

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาวิจัยที่มีผลต่อการคัดเลือกและเก็บรักษาสายพันธุ์ในกะเพราแดง
โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



เลขหม.....
เลขทะเบียน..... 47304
วัน, เดือน, ปี..... 27 ส.ย. 2546

b.....
i.....

โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study of the Effects on Selection and Collection of Red *Ocimum sanctum* Linn.
by Tissue Culture Technique



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ เรื่อง

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการคัดเลือกและเก็บรักษาสายพันธุ์ใน
กะเพราแดง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย

นาย กัมปนาท สุทธิพงษ์
นาย รุทธ์ มณีประเสริฐ

ภาควิชา

ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. กนกพร สมพรไพหลิน

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

	คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม		
กรรมการ ดร. กนกพร สมพรไพหลิน		
กรรมการ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี		



รศ.ดร. นवलพรรณ ณะระนอง

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ เรื่อง การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการคัดเลือกและเก็บรักษาสายพันธุ์ใน กะเพราแดง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย นาย กัมปนาท สุทธิพงษ์
นาย รุทธ์ มณีประเสริฐ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะเพราแดง (*Ocimum sanctum* Linn.) พบว่าเนื้อเยื่อส่วนข้อให้ผลชักนำยอดและรากได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA/BA (0.25/0.5 มิลลิกรัม/ลิตร) มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งในที่นี้เราได้ศึกษาถึงความเข้มข้นของน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (2, 3, 4 , 5 เปอร์เซ็นต์) และระยะเวลาการขาดอาหารพบว่า ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น จาก 2 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการขาดสารอาหารมีผลให้เกิดการสะสมของ ผลผลิตแอนโทไซยานินของต้นกะเพราแดง จากการผลิตอาหารสูตร 0.75x B5 เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาต้นกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title A Study of the Effects on Selection and Collection of Red *Ocimum sanctum* Linn. by Tissue Culture Technique

Name Mr. Kampanat Suthipong

Mr. Rut Maneprasert

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic Year 2002

Special Project Advisor Dr. Kanokporn Sompornpailin

ABSTRACT

Tissue culture of red *Ocimum sanctum* Linn. shows successive embryogenesis from node cultured in MS medium containing NAA/BA (0.25/0.5 mg/ml). Many factors have effected on anthocyanin biosynthesis. In this study, The MS medium with various sugar concentrations (2, 3, 4, 5%) and period of nutrient deficiency have been observed. The results show that increasing sugar concentration (from 2 to 5%) and period of nutrient deficiency enhanced the accumulation of anthocyanin products in red *O. sanctum* Linn. The collection of red *O. sanctum* Linn. by tissue culture technique shows highest quality in 0.75x B5 medium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ดร. กนกพร สมพรไพลิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ อุปกรณ์ในการทำการทดลองต่างๆ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทาน แก้ไขทางด้านภาษา และให้คำแนะนำในด้านต่างๆ ในการทำโครงการพิเศษนี้ ผศ. นวรัตน์ ปานเยี่ยม ประธานกรรมการ สอบโครงการพิเศษ และ ดร.พนา โทหะทรัพย์ทวี กรรมการพิจารณาโครงการพิเศษ ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆด้วย รวมทั้ง คุณ ประเสริฐวิทย์ แพ่งคำ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆรวมทั้งคำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่างๆด้วย

สุดท้าย คณะผู้จัดทำขอขอบคุณบิดามารดา รุ่นพี่และเพื่อนๆ ที่ให้คำแนะนำ ให้การช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการจัดทำโครงการพิเศษนี้



กัปนาท สุทธิพงษ์

รุทธ์ มณีประเสริฐ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีดำเนินการ	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	16
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก ก	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 3.1 สูตรอาหาร MS ที่แปรผันฮอร์โมน	15
ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของข้อตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์	18
ตารางที่ 4.2 ผลการเปลี่ยนแปลงของใบตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างหลักทางเคมีของแอนโทไซยานิน	4
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติ	4
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ Acylated anthocyanin	5
รูปที่ 2.4 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารแอนโทไซยานิน 3 ชนิดคือ เพลลาโกนินดิน, ไซยานิดิน และเคลพินินดิน	6
รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอช	7
รูปที่ 2.6 วิธีชีวสังเคราะห์ของแอนโทไซยานิน	9
รูปที่ 4.1 ผลการเปลี่ยนแปลงของข้อตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์	17
รูปที่ 4.2 ผลการเปลี่ยนแปลงของใบตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์	19
รูปที่ 4.3 ต้นกะเพราที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีปริมาณน้ำตาลต่างกัน	21
รูปที่ 4.4 สีของสารที่สกัดได้จากต้นกะเพราที่เจริญบนอาหาร MS ซึ่งมีปริมาณน้ำตาล 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์	22
รูปที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของต้นกะเพราที่เจริญบนอาหาร MS ซึ่งมีปริมาณน้ำตาล 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์	22
รูปที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของต้นกะเพราที่เจริญในวัสดุปลูกที่ปราศจากอาหาร	23
รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโตของต้นกะเพราในอาหารสูตร MS และ B5 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์	24
รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของต้นกะเพราในอาหารสูตร MS และ B5 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

กะเพรา (Holy basil) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum sanctum* Linn. เป็นพืชในวงศ์ LABITAE มีชื่อท้องถิ่นว่า กอมก้อ กอมก้อดง ห่อตูปลู เป็นต้น ลักษณะเป็นไม้พุ่มเตี้ยทุกส่วนของต้นมีกลิ่นหอม ขนาดสูงประมาณ 60 เซนติเมตร เนื้อไม้ส่วนโคนต้นเป็นไม้เนื้อแข็งใบมีขนปกคลุม ออกดอกเป็นช่อ นิยมปลูกในเขตเมืองร้อน ปัจจุบันมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย นอกจากจะใช้เป็นสารประกอบของอาหารแล้วยังมีคุณค่าทางเภสัช กะเพราซึ่งปลูกในประเทศไทยปัจจุบันมี 2 สายพันธุ์ คือกะเพราเขียวและกะเพราแดง ซึ่งกะเพราแดงนิยมใช้สกัดสารเนื่องจากออกฤทธิ์ทางยาที่สูงกว่าเพราะสามารถผลิตสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสารกลุ่มเม็ดสีซึ่งให้สีแดง และ น้ำเงินในเนื้อเยื่อดอก และใบของพืช เป็นที่ทราบกันดีว่า สารกลุ่มนี้มีคุณค่าทางเสริมสุขภาพ และเภสัช เวช เช่น ให้ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดปริมาณกลอเรสเตอรอล และการเกิดมะเร็ง การสะสมของแอนโทไซยานินในพืชนั้นถูกควบคุมโดยสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ สารอาหาร และสภาวะเครียดอื่นๆ แอนโทไซยานินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อ UVB การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่างเมื่อพืชได้รับการรบกวนจากเชื้อโรค (Lo และ Nicholson, 1998) เช่นเดียวกับข้าวโพดซึ่งมีรายงานของการสะสมสารกลุ่มนี้เมื่อถูกหนอนรบกวน (Ferrerres และคณะ, 1997)

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการคัดเลือกสายพันธุ์กะเพราแดง ที่ผลิตสารแอนโทไซยานินได้สม่ำเสมอและปริมาณสูงมาใช้ในการทดลอง ศึกษาถึงการเก็บและขยายสายพันธุ์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาการแยกยีนในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของฮอร์โมนกลุ่มออกซินและไซโตไคนินต่อการเจริญของเนื้อเยื่อกะเพราแดง
2. ศึกษาสภาวะเครียดที่มีผลต่อการผลิตสารแอนโทไซยานิน
3. ศึกษาระดับความเข้มของสูตรอาหารต่อการเก็บรักษาสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของโครงการพิเศษ

การเพาะเลี้ยงกะเพราแดงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์และการเก็บรักษาสายพันธุ์ในระดับเล็ก สำหรับใช้ในการแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

วิธีดำเนินงานโดยสังเขป

1. คัดเลือกสายพันธุ์ โดยคัดเลือกสายพันธุ์กะเพราแดงจากท้องตลาดและแหล่งธรรมชาติต่างๆ ซึ่งให้สารแอนโทไซยานินในกะเพราแดงโดยระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เพิ่มปริมาณต้นกะเพราโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์สูตร MS
3. ศึกษาระดับของฮอร์โมน NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อจากต้นกะเพราแดง
4. ศึกษาสภาวะเครียดที่มีผลต่อการผลิตสารแอนโทไซยานิน
5. ศึกษาระดับความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการเก็บรักษาสายพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. แนวทางการคัดเลือกกะเพราแดงเพื่อใช้ในการทดลอง โดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
1. แนวทางการเพาะเลี้ยงกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณและเก็บรักษาสายพันธุ์
2. ระดับของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ของกะเพราแดง
3. ระดับน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแอนโทไซยานิน
4. ผลของสภาวะขาดอาหารต่อการผลิตสารแอนโทไซยานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

สีสันทันของ ต้น ใบ ดอก ผล ราก เมล็ดของพืชชั้นสูง เกิดจากเม็ดสีหรือรงควัตถุ (Pigment) ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิดคือ

คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) ให้รงควัตถุสีเขียว พบในใบ หรือในต้น กิ่ง ราก

แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) ให้รงควัตถุสีเหลือง ส้ม แดง พบมากที่ใบ โดยในฤดูใบไม้ร่วงของประเทศแถบที่มีอากาศหนาวเย็น ใบบ้านเราพบในผลมะเขือสุก ผลแตงโม หัวแครอท รวมทั้งพบในดอกไม้ เช่น ดาวเรือง ทานตะวัน

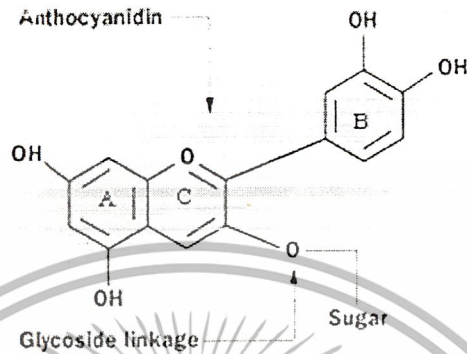
ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ให้รงควัตถุสีเกือบทุกสี ยกเว้นสีเขียว สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) และ ฟลาโวน (Flavones) หรือ ฟลาโวนอล (flavonols) สารในกลุ่มนี้พบมากในดอกไม้ ผลไม้ นอกจากนี้ยังพบแอนโทไซยานินในใบและส่วนอื่นๆของพืชอีกด้วย

คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ได้รับการศึกษามาเป็นระยะเวลาช้านาน เพราะทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง ส่วนสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เพิ่งได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้ เนื่องจากในระยะแรก สารกลุ่มนี้ถือเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช ไม่ใช่สารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ต่างๆโดยตรง จนกระทั่งระยะหลังมีการค้นพบว่า สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะแอนโทไซยานินนั้น นอกจากจะเป็นสารที่ทำให้ดอกไม้มีสีสันสวยงามแล้วยังป้องกันพืชไม่ให้ได้รับอันตรายจากสิ่งแวดล้อม และจากการทำลายของแมลงต่างๆอีกด้วย มีการสกัดสารแอนโทไซยานินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหรืออุตสาหกรรมเครื่องสำอางมากมาย และที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบันก็ได้แก่คุณสมบัติที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพ

แอนโทไซยานินมีชื่อมาจากรากศัพท์เดิมของกรีกคือ anthos แปลว่า ดอกไม้ และ kyanos แปลว่าสีน้ำเงิน แอนโทไซยานินจึงหมายถึง ดอกไม้สีน้ำเงิน ซึ่งในปัจจุบันพบว่านอกจากสีน้ำเงินแล้วยังมีสีม่วงและสีแดงอีกด้วย แอนโทไซยานินพบในดอกไม้แทบทุกชนิด ยกเว้นในพืชพวกตะบองเพชร ผักกาดหัวและผักโขม ในพืชจำพวกส้มและพวกสาหร่ายก็ไม่มีแอนโทไซยานินเช่นกัน ปัจจุบันมีการค้นพบสารแอนโทไซยานินมากกว่า 300 ชนิดจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบแล้วมากกว่า 7,000 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีสีสันทันแตกต่างกันออกไป

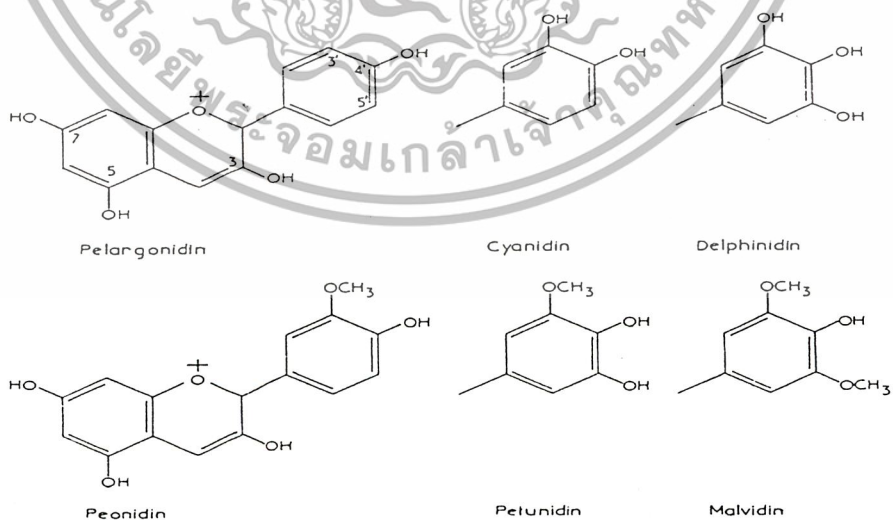
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างของแอนโทไซยานิน



รูปที่ 2.1 โครงสร้างหลักทางเคมีของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินประกอบด้วยโมเลกุลที่มีน้ำตาลและโมเลกุลที่ไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบที่เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidins) แอนโทไซยานิดินนี้ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2 วง เชื่อมกับวงแหวนที่มี 5 คาร์บอนกับออกซิเจน 1 อะตอม ชนิดแอนโทไซยานินจะแตกต่างกันไปตามลักษณะดังต่อไปนี้ ประการแรกคือ จำนวนและชนิดของกลุ่มสารที่ติดกับวงแหวนของแอนโทไซยานิดิน ทั้งหมดไฮดรอกซิล (Hydroxyl group -OH) หรือหมู่เมทอกซี (methoxy group -OCH₃) ประการที่สอง น้ำตาลซึ่งจัดเรียงตัวเป็นพันธะไกลโคไซด์ (glycoside linkage พันธะระหว่างน้ำตาลกับแอนโทไซยานิดิน)

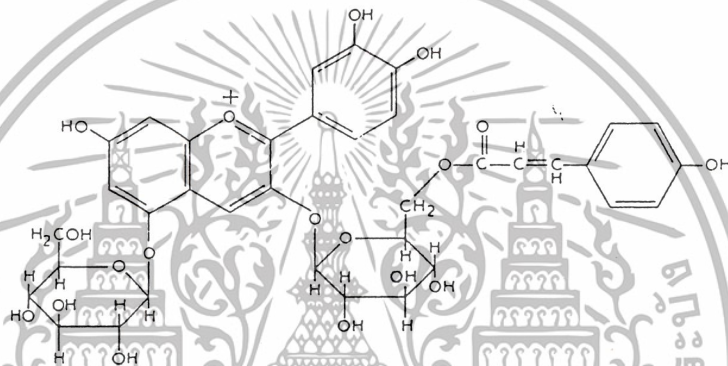


รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิดินส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 2.2 สาร 3 ตัวแรก เป็นแอนโทไซยานินที่พบโดยทั่วไป โดยแต่ละตัวจะต่างกันที่จำนวนหมู่ไฮดรอกซีบนวง B ส่วนอนุพันธ์ที่มีหมู่เมทิล จะพบในดอกไม้มากกว่าในผลไม้

น้ำตาลที่อยู่ในโมเลกุลของแอนโทไซยานินทำให้แอนโทไซยานินมีความเสถียรและทำให้สามารถละลายน้ำได้ ในบางกรณีน้ำตาลจะถูกอะซิลเลท (Acylate) ด้วยหมู่เอซิด (acyl group) ซึ่งได้มาจากกรดอะซิติกหรือ กรดซินนามิก (cinnamic acid เช่น *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid หรือ sinapic acid)



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างโครงสร้างของแอนโทไซยานินซึ่งถูกอะซิลเลท (Acylated anthocyanin)

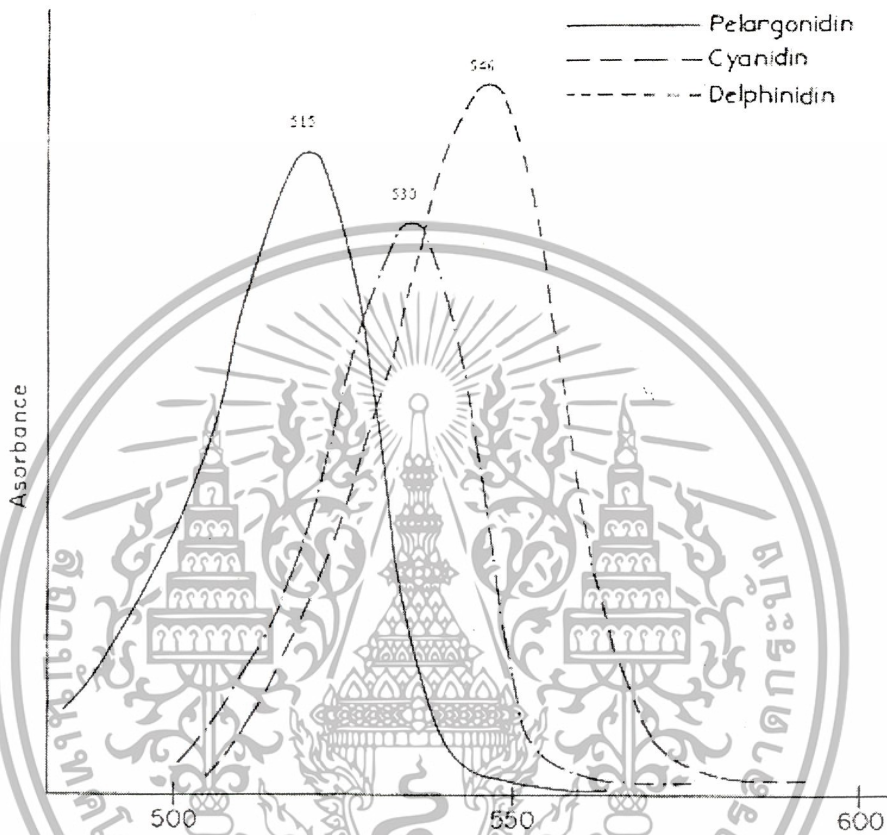
คุณสมบัติของแอนโทไซยานิน (สัมพัทธ์, 2546)

1. การดูดกลืนแสง

แอนโทไซยานินจะมีสีเข้มขึ้นเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกรด สามารถแบ่งค่าการดูดกลืนแสงได้เป็น 2 ช่วง คือ ช่วงความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ อยู่ระหว่าง 465-550 นาโนเมตร และช่วงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet) มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 270-280 นาโนเมตร

ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นได้ของเม็ดสีกลุ่มหลัก ได้แก่ เพลาгонินิดิน (Pelargonidin), ไชยานินิดิน (Cyanidin) และ เดลฟินิดิน (Delphinidin) แสดงดังรูปที่ 2.4 คือที่ 515, 530 และ 546 นาโนเมตร (Xiaoyan, 2001) สีของเพลาгонินิดิน คือสีส้มแดง ส่วนของไชยานินิดิน คือสีแดง และของเดลฟินิดินเป็นสีม่วงคราม ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดนี้ จะเปลี่ยนแปลงตามคุณสมบัติของสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารแอนโทไซยานินสามชนิดคือ เพลาгонินิน ไชยานิน และเดลฟินิน

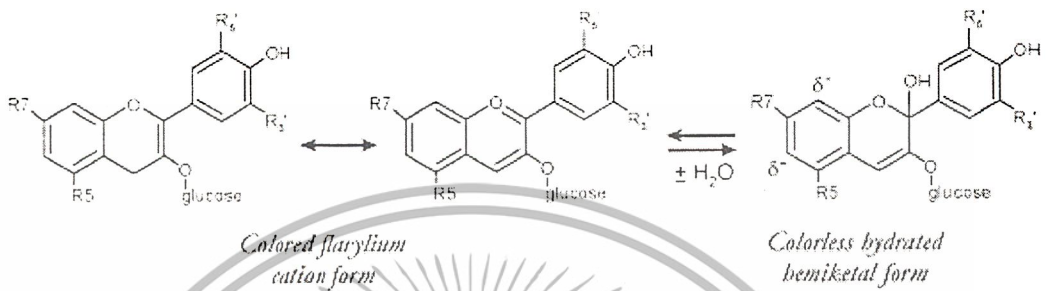
การเกิดอะซิลเลชัน (Acylation) ของน้ำตาลของแอนโทไซยานิน โดยกรดพวกหมู่ซึนามิก ทำให้เกิดพีค (peak) เพิ่มขึ้นในช่วงของ ultraviolet ที่ 310-335 นาโนเมตร

2. คุณสมบัติทางเคมี

แอนโทไซยานินเป็นตัวชี้บ่ง (Indicator) ในสารละลาย สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามพีเอช ที่พีเอชเท่ากับ 1 แอนโทไซยานินจะมีสีเข้มมาก เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น สีของแอนโทไซยานินจะค่อยๆ ซีด จนไม่มีสีเกิดเป็นซูโดเบสฟอร์ม (pseudobase form) ในสภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อยจะเกิดเป็นบลูแอนไฮโดรเบสฟอร์ม (blue anhydrobase form) ปฏิกิริยานี้สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนกระทั่งในสภาวะที่เป็นค่าแรงจึงไม่สามารถเปลี่ยนกลับได้ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เกิดในแอนโทไซยานินเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอช แสดงให้เห็นดังรูป 2.5



รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอช

วิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

1. การสกัด

การวิเคราะห์ด้วยการสกัดนี้ต้องระวังเนื่องจากแอนโทไซยานินไม่คงที่เมื่ออยู่ภายใต้แสงที่เข้ม, ที่ที่มีอุณหภูมิสูง และในสารละลายที่เป็นน้ำ รงควัตถุสามารถสกัดได้โดยวิธีโฮโมจีไนส์ซิ่ง (Homogenizing) ของพืชตัวอย่าง ในเมทานอล ที่มี 1% ไฮโดรคลอริก (HCl) (Xiaoyan และคณะ, 2001) ถ้าสารสกัดที่ได้มีลักษณะขุ่นสามารถนำไปกรองหรือปั่นเหวี่ยงได้

2. Column Chromatography

ก่อนที่จะหยดสารสกัดลงบนกระดาษหรือ Thin-layer adsorbents สำหรับทำการแยกแต่ละรงควัตถุออกจากกัน ต้องทำให้สารสกัดเข้มข้นก่อน และควรทำในที่อุณหภูมิต่ำเพื่อหลีกเลี่ยงการถูกทำลาย ตัวดูดซับ (Adsorbent) ที่ใช้โดยทั่วไปใน Column chromatography คือ Cation-exchange resin, Alumina, Polyamide, Polyvinylpyrrolidone (PVP), Formophenolic resin ในปัจจุบันนิยมใช้ Ion-exchange resin ทำให้แอนโทไซยานินบริสุทธิ์ ในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของแอนโทไซยานินในสตรอเบอร์รี่และองุ่น จะใช้ Polyvinylpyrrolidone (PVP) และสามารถใช่ Polyamide column ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบ และแยกแอนโทไซยานินซึ่งถูกอะซิลเลทได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิธีการวิเคราะห์ห่อนุพันธ์ของแอนโทไซยานิน

3.1 การตรวจสอบอนุพันธ์ของน้ำตาล

โดยไฮโครไลส แอนโทไซยานินด้วยกรดในน้ำเดือด 30 นาที เพื่อที่จะได้อะไกลโคน (Aglycone) และ น้ำตาลออกมา สกัดแอนโทไซยานินด้วยเอมีลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol) และอาจใช้การวิเคราะห์น้ำตาลช่วย น้ำตาลที่ได้จะอยู่ใน ชั้นน้ำ(aqueous phase) หลังจากนั้น ล้างด้วยเอมีนเพื่อเอกรดอกแล้ว แยกน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และตรวจสอบน้ำตาลโดยวิธีทั่วไป

3.2 การตรวจสอบอนุพันธ์ของหมู่เอซิล

กรดของเม็คลีสี่ที่มีหมู่เอซิลเกาะอยู่ จะวิเคราะห์โดยการไฮโครไลซิสด้วยด่างอ่อนๆ และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทั่วไปหรือใช้ HPLC

ชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Holton และ Cornish, 1995)

แอนโทไซยานินเกิดจากการรวมตัวกันระหว่าง Phenylalanine (C_9) ซึ่งได้จาก shikimic acid pathway กับ 3 โมเลกุลของ malonyl-CoenzymeA (C_3) สารสองตัวนี้ต่างก็เริ่มมาจาก Acetate (C_2) ที่เกิดจากขบวนการสังเคราะห์แสง โดยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เกิดเป็นสารตัวกลาง naringenin chalcone ซึ่งมีสีเหลืองโดยกลไก polyketide folding ที่พบในพืชทั่วไป จากนั้นเป็นการทำ isomerization ของ chalcone โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) จะให้สาร naringenin flavanone ซึ่งปราศจากสีจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ Flavanone 3-hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอล (dihydroflavonol) คือสารไฮโดรเคเอ็มเฟินอล (dihydrokaempferol) โดยสารนี้อาจได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งต่างๆเพิ่มเติม โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) และให้สารกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอลชนิดอื่นเพิ่มเติมได้แก่ ไดไฮโดรเคอควีทิน (dihydroquercetin) และ ไดไฮโดรเมอริซีทิน (dihydromyricetin) จำนวนหมู่ไฮดรอกซีนีมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเม็คลีสี่ที่ต่างกัน เช่น แดง น้ำเงิน ส้ม สารกลุ่ม ไดไฮโดรฟลาโวนอล ต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ขั้นตอน สำหรับเปลี่ยนเป็นสารมีสีกลุ่มแอนโทไซยานิน เริ่มจากการกระตุ้นการรีดิวซ์สารกลุ่มนี้ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) และให้สารกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิดิน (leucoanthocyanidin) ได้แก่ ลิวโคไซยานิดิน (leucocyanidin) , ลิวโคเพลาโกนิดิน (leucopelargonidin) , ลิวโคเคลฟีนิดิน (leucodelphinidin) ซึ่งจะถูกออกซิเดชัน , ดีไฮดรชัน และไกลโคซิลเลชัน ให้สารกลุ่มแอนโทไซยานินซึ่งให้เม็คลีสี่แตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน นอกจากนี้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาต่างๆเพิ่มเติมเช่น ไกลโคซิลเลชัน, เมทิลเลชัน และ เอซิลเลชันทำให้มีความแตกต่างเล็กน้อยภายในโมเลกุล จะให้สีเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป



รูปที่ 2.6 วิธีชีวสังเคราะห์ของแอนโทไซยานิน (Sullivan, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมสารแอนโทไซยานินในพืช

1. การชักนำด้วยแสง (photo induction)

เนื่องมาจากแสงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตสารแอนโทไซยานิน ดังนั้นการวิจัยส่วนใหญ่ของแอนโทไซยานินจึงมุ่งศึกษาถึงการชักนำด้วยแสง โดยศึกษาแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง UV ช่วงที่มองเห็นได้ และช่วง far-red มีการทำวิจัยเพื่อสนับสนุนเรื่องการชักนำด้วยแสง โดยทำการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่มีดี (Dong และคณะ, 1998) มีการศึกษาที่ให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาแรก โดยพบว่าปริมาณรังสี UVB ที่มากเกินไปจะทำให้ DNA เสียหาย และยับยั้งการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Buchholz และคณะ, 1995)

จากการศึกษาในพืชสายพันธุ์ต่างๆ ทำให้สามารถแบ่งนักวิจัยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่า การสังเคราะห์แอนโทไซยานินจะถูกชักนำโดยตัวรับแสง UVB (Reddy และคณะ, 1994) และอีกกลุ่มหนึ่งที่มีข้อโต้แย้งว่า การชักนำนั้นเกิดขึ้นโดยผ่านการทำงานร่วมกันของตัวรับแสง UVB, phytochrome และ cryptochrome บางตัว (Kubasek และคณะ, 1992) มีหลักฐานที่สนับสนุนข้อสันนิษฐานแรกโดย Brandt และคณะ (1995) พบว่าต้นมะเขือเทศ ที่กลายพันธุ์ โดยขาด phytochrome มีการสะสมของแอนโทไซยานินหลังจากได้รับแสง UVB เช่นเดียวกับการทดลองของ Krizek และคณะ (1998) ที่พบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานินในใบผักกาดหอมที่ไม่ได้รับแสง UVB มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และจากการทดลองของ Ambashit และ Agrawal (1995) พบว่า ข้าวโพดที่เจริญในธรรมชาติจะสะสมแอนโทไซยานินหลังจากได้รับแสง UVB

แต่จากการทดลองของ Mol และคณะ (1996) ได้เสนอว่า phytochrome มีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เช่นเดียวกับตัวรับแสงอื่นๆ ซึ่งขัดแย้งกับสมมติฐานแรก

2. การชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ (cold temperature induction)

การศึกษาเกี่ยวกับการชักนำแอนโทไซยานินโดยใช้อุณหภูมิต่ำพบว่าการชักนำให้เกิดแอนโทไซยานินในต้นอ่อนของ *Arabidopsis* (Leyva และคณะ, 1995), *Sorghum* (Shichijo และคณะ, 1993), *Poncirus* (Tignor และคณะ, 1997) และข้าวโพด (Christie และคณะ, 1994), ใบของ *Cotinus* (Oren-Shamir และ Levi-Nissim, 1997) และ *Pinus* (Krol และคณะ, 1995), ถึงอ่อนอายุ 1 ปีของ *Diospiros* (Leng และคณะ, 1993) และเซลล์พาราเรโนโคมาของ *Fagus sylvatica* (Schmucker, 1947) โดย Christie และคณะ (1994) กล่าวว่า วิธีชีวสังเคราะห์ของแอนโทไซยานินมีความเกี่ยวข้องกับ *cor* gene (cold-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

regulation) แต่ก็มีข้อสังเกตว่าที่อุณหภูมิต่ำมากๆจะทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินได้ และจากการศึกษาของ Mckown และคณะ(1996) สนับสนุนว่าการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและการทนต่ออุณหภูมิที่เย็นจัด มีความเกี่ยวข้องกันทั้งในด้านวิถีสังเคราะห์และวิถีในการควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำและไม่มีแสงจะไม่มีสารสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกิดขึ้น เช่นเดียวกับข้อสรุปของ Mol และคณะ (1996) ที่ว่า กลไกการชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำและบทบาทหน้าที่ของแสงต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้นยังคงไม่สามารถอธิบายได้

3. การชักนำทางด้านออสโมติก (Osmotic induction)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหลายชนิดพบว่า การสะสมของแอนโทไซยานินเกิดเนื่องมาจากสภาวะเครียดทางออสโมติก (osmotic stress) โดยการชักนำของกลูโคส (Tholalabavi และคณะ, 1994) ซูโครส (Comier และคณะ, 1989) และแมนนิทอล (Tholalabavi และคณะ, 1997)

จากการทดลองในต้นพืชก็ให้ผลที่คล้ายกัน โดยพบว่าการสะสมแอนโทไซยานินจะถูกชักนำให้เกิดขึ้นในสภาพที่เป็นเกลือ เช่น ในรากของข้าวโพด (Kalamoorthy และ Rao, 1994), ใบของ *Monis alba* (Ramanjulu และคณะ, 1993) และในลำต้นส่วนล่างของต้นอ่อนของ *Casuarina equisetifolia* (Butt และคณะ, 1991) ส่วนใน *Arabidopsis* (Mita และคณะ, 1997), *Terminalia catappa* (Dube และคณะ, 1993) และใบของ *Hedera helix* (Murray และคณะ, 1994) จะสะสมแอนโทไซยานินเมื่อเลี้ยงในอาหารที่น้ำตาลชนิดต่างๆ

จากการศึกษาที่เกี่ยวข้องพบว่า ในสภาวะที่แห้งแล้ง ต้นอ่อนของถั่ว Cowpea (Balakumar และคณะ, 1993) และพืชล้มลุก (Fherwin และ Farrant, 1998) จะมีระดับของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และในใบของต้น *Malus* และ *Pyrus* ที่ถูกน้ำท่วมพบว่ามีปริมาณของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น (Anderson และคณะ, 1984) ซึ่งอาจเกิดจากมีการกระตุ้นการทำงานของราก ส่งผลให้บริเวณใบเกิดสภาวะเครียดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ปัจจัยชักนำอื่นๆ (Other induction factors)

ความหลากหลายของปัจจัยต่างๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมล้วนมีความสัมพันธ์กับการชักนำ การสะสม หรือการยับยั้งแอนโทไซยานิน (Graham, 1998) การขาดแคลนไนโตรเจน (Bongue-Bartelsman และ Phillips, 1995), ฟอสฟอรัส (Dedaldechamp และคณะ, 1995) หรือขาดทั้งสองอย่างพร้อมกัน (Liskova และคณะ, 1989) อาจเป็นสาเหตุให้มีการเพิ่มขึ้นของแอนโทไซยานิน เช่นเดียวกับที่ระดับ pH ต่ำๆ (Suzuki, 1995), การบาดเจ็บ (Ferrerres และคณะ, 1997), การติดเชื้อ (Dixon และคณะ, 1994) โดย Gläufigen และคณะ (1998), Gleitz และคณะ (1991) และ Lo และ Nicholson (1998) ได้บันทึกไว้ว่า การสังเคราะห์แอนโทไซยานินจะถูกยับยั้ง เมื่อพืชมีการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา และเมื่อทำการเลี้ยงต้นอ่อนด้วยสารปราบวัชพืช เช่น alachlor และ rimsulfuron พบว่าการยับยั้งการสะสมของแอนโทไซยานิน (Nemat-Alla และ Younis, 1995) เช่นกัน

ส่วนผลกระทบที่เกิดจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจากภายนอกต่อการสะสมแอนโทไซยานินนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่พบว่าฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน สามารถชักนำให้เกิดแอนโทไซยานินในเซลล์เพาะเลี้ยง (Sakamoto และคณะ, 1994) และในต้นพืช (Deikman และ Hammer, 1995) และยังมีการศึกษาเกี่ยวกับผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดแอบไซซิก (abscisic acid, ABA) (Mumford, 1990) ซึ่ง Famrini และคณะ (1993) พบว่าการขาดแคลนกรดแอบไซซิก จะป้องกันไม่ให้เกิดการผลิตแอนโทไซยานินขึ้น

ประโยชน์ของแอนโทไซยานิน

1. ช่วยในการผสมเกสร

การผสมเกสรพันธุ์สามารถพัฒนาโครงสร้างพันธุ์อยู่ต่อไป พืชต้องมีการพัฒนาให้ส่วนของใบ ดอก มีสีส้มสวยงามเพื่อช่วยดึงดูดแมลง หรือมีรูปทรงเอื้ออำนวยต่อการผสมเกสร เช่นการทำให้สีดอก มีสีส้มสวยงาม เป็นต้น เนื่องจากแอนโทไซยานินดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงรังสีอัลตราไวโอเล็ต

2. ช่วยดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ต

รังสีนี้มีความยาวคลื่นสั้น จึงมีพลังงานสูงเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต จัดขวางการจำลองตัวของ ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม และมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนขึ้น หรืออาจถึงขั้นกลายพันธุ์ ในธรรมชาติ สารแอนโทไซยานินซึ่งอยู่ในเซลล์บริเวณรอบนอกของส่วนต่างๆ ของพืชจะคอยดูดซับหรือกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ตไว้ ทำให้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ไม่ได้รับอันตราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ช่วยลดระดับอนุมูลอิสระ

โดยทำหน้าที่เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกระบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) ในแง่ของประโยชน์ด้านโภชนาการสารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันโดยยับยั้งการรวมตัวระหว่าง ออกซิเจนกับคลอเรสเตอรอล ชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL-cholesterol) ซึ่งเป็นไขมันที่ไม่พึงประสงค์ในขณะเดียวกันก็ช่วยเพิ่มปริมาณของคลอเรสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูง (HDL-cholesterol) ซึ่งเป็นไขมันที่ดีมีประโยชน์ให้สูงขึ้น

4. ใช้ในการจัดหมวดหมู่จำแนกพันธุ์พืช

เนื่องจากสารแอนโทไซยานินมีอยู่มากมายในร้อยชนิด นักอนุกรมวิธานจึงได้นำเอาไปใช้ประโยชน์ของความหลากหลายนี้มาช่วยจำแนกพันธุ์พืช โดยพืชในกลุ่มเดียวกันจะมีสารแอนโทไซยานินชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

5. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง

มีการนำความรู้เกี่ยวกับสารแอนโทไซยานินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง ตลอดเวลาทั้งในด้านคุณภาพและการเก็บรักษาเช่น การแปรรูปอาหารต้องคงคุณค่าของสารแอนโทไซยานินให้คงเดิม การเก็บหรือการบรรจุผลิตภัณฑ์ ต้องทำโดยกรรมวิธีที่จะไม่ทำให้คุณสมบัติของสารนี้เปลี่ยนไป รวมถึงการสกัดสารเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการทำสีผสมอาหารในรูปแบบต่างๆทำให้มีสีสันน่ารับประทาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. การคัดเลือกสายพันธุ์กะเพราแดง

3.1.1 การคัดเลือกจากต้นกะเพราแดงในธรรมชาติ

โดยคัดเลือกจากต้นกะเพราแดงในตลาดและในธรรมชาติหลายๆที่ โดยสังเกตจากสีของใบกะเพราแดง จากนั้นนำเมล็ดกะเพราแดงจากต้นที่คัดเลือกแล้ว มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

3.1.2 การคัดเลือกต้นกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดกะเพราแดงจากต้นที่คัดเลือกแล้วในข้อ 3.1.1 มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหาร MS (ภาคผนวกก) โดยมีวิธีการพอกฆ่าเชื้อดังนี้

- 1) นำเมล็ดกะเพราแดงใส่ในหลอดขนาด 1.5 มล.
- 2) เติมสารละลาย คลอโรกซ์ 100% (โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 6%) ลงไป 1 มล.
- 3) เขย่าหรือใช้เครื่อง Vortex เป็นเวลา 20 นาที
- 4) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เมล็ดตกลงมาที่ปลายหลอด
- 5) คูดสารละลายทิ้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ
- 6) นำไปเขย่าอีกประมาณ 5 นาที เทน้ำกลั่นออก
- 7) ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 8-9 รอบ
- 8) นำเมล็ดที่ได้ไปวางบนอาหาร MS ที่เตรียมไว้
- 9) นำไปเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและมีการควบคุมแสง โดยให้แสง 16 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง ความเข้มแสง 700 ลักซ์

บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและต้นที่มีสีแดง

3.2. ทักษะระดับของฮอร์โมน NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อของต้นกะเพราแดงเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์

นำส่วนใบและข้อของต้นกะเพราแดงจากสภาพปลอดเชื้อ (ข้อ 3.1.2) อายุ 4 สัปดาห์ มาวางไว้บนอาหาร MS ที่แปรผันสูตรของฮอร์โมน ดังตาราง 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหาร MS ที่แปรผันฮอร์โมน

NAA(mg/l)	0.25	0.5	0.75	1.0
BA (mg/l)				
0.25	1	2	3	4
0.5	5	6	7	8
0.75	9	10	11	12
1.0	13	14	15	16

จากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของชิ้นเนื้อเยื่อต่อการตอบสนองต่ออาหาร MS ที่มีฮอร์โมนแตกต่างกัน บันทึกผลการทดลองทุกๆ สัปดาห์ แต่แสดงผลการทดลองที่ 4 สัปดาห์เท่านั้น

3.3. ศึกษาภาวะเครียดที่มีผลต่อการผลิตสารแอนโทไซยานิน

3.3.1 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

นำต้นอ่อนกะเพราแดงอายุ 4 สัปดาห์ มาวางบนอาหาร MS ที่แปรผันปริมาณน้ำตาล 2%, 3%, 4% และ 5% เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นกะเพราแดงมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ ที่มี กรดไฮโดรคลอริก 1% โดยใช้ปริมาตร 1 มล./ 0.05 กรัม น้ำหนักสด แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ หลังจากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 515 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ ไซยานิดิน และ เพลลาโกนินดินตามลำดับ

3.3.2 สภาพขาดธาตุอาหาร

นำต้นอ่อนกะเพราแดงที่มีอายุ 4 สัปดาห์มาเพาะเลี้ยงในสถานะที่ไม่มีอาหาร โดยนำต้นอ่อนกะเพราแดงไปวางบนกระดาษทิชชูแล้วเติมน้ำให้พอชุ่ม เพื่อศึกษาภาวะตอบสนองของการผลิตสารแอนโทไซยานินต่อสภาวะการขาดอาหาร หลังจากนั้นนำต้นกะเพรามาวเคราะห์สารแอนโทไซยานินทุกๆ 1 สัปดาห์ ตามวิธี 3.3.1 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโทไซยานินที่ได้

3.4. ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาสายพันธุ์

นำต้นอ่อนกะเพราแดงมาเลี้ยงในอาหาร MS และ B5 (ภาคผนวก ก) ที่มีความเข้มข้นอาหารต่างๆกัน ดังนี้คือ 0.5 เท่า, 0.75 เท่า และ 1 เท่า สังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงลักษณะของต้นและใบเปรียบเทียบกันระหว่างต้นที่เลี้ยงในอาหาร MS และ B5 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1. ผลการคัดเลือกกะเพราแดง

4.1.1 ผลการคัดเลือกจากธรรมชาติ

จากการที่ได้ทำการคัดเลือกต้นกะเพราแดง ทั้งในตลาดและในธรรมชาติ ทางคณะวิจัยได้เลือกต้นกะเพราแดงจาก อำเภอชะอำ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งให้ลักษณะใบสีแดงเข้ม

4.1.2 ผลจากการคัดเลือกต้นกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ


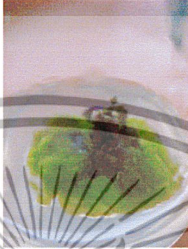









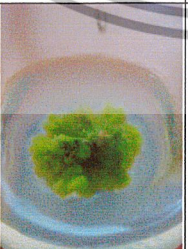


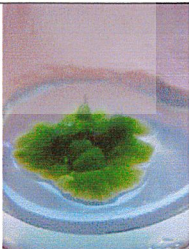
เมื่อนำเมล็ดกะเพราแดงมาฟอก แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร MS ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วปรากฏว่ามีต้นกะเพราแดงเพียง 4% เท่านั้นที่มีลักษณะสีม่วงปนแดงทั้งต้น นอกนั้นเป็นต้นที่มีลักษณะสีแดงตรงก้านเท่านั้น ต้นที่มีสีม่วงปนแดงทั้งต้น มีการเจริญเติบโตช้ามาก จึงไม่เพียงพอต่อการขยายพันธุ์เพื่อใช้สำหรับการทดลอง ดังนั้นในการทดลองจึงใช้ต้นกะเพราแดงที่มีสีแดงตรงก้านเท่านั้น เนื่องจากมีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ สามารถนำไปทำการขยายพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดลองได้

4.2. ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกะเพรา

ส่วนของข้อกะเพราจะเริ่มพัฒนาไปเป็นแคลลัส จากนั้นส่วนที่มีตาข้างจะเริ่มแตกยอดออกมา โดยเฉพาะในอาหารสูตร 5 ซึ่งประกอบด้วยฮอร์โมน NAA /BA (0.25 ต่อ 0.5 mg/ml) ให้ยอดเฉลี่ยสูงสุด 6 ยอด ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BA ในช่วง 0.5 -0.75 mg/ml มีแนวโน้มการพัฒนาให้เกิดยอด แต่ที่ระดับฮอร์โมน BA 0.5 mg/ml มียอดเฉลี่ยสูงสุดและให้ยอดที่คล้ายธรรมชาติและที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน NA 0.25 mg/ml มีแนวโน้มการพัฒนาเป็นรากที่สมบูรณ์

ส่วนของใบ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงจะให้ผลเช่นเดียวกับข้อ แต่จำนวนยอดเฉลี่ยต่ำกว่า และลักษณะยอดที่ได้ไม่สมบูรณ์นัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NAA(mg/l) \ BA (mg/l)	0.25	0.5	0.75	1.0
0.25	 1	 2	 3	 4
0.5	 5	 6	 7	 8
0.75	 9	 10	 11	 12
1.0	 13	 14	 15	 16

รูปที่ 4.1 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของข้อตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของข้อต่อสนองต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์

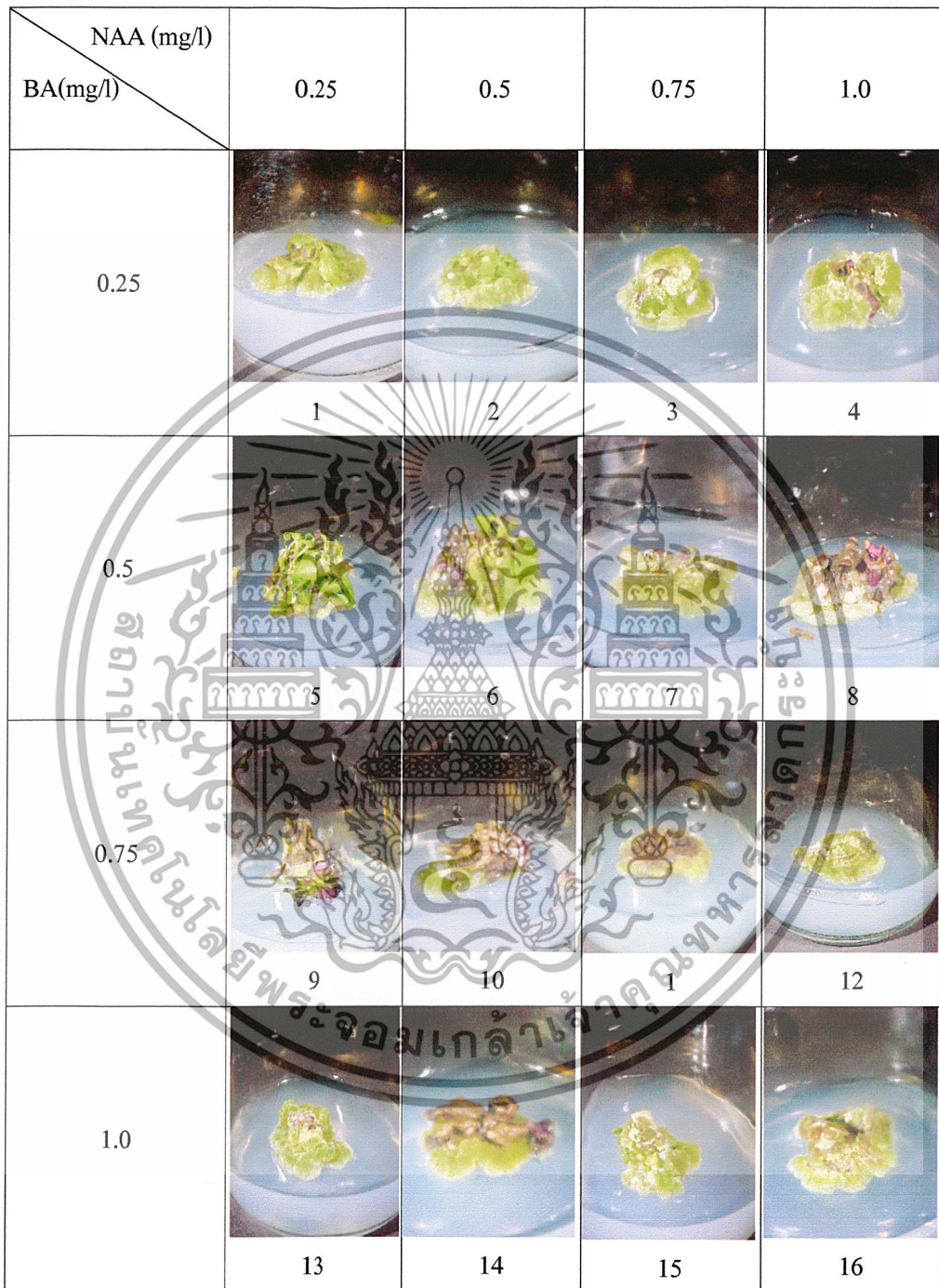
สูตรอาหาร	NAA(mg/l)	BA(mg/l)	การพัฒนาไปเป็นยอด	การพัฒนาไปเป็นราก	การพัฒนาไปเป็นแคลลัส
1	0.25	0.25	+	-	++
2	0.50	0.25	+	-	++
3	0.75	0.25	+	-	++
4	1.0	0.25	+	+	++
5	0.25	0.50	+++	+++	+
6	0.50	0.50	++	-	++
7	0.75	0.50	++	-	++
8	1.0	0.50	+	+	+++
9	0.25	0.75	+	-	+
10	0.50	0.75	++	-	++
11	0.75	0.75	++	-	++
12	1.0	0.75	-	+	+++
13	0.25	1.0	-	++	+++
14	0.50	1.0	+	+	+++
15	0.75	1.0	-	+	+++
16	1.0	1.0	-	-	+++

+ หมายถึงเกิด ยอด, ราก 1-2 ยอด (ราก), เส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส น้อยกว่า 2 เซนติเมตร

++ หมายถึงเกิด ยอด, ราก 3-4 ยอด (ราก), เส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส ระหว่าง 2.0- 2.4 เซนติเมตร

+++ หมายถึงเกิด ยอด, ราก มากกว่า 5 ยอด (ราก) ขึ้นไป, เส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส มากกว่า 2.4 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของไบโอบีโอมต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของไบโอบีโอมของไบโอบีโอมต่อฮอร์โมนที่เวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	NAA(mg/l)	BA(mg/l)	การพัฒนาไปเป็นยอด	การพัฒนาไปเป็นราก	การพัฒนาไปเป็นแคลลัส
1	0.25	0.25	-	-	++
2	0.50	0.25	-	-	++
3	0.75	0.25	-	-	++
4	1.0	0.25	-	-	++
5	0.25	0.50	+++	-	+
6	0.50	0.50	+	-	++
7	0.75	0.50	-	-	++
8	1.0	0.50	-	-	+++
9	0.25	0.75	-	-	+
10	0.50	0.75	-	-	++
11	0.75	0.75	-	-	++
12	1.0	0.75	-	-	++
13	0.25	1.0	-	-	++
14	0.50	1.0	-	-	+++
15	0.75	1.0	-	-	++
16	1.0	1.0	-	-	+++

- + หมายถึงเกิด ยอด, ราก 1-2 ยอด (ราก), เส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส น้อยกว่า 2 เซนติเมตร
- ++ หมายถึงเกิด ยอด, ราก 3-4 ยอด (ราก), เส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส ระหว่าง 2.0- 2.4 เซนติเมตร
- +++ หมายถึงเกิด ยอด, ราก มากกว่า 5 ยอด (ราก) ขึ้นไป, เส้นผ่าศูนย์กลางแคลลัส มากกว่า 2.4 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. ผลการศึกษาสภาวะเครียด

4.3.1. ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

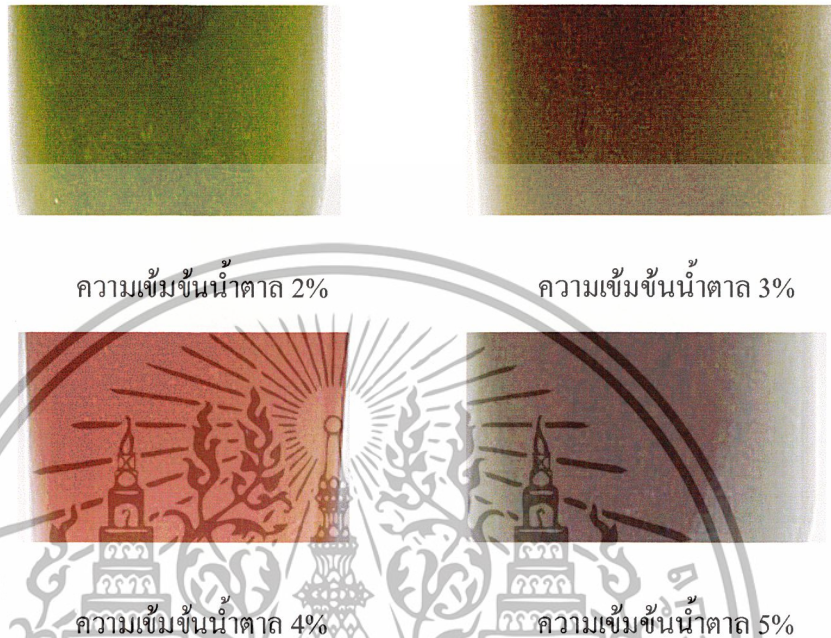
เมื่อเลี้ยงกะเพราแดงบนอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมากขึ้นต้นกะเพราแดงที่ได้จะมีสีของลำต้นและใบเข้มขึ้น ในระดับความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำต้นกะเพราแดงจะมีการเจริญเติบโตเร็ว ซึ่งแตกต่างจากต้นกะเพราแดงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมากจะมีการเติบโตช้ากว่าดังจะเห็นในรูปที่ 4.3



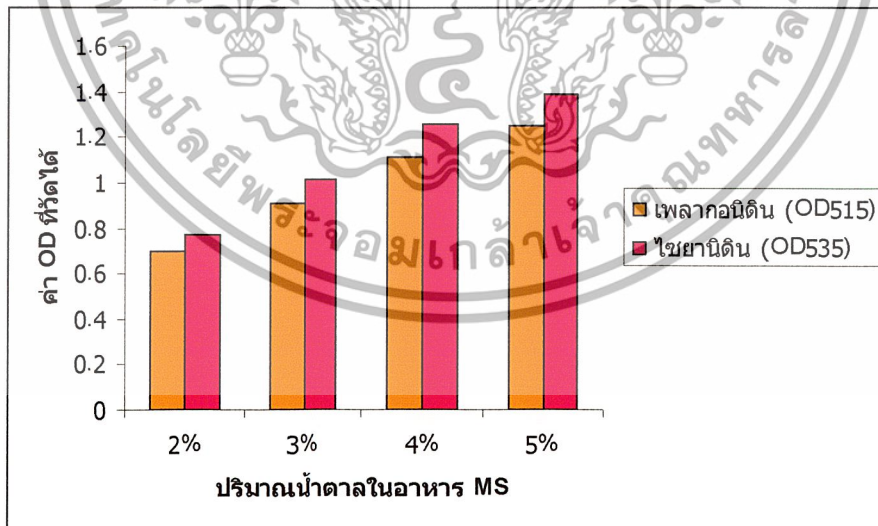
รูปที่ 4.3 ต้นกะเพราที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีปริมาณน้ำตาล 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำมาสกัดแอนโทไซยานินพบว่าสารสกัดที่ได้มีสีดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 สีของสารที่สกัดได้จากต้นกะเพราที่เจริญบนอาหาร MS ซึ่งมีปริมาณน้ำตาล 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์

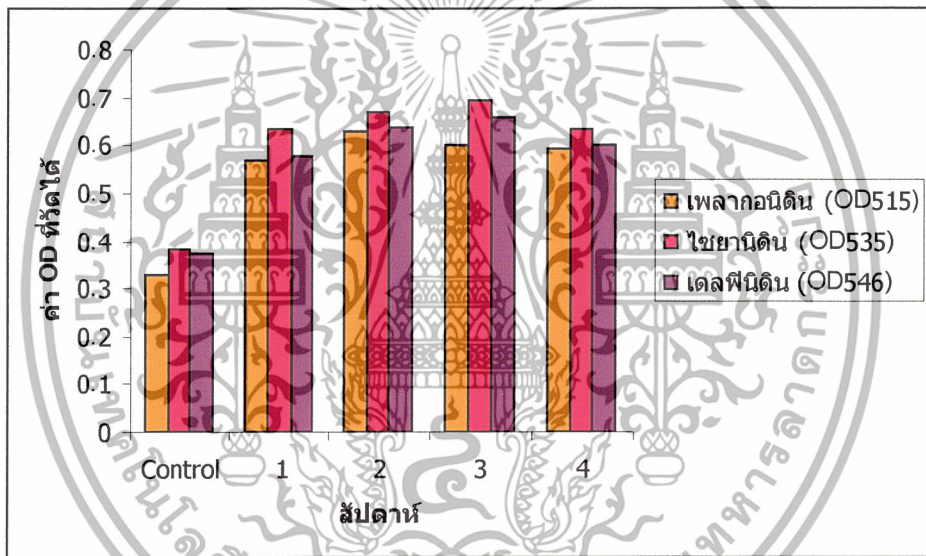


รูปที่ 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงของต้นกะเพราที่เจริญบนอาหาร MS ซึ่งมีปริมาณน้ำตาล 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2. ผลการศึกษาสภาวะขาดธาตุอาหาร

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกะเพราแดงบนทิวชูที่ชุ่มน้ำเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญของต้นกะเพราแดงทั้ง 4 สัปดาห์กับชุดควบคุม (สัปดาห์ที่ 0) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สกัดได้ ปรากฏว่าที่ชุดควบคุมมีปริมาณแอนโทไซยานินน้อยที่สุด และเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ถัดไป ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

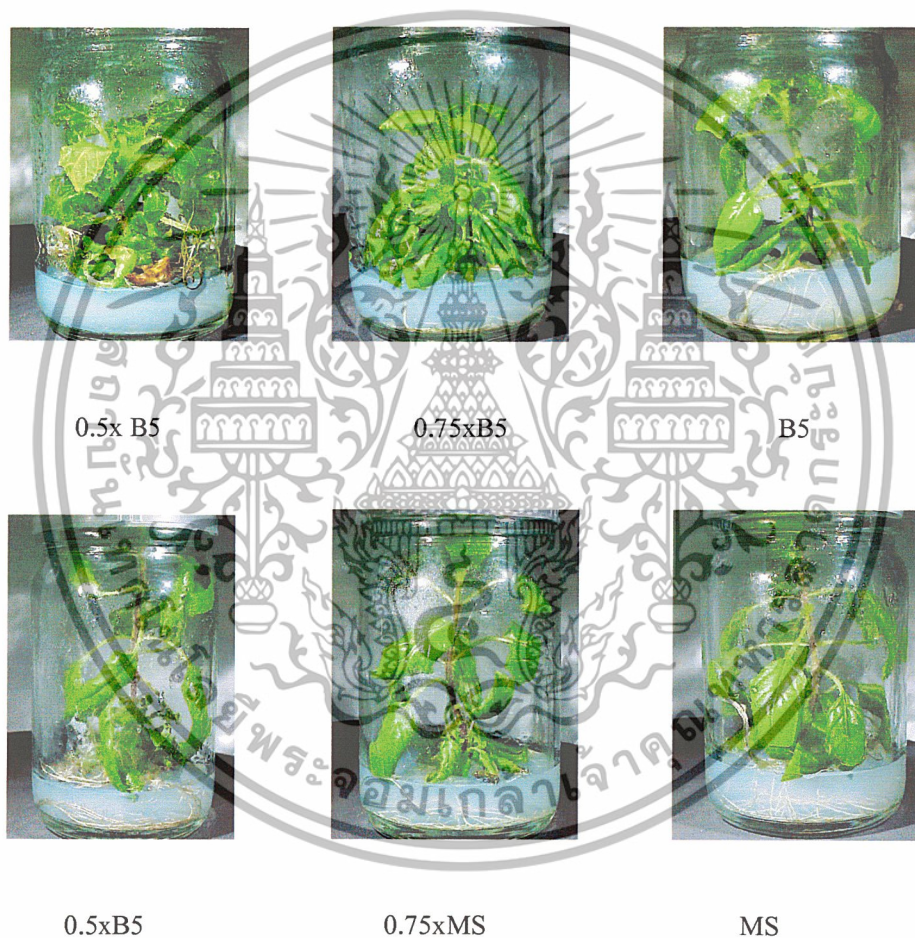


รูปที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงของต้นกะเพราที่เจริญในวัสดุปลูกที่ปราศจากอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4. ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาสายพันธุ์กะเพราแดง

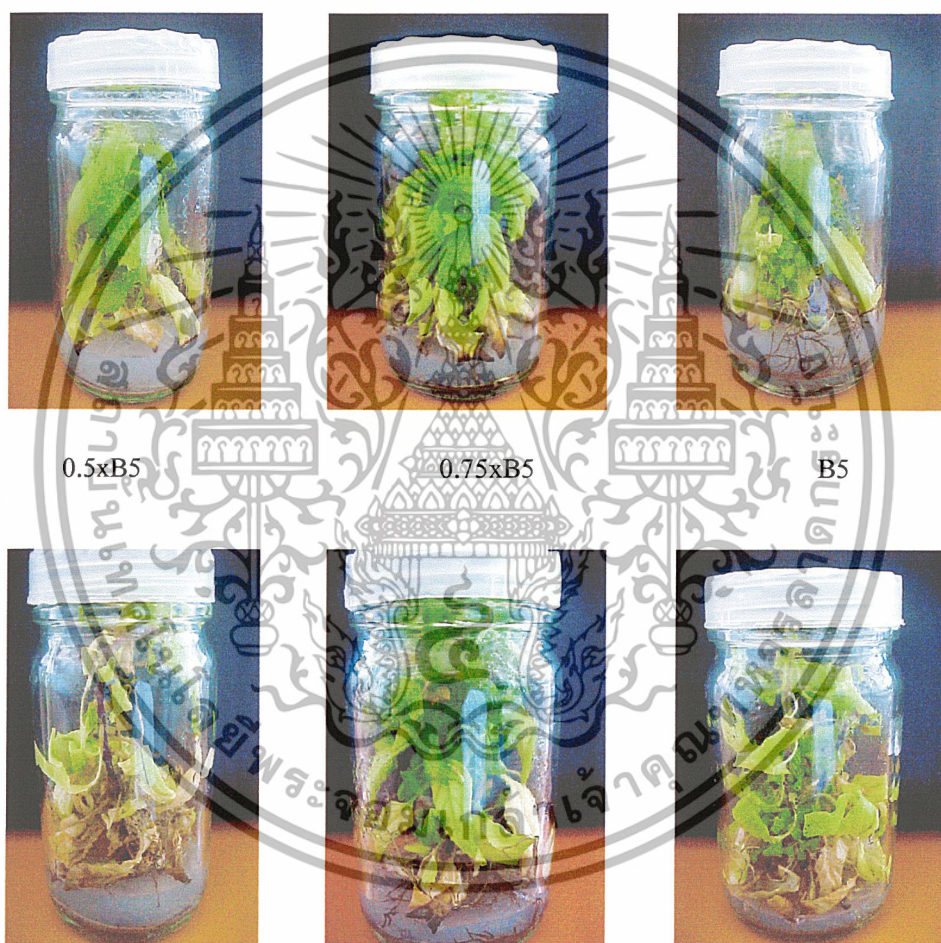
ต้นกะเพราที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS ลำต้นมีการยึดตัวที่ดีกว่าและใบมีลักษณะใหญ่และสมบูรณ์กว่าต้นกะเพราที่เลี้ยงในอาหาร B5 ในขณะที่ต้นกะเพราที่เลี้ยงในอาหาร B5 การเจริญเติบโตจะช้ากว่า และใบมีสีเขียวอ่อนดังรูป 4.7



รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโตของต้นกะเพราในอาหารสูตร MS และ B5 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ต้นกะเพราแดงที่เจริญบนอาหาร MS ต้นเจริญเติบโตเต็มขวด และใบเริ่มเหี่ยวและมีสีเหลือง ในขณะที่ต้นกะเพราแดงที่เจริญบนอาหาร B5 ใบและต้นยังมีความสมบูรณ์กว่า ใบมีสีเขียว ในอาหาร 0.75 B5 ต้นมีความสมบูรณ์ที่สุด ดังรูป 4.8



0.5x MS

0.75x MS

MS

รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโตของต้นกะเพราในอาหารสูตร MS และ B5 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1. การคัดเลือกสายพันธุ์กะเพราแดง

กะเพราแดงจาก อำเภอ มะขาม จังหวัด จันทบุรี ให้ใบและต้นที่มีลักษณะสีแดงเข้มมากที่สุดเมื่อนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อต้นที่ให้สีแดงเข้มทั้งต้นและใบมีเพียง 4 % ซึ่งมีปริมาณน้อยและต้นมีการเจริญเติบโตช้า เนื่องจากต้นไม้ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงนั้น จะมีการเจริญเติบโตช้าเมื่อเทียบกับต้นที่มีปริมาณแอนโทไซยานินน้อย ดังนั้นจึงเก็บต้นส่วนนี้ไว้เพื่อใช้ในการทำ cDNA ต่อไป ส่วนที่เหลือคือต้นที่มีก้านสีแดงอย่างเดียว ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วกว่าต้นที่มีสีแดงทั้งต้น และสามารถทำการขยายพันธุ์เพื่อใช้ในการทดลองได้ การที่เป็นเช่นนี้ก็อาจจะเป็นเพราะว่า ลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์นี้และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงซึ่งแตกต่างจากสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ

5.2. ศึกษาระดับของฮอร์โมน NAA และ BA ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อของต้นกะเพราแดงเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์

จากการทดลองโดยใช้ชื่อ อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดต่อการพัฒนาของข้อกะเพราแดงไปเป็นต้นกะเพราคือสูตร 5 ซึ่งประกอบด้วยสัดส่วนของฮอร์โมน NAA /BA (0.25 ต่อ 0.5 mg/ml) ให้ยอดต้นกะเพราออกมามากที่สุดเฉลี่ย 6 ยอด ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BA ในช่วง 0.5 -0.75mg/ml มีแนวโน้มการพัฒนาไปเป็นยอดและที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน NA 0.25 mg/ml มีแนวโน้มการพัฒนาเป็นรากที่สมบูรณ์ ส่วนใบให้ผลเช่นเดียวกันข้อแต่มียอดเฉลี่ยน้อยกว่าและไม่สมบูรณ์ ส่วนของแคลลัสที่ได้มีลักษณะแข็ง (hard callus) มีการศึกษาฮอร์โมนช่วง 1 mg/ml ขึ้นไปเป็นช่วงที่ฮอร์โมนเข้มข้นขึ้นแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ (friable callus) (ขนิษฐา และคณะ, 2545)

5.3. ผลของการศึกษาสภาวะเครียด

5.3.1. ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล

จากการทดลองระดับของน้ำตาลมีผลต่อการผลิตแอนโทไซยานิน ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้นมีผลทำให้มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินสูงขึ้นด้วย เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารที่สูงขึ้น จะถูกทำให้ลดลงด้วยวิธีที่เกี่ยวข้องกับการตรวจจับน้ำตาล (sugar sensor) หรือ วิถีเฮกโซไคเนส (hexokinase) ซึ่งคล้ายกับกลไกการควบคุมน้ำตาลของการสังเคราะห์แสงโดยอาจจะถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมด้วยวิถี เฮกโซคินเนส-อินดีเพนเดนท์ (hexokinase-independent pathway) ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อน้ำตาลในพืชชั้นสูง (Zhou และคณะ, 1998) ต้นกะเพราแดงจากสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาล 2 % จะมีสารสกัดที่ได้เป็นสีเขียว ต้นกะเพราแดงจากอาหารความเข้มข้นของน้ำตาล 3%, 4% และ 5% จะให้สี น้ำตาลแดง สีส้ม และสีออกม่วงแดงตามลำดับ จะเห็นว่าสารสกัดที่ได้มีสีเข้มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้น

5.3.2. สภาพขาดธาตุอาหาร

จากการทดลองศึกษาในสภาพที่ขาดอาหารต้นกะเพราแดงมีต้นและใบสีเข้มขึ้น เมื่อนำมาสกัดแอนโทไซยานินพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สาเหตุหนึ่งอาจเป็นเพราะว่า การขาดฟอสฟอรัสเป็นผลทำให้เกิดการสะสมแอนโทไซยานินผ่านทางวิถีชีวสังเคราะห์ ฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoid) โดยจะไปลดการยับยั้งของ PO_4 ที่มีผลต่อเอนไซม์ PAL และ CHS และยังกระตุ้นการสร้างฟลาโวนอยด์ หรือสามารถพูดได้ว่า การขาดฟอสเฟต จะกระตุ้นยีน PAL และ CHS (<http://www.mwsu.edu/html/docs/departments/biology/beta/index.html>)

5.4. ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาสายพันธุ์

จากการทดลองเมื่อเลี้ยงกะเพราแดงจนครบ 4 สัปดาห์ต้นกะเพราแดงในอาหาร MS จะเจริญเติบโตเร็วกว่าและมีลักษณะการขีดตัวที่ดีกว่าต้นกะเพราแดงในอาหาร B5 เนื่องจากปริมาณธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกัน ในอาหาร MS มีปริมาณของไนโตรเจนมากกว่าต้นกะเพราจึงเอาไปใช้ในการเจริญมากกว่าอาหาร B5 เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ต้นกะเพราแดงในอาหาร MS เริ่มมีใบเหลืองและที่ขยอลง แต่ต้นกะเพราแดงในอาหาร B5 ต้นละใบยังมีความสมบูรณ์ใบมีเขียว ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาสายพันธุ์คือสูตรอาหาร 0.75 B5 เพราะต้นกะเพราแดงยังคงมีความสมบูรณ์มากกว่าในอาหาร MS และ B5 สูตรอื่นๆ

ข้อเสนอแนะ

กะเพราแดงจากจังหวัดจันทบุรีนั้นเมื่อปลูกโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นได้ต้นและใบที่ไม่แดงเท่าต้นที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ อาจเนื่องจากในสภาพธรรมชาตินั้นปัจจัยในเรื่องของสภาพแวดล้อมมีความสำคัญต่อการเจริญการสร้างและสะสมสารแอนโทไซยานิน ในสภาพธรรมชาติอุณหภูมิในช่วงเวลากลางวันมีความร้อนมากพอเวลากลางคืนอุณหภูมิลดลง ในขณะที่ในห้องเพาะเลี้ยงอุณหภูมิก่อนข้างที่จะคงที่คือ 25 องศาเซลเซียส และในสภาพธรรมชาติดอกจะมีปัจจัยเรื่องความเครียดอื่นๆอีกเช่น ความชื้น ยางฆ่าแมลง ทำให้เกิดการชักนำในการสร้างและสะสมแอนโทไซยานินมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- สัมพันธ์ คัมภีรานนท์.2546. แอนโทไซยานินสีส้มเพื่อโลกสวย. อพเคท. ปีที่18 (ฉบับที่ 186): 53-56.
- Ambasht, N. K. and M. Agrawal (1995) Physiological responses of field grown *Zea mays* L. plants to enhanced UV-B radiation. *Biotronics* 24, 15–23.
- Anderson, P. C., P. B. Lombard and M. N. Westwood (1984) Leaf conductance, growth, and survival of willow and deciduous fruit tree species under flooded soil conditions. *J. Am.Soc. Hort. Sci.* 109, 132–138.
- Balakumar, T., V. Hani Babu Vincent and K. Paliwal (1993) On the interaction of UV-B radiation (280–315 nm) with water stress in crop plants. *Physiol. Plant.* 87, 217–222.
- Bongue-Bartelsman, M. and D. A. Phillips (1995) Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 539–546.
- Brandt, K., A. Giannini and B. Lercari (1995) Photomorphogenic responses to UV radiation III: a comparative study of UVB effects on anthocyanin and flavonoid accumulation in wild-type and *aurea* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Photochem. Photobiol.* 62, 1081–1087.
- Buchholz, G., B. Ehmann and E. Wellmann (1995) Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons (*Sinapis alba* L.). *Plant Physiol.* 108, 227–234.
- Christie, P. J., M. R. Alfenito and V. Walbot (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194, 541–549.
- Cormier, F., H. A. Crevier and C. B. Do (1989) Effect of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Can. J. Bot.* 68, 1822–1825.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dedaldechamp, F., C. Uhel and J. J. Macheix (1995) Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions. *Phytochemistry* 40, 1357–1360.
- Deikman, J. and P. E. Hammer (1995) Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Physiol.* 108, 47–57.
- Dixon, R. A., M. J. Harrison and C. J. Lamb (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 479–501.
- Dong, Y.-H., L. Beuning, K. Davies, D. Mitra, B. Morris and A. Kootstra (1998) Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers. *Aust. J. Plant Physiol.* 25, 245–252.
- Dube', A., S. Charti and M. M. Laloraya (1993) Inhibition of anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity of Co21 in leaf disks of *Terminalia catappa*. *Physiol. Plant.* 88, 237–242.
- Dutt, S. K., A. R. Bal and A. K. Bandyopadhyay (1991) Salinity induced chemical changes in *Casuarina equisetifolia* Forst. *Egypt. J. Soil Sci.* 31, 57–63.
- Fambrini, M., C. Pugliesi, P. Vernieri, G. Guiliano and S. Baroncelli (1993) Characterization of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant, deficient in carotenoid synthesis and abscisic acid content, induced by in-vitro tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 87, 65–69.
- Ferreres, F., M. I. Gil, M. Castaner and F. A. Tomas-Barberan (1997) Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4249–4254.
- Glaßgen, W. E., A. Rose, J. Madlung, W. Koch, J. Gleitz and H. U. Seitz (1998) Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell culture in response to treatment with ultraviolet and fungal elicitors. *Planta* 204, 490–498.
- Gleitz, J., J.-P. Schnitzler, D. Steimle and H. U. Seitz (1991) Metabolic changes in carrot cells in response to simultaneous treatment with ultraviolet light and a fungal elicitor. *Planta* 184, 362–367.

- Graham, T. L. (1998) Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 135–144.
- Holton, T. A. and E. C. Cornish (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 9, 1071–1083.
- Kaliemoorthy, S. and A. S. Rao (1994) Effect of salinity on anthocyanin accumulation in the root of maize. *Ind. J. Plant Physiol.* 37, 169–170.
- Krizek, D. T., S. J. Britz and R. M. Mirecki (1998). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiol. Plant.* 103, 1–7.
- Krol, M., G. R. Gray, V. M. Hurry, G. O'quist, L. Malek and N. P. A. Huner (1995) Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. *Can. J. Bot.* 73, 1119–1127.
- Kubasek, W. L., B. W. Shirley, A. McKillop, H. M. Goodman, W. Briggs and F. M. Ausubel (1992) Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 4, 1229–1236.
- Leng, P., H. Itamura and H. Yamamura (1993) Freezing tolerance of several *Diospyros* species and kaki cultivars as related to anthocyanin formation. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 61, 795–804.
- Leyva, A., J. A. Jarillo, J. Salinas and J. M. Martinez-Zapater (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* 108, 39–46.
- Liskova, D., L. Zakutna and D. Kakoniova (1989) Pigment formation in willow tissue culture. *Biol. Bratisl.* 44, 1039–1045.
- Lo, S. C. C. and R. L. Nicholson (1998) Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls: implications for a compensatory role in the defense response. *Plant Physiol.* 116, 979–989.
- McKown, R., G. Kuroki and G. Warren (1996) Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance. *J. Exp. Bot.* 47, 1919–1925.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mita, S., N. Murano, M. Akaike and K. Nakamura (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J.* 11, 841–851.
- Mol, J., G. Jenkins, E. Schafer and D. Weiss (1996) Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 525–557.
- Mumford, P. M. (1990) Dormancy break in seeds of *Impatiens glandulifera* Royle. *New Phytol.* 115, 171–175.
- Murray, J. R., A. G. Smith and W. P. Hackett (1994) Differential dihydroflavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in the juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.). *Planta* 194, 102–109.
- Nemat-Alla, M. M. and M. E. Younis (1995) Herbicide effects on phenolic metabolism in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) seedlings. *J. Exp. Bot.* 46, 1731–1736.
- Oren-Shamir, M. and A. Levi-Nissim (1997) Temperature effect on the leaf pigmentation of *Cotinus coggygria* 'Royal Purple.' *J. Hort. Sci.* 72, 425–432.
- Ramanjulu, S., K. Veeranjanyulu and C. Sudhakar (1993) Physiological changes induced by NaCl in mulberry var. Mysore local. *Ind. J. Plant Physiol.* 36, 273–275.
- Reddy, V. S., K. V. Goud, R. Sharma and A. R. Reddy (1994) Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis. *Plant Physiol.* 105, 1059–1066.
- Sakamoto, K., I. Kumiko, K. Sawamura, H. Kyoko, A. Yoshihisa, Y. Takafumi and F. Tsutomu (1994) Anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata* Thumb. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 36, 21–26.
- Schmucker, T. (1947) Anthocyan im Holz der Rotbuche. *Naturwissenschaften* 34, 91.
- Sherwin, H. W. and J. M. Farrant (1998) Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Reg.* 24, 203–210.

- Shichijo, C., T. Hamada, M. Hiraoka, C. B. Johnson and T. Hashimoto (1993) Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta* 191, 238–245.
- Suzuki, M. (1995) Enhancement of anthocyanin accumulation by high osmotic stress and low pH in grape cells (*Vitis* hybrids). *J. Plant Physiol.* 147, 152–155.
- Tignor, M. E., F. S. Davies, W. B. Sherman and J. M. Davis (1997) Rapid freezing acclimation of *Poncirus trifoliata* seedlings exposed to 10 degrees C and long days. *HortScience* 32, 854–857.
- Tholakalabavi, A., J. J. Zwiabek and R. A. Thorpe (1994) Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30P, 164–170.
- Tholakalabavi, A., J. J. Zwiazek and T. A. Thorpe (1997) Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition. *J. Plant Physiol.* 151, 489–496.
- Xiaoyan Dong, Edward L. Braun, and Erich Gvotewold. (2001) Functional conversation of plant secondary metabolic enzyme revealed by complementation of *Arabidopsis* flavonoid mutants with maize genes *Plant Physiol.* 127, 46-57.
- Zhou L, Jang J-C, Jones TL and J Sheen. (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10294-10299.

<http://www.mwsu.edu/html/docs/departments/biology/beta/index.html>

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร MS

MS macronutrient elements stock solution I	ใช้ 20 ml/l
Macronutrient elements	gm/l.
NH_4NO_3	82.5
KNO_3	95.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22.0
Distilled water to make	1000 ml.
MS macronutrient elements stock solution II	ใช้ 20 ml/l
Macronutrient elements	gm/l.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18.5
KH_2PO_4	8.5
Distilled water to make	1000 ml.
FeEDTA stock solution III	ใช้ 10 ml/l
Micronutrient elements	gm/l.
FeSO_4	2.79
Na_2EDTA	3.72
Distilled water to make	1000 ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MS micronutrient elements stock solution IV	ใช้ 1 ml/l
Micronutrient elements	gm/l.
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Distilled water to make	1000 ml.
Vitamin stock solution	ใช้ 1 ml/l
Vitamin	gm/l.
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Myoinositol	100
เติม Sucrose 3%	
ปรับ pH 5.6-5.8 และ agar 8gm/l	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร B5

B5 macronutrient elements stock solution A

Macronutrient elements	mg/l.
KH_2PO_4	527.5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.5

B5 macronutrient elements stock solution B

Macronutrient elements	mg/l.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150

B5 micronutrient elements stock solution C

Micronutrient elements	mg/l.
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
KI	0.75
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
H_3BO_3	3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10

Vitamin stock solution

Vitamin	mg/l.
Nicotinic acid	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10
Myoinositol	100
Na_2EDTA	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Sucrose 2%	

ปรับ pH 5.6-5.8 และ agar 8gm/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้