



การเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานิน ในแคลลัส กลีบดอก และใบอ่อน ของต้นกุหลาบหนู

Comparison of Total Anthocyanin Contents in Callus, Petal and Young Leaves of Fairy Rose (*Rosa chinesis* Jacq. var. minima Voss)

ยุพารณ จิโรภาสผานวงศ์¹, วุฒิชัย ศรีช่วย²

Yupaporn Jiropasphanuwong¹, Wutthichai Srisuay²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ เปรียบเทียบปริมาณสารสกัดแอนโทไซยานิน จากแคลลัส กลีบดอก และใบอ่อน ของต้นกุหลาบหนู โดยแคลลัสได้มาจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ร่วมกับ benzyladenine (BA) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75% จากการศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อปริมาณแอนโทไซยานิน บนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส (MS ร่วมกับ dicamba 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75%) พบว่า ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแคลลัส 4 สัปดาห์ แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้สูงสุด 5.52 ± 0.29 กรัม/น้ำหนักสด และมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด 0.098 ± 0.030 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด เมื่อศึกษาผลของชิ้นส่วนพืชต่อปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า ในกลีบดอกกุหลาบหนู มีปริมาณสารแอนโทไซยานินสกัดสูงสุด 0.117 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ใบอ่อน แคลลัสสีแดง และแคลลัสสีเหลืองขุ่น มีปริมาณแอนโทไซยานิน 0.104 ± 0.001 , 0.063 ± 0.017 และ 0.004 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลที่ได้ สามารถนำมาใช้เป็น แนวทางสำหรับการผลิตสารชีวเคมีทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชต่อไป

คำสำคัญ: แคลลัส ต้นกุหลาบหนู การเพาะเลี้ยงเซลล์พืช แอนโทไซยานิน

Abstract

This study aimed to compare the anthocyanin contents in callus, petal and young leaves of fairy rose (*Rosa chinesis* Jacq. var. minima Voss) and in young leaves – derived callus induction was performed in vitro using Murashige and Skoog (MS) supplemented with 2 mg/l benzyladenine (BA), 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D), 3% sucrose and 0.75% agar. With regard to the highest callus proliferation, the study revealed that there was 5.52 ± 0.29 gFW with 0.098 ± 0.030 mg/gFW anthocyanin contents after culturing on callus proliferation medium (MS medium with 1.5 mg/l dicamba, 3% sucrose and 0.75% agar) for 4 weeks. Based on anthocyanin contents among explants obtained, the highest anthocyanin content was 0.117 ± 0.001 mg/gFW in petal explant, while the anthocyanin contents in young leaves, red spot callus and yellowish callus were 0.104 ± 0.001 mg/gFW, 0.063 ± 0.017 mg/gFW and 0.004 ± 0.001 mg/gFW, respectively. In addition, the results of this study can be the guidelines for an alternative source of secondary metabolite production.

Keywords: Callus, Fairy rose, Plant cell culture, Anthocyanin

¹ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

¹ Agriculture program, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University

² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

² Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เป็นกระบวนการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ช่วยร่นระยะเวลาในการผลิตพืชต้นใหม่ และสามารถสร้างคุณลักษณะใหม่ๆ ให้กับเซลล์พืชที่เราต้องการเพาะเลี้ยงได้ โดยผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ การถ่ายยีน การทำเมล็ดเทียม รวมทั้งการผลิตสารชีวเคมีทุติยภูมิของเซลล์พืช ในส่วนของการผลิตสารชีวเคมีนี้ ถือว่าเป็นผลพลอยได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงแคลลัส ซึ่งแคลลัสของพืชหลายชนิดที่สามารถผลิตสารเหล่านี้ออกมาในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ เช่น ออุน (Saw et al., 2012; Cai et al., 2012) เมญูจมาศ (Taha et al., 2008) *Crataegus sinaica* (Maharik et al., 2009) มันทะ (Chen et al., 2012) รวมทั้งกุหลาบ (Mikanagi et al., 2000; Ram et al., 2011) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กุหลาบ สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่าย และขึ้นส่วนต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น ใบอ่อน ก้านใบ ลำต้น คัพภะ และอับล่องเกอร์ สามารถชักนำแคลลัสได้ดี เพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งในเซลล์แคลลัสกุหลาบนั้นยังสามารถผลิตสารแอนโธไซยานินได้ดีอีกด้วย (Tarrahi & Rezanejad, 2013) ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เพื่อให้ผลิตสารทุติยภูมิ คือ สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการผลิตได้ ปราศจากเชื้อ และไม่มีปัจจัยการผลิตอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง อีกทั้งขั้นตอนการสกัดสารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชยังง่ายกว่าการสกัดจากชิ้นส่วนอื่นๆ นอกหลอดทดลอง (Nagata & Ebizuka, 2002) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารแอนโธไซยานินนั้น พบว่า แคลลัสหรือเซลล์ส่วนใหญ่มักจะเกิดในหลายลักษณะโดยพบทั้งเซลล์ที่ผลิตและไม่ผลิตสารอยู่ปนกัน ในเซลล์แคลลัสจะเกิดการสะสมของแอนโธไซยานินจากเซลล์ผิวด้านนอกก่อน เมื่อระยะเวลาผ่านไปจึงจะมีการสะสมที่บริเวณเซลล์ด้านใน (Hara et al., 2003) สำหรับการเกิดแอนโธไซยานินกับการพัฒนาของเซลล์ พบว่า การเกิดแอนโธไซยานินสัมพันธ์กับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ และกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ทั้งสองกระบวนการนี้ ได้รับมาจากปัจจัยทั้งภายนอกและภายในเซลล์ เช่น ชนิดและแหล่งของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน สภาวะที่เพาะเลี้ยงเซลล์ และระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร นอกจากนี้ แหล่งของไนโตรเจนหรือคาร์บอน รวมทั้งชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล ก็ล้วนแล้วแต่ส่งผลต่อการสร้างแอนโธไซยานินในหลอดทดลอง การศึกษาเปรียบเทียบ การผลิตแอนโธไซยานินของระหว่างเซลล์พืชนอกหลอดทดลอง และในหลอดทดลองเป็นเรื่องสำคัญ เพื่อยืนยันว่า แอนโธไซยานินที่ผลิตออกมาได้นั้น มีปริมาณหรือคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกันอย่างไรบ้าง (Maharik et al., 2009) และเพื่อประเมินในขั้นต้นว่า พืชชนิดนั้นๆ เหมาะที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองหรือไม่ ดังเช่น การศึกษาของ Kartnig และคณะ (1993) ได้ทดสอบหาปริมาณแอนโธไซยานินในแคลลัส *Crataegus monogyna* เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนพืชนอกหลอดทดลอง พบว่า แคลลัสสามารถผลิตสารแอนโธไซยานินได้สัดส่วนที่มากกว่า และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากชิ้นส่วนพืชนอกหลอดทดลอง (Pakotoarison et al., 1997) นอกจากนี้ Chen, et al. (2012) ยังได้รายงานเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินในแคลลัสและหัวของมันทะ ซึ่งพบว่า ในหัวมันทะมีปริมาณแอนโธไซยานิน cyanidin-3-glucoside และ กรด gallic สูงกว่าในแคลลัส อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการศึกษาเปรียบเทียบในต้นกุหลาบ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้มีหาปริมาณแอนโธไซยานินจากแคลลัสกุหลาบที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลอง เปรียบเทียบกับ ชิ้นส่วนกลีบดอก และใบอ่อนนอกหลอดทดลอง ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำมาเป็นข้อมูล เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการผลิตแอนโธไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากแคลลัส กลีบดอก และใบอ่อน จากต้นกุหลาบหนู (*Rosa chinensis* Jacq. var. minima Voss)



ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช

การศึกษานี้ ใช้ชิ้นส่วน friable callus ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนระยะใบสีแดงจากต้นกุหลาบหนูอายุ 6 เดือน หลังจากการปักชำ เพื่อนำมาสกัดสารแอนโทไซยานิน และเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดใน กลีบดอก และใบอ่อน จากต้นเดียวกัน

1.1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบหนู

นำใบอ่อนมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ โดยล้างผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น จุ่มแช่ใน สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 % เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายแอลกอฮอล์ทิ้ง จุ่มแช่ต่อในสารละลายคลอริกซ์ เข้มข้น 20% ร่วมกับ สารละลายทวิน-20 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรต่อสารละลายคลอริกซ์ 100 มิลลิตร เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 3 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชเข้าตู้ยาล้าง แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งมาเชื้อให้แห้ง

1.2 การชักนำแคลลัสเริ่มต้น

การชักนำแคลลัสเริ่มต้นทำตามวิธีการของ ยุพารณ จิโรภาสภานุวงศ์ (2559) โดยนำชิ้นส่วนใบอ่อนที่ ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ มากรีดเพื่อให้เกิดบาดแผล แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส (MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75%) เพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตัดแยกแคลลัสที่เกิดขึ้น ย้ายลงอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส (MS เติม dicamba เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 3 % และผงวุ้น 0.75 %) เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

2. ศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและปริมาณแอนโทไซยานิน

นำแคลลัสน้ำหนัก 0.5 กรัม อายุ 2 สัปดาห์ หลังจากการย้ายเลี้ยง มาเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัส เพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส บันทึกน้ำหนักสดแคลลัสทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จนกระทั่งน้ำหนักวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

3. การสกัด และวัดปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยประยุกต์วิธีการของ Erefej และคณะ (2015) โดยชั่งน้ำหนักแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์หลังจากการย้ายเลี้ยง กลีบดอก และใบอ่อนกุหลาบหนู ในแต่ละตัวอย่างมา 0.5 กรัม น้ำหนัก สด เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1% ในสารละลายเมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำหลอดตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสตอนบนไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 657 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้สูตร

$$AC = [Absorbance \times 449.2 \times DF] / 29,000 \times Sample Weight (g)$$

$$\text{โดยที่ } AC = \text{Anthocyanin contents (mg/gFW)}$$

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

$$Dilution Factor (DF) = \text{final volume} / \text{initial volume (ml)}$$

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 หลอด

ผลการวิจัย

จากการนำใบอ่อนต้นกุหลาบหนู มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เริ่มมีการสร้างแคลลัส ตรงบริเวณรอยตัด และขอบใบ ลักษณะแคลลัสเป็นแบบร่วน มีสีขาวขุ่น บางเซลล์มีสีเขียว และยังไม่พบการสร้างจุดสีแดงในแคลลัสระยะนี้ (ภาพที่ 1-ก) ต่อมา เมื่อตัดย้าย friable callus มาเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติมไดแคมบา เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แคลลัสสามารถเพิ่มปริมาณได้สูงสุด 5.52 ± 0.29 กรัมน้ำหนักสด หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเริ่มคงที่ หลังจากสัปดาห์ที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง แคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มจนดำ เมื่อพิจารณาการสร้างจุดสีแดงบนก้อนแคลลัส พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารชักนำแคลลัส ไม่พบการสร้างจุดสีแดงบนก้อนแคลลัส (ภาพที่ 1-ข) ส่วนในสูตรอาหารที่เติม dicamba เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการสร้างจุดสีแดงบนก้อนแคลลัสกระจายอยู่ทั่วทั้งก้อน และเมื่อแยกแคลลัสที่ได้ ไปเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรเดิม พบว่า แคลลัสยังสามารถสร้างจุดสีแดงได้ 100% (ภาพที่ 1-ค) และเมื่อนำแคลลัสในแต่ละสัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง มาวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด พบว่า ปริมาณสารแอนโทไซยานินค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากสัปดาห์แรก จนกระทั่งมีปริมาณมากที่สุด 0.098 ± 0.030 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดมีปริมาณลดลง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 น้ำหนักสดแคลลัสกุหลาบหนู (*Rosa chinesis* Jacq. var. *minima* Voss) หลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75%

สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง	น้ำหนักสดแคลลัส (gFW)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/gFW)
1	0.90 ± 0.06^x	0.036 ± 0.04
2	2.54 ± 0.16	0.037 ± 0.03
3	3.55 ± 0.36	0.069 ± 0.01
4	5.52 ± 0.29	0.098 ± 0.03
5	5.51 ± 0.39	0.076 ± 0.04
6	5.11 ± 0.30	0.055 ± 0.02

^x ค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อนำแคลลัสสีเหลืองขุ่น และสีแดง ที่เพิ่มปริมาณได้อายุ 4 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง มาสกัดสารแอนโทไซยานินทั้งหมดอีกครั้ง เปรียบเทียบกับปริมาณแอนโทไซยานิน ในกลีบดอก และใบอ่อน (ภาพที่ 1ง - น) จากต้นแม่ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ในกลีบดอก มีปริมาณแอนโทไซยานิน สูงสุด 0.117 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ใกล้เคียงกับใบอ่อนคือ 0.104 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือในแคลลัสสีแดง มีปริมาณแอนโทไซยานิน 0.063 ± 0.017 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ส่วนในแคลลัสสีเหลืองขุ่นมีปริมาณสารน้อยที่สุด 0.004 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 2)



ตารางที่ 2 ปริมาณแอนโธไซยานินในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75% เปรียบเทียบกับปริมาณแอนโธไซยานินในกลีบดอก และใบอ่อนกุหลาบหนู (*Rosa chinensis* Jacq. var. *minima* Voss)

ตัวอย่างพืช	ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด (mg/gFW)
แคลลัสสีเหลืองขุ่น	0.004±0.001c
แคลลัสสีแดง	0.063±0.017b
กลีบดอก	0.117±0.001a
ใบอ่อน	0.104±0.001a
F-test	*
C.V. (%)	0.22

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัส ดอก ใบ และสารแอนโธไซยานินที่สกัดจากชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นกุหลาบหนู (*Rosa chinensis* Jacq. var. *minima* Voss)

ก-ข: การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75% (บาร์ = 0.5 ซม)

ค: แคลลัสเกิดจุดสีแดงบนอาหารสูตร MS เติม Dicamba เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3% และผงวุ้น 0.75% (บาร์ = 0.5 ซม)

ง-จ: ดอกและใบอ่อนกุหลาบหนูจากต้นอายุ 6 เดือนหลังจากการปักชำ (บาร์ = 0.5 ซม)

ฉ: สารสกัดแอนโธไซยานินจาก แคลลัสสีเหลืองขุ่น แคลลัสสีแดง กลีบดอก และใบอ่อน

อภิปรายผล

การเพาะเลี้ยงเซลล์พืช โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตสารทุติยภูมิ โดยเฉพาะ สารแอนโธไซยานิน ยังคงได้รับความสนใจอยู่ในปัจจุบัน โดย Mathur และคณะ (2010) ได้ให้เหตุผลไว้ว่า การผลิตด้วยวิธีการนี้ ง่ายและมีขั้นตอนการสกัดที่ไม่ยุ่งยาก ปริมาณของสารอื่นที่ไม่จำเป็น เช่น แพลติน โพลีแซคคาไรด์ และเอนไซม์อื่นๆ มีจำนวนน้อย และไม่มีผลจากสภาวะแวดล้อมภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง สำหรับการผลิตสารแอนโธไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ แสง รวมทั้ง น้ำตาลซูโครส ซึ่งมีผลต่อความเสถียรของสารแอนโธไซยานินที่เซลล์พืชสร้างขึ้น (Tsai et al., 2005) น้ำตาลซูโครส นอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นกับเซลล์พืชแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ในการเติมหมู่น้ำตาลให้กับสาร aglycone ในกระบวนการ glycosylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน (Mano et al., 2007) นอกจากนี้ ยังส่งผลต่ออื่นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโธไซยานินใน *Arabidopsis* เช่น flavanone 3 β -hydroxylase chalcone synthase chalcone isomerase และ anthocyanidin synthase เป็นต้น (Solfanelli et al., 2006) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้คือ 3% สามารถส่งเสริมให้แคลลัสของกุหลาบหนู มีการสร้างสารแอนโธไซยานินสูงสุด ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับลักษณะสี ที่ปรากฏบนก้นแกลลัส คือ แคลลัสมีจุดสีแดงเข้มกระจายอยู่ทั่วทั้งก้อน ซึ่งหากเพาะเลี้ยงต่อไปโดยปราศจากการย้ายเลี้ยง พบว่าในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 แคลลัสจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีปริมาณสารแอนโธไซยานินลดลง (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อส่งเสริมให้ผลิตสารแอนโธไซยานินในพืชหลายชนิด เช่น โสม ปริมาณสารชนิดนี้พบมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสนาน 3-4 สัปดาห์ และค่อยๆ ลดลงในสัปดาห์ที่ 5-11 (Mathur et al., 2010) แต่ในพืชบางชนิด เช่น *Prosopis farcta* L. มีปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุดหลังจากการเพาะเลี้ยงถึง 8 สัปดาห์ (Yahya & Al-Salih, 2014) เห็นได้ว่า สายพันธุ์และชนิดของพืชก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารแอนโธไซยานินจากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินใน แคลลัส กลีบดอก และใบอ่อนในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ในกลีบดอกมีปริมาณแอนโธไซยานินรวมสูงสุด 0.117 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด สูงกว่าในแคลลัสประมาณสองเท่า สอดคล้องกับการรายงานของ Chen et al (2012) ที่ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินสกัดจากแคลลัส และหัวมันเทศ ซึ่งพบว่า ปริมาณสารในหัวมีมากกว่าในแคลลัสประมาณสองเท่า แต่การเพาะเลี้ยงแคลลัสมันเทศมีข้อได้เปรียบ ตรงที่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้อย่างรวดเร็วและสามารถหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนสารเคมีจากสภาพแวดล้อมจากภายนอกได้ เช่นเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ หากพิจารณาในเรื่องของปริมาณ ในกลีบดอกให้ปริมาณสารแอนโธไซยานินรวมที่มากกว่า แต่หากพิจารณาถึงสมบัติ ความบริสุทธิ์ หรือการปนเปื้อนของสารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ อาจมีข้อได้เปรียบมากกว่า กลีบดอกปลูกอยู่ในสภาพแวดล้อมภายนอก เสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากสารเคมี ยาฆ่าแมลง หรือยาปฏิชีวนะ และอาจมีปริมาณสารพิษอื่นอีกในปริมาณมาก ในขณะที่ แคลลัส มีการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยง จึงไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากสภาพแวดล้อมภายนอก แต่ปริมาณสารที่ได้อาจมีปริมาณน้อย ซึ่งหากนำมาประยุกต์การเพาะเลี้ยงในระดับที่ใหญ่ขึ้น เช่น การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จนกระทั่งประยุกต์ต่อไปถึงระดับการเพาะเลี้ยงในระบบถังหมักขนาดใหญ่ ก็อาจเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิต ยา เครื่องสำอาง และอาหาร ในขณะเดียวกัน ยังคงต้องปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้สามารถผลิตสารได้ในปริมาณมาก และสารที่ได้มีคุณภาพ เหมาะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



สรุป

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับชูโครส เข้มข้น 3% สามารถเพิ่มปริมาณได้สูงสุด 5.52 ± 0.29 กรัม มีปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุด 0.098 ± 0.030 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารแอนโธไซยานิน พบว่า ในกลีบดอกกุหลาบหนู มีปริมาณสารแอนโธไซยานินสกัดสูงสุด 0.117 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ในใบอ่อน แคลลัสสีแดง และแคลลัสสีเหลืองอ่อน มีปริมาณแอนโธไซยานิน 0.104 ± 0.001 , 0.063 ± 0.017 และ 0.004 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาต่อไป ควรมีการศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์กุหลาบเพิ่มเติม เช่น การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส ศึกษาความถี่ของการย้ายเลี้ยงเซลล์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างสารแอนโธไซยานิน เป็นต้น รวมทั้งมีการวิเคราะห์ถึงคุณสมบัติของสารแอนโธไซยานินที่สกัดได้ เช่น สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีของสาร สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

รายการอ้างอิง

ยุพารณ จีโรภาสผดุงวงศ์. (2559). ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการชักนำแคลลัส และปริมาณแอนโธไซยานินในกุหลาบหนู.

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3, 7-11.

Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D. & Smetanska, I. (2012). Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 108, 401-409.

Chen, S.Y., Yap, W.S. & Yong, W.T.L. (2012). Comparison of Anthocyanin and phenolic contents between tuber and callus of *Ipomoea batatas* (L.). **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, 35, 9-14.

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 ten wild edible plants. **Food and Nutrition Sciences**, 6, 581-590.

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

Kartnig, T., G. Kohl, & B. Heydel. (1993). Production of flavonoids in cell cultures of *Crataegus monogyna*. **Planta Medica**, 59, 537-538.



- Maharik, N., Elgengaihib, S. & Taha. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* Boiss. **International Journal of Academic Research**, **1**, 30-34.
- Mano, H., Ogasawara, F., Sato, K., Higo, H. & Minobe, Y. (2007). Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. **Plant Physiology**, **143**, 1252-1268.
- Mathur, A., Mathur, A. K., Ganwar, A., Yadav, S., Verma, P. & Sangwan, R. S. (2010). Anthocyanin production in a callus line of *Panax sikkimensis* Ban. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, **46**, 13-21.
- Mikanagi, Y., Saito, N., Yokoi, M. & Tatsuzawa, F. (2000). Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (= *Rosa*), *Chinenses*, *Gallicanae* and some modern garden roses. **Biochemical Systematics and Ecology**, **28**, 887-902.
- Nagata, T. & Ebizuka, Y. (2002). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 51: Medicinal and Aromatic plants 1st Ed XII** (pp. 24-44). German: Springer Verlag.
- Pakotoarison, D., B. Gressier, F. Trotin., C. Brunet., T. Dine, M. Luychx., M.Cazin., J.C.Czine, Pinkas M. (1997). Antioxidant activities of polyphenolic extract from flowers in vitro callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*. **Pharmazie**, **1**, 60-64.
- Ram, M., Prasad, K. V., Kaur, C., Singh, S. K., Arora A. & Kumar, S. (2011). Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **104**, 171-179.
- Saw, N. M. M. T., Riedel, H., Cai, Z., Kutuk, O. & Smetanska, I. (2012). Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric fields and ethephon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **108**, 47-54.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A. & Perata, P. (2006). Sucrose-Specific Induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, **140**, 637-646.
- Taha, H. S., Abd El-Rahman, R. A., Fathalla, A., Abd-El-Kareem, M. & Aly, U. E. (2008). Successful application for enhancement and production of anthocyanin pigment from calli cultures of some ornamental plants. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, **2**, 1148-1156.
- Tarrah, R. & Rezanejad, F. (2013). Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrida* (Rosaceae). **Turkish Journal of Botany**, **37**, 1145-1154.
- Tsai, P.J., Delva, L., Yu, T.Y., Huang, Y.T. & Dufosse, L. (2005). Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. **Food Research International**, **38**, 1059-1065.
- Yahya, R.T. & Al-Salih, H.S. (2014). Determination of anthocyanin content in *Prosopis farcta* L. callus cultures. **Journal of Biotechnology Research Center**, **8**, 59-63.