

ผลของซีรีน ไกลซีน และเคซีน ต่อการชักนำให้เกิดต้นและปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ
Effects of serine, glycine, and casein on *in vitro* shoot induction and inulin content of Kaentawan
(*Helianthus tuberosus* L.)

เฟื่องฟ้า ปัญญา (Phuangpha Punha)* ดร.สุมนา นีระ (Dr.Sumana Neera)**

ดร.ภาณุพล หงษ์ภักดี (Dr.Panupon Hongpakdee)**

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซอรีน (serine) ไกลซีน (glycine) และเคซีน (casein) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่มีต่อการชักนำให้เกิดต้น ราก และปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำเอาชิ้นส่วนข้อของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ข้างต้นตามการแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่าอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม serine 100 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด (1.80 ยอดต่อชิ้นส่วน) และรากสูงสุด (0.20 รากต่อชิ้นส่วน) ส่วนอาหารที่เติม glycine 100 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดอย่างเดียว 2.10 ยอดต่อชิ้นส่วน และอาหารที่เติม casein 150 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด (1.20 ยอดต่อชิ้นส่วน) และรากสูงสุด (0.50 รากต่อชิ้นส่วน) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินพบว่าที่ serine 200 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้มีปริมาณอินนูลินสูงที่สุด 15.63 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง ที่ glycine 150 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีปริมาณอินนูลินสูงที่สุด 0.96 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง และอาหารที่มี casein 50 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีปริมาณอินนูลินสูงที่สุด 6.50 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อต่อไป

ABSTRACT

This study investigated the effect of serine, glycine, and casein on growth and inulin content of Kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.) *in vitro*. Auxiliary meristems from the field-grown plants were cultured on MS medium containing 0, 50, 100, 150, and 200 mg l⁻¹ serine, glycine, and casein, respectively. The experimental design was CRD with 10 replications for each treatment. The results showed that the explant cultured in MS medium with 100 mg l⁻¹ serine was the best concentration to induce shoots (1.80 shoots/explant) and root (0.20 roots/plantlet). The best shoot induction of glycine was 2.10 shoots/explant at 100 mg l⁻¹ glycine and without root. The medium was added 150 mg l⁻¹ casein gave the best result in shoot and root induction (1.20 shoots/explant and 0.50 roots/plantlet, respectively). The inulin content of plantlets was analyzed by HPLC-RID. The results showed the highest inulin content on MS medium containing 200 mg l⁻¹ serine (15.63 g/100 g DW), 150 mg l⁻¹ glycine (0.96 g/100 g DW) and 50 mg l⁻¹ casein (6.50 g/100 g DW). It can be used as an alternative approach for propagation and inulin production from Kaentawan.

คำสำคัญ: แก่นตะวัน กรดอะมิโน อินนูลิน

Keywords: Amino, Inulin, Kaentawan

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) จัดอยู่ในตระกูล Asteraceae มีลำต้นสะสมอาหารอยู่ในรูปอินนูลิน (Inulin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์ เมื่อรับประทานเข้าไปไม่สามารถย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบน แต่ถูกย่อยในกระบวนการหมัก (fermentation) ของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ จึงทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดไม่สูงเกินไป ช่วยให้ระดับไขมันในเลือดลดลง ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานและหัวใจได้ (Coussemant, 1992) ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ใช้อินนูลินเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและเสริมประสิทธิภาพในการผลิตสัตว์ เนื่องจากอินนูลินมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์ให้กับจุลินทรีย์ชนิดดีในลำไส้ ทำให้ลดการใช้ยาปฏิชีวนะ (Gibson et al., 1995) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อผลิต อะซิโตน (Acetone) บิวทานอล (Butanol) และเอทานอล (Ethanol) เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลสูง เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ (Kaur and Gupta, 2002) ปัจจุบันการขยายพันธุ์แก่นตะวันนิยมขยายพันธุ์ด้วยหัวพันธุ์ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามการนำหัวพันธุ์มาใช้ขยายพันธุ์นั้นได้ประสบปัญหาโรคติดมาด้วย ทำให้เกิดความเสียหาย ผลผลิตต่ำลงและโรคสามารถระบาดไปยังพื้นที่ปลูกใกล้เคียงได้ จึงมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแก่นตะวันจากเมล็ด ชิ้นส่วนข้อ และใบอ่อน (ปิยะวัชร, 2554) การศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงและปริมาณอินนูลินในแก่นตะวัน (วสุวิ, 2558) การชักนำให้เกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อ (Gamburg et al., 1999; สุดารัตน์, 2551) รวมทั้งการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในหัวแก่นตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ (ศิริพร และคณะ, 2555) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าว การขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไปนิยมเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อชักนำให้เกิดต้นและเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการนำสารควบคุมการเจริญเติบโต มาใช้เพื่อเพาะเลี้ยงแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ นอกจากการเติมสารควบคุมการเติบโตแล้ว ยังพบว่าการเติมกรดอะมิโนลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดต้น กระตุ้นการเกิดแคลลัสและเพิ่มปริมาณสารสำคัญในพืชอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดต้นและมีปริมาณอินนูลิน ในแก่นตะวันพันธุ์ “HEL 65” ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซีรีน (serine) ไกลซีน (glycine) และเคซีน (casein) ต่อการชักนำให้เกิดต้นและปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของซีรีน (serine) ไกลซีน (glycine) และเคซีน (casein) ต่อการชักนำให้เกิดต้นและปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

วิธีการศึกษา

พืชที่ใช้ทดลอง

ชิ้นส่วนข้อของแก่นตะวันสายพันธุ์ “HEL 65” เมื่ออายุ 15 วันหลังย้ายปลูก โดยใช้บริเวณตำแหน่งข้อที่ 2 – 11 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์หัวพันธุ์แก่นตะวัน จาก โครงการวิจัยแก่นตะวัน สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการทดลองที่ สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีการทดลอง

นำชิ้นส่วนข้อแค้นตะวันตกมาฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 3% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นตัดชิ้นส่วนข้อของแค้นตะวันตกที่ได้เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร phytagel 2.4 กรัมต่อลิตร และเติมกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ไกลซีน (glycine) และเคซีน (casein) ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 ± 2 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยเก็บข้อมูลจำนวนยอด ความยาวยอด ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณอินนูลิน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) แต่ละสิ่งทดลองมี 10 หน่วยทดลอง และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Least significant difference (LSD)

การสกัดและวิเคราะห์อินนูลินโดย High Performance Liquid Chromatography; HPLC

นำตัวอย่างต้นแค้นตะวันตก ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากย้ายอาหาร 3 ครั้ง (ย้ายอาหารทุก 4 สัปดาห์) นำมาทำแห้งด้วยการระเหยแห้งโดย freeze-dried ที่อุณหภูมิ -52 °C เป็นเวลา 3 วัน บดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 90 นาที ในอัตราส่วน 1:5 น้ำหนักโดยปริมาตร (Gaafar et al, 2010) แล้วนำสารสกัดที่ได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมกรองด้วย Nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (μm) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ซึ่งคัดแปลงจากการทดลองของ Petkova et al. (2013) โดยใช้ HPLC จากบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งประกอบด้วยปั๊ม LC-20AD และตัวชี้วัด Refractive index detector Shimadzu RID-10A ในการแยกโครมาโทกราฟี โดยควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรม Class-VP วิเคราะห์ปริมาณอินนูลินโดยใช้คอลัมน์ Shodex® Sugar KS-806 (300 mm \times 8.0 mm i.d.) ร่วมกับ sugar KS-G-6B guard column (50 mm \times 6.0 mm i.d.) ใช้เฟสเคลื่อน (Mobile phase) คือ น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized distilled water) อุณหภูมิตัวตรวจวัด (Detector temperature) คือ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมน์ (Column temperature) คือ 80 องศาเซลเซียส ปริมาณตัวอย่าง (Inject volume) คือ 10 ไมโครลิตร อัตราการไหล (Flow rate) คือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส เคสโตส ไนสโตสและอินนูลิน ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐานในการวิเคราะห์

ผลการวิจัย

ผลของซีรีน (serine) ต่อการชักนำให้เกิดต้นแค้นตะวันตกในสภาพปลอดเชื้อ

จากการนำชิ้นส่วนข้อของแค้นตะวันตกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม serine ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นของ serine ที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด โดยเกิดยอดได้สูงสุด (1.80 ยอดต่อชิ้นส่วน) เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 0, 50, 200 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.60, 1.20, 1.20 และ 1.00 ยอดต่อชิ้นส่วนตามลำดับ) พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % การเติม serine ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวยอดมากที่สุดเป็น 3.32 เซนติเมตร ลำดับรองลงมาคือ 0, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.10, 2.88, 2.65 และ 1.99 เซนติเมตร ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ serine มีผลทำให้ความยาวยอดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกับจำนวนใบ พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารที่เติม serine ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนใบมากที่สุด 10.60 ใบต่อชิ้นส่วน ลำดับต่อมาคือ 50, 0, 150 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (10.00, 9.40, 8.40 และ

8.60 ใบต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) ความกว้างของใบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความกว้างใบเป็น 0.6 เซนติเมตร รองลงมาคือ 100, 50, 150, และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.53, 0.49, 0.44, และ 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ) นอกจากนี้ serine ยังมีผลทำให้ความยาวใบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวใบสูงสุดเป็น 1.5 เซนติเมตร ลำดับรองลงมาคือ 1.46 1.28 1.17 และ 1.04 เซนติเมตร (50, 200, 100 และ 150 ตามลำดับ) นอกจากนี้ serine มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากมี 3 ระดับคือ 0 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากสูงสุดเป็น 3.2 เซนติเมตร รองลงมาคือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.60 เซนติเมตร) และความยาวรากต่ำสุดคือ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.46 เซนติเมตร) แม้ว่าทุกความเข้มข้นของ serine สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นและรากได้ดีที่สุดคือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนยอด ความยาวยอด ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก ของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 (*Helianthus tuberosus* L. cv. HEL 65) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MS โดยแปรผันระดับความเข้มข้นของ serine หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Concentration of Serine (mg l ⁻¹)	Shoot number (shoots/explant)	Shoot length (cm)	Leaf number (leaves/plantlet)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Root number (roots/plantlet)	Root length (cm)
0	1.60ab	3.10	9.40	0.6a	1.5a	0.20	0.46
50	1.20bc	2.88	10.00	0.49abc	1.46a	0.00	0.00
100	1.80a	2.65	8.40	0.53ab	1.17b	0.20	3.20
150	1.00c	1.99	8.60	0.44bc	1.04b	0.00	0.00
200	1.20bc	3.32	10.60	0.35c	1.28ab	0.20	1.60
F-test	*	NS	NS	*	**	NS	NS
CV (%)	39.82	46.41	43.94	33.01	23.70	272.17	325.11

หมายเหตุ: ^{abc} Mean with in the column with different superscript letters differ significant (P<0.05)

NS = Non significant (P> 0.05)

* = significant (P< 0.05)

** = significant (P< 0.01)

ผลของไกลซีน (glycine) ต่อการชักนำให้เกิดต้นแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ

จากการนำชิ้นส่วนข้อของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม glycine ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ glycine ส่งผลให้จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนรากและความยาวรากไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่

ส่งผลให้ความกว้างใบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความกว้างใบสูงสุดเป็น 0.67 เซนติเมตร รองลงมาคือ 100, 50, 0 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.48, 0.46, 0.44 และ 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 2.10 ยอดต่อต้น ความยาวยอด 2.10 เซนติเมตร จำนวนใบ 7.65 ใบต่อต้น ความกว้างใบ 0.48 เซนติเมตร ความยาวใบ 1.28 เซนติเมตร แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ แต่ที่ความเข้มข้น 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดราก (0.30 และ 0.20 รากต่อต้น และมีความยาวราก 1.97 และ 1.60 เซนติเมตรตามลำดับ) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนยอด ความยาวยอด ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก ของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 (*Helianthus tuberosus* L. cv. HEL 65) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MS โดยแปรผันระดับความเข้มข้นของ glycine หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Concentration of Glycine (mg l ⁻¹)	Shoot number (shoots/explant)	Shoot length (cm)	Leaf number (leaves/plantlet)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Root number (roots/plantlet)	Root length (cm)
0	1.20	2.28	8.00	0.44b	1.15	0.00	0.00
50	1.30	2.85	11.90	0.46b	1.21	0.00	0.00
100	2.10	2.10	7.60	0.48b	1.28	0.00	0.00
150	1.80	3.91	11.20	0.67a	1.45	0.30	1.97
200	1.20	3.32	10.60	0.35b	1.28	0.20	1.60
F-test	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
CV (%)	61.87	78.51	42.31	40.61	34.46	355.90	352.02

หมายเหตุ : ^{abc} Mean with in the column with different superscript letters differ significant (P<0.05)

NS = Non significant (P> 0.05)

* = significant (P< 0.05)

ผลของเคซีน (casein) ต่อการชักนำให้เกิดต้นแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาผลของ casein ต่อการชักนำให้เกิดต้นแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ ด้วยการเติม casein ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ casein ส่งผลให้ จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนรากและความยาวราก ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับความกว้างใบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่ casein เข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดความกว้างใบสูงสุดเป็น 0.73 เซนติเมตร ลำดับต่อมาคือ 50, 150, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.64, 0.57, 0.41 และ 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ) นอกจากนี้ casein ทุกความเข้มข้นมีผลในการชักนำรากได้ โดยที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้สูงสุดเป็น 0.50 รากต่อต้น รองลงมาคือ 0

และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (0.40 และ 0.40 รากต่อต้น ตามลำดับ) และที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากต่ำสุด (0.10 และ 0.20 รากต่อต้น ตามลำดับ) และมีความยาวรากสูงสุดที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (4.06 เซนติเมตร) รองลงมาคือ 0 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.10 และ 2.30 เซนติเมตร ตามลำดับ) และที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากต่ำสุด (0.80 และ 1.60 เซนติเมตร ตามลำดับ) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนยอด ความยาวยอด ความกว้างใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก ของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 (*Helianthus tuberosus* L. cv. HEL 65) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MS โดยแปรผันระดับความเข้มข้นของ casein หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Concentration of Casein (mg l ⁻¹)	Shoot number (shoots/explant)	Shoot length (cm)	Leaf number (leaves/plantlet)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Root number (roots/plantlet)	Root length (cm)
0	1.90	4.21	12.50	0.73a	1.69	0.40	3.10
50	1.20	3.76	13.00	0.64ab	1.66	0.40	2.30
100	1.30	2.25	9.20	0.41bc	1.17	0.10	0.80
150	1.20	3.30	9.90	0.57abc	1.37	0.50	4.06
200	1.20	3.32	10.60	0.35c	1.28	0.20	1.60
F-test	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
CV (%)	55.68	69.80	34.20	48.13	34.02	185.17	185.90

หมายเหตุ : ^{abc} Mean with in the column with different superscript letters differ significant (P<0.05)

NS = Non significant (P> 0.05)

* = significant (P< 0.05)

ผลของซีรีน ไกลซีน และเคซีน ต่อปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

ผลของซีรีน ต่อปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

นำข้อแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่แปรผันระดับความเข้มข้นของ serine เป็น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายขึ้นส่วนลงสู่อาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์ หลังจาก 12 สัปดาห์ นำไปวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินและน้ำตาลอื่น ๆ ด้วย HPLC พบว่าระดับความเข้มข้นของ serine ส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส และอินนูลิน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยที่ความเข้มข้น 0 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีปริมาณกลูโคสสูงที่สุด (5.76 และ 5.95 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) รองลงมาคือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.18 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง) และที่ความเข้มข้น 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบปริมาณกลูโคส ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ serine ในการเพาะเลี้ยงแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อเป็นเพียงความเข้มข้นเดียวที่ส่งผลให้มีปริมาณซูโครสสูงเป็น 1.71 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร ส่งผลให้มีปริมาณฟรุกโตสสูงที่สุดเป็น 3.37 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่มีพบ ปริมาณฟรุกโตส นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นของ serine 200, 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการชักนำให้เกิด อินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ตามลำดับดังนี้ 15.63, 7.12 และ 1.71 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ดัง ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของระดับความเข้มข้นของซีรีนในอาหารสังเคราะห์ MS ต่อปริมาณอินนูลินและน้ำตาลต่างๆ ในแก่น ตะวันสายพันธุ์ HEL 65 (*Helianthus tuberosus* L. cv. HEL 65) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยการสกัดด้วย น้ำร้อนและวิเคราะห์ด้วย HPLC-RID

Concentration of Serine (mg l ⁻¹)	Sugars contents (g/100 g of dry weight)			
	Glucose	Sucrose	Fructose	Inulin
0	5.76a	0.00b	0.00b	0.00c
50	0.00b	1.71a	0.00b	7.12b
100	5.95a	0.00b	0.00b	0.00c
150	1.18b	0.00b	0.00b	1.71bc
200	0.00b	0.00b	3.37a	15.63a
F-test	**	**	**	**
CV (%)	32.61	40.60	24.21	66.04

หมายเหตุ : ^{abc} Mean with in the column with different superscript letters differ significant (P<0.05)

NS = Non significant (P> 0.05)

** = significant (P< 0.01)

ผลของ ไกลซีน ต่อปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงข้อแก่นตะวันในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม glycine ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยย้ายอาหารทุก 4 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์และนำมาวิเคราะห์ปริมาณ อินนูลินและน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ด้วย HPLC พบว่า glycine มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และอินนูลิน ที่มีความ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % แต่อย่างไรก็ตามไม่มีผลต่อปริมาณฟรุกโตส ทุกความเข้มข้นของ glycine ไม่พบปริมาณฟรุกโตสในเนื้อเยื่อของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยพบว่าระดับความเข้มข้น ของ glycine ที่ 0 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณกลูโคสสูงที่สุดตามลำดับเป็น 5.75 และ 0.97 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่พบปริมาณกลูโคส ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดน้ำตาลซูโครสเป็นดังนี้ 8.82, 0.10 และ 1.20 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และที่ระดับ ความเข้มข้น 0 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดน้ำตาลซูโครสได้ นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้นของ glycine 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเพียงความเข้มข้นเดียวที่สามารถชักนำให้เกิดอินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพ ปลอดเชื้อได้เป็น 0.96 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลของระดับความเข้มข้นของไกลซีนในอาหารสังเคราะห์ MS ต่อปริมาณอินนูลินและน้ำตาลต่าง ๆ ใน
แก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 (*Helianthus tuberosus* L. cv. HEL 65) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยการสกัด
ด้วยน้ำร้อนและวิเคราะห์ด้วย HPLC-RID

Concentration of Glycine (mg l ⁻¹)	Sugars contents (g/100 g of dry weight)			
	Glucose	Sucrose	Fructose	Inulin
0	5.75a	0.00b	-	0.00b
50	0.00c	8.82a	-	0.00b
100	0.00c	0.10b	-	0.00b
150	0.97b	0.00b	-	0.96a
200	0.00c	1.20b	-	0.00b
F-test	**	**	-	**
CV (%)	35.24	50.93	-	74.19

หมายเหตุ : ^{abc} Mean with in the column with different superscript letters differ significant (P<0.05)

NS = Non significant (P> 0.05)

** = significant (P< 0.01)

ผลของเคซีน ต่อปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นผลของระดับความเข้มข้นของ casein 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสังเคราะห์ MS ต่อปริมาณอินนูลินและน้ำตาลต่าง ๆ ในแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นของ casein มีผลต่อปริมาณอินนูลิน กลูโคส และฟรุกโตส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเข้มข้น 99 % โดยที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ส่งผลให้มีปริมาณกลูโคสสูงที่สุด เป็น 15.26 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (5.54 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง) และความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่มีผลต่อปริมาณกลูโคส ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้แก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณฟรุกโตสเป็น 0.99 และ 0.84 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่มีผลต่อปริมาณฟรุกโตส นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้นของ casein 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดอินนูลิน ได้สูงสุดเป็น 6.50 และ 3.76 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง แต่อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของ casein ไม่มีผลต่อปริมาณซูโครสในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

ตารางที่ 6 ผลของระดับความเข้มข้นของเคซีนในอาหารสังเคราะห์ MS ต่อปริมาณอินนูลินและน้ำตาลต่างๆ ในแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 (*Helianthus tuberosus* L. cv. HEL 65) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยการสกัดด้วยน้ำร้อนและวิเคราะห์ด้วย HPLC-RID

Concentration of Casein (mg l ⁻¹)	Sugars contents (g/100 g of dry weight)			
	Glucose	Sucrose	Fructose	Inulin
0	5.54b	-	0.00b	0.00c
50	0.00c	-	0.00b	6.50a
100	0.00c	-	0.99a	3.76b
150	0.00c	-	0.84a	0.00c
200	15.26a	-	0.00b	0.00c
F-test	**	-	**	**
CV (%)	29.74	-	54.37	41.90

หมายเหตุ : ^{abc} Mean with in the column with different superscript letters differ significant (P<0.05)

NS = Non significant (P> 0.05)

** = significant (P< 0.01)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการนำข้อของแก่นตะวันมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซีรีน (serine) ไกลซีน (glycine) และเคซีน (casein) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ สามารถชักนำให้เกิดต้น ราก และมีปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อได้ โดยกรดอะมิโนแต่ละชนิดไม่มีผลเป็นแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่มีต่อการเจริญเติบโตทางกิ่งใบของแก่นตะวัน แต่ชนิดและระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนจะตอบสนองต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะต่าง ๆ ของแก่นตะวันได้แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงการชักนำให้เกิดต้นนั้นหมายรวมถึงการมียอดและราก พบว่าอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม serine 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด แต่สามารถชักนำรากได้ไม่แตกต่างจากความเข้มข้นอื่น ๆ ดังนั้นความเข้มข้นนี้จึงเหมาะสมต่อการชักนำยอดเท่านั้น ส่วนอาหารที่เติม glycine ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำยอดได้เพียงอย่างเดียว และอาหารที่เติม casein ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ โดยที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ จากการทดลองผลของกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้นต่อการชักนำให้เกิดต้นแก่นตะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนดังกล่าวส่งผลต่อการเจริญเติบโตทางกิ่งใบของแก่นตะวัน เนื่องจากกรดอะมิโนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีการเติมกรดอะมิโนเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่เซลล์พืชในปริมาณน้อย เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของพืช จากการศึกษาของ Murashige and Skoog (1962) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยาสูบบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีกรดอะมิโน glycine เป็นองค์ประกอบ พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกับอาหารสังเคราะห์ N1 (Nitsch and Nitsch, 1956) โดยมีการตอบสนองการชักนำให้เกิดต้นได้ดีและ casein hydrolysat สามารถเพิ่ม

ปริมาณแคลลัสที่สูงขึ้นในยาสูบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Asad et al. (2009) โดยแปรผันชนิดของกรดอะมิโน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า glycine สามารถชักนำให้เกิดต้น และแคลลัสได้ดีในอ้อย นอกจากนี้กรดอะมิโนยังมีผลต่อการผลิตสารสำคัญ (secondary metabolites) ในพืช โดยในการศึกษารุ่นนี้ได้นำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อแก่ต้นมะวันบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดตามความเข้มข้นที่กล่าวมาข้างต้น ย้ายอาหารทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 ครั้ง มาวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินและน้ำตาลอื่น ๆ ด้วย HPLC พบว่าชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนมีผลต่อปริมาณอินนูลินและน้ำตาลอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดส่งผลให้น้ำตาลแต่ละชนิดมีปริมาณมากน้อยต่างกัน การศึกษารุ่นนี้จะมุ่งเน้นถึงผลของกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดต่อชักนำอินนูลิน ซึ่งเป็นสารสำคัญในแก่นมะวัน พบว่าที่ความเข้มข้นของ serine 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีปริมาณอินนูลินสูงที่สุด สำหรับความเข้มข้น glycine พบว่าที่ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณอินนูลินสูงที่สุด และอาหารที่เติม casein ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีปริมาณอินนูลินสูงที่สุด เนื่องจากกรดอะมิโนมีความสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช (Basu et al., 1989) กรดอะมิโนดังกล่าวเป็นองค์ประกอบของสารตั้งต้นในวัฏจักรต่าง ๆ ของการสังเคราะห์อินนูลิน จึงสามารถชักนำให้เกิดอินนูลินในสภาพปลอดเชื้อได้ ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดข้างต้น สามารถชักนำให้เกิดต้นและปริมาณอินนูลินในแก่นมะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อได้เช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ ตามการทดลองของ วสุวี (2558) และปริมาณอินนูลินที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในหัวของแก่นมะวันที่ปอกเปลือกด้วย HPLC (15.28 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด) (ศิริพร และคณะ, 2555) เมื่อคำนวณกลับและเปรียบเทียบในหน่วย กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด การศึกษารุ่นนี้สามารถใช้กรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เซรีน (serine) ไกลซีน (glycine) และเคซีน (casein) ในการเพาะเลี้ยงข้อแก่ต้นมะวัน เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนต้นพันธุ์ในปริมาณมากและเพิ่มปริมาณอินนูลินในแก่นมะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ปิยวัชร ผาสุข. ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแก่นมะวันในสภาพปลอดเชื้อ. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน]. ขอนแก่น: ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2554.
- วสุวี สุนทร. อิทธิพลของน้ำตาลและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเกิดต้นและปริมาณสารอินนูลินในแก่นมะวันภายใต้สภาพปลอดเชื้อ. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2558.
- ศิริพร ดันจอม, ครรชิต จุดประสงค์, ชนัญชิตา ไชยโต และ สนั่น จอกลอย. อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในแก่นมะวันสายพันธุ์ต่างๆ. วารสารวิจัย มข, 2555, 17(1): 25-34.
- สุดารัตน์ คำผา. ความหลากหลายทางพันธุกรรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคและการเกิดลำต้นสะสมอาหารในสภาพปลอดเชื้อของแก่นมะวัน. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา]. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.

- Asad S, Arshad M, Mansoor S, Zafar Y. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Biotechnology* 2009; 8(7): 1214–1218.
- Basu A, Sethi U, Mukherjee SP. Regulation of cell proliferation and morphogenesis by amino acids in Brassica tissue cultures and its correlation with threonine deaminase. *Plant Cell Rep* 1989; 8: 333-335.
- Coussement AP. Inulin and Oligofructose: safe intake and legal status. In: First Orafti Research Conference, Orafti, Tienen, Belgium 1992; 151-161.
- Gaafar AM, Serag El-Din MF, Boudy EA, El-Gazar HH. Extraction Conditions of Inulin from Jerusalem artichoke Tubers and its Effects on Blood Glucose and Lipid Profile in Diabetic Rats 2010; 6(5): 36-43.
- Gamburg KZ, Vysotskaya EF, Gamanets LV. Microtuber formation in micropropagated jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1999; 55: 115-118.
- Gibson GR, Beatty X, Wang X, Cummings JH. Selective simulating of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 1995; 108: 975-982.
- Kaur N, and Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci* 2002; 27: 703-714.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; 15: 473-497.
- Nitsch JP, Nitsch C. Auxin-dependent growth of excised *Helianthus* tissues. *Am J Bot.*1956; 43: 839-851.
- Petkova N, Vrancheva R, Denev P, Ivanov I, Pavlov A. HPLC-RID method for determination of inulin and fructooligosaccharides. *Acta Scientifical Naturalis* 2013; 1: 99-107.