



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสารประกอบฟีนอลเพื่อเป็นเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลในการจำแนก คัดเลือก
และปรับปรุงสาย พันธุ์กล้วย

The Study of Phenolic Compounds as a Biomolecular Marker for Identification, Selection and
Improvement of Bananas

สัญญาเลขที่ MRG5080329

โดย นาย จามร สมณะ

กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๒

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสารประกอบฟีนอลเพื่อเป็นเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลในการจำแนก คัดเลือก
และปรับปรุงสาย พันธุ์กล้วย

The Study of Phenolic Compounds as a Biomolecular Marker for Identification, Selection and
Improvement of Bananas

ผู้วิจัย นาย จามร สมณะ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Project Code (รหัสโครงการ): MRG5080329

ชื่อโครงการ: การศึกษาสารประกอบฟีนอลเพื่อเป็นเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลในการจำแนก คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์กล้วย

Project Title: The Study of Phenolic Compounds as a Biomolecular Marker for Identification, Selection and Improvement of Bananas

ชื่อนักวิจัย จามร สมณะ¹, พงศกร โพธิ์ถาวร¹, กาสินัย กิจดำรงสันต์¹, วิลาวัณย์ ชาวหงสา², กนกพร อะทะวงษา², สิรภพ วงษ์เนียม² และ ศศิวิมล แสงผล²

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล scjsm@mahidol.ac.th

² ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล scssg@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ ๑ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๐ ถึงวันที่ ๓๑ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๒

Abstract (บทคัดย่อ)

กล้วยเป็นพืชปลูกที่สำคัญอย่างหนึ่งของโลกซึ่งมีแหล่งกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ความหลากหลายของพันธุ์กล้วยเหล่านี้สามารถแยกแยะได้ไม่เพียงแต่ลักษณะที่มองเห็น ยังมีกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสด้วย แต่ลักษณะเหล่านี้บางครั้งไม่แน่นอนเพราะขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ จึงได้มีการพัฒนาค้นหา Biochemical และ Molecular Markers ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทั้ง genotype และ phenotype ที่สำคัญบางประการเช่นปริมาณและการกระจายของความฝาด (tannin) รูปแบบการสะสมสีแดง (anthocyanin) โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างและระบุลักษณะกล้วยได้เก็บตัวอย่างกล้วยป่าและกล้วยปลูกจากทั่วประเทศตั้งแต่ก่อนจะได้รับทุนจนถึงปัจจุบันได้ประมาณ 400 ตัวอย่าง เป็นข้อมูลรูปถ่าย รูปวาด ข้อมูลลักษณะปรากฏกว่า 70 ลักษณะของแต่ละตัวอย่าง ได้เก็บตัวอย่างแห้งสำหรับกล้วยป่าเฉพาะส่วนของใบและตัวอย่างดองในส่วนของปลี ผล ดอก ที่ห่อพรรณไม้สวนหลวง ร.๙ ส่วนตัวอย่างที่มีชีวิต กล้วยป่าส่วนใหญ่ได้นำหน่อหรือเมล็ดไปปลูกที่สวนของเจ้าของโครงการที่ อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม ส่วนกล้วยปลูกนั้นส่วนใหญ่ดูแลโดยสวนของเรือนไทยพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติกำแพงเพชร และแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วย คลองสิบ อ. หนองเสือ ปทุมธานี และได้มีการนำกล้วยบางตัวที่หายาก ลักษณะโดดเด่น หรือเติบโตที่แปลกปลูกได้ไม่เต็มเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การปรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบชนิดสารให้ความฝาด ได้ทำการวัด ปริมาณ total phenolic compound ด้วยวิธี modified Prussian blue กับสารสกัดจากส่วนต่างๆของกล้วยบางตัวอย่าง โดยใช้ catechin เป็นสารประกอบฟีนอลมาตรฐานเปรียบเทียบ และทดสอบรูปแบบการกระจายของสารประกอบฟีนอลในเนื้อเยื่อกล้วยส่วนต่างๆ รวมทั้งเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลกับความฝาด ทั้งจากเนื้อเยื่อแบบเดียวกันในกล้วยชนิดต่างๆ ที่นิยมหรือไม่ นิยมรับประทานเช่นหอยหรือปลี เนื้อเยื่อต่างๆ จากกล้วยพันธุ์เดียวกัน หรือผลเครือเดียวกันในระยะการสุกที่ต่างกันซึ่งเห็นความสอดคล้องกันของปริมาณ tannin กับการทดสอบรสฝาดทั้งในเนื้อเยื่อเดียวกันของกล้วยต่างชนิดหรือผลกล้วยเดียวกันในระยะการสุกต่างกันและสามารถแบ่งระดับความฝาดที่แปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยคร่าวได้

การตรวจสอบชนิดสารให้ความฝาด ได้เก็บตัวอย่างน้ำยางกล้วย ซึ่งถือเป็นของเหลวที่บ่งถึงสภาพของกล้วยทั้งต้นและเป็นของเหลวที่มีสารประกอบฟีนอลอยู่มาก โดยได้พัฒนาน้ำยาเก็บรักษาของกล้วยให้คงสภาพและไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากกว่าเดิม เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC และ MS ซึ่งพบสารประกอบฟีนอลหลายชนิดที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มของกล้วยเช่น dopamine, myricetin-3-*O*-rutinoside ส่วนสารประกอบ anthocyanin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกันแต่เป็นรงควัตถุที่ไม่มีรสฝาดได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC และ MS เช่นกัน พบสาร anthocyanin หลายชนิดที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มของกล้วย แต่ไม่สอดคล้องกันเสมอไปว่ากล้วยที่มีสีแดงมากจะฝาดกว่ากล้วยที่มีสีแดงน้อยกว่า

การสกัด DNA เพื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเบื้องต้นด้วย AFLP สามารถจัดกลุ่มกล้วยได้ตามกลุ่มชนิดและ genome และได้ค้นพบชิ้น DNA ที่มีความจำเพาะกับชนิดและกลุ่ม genome ของกล้วยซึ่งสามารถนำไปออกแบบ primer สำหรับเป็นตัวจำแนกกลุ่มเฉพาะของกล้วยและได้ผ่านการทดสอบแล้วว่าได้ผลดี นอกจากนี้ยังมีการคัดเลือกตัวอย่างกล้วยที่แสดงลักษณะการสร้างสารประกอบฟีนอลในปริมาณมากและความหลากหลายที่สุดเพื่อสกัด RNA มาทำ cDNA library ได้สำเร็จแล้วรอการค้นหายีนที่สนใจในอนาคตต่อไป

Keywords (คำหลัก): Banana, phenolic composition, anthocyanin, astringency, genetic diversity

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อให้ทราบแหล่งที่มาจนจะสามารถรวบรวมพันธุกรรมของกล้วยทั้งพันธุ์กล้วยป่าและกล้วยปลูกจากแหล่งต่างๆที่น่าสนใจทั่วประเทศ
2. เพื่อให้มีข้อมูลเชิงลึกในรายละเอียดของลักษณะปรากฏต่างๆในแต่ละสายพันธุ์ทั้งกล้วยป่าและกล้วยปลูก เช่นระดับและการกระจายของสีแดงและความฝาด
3. เพื่อศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในส่วนที่น่าสนใจซึ่งยังไม่เป็นที่รู้มาก่อน และนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับลักษณะปรากฏ
4. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลที่นำไปใช้ได้และวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสม
5. เพื่อเพิ่มผลงานวิจัยเกี่ยวกับเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลของพืชในวงศ์กล้วย (Musaceae) ในประเทศไทย

วิธีการทดลอง

1. การรวบรวมพันธุกรรมของกล้วยทั้งพันธุ์กล้วยป่าและกล้วยปลูกจากแหล่งต่างๆที่น่าสนใจทั่วประเทศ
ได้มีการออกสำรวจรวบรวมพันธุ์กล้วยป่าจากแหล่งกำเนิดในธรรมชาติจากที่ต่างๆ ทั่วประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านทั้งสิ้น 262 ตัวอย่าง และกล้วยปลูกจากแหล่งรวบรวมพันธุ์และจากสวนของชาวบ้านจากท้องถิ่นต่างๆ อีก 141 ตัวอย่าง กล้วยทุกตัวอย่างจะเก็บข้อมูลมากที่สุดเท่าที่จะทำได้โดยเก็บเป็น รูปถ่าย รูปวาด ข้อมูลลักษณะปรากฏกว่า 70 ลักษณะและตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์(รูปที่ 2) ในแต่ละตัวอย่างโดยดัดแปลงจากแบบการเก็บข้อมูลของ IPGRI-INIBAP/CIRAD (1996) ตัวอย่างแห้งสำหรับกล้วยป่าเฉพาะส่วนของใบ และตัวอย่างดองในส่วนของปลี ผล ดอก (ชุดรูปที่ 1) และได้บันทึกคำอธิบายแต่ละตัวอย่างและลักษณะประจำแต่ละชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน (Atawongsa 2008) นอกจากนี้ยังมีการเก็บหน่อหรือเมล็ดเพื่อนำไปปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์เพื่อสามารถนำมาอ้างอิงใหม่ต่อไปในสภาพสิ่งแวดล้อมการปลูกลักษณะเดียวและเพื่อศึกษาการเติบโต ความต้านทานโรคและข้อมูลทางสรีรวิทยาอื่นๆ ต่อไป กล้วยป่าส่วนใหญ่ได้นำหน่อหรือเมล็ดไปปลูกที่สวนของเจ้าของโครงการที่ อ. นครชัยศรี จ. นครปฐม ส่วนกล้วยปลูกนั้นส่วนใหญ่ดูแลโดยเจ้าหน้าที่ประจำสวนของเรือนไทยพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติกำแพงเพชร และแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วย

คลองสิบ อ. หนองเสือ ปทุมธานี นอกจากนี้ยังได้เริ่มนำกล้วยบางตัวที่หายาก ลักษณะโดดเด่น หรือเติบโตที่แปลกปลูกได้ ไม่ดีมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และกำลังติดต่อเพื่อขยายกำลังการ เก็บรักษาพันธุ์กล้วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขงกับโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

2. ระดับและการกระจายของสีแดงและความฝาด

ได้มีการทดสอบปริมาณ total phenolic compound ที่วัดได้จากวิธี modified Prussian blue โดยใช้ catechin เป็น สารประกอบฟีนอลมาตรฐานตามวิธีของ Hagerman A. E. (1998) และเปรียบเทียบวิเคราะห์ระดับความฝาดโดยใช้ อาสาสมัครที่ผ่านการฝึกและแนะนำก่อนทดสอบจริง (Chaohongsa 2007) โดยการชิมส่วนที่ใช้บริโภคได้ของกล้วย ตัวอย่างชนิดต่างๆ และเก็บข้อมูลทั้งการวิเคราะห์เชิงรสฝาดจากผลกล้วยน้ำว้าสวนในระยะเวลาสุกต่างๆ ตามหลักของ Loesecke 1950 ซึ่งสามารถนำไปใช้เปรียบเทียบกันได้เพราะมีการแปรผันตรงต่อกันดังผลในรูปที่ 3 ในส่วนของการ วิเคราะห์ชนิดของสารให้ความฝาด ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำยางกล้วย ซึ่งถือเป็นของเหลวที่บ่งถึงสภาพของกล้วยทั้งต้น และเป็นของเหลวที่มีสารประกอบฟีนอลอยู่มาก โดยได้พัฒนาน้ำยาเก็บรักษายางกล้วยให้คงความเป็นของเหลวและไม่ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากกว่าเดิม ยางกล้วยที่ได้จะสกัดสารประกอบฟีนอลใน acid acetone เพื่อแยกจากองค์ประกอบอื่นที่ยัง ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในขณะนั้นเช่น lipids, carbohydrate, proteins ออก จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC/MS (Pothavorn 2008) ดังได้สรุปไว้ในรูปที่ 4 และตารางที่ 2 ในส่วนของสารสีแดงจากการวิเคราะห์รงควัตถุในกาบปลีของกล้วยหลาย ตัวอย่างนั้น จากการสกัดด้วย acid methanol และวิเคราะห์ด้วย HPLC/MS (Kitdamrongsont 2008) พบ anthocyanin 6 ชนิดดังสรุปไว้ในรูปที่ 5 และตารางที่ 3

3. ศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม

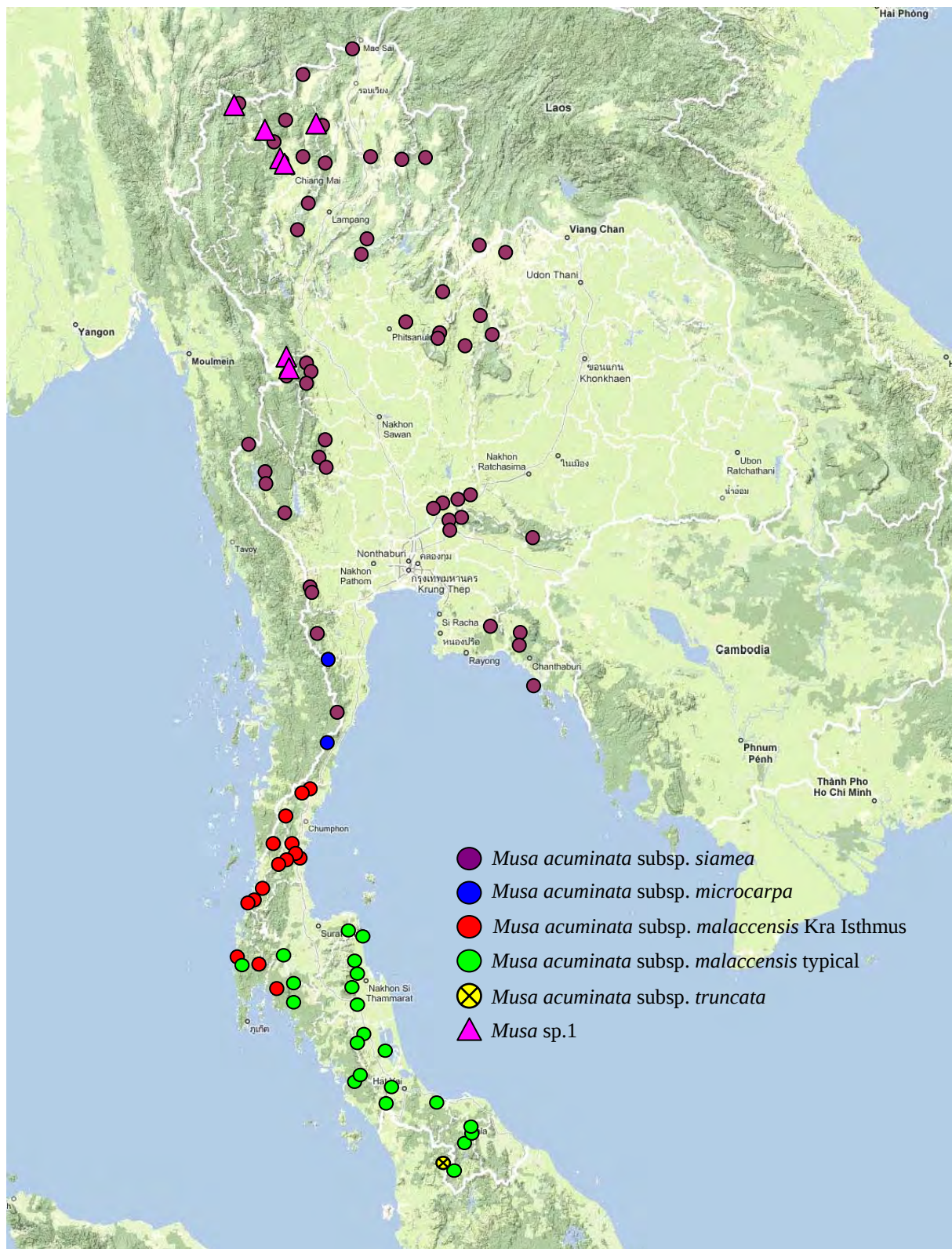
เนื่องจากกล้วยเป็นพืชที่มีข้อมูลทางพันธุกรรมหรือโปรตีนในฐานะข้อมูลอยู่น้อยและยังไม่มีพันธุ์มาตรฐานสากลที่ใช้ เปรียบเทียบ การศึกษาเบื้องต้นจึงต้องใช้จากตัวอย่างที่เก็บได้เปรียบเทียบกันเองโดยการสกัด DNA จากใบเทียน (cigar leaf) นำมาหาความหลากหลายแบบสุ่มทั่ว genome ทั้งหมดด้วยวิธี AFLP แล้วจึงวิเคราะห์ความต่างทางพันธุกรรมใน รูปแบบของ polymorphic bands ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะอื่นที่ได้บันทึกไว้ก่อน ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 6 และข้อมูลที่ได้ นั้นสามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มกล้วยเป็นกลุ่มตามลักษณะ genome พื้นฐานของแต่ละตัวอย่าง (รูปที่ 7) (Wongnium 2008) ในขั้นต่อไปจึงจะทำการแยก polymorphic bands ที่จำเพาะต่อชนิดกล้วยป่าและกล้วยตานีเหล่านั้นเพื่ออ่านรหัส พันธุกรรมและออกแบบสร้างเป็น probes, primers ที่ทดสอบแล้วว่าสามารถแยกชนิดและบอกลูกผสมของกล้วยได้อย่าง แม่นยำดังตารางที่ 4 และรูปที่ 8 (Wongnium in preparation)

ผลการศึกษาทดลอง



ชุดรูปที่ 1. แสดงการเก็บตัวอย่างกล้วยป่าโดยมีการบันทึกลักษณะปรากฏ ณ สถานที่เก็บ (2 รูปบน) การเก็บตัวอย่างใบอัดแห้ง (ซ้าย) และการเก็บตัวอย่างดอก ปลี ผลในขวดดอง (ขวา)

รูปที่ 2 ตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์แสดงการกระจายตัวของกล้วยป่ากลุ่มต่างๆ ในประเทศไทย (Atawongsa 2008)



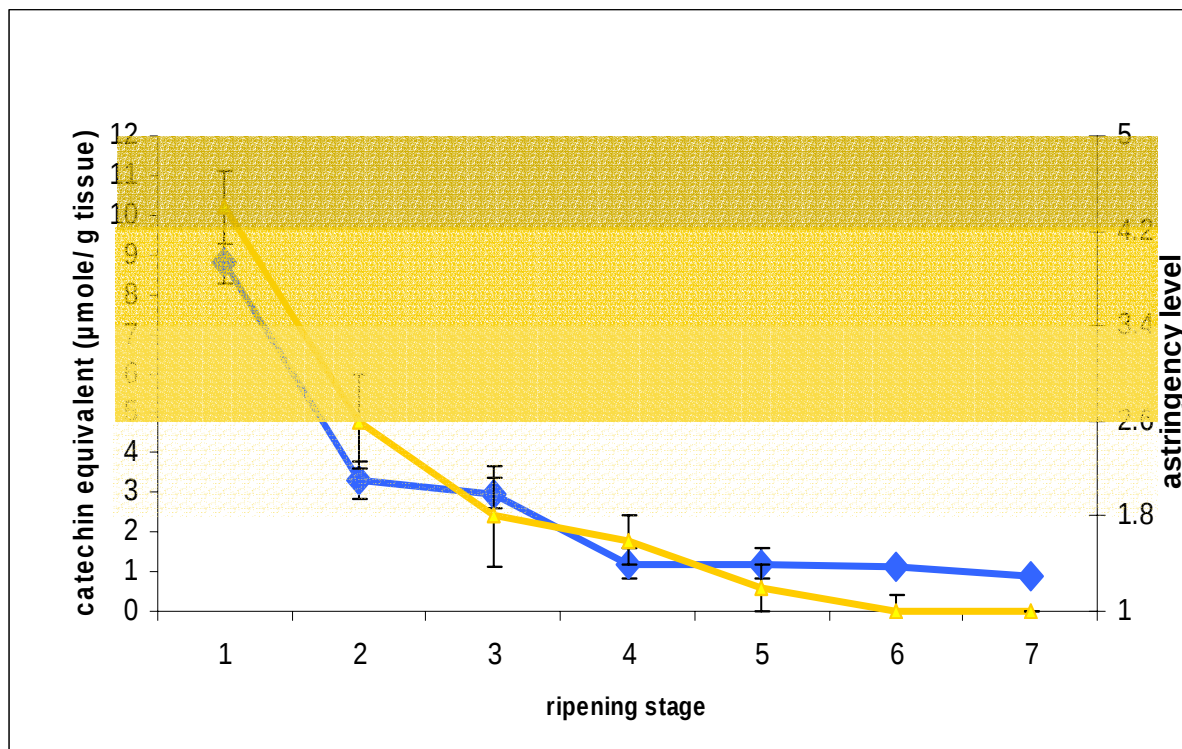
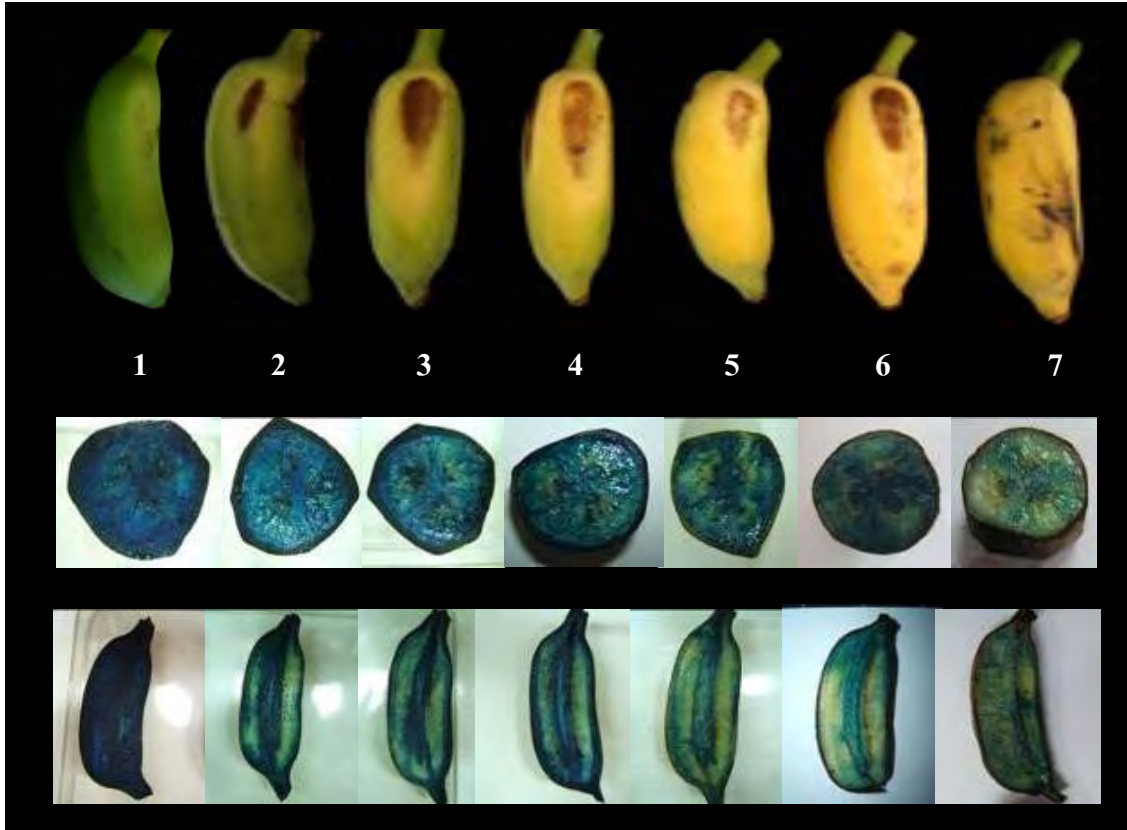
ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างกล้วยในกลุ่มต่างๆ ที่ได้จากการสำรวจ

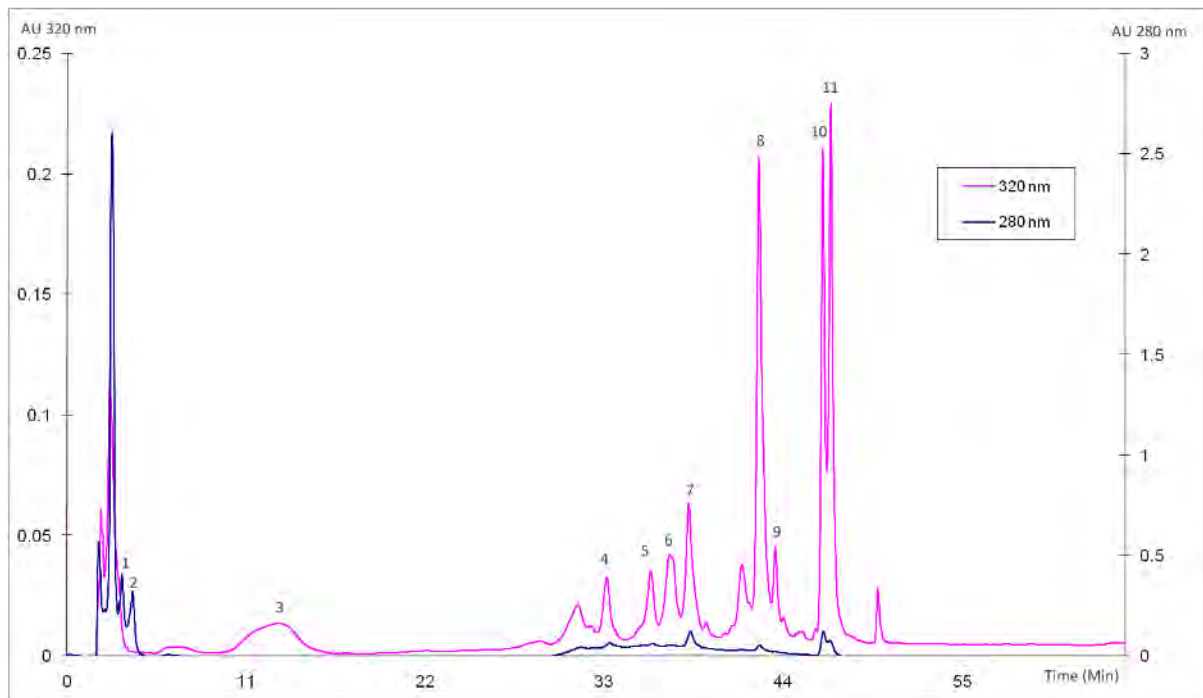
Species	Amount in the accession
WILD	262
<i>Ensete glaucum</i>	8
<i>Ensete superbum</i>	9
<i>Musella larsiocarpa</i>	1
<i>Musa acuminata</i>	155
<i>Musa balbisiana</i>	37
<i>Musa itinerans</i>	17
<i>Musa</i> sp.1 *	12
<i>Musa</i> sp.2 *	5
<i>Musa gracilis</i>	1
<i>Musa laterita</i>	10
<i>Musa ornata</i>	4
<i>Musa coccinea</i>	2
<i>Musa velutina</i>	1
CUTIVATED	141
<i>Musa</i> AA	23
<i>Musa</i> AB	2
<i>Musa</i> AAA	37
<i>Musa</i> AAB	26
<i>Musa</i> ABB	46
<i>Musa</i> BBB	4
<i>Musa</i> AABB	2
<i>Musa</i> ABBB	1
TOTAL	403

* *Musa* sp.1 และ sp.2 น่าจะเป็นกล้วยป่าชนิดใหม่ อยู่ระหว่างการตรวจสอบ

ชุดรูปที่ 3 แสดงระยะการสุกของกล้วยน้ำว้า (*Musa* ABB 'Kluai Namwa') รูปบน แสดงลักษณะผลและสีเปลือก (แถวบน) การติดสี Prussian blue ซึ่งบ่งชี้ปริมาณสารประกอบฟีนอล ของผลตัดตามขวาง (แถวกลาง) และ ผลตัดตามยาว (แถวล่าง) รูปล่าง แสดงถึงการลดลงของความฝาดและปริมาณสารประกอบฟีนอลในระยะการสุกที่เพิ่มขึ้น (Chaohongsa 2007)

● ระดับคะแนนความฝาด ● ปริมาณสารประกอบฟีนอล

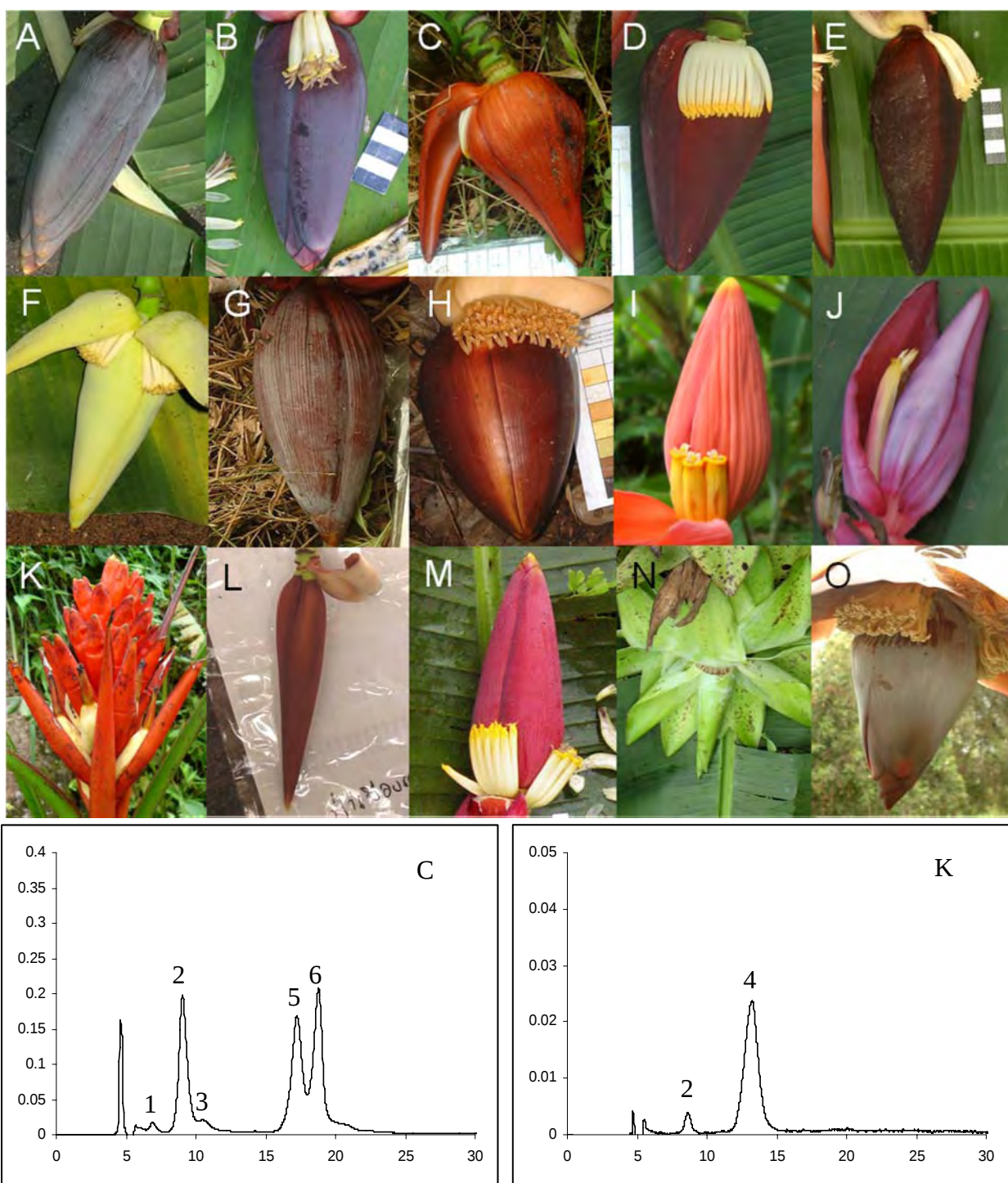




รูปที่ 4. กราฟแสดงการแยกสารประกอบฟีนอลชนิดต่างๆ จากยางกล้วยผสมหลายตัวอย่างผ่านเครื่อง HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 320 nm และ 280 nm (Pothavorn 2008)

banana sample	phenolics contents
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>siamea</i> type I	1, 2, 4, 7
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>siamea</i> type II	1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>siamea</i> with yellow bract	1, 2, 4, 9, 10, 11
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>	1, 2, 4, 6, 7, 11
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> (Kra Isthmus)	1, 2, 4, 7, 8
<i>M. balbisiana</i>	3, 4, 5
<i>Musa</i> (ABB) 'Kluai Namwa Suan'	1, 4, 7, 9, 11
<i>Musa</i> (AA) 'Kluai Nua Thong'	1, 4, 7, 9, 11
<i>Musa</i> (AAA) 'Kluai Nak Yak'	1, 4, 7, 9, 11
<i>M. laterita</i>	1, 2, 4, 10
<i>M. ornata</i>	1, 2, 4, 7

ตารางที่ 2. แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลที่พบในยางกล้วยกลุ่มต่างๆ 1 = dopamine, 2 = N-acetylserotonin, 3 = cafeoylquinic acid, 4 = myricetin-3-*O*-rutinoside, 5 = myricetin glycoside, 6 = kaempferol-3-*O*-rutinoside, 7 = quercetin-3-*O*-rutinoside, 8 = naringenin glycoside I, 9 = genistein glycoside I, 10 = naringenin glycoside II, 11 = genistein glycoside II (Pothavorn 2008)



ชุดรูปที่ 5. แสดงสีป्लीของกล้วยป้าชนิดต่างๆ ได้แก่ A, *Musa acuminata* subsp. *siamea* 1; B, *M. acuminata* subsp. *siamea* 2; C, *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 1; D, *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 2; E, *M. acuminata* subsp. *truncata*; F, *M. acuminata* yellow bract; G, *M. balbisiana*; H, *M. itinerans*; I, *M. laterita*; J, *M. velutina*; K, *M. coccinea*; L, *Musa* sp. 1 unknown; M, *Musa* sp. 2 unknown; N, *Ensete glaucum*; O, *Ensete superbum* (บอน). กราฟจาก HPLC ของสารสกัดจากป्लीแสดงชนิดของรงควัตถุในป्लीได้แก่ Peak 1, delphinidin-3-rutinoside; Peak 2, cyanidin-3-rutinoside; Peak 3, petunidin-3-rutinoside; Peak 4, pelargonidin-3-rutinoside; Peak 5, peonidin-3-rutinoside; Peak 6, malvidin-3-rutinoside ตัวอักษรในกราฟแสดงที่มาของตัวอย่างกล้วยที่ใช้ตามรูปส่วนบน (ล่าง) (Kitdamrongsont 2008)

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณ Anthocyanin pigment จากกาบปลีกล้วยบางตัวอย่าง (Kitdamrongsont 2008)

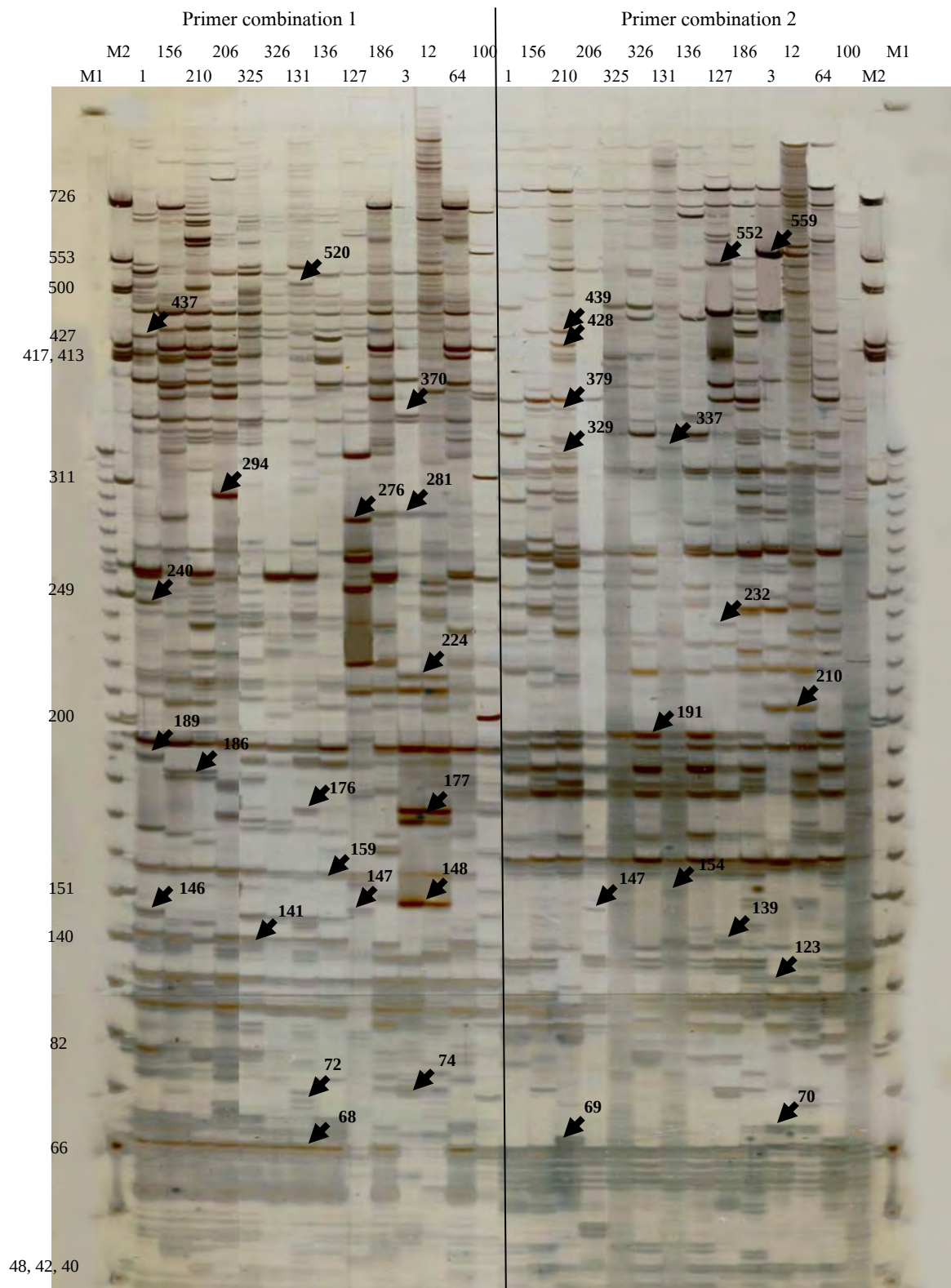
No.	Accession no.	Anthocyanin content ($\mu\text{mole/g}$ fresh bract) ¹						
		1 ²	2	3	4	5	6	total
1	2	0.01	0.04	0	0	0.02	0.06	0.13
2	3	0.16	0.76	0	0	0	0	0.92
3	6	0.02	0.21	0.04	0	0.39	0.92	1.58
4	7	0.10	0.06	0.07	0	0.06	0.93	1.22
5	8	0.03	0.08	0.03	0	0.22	0.47	0.83
6	9	0.03	0.19	0	0	0.12	0.48	0.83
7	19	0.02	0.05	0.01	0	0.04	0.22	0.35
8	27	0	0	0	0	0	0	0
9	45	0	0	0	0	trace ³	0	trace
10	223	0	0.02	0	0.34	0	0	0.36

¹, As equivalent moles to cyanidin-3-rutinoside

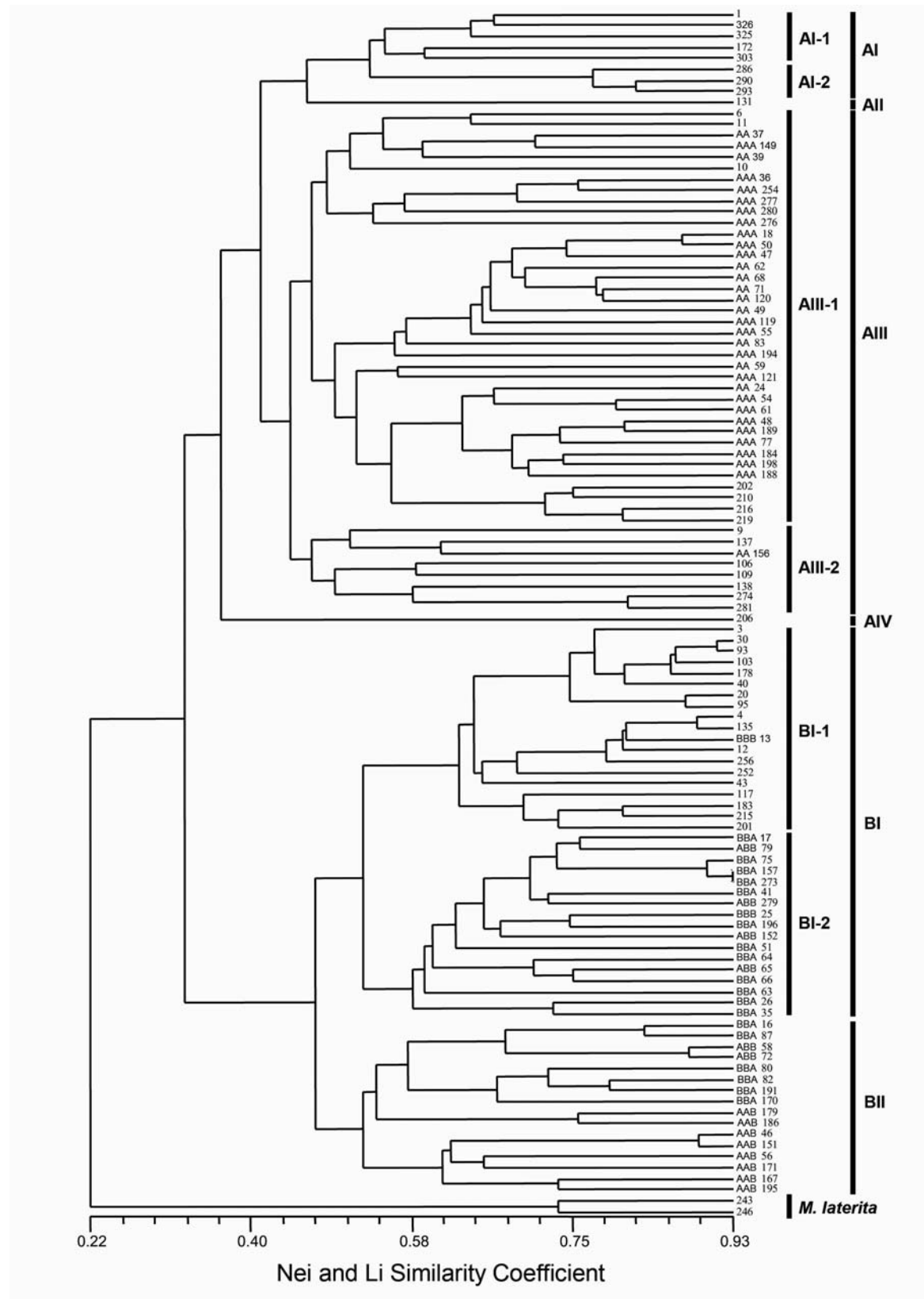
², Peak no.1 = delphinidin-3-rutinoside, 2 = cyanidin-3-rutinoside, 3 = petunidin-3-rutinoside, 4 = pelargonidin-3-rutinoside, 5 = peonidin-3-rutinoside, 6 = malvidin-3-rutinoside

³, < 0.001 $\mu\text{mole/g}$ bract

รูปที่ 6 DNA polymorphic band จาก AFLP primers combination 1, 2 ของกล้วยบางตัวอย่าง (Wongniam 2008) ลูกศรแสดงตำแหน่งแถบ DNA จำเพาะและขนาด (bp) ของกล้วยแต่ละตัวอย่าง (accession No.)

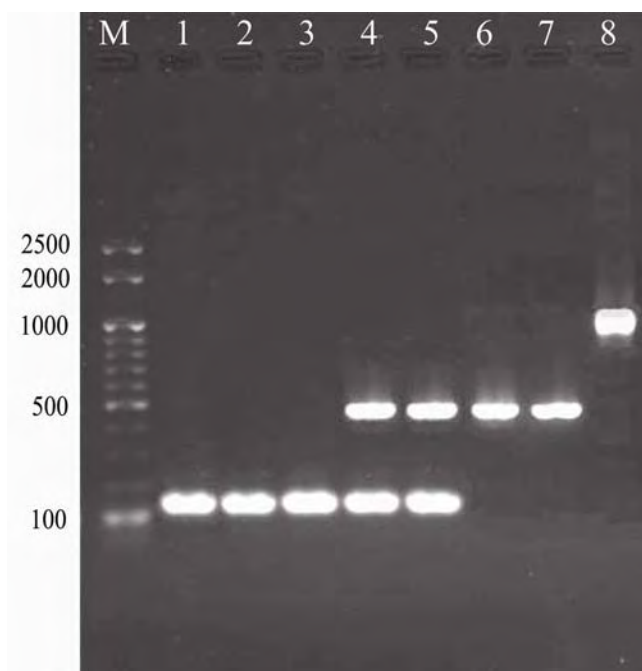


รูปที่ 7 UPGMA cluster analysis ด้วย Nei and Li Similarity Coefficient จากความหลากหลายของขนาดชิ้น DNA จาก AFLP; AI (*M. acuminata* subsp. *siamea*), AII (*M. acuminata* subsp. *microcarpa*), AIII (*M. acuminata* subsp. *malaccensis* และกล้วยปลูก AA, AAA), AIV (*M. acuminata* subsp. *truncata*), BI *M. balbisiana* และกล้วยปลูกส่วนใหญ่ในกลุ่ม ABB/BBA และ BBB, BII กล้วยตานีอีกกลุ่มและกล้วยปลูกกลุ่ม AAB และ ABB ในส่วนที่เหลือ (Wongniam 2008)



Marker name	<i>Musa</i>	Allele size (bp)	Primers (5'-3')	Tm (°C)
A64B204C4	<i>M. acuminata</i>	130	F: TAG TCT ATC ATC ACT GCT A R: TCA CTG CTG GAG GTG T	45 47
A210B204C5	<i>M. acuminata</i>	110	F: GAG AGT TAG AGT GGA GGT R: GAC TGC GTA CCA ATT CA	46 45
A127B409C3	<i>M. acuminata</i>	330	F: CGA CCG TGG CAC CTA R: CAA TCA CAG AAT AAG ATC AAG	48 46
A127B527C7	<i>M. acuminata</i>	430	F: AGG CAG ACC AGA CCT T R: ATT CAG CAG AAT CTG GTT	46 45
A3B554C8	<i>M. balbisiana</i>	500	F: TTC TAT TGA ACG AGA GAT C R: GCT GTG CAG GAA TGA G	45 46
A3B170C5	<i>M. balbisiana</i>	130	F: CTC GGC TAC CTA CCC R: CCT GGT TGT CGC CTT	45 45
A3B155C5	<i>M. balbisiana</i>	117	F: CAA GTC AGT CAA CTA CCC R: CTG CGT ACC AAT CAC C	45 45
A3B264C7	<i>M. balbisiana</i>	218	F: CAA TAT GCA CGA GAT CCT R: CAG CAC AAG TAA TAC AAC T	46 45

ตารางที่ 4. แสดงตัวอย่าง primer ที่จำเพาะกับชนิดกล้วยป่า *Musa acuminata* และกล้วยตานี *M. balbisiana* ที่ได้จากการวิเคราะห์แถบ DNA ที่มีความจำเพาะกับกล้วยแต่ละชนิดที่เกิดขึ้นโดย AFLP ซึ่งได้มีการทดสอบแล้วว่าให้ผลจำเพาะจริง



รูปที่ 8. แสดงตัวอย่างการใช้ specific combination primers (A64B204C4 และ A3B554C8) เพื่อการวิเคราะห์ชนิดและลูกผสมของกล้วยป่าและกล้วยปลูกดังนี้: Lane M: Marker 100 bp; Lane 1: *M. acuminata* subsp. *malaccensis* ‘ป่าทะเลบัน’ (SS & JS 210); Lane 2: *Musa* (AA) ‘นีนางรำ’ (SS & JS 156); Lane 3: *Musa* (AAA) ‘นาถ’ (SS & JS 036); Lane 4: *Musa* (AAB) ‘งาช้าง’ (SS & JS 186); Lane 5: *Musa* (ABB) ‘น้ำवानวล’ (SS & JS 064); Lane 6: *M. balbisiana* ‘ตานีป่าตาดหลวง’ (SS & JS 012); Lane 7: *Musa* (BBB) ‘เล็บช้างกู่’ (SS & JS 025); Lane 8: *M. laterita* ‘บัวสีส้มท่าขุน’ (SS & JS 243)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมพันธุ์กรรมของกล้วยทั้งพันธุ์กล้วยป่าและกล้วยปลูกจากแหล่งต่างๆที่น่าสนใจทั่วประเทศ

จากการสำรวจพันธุ์กล้วยทั่วประเทศพบว่าประเทศไทยมีความหลากหลายของกล้วยสูงมากโดยพบเป็นกล้วยป่าที่พบในธรรมชาติ 9 ชนิด นำเข้า 4 ชนิดในจำนวนนี้พบกล้วยตานีป่า *Musa balbisiana* Colla ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานอย่างเป็นทางการว่ามีอยู่ในประเทศไทยแต่การวิจัยครั้งนี้ทำให้สามารถบอกลักษณะความแตกต่างและขอบเขตการกระจายพันธุ์ของกล้วยตานีป่าว่าอยู่บริเวณไหนและต่างกับกล้วยตานีปลูกอย่างไร นอกจากนี้ยังพบว่ากล้วยป่า *Musa acuminata* Colla มีความหลากหลายมากที่สุดคือพบถึง 4 ชนิดย่อย ด้วยการสังเกตจากลักษณะภายนอกและเทียบเคียงกับข้อมูลอ้างอิงก่อนๆ (De Langhe et al., 2000) ได้แก่ subspecies *malaccensis*, *microcarpa*, *siamea*, *truncata* ซึ่งอาจจะพบมากกว่านี้ถ้าได้มีการตรวจสอบค้นหาต่อไป โดย subspecies *truncata* เป็น new record คือไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อนและยังพบกล้วยอีก 2 ชนิดซึ่งไม่เคยมีรายงานที่ไหนมาก่อนเลยและคาดว่าจะจะเป็นชนิดใหม่ของโลก (*Musa* sp. 1, *Musa* sp. 2) ซึ่งจะได้มีการกำหนดกล้วยตัวแทนในแต่ละกลุ่มเพื่อไว้อ้างอิงต่อไปและอาจกล่าวได้ว่าการศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้นำมาซึ่งการเก็บสะสมข้อมูลและเชื้อพันธุ์กล้วยป่าที่สมบูรณ์ที่สุดในประเทศไทยและจะพยายามให้เป็นแหล่งพันธุ์กล้วยอ้างอิงที่สำคัญแหล่งหนึ่งของโลกในอนาคตต่อไป

ในส่วนของกล้วยปลูกนอกจากสำรวจจากแปลงรวมพันธุ์กล้วยที่ได้เคยมีผู้สะสมไว้มาก่อนแล้ว (Chomchalow and Silayoy 1984) ทางคณะผู้วิจัยได้รวบรวมข้อมูลเพิ่มเติมไว้อีกและได้พบกล้วยปลูกพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกล้วยไข่ดำ กล้วยนิ้วพญาสาละวิน รวมทั้งพบกล้วยที่มีลักษณะแปลกๆ เช่นมีปลีสีเหลือง มีปลีจำนวนมากแทงยอดออกมาแทนผลเป็นต้น

2. ระดับและการกระจายของสีแดงและความเผด

จากการย้อมส่วนต่างๆ ของกล้วยด้วยวิธี modified Prussian blue และการวัดสารปริมาณในสารสกัดจากส่วนต่างๆ เทียบกับ standard catechin พบว่าส่วนที่มีความเข้มข้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุดคือ ใบกล้วยทั้งอ่อนและแก่หอยกทั้งที่ยังไม่ออกปลีและออกปลีแล้ว และส่วนที่มีความเข้มข้นของปริมาณแทนนินน้อยที่สุดคือ เหง้าและกาบปลีอ่อนตามลำดับ สำหรับกล้วยชนิดต่างๆ พบว่าปลีกล้วยหูกและกล้วยตานีมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลน้อยที่สุดสำหรับผลกล้วยในระยะการสุกต่างๆ พบว่าสารประกอบฟีนอลที่สะสมในเนื้อเยื่อกล้วย ลดลงตามระดับการสุกที่เพิ่มขึ้น การติดสี Prussian blue จะเริ่มจางจากส่วนเนื้อผล ซึ่งเป็นผนังผลชั้นกลาง (mesocarp) และผนังผลชั้นใน (endocarp) โดยสุกจากช่องในรังไข่ (locule) ขยายออกไปรอบๆ และเริ่มสุกจากโคนผลไปหาปลายผล (Chaohongsa 2007) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดลักษณะการกระจายตัวของสารประกอบฟีนอลเช่นนี้ น่าจะมาจากความแตกต่างในแต่ละพันธุ์และการที่กล้วยต้องป้องกันส่วนที่ใช้สร้างอาหารและการเป็นเหตุเป็นผลกับส่วนของกล้วยที่มนุษย์จะเลือกรับประทานหรือเหตุผลจากสรีรวิทยาของกล้วยในการสร้าง ขนส่งและสะสมหรือแปรรูปสารอาหารในส่วนต่างๆ ของต้น

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกล้วย พบว่านอกเหนือจากสารประกอบฟีนอลแล้วกล้วยยังอุดมไปด้วยไขมัน โปรตีน และน้ำตาลซึ่งเป็นไปได้ว่าน้ำตาลเป็นส่วนหนึ่งของน้ำเลี้ยงของพืชซึ่งต้องมีสารอาหารต่างๆ สำหรับการเจริญเติบโตของพืชรวมอยู่ด้วย ตัวสารประกอบฟีนอลเองก็มีสารบางตัวที่น่าสนใจเช่นพบว่ามี dopamine และ N-acetyl serotonin อยู่ในปริมาณสูงซึ่งอาจจะเกี่ยวกับการสร้าง melanin ที่ทำให้กล้วยทั้งอมจัดมีสีดำ และสารนี้มีมากในกล้วย *Musa acuminata* หรือกล้วยปลูกที่มี A genome ในบางกล้วยตานีจะมีสารประกอบฟีนอลเฉพาะคือ caffeoylquinic acid และ myricetin glycoside สารประกอบเหล่านี้นอกจากจะทำให้ยางกล้วยเป็นสีน้ำตาลได้ง่ายแล้วยังมีประโยชน์ในด้านอื่น เช่นเป็น mordant, antioxidant หรือสารมีฤทธิ์ทางยาอื่นๆ เช่นห้ามเลือด ลดการอักเสบ ลดไขมันในเส้นเลือดซึ่งควรจะมีการทดสอบและขยายผลต่อไป (Pothavorn 2008)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสีปลีในกล้วยป่าหลายชนิดพบว่ากล้วยป่ามี anthocyanin ทั้งหมด 6 ชนิด โดยทั้งหมดเป็น 3-rutinoside conjugate ของ delphinidin, cyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin และ malvidin โดยกล้วยส่วนใหญ่จะพบ anthocyanin ทั้ง 5 ชนิดยกเว้น pelargonidin ซึ่งจะพบเฉพาะใน *Musa coccinea* ส่วนกล้วยผาและกล้วยตานีจะพบเฉพาะ delphinidin กับ cyanidin เท่านั้น ส่วนกล้วยนวล (*Ensete glaucum*) และกล้วยป่าปลีเหลือง (*Musa acuminata* yellow bract) นั้นไม่พบ anthocyanin ตัวใดเลย ซึ่งสิ่งนี้จะช่วยอธิบาย metabolic diversity และการวิวัฒนาการของกล้วยได้ (Kitdamrongsont et al., 2008)

3. ศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ด้วย AFLP ด้วย 8 คู่ primer จากกล้วย 110 ตัวอย่างมีค่า polymorphic bands/primer เป็น 89.25 และพบ 106 unique bands จากกล้วยทั้งหมด ค่า GDEs (Genetic Diversity Estimates) ระหว่างกล้วย *Musa acuminata* 49.2% และระหว่างกล้วย *Musa balbisiana* 37.0% การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแยกกลุ่มกล้วยที่มี genome A ล้วน ออกจากที่มี B ปนหรือ B ล้วน โดยในกล้วยกลุ่ม A มีกล้วย *Musa acuminata* ที่แยกกลุ่มย่อยในระดับ subspecies ได้ค่อนข้างชัดเจน และกล้วยปลูกที่เป็น AA, AAA genome มีความใกล้ชิดกับ *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* สำหรับกลุ่ม B แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยกลุ่มแรก เป็นกล้วยตานีและกล้วยปลูก ABB, BBB ส่วนใหญ่กลุ่มนี้จะเป็นกล้วยที่ส่วนหนึ่งหรือทั้งหมดของพันธุกรรมกำเนิดในบริเวณประเทศไทย กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบไปด้วยกล้วยกลุ่ม AAB และ ABB บางส่วนกลุ่มนี้เข้าใจว่านำเข้ามาในประเทศตั้งแต่โบราณ

การทำ specific marker ได้สกัด DNA จาก 27 unique bands ที่เลือกนำไป sequencing และออกแบบ primers ได้ 19 combination primers นำไปทดสอบแล้วเหลือที่ใช้การได้คืออยู่ 8 คู่เป็น A specific 4 คู่ และ B specific 4 คู่ อย่างไรก็ตามการใช้ primer เพียง 1 คู่อาจไม่สามารถแยกได้อย่างถูกต้อง 100% ต้องใช้หลายๆ คู่ประกอบกันเพื่อยืนยันผลและ primer เหล่านี้ใช้แยกความแตกต่างของปริมาณ A:B genome ในกล้วยลูกผสมที่มีทั้ง 2 genome ไม่ได้ (Wongniam in preparation)

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

ประเทศไทยเป็นส่วนหนึ่งของแหล่งกำเนิดกล้วยมีความหลากหลายของชนิดพันธุ์และรูปแบบการใช้ประโยชน์จากมนุษย์อันเป็นทรัพยากรและข้อมูลอันมีค่ายิ่ง จึงควรมีการส่งเสริมงานวิจัยเช่น การพัฒนาพันธุ์ การใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา การดูแลหลังเก็บเกี่ยวและประสานงานการใช้ประโยชน์จากองค์กรต่างๆ ที่มีศักยภาพที่จะทำได้ให้มากขึ้น เพื่อให้เกิดการพัฒนาและใช้ประโยชน์ได้เท่าเทียมกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ได้รับการสนับสนุนเป็นอย่างดี

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

หลังจากที่ได้ทราบองค์ประกอบหลักของสารประกอบฟีนอลในยางกล้วยและสารให้สีแดงในกาบปลีกล้วยแล้ว จะได้มีการหาความสัมพันธ์ภายในและระหว่างกล้วยกลุ่มต่างๆ ว่ามีสารใดเป็นบ่งเฉพาะกลุ่มหรือมีความสัมพันธ์ทางเมตาโบลิสมอย่างไรซึ่งอาจใช้เป็นตัวช่วยในการค้นหา gene และ protein ที่เกี่ยวข้องโดยเทียบเคียงกับฐานข้อมูลและค้นหา gene จาก cDNA library ต่อไป นอกจากนี้ยังพบพันธุ์กล้วยในธรรมชาติที่ปลีและต้นเป็นสีเหลืองและไม่พบ anthocyanin เลย กล้วยนี้ยังมีองค์ประกอบ phenolic compounds ที่เป็นแบบเฉพาะซึ่งเป็นที่น่าสนใจและอาจช่วยอธิบายความหลากหลายของ flavonoid metabolism ในกล้วยแต่ละกลุ่มได้

สำหรับแถบ DNA จำเพาะที่ได้จาก AFLP จนสามารถสร้าง primer หรือ probe ที่มีความจำเพาะต่อแต่ละชนิดกล้วยได้จะได้มีการขยายผลต่อในการหา primer ที่จำเพาะกับ subspecies, genus หรือ ความเผ่ามากหรือปลีเหลืองต่อไปและถ้าเป็นไปได้ข้อมูลที่ได้ อาจจะเป็นประโยชน์ในการสร้าง microsatellite DNA markers เพื่อกำหนดมาตรฐานพันธุ์กล้วยไทย

ซึ่งได้นำเสนอโครงการเพื่อขอทุนพัฒนานักวิจัยกับ สกว. แล้ว ข้อมูลที่คณะผู้วิจัยค้นพบแล้วเหล่านี้เป็นข้อมูลที่มีค่า ส่วนใหญ่เป็นข้อมูลซึ่งไม่เป็นที่รู้กันมาก่อนจึงจำเป็นต้องมีการรวบรวมประมวลและเผยแพร่ในระดับชาติและนานาชาติต่อไป

ผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

เรื่องแรกได้ตีพิมพ์ไปแล้วได้แก่ Kitdamrongsont, K., Pothavorn, P., Swangpol, S., Wongniam, S., Atawongsa, K., Svasti, J., and Somana, J. (2008) Anthocyanin Composition of Wild Bananas in Thailand. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (22), 10853-10857. ส่วนเรื่อง “Sap Phenolic Compositions of Some Bananas in Thailand” ในวารสาร Journal of Agricultural Food Chemistry ยังอยู่ระหว่างการเตรียมจัดพิมพ์คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ภายในปีนี้

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้มีการนำข้อมูลเรื่องกล้วยบางส่วนเพื่อนำเสนอต่อสาธารณชนได้แก่ รายการความรู้คือประทับใจ ตอน ความงามในความจริง สทท 11 ๒๔ มิ.ย. พ.ศ. ๒๕๕๐ 9.30-10.00 น. และ รายการคุยกันทุกเรื่อง ตอน เรื่องกล้วยกล้วย FM 98.75 MHz Trinity Family Radio ๒๔ ส.ค. พ.ศ. ๒๕๕๒ 14.00 - 17.00 น.

ได้มีการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ซึ่งสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโทไปแล้ว 4 รายในจำนวนนี้ 3 รายยังเป็นนักวิจัยประจำในมหาวิทยาลัยมหิดล

นอกจากนี้ยังได้มีเครือข่ายความร่วมมือเชิงวิชาการกับโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี โดยจะมีการประสานงานกับ ดร. ปิยรัชฎ์ ปรินญาพงษ์ ในการใช้ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ DNA polymorphism รวมถึงการเก็บรักษาตัวอย่างที่มีชีวิตในหลอดทดลอง ในด้านการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงอนุกรมวิธานได้มีการประสานงานกับ ดร. ศศิวิมล แสงผล ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและ ดร. ต่อศักดิ์ สีสานนท์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซึ่งได้รับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ของสกว. แล้วในหัวข้อ “การจัดการทรัพยากรพันธุกรรมกล้วยในประเทศไทยอย่างยั่งยืน” ส่วนการวิเคราะห์ห้องคัพประกอบทางชีวเคมี ได้มีการประสานงานกับ ศ.ดร. มรว. ชัยนุสร สวัสดิวัฒน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในส่วนที่เกี่ยวกับพืชสวนและการเกษตรมีการประสานงานกับ ดร. ณรงค์ โจมเจลา และคุณ สมรรถชัย ฉัตราคม ประธานและรองประธานเครือข่ายพืชปลูกพื้นเมืองไทย ในส่วนของการแสดงพันธุ์กล้วยและเผยแพร่ความรู้ต่อสาธารณชน ได้มีการประสานงานกับ ท่านพระครูวิสุทธิธรรมพาล เลขานุการในสมเด็จพระสังฆราช และ คุณจินตนา คุ่มกล้า ผู้ดูแลแปลงกล้วยในสวนเรือนไทยพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติกำแพงเพชร

ในส่วนของข้อตกลงการร่วมวิจัยระหว่างประเทศได้ทำข้อตกลงระหว่าง Czech Academy of Science และ Institute of Experimental Botany ประเทศสาธารณรัฐเชคกับคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล โดยจะมีโครงการการวิจัยร่วมกันเกี่ยวกับ Banana molecular cytogenetics และ Banana Nuclear Genome Size ซึ่งจะได้ประสานงานและแลกเปลี่ยนนักวิจัยกับ Dr. Jaroslav Dolozel ผู้อำนวยการ Institute of Experimental Botany ต่อไป

3. อื่นๆ

มีการนำเสนอผลงานเชิงวิชาการในภาคบรรยาย 3 เรื่อง เรื่องแรก ในงานประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 3 ณ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างวันที่ ๒๕-๒๖ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๕๒ ในหัวข้อ “Genomic Marker for Thai Banana Cultivars Developed from AFLP Technique” เรื่องที่ 2 ในงานประชุมวิชาการสมาคมกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ระหว่างวันที่ ๒๕ เมษายน-๑ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๒ ในหัวข้อ “กล้วย...เรื่องไม่กล้วย” เรื่องที่ 3 ในงาน

BMB conference 2009 ณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ ๗-๙ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๒ ในหัวข้อ “Anthocyanin of Wild Bananas in Thailand” นอกจากนี้ยังได้มีการนำข้อมูลจากการสำรวจบางส่วนไปตีพิมพ์เป็นหนังสือ “๑๐๘ พันธุ์กล้วยไทย” ซึ่งได้สำเร็จเป็นรูปเล่มแล้ว

เอกสารอ้างอิง

- Atawongsa K. Morphological Diversity of Wild Banana (*Musa acuminata* Colla) in Thailand. M.Sc. Thesis, Mahidol University. 2008.
- Chaohongsa W. The Distribution of Tannin and Correlation to Astringency Level in some Bananas in Thailand. Undergraduate thesis. Mahidol University. 2007
- Chomchalow, N., & Silayoi, B. 1984. Banana germplasm in Thailand. *BPGR/SEAN* 8(4), 23-28.
- De Langhe, E., D. Wattanachaiyingcharoen, H. Volkaert and S. Piyapitchard. 2002. Biodiversity of wild Musaceae in Northern Thailand. In: Molina, A.B. and Roa, V.N. (eds), *Advancing banana and plantain R & D in Asia and the Pacific*. INIBAP, Montpellier, France. pp. 71-83
- Hagerman A. E. (1998) Tannin handbook In <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>
- IPGRI-INIBAP/CIRAD (1996) Descriptor for banana (*Musa* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy/International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.
- Kitdamrongsont, K., Pothavorn, P., Swangpol, S., Wongniam, S., Atawongsa, K., Svasti, J., and Somana, J. (2008) Anthocyanin Composition of Wild Bananas in Thailand. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (22), 10853-10857.
- Loesecke, V. (1950). *Bananas*. New York, Interscience.
- Pothavorn P. Sap Composition in Some Bananas in Thailand. M.Sc. Thesis, Mahidol University. 2008.
- Wongniam S. Genetic Diversity of Thai Banana (*Musa*) Using AFLPs. M.Sc. Thesis, Mahidol University. 2008.
- Wongniam S., Somana J., Seelanan T., Chareonsap P. and Swangpol S. Genetic Diversity and Species-Specific Markers from AFLP Analyses of Thai Bananas. *manuscript in preparation*

Article

Anthocyanin Composition of Wild Bananas in Thailand

Kasipong Kitdamrongsont, Pongsagon Pothavorn, Sasivimon Swangpol, Siripope Wongniam, Kanokporn Atawongsa, Jisnuson Svasti, and Jamorn Somana

J. Agric. Food Chem., **2008**, 56 (22), 10853-10857 • DOI: 10.1021/jf8018529 • Publication Date (Web): 30 October 2008

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on December 29, 2008

More About This Article

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

[View the Full Text HTML](#)

Anthocyanin Composition of Wild Bananas in
ThailandKASIPONG KITDAMRONGSONT,[†] PONGSAGON POTHAVORN,[†]
SASIVIMON SWANGPOL,[‡] SIRIPOPE WONGNIAM,[‡] KANOKPORN ATAWONGSA,[‡]
JISNUSON SVASTI,[†] AND JAMORN SOMANA*,[†]Department of Biochemistry, Mahidol University, Rama VI Road, Rajthevi, Bangkok 10400, Thailand,
and Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Rajthevi,
Bangkok 10400, Thailand

Anthocyanins were isolated from male bracts of 10 wild species of bananas (*Musa* spp. and *Ensete* spp.) distributed in Thailand. Six major anthocyanin pigments were identified by high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS), and tandem mass spectrometry (MS/MS). They are delphinidin-3-rutinoside (m/z 611.2), cyanidin-3-rutinoside (m/z 595.8), petunidin-3-rutinoside (m/z 624.9), pelargonidin-3-rutinoside (m/z 579.4), peonidin-3-rutinoside (m/z 608.7), and malvidin-3-rutinoside (m/z 638.8). On the basis of the types of pigment present, the wild bananas can be divided into 5 groups. The first group comprises *M. itinerans*, *Musa* sp. one, *Musa* sp. two, and *M. acuminata* accessions, which contain almost or all anthocyanin pigments except for pelargonidin-3-rutinoside, including both nonmethylated and methylated anthocyanins. The second group, *M. acuminata* subsp. *truncata*, contains only malvidin-3-rutinoside while the third group, *M. coccinea*, contains cyanidin-3-rutinoside and pelargonidin-3-rutinoside. The fourth group, *M. acuminata* yellow bract and *E. glaucum* do not appear to contain any anthocyanin pigment. The fifth group consists of *M. balbisiana*, *M. velutina*, *M. laterita*, and *E. superbum* which contain only nonmethylated anthocyanin, delphinidin-3-rutinoside, and cyanidin-3-rutinoside. Total anthocyanin content in the analyzed bracts ranged from 0–119.70 mg/100 g bract fresh weight. The differences in the type of anthocyanin and variation in the amounts present indicate that wild bananas show biochemical diversity, which may be useful for identifying specific groups of bananas or for clarifying the evolution of flavonoid metabolism in each banana group.

KEYWORDS: wild bananas; anthocyanin; male bract; *Musa*; *Ensete*

INTRODUCTION

Bananas are an important fruit crop of the world. They are produced for local consumption and trading mostly in tropical and subtropical areas (1). Most cultivated bananas are believed to have originated from two wild banana species: *Musa acuminata* Colla and *M. balbisiana* Colla (2, 3). Simmonds (4, 5) proposed that wild and cultivated bananas had their origins in Southeast Asia and were later introduced to secondary centers. In many Southeast Asian locations, male buds of some wild and cultivated bananas are used as vegetables (5), and bract color is a potential source of food colorants (6). In terms of banana classification (7), male bract color is an important character for classifying wild bananas into species and subspecies. However, using bract color description was difficult to compare and quantify. The type of pigments in the banana bract

was preliminary analyzed by acid extraction and paper chromatography (4, 8). Simmonds suggested from this study that the colors of bracts were due to glycoconjugated anthocyanidin pigments. However, the information of sugar type and linkage position was unattainable due to acid hydrolysis. Recently, anthocyanin in many plants has been successfully identified by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) (9–11) including those from strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) (12), grape (*Vitis vinifera*) (13), blueberry (*Vaccinium corymbosum*) (13), black raspberry (*Rubus occidentalis*) (13), red raspberry (*Rubus idaeus*) (13), black current (*Ribes nigrum* L.) (14). For bananas, anthocyanin from bracts of 59 accessions which included *Musa acuminata*, *Musa balbisiana* species and *Musa* cultivars was extracted by acid hydrolysis and analyzed by TLC and HPLC for chemotaxonomic study (15). The assigned pigments were 3-rutinosyl of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin. Further study in *Musa* × *paradisica* by HPLC-MS (6) was also reported the same 5 anthocyanin pigments in addition with minor amount of pelargonidin-3-rutinoside, cya-

* Corresponding author. Phone: +662 2015468. Fax: +662 3547174.
E-mail: scjism@mahidol.ac.th.

[†] Department of Biochemistry.

[‡] Department of Plant Science.



Figure 1. Male bract colors of wild bananas in Thailand. (A) *Musa acuminata* subsp. *siamea* 1; (B) *M. acuminata* subsp. *siamea* 2; (C) *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 1; (D) *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 2; (E) *M. acuminata* subsp. *truncata*; (F) *M. acuminata* yellow bract; (G) *M. balbisiana*; (H) *M. itinerans*; (I) *M. laterita*; (J) *M. velutina*; (K) *M. coccinea*; (L) *Musa* sp. one unknown; (M) *Musa* sp. two unknown; (N) *Ensete glaucum*; (O) *Ensete superbum*.

nidin-3-rhamnoside, -7-glucoside and unidentified acylated anthocyanin. However, the glycosylating group, type of anthocyanidin aglycone and metabolic relationships are still unknown in many *Musa* and *Ensete* species. In this paper, 15 samples of wild bananas species of various color types (Figure 1) were analyzed for their anthocyanin composition.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials. Wild banana specimens were collected from natural habitats in Thailand, characterized, identified and deposited in a private *ex situ* germplasm collection in Nakorn Pathom, Thailand. Voucher specimens were identified based on Simmonds (4) and Cheesman (2) and deposited at Suan Luang Rama IX Herbarium, Thailand. Details of the 15 accessions used, shown in Table 1, were based on Wongniam (16). Outermost nonopening bracts of male bud, which fully develop their colors and not yet start deterioration, were harvested from the collection on the same day as extraction.

Reagents and Standards. Standard keracyanin chloride (cyanidin-3-O-rutinoside chloride) was purchased from Fluka. All solvents for High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry were HPLC grade (Fisher).

Extractions. Anthocyanin pigments were extracted from fresh male bracts by grinding one gram of bract with 60% methanol containing 0.027% HCl (v/v). The slurry was then transferred into a 15 mL tube, kept overnight at 4 °C, and centrifuged at 4000 g for 20 min. The supernatant was collected and stored at -20 °C until analysis. All samples for HPLC analysis were filtered through 0.45 μ m nylon membrane (Millex, Millipore) before injections. Determination of total anthocyanin was performed as described in Giusti and Wrolstad (17, 18) by pH differential method and total anthocyanin was calculated as equivalent grams to cyanidin-3-O-rutinoside.

High Performance Liquid Chromatography Analysis. Anthocyanins were analyzed by reversed-phase HPLC on a HPLC model 717 plus equipped with pump model 600 and photodiode array detector (PDA) model 2996 (Waters). A Nova-pak C-18 (3.9 $\times$ 300 mm, Waters) with protected guard was used. Solvent A was acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid (v/v) and solvent B was H₂O containing 0.1% trifluoroacetic acid (v/v). The program used a linear gradient from 15 to 95% solvent A for 45 min and returned to 15% solvent A for the next 15 min, with simultaneous detection at 280 and 530 nm. Injection volume was 20 μ L. Anthocyanin peaks were then fractionated online with a flow rate 0.5 mL/min (1 min per fraction) using a fraction collector (Waters). Fractions were kept at -20 °C for mass spectrometric analysis.

Mass Spectrometry of Anthocyanin. Anthocyanin fractions were directly infused into a mass spectrometer (Esquire 3000 plus, Bruker) equipped with ESI-source. Anthocyanin molecular ion mass and their tandem mass spectra were detected in positive ion mode with quadrupole ion trap mass analyzer (resolution 0.1 *m/z*) and parameter

was setup as follow: capillary 4000 V, Nebulizer 10 psi, Dry Gas 7.0 L/min, Dry temperature 250 °C, skimmer 40 V, Cap exit 121.0 V, Oct1 DC 9.0 V, Oct2 DC 1.10 V, Trap drive 40, Oct RF 100 Vpp, Lens1 -10 V, Lens2 -35 V.

RESULTS AND DISCUSSION

HPLC Chromatogram. The HPLC chromatogram of crude extract obtained from wild banana bract *M. acuminata* subsp. *siamea* 1 (Figure 2A) and *M. coccinea* (Figure 2B) revealed a total of six major anthocyanin peaks, corresponding to compounds shown in Figure 3. Other *Musa* and *Ensete* species exhibited profiles within 5 anthocyanin peak profiles as found in *M. acuminata* subsp. *siamea* 1, but with varying contents of each peak (Table 3). Each pigment elution time was similar in all samples. The elution order was from high to low pigment polarity, as follows: delphinidin-3-rutinoside to cyanidin-3-rutinoside, petunidin-3-rutinoside, pelargonidin-3-rutinoside, peonidin-3-rutinoside and malvidin-3-rutinoside, respectively.

Identification of Anthocyanins. Characterization of anthocyanins from wild banana bracts based on UV-vis spectral analysis (18–20) from HPLC and mass spectrometry data, is presented in Table 2. The UV-vis spectra of anthocyanin peaks 1–5 show maximum absorption in the visible region at 520–530 nm with percent ratio $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ of 24–44% indicating 3-glycosylation of anthocyanin (21), the percent ratios $A_{310}/A_{\text{vis-max}}$ of 8–32% for peaks 2–5 indicate that anthocyanins from wild bananas are simple anthocyanins, without acylation. The percent ratio $A_{310}/A_{\text{vis-max}}$ in peak 1 is 69%, which suggests a single acylation (21, 22), but the mass spectrometry data show no acylation of this anthocyanin. The λ_{max} obtained from our results are similar to those of previous studies in blackcurrant (14) and *Musa* $\times$ *paradisiaca* (*Musa* AAA group 3, 23, 24) confirming that the glycosylation is at the position 3 of anthocyanidin core.

With regard to the mass spectrometry data, anthocyanin peaks 1–6 clearly show the molecular ions (*m/z*) for six major anthocyanins (Table 2) were as follows; 610.8, 594.7, 624.8, 579.3, 608.7, and 638.8, respectively. During MS/MS analysis, molecular ions produced fragment ions at 464.8, 448.6, 478.6, 433.3, 462.6, and 492.7, indicating that all molecular ions lost 146 *m/z*, corresponding to a rhamnosyl group and further loss of a glucosyl group (162 *m/z*) to yield the common anthocyanidin aglycone cations at 302.7 (delphinidin, Dp), 286.7 (cyanidin, Cy), 316.6 (petunidin, Pt), 271.3 (pelargonidin, Pg), 300.7 (peonidin, Pn), and 330.7 (malvidin, Mv), respectively. The fragmentation pattern of molecular ions matched with those of previous studies in black raspberry (13, 25) and blackcurrants (14). This confirmed that the rutinosyl group is attached to the anthocyanidin core as peonidin-3-rutinoside. Furthermore, the fragmentation pattern from cyanidin-3-rutinoside (peak 2) is identical to standard cyanidin-3-rutinoside chloride (data not shown).

Determination of Anthocyanin Content in Bracts of Wild Bananas from Thailand. The anthocyanin contents in the bracts, determined by HPLC peak area monitored at 530 nm, are shown in Table 3. Wild bananas in Thailand showed some differences in anthocyanin contents. Anthocyanin could not be detected in *M. acuminata* (yellow bract) and *E. glaucum* which possessed yellow bracts. Cyanidin-3-rutinoside was detected in all banana bracts, except in yellow bract and *M. acuminata* subsp. *truncata*. Only pelargonidin-3-rutinoside could be detected in *M. coccinea*. Five anthocyanin pigments were detected in *M. acuminata* subsp. *siamea* 1 and subsp. *siamea* 2, which their bract color did not differ greatly from each other. *M.*

Table 1. List of Bananas Used in This Paper^a

scientific names	accession no. ^b	visual bract colors ^c	source provinces
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>siamea</i> 1	96	BL	Loei
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>siamea</i> 2	132	BL+PL tipYW	Nakhon Ratchasima
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 1	109	OR streak YW	Krabi
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 2	106	RP	Chumphon
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>truncata</i>	206	BL	Yala
<i>M. acuminata</i> (yellow bract)	173	GY+YW	Nakhon Ratchasima
<i>M. balbisiana</i>	135	GR	Phetchaburi
<i>M. itinerans</i>	313	RP	Mae Hong Son
<i>M. laterita</i>	243	OR	Kanchanaburi
<i>M. velutina</i>	168	pale PL	Unknown, possibly introduced
<i>M. coccinea</i>	223	OR	Unknown, possibly introduced
<i>Musa</i> sp. one (unknown) ^d	314	RP	Mae Hong Son
<i>Musa</i> sp. two (unknown) ^d	246	PP	Kanchanaburi
<i>E. glaucum</i>	318	YW	Tak
<i>E. superbum</i>	319	RP	Tak

^a Visual bract colors were defined using color chart from "Descriptor for Bananas" (30). Scientific names were based on Wongniam 2008 (26). ^b Wongniam 2008 (M.Sc. Thesis). ^c Defined by Color chart from "Descriptor for Bananas (30)". BL= Blue, PL= Purple, YW= Yellow, OR= Orange red, RP= Red Purple, GY= Green Yellow, GR= Green, PP= Pink Purple. ^d Unknown species, on the confirmation.

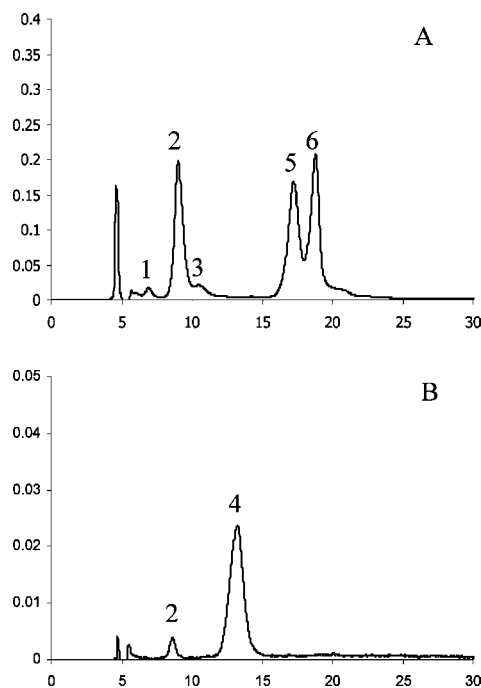


Figure 2. HPLC Chromatograms showing absorbance at 530 nm of anthocyanins obtained from *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 1. (A) Peak 1, delphinidin-3-rutinoside; Peak 2, cyanidin-3-rutinoside; Peak 3, petunidin-3-rutinoside; Peak 5, peonidin-3-rutinoside; Peak 6, malvidin-3-rutinoside. and *M. coccinea*. (B) Peak 2, cyanidin-3-rutinoside; Peak 4, pelargonidin-3-rutinoside. (Note: The first initial peaks are unknown artifact.)

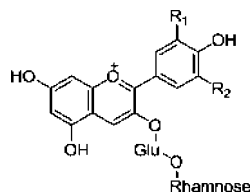


Figure 3. Chemical structure of anthocyanin pigments from bracts of wild bananas in Thailand. Delphinidin-3-rutinoside: $R_1 = OH$, $R_2 = OH$; Cyanidin-3-rutinoside: $R_1 = OH$, $R_2 = H$; Petunidin-3-rutinoside: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$; Pelargonidin-3-rutinoside: $R_1 = H$, $R_2 = H$; Peonidin: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$; Malvidin-3-rutinoside: $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$. *itinerans* had a different bract color and different proportion of anthocyanin pigments when compared to *Musa acuminata* subsp. *siamea* 1, 2. Delphinidin-3-rutinoside was found in *M.*

acuminata subsp. *malaccensis* 2, but not found in *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 1, even though they had a similar bract color. On the other hand, *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 1 and *Musa* sp. one possessed the same anthocyanin pigments even though they showed different bract colors. In *M. acuminata* subsp. *truncata*, only malvidin-3-rutinoside was found and its bract color differed from that of *M. acuminata* subsp. *siamea* 1 and *siamea* 2. In *M. balbisiana*, *M. velutina*, and *E. superbum*, only two types of anthocyanin pigments are found, delphinidin-3-rutinoside and cyanidin-3-rutinoside. *M. balbisiana* contained more cyanidin-3-rutinoside than delphinidin-3-rutinoside, while *E. superbum* had more delphinidin-3-rutinoside than cyanidin-3-rutinoside, and *M. velutina* showed equal amounts of both pigments. This might help to distinguish banana species showing different contents of nonmethylated anthocyanin. *M. laterita* had orange bracts containing only cyanidin-3-rutinoside. *Musa* sp. two possessed 3 pigments: delphinidin-3-rutinoside, petunidin-3-rutinoside, and malvidin-3-rutinoside.

The range of each anthocyanin content in fresh tissue from 15 samples of wild banana samples was 0.00–66.70 mg/100 g of delphinidin-3-rutinoside, 0.00–37.52 mg/100 g of cyanidin-3-rutinoside, 0.00–11.91 mg/100 g of petunidin-3-rutinoside, 20.25 μ mol/g of pelargonidin-3-rutinoside, 0.00–36.92 mg/100 g of peonidin-3-rutinoside and 0.00–70.27 mg/100 g of malvidin-3-rutinoside respectively. Total anthocyanin contents from each 15 samples ranged from 0.00–119.70 mg/100 g.

According to the present study, anthocyanin pigment profiles can be roughly divided to 5 groups according to present pigments and possible metabolic defective steps (Figure 4). The A group, which composed of *M. acuminata* subsp. *siamea* 1 and 2, subsp. *malaccensis* 1 and 2, *M. itinerans*, *Musa* sp. one and *Musa* sp. two (all in *Musa* section but not sure for unknown species), contains 3 to 5 anthocyanin types which both methylated and nonmethylated anthocyanin. Though the *Musa* sp. one and the *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 1 showed a comparable pairs of anthocyanin profiles, they possessed distinct morphology (26). The *Musa* sp. two and the *M. laterita* were related morphologically but their anthocyanin profiles were clearly different. The analyses, thus, indicated that these four accessions were distinct species. The B group, only *M. acuminata* subsp. *truncata* is in this group which presented only malvidin-3-rutinoside. It is possible to synthesize anthocyanin only via dihydromyricetin and might have so strong anthocyanin methylation that unable to detect neither delphinidin-3-rutinoside nor petunidin-3-rutinoside, which are partially methylated

Table 2. Chromatographic and Spectroscopic Characteristics of Anthocyanin Pigments from Wild Bananas

peak	retention time min.	[M] ⁺ m/z	fragments m/z	UV-vis peak nm	A ₃₁₀ /A _{vis peak} (%)	A ₄₄₀ /A _{vis peak} (%)	identity ^a
1	6.98	611.2	464.8, 302.9	279, 528	69	28	Dp-3-rutinoside
2	9.04	595.8	448.7, 286.7	275, 518	23	30	Cy-3-rutinoside
3	10.49	624.9	478.7, 316.7	272, 528	32	24	Pt-3-rutinoside
4	13.25	579.4	433.3, 271.2	282, 504	10	44	Pg-3-rutinoside
5	17.24	608.7	462.6, 300.7	279, 525	8	30	Pn-3-rutinoside
6	18.88	638.8	492.7, 330.6	279, 532	17	26	Mv-3-rutinoside

^a (Dp= delphinidin, Cy= cyanidin, Pt= petunidin, Pg= pelargonidin, Pn= peonidin, Mv= malvidin).

Table 3. Anthocyanin Contents from Bracts of Wild Bananas in Thailand

scientific names	anthocyanin content (mg/100 g bract) ^a						
	peak 1 ^b	2	3	4	5	6	total ^c
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>siamea</i> 1	11.91	8.34	11.91	0.00	7.15	70.27	109.58
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>siamea</i> 2	4.17	8.34	4.17	0.00	11.32	69.08	97.07
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 1	0.00	19.65	0.00	0.00	31.56	14.29	65.51
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 2	1.19	33.95	3.57	0.00	36.92	44.07	119.70
<i>M. acuminata</i> subsp. <i>truncata</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	37.52	37.52
<i>M. acuminata</i> (yellow bract)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. balbisiana</i>	6.55	32.75	0.00	0.00	0.00	0.00	39.30
<i>M. itinerans</i>	2.38	16.08	2.38	0.00	5.36	13.70	39.90
<i>M. laterita</i>	0.00	34.54	0.00	0.00	0.00	0.00	34.54
<i>M. coccinea</i>	0.00	1.19	0.00	20.25	0.00	0.00	21.44
<i>M. velutina</i>	2.98	5.36	0.00	0.00	0.00	0.00	8.34
<i>Musa</i> sp. one (unknown)	0.00	18.46	0.00	0.00	12.51	20.25	51.22
<i>Musa</i> sp. two (unknown)	5.36	7.74	4.17	0.00	7.74	15.48	40.50
<i>E. glaucum</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>E. superbum</i>	66.70	37.52	0.00	0.00	0.00	0.00	104.22

^a As equivalent gram to cyanidin-3-rutinoside (Molecular weight 595.53) (18). 0.00= not detected. ^b Peak numbers as mention in Table 2, calculated from ratio area under each HPLC peak multiplied by total anthocyanin. ^c Calculated by pH differential method from crude bract extracts (17).

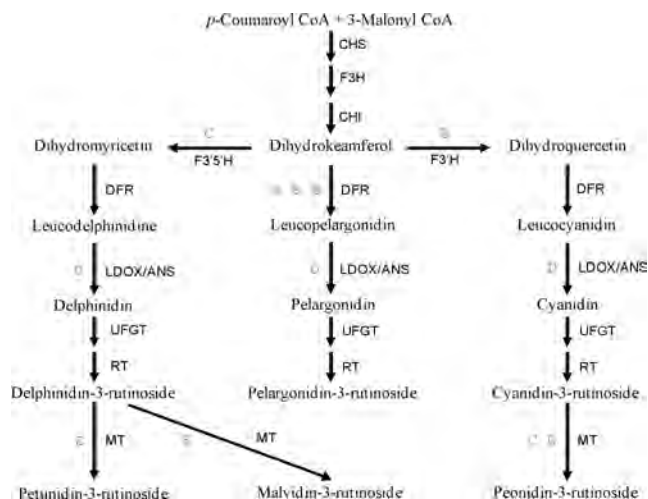


Figure 4. Possible limiting steps in anthocyanin biosynthetic pathway (modified from petunia (29)) from the anthocyanin profiles in each wild banana group (letter of each group in gray color at limiting steps). The enzyme names are CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone-3-hydroxylase; F3'H, flavanone-3'-hydroxylase; F3'5'H, flavanone 3',5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LDOX/ANS, leucoanthocyanidin dioxygenase/anthocyanidin synthase; UFGT, UDP glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase; RT, UDP rhamnose:anthocyanidin-3-O-glucoside rhamnosyltransferase; MT, methyltransferase.

anthocyanin pigments. This anthocyanin profile could be an evidence to confirm that *M. acuminata* subsp. *truncata* was a distinct subspecies from *M. acuminata* subsp. *malaccensis* (27). The C group, only *M. coccinea* (Callimusa section) presents cyanidin-3-rutinoside and pelargonidin-3-rutinoside which is

unique in this study. Thus imply for *M. coccinea* that it might be able to synthesize anthocyanin mainly via dihydrochalcone and little via dihydroquercetin and unable to do methylation on anthocyanin. In D group, yellow bract color group which is not detected any anthocyanin. Imply for this group that they might have problem either the step of turning leucoanthocyanidin to anthocyanidin or any prior steps in anthocyanin biosynthetic pathway. The E group which consists of *M. balbisiana* (Musa section), *M. laterita* (Rhodochlamys section), *M. velutina* (Rhodochlamys section) and *E. superbum* possessed 2 types of anthocyanin which are nonmethylated anthocyanin. The anthocyanin in this group could be synthesized via both dihydroquercetin and dihydromyricetin but unable to do methylation. These suspected defective metabolic steps of anthocyanin biosynthesis in bananas should be further investigated.

Our results show that only anthocyanin composition cannot directly determine visual bracts color. Other factors such as accumulation patterns, vacuolar pH and copigments in each individual cell or tissue area (28) also have influence. This study indicates that visual bract colors are not by themselves sufficient enough to be used as a strong character to classify bananas. Study of the anthocyanin composition or other phenotypic and molecular assessments are needed to provide more accurate classification. The present findings, together with the data from numerical morphological taxonomy (26) and DNA polymorphisms such as genomic DNA AFLP (16, 27), should be combined to validate the previous classification of wild bananas and may help to define groups or possible parental hybridizations or origins of cultivated bananas.

The project is supported by the New Researcher Support Fund from Mahidol University and the Thailand Research Fund grant MRG 5080329.

LITERATURE CITED

- (1) Price, N. S. The origin and development of banana and plantain cultivation. In *Bananas and Plantains*; Gowen, S., Ed.; Chapman & Hall: London, 1995; pp 1–13.
- (2) Cheesman, E., E. Classification of The Bananas. *Kew Bull.* **1947**, 2, 79–117.
- (3) Swangpol, S.; Volkaert, H.; Sotto, R. C.; Seelanan, T. Utility of Selected Non-coding Chloroplast DNA Sequences for Lineage Assessment of *Musa* Interspecific Hybrids. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, 40 (4), 577.
- (4) Simmonds, N. W. *The Evolution of Bananas*; Longmans: London, 1962.
- (5) Crouch, J. H.; Vuylsteke, D.; Ortiz, R. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). *Electron. J. Biotechnol.* **1998**, 1, 11–22.
- (6) Pazmino-Duran, E. A.; Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E.; Gloria, M. B. Anthocyanins from banana bracts (*Musa* × *paradisica*) as potential food colorants. *Food Chem.* **2001**, 73, 327–332.
- (7) Simmonds, N. W. Botanical Results of the Banana Collecting Expedition, 1954–5. *Kew Bull.* **1956**, 3, 463–489.

- (8) Simmonds, N. W. Anthocyanins in bananas. *Ann. Bot.* **1954c**, *18* (72), 471–482.
- (9) Giusti, M. M.; Rodriguez-Saona, L. E.; Griffin, D.; Wrolstad, R. E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (11), 4657–64.
- (10) de Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1003–1006.
- (11) Wu, X.; Prior, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (7), 2589–99.
- (12) Da Silva, F. L.; Escribano-Bailon, M. T.; Alonso, J. J. P.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT* **2007**, *40*, 374–382.
- (13) Tian, Q.; Giusti, M. M.; Stoner, G. D.; Schwartz, S. J. Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1091*, 72–82.
- (14) Slimestad, R.; Solheim, H. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (11), 3228–31.
- (15) Horry, J. P.; Jay, M. Distribution of Anthocyanins in Wild and Cultivated Banana Varieties. *Phytochemistry* **1988**, *27* (8), 2667–2672.
- (16) Wongniam, S. Genetic Diversity of Thai Banana (*Musa*) Cultivars Using AFLPs. M.Sc. thesis; Mahidol University, Bangkok, 2008.
- (17) Rodriguez-Saona, L. E.; Wrolstad, R. E. Unit F1.1: Anthocyanins. Extraction, Isolation and Purification of Anthocyanins. In *Handbook of Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R. E., Ed.; John Wiley & Sons: NJ, 2005; pp 1–17.
- (18) Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In *Handbook of Analytical Chemistry*; Wrolstad, R. E., Ed.; John Wiley & Sons: NJ, 2005; pp 19–31.
- (19) Harborne, J. B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* **1958**, *70* (1), 22–8.
- (20) Giusti, M. M.; Rodriguez-Saona, L. E.; Wrolstad, R. E. Molar absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated pelargonidin-Base Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4631–4637.
- (21) Drust, R. W.; Wrolstad, R. E. Unit F1.3: Anthocyanins. Separation and Characterization of anthocyanin by HPLC. In *Handbook of Analytical Chemistry*; Wrolstad, R. E., Ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, 2005; pp 33–45.
- (22) Strack, D.; Wray, V. Anthocyanins. In *Method in Plant Biochemistry*; Dey, P. M., Harborne, J. B., Eds.; Academic Press: San Diego, 1989; Vol. 1, pp 325–359.
- (23) Simmonds, N. W.; Shepherd, K. The taxonomy and origins of cultivated bananas. *J. Linn. Soc. Bot.* **1955**, *55*, 302–312.
- (24) Chomchalow, N.; Silayoi, B. Bananas Germplasm in Thailand. *IBPGR/SEAP Newsletter*. **1984**, *8*, 23–28.
- (25) Tian, Q.; Giusti, M. M.; Stoner, G. D.; Schwartz, S. J. Characterization of new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2006**, *94*, 465–468.
- (26) Atawongsa, K. Morphological Diversity of Wild Banana (*Musa acuminata* Colla.) in Thailand. M.Sc. thesis, Mahidol University, Bangkok, 2008.
- (27) Wong, C.; Kiew, R.; Loh, J. P.; Gan, L. H.; Set, O.; Lee, S. K.; Lum, S.; Gan, Y. Y. Genetic Diversity of the Wild Banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as Evidenced by AFLP. *Ann. Bot. (Oxford, U.K.)* **2001**, *88*, 1017–1025.
- (28) Grotewold, E. The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2006**, *57*, 761–780.
- (29) Quattrocchio, F.; Verweij, W.; Kroon, A.; Spelt, C.; Mol, J.; Koes, R. PH4 of Petunia Is an R2R3 MYB Protein That Activates Vacuolar Acidification through Interactions with Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factors of the Anthocyanin Pathway. *Plant Cell* **2006**, *18*, 1274–1291.
- (30) IPGRI-INIBAP/CIRAD. In *Descriptor for banana (Musa spp.)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy/International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France/Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, Montpellier, France, 1996.

Received for review June 17, 2008. Revised manuscript received September 28, 2008. Accepted September 28, 2008.

JF8018529