

ผลของสัดส่วนแสงสีแดงและน้ำเงินจากหลอดไดโอดเปล่งแสงต่อการพัฒนา
ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ
EFFECT OF RED AND BLUE LIGHT-EMITTING DIODE (LED) RATIOS
ON CALLUS DEVELOPMENT FROM CHRYSANTHEMUM PETAL
IN VITRO



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2568
KMITL-2025-AG-M-065-455

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF RED AND BLUE LIGHT-EMITTING DIODE (LED) RATIOS
ON CALLUS DEVELOPMENT FROM CHRYSANTHEMUM PETAL
IN VITRO



SORAWIT BOONPRASOP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURE
SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2025

KMITL-2025-AG-M-065-455

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสัดส่วนแสงสีแดงและน้ำเงินจากหลอดไดโอดเปล่งแสงต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ
นักศึกษา	นายสรวิศ บุญประสพ
รหัสประจำตัว	64604027
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2568
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศสามารถทำได้โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนกลีบดอกมาชักนำให้เกิดแคลลัส เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีผลทางสรีรวิทยาที่หลากหลายต่อพันธุกรรมของพืชชนิดต่าง ๆ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อแคลลัสที่เกิดจากการเหนี่ยวนำกลีบดอกของเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เหลืองปิงปอง สการ์เลท และการะเกด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 4 สูตร BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l, BA 2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l, BA 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l + 2,4-D 1 mg/l และ Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ภายใต้แสง LED สีขาว (PPFD 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า กลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็วที่สุด 6-12 วัน และกลีบดอกที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l + 2,4-D 1 mg/l มีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่มีน้ำหนักสดมากที่สุด 2.03 g ในขณะที่แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์สูงสุด 98.59 mg/g FW, 44.72 mg/g FW และ 24.46 mg/g FW ตามลำดับ ส่งผลให้แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดสูงสุดเฉลี่ย 4 ยอด เมื่อพิจารณาสูตรอาหารต่อการชักนำแคลลัส พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรอาหารสามารถชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศได้ โดยเฉพาะอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l กลีบดอกเบญจมาศสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและยอดได้ดี ส่วนปัจจัยเรื่องสายพันธุ์ที่ต่างกันจะตอบสนองต่อสูตรอาหารที่ต่างกัน

การศึกษาสัดส่วนของแสง LED 10 รูปแบบต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน R40:B15 และ R30:B3 มีมากที่สุด เมื่อพิจารณาผลของรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงพบว่าแสง LED R40:B15 และ R30:B3 มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ของแคลลัสสูงกว่าสัดส่วนแสงอื่น ๆ ส่วนความเครียดที่แคลลัสได้รับจากแสง LED พบว่า ปริมาณ MDA และฟีนอลิกของแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 1
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เลี้ยงภายใต้แสง LED R40:B15 และ R30:B3 มีปริมาณน้อยที่สุด ในทางกลับกันแสง LED สัดส่วนอื่น ๆ มีปริมาณ MDA และฟีนอลิกสูง

ผลของแสง LED ต่อการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดและพันธุ์สการ์เลทที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีขาว (PPFD $30 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) และสีแดงต่อสีน้ำเงินในอัตราส่วน R30:B10 R40:B15 R30:B3 (PPFD $50 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 16 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปัจจัยเรื่องสัดส่วนของแสงไม่มีผลต่อน้ำหนักสดของแคลลัส ในทางกลับกันสัดส่วนของแสงที่ต่างกันส่งผลให้น้ำหนักแห้งของแคลลัสต่างกัน เมื่อพิจารณาปัจจัยเรื่องสายพันธุ์พบว่าเบญจมาศพันธุ์การะเกดมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าแคลลัสจากพันธุ์สการ์เลท หลังจากชักนำแคลลัสจากกลีบดอกของเบญจมาศพันธุ์การะเกดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่สังเคราะห์แสง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน R30:B3 มีปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด ปริมาณ MDA และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด และค่า EC_{50} ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด ส่วนเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท หลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์ พบว่าแสงสีแดงต่อสีน้ำเงินในอัตราส่วน R40:B15 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์สูงที่สุด ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ของแคลลัสที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และปริมาณ MDA ของแคลลัสสการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีขาวมีปริมาณสูงที่สุด และค่า EC_{50} ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED R30:B10 R40:B15 และ R30:B3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงภายใต้แสง LED สีขาว แคลลัสของสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง R30:B3 มีการสะสมปริมาณ RS สูงกว่าสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแสงอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณ TNC ของแคลลัสทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และขิงอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Effect of Red and Blue Light-Emitting Diode (LED) Ratios on Callus Development from Chrysanthemum Petal <i>In Vitro</i>
Student	Mr. Sorawit Boonprasop
Student ID	64604027
Degree	Master of Science
Program	Agricultural
Year	2025
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Kanjana Seatiew

Abstract

Chrysanthemum propagation and breeding can be done *via* petal tissue culture technique. Since it has been well known that plant growth regulator has rather wide range of physiological effects on diverse plant genetic resources, such effects were thus determined in petal induced callus of 3 chrysanthemum varieties, i.e., “Pingpong Golden”, “Scarlet” and “Karaked”. Chrysanthemum petals were detached from the plants of the 3 varieties as previously described then cultured on MS medium containing different formulas of plant growth regulators, i.e, 2 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA; 2 mg/l BA + 1 mg/l 2,4-D; 1 mg/l BA + 1 mg/l Kinetin + 1 mg/l 2,4-D and 4 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA, as treatment 1-4, respectively. The cultures were cultured under white LED light (PPFD 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 16 hours per day at $25\pm 3^\circ\text{C}$ for 12 weeks. The results showed that “Karaked” exhibited the shortest callus induction period of 6-12 days and the highest fresh weight of callus growth 2.03 g when cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l BA + 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l 2,4-D. The callus “Scarlet” performed highest pigment content chlorophyll a 98.59 mg/g FW, chlorophyll b 44.72 mg/g FW and carotenoid 24.46 mg/g FW. Whereas compact callus with highest number of 4 shoots per explant were obtained in “Scarlet” variety cultured on MS medium supplemented with 4 mg/l Kinetin + 2 mg/l NAA.

Investigation of the effects of 10 LED light patterns on the callus development from Scarlet chrysanthemum petals cultivated on MS medium enriched with 4 mg/l Kinetin and 2 mg/l NAA. The fresh weight and dry weight of callus grown under R40:B15 and R30:B3 LED illuminations were the highest. Upon examining the influence of photosynthesis-related pigments, it was determined that R40:B15 and R30:B3 LED lights significantly enhanced the chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid content of callus compared to other light ratios. The callus exposed to LED light exhibited the

lowest levels of MDA and phenolic content when developed under R40:B15 and R30:B3 conditions. Conversely, different amounts of LED light exhibited elevated levels of MDA and phenolic content.

Effects of LED illumination on callus induction from petals of Karaked and Scarlet chrysanthemums cultivated in MS medium supplemented with 4 mg/l Kinetin and 2 mg/l NAA, under white LED light (PPFD $30 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) and red to blue light in the ratios R30:B10, R40:B15, and R30:B3 (PPFD $50 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) for 16 hours. It was determined that a light ratio throughout 4 weeks culture period had no impact on the fresh weight of callus. Conversely, varying light proportions yield distinct callus dry weights. Upon evaluating cultivar parameters, it was determined that 'Karaked' exhibited more fresh and dry weight compared to the callus of the 'Scarlet'. Analysis of Karaked's callus showed that callus cultured under R30:B3 red to blue LED light exhibited the largest concentrations of all photosynthetic pigments, the greatest levels of malondialdehyde (MDA) and total phenolic compounds, and the lowest EC_{50} value for DPPH free radical inhibition. In the case of the Scarlet chrysanthemum, following 8 weeks of callus induction, it was observed that a light ratio of red to blue at R40:B15 yielded the maximum concentrations of chlorophyll a and carotenoids. No statistical difference was seen in the quantity of chlorophyll b. The MDA content of Scarlet's callus cultivated under white LED light was the highest, and the EC_{50} value for DPPH free radical inhibition was also the highest. Callus produced under red to blue LED light ratios of R30:B10, R40:B15, and R30:B3 exhibited greater quantities of phenolic compared to callus cultured under white LED light. The callus of the cultivar cultured under R30:B3 light exhibited a significantly higher accumulation of reducing sugar (RS) compared to those cultured under other light conditions, while the total non-structural carbohydrate (TNC) content of the callus from both cultivars showed no statistically significant difference.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และตั้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง ผลของสัดส่วนแสงสีแดงและน้ำเงินจากหลอดไดโอดเปล่งแสงต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ เล่มนี้ เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กัญญา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และแนวทางการแก้ไขปัญหา ทั้งในเรื่องของการเรียน งานทดลองและการทำงานในทุกอย่าง สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างที่ทำการทดลองได้อย่างราบรื่น และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑินี อธิราชย์ ที่ถ่ายทอดความรู้และให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสรีระวิทยา และเอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี รวมทั้งห้องปฏิบัติการให้ใช้งานในระหว่างทำการทดลอง จนทำให้วิทยานิพนธ์เรื่องนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมัยพร อนุวงศ์ ที่ให้ความรู้และช่วยวางแผนการทำงาน ในเรื่องของการวิเคราะห์ข้อมูลทางสรีระวิทยา และอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ รวมทั้งสารเคมีในการทำการทดลอง

ขอขอบคุณคณะอาจารย์ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือติดตั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำตั้งแต่เริ่มเข้าเรียนจนเรียนจบตลอดหลักสูตร

ขอขอบคุณทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาระดับปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณโครงการวิจัย การควบคุมระบบแสงจากหลอด LED ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณสารประกอบทางเคมีของเบญจมาศในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว ญาติพี่น้อง และคนรอบข้างทุกคนที่ให้การสนับสนุน และคอยให้กำลังใจในทุก ๆ ช่วงเวลา และการเรียนในระดับมหาบัณฑิตก็เป็นหนึ่งในช่วงเวลานั้น

นายสรวิศ บุญประสพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ต
สารบัญภาพ.....	ฎ
ความหมายของคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา.....	2
1.4 ทฤษฎีหรือแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย.....	2
1.5 ขอบเขตของการศึกษา.....	3
1.6 ขั้นตอนของการศึกษา.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 หลอดไดโอดเปล่งแสง (Light emitting diode: LED).....	4
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเบญจมาศ.....	6
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	8
2.3.1 แคลลัส (Callus).....	9
2.3.2 การเกิดแคลลัส.....	9
2.3.3 ประเภทของแคลลัส.....	9
2.4 แสงต่อการเจริญเติบโตของพืช.....	10
2.4.1 การสังเคราะห์แสงของพืช.....	10
2.4.2 การตอบสนองต่อแสงของพืช.....	11
2.5 ความสัมพันธ์ของแสงต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพปลอดเชื้อ.....	12
2.6 ฮอรโมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช.....	13
2.6.1 ออกซิน (Auxins).....	13
2.6.2 ไซโทไคนิน (Cytokinin).....	13
2.6.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7 สารชีวเคมีในพืช.....	14
2.7.1 รงควัตถุ (Pigment).....	14
2.7.2 ฟีนอลิก (Phenolic).....	16
2.7.3 มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde).....	17
2.7.4 น้ำตาลประเภทรีดิวซ์ (reducing sugar test).....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.1 พืชทดลอง.....	19
3.2 วิธีการทดลอง.....	20
3.2.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ.....	20
3.2.2 การทดลองที่ 2 สัดส่วนของแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ.....	23
3.2.3 การทดลองที่ 3 การจ่ายแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 2 สายพันธุ์และปริมาณสารชีวเคมีของแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ.....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	29
4.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ.....	29
4.1.1 การพัฒนาเป็นแคลลัสของกลีบดอกเบญจมาศ.....	29
4.1.2 น้ำหนักสดของแคลลัส.....	31
4.1.3 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัส.....	32
4.1.4 การพัฒนาจากแคลลัสเป็นยอด.....	33
4.2 สัดส่วนของแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ.....	34
4.2.1 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส.....	34
4.2.2 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัส.....	35
4.2.3 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA).....	37
4.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content).....	37
4.3 การจ่ายแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 2 สายพันธุ์.....	38
4.3.1 การพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ.....	38
4.3.2 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส.....	39
4.3.3 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง.....	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และส่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.4 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA).....	42
4.3.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content).	44
4.3.6 วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity).....	44
4.3.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar; RS) และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Total nonstructural carbohydrate; TNC).....	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	46
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	46
5.1.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ.....	46
5.1.2 สัดส่วนของแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ.....	46
5.1.3 การจ่ายแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ และปริมาณสารชีวเคมีของแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ.....	46
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	47
บรรณานุกรม.....	48
ภาคผนวก.....	61
ประวัติผู้เขียน.....	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และส่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	สูตรอาหารชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ.....	20
3.2	สัดส่วนของแสงสีแดงและน้ำเงิน 9 รูปแบบที่แตกต่างกัน	24
4.1	ระยะเวลาในการพัฒนาของกลีบดอกเบญจมาศเป็นแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และจำนวนยอดที่พัฒนามาจากแคลลัส.....	30
4.2	น้ำหนักสดแคลลัสที่พัฒนาจากกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน.....	31
4.3	ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัสที่พัฒนาจากกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	32
4.4	น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	35
4.5	ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์ สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน บนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	36
4.6	ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน บนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	38
4.7	น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทและพันธุ์การะเกดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน ระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	41
4.8	คลอโรฟิลล์ เอ บีและแคโรทีนอยด์ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	42
4.9	คลอโรฟิลล์ เอ บีและแคโรทีนอยด์ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	42
4.10	ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศการะเกด ที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และเผยแพร่อย่างอื่นถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.11	
ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง ของแคลลัสจากกลีบดอก เบญจมาศสการ์เลขที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	43



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และเผยแพร่อย่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 หลอดไดโอดเปล่งแสง (light emitting diode: LED).....	5
2.2 ปฏิกริยาการสังเคราะห์แสงของพืช.....	10
2.3 ความสัมพันธ์การดูดกลืนแสงของรงควัตถุชนิดต่าง ๆ.....	14
2.4 โครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์.....	15
2.5 โครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์.....	16
3.1 เเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ลักษณะดอกเป็นช่อ (spray type) รูปทรงดอกแบบ single.	19
3.2 เเบญจมาศพันธุ์การะเกด ลักษณะดอกเดี่ยว (standard type) รูปทรงดอกแบบ incurve.....	19
3.3 เเบญจมาศพันธุ์เหลืองปึงปอง ลักษณะดอกเดี่ยว (standard type) รูปทรงดอกแบบ Pompon.....	20
3.4 ลักษณะของกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น.....	21
3.5 แบบจำลองชั้นวางเนื้อเยื่อและความเข้มแสงจากหลอด LED โดยตำแหน่งการวางเนื้อเยื่อจะเป็นจุดที่มีการเร่งเงาสีน้ำตาล ความเข้มแสงประมาณ $50 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.	24
4.1 แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 mg/L + Kinetin 4 mg/L (A) เหลืองปึงปอง (B) สการ์เลท (C) การะเกด.	30
4.2 ลักษณะของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ (A) ลักษณะของแคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแน่น (Compact callus) และ (B) แคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม (Friable callus).....	30
4.3 แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่.....	33
4.4 แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกันบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 mg/L + Kinetin 4 mg/L ระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	34
4.5 ความยาวคลื่นแสงในช่วง 380–780 nm ของแสง LED สีขาว และสีแดงต่อสีน้ำเงินในสัดส่วนความเข้มแสงแบบต่าง ๆ	36
4.6 การชักนำแคลลัสด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 mg/L + Kinetin 4 mg/L; กลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่กำลังพัฒนาเป็นแคลลัส (A) เซลล์จากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกด หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (B) กลุ่มเซลล์จากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่กำลังพัฒนาเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (C) และกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท (D) เซลล์จากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์.....	39
4.7 แสดงการกระจายของความยาวคลื่นในช่วง 380–780 nm ภายใต้สภาวะแสงสีขาวและแสง LED สัดส่วนต่าง ๆ ของแสงสีแดง (R) ต่อแสงสีน้ำเงิน (B).....	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และห้ามอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความหมายของคำย่อ

LED Light-Emitting Diode

Chl a Chlorophyll a

Chl b Chlorophyll b

Car Carotenoids

MDA Malondialdehyde

DPPH วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

RS Reducing sugar

TNC Total nonstructural carbohydrate

FW Fresh weight

DW Dry weight



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และส่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หลอดไดโอดเปล่งแสง (light-emitting diode; LED) ถูกนำมาใช้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแทนที่หลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) เนื่องจากหลอด LED ใช้พลังงานไฟฟ้าน้อยกว่า มีการปลดปล่อยความร้อนต่ำ อีกทั้งยังสามารถกำหนดค่าความยาวคลื่นแสง (wavelength) และความเข้มแสง (light intensity) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการทางชีววิทยาของพืชทุกสายพันธุ์ (Batista *et al.*, 2018) มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับแสง LED ต่อการเจริญเติบโต การพัฒนา รวมถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาทิ ผลของแสงจากหลอด LED ต่อการเจริญเติบโต โครงสร้างใบและคลอโรพลาสต์ของมันฝรั่ง (Chen *et al.*, 2020) ความแตกต่างของความเข้มแสงจากหลอด LED ต่อการสังเคราะห์แสง โครงสร้างใบ และการพัฒนาของยอดเยอบีรา (Cioč *et al.*, 2019)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเทคโนโลยีที่เป็นประโยชน์อย่างมากทั้งด้านการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำชิ้นส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพปลอดเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมความชื้น อุณหภูมิ และแสง ดังนั้นแสงเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืช โดยแสงที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช คือแสงในช่วงความยาวคลื่น 380-760 nm (กัญจนา แซ่เตียว และคณะ, 2558) ซึ่งหลอดไดโอดเปล่งแสงสามารถเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวได้ดี พืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อความเข้มแสงและช่วงความยาวคลื่นแสงที่แตกต่างกัน รวมถึงเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน แสงในช่วงความยาวคลื่น 569 nm มีผลต่อการเจริญเติบโตและสามารถยับยั้งการออกดอกของเบญจมาศสายพันธุ์ Reagan (Sumitomo *et al.*, 2012) ในเบญจมาศพันธุ์ Jimba แสงสีแดง (660 nm) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและยับยั้งการสร้างตาออก ในขณะที่เบญจมาศพันธุ์ Iwa no Hakusen แสงสีแดงเพียงชนิดเดียวไม่สามารถยับยั้งการออกดอกได้ แต่แสงสีแดงร่วมกับแสงสีแดงไกล (infrared) (660+735 nm) ยับยั้งการสร้างตาออกได้ดี (Liao *et al.*, 2014) หลอด LED สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อได้ดี จากการศึกษาของ Yu *et al.* (2020) รายงานว่าหลอด LED สีน้ำเงินเป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ส่งผลต่อระยะเวลาการขยายตัวของแคลลัส จำนวนยอดและการแตกกอใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด และแสงสีแดงต่อน้ำเงินในอัตราส่วน 1:1 ส่งผลต่อการสังเคราะห์แสง ปริมาณคลอโรฟิลล์แคโรทีนอยด์ของต้นกล้าข้าวเพิ่มมากขึ้น และรายงานการศึกษาคุณภาพของแสงต่อการเพิ่มจำนวนยอดวานิลา โดย Latif *et al.* (2019) รายงานว่าหลอด LED แสงสีขาวช่วยชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด แสงสีแดงและน้ำเงินในอัตราส่วน 1:1 ช่วยเพิ่มจำนวนยอดสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบญจมาศเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับต้น ๆ มีรายงานข้อมูลปี พ.ศ. 2562 พื้นที่การผลิตในประเทศไทยมีเพียง 4,000 ไร่ (สุภาพร สัมโย และอำนวยการ วรรณรัตน์, 2563) ปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด จึงมีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นมูลค่าสูงถึง 350 ล้านบาท (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2563) ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้เป็นจุดเริ่มต้นของการส่งเสริมการผลิตเบญจมาศ โดยศึกษาสัดส่วนของแสงสีแดงและสีน้ำเงินจากหลอด LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ เพื่อการพัฒนาและต่อยอดการผลิตเบญจมาศให้มีคุณภาพและปริมาณการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น

1.2 ความมุ่งหมายวัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ
- 1.2.2 ศึกษาสัดส่วนแสงสีแดงและสีน้ำเงินจากหลอด LED ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ
- 1.2.3 ศึกษาปริมาณสารชีวเคมีของแคลลัสเบญจมาศ 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแสง LED ที่แตกต่างกัน

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

- 1.3.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส จะช่วยให้กลีบดอกสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็ว และแคลลัสมีการเจริญเติบโตได้ดี
- 1.3.2 แสง LED สีแดงและสีน้ำเงินในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะช่วยให้แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศเจริญเติบโตได้ดี
- 1.3.3 แสง LED สีแดงและสีน้ำเงินในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะช่วยให้แคลลัสเจริญเติบโตได้ดี มีปริมาณสารชีวเคมีสูง

1.4 ทฤษฎีหรือแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย

สูตรอาหารที่เหมาะสมจะช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์หรือแคลลัสได้ดี ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน และไซโทไคนิน ในทางทฤษฎีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินส่วนใหญ่จะมากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เนื้อเยื่อจึงจะพัฒนาเป็นแคลลัสได้ (George *et al.*, 2008; Taiz & Zeiger, 2010)

แสงเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งพืชแต่ละชนิดสามารถตอบสนองต่อช่วงแสงที่แตกต่างกัน โดยแสงที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช คือแสงในช่วง 380-760 nm (Wang *et al.*, 2009) ในธรรมชาติพืชจะได้รับแสงจากดวงอาทิตย์ แต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแสง

ที่พืชได้รับมาจากแสงเทียมหรือหลอดไฟ โดยในปัจจุบันนิยมใช้แสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสง (LED) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ขอสงวนสิทธิ์

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากสามารถควบคุมความยาวคลื่น ความเข้ม และคุณภาพแสงได้ดี (Massa *et al.*, 2008) การให้แสงเพียงสีเดียวแก่พืช เช่น แสงสีแดง แสงสีน้ำเงิน หรือแสงสีเขียว สามารถทำให้พืชเจริญเติบโตได้ แต่จะมีการตอบสนองที่แตกต่างไปจากการเจริญเติบโตในแสงธรรมชาติ (Lin, 2020) การให้แสงที่ผสมกันระหว่างแสงสีแดงและสีน้ำเงินมักให้ผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากเป็นช่วงแสงที่พืชดูดซับได้ดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (Johkan *et al.*, 2012; จิตราภรณ์ ยวนนท์ และคณะ, 2565)

1.5 ขอบเขตของการศึกษา

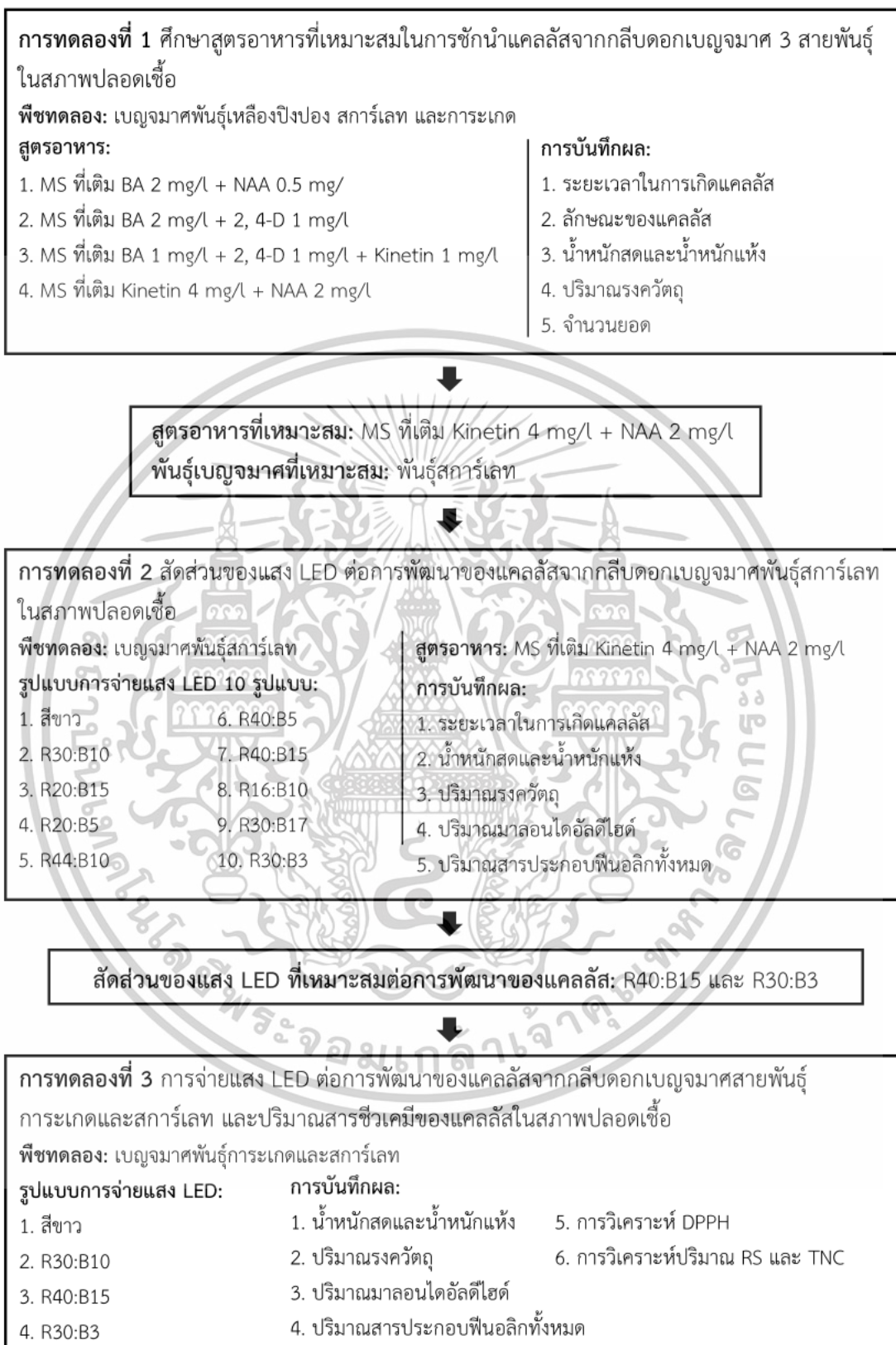
1.5.1 ศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน 4 สูตร ที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เหลืองปิงปอง สการ์เลท และการะเกด

1.5.2 ศึกษาสัดส่วนของแสง LED สีแดงและสีน้ำเงินที่แตกต่างกัน 10 รูปแบบที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท

1.5.3 ศึกษาปริมาณสารชีวเคมีของแคลลัสเบญจมาศ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ การะเกด และสการ์เลท ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแสง LED 4 รูปแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 ขั้นตอนของการศึกษา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หลอดไดโอดเปล่งแสง (Light-emitting diode: LED)

ไดโอดเปล่งแสง (light-emitting diode หรือย่อว่า LED) เป็นอุปกรณ์สารกึ่งตัวนำอย่างหนึ่ง จัดอยู่ในจำพวกไดโอดที่สามารถเปล่งแสงในช่วงสเปกตรัมแคบ เมื่อถูกไบอัสทางไฟฟ้าในทิศทางไปข้างหน้า ปรากฏการณ์นี้อยู่ในรูปของ electroluminescence สีของแสงที่เปล่งออกมานั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของวัสดุกึ่งตัวนำที่ใช้และเปล่งแสงได้ใกล้ช่วงอัลตราไวโอเล็ต ช่วงแสงที่มองเห็น และช่วงอินฟราเรด ผู้พัฒนาไดโอดเปล่งแสงขึ้นเป็นคนแรก คือ นิก โฮโลยัค (Nick Holonyak Jr.) แห่งบริษัทเจเนรัล อิเล็กทริก (General Electric Company) โดยได้พัฒนาไดโอดเปล่งแสง ในช่วงแสงที่มองเห็น และสามารถใช้งานได้ในเชิงปฏิบัติเป็นครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1962 ที่สามารถเปล่งแสงสีแดงที่มีความสว่างออกมาเพียงพอที่จะนำมาใช้ประโยชน์ได้ (ภาพที่ 2.1) ทำให้ทั่วโลกเริ่มมีการตื่นตัววิจัยและพัฒนาในด้านนี้อย่างจริงจัง (หทัยชนก หมั่นกล้า, 2556)



ภาพที่ 2.1 หลอดไดโอดเปล่งแสง (light emitting diode)

ที่มา : <https://www.tradeindia.com/products/multicolor-dc12v-rgb-led-strip-light-7006546.html>

หลอด LED มีประสิทธิภาพมากกว่าแหล่งกำเนิดชนิดอื่น ๆ ถูกนำมาใช้ในการผลิตพีซีมากขึ้น เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีกว่าหลอดชนิดอื่น ทั้งความหลากหลาย อายุการใช้งานยาวนาน ทนทาน มีขนาดเล็ก ไม่ทำให้อุณหภูมิโดยรอบสูง และสามารถเลือกช่วงแสงของความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ (แพรววี ตะเพียนทอง และคณะ, 2559) หลอด LED จึงถูกนำมาแทนที่หลอดไฟชนิดเดิม มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับผลของแสงจากหลอด LED ต่อการเจริญเติบโตของพืช เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลากหลายชนิดในสภาพปลอดเชื้อ Lin *et al.* (2011) ศึกษาคุณภาพของแสงต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ สัดส่วนของแสงสีแดงและน้ำเงินจากหลอด LED แสงสีแดงและน้ำเงิน (1:2) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและการพัฒนาของยอด รวมถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ Attaya (2021) ได้ศึกษาแหล่งกำเนิดแสงคุณภาพของแสงและความเข้มของแสงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของหญ้าหวาน แสงสีน้ำเงินจากหลอด LED ส่งผลต่อการยืดยาวของยอด จำนวนใบต่อยอด น้ำหนักสดและแห้งของใบส่วนแสงสีแดงส่งผลต่อจำนวนยอด และจำนวนรากสูงสุด

การใช้แสงประดิษฐ์ปลูกพืชต้องคำนึงถึง Photosynthetic action spectrum หรือมาตรวัดที่บ่งบอกคุณภาพของแสงที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้กำหนดวิธีการวัดและประเมินค่าของแสงในกลไกการสังเคราะห์แสงของพืช แบ่งออกได้ 4 ตัวชี้วัดเฉพาะที่แตกต่างจากมาตรวัดทางสถาปัตยกรรมที่ใช้ออกแบบแสงสำหรับมนุษย์ที่วัดค่ากันเป็นแรงเทียน Lumen, Lux หรือ Watt ซึ่งตัวชี้วัดหรือมาตรวัดค่าแสงสำหรับพืชนั้น แบ่งออกได้ดังนี้

Photosynthetically Active Radiation หรือ PAR

ค่าของแสงในช่วงความถี่ 400-700 nm ซึ่งนักวิทยาศาสตร์พบว่า แสงในช่วงความถี่ 400-700 nm คือช่วงแสงที่มีประโยชน์ต่อการสังเคราะห์แสงของพืช ค่า PAR เป็นค่าคุณสมบัติของแหล่งกำเนิดแสง PAR หรือหลอดไฟหลอดนั้นให้แสง PAR มากน้อยแค่ไหน ไม่สามารถบอกได้ว่าพืชได้รับแสงมากหรือน้อยเพียงใด บอกเพียงแค่ว่าแสงนี้มีความยาวคลื่นในช่วง 400-700 nm อยู่เท่าใด โดยจะแสดงอยู่ในหน่วยของพลังงาน (W/m^2) (ธรรม นามพร้อม, 2563)

Photosynthetic Photon Flux หรือ PPF

การวัดค่าแสงว่าแหล่งกำเนิดแสงนั้นสามารถผลิตค่า PAR ต่อวินาที มีหน่วยวัดเป็นไมโครเมตรต่อวินาที หรือ μ/s ในช่วงความถี่ 400-700 nm ปล่อย Photons ออกมาต่อหนึ่งหน่วยเวลา ($\mu mol/second$) ค่า PPF ก็ยังเป็นคุณสมบัติของแหล่งกำเนิดแสงหรือหลอดไฟเช่นกัน ไม่สามารถบอกได้ว่าพืชได้รับแสงมากหรือน้อย (ธรรม นามพร้อม, 2563) ความสม่ำเสมอของ PPF มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะส่งผลโดยตรงต่อการกระจายของแสงที่พืชได้รับ หาก PPF ไม่สม่ำเสมอ จะทำให้พืชบางต้นได้รับแสงมากเกินไป ขณะที่บางต้นได้รับน้อย ส่งผลให้การเจริญเติบโตไม่เท่ากัน และลดประสิทธิภาพโดยรวมของการผลิตพืช ระบบไฟที่ให้แสงอย่างสม่ำเสมอจึงจำเป็นสำหรับการควบคุมสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเติบโตของพืชอย่างสม่ำเสมอ (Nelson and Bugbee, 2014)

Photosynthetic Photon Flux Density หรือ PPFD

ค่าความหนาแน่นของ Photons จากแหล่งกำเนิดแสงที่พืชดูดซับไปใช้ในการสังเคราะห์แสงเป็นค่าของแสงที่สำคัญที่สุด ซึ่งในทางเทคนิคก็คือการวัดค่า PPF ที่มาถึงใบพืชที่ทำหน้าที่ดูดซับแสงไปใช้ ซึ่งค่า PPFD ที่ได้จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าแสงที่พืชได้รับนั้นเหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสงหรือไม่ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของพืช นิยมวัดค่าบริเวณยอด ค่า PPFD จะมีความมากน้อย

แตกต่างกันตามระยะห่างของจากแหล่งกำเนิดแสง การรายงานค่าจึงควรแจ้งในระยะห่างของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งกำเนิดแสงกับต้นพืช ค่า PPFD มีหน่วยวัดเป็นไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) อ้างอิงตัวแปรพื้นที่เพิ่มเข้ามา (ธรรม นามพร้อม, 2563) การวัด PPFD จึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการออกแบบระบบแสงที่เหมาะสมสำหรับพืช เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น โดยใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ (McCree, 1972) มีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่า PPFD มีบทบาทสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต การพัฒนาของปากใบ การสังเคราะห์แสง และการเกิดรากของพืชในสภาพปลอดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Miyashita *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2007)

Daily Light Integral หรือ DLI

ค่าของแสงที่พืชได้รับต่อวัน ค่า DLI จะสอดคล้องกับค่า PPFD ซึ่งพืชแต่ละชนิดต้องการแสงต่อวันแตกต่างกันไป ถ้าพืชได้รับแสงเพียงพอพืชก็จะเจริญเติบโตอย่างเต็มศักยภาพ เพราะนอกจากจะต้องให้แสงในระดับที่ PPFD เหมาะสมแล้ว ยังต้องรู้ว่าแต่ละวันพืชต้องได้รับแสงนานเท่าใด ค่า DLI มีหน่วยเป็นไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวัน ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{d}$) (ธรรม นามพร้อม, 2563)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเบญจมาศ

เบญจมาศ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendranthema grandiflora* อยู่ในวงศ์ Asteraceae ชื่อสามัญ Chrysanthemum เป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของโลก มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีน และญี่ปุ่น ผลิตเป็นไม้ตัดดอกหรือไม้กระถางขึ้นอยู่กับชนิดของเบญจมาศ ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาพันธุ์เบญจมาศกระถางมากมาย (Jeong *et al.*, 2012) นอกจากนี้จะมีความหลากหลายของสีแล้ว ยังมีความหลากหลายในเรื่องของรูปร่างดอก ลักษณะการเจริญเติบโตและการแตกพุ่ม เบญจมาศเป็นไม้ขนาดเล็กสูงประมาณ 30-100 cm ตามกิ่งก้านและลำต้นมีขนละเอียด ใบเป็นใบเดี่ยวเรียวยาวรี ขอบใบหยักมีสีเขียวอ่อนนุ่มมีขนอ่อน ๆ ทั่วทั้งใบ แตกกิ่งมาก การเรียงตัวของใบเป็นแบบ spiral หรือ vacates คือ ใบเรียงเวียนเหมือนบันไดเวียน สามารถแตกหน่อใหม่ได้ ดอกกลม กลีบดอกจะซ้อนกัน มีหลากหลายสี เช่น สีแดง สีบานเย็น สีขาว สีม่วง สีชมพู สีเหลือง สีส้ม และอื่น ๆ ดอกเบญจมาศเป็นดอกชนิด inflorescence ซึ่งแต่ละดอกในช่อประกอบด้วยดอกย่อย (floret) 2 ชนิด คือ ชนิดแรกดอกย่อยชั้นนอกของฐานรองดอก (ray floret) เป็นดอกเพศเมีย ซึ่งจำนวนชั้นของดอกเพศเมียขึ้นอยู่กับชนิดของดอกว่าเป็นดอกชั้นเดียว ดอกช่อน หรือชนิดอื่นๆ และชนิดที่สองดอกย่อยชั้นใน (disc floret) ที่อยู่ถัดจากดอกย่อยชั้นนอกเข้ามาครอบคลุมพื้นที่ส่วนกลางของฐานรองดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ พื้นที่ส่วนใหญ่ของฐานรองดอกจะถูกคลุมไปด้วยดอกย่อยชั้นใน ทั้งดอกย่อยชั้นนอกและชั้นในแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ กลีบดอก (corolla) และกลีบใบหุ้มดอก (calyx) เบญจมาศมีทั้งที่เป็นพืชล้มลุก (annual) พืชสองปี (biennial) และพืชยืนต้น (perennial) แต่นิยมปลูกเป็นพืชปีเดียว เพราะต้นเบญจมาศจะโตเร็ว มีอายุ 90-150 วัน และเป็นพืชไวต่อความยาวของวันหรือช่วงแสง โรคและแมลงเข้าทำลายง่ายเมื่ออยู่ในพื้นที่ปลูกเป็นระยะเวลาสั้น สามารถขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด

การปักชำ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อดิสรุ กระแสชัย, 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกเบญจมาศตามลักษณะดอก

ซึ่งจำแนกได้ตามลักษณะดอกโดย สมาคมเบญจมาศแห่งชาติของประเทศสหรัฐอเมริกา (National Chrysanthemum Society: NCS, USA) ได้ดังนี้

1. Single มีดอกชั้นใน (disc florets) อยู่เป็นกระจุกตรงกลางของดอก ดอกชั้นนอก (ray florets) 1-2 ชั้น

2. Anemones กลีบดอกชั้นใน (disc florets) มีการเรียงตัวและจำนวนคล้ายแบบ Single แต่กลีบชั้นในยาวกว่า

3. Pompons กลีบดอกนอกสั้น กว้าง ซ้อนเข้าหาใจกลางดอก ทำให้ดอกมีลักษณะกลมเป็น ball-shaped กลีบชั้นในสั้นและมีขนาดเล็ก

4. Decorative กลีบดอกชั้นนอกและชั้นในเรียงตัวคล้ายชนิด pompons แต่กลีบดอกชั้นนอกยาวกว่า ทำให้ดอกมีลักษณะแบน

5. Incurved กลีบดอกชั้นนอกยาวและงุ้มเข้าหาใจกลางดอก กลีบดอกมีขนาดใหญ่ทำให้ดอกมีขนาดใหญ่

6. Reflexed มีการจัดเรียงกลีบดอกคล้าย pompons กลีบดอกชั้นนอกยาวแบบ incurved แต่ห้อยลงด้านล่าง

7. Spider กลีบดอกชั้นนอกยาวมาก มีลักษณะคล้ายหลอดขนาดเล็ก ปลายกลีบม้วนเข้าแบบตะขอ

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำชิ้นส่วนของพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ ไม่ว่าจะป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (protoplast) มาทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์ภายในสภาพปลอดเชื้อ ที่สามารถควบคุมแสง อุณหภูมิ ความชื้น รวมถึงธาตุอาหารต่าง ๆ หรือปัจจัยที่พืชจำเป็นต้องดำรงชีวิต ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลากหลายรูปแบบบางชิ้นส่วนเจริญเติบโตเป็นต้นโดยตรง บางชิ้นส่วนเจริญเติบโตเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ ที่เรียกว่า แคลลัส (callus) หรือเกิดเป็นคัพภะ ที่เรียกว่าโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) (กัญญา แซ่เตียว และคณะ, 2558)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ทั้งเรื่องการขยายพันธุ์พืช เนื่องจากเมื่อตัดแบ่งชิ้นส่วน แล้วเลี้ยงในอาหารสามารถเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อได้จำนวนมาก หรือการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้สารก่อกลายพันธุ์ การใช้รังสี การตัดต่อพันธุกรรม หรือการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประสบผลสำเร็จมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อพืช รวมไปถึงเทคนิคและวิธีการต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แคลลัส (Callus)

การนำเอาชิ้นส่วนของพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ชิ้นส่วนของพืชอาจจะเจริญเติบโตต่อไปตามโครงสร้างเดิมเหมือนการปักชำ หรือพืชอาจเจริญเติบโตไม่ขึ้นกับโครงสร้างเดิม เนื่องจากเซลล์ parenchyma ที่เป็นองค์ประกอบของพืชชิ้นนั้นปรับสภาพกลับไปคล้ายกับเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ การเจริญเติบโตซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับโครงสร้างเดิมนั้น อาจเป็นการเจริญเติบโตอย่างมีระบบเกิดเป็นโครงสร้างต่าง ๆ เช่น ใบ ราก ดอก และเอ็มบริโอ หรืออาจเป็นเซลล์ parenchyma ที่เปลี่ยนแปลงรูปลักษณ์อยู่ร่วมกันอย่างไม่มีระบบเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส (Callus) เป็นกลุ่มเซลล์ Parenchyma ผนังบางที่เกาะตัวกันอย่างไม่มีระบบ โดยเกิดจากการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (สุรวิช วรรณไกรโรจน์ และคณะ, 2564)

2.3.2 การเกิดแคลลัส

ชิ้นส่วนของพืช (explant) จะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา เมื่อถูกนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ บางครั้งอาจเกิดกระบวนการ oxidation ของผนังเซลล์ที่ถูกทำลายขณะตัดแยกชิ้นส่วนพืช ทำให้พืชมีการปลดปล่อยสารฟีนอลิก (phenolic compound) สีน้ำตาล หากมีปลดปล่อยเป็นจำนวนมากจะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืชเอง เนื่องจากพืชสร้างสารกลุ่มนี้เพื่อให้เซลล์บริเวณที่ถูกตัดหรือทำลายตาย เป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าทำลายบาดแผล ปกติเซลล์ของชิ้นส่วนพืชบริเวณรอยตัดหรือเซลล์ผิวนอก ถ้าหากได้รับปัจจัยที่เหมาะสมจะมีการเปลี่ยนแปลงให้พร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์ ซึ่งจะเห็นได้จากรูปร่างของนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและติดสีเข้มขึ้น โครมาตินหดตัวมากขึ้น จำนวนไรโบโซมเพิ่มมากขึ้นและเกาะตัวเป็นกลุ่ม มีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น มีการสังเคราะห์ DNA และ RNA เกิดขึ้น จากนั้นเซลล์จะแบ่งตัวเพิ่มปริมาณ โดยเซลล์ที่เกิดขึ้นจะมีผนังบาง นิวเคลียสใหญ่และมีรูปร่างค่อนข้างกลม เป็นเซลล์ parenchyma ที่พร้อมจะแบ่งเซลล์ เมื่อกลุ่มเซลล์ parenchyma มีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์ที่อยู่ภายในก้อนแคลลัส ซึ่งถ้าได้รับปัจจัยภายนอกไม่ดีพอก็อาจจะหยุดการแบ่งเซลล์ เซลล์ที่อยู่ผิวนอกแคลลัสจึงมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์มากที่สุด ในก้อนแคลลัส แคลลัสมักจะประกอบไปด้วยเซลล์ parenchyma ซึ่ง dedifferentiate ในระดับที่แตกต่างกัน (สุรวิช วรรณไกรโรจน์ และคณะ, 2564)

2.3.3 ประเภทของแคลลัส

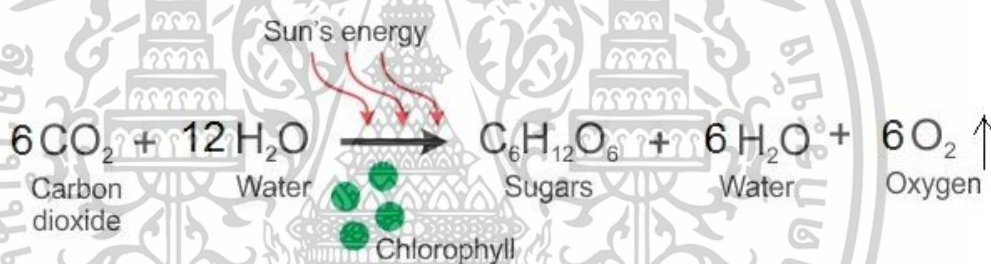
การเกาะตัวของเซลล์ในแคลลัสเป็นอีกลักษณะหนึ่งที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด ลักษณะนี้อาจจำแนกชนิดของแคลลัสตามความสามารถในการเกิดสัณฐานเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิดด้วย แคลลัสชนิดแน่น (compact callus) ประกอบด้วยเซลล์ที่อัดแน่นของพืชชนิดหนึ่งสามารถเกิดยอดและรากได้ ขณะที่แคลลัสชนิดยุ่ย (friable callus) ซึ่งเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ เป็นแคลลัสที่เกิดเป็นเอ็มบริอยด์ การที่แคลลัสของพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกิดสัณฐานต่างกัน มักมีสีและผิวสัมผัสเฉพาะตัว จึงจำเป็นต้องศึกษาว่าแคลลัสชนิดใดของพืชที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำลังศึกษาเพาะเลี้ยงนั้น สามารถชักนำให้เกิดสัญญาณตามความต้องการได้ง่าย เพื่อสะดวกในการคัดเลือกแคลลัสที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการไว้เพิ่มปริมาณต่อไป (สุรวิช วรรณไกรโรจน์ และคณะ, 2564)

2.4 แสงต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.4.1 การสังเคราะห์แสงของพืช

พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารเองได้และเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้ กระบวนการสร้างอาหารของพืชเรียกว่า กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งมีน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นวัตถุดิบ มีแสงและคลอโรฟิลล์ช่วยทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือน้ำตาล น้ำ และแก๊สออกซิเจน กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของแก๊สและแร่ธาตุในดิน ทำให้เกิดความสมดุลตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตบนโลก การสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นกระบวนการที่พืชสีเขียวใช้พลังงานแสงเปลี่ยนเป็นพลังงานเคมี ปฏิกิริยาของการสังเคราะห์แสงเขียนสรุปได้ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงของพืช

ที่มา : https://qforquestions.com/?attachment_id=3737

ผลจากการสังเคราะห์ด้วยแสงนอกจากออกซิเจนแล้ว จะได้คาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม คือ กลูโคส น้ำ และพลังงานที่สะสมในรูปสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งสิ่งมีชีวิตทั้งหลายจะนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เพื่อสร้างสารประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ อาหารที่พืชสร้างขึ้นมานั้นนอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตเองแล้ว ยังเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่ไม่สามารถสร้างอาหารโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง ตลอดทั้งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ และการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทั้งหลายรวมทั้งมนุษย์ด้วย ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสงของพืชจะเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของผลผลิตให้เพียงพอต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ สิ่งมีชีวิตที่สร้างพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ เรียกว่า phototrophs โดยโมเลกุลที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่มีอยู่ในพืชและสิ่งมีชีวิตนี้คือ รงควัตถุ (pigment) คลอโรฟิลล์จะพบในพืชชั้นสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งออกเป็นคลอโรฟิลล์ เอ ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 430 และ 660 nm และคลอโรฟิลล์ บี ดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสง 453 และ 642 nm (จริงแท้ ศิริพานิช, 2529)

2.4.2 การตอบสนองต่อแสงของพืช

แสง เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช เพราะแสงเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างอาหารหรือการสังเคราะห์แสงของพืช โดยมีคลอโรฟิลล์เป็นตัวรับแสงไปใช้เป็นพลังงานในการเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเป็นคาร์โบไฮเดรตและออกซิเจน (อักษร ศรีเปล่ง, 2529)

ความเข้มของแสง (Light Intensity) คือ ปริมาณโฟตอนของแสงทั้งหมดที่พืชได้รับ ซึ่งความเข้มของแสงจะแตกต่างกันตามพื้นที่ เวลา ฤดูกาล อิทธิพลของความเข้มของแสงต่อการเจริญเติบโตของพืช ความเข้มของแสงน้อย จะทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชเกิดขึ้นน้อยกว่ากระบวนการหายใจ น้ำตาลถูกใช้หมดไป พืชจะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มของแสงเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับความยาวคลื่น (คุณภาพ) ของแสง และช่วงเวลาที่ได้รับความเข้มของแสงสูง อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะเพิ่มสูงขึ้น อุณหภูมิกับความเข้มของแสง มีผลต่ออัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกัน คือ ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเพียงอย่างเดียว แต่ความเข้มของแสงน้อยจะไม่สามารถทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มขึ้น อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะเพิ่มขึ้นจนถึงขีดหนึ่งแล้วอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงจะลดต่ำลงตามอุณหภูมิและความเข้มของแสงที่เพิ่มขึ้น และยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอีกด้วย (ธนาพร นพรัตน์ไพบูลย์, 2560)

คุณภาพของแสง (Light quality) หมายถึง ความยาวของคลื่นแสง (light wavelength) ที่พืชได้รับ โดยแต่ละช่วงความยาวคลื่นจะมีสีต่างกัน แสงที่มองเห็นมีความยาวคลื่นระหว่าง 380-775 nm แสงที่ใช้ในการทดลองนี้จะมีผลต่อพืช คือ แสงสีแดง (647-775 nm) ช่วยกระตุ้นอัตราการเจริญเติบโตของพืช ความแข็งแรง ชักนำพืชวันสั้นออกดอก แสงสีเขียวยมีความยาวคลื่น 492-535 nm ไม่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสง แต่เป็นส่วนประกอบสำคัญของแห่งกำเนิดแสงบางชนิด แสงสีน้ำเงิน (422- 492 nm) พืชใช้ปริมาณของแสงสีน้ำเงินในกำหนดการเปิดของปากใบและเพิ่มจำนวนของคลอโรพลาส แสงสีน้ำเงินที่สูงขึ้นจะส่งเสริมการเผาผลาญอาหารที่เพิ่มขึ้นและขยายการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช และแสงสีม่วง (380-422 nm) (อักษร ศรีเปล่ง, 2529)

ช่วงแสง (Photoperiod) หมายถึง ระยะเวลาของแสงในแต่ละวัน ซึ่งช่วงแสงในแต่ละวันจะแตกต่างกันไปตามฤดูกาลและท้องถิ่น โดยทั่วไปช่วงแสงจะมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตด้านลำต้น และการเจริญเติบโตด้านการสืบพันธุ์ การตอบสนองของพืชต่อช่วงแสงแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม

1. พืชวันสั้น (Short day plant) เป็นพืชที่มีความต้องการช่วงแสงในวันหนึ่ง ๆ สั้นกว่าช่วงวันวิกฤติจึงจะออกดอก โดยช่วงวันวิกฤตินี้จะมีค่าแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ซึ่งพืชส่วนใหญ่จะมีช่วงวันวิกฤติประมาณ 12 ชั่วโมง เช่น เบญจมาศ (Chrysanthemum) มากาเร็ต (Marguerite)

2. พืชวันยาว (Long day plant) เป็นพืชที่ต้องการช่วงแสงในวันหนึ่ง ๆ ยาวกว่าช่วงแสงวันวิกฤติ มากกว่า 12 ชั่วโมง จึงจะออกดอก เช่น บีโกเนีย (Begonia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. พืชที่ไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง (Day neutral plant) เป็นพืชที่สามารถเจริญได้ดีไม่ว่าจะมีช่วงแสงสั้นหรือยาว เช่น กุหลาบ (Roses) อัฟริกันไวโอเล็ต (African violet) กล็อกซิเนีย (Gloxinias) พิทูเนีย (Petunia) เป็นต้น

การตอบสนองต่อแสงของเบญจมาศ การปลูกเบญจมาศในสภาพแปลงหรือในสภาพแวดล้อมปกติ เบญจมาศต้องการความเข้มแสงในระดับปานกลางถึงสูง โดยมีค่าความเข้มแสงที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 200–400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตทางลำต้น การพัฒนาของใบ (Doi *et al.*, 2004) ทั้งนี้ หากความเข้มแสงเกินกว่า 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ อาจทำให้เกิดความเครียดจากความร้อนและความเข้มแสงที่มากเกินไป ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชได้ ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความเข้มแสงจะต้องถูกควบคุมให้มีค่าคงที่ โดยในระยะเริ่มต้นของการชักนำแคลลัส ควรใช้แสงในระดับต่ำที่ประมาณ 30–60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ เพื่อไม่กระตุ้นการสังเคราะห์แสงมากเกินไปซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาแคลลัส (Roh & Lawson, 1988) ส่วนในระยะของการชักนำให้เกิดยอดหรือลำต้น ความเข้มแสงที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 50–100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ เพื่อการพัฒนาอวัยวะของพืชโดยไม่เกิดการยืดตัวมากเกินไป ในระบบการปลูกแบบโรงเรือนปิด หรือระบบปลูกที่ใช้แสงประดิษฐ์ เช่น หลอด LED แนะนำให้ใช้แสงที่มีความเข้มในช่วง 150–250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ร่วมกับอัตราส่วนของแสงแดงและแสงน้ำเงินที่เหมาะสม เช่น 4:1 หรือ 3:1 ซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตทางลำต้น จำนวนใบ และการสะสมคลอโรฟิลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Tariq *et al.*, 2020)

2.5 ความสัมพันธ์ของแสงต่อการเจริญเติบโตของพืชในสภาพปลอดเชื้อ

แสงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืชในสภาพปลอดเชื้อ ทั้งในระดับสรีรวิทยาและระดับชีวโมเลกุล โดยคุณภาพของแสง (wavelength) เช่น แสงสีแดงและแสงสีน้ำเงิน สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การสร้างอวัยวะ และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Kumar *et al.*, 2020) แสงสีแดงส่วนใหญ่ส่งเสริมการยืดตัวของลำต้นและการสร้างราก ในขณะที่แสงน้ำเงินช่วยในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และยับยั้งการยืดตัวของต้นกล้า ทำให้ต้นกล้ามีความแข็งแรง (Park *et al.*, 2019) ในประเทศไทย งานวิจัยโดย ชัยวัฒน์ ต่วนภูวเสถียร และคณะ (2564) พบว่าแสง LED สีแดงร่วมกับน้ำเงิน (อัตราส่วน 3:1) ส่งผลดีต่อการขยายตัวของแคลลัสชั้นชั้น รวมถึงเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ จิตราภรณ์ ยุวานนท์ และคณะ (2565) ยังรายงาน bahwa แสงแดงและน้ำเงินที่ผสมกัน ส่งเสริมการเติบโตของต้นอ่อนกล้วยหอมในสภาพปลอดเชื้อได้ดีกว่าแสงขาวหรือแสงชนิดเดียว ความเข้มแสงมีผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์แสงและการสะสมสารอาหาร โดยค่าความเข้มแสงที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มักอยู่ระหว่าง 40–80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ หากแสงเข้มเกินไปอาจทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน และเพิ่มระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเซลล์ (Tobin *et al.*, 2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ฮอรโมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ฮอรโมนพืช (Plant hormone) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่พืชสร้างขึ้น มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโต การพัฒนาและการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมของพืช (Jiang and Asami, 2018) ยับยั้งหรือกระตุ้นกระบวนการทางสรีรวิทยา ซึ่งจะส่งผลต่อบริเวณที่พืชสร้างโดยตรงหรือเคลื่อนย้ายไปมีผลต่อส่วนอื่น ๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth regulator) คือสารประกอบอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเองและมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น เมื่อมีอยู่เพียงปริมาณเล็กน้อยก็สามารถกระตุ้นหรือยับยั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชได้ (Taiz and Zeiger, 2003) ในปัจจุบันมีการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งเร่งการเจริญเติบโตของต้นพืช และยับยั้งการเจริญเติบโต สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชสามารถจำแนกได้ 7 กลุ่มตามคุณสมบัติ ได้แก่ ออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (gibberellin) ไซโทไคนิน (cytokinin) เอทิลีน (ethylene) สารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช และสารอื่น ๆ (ภูวนาถ นนทรีย์, 2532)

2.6.1 ออกซิน (Auxins)

ออกซินในธรรมชาติเป็นฮอรโมนพืชชนิดแรกที่มีค้นพบ มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการพัฒนาของพืช มีหน้าที่ในการขยายตัวของเซลล์ และทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ (दनัย บุญยเกียรติ, 2539) นอกจากนี้ยังสามารถชักนำให้เกิดการยึดตัวของเซลล์ในส่วนที่อยู่เหนือดินของพืช ออกซินมีผลต่อรูปร่างลักษณะของพืชหลายอย่าง และสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคาร์โบไฮเดรต (จินดา ศรศรีวิชัย, 2524) ออกซินที่นิยมใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นชนิดสังเคราะห์ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric acid), NAA (naphthaleneacetic acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

2.6.2 ไซโทไคนิน (Cytokinin)

ไซโทไคนินเป็นฮอรโมนที่ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม การพัฒนาและการแบ่งเซลล์ การสร้างยอดจากแคลลัส กระตุ้นการแตกกอของพืชและการขนส่งสารอาหาร (Sakakibara, 2006; CCA, 1998) ไซโทไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ 6-BA (6-[n-benzyl] aminopurine) บริเวณที่พบไซโทไคนินมากที่สุดคือบริเวณส่วนของพืชที่กำลังจะเจริญเติบโตและบริเวณที่มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง อย่างเช่น ใบอ่อน ราก ผล และเมล็ดที่กำลังจะพัฒนา (ภานุพล หงส์ภักดี, 2565)

2.6.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาของ Nasri *et al.* (2018) รายงานการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

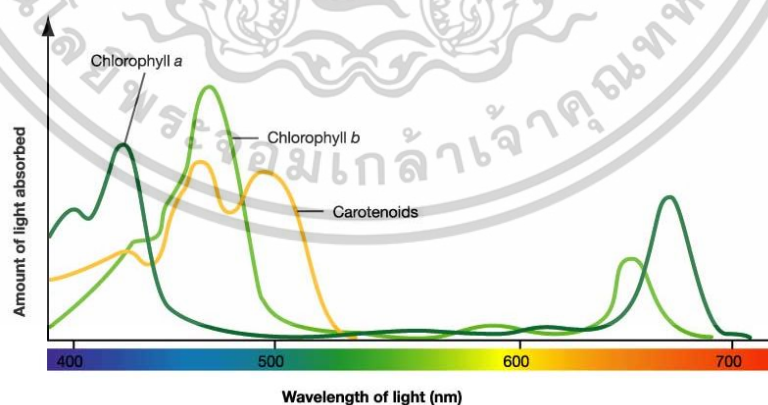
ต่างกัน ในการชักนำแคลลัสจากยอดและใบของเบญจมาศ ขั้วดวงดาว จันทะหา และคณะ (2564) ได้ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและตายอดจากชิ้นส่วนใบดาวเรือง อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l และ NAA 0.5 mg/l ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดตายอดดีที่สุด และมีการศึกษาอื่น ๆ อีกมากมาย อาทิ ชักนำแคลลัสและชักนำให้เกิดเป็นอวัยวะโดยตรงจากใบเบญจมาศ ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ IAA และ BAP (Swarna *et al.*, 2016) ชักนำแคลลัสจากรังไข่บริเวณกลีบดอกเบญจมาศด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ 2,4-D จากนั้นนำแคลลัสที่ได้ชักนำให้เกิดเป็นยอดด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kinetin และ IAA (Miler and Muszczyk, 2013)

2.7 สารชีวเคมีในพืช

พืชจะมีการผลิตสารชีวเคมีหลายชนิดเพื่อตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งสารชีวเคมีเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโต และการพัฒนาที่เหมาะสมภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโต (Balasundram *et al.*, 2006) ในอดีตมีการใช้แสงในการกระตุ้นให้พืชเกิดความเครียดเพื่อให้พืชมีการสร้างสารชีวเคมีอย่างมีประสิทธิภาพ ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมผลักดันให้พืชผลิตอนุมูลอิสระที่มีปฏิกิริยาสูงระหว่างปฏิกิริยาเมตาบอลิซึม ซึ่งทำให้มีการขัดขวางการเจริญเติบโต การพัฒนา และกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช (Amar *et al.*, 2006)

2.7.1 รงควัตถุ (Pigment)

รงควัตถุ คือสารที่สามารถดูดกลืนแสง รงควัตถุแต่ละชนิดจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่พบในใบไม้สามารถดูดกลืนแสงสีม่วง น้ำเงิน แดงซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 nm ได้ดีแต่สะท้อนแสงสีเขียว (ภาพที่ 2.3)



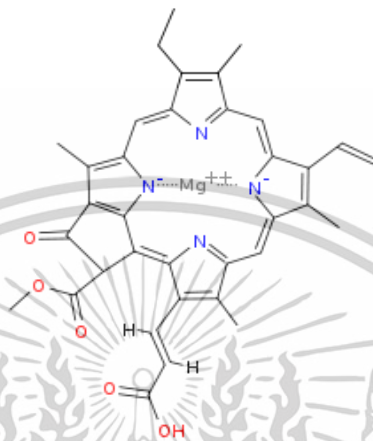
ภาพที่ 2.3 ความสัมพันธ์การดูดกลืนแสงของรงควัตถุชนิดต่าง ๆ

ที่มา : <https://aqua.c1ub.net/forum/index.php?topic=240587.5>

คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) ทำหน้าที่ดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงของความยาวคลื่น

โดยเฉพาะในช่วงแถบสีม่วงและสีน้ำเงินคลอโรฟิลล์ดูดพลังงานแสงได้ดีที่สุด ร่องลงมาคือแถบแสงสีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แดง ส่วนแถบแสงสีเขียวดูดได้น้อยที่สุดและปล่อยแถบแสงสีเขียวออกมามากที่สุด จึงทำให้มองเห็นคลอโรฟิลล์มีสีเขียว อยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช คลอโรฟิลล์มีโครงสร้างเป็นวงโพรไพริน (prophyrin) ประกอบด้วยวงแหวนไพร์โรล (pyrrole) 4 วง เรียงติดกัน มี Mg^{+2} อยู่ตรงกลาง (ภาพที่ 2.4)



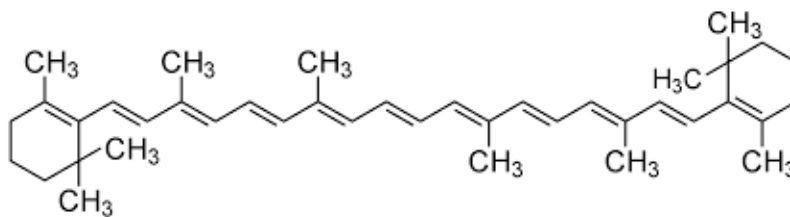
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์

ที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/คลอโรฟิลล์>

คลอโรฟิลล์จะพบในพืชชั้นสูง มี 2 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) ดูดกลืนแสงได้ดีที่มีความยาวคลื่น 430 และ 660 nm และ คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) ดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นแสง 453 และ 642 nm (จริงแท้ ศิริพานิช, 2529) ในอัตราส่วน 3:1 คลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้างเหมือนกัน แตกต่างกันที่หมู่ในบางตำแหน่งของโครงสร้างโมเลกุล คลอโรฟิลล์ไม่คงตัวต่อความร้อน เมื่อได้รับความร้อนจะเปลี่ยนเป็นฟีโอไฟติน (pheophytin) ทำให้สีเขียวเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำตาล

แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เป็นสารธรรมชาติ เป็นรงควัตถุที่พบในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และโครโมพลาสต์ (chromoplast) ของผลไม้ ดอกไม้ และใบพืช มีบทบาทสำคัญหลายอย่าง เช่น ป้องกันการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระ (free radical) ปกป้องพืชในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ปกป้องผลกระทบจากแสงแดดอย่างรุนแรง (อัจฉรา นิยมเดชา และมงคล คงเสน, 2556) โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) จำนวน 8 หน่วย ที่เกิดพันธะโควาเลนต์กัน และทำให้เกิดคอนจูเกชันของพันธะคู่เป็นสายยาว (extensive conjugated double bond) (ภาพที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของแคโรทีนอยด์

ที่มา : <https://euresisjournal.org/what-is-the-difference-between-carotene-and-carotenoid>

ซึ่งระบบคอนจูเกชัน เป็นระบบที่ทำให้แคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนพลังงานแสงอัลตราไวโอเล็ต และแสงสีขาวย และทำให้แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสีและมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโมเลกุลของแคโรทีนอยด์อาจเป็นเส้นตรงดังที่พบในไลโคพีน (lycopene) หรือเป็นวงแหวนที่ปลายโซ่ของโมเลกุล ดังที่พบในเบตาแคโรทีน (beta-carotene) สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์เป็น 2 กลุ่ม คือ hydrogenated และ oxygenated carotenoid derivatives โดยกลุ่ม hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เบตาแคโรทีน และ ไลโคพีน เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่ม oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิล (xanthophyll) นั้น มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุลจึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่าแคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และ แอสตาแซนทิน (Simpson *et al.*, 1989)

2.7.2 ฟีนอลิก (Phenolic)

สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิกไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือจะเป็นสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดอินทรีย์ รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกสามารถกำจัดอนุมูลอิสระและโครงสร้างมีความเสถียรสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และ low-density lipoprotein (LDL) ป้องกันเนื้อเยื่อและ DNA จากการถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ลือชัย บุตคุป, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่เป็นวงแหวนอะโรมาติก และมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ ลิกนิน กรดซินนามิก และโคเอนไซม์คิว (เนตรนภา เมยกลาง และเฉลิม เรื่องวิริยะชัย, 2557)

การผลิตสารประกอบเหล่านี้ มักจะถูกสร้างขึ้นภายใต้อิทธิพลของความเครียดจากสภาพแวดล้อมภายนอกหรือความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อม เพื่อให้พืชสามารถปรับตัวจากสภาวะความเครียด การให้พืชได้รับความเครียดในสภาพปลอดเชื้ออาจเป็นประโยชน์สำหรับการทดสอบการสร้างสารพฤกษเคมีของพืช หนึ่งในวิธีที่สำคัญและมีประสิทธิภาพคือการกระตุ้น ซึ่งกระบวนการสร้างสารพฤกษเคมีจะถูกกระตุ้นโดยตัวกระตุ้น เพื่อการผลิตสารพฤกษเคมีที่เหมาะสม (Yue *et al.*, 2016) แสงเป็นหนึ่งในตัวกระตุ้นทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งมีอิทธิพลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช การพัฒนา และการสร้างรูปร่าง แสงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมระดับปฐมภูมิและทุติยภูมิ เพื่อช่วยให้เติบโตได้อย่างเหมาะสม อย่างไรก็ตามบทบาทของแสงก็ขึ้นอยู่กับความเข้มของแสง คุณภาพแสง เวลาเปิดรับแสง สายพันธุ์หรือชนิดพืช และประเภทเนื้อเยื่อ (Khurshid *et al.*, 2020)

2.7.3 มอลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde: MDA)

มอลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde: MDA) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตร $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ เป็นของเหลวไม่มีสี มอลอนไดอัลดีไฮด์เป็นสารประกอบปฏิกิริยาสูงที่เกิดขึ้นเป็นอินอลซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติเมื่อพืชอยู่ในสภาวะความเครียด มอลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน (กระบวนการ lipid peroxidation) ซึ่งแสดงถึงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจาก reactive oxygen species ในสภาพ oxidative stress ที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นจากการขาดน้ำ (วราพงษ์ เสนะวีระกุล และคณะ, 2553) การสะสมของ MDA ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของแคลลัส เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงระดับความเครียดที่เซลล์ประสบอยู่ งานวิจัยของ Zubova *et al.* (2024) ได้ทดสอบผลของความเข้มแสงต่อแคลลัสของชา พบว่าการปลูกแคลลัสภายใต้แสงที่มีความเข้มสูง ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) ทำให้ระดับ MDA สูงขึ้นในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงและระดับนี้ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่แคลลัสที่ปลูกภายใต้แสงที่มีความเข้มต่ำกว่า (50 และ $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) มีระดับ MDA ต่ำกว่าและมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มแสงมีผลต่อระดับความเครียดออกซิเดชันและการเจริญเติบโตของแคลลัส

2.6.4 น้ำตาลประเภทรีดิวซ์ (reducing sugar test)

น้ำตาลประเภทรีดิวซ์ คือน้ำตาลที่มีหมู่ฟังก์ชันอัลดีไฮด์ (-CHO) หรือคีโตน (-C=O) อิสระที่สามารถทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ เช่น โซเดียมเปอร์ไอโอเดท (NaIO_3) หรือกรดไนตริก ได้กรดน้ำตาลชนิดต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาพของปฏิกิริยา เช่น ถ้า -CHO ของน้ำตาลถูกออกซิไดซ์ด้วยตัวออกซิไดซ์นี้ เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิไดซ์อย่างอ่อนหรือโดยเอนไซม์ จะได้น้ำตาลที่มีหมู่ $-COOH$ เพียงหมู่เดียว เช่น D-gluconic acid หรือ D-galactonic acid แต่ถ้าน้ำตาลถูกออกซิไดซ์ด้วยตัวออกซิไดซ์อย่างแรง เช่น กรดไนตริก ทั้งหมู่ $-CHO$ และ CH_2OH ในโมเลกุลของน้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์เป็น $-COOH$ ทั้งหมด เกิดเป็นกรดที่มีหมู่ $-COOH$ สองหมู่ เช่น D-glucaric acid และ D-glucuronic acid (จันทรา เล็กเกี่ยม, 2534)

น้ำตาลทุกชนิดทั้งโมโนแซคคาไรด์ และไดแซคคาไรด์ มีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ยกเว้นน้ำตาลซูโครส ซึ่งโมเลกุลไม่มีหมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตนอิสระ จึงเรียกว่า non-reducing sugar เมื่อน้ำตาลซูโครสถูกไฮโดรไลสเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส สารละลายที่ได้จะมีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ (ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ นิธิยา รัตนานนท์, 2533)

การพัฒนาหรือการเจริญเติบโตของแคลลัสมีความสัมพันธ์กับกับปริมาณน้ำตาลประเภทรีดิวซ์ เช่นกลูโคสและฟรุกโตส ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนที่เซลล์พืชใช้ในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่าง ๆ (Al-Zubaidy *et al.*, 2020) ซึ่งแสงเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสะสมน้ำตาลประเภทรีดิวซ์ ในการเจริญเติบโตของแคลลัส (callus) โดยเฉพาะคุณภาพของแสง เช่น แสงสีฟ้าและแสงสีแดง ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์และการสะสมของน้ำตาลในเซลล์พืช (Khurshid *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2025)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชทดลอง

3.1.1 เภยจมาศพันธุ์เหลืองปึงปอง ดอกมีสีเหลือง ลักษณะดอกเดี่ยว (standard type) รูปทรงดอกกลมแบบ pompon (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 เภยจมาศพันธุ์เหลืองปึงปอง ลักษณะดอกเดี่ยว (standard type) รูปทรงดอกแบบ pompon

3.1.2 เภยจมาศพันธุ์สการ์เลท ดอกมีสีแดงเข้ม ลักษณะดอกเป็นช่อ (spray type) รูปทรงดอกแบบ single (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 เภยจมาศพันธุ์สการ์เลท ลักษณะดอกเป็นช่อ (spray type) รูปทรงดอกแบบ single

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 เบญจมาศพันธุ์การะเกด ดอกมีสีขาวขนาดใหญ่ ลักษณะดอกเดี่ยว (standard type) รูปทรงดอกแบบ incurved (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 เบญจมาศพันธุ์การะเกด ลักษณะดอกเดี่ยว (standard type) รูปทรงดอกแบบ incurve

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

3.2.1.1 การเตรียมอาหารชักนำแคลลัส

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเข้มข้นดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองที่ 1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

สูตรอาหาร	ชิ้นส่วนพืช	อ้างอิง
MS ที่เติม BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l	ใบ ดาวเรือง	ขวัญดาว จันทะหา และคณะ, 2564
MS ที่เติม BA 2 mg/l + 2, 4-D 1 mg/l	ข้อ เบญจมาศ	Khan <i>et al.</i> , 2020
MS ที่เติม BA 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l + 2, 4-D 1 mg/l	กลีบดอก เบญจมาศ	พันทิพา ลิ้มสงวน และ คณะ, 2560
MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l	กลีบดอก เบญจมาศ	Yoosumran <i>et al.</i> , 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเริ่มต้น

การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์เหลืองปิงปอง พันธุ์สการ์เลท และพันธุ์กระเกต นำกลีบดอกเบญจมาศมาทำความสะอาดด้วยการไหลผ่านน้ำสะอาด 30 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hyperchlorite 1.2% (คลอรีนออกซ์ 20%) 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



ภาพที่ 3.4 ลักษณะของกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น

3.2.1.3 การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นเพื่อชักนำแคลลัส

นำกลีบดอกเบญจมาศที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ตัดส่วนหัวและส่วนท้ายของกลีบดอกออกให้ได้ขนาด 0.5×0.5 cm ไม่ให้ชิ้นส่วนที่ตัดติดส่วนของรังไข่ นำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสที่เตรียมไว้ในขวดทดลองขนาด 2 ออนซ์ แล้วนำไปเลี้ยงภายใต้แสงไฟส่องสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน แสงไฟที่ใช้จากหลอด LED สีขาว ที่โดยมีค่า PPFD เฉลี่ยประมาณ $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$

3.2.1.4 การเปลี่ยนอาหารชักนำแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงกลีบดอกลงในอาหารชักนำแคลลัสครบ 4 สัปดาห์ จะย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตรเดิมที่เตรียมขึ้นใหม่ เพื่อให้แคลลัสมีการพัฒนาที่ดีขึ้น ขั้นตอนนี้ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนจากเชื้อราหรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.5 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 3×4 factorial in completely randomized design มี 3 ซ้ำ โดยมีปัจจัยในการทดลอง 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ สายพันธุ์เบญจมาศ มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่

1. เบญจมาศพันธุ์เหลืองปี่
2. เบญจมาศพันธุ์สการ์เลท
3. เบญจมาศพันธุ์การะเกด

ปัจจัยที่ 2 คือ สูตรอาหารชักนำแคลลัส มี 4 สูตร ได้แก่

1. อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l
2. อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l + 2, 4-D 1 mg/l
3. อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l + 2, 4-D 1 mg/l
4. อาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l

3.2.1.6 การบันทึกผลการทดลอง

- ระยะเวลาการเกิดแคลลัส
- ลักษณะของแคลลัส (compact หรือ friable callus)
- น้ำหนักสดของแคลลัส (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 4 สัปดาห์)

ซึ่งน้ำหนักสดโดยการนำแคลลัสออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ทำความสะอาดเศษวุ้นที่ติดมากับแคลลัสออกให้หมดแล้ว ชั่งน้ำและความชื้นออกจากแคลลัส แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสดด้วยเครื่องชั่งดิจิตอล

- จำนวนยอด (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 12 สัปดาห์)
- ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี และ แคโรทีนอยด์ (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 4 สัปดาห์)

โดยดัดแปลงวิธีการจาก Lichhtenthaler (1987) โดยชั่งน้ำหนักสดของแคลลัส 0.2 g บดและสกัดด้วยอะซิโตน ความเข้มข้น 80% ปริมาตร 5 ml แล้วห่อด้วยอะลูมิเนียมฟรอยด์เก็บไว้ในที่มืด 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 93 ขนาด 125 mm และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10,000 rpm ระยะเวลา 10 นาที แล้วนำสารใสที่แยกจากกากวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer คลอโรฟิลล์ เอ วัดที่ความยาวคลื่น 663 nm และคลอโรฟิลล์ บี วัดที่ความยาวคลื่น 647 nm แคโรทีนอยด์ วัดที่ความยาวคลื่น 470 nm

1. คำนวณหาค่า คลอโรฟิลล์ เอ, บี และแคโรทีนอยด์ของแคลลัส

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ } (\mu\text{g/g FW}) = 12.25(A_{663}) - 2.79(A_{647})$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ บี } (\mu\text{g/g FW}) = 21.50(A_{647}) - 5.10(A_{663})$$

$$\text{แคโรทีนอยด์ } (\mu\text{g/g FW}) = [1000(A_{470}) - 1.82(\text{คลอโรฟิลล์ เอ}) - 85.02(\text{คลอโรฟิลล์ บี})]/198$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. นำค่าที่ได้คำนวณหาค่า คลอโรฟิลล์ เอ, บี และแคโรทีนอยด์ของแคลลัส

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ } (\mu\text{g/g FW}) = (\text{ค่าคลอโรฟิลล์} \times 5 \text{ ml}) / \text{น้ำหนักเริ่มต้น}$$

3.2.2 การทดลองที่ 2 สัดส่วนของแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทในสภาพปลอดเชื้อ

3.2.2.1 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l

3.2.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นและการฟอกฆ่าเชื้อ

การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นจากกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์สการ์เลท นำกลีบดอกเบญจมาศมาทำความสะอาดด้วยการไหลผ่านน้ำสะอาด 30 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hyperchlorite 1.2% (คลอรีน 20%) 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำกลีบดอกเบญจมาศที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ตัดส่วนหัวและส่วนท้ายของกลีบดอกออกให้ได้ขนาด 0.5×0.5 cm ไม่ให้ชิ้นส่วนที่ตัดติดส่วนของรังไข่ นำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสที่เตรียมไว้ในขวดทดลองขนาด 2 ออนซ์ แล้วนำไปเลี้ยงที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25 ± 2 °C

3.2.2.3 การเปลี่ยนอาหารชักนำแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงกลีบดอกลงในอาหารชักนำแคลลัสครบ 4 สัปดาห์ จะย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ที่เตรียมขึ้นใหม่เพื่อให้แคลลัสมีการพัฒนาที่ดีขึ้น ขั้นตอนนี้ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนจากเชื้อราหรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์

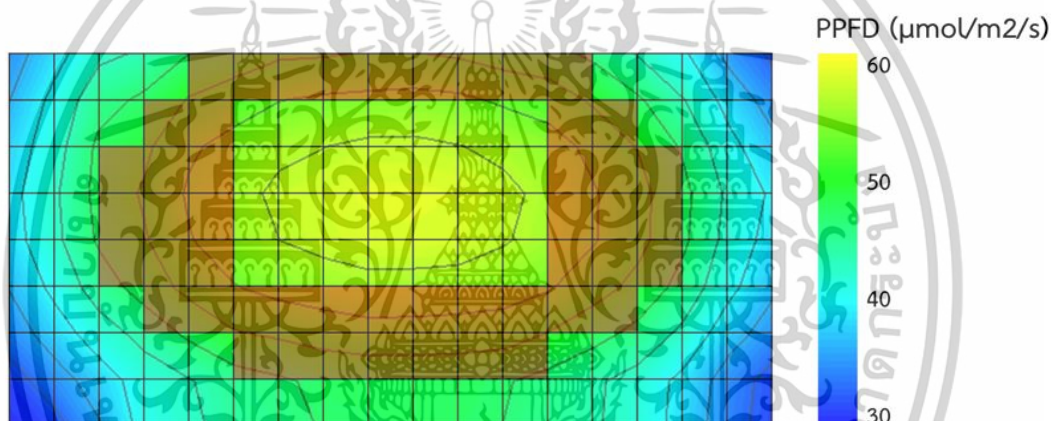
3.2.2.4 การเตรียมชั้นวางเนื้อเยื่อ

ใช้ชั้นวางเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดความกว้าง 60 cm ยาว 120 cm และสูง 40 cm จำนวน 4 ชั้น แต่ละชั้นมีรูปแบบการให้แสง LED ที่ต่างกัน 10 รูปแบบ โดยมีสัดส่วนของแสงสีขาวและสีแดงต่อสีน้ำเงินที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยวางการทดลองในวงรัศมีที่ค่า PPFD ที่แคลลัสได้รับประมาณ 50 ± 2 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (ภาพที่ 3.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 สัดส่วนของแสง LED สีขาว และสีแดงต่อน้ำเงิน 10 รูปแบบที่แตกต่างกัน

รูปแบบ	สัดส่วนของแสง	
1	สีขาว	
2	R30	B10
3	R20	B15
4	R20	B5
5	R44	B10
6	R40	B5
7	R40	B15
8	R16	B10
9	R30	B17
10	R30	B3



ภาพที่ 3.5 แบบจำลองชั้นวางเนื้อเยื่อและความเข้มแสงจากหลอด LED โดยตำแหน่งการวางเนื้อเยื่อจะเป็นจุดที่มีการแรงเงาสีน้ำตาล ความเข้มแสงประมาณ $50 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

3.2.2.5 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) มี 10 ทรีตเมนต์ สัดส่วนแสงสีแดงและสีน้ำเงิน 9 รูปแบบ แสงสีขาว (control) 1 รูปแบบ 3 ซ้ำ

3.2.2.6 การบันทึกผลการทดลอง

- น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)

น้ำหนักแห้งของแคลลัส นำแคลลัสอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ $45 \pm 5^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 3 วัน เมื่อแคลลัสมีน้ำหนักคงที่ นำออกจากตู้อบแล้วพักไว้ให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิปกติจึงนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งดิจิทัล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี และ แคโรทีนอยด์ (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)

- ปริมาณ malondialdehyde (MDA) (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)

โดยการชั่งน้ำหนักสดของแคลลัส 0.2 g บดให้ละเอียดแล้วผสมกับ trichloroacetic acid 0.1 เปอร์เซ็นต์ 3 ml จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 20 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใส 1 ml ผสมกับ thiobarbituric acid 0.5% ใน trichloroacetic acid 20% ปริมาตร 4 ml นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 10 นาที จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 nm

คำนวณหาค่า MAD equivalents (nmol/ml) = $[(A_{532} - A_{600}) \times 106] / 155,000$

- การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)

เตรียมตัวอย่างแคลลัสเบญจมาศ 0.2 g สกัดในเอทานอล 95% 10 ml เก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 93 ขนาด 125 ml ใช้สารละลายส่วนใส 1 ml เติมน้ำกลั่น 4.5 ml และ Folin - Ciocalteu 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% 4 ml ส่วนผสมถูกผสมจนเข้ากันด้วย vortex mixer 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย gallic acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent / g extract) ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จาก Ebrahimzaded (2008) และ Nabavi (2008)

3.2.3 การทดลองที่ 3 การจ่ายแสง LED ต่อการพัฒนาของคัลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์ การเกิดและสการ์เลท และปริมาณสารชีวเคมีของแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ

3.2.3.1 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kinetin 4 mg/l ร่วมกับ NAA 2 mg/l

3.2.3.2 การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นและการฟอกฆ่าเชื้อ

การเตรียมชิ้นส่วนเริ่มต้นจากกลีบดอกเบญจมาศสายพันธุ์สการ์เลทและสายพันธุ์การเกิดนำกลีบดอกเบญจมาศที่อยู่ในระยะที่ยังพัฒนาไม่เต็มที่มาทำความสะอาดด้วยการผ่านน้ำสะอาด 30 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hyperchlorite 1.2% (คลอรีนออกซ์ 20%) 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำกลีบดอกเบญจมาศที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดส่วนหัวและส่วนท้ายของกลีบดอกออก ให้ได้ขนาด 0.5×0.5 cm ไม่ให้ชิ้นส่วนที่ตัดติดส่วนของรังไข่ นำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสที่เตรียมไว้ในขวดทดลองขนาด 2 ออนซ์ แล้วนำไปเลี้ยงที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25 ± 2 °C

3.2.3.3 การเปลี่ยนอาหารชักนำแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงกลีบดอกลงในอาหารชักนำแคลลัสครบ 4 สัปดาห์ จะย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ที่เตรียมขึ้นใหม่ เพื่อให้แคลลัสมีการพัฒนาที่ดีขึ้น ขั้นตอนนี้ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนจากเชื้อราหรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์

3.2.3.4 การเตรียมชั้นวางเนื้อเยื่อ

ใช้ชั้นวางเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดความกว้าง 60 cm ยาว 120 cm และสูง 40 cm จำนวน 4 ชั้น แต่ละชั้นมีรูปแบบการให้แสง LED ที่ต่างกัน 4 รูปแบบ โดยมีสัดส่วนของแสงสีแดงและสีน้ำเงิน R30:B10 R40:B15 R30:B3 ที่ความเข้มแสงประมาณ 50 ± 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ และแสงสีขาวที่ใช้เปรียบเทียบ ความเข้มแสงประมาณ 30 ± 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

3.2.3.5 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2×3 factorial in completely randomized design มี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด โดยมีปัจจัยในการทดลอง 2 ปัจจัย ดังนี้
ปัจจัยที่ 1 คือ สายพันธุ์เบญจมาศ มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่

1. เบญจมาศพันธุ์การ์เกต
2. เบญจมาศพันธุ์สการ์เลท

ปัจจัยที่ 2 คือ สัดส่วนของแสง มี 4 รูปแบบ ได้แก่

1. แสงสีขาว (control)
2. แสงสีแดงและสีน้ำเงิน R30:B10
3. แสงสีแดงและสีน้ำเงิน R40:B15
4. แสงสีแดงและสีน้ำเงิน R30:B3

3.2.3.6 การบันทึกผลการทดลอง

- น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 4 สัปดาห์)
- ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)
- ปริมาณ malondialdehyde (MDA) (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)
- การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity) (บันทึกผลหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์)

การเตรียมตัวอย่างการวิเคราะห์โดยชั่งแคลลัส 0.25 g บดและสกัดด้วยเอทานอล 95% 25 ml เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องปกติ 3 วัน

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเตรียมสารละลาย DPPH โดยหลีกเลี่ยงการถูกแสงแดด จากนั้นดูดตัวอย่างสารสกัดแคลลัส แล้วเติมสารละลาย DPPH 0.5 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูล DPPH คำนวณดังสมการ

$$\text{ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (\%)} = [(A-B) - (C-D) \times 100] / (A-B)$$

A = ค่าดูดกลืนแสงของอนุมูล DPPH ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารสกัด

B = ค่าดูดกลืนแสงของเอทานอล 95%

C = ค่าดูดกลืนแสงของอนุมูล DPPH ที่ทำปฏิกิริยากับสารสกัด

D = ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดในเอทานอล 95%

- การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar: RS) และการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Total nonstructural carbohydrate: TNC) ทำการวิเคราะห์หลังจากชักนำแคลลัสจากกลีบดอก 8 สัปดาห์

การเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ RS และ TNC

เก็บตัวอย่างแคลลัส 5 g นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง เก็บตัวอย่างแคลลัสที่บดลงในถุงกระดาษที่สะอาดแล้วเก็บใน desiccator เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณ RS และ TNC ต่อไป

การสกัด RS และ TNC จากตัวอย่างพืช ตามวิธีของ Smith *et al.*, (1964) ซึ่งดัดแปลงโดย ธวัชชัย (2524)

วิธีการสกัด RS การสกัดใช้ ethanol 50% ซึ่งตัวอย่างพืชที่บดและอบแห้งสนิท 0.2 g ใส่ขวดแก้ว 200 ml เติม ethanol 50% ลงไป 20 ml ปิดปากภาชนะด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 2 ชั่วโมง เขย่าขวดทุกครึ่งชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาขบวนการ นำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 93 ปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดพลาสติกขนาด 100 ml เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์หา RS โดยวิธีของ Nelson's reducing sugar procedures

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการสกัด TNC โดยชั่งตัวอย่างพืชที่บดและอบแห้งสนิท 0.2 g ใส่ลงใน erlenmeyer flask เติม 0.2 N H₂SO₄ ลงไป 40 ml ปิดปากภาชนะด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์ นำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง นำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 93 ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH และ HCl ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดพลาสติกขนาด 100 ml เพื่อวิเคราะห์หา TNC โดยวิธีของ Nelson's reducing sugar procedures

การวิเคราะห์ปริมาณ RS และ TNC ตามวิธีการ Nelson's reducing sugar procedures โดย Hodge and Hofreiter (1962) โดยใช้สารละลายที่มีดี-กลูโคส (D-glucose equivalent) ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.00-0.04 mg/ml ใส่ในหลอดทดสอบปริมาตร 1 ml ทำ blank ควบคุมไปด้วยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลาย D-glucose จากนั้นเติม Nelson's alkaline copper reagent ลงไปในหลอดละ 1 ml เขย่าให้เข้ากันดี แล้วปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ นำหลอดไปวางในน้ำเดือดนาน 20 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็น แล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid reagent ลงในหลอดละ 1 ml เขย่าให้ตะกอน Cu₂O ละลายให้หมดแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 12.5 ml ด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้ค่า standard จากสารละลาย D- glucose เป็นตัวเปรียบเทียบผลที่ได้แสดงเป็นมิลลิกรัมดี-กลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

4.1.1 การพัฒนาเป็นแคลลัสของกลีบดอกเบญจมาศ

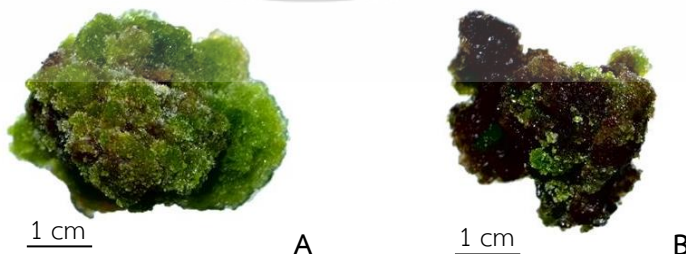
จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างชนิดและต่างความเข้มข้นกัน พบว่ากลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกด มีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็วที่สุด โดยเฉพาะในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l และสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็วที่สุด ใช้เวลาเพียง 6-12 วัน (ตารางที่ 4.1) หลังจากนั้นแคลลัสมีการพัฒนาเป็นรากและขนราก (ภาพที่ 4.1 C) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shahidul *et al.* (2020) รายงานการใช้สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l สามารถชักนำแคลลัสได้เร็วที่สุดและเปอร์เซ็นต์ของการเกิดแคลลัสสูงถึง 76% สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินและออกซินมีประสิทธิภาพในการชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นของพืชพัฒนาเป็นแคลลัส (Francis and Sorrell, 2001) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินโดยเฉพาะ 2,4-D ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-2 mg/l ช่วยกระตุ้นให้ชิ้นส่วนใบของเบญจมาศพัฒนาเป็นแคลลัส (Obukosia *et al.*, 2005) การใช้ความเข้มข้นของออกซินในปริมาณที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถชะลอการเจริญเติบโตทางสัณฐานวิทยา ในขณะเดียวกันจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของแคลลัส อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้น (2-4 mg/l) (Eisa *et al.*, 2022) ส่วนกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ใช้เวลา 9-18 วัน กลีบดอกจึงจะสามารถพัฒนาเป็นแคลลัส แคลลัสของกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกด และสการ์เลท มีสีเขียว ลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนแน่น (compact callus) (ภาพที่ 4.2 A) และพันธุ์เหลืองปึงปองใช้เวลาในการพัฒนาเป็นแคลลัส 12-18 วัน ซึ่งแคลลัสที่พัฒนามีสีเหลือง ลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) หลังจากเข้าสู่สัปดาห์ที่ 10 แคลลัสจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 4.2 B) อาจเกิดจากการออกซิเดชันของฟีนอลิก หลักจากการย้ายอาหารแคลลัส แคลลัสบางส่วนอาจถูกตัดหรือเกิดบาดแผล จึงทำให้มีการปลดปล่อยสารฟีนอลิกออกมา เมื่อสารเหล่านี้สัมผัสทำปฏิกิริยากับออกซิเจนภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัสนั้นจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Thomas, 2008) หรืออาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของแคลลัส การแบ่งเซลล์ลดลง เซลล์ตายจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (George *et al.*, 2008) การชักนำแคลลัสและการเจริญเติบโตของแคลลัสขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของเบญจมาศและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง (Bankarat *et al.*, 2010)

ตารางที่ 4.1 ระยะเวลาในการพัฒนาของกลีบดอกเบญจมาศเป็นแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และจำนวนยอดที่พัฒนามาจากแคลลัส

สูตรอาหาร MS (mg L ⁻¹)	สายพันธุ์	การเกิดแคลลัส (%)			ลักษณะของแคลลัส		จำนวนยอด/ ชิ้นส่วน 12 สัปดาห์
		6 วัน	12 วัน	18 วัน	Compact callus	Friable callus	
2 BA + 0.5 NAA	เหลืองปี่ปอง	0	5	100		/	0
	สการ์เลท	0	15	100	/		0
	การะเกด	0	70	100	/		2.5
1 BA + 1 Ki + 1 2,4-D	เหลืองปี่ปอง	0	20	100		/	0
	สการ์เลท	0	60	100	/		1
	การะเกด	0	95	100	/		1
2 BA + 1 2,4-D	เหลืองปี่ปอง	0	30	100		/	0
	สการ์เลท	0	35	100	/		1
	การะเกด	20	100	100	/		0
4 Ki 2 + NAA	เหลืองปี่ปอง	0	10	100		/	0
	สการ์เลท	0	15	100	/		4
	การะเกด	45	100	100	/		0



ภาพที่ 4.1 แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l (A) ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เหลืองปี่ปอง (B) สการ์เลท (C) การะเกด (D)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ (A) ลักษณะของแคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแน่น (Compact callus) และ (B) แคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม (Friable callus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 น้ำหนักสดของแคลลัส

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 สูตร สามารถชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศทั้ง 3 พันธุ์ได้ เมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัยพบว่าสูตรอาหารที่ต่างกันส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ต่างกัน โดยใน 4-8 สัปดาห์ อาหารสูตร BA 2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l กลีบดอกเบญจมาศทุกสายพันธุ์มีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด เมื่อผ่านไป 8-12 สัปดาห์พบว่าอาหารสูตร BA 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l + 2,4-D 1 mg/l น้ำหนักสดของแคลลัสสูงที่สุด ส่วนปัจจัยเรื่องสายพันธุ์ กลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วส่งผลให้น้ำหนักสดสูงที่สุด เมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์ของสูตรอาหารและพันธุ์เบญจมาศ พบว่าแคลลัสของพันธุ์การะเกด มีการเจริญเติบโตที่ดี ทั้งขนาดและน้ำหนักสดของแคลลัส สูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงแคลลัสของกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกด มีน้ำหนักมากที่สุดคือ สูตร MS ที่เติม BA 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l + 2,4-D 1 mg/l 2.03 g ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนวันที่กลีบดอกพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็วที่สุด ส่งผลต่อน้ำหนักสดของแคลลัส ส่วนพันธุ์เหลืองปี่งองและสการ์เลท มีน้ำหนักสดใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักสดแคลลัสที่พัฒนาจากกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน

		น้ำหนักสด (g)		
		4 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
สูตรอาหาร (MS)	BA 2 + NAA 0.5	0.19±0.12 ab	0.39±0.17 ab	0.72±0.11 c
	BA 1 + Ki 1 + 2,4-D 1	0.16±0.09 b	0.46±0.24 a	1.26±0.36 a
	BA 2 + 2,4-D 1	0.21±0.11 a	0.43±0.23 a	1.00±0.23 b
	Ki 4 + NAA 2	0.17±0.10 ab	0.29±0.12 b	0.97±0.28 b
F-test		**	**	**
สายพันธุ์	เหลืองปี่งอง	0.05±0.01 b	0.16±0.03 b	0.74±0.18 b
	สการ์เลท	0.07± 0.01 b	0.21±0.06 b	0.82±0.22 b
	การะเกด	0.42± 0.05 a	0.81±0.14 a	1.36±0.27 a
F-test		**	**	**
สูตรอาหาร (MS)	สายพันธุ์			
BA 2 + NAA 0.5	เหลืองปี่งอง	0.04±0.00 c	0.16±0.03 c	0.48±0.03 h
	สการ์เลท	0.06±0.00 c	0.23±0.04 c	0.80±0.03 efg
	การะเกด	0.47±0.05 a	0.77±0.03 a	0.90±0.03 defg
BA 1 + Ki 1 + 2,4-D 1	เหลืองปี่งอง	0.05±0.00 c	0.20±0.03 c	1.13±0.03 cd
	สการ์เลท	0.06±0.00 c	0.19±0.05 c	0.62±0.04 fgh
	การะเกด	0.36±0.03 b	0.97±0.19 a	2.03±0.05 a
BA 2 + 2,4-D 1	เหลืองปี่งอง	0.06±0.00 c	0.18±0.02 c	0.92±0.03 def
	สการ์เลท	0.10±0.01 c	0.14±0.01 c	0.58±0.04 gh
	การะเกด	0.46±0.02 a	0.97±0.05 a	1.49±0.03 b
Ki 4 + NAA 2	เหลืองปี่งอง	0.05±0.01 c	0.09±0.01 c	0.43±0.05 h
	สการ์เลท	0.07±0.01 c	0.26±0.10 c	1.30±0.33 bc
	การะเกด	0.39±0.06 ab	0.51±0.04 b	1.01±0.02 cde
F-test		**	**	**
CV%		24.29	31.01	17.87

เอกสารค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละตัว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ผลของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัส

ผลของสูตรอาหารและพันธุ์เบญจมาศต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และ แคโรทีนอยด์ เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะพันธุ์ของเบญจมาศ พบว่าแคลลัสของเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทมี ปริมาณรงควัตถุมากที่สุด แคลลัสของเบญจมาศพันธุ์เหลืองปึงปองมีปริมาณรงควัตถุน้อยที่สุด แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l มีปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด (chl a 98.59 mg/g, chl b 44.72 mg/g และ แคโรทีนอยด์ 24.46 mg/g) (ตารางที่ 4.3) ไคเนตินมีส่วนช่วยในการป้องกันคลอโรฟิลล์ การเสื่อมสลายของโปรตีน และส่งเสริมเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ดังนั้นจึงเป็นผลดีต่อการเจริญเติบโตและขยายตัวของยอด (Alsoufi *et al.*, 2021)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัสที่พัฒนาจากกลีบดอกเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

		คลอโรฟิลล์ เอ (mg g ⁻¹ FW)	คลอโรฟิลล์ บี (mg g ⁻¹ FW)	แคโรทีนอยด์ (mg g ⁻¹ FW)		
สูตรอาหาร MS (mg L ⁻¹)	BA 2 + NAA 0.5	47.97±8.30 a	22.70±2.69 a	17.57±1.71 a		
	BA 1 + Ki 1 + 1 2,4-D	36.10±13.81 b	17.23±6.19 b	13.76±3.48 bc		
	BA 2 + 2,4-D 1	35.84±13.04 b	18.24±5.75 b	13.06±3.39 c		
	Ki 4 + NAA 2	50.41±22.01 a	24.77±9.21 a	16.08±4.16 ab		
F-test	**	**	**			
สายพันธุ์	เหลืองปึงปอง	20.67±7.14 c	11.69±3.28 c	10.05±2.41 c		
	สการ์เลท	71.77±11.16 a	32.79±5.05 a	21.30±1.63 a		
	การะเกด	35.31±5.83 b	17.76±2.71 b	14.02±1.81 b		
F-test	**	**	**			
สูตรอาหาร MS (mg L ⁻¹)	สายพันธุ์	BA 2 + NAA 0.5	เหลืองปึงปอง	37.63±7.75 c	19.59±2.64 cde	16.26±1.60 cd
		สการ์เลท	62.22±2.11 b	27.32±0.67 bc	20.27±1.21 abc	
		การะเกด	44.07±6.96 c	21.31±2.24 cd	16.16±1.49 cd	
	BA 1 + Ki 1 + 1 2,4-D	เหลืองปึงปอง	15.89±2.26 ef	7.79±1.26 f	8.42±0.61 fg	
		สการ์เลท	64.71±10.38 b	29.67±5.00 b	21.22±1.88 ab	
		การะเกด	27.70±1.04 cdef	14.23±0.52 def	11.65±0.44 ef	
	BA 2 + 2,4-D 1	เหลืองปึงปอง	10.46±2.10 ef	7.17±1.21 f	6.25±0.63 g	
		สการ์เลท	61.55±1.66 b	29.46±1.45 b	19.23±0.19 bc	
		การะเกด	35.50±4.47 cd	18.10±2.13 de	13.71±1.74 ed	
	Ki 4 + NAA 2	เหลืองปึงปอง	18.70±1.31 def	12.22±0.21 ef	9.23±0.42 fg	
		สการ์เลท	98.59±9.40 a	44.72±4.04 a	24.46±1.36 a	
		การะเกด	33.95±7.03 cde	17.39±4.25 de	14.57±2.71de	
F-test	**	**	**			
CV%	23.29	21.81	15.91			

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 การพัฒนาจากแคลลัสเป็นยอด

เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์เหลืองปึงปองเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาล และไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดหรืออวัยวะอื่นได้ แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l และอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 mg/l + Kinetin 1 mg/l + 2,4-D 1 mg/l แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (ภาพที่ 4.3) แต่ในอาหารสูตรอื่นแคลลัสพัฒนาเป็นรากแต่ไม่พัฒนาต่อเป็นยอด Imtiaz *et al.* (2019) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้นของ NAA ต่ำกว่า BA จะทำให้มีการพัฒนาของยอดต่อขึ้นส่วนเริ่มต้นได้ดี ส่วนแคลลัสเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ในทุกสูตรอาหาร เนื่องจากแคลลัสของเบญจมาศพันธุ์นี้มีปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงสูงที่สุด ซึ่งรงควัตถุเป็นส่วนสำคัญที่พืชใช้ในการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต และแคลลัสของพันธุ์สการ์เลท ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 4 ยอด (ตารางที่ 4.1) Tymoszuk and Zalewska (2014) ได้รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี BA กับ NAA หรือ Kinetin กับ NAA จะช่วยให้มีการพัฒนาของยอดใหม่จากกลีบดอกเบญจมาศ โคเนตินเป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างยอดใหม่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Janarthanam and Seshadri, 2008) อาหารเพาะเลี้ยงที่เติมโคเนตินความเข้มข้นสูงจะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของยอดและส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ (Alsoufi *et al.*, 2021) นอกจากฮอร์โมนที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ลักษณะทางโครงสร้างของแคลลัสยังมีผลต่อการพัฒนาเป็นยอดอีกด้วย (Chen *et al.*, 2022)



ภาพที่ 4.3 แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ สามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้นั้น ไม่นอญญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 สัดส่วนของแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท

4.2.1 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส

การเพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ภายใต้รูปการจ่ายแสงที่แตกต่างกัน พบว่า กลีบดอกเบญจมาศสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงต่าง ๆ แต่การเจริญเติบโตของแคลลัสต่างกัน กลีบดอกเบญจมาศที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงิน R30:B3 และ R40:B15 สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี มีน้ำหนักสดแคลลัสมากที่สุด (ตารางที่ 4.4) และเห็นได้ชัดจากขนาดของแคลลัสในภาพที่ 4.4 และเมื่อนำแคลลัสมาอบที่อุณหภูมิ 45 °C ระยะเวลา 3 วัน เอน้ำที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ออก เพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของแคลลัสพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงต่อสีน้ำเงิน R30:B3 และ R40:B15 มีน้ำหนักแห้งมากที่สุดเช่นกัน (ตารางที่ 4.5) ในทางกลับกันแสงสีแดงต่อสีน้ำเงิน R30:B10 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Adil *et al.* (2019) แคลลัส *Withania somnifera* L. ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีที่ต่างกัน พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงภายใต้แสงสีม่วงมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด สเปกตรัมของแสงสีแดง สีน้ำเงิน และสีแดงต่อสีน้ำเงิน มีอิทธิพลต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของพืช (Randall and Lopez, 2015) ในงานทดลองบางเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้แสง LED พบว่าช่วยเพิ่มปริมาณของชีวมวลของพืชได้ เช่น การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดเบญจมาศ (Kim *et al.*, 2004) และ *Achillea millefolium* L. (Alvarenga *et al.*, 2015)



ภาพที่ 4.4 แคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน บนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ระยะเวลา 12 สัปดาห์

แสง LED	น้ำหนักสด (mg)	น้ำหนักแห้ง (mg)
สีขาว	123.70±7.14 cd	12.48±1.16 c
R30:B10	99.68±5.40 e	11.25±0.71 c
R20:B15	103.46±2.74 de	11.32±0.44 c
R20:B5	85.32±4.75 ef	11.16±0.65 c
R44:B10	124.28±7.39 cd	14.84±0.78 b
R40:B5	140.38±7.52 c	16.60±0.51 b
R40:B15	219.34±5.46 a	21.40±0.42 a
R16:B10	59.78±1.90 g	7.74±0.13 d
R30:B17	75.60±6.01 fg	10.42±1.39 c
R30:B3	162.20±4.63 b	16.84±1.13 b
F-test	**	**
CV (%)	13.74	13.70

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.2.2 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัส

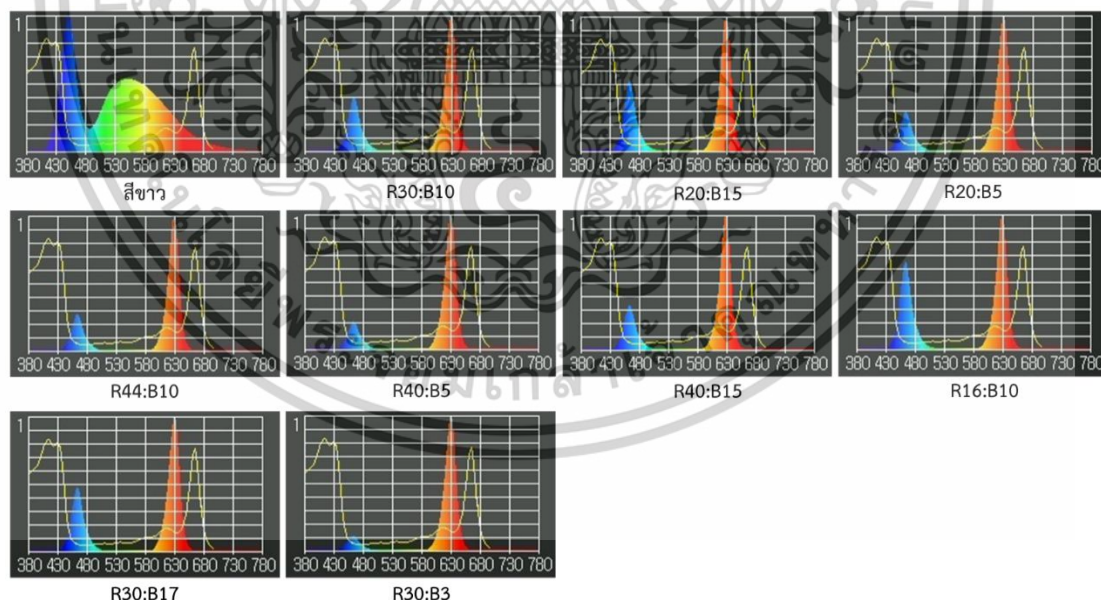
รูปแบบการจ่ายแสงที่ต่างกันส่งผลต่อปริมาณของรงควัตถุที่แคลลัสสร้างขึ้น เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงินกับแสงสีขาว พบว่าการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงินส่งผลต่อปริมาณรงควัตถุที่มากกว่าแสงสีขาว รูปแบบการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงิน R30:B3 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์มากที่สุด (107.13 mg/g FW, 46.07 mg/g FW และ 32.09 mg/g FW ตามลำดับ) และแคลลัสที่เลี้ยงภายใต้แสง R40:B15 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ บี 44.55 mg/g FW มากที่สุดเช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งคลอโรฟิลล์เป็นปัจจัยสำคัญของการสังเคราะห์แสงของแคลลัส มีงานทดลองมากมายที่แสดงให้เห็นถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เพิ่มขึ้นหลังจากที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน (Zhao *et al.*, 2020; Saldarriaga *et al.*, 2020; Akbari *et al.*, 2025) นอกจากคลอโรฟิลล์จะเป็นรงควัตถุหลักที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงแล้ว แคโรทีนอยด์ก็เป็นหนึ่งในรงควัตถุที่สามารถดูดซับแสงได้เช่นกัน ซึ่งเมื่อคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ทำงานร่วมกันในการสังเคราะห์แสงแล้ว ยังช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive Oxygen Species; ROS) ที่เกิดจากความเครียดที่พืชได้รับแสงรุนแรงได้อีกด้วย (Fu *et al.*, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ พันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน บนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ระยะเวลา 12 สัปดาห์

แสง LED	คลอโรฟิลล์ เอ (mg/g FW)	คลอโรฟิลล์ บี (mg/g FW)	แคโรทีนอยด์ (mg/g FW)
สีขาว	46.67±4.83 c	19.15±2.38 b	20.31±1.13 b
R30:B10	36.97±2.65 c	15.26±0.98 b	18.50±0.73 b
R20:B15	37.79±7.28 c	19.88±4.19 b	18.60±2.18 b
R20:B5	44.27±3.86 c	18.60±1.89 b	20.10±0.93 b
R44:B10	30.37±2.21 c	12.39±1.42 b	16.48±1.00 b
R40:B5	23.77±1.88 c	9.99±0.91 b	14.77±1.02 b
R40:B15	107.13±6.32 a	46.07±2.52 a	32.09±2.54 a
R16:B10	23.79±0.81 c	10.66±0.25 b	14.65±0.79 b
R30:B17	41.98±9.05 c	17.33±3.71 b	20.92±2.57 b
R30:B3	74.66±3.60 b	44.55±3.11 a	20.33±4.86 b
F-test	**	**	**
CV (%)	26.17	40.18	19.04

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 4.5 ความยาวคลื่นแสงในช่วง 380–780 nm ของแสง LED สีขาว และสีแดงต่อสีน้ำเงินใน สัดส่วนความเข้มแสงแบบต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA)

แคลลัสที่พัฒนามาจากกลีบดอกเบญจมาศที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงที่ต่างกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ความเครียดที่แคลลัสได้รับจากรูปแบบการจ่ายแสง พบว่า รูปแบบการจ่ายแสงสีขาว และ R20:B5 แคลลัสมีปริมาณ MDA สูงที่สุด 11.18 nmol/g ในขณะที่เดียวกันแคลลัสที่เจริญเติบโตภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงินมีปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์น้อยที่สุด R30:B3 และ R40:B15 (5.16 nmol/g และ 6.45 nmol/g ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง อธิบายเพิ่มเติมคือเมื่อแคลลัสมีปริมาณรงควัตถุสูงเนื่องจากแสงที่ได้รับเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต แคลลัสได้รับความเครียดที่น้อย จึงมีปริมาณ MDA ที่ต่ำกว่าแคลลัสที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงอื่น จากภาพที่ 4.5 สเปกตรัมที่มีแสงสีน้ำเงินสูง เช่น แสงสีขาว หรือ R20:B5 ส่งผลให้ค่า MDA สูงกว่าชุดอื่น ๆ เนื่องจากแสงน้ำเงินกระตุ้นการผลิต reactive oxygen species (ROS) ที่สูงขึ้นในเซลล์ (Wang *et al.*, 2016) ในขณะที่สเปกตรัมที่มีแสงสีแดงสูง เช่น R30:B3 แคลลัสจะมีปริมาณ MDA น้อย เนื่องจากความเครียดต่ำ

4.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การสะสมปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงที่แตกต่างกัน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว และแสงสีแดงต่อสีน้ำเงิน R44:B10 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด 2.45 mg (GAE)/g FW และ 2.35 mg (GAE)/g FW ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงต่อสีน้ำเงิน R40:B15 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุด 1.47 mg (GAE)/g FW (ตารางที่ 4.6) จากผลการทดลองดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงต่อสีน้ำเงิน R40:B15 มีความเครียดน้อยที่สุด เนื่องจากผลของฟีนอลิกน้อยที่สุด คุณภาพและความเข้มของแสงมีผลต่อปริมาณสารชีวเคมีของแคลลัส แสงสีแดงและสีน้ำเงินมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารฟลูโอยด์ในแคลลัส (Bajwa *et al.*, 2023) แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสะสมฟีนอลิกซึ่งฟีนอลิกเป็นสารฟลูโอยด์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการปกป้องเซลล์จากความเครียด (Giménez *et al.*, 2014)

ตารางที่ 4.6 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน บนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ระยะเวลา 12 สัปดาห์

แสง LED	MDA (nmol/g)	ฟีนอลิก (mg (GAE)/g FW)
สีขาว	11.18±0.27 a	2.42±0.06 a
R30:B10	9.82±0.26 ab	2.00±0.03 c
R20:B15	8.55±0.41 b	1.58±0.03 d
R20:B5	11.18±0.61 a	2.03±0.02 c
R44:B10	9.62±0.46 ab	2.35±0.02 a
R40:B5	9.84±0.85 ab	2.11±0.03 bc
R40:B15	6.45±0.25 c	1.47±0.02 e
R16:B10	9.73±0.63 ab	2.04±0.04 c
R30:B17	9.95±0.80 ab	2.18±0.03 b
R30:B3	5.16±0.81 c	1.57±0.04 d
F-test	**	**
CV (%)	11.00	3.07

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

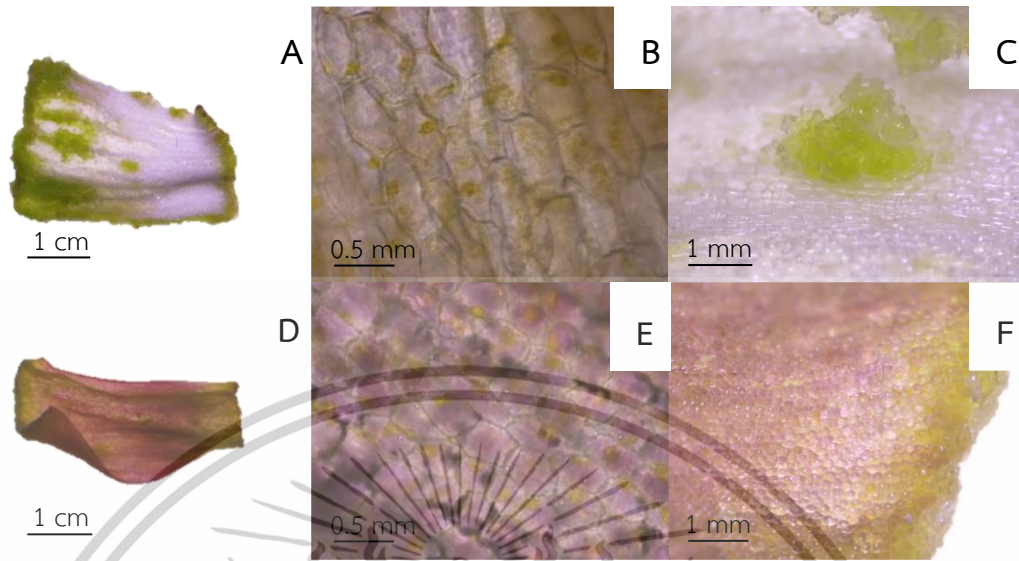
4.3 การจ่ายแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 2 สายพันธุ์

4.3.1 การพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ

หลังจากนำกลีบดอกเบญจมาศมาชักนำให้เกิดแคลลัสด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l นำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน พบว่า กลีบดอกเบญจมาศทั้งสองพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ในทุกรูปแบบเกิดการพัฒนากลุ่มเซลล์ Parenchyma ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นอวัยวะหรือส่วนอื่นๆ หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ ดังภาพที่ 4.6 (B) และ (E) ต่อมาเซลล์นี้มีการพัฒนาเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนแน่นแบบ Compact callus ภาพที่ 4.6 (C) และ (F) ซึ่งมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ในช่วงแรกของการพัฒนา หลังจากเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ แคลลัสเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าแคลลัสของเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท กลีบดอกในส่วนที่ไม่ได้พัฒนาเป็นแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล การใช้ไซโทโคตินจะมีผลต่อการสร้างแคลลัส โดยจะไปทำให้ผนังเซลล์อ่อนลง และเริ่มพัฒนาเป็นแคลลัส ซึ่งแคลลัสจะเริ่มพัฒนาจากชั้นส่วนเริ่มต้นตรงบริเวณที่ถูกตัดและเจริญเติบโตครอบคลุมทั้งชั้นส่วน (Dar *et al.*, 2021) และมีการศึกษาหลายครั้งกล่าวว่า การใช้ออกซินร่วมกับไซโทโคตินจะทำให้การชักนำแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ผลดีกว่าการใช้ออกซินหรือไซโทไคนินเพียงอย่างเดียว (Kaviani *et al.*, 2013; Normasari *et al.*, 2021)



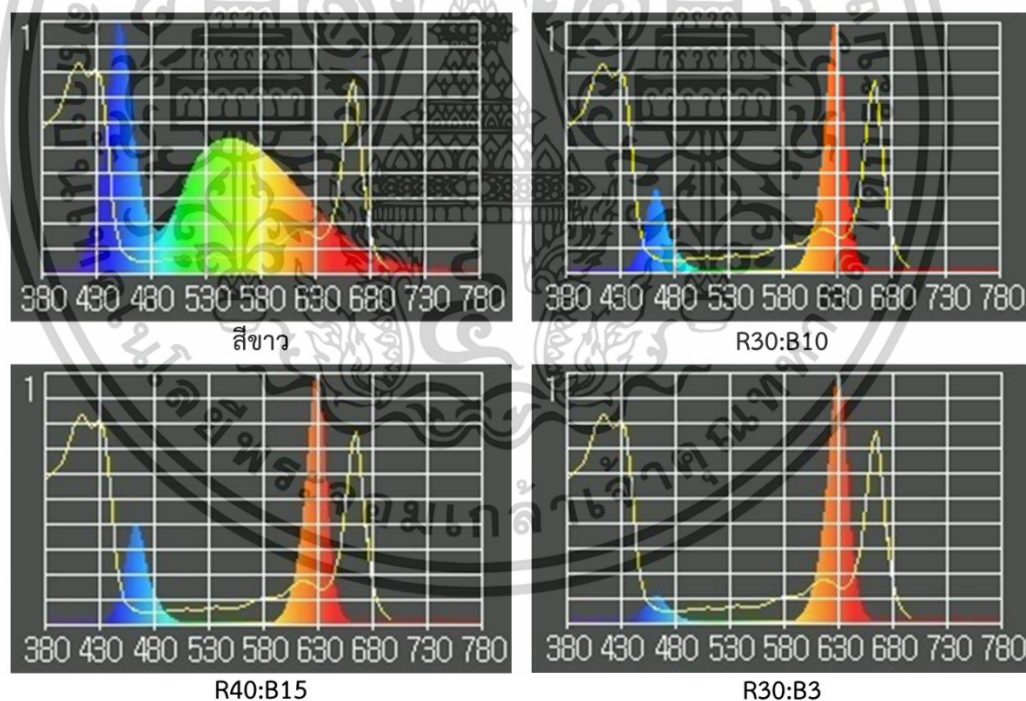
ภาพที่ 4.6 การชักนำแคลลัสด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l; กลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่กำลังพัฒนาเป็นแคลลัส (A) เซลล์จากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกด หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (B) กลุ่มเซลล์จากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่กำลังพัฒนาเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (C) และกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท (D) เซลล์จากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (E) กลีบดอกที่พัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เบญจมาศพันธุ์สการ์เลท หลังจากเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (F)

4.3.2 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส

การเพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงที่ต่างกัน พบว่า กลีบดอกเบญจมาศสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ ภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงต่างๆ มีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ต่างกัน ปัจจัยเรื่องแสงต่อการพัฒนาของน้ำหนักสดแคลลัส กลีบดอกเบญจมาศทั้งสองพันธุ์ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบการจ่ายแสงที่ต่างกัน น้ำหนักสดแคลลัสไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.7) เมื่อนำแคลลัสมาอบที่อุณหภูมิ 45°C เพื่อเอาน้ำที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ออก พบว่าแสง LED มีผลต่อน้ำหนักแห้งของแคลลัส โดยแสง LED สีแดงต่อน้ำเงินในอัตราส่วน R40:B15 แคลลัสมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด ปัจจัยเรื่องพันธุ์ต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส เบญจมาศพันธุ์การะเกด มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสมากกว่าพันธุ์สการ์เลท เมื่อเปรียบเทียบทั้งปัจจัยในเรื่องแสงและพันธุ์เบญจมาศ พบว่าแคลลัสเบญจมาศพันธุ์การะเกด ตอบสนองต่อแสง LED สีแดงต่อน้ำเงินในอัตราส่วน R40:B15 ได้ดีที่สุดในเรื่องน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จากผลการทดลองสันนิษฐานได้ว่า ปัจจัยเรื่องสายพันธุ์มีอิทธิพลมากกว่าปัจจัยเรื่องแสง แต่ก็มีรายงานหลายชิ้นที่อธิบายว่าแสงมีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น การใช้แสงสีแดงและสีน้ำเงินร่วมกันทำให้ต้นกล้าแข็งแรงกว่าการใช้แสงสีแดงคุณภาพแสงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเมล็ดมะเขือเทศคืออัตราส่วนสีแดงต่อแสงสีน้ำเงินที่ 3:7 (Wang *et al.*, 2024) ปัจจัยแสงที่เหมาะสมมีผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่องน้ำหนักของแคลลัส (Saldarriaga *et al.*, 2020) งานวิจัยของ Jang *et al.* (2020) รายงานว่าแสงสีแดงและแสงสีม่วงที่ผสมกับแสงสีน้ำเงินมีผลต่อน้ำหนักสดของแคลลัส *Camellia japonica* ที่มากกว่าแสงชนิดอื่นๆ จากภาพที่ 4.7 สามารถอธิบายผลในเรื่องของน้ำหนักแห้งได้ว่า แสงสีแดงที่ในสัดส่วนที่สูงกว่าแสงสีน้ำเงิน ส่งเสริมการการแบ่งเซลล์และการสะสมชีวมวลของแคลลัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้แคลลัสมีน้ำหนักแห้งที่สูง (Shohaet *et al.*, 2006) อีกทั้งยังผลการทดลองนี้ยังเป็นไปในแนวทางเกี่ยวกับการทดลองของ Nhut *et al.* (2003) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสตรอว์เบอร์รี่ภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน 70:30 ซึ่งให้ผลในเรื่องของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งดีกว่าแสงควบคุมที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

เมื่อวัดการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งแล้ว ปรากฏว่าขนาดของแคลลัสพันธุ์สการ์เลทมีขนาดเล็ก ซึ่งไม่เพียงพอต่อการประเมินผลในเรื่องคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง จึงต้องเพาะเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ ส่งผลให้ต้องแยกการวิเคราะห์ผลออกเป็น 2 ครั้ง ซึ่งจะวิเคราะห์ผลของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์กระแจะ ในสัปดาห์ที่ 4 เนื่องจากแคลลัสการเกิดเมื่อนำมาเลี้ยงภายใต้แสง LED พบว่าการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว จึงต้องมีการนำมาวิเคราะห์ก่อน หากเพาะเลี้ยงต่อแคลลัสอาจเข้าสู่การเสื่อมสภาพได้ และวิเคราะห์ผลของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทในสัปดาห์ที่ 8



ภาพที่ 4.7 แสดงการกระจายของความยาวคลื่นในช่วง 380–780 nm ภายใต้สภาวะแสงสีขาวและแสง LED สัดส่วนต่าง ๆ ของแสงสีแดง (R) ต่อแสงสีน้ำเงิน (B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทและพันธุ์การะเกดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน ระยะเวลา 4 สัปดาห์

		น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	
แสง LED	สีขาว	0.30±0.09	0.02±0.01 b	
	R30:B10	0.32±0.11	0.03±0.01 ab	
	R40:B15	0.39±0.13	0.04±0.01 a	
	R30:B3	0.34±0.11	0.03±0.01 ab	
F-test		Ns	**	
สายพันธุ์	สการ์เลท	0.03±0.00 b	0.01±0.00 b	
	การะเกด	0.64±0.04 a	0.05±0.00 a	
F-test		**	**	
แสง LED	สายพันธุ์			
		สีขาว	สการ์เลท	0.03±0.00 c
		การะเกด	0.57±0.03 b	0.04±0.00 b
R30:B10	สการ์เลท	0.02±0.00 c	0.01±0.00 c	
	การะเกด	0.62±0.09 ab	0.05±0.01 b	
R40:B15	สการ์เลท	0.03±0.00 c	0.01±0.00 c	
	การะเกด	0.75±0.09 a	0.07±0.01 a	
R30:B3	สการ์เลท	0.03±0.00 c	0.01±0.00 c	
	การะเกด	0.64±0.09 ab	0.06±0.01 ab	
F-test		**	**	
CV (%)		37.65	38.48	

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3.3 ปริมาณรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง

รูปแบบการจ่ายแสงที่ต่างกันส่งผลต่อปริมาณของรงควัตถุที่แคลลัสสร้างขึ้น เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงินกับแสงสีขาว พบว่าการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงินส่งผลต่อปริมาณรงควัตถุของแคลลัสของเบญจมาศพันธุ์การะเกด ตอบสนองต่อแสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ในอัตราส่วน R30:B3 ได้ดีกว่าแสงรูปแบบอื่น ส่งผลให้มีปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด (ตารางที่ 4.8) แคลลัสเบญจมาศพันธุ์สการ์เลท รูปแบบการจ่ายแสงสีแดงต่อสีน้ำเงินในอัตราส่วน R40:B15 มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์สูงที่สุดในส่วนของปริมาณคลอโรฟิลล์ บี ของแคลลัสที่เลี้ยงภายใต้แสงที่แตกต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.9) ซึ่งรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสังเคราะห์แสงของแคลลัส มีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงไว้ว่าแสง LED สีแดงและสีน้ำเงิน มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของแคลลัสมากกว่าแสงสีอื่นๆ เมื่อแคลลัสมีการเจริญเติบโตได้ดีกระบวนการสังเคราะห์แสงย่อมมีประสิทธิภาพ YU *et al.* (2020) รายงานว่า แสง LED สีแดงและสีน้ำเงินช่วยให้ต้นกล้าข้าวมีอัตราการสังเคราะห์แสงที่ดี ผลลัพธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงมีจำนวนมากและมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังมีปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคโรทีนอยด์สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับ Li *et al.* (2024) ที่ศึกษาเพาะเลี้ยงต้นมันฝรั่งภายใต้แสง LED พบว่าต้นมันฝรั่งที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงและสีน้ำเงินมีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ที่มากกว่าแสงสีขาว และแสงสีแดงหรือน้ำเงินเพียงชนิดเดียว

ตารางที่ 4.8 คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บีและแคโรทีนอยด์ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

แสง LED	คลอโรฟิลล์ เอ (mg/g FW)	คลอโรฟิลล์ บี (mg/g FW)	แคโรทีนอยด์ (mg/g FW)
สีขาว	22.94±0.80 c	10.70±0.61 c	11.89±0.33 c
R30:B10	27.40±0.89 b	13.25±0.97 ab	14.34±0.52 b
R40:B15	25.61±1.11 b	11.54±0.41 bc	14.10±0.43 b
R30:B3	30.96±0.38 a	14.15±0.60 a	15.86±0.16 a
F-test	**	**	**
CV (%)	7.00	12.24	6.14

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.9 คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บีและแคโรทีนอยด์ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์สการ์เล็ตที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์

แสง LED	คลอโรฟิลล์ เอ (mg/g FW)	คลอโรฟิลล์ บี (mg/g FW)	แคโรทีนอยด์ (mg/g FW)
สีขาว	33.21±0.41 b	18.32±0.58	14.45±0.34 b
R30:B10	33.89±0.60 b	16.72±0.99	14.73±0.27 b
R40:B15	38.25±0.63 a	18.71±0.63	16.41±0.54 a
R30:B3	36.95±0.62 a	17.82±0.32	15.14±0.32 b
F-test	**	ns	*
CV (%)	3.60	8.40	5.60

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3.4 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA)

การตรวจสอบความเครียดของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกันด้วยการวิเคราะห์ปริมาณ MDA พบว่า แคลลัสเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ในอัตราส่วน R40:B15 และ R30:B3 มีปริมาณ MDA สูงที่สุด (ตารางที่ 4.10) ส่วนแคลลัสเบญจมาศพันธุ์สการ์เล็ตที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีขาวมีปริมาณ MDA สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างกันกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ในอัตราส่วน R40:B15 และ R30:B3 (ตารางที่ 4.11) MDA เป็นผลผลิตขั้นสุดท้ายที่เกิดจากการที่ไขมันถูกทำลายจากกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งสามารถบ่งบอกความรุนแรงของความเสียหายที่เกิดจากความเครียดได้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Alché, 2019) ความเครียดที่เกิดขึ้นกับแคลลัสโดยแสง LED ทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation เพิ่มขึ้นส่งผลให้กระบวนการทางสรีรวิทยาลดลงและปริมาณ MDA จะเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส *Artemisia absinthium* L. ภายใต้แสง LED สีต่างๆ (Ebisawa et al., 2008)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ การเพาะที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์

แสง LED	MDA (nmol/g)	Phenolic (mg (GAE)/g FW)	EC ₅₀ for DPPH scavenging activity (mg/L)	TNC (mg D- glucose/DW)	RS (mg D- glucose/DW)
สีขาว	8.42±0.24 b	1.58±0.06 c	0.22±0.00 a	31.49±1.07	5.61±0.27 c
R30:B10	8.00±0.32 b	2.28±0.06 b	0.21±0.00 b	31.08±0.93	4.91±0.18 c
R40:B15	9.29±0.11 a	2.52±0.07 a	0.15±0.00 c	33.10±1.99	9.16±0.53 b
R30:B3	8.65±0.07 a	2.59±0.05 a	0.13±0.00 d	37.16±3.00	18.88±1.69 a
F-test	**	**	**	ns	**
CV (%)	5.40	5.74	1.78	10.09	16.16

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.11 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง ของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ สกัดที่ชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์

แสง LED	MDA (nmol/g)	Phenolic (mg (GAE)/g FW)	EC ₅₀ for DPPH scavenging activity (mg/L)	TNC (mg D- glucose/DW)	RS (mg D- glucose/DW)
สีขาว	8.48±0.23 a	5.63±0.07 b	0.13±0.00 a	54.76±0.70	17.36±0.46 bc
R30:B10	7.13±0.25 b	7.35±0.19 a	0.03±0.00 d	57.19±1.05	17.97±0.18 ab
R40:B15	7.68±0.44 ab	7.13±0.05 a	0.05±0.01 c	56.59±1.61	16.05±0.10 c
R30:B3	8.16±0.43 ab	7.26±0.17 a	0.08±0.01 b	58.61±1.07	18.98±0.79 a
F-test	*	**	**	ns	*
CV (%)	9.95	4.53	6.85	3.52	4.62

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% *มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของแคลลัสเบญจมาศพันธุ์การะเกด หลังจากชักนำแคลลัส 4 สัปดาห์และพันธุ์สการ์เลทหลังจากชักนำแคลลัส 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน พบว่าแคลลัสเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ในอัตราส่วน R30:B10 และ R30:B3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (ตารางที่ 4.10) ส่วนแคลลัสเบญจมาศพันธุ์สการ์เลทที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ทั้ง 3 รูปแบบ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีขาว (ตารางที่ 4.11) การทดลองของ Muhammad *et al.* (2019) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสของโหระพาภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกันพบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีน้ำเงิน และสีแดง มีปริมาณฟีนอลิกที่สูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงภายใต้แสง LED สีขาว และยังมีรายงานของ Lian *et al.* (2023) ที่กล่าวว่าแสงสีน้ำเงินและแดงจะส่งผลให้แคลลัสของ *G. procumbens* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าแสงขาวและแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืด ปริมาณของฟีนอลิกหรือสารชีวเคมีเป็นสิ่งสำคัญต่อการป้องกันการเกิดความเครียดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งความเครียดนั้นอาจเกิดจากสิ่งไม่มีชีวิตหรือปัจจัยอื่น ๆ (Saldarriaga *et al.*, 2020)

4.3.6 วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging activity)

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของแคลลัสเบญจมาศพันธุ์การะเกดและพันธุ์สการ์เลท พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ทั้ง 3 รูปแบบ โดยแคลลัสเบญจมาศพันธุ์การะเกดที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ในอัตราส่วน R30:B3 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด 0.13 mg/l (ตารางที่ 4.10) และแคลลัสสการ์เลทที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน ในอัตราส่วน R30:B10 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.11) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Halimeh (2022) ที่ทดลองผลของแสงสีแดงและสีน้ำเงินต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส *Hyoscyamus reticulatus* พบว่าแสงสีแดงและสีน้ำเงินในสัดส่วน R75:B25 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าแสงสีขาว ซึ่งการยับยั้งอนุมูลอิสระอาจเกิดจากการที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง กล่าวคือแคลลัสที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงก็สามารถที่จะยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี

4.3.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar; RS) และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Total nonstructural carbohydrate; TNC)

การวิเคราะห์ปริมาณ RS ของแคลลัสเบญจมาศทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงินในอัตราส่วน R30:B3 มีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทริตเมนต์อื่น ๆ ซึ่งผลการทดลองเรื่องปริมาณ RS เป็นไปในทิศทางเดียวกับการเจริญเติบโต น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ งานวิจัยนี้ให้ข้อสรุปเรื่องปริมาณการสะสมน้ำตาลคล้ายคลึงกับ Cioc *et al.* (2021) ที่รายงานว่าเยอบีร่าที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีการสะสมน้ำตาลที่มากเมื่อได้รับแสงสีแดงต่อแสงสีน้ำเงินในอัตราส่วน 7:3 และแสง LED สีแดงและน้ำเงินช่วยให้มีการสะสมแป้งและน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย (Shin *et al.*, 2007) การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ของแคลลัสเบญจมาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์การเกิดและพันธุ์สการ์เลท พบว่าแคลล์สที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED ที่แตกต่างกัน มีปริมาณ TNC ใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลล์ส เป็นตัวชี้วัดที่สำคัญของการเจริญเติบโต ซึ่งมีความสัมพันธ์กับรงควัตถุที่สะท้อนถึงประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง แคลล์สที่มีรงควัตถุสูงมักมีน้ำหนักมากและพัฒนาได้ดี ในขณะเดียวกัน ระดับของ MDA และสารประกอบฟีนอลิก บ่งชี้ถึงความเครียดที่เนื้อเยื่อได้รับ ซึ่งหากสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโต นอกจากนี้ ค่า EC_{50} ของ DPPH แสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับแข็งแรงของเซลล์โดยตรง ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะสะท้อนถึงพลังงานที่สะสมในแคลล์สสำหรับการพัฒนาเป็นโครงสร้างใหม่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

พันธุ์เบญจมาศที่แตกต่างกันมีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ทั้งในเรื่องจำนวนวันในการเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น น้ำหนักสด ปริมาณรงควัตถุของแคลลัส รวมถึงจำนวนยอดที่พัฒนาจากแคลลัส กลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกด ตอบสนองต่ออาหารทุกสูตรสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็ว เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l แต่เมื่อเวลาผ่านไปสามารถพัฒนาต่อเป็นยอดได้จำนวนน้อย แต่เบญจมาศพันธุ์สการ์เลท พัฒนาเป็นแคลลัสได้ช้า แต่เมื่อเวลาผ่านไปแคลลัสที่ได้สามารถพัฒนาเป็นยอดได้จำนวนมาก เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 4 mg/l + NAA 2 mg/l ส่วนแคลลัสจากกลีบดอกเหลืองปึงปอง แคลลัสมีการเจริญเติบโตช้า และไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้

5.1.2 สัดส่วนของแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ

สัดส่วนของแสง LED มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสที่พัฒนาจากกลีบดอกเบญจมาศ พิจารณาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแคลลัส มีผลไปในทิศทางเดียวกันกับผลคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์ ซึ่งแสง LED ในสีแดงต่อสีน้ำเงินสัดส่วน R40:B15 และ R30:B3 มีการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุด ในขณะที่ parameter ที่ใช้ตรวจสอบความเครียดที่ได้รับจากแสงของแคลลัส แคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง R40:B15 และ R30:B3 มีค่า MDA น้อยที่สุด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีนี้มีความเครียดน้อย จึงส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยอีกด้วย

5.1.3 การจ่ายแสง LED ต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ 3 สายพันธุ์ และปริมาณสารชีวเคมีของแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ

อัตราส่วนของแสง LED มีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศ โดยกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์การะเกด สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้เร็วเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงินในอัตราส่วน R40:B15 และ R30:B3 ส่งผลให้แคลลัสมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูง และปริมาณรงควัตถุที่สังเคราะห์แสงของแคลลัสที่เลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน R30:B3 สูงที่สุดในทางกลับกันแสง LED สีแดงต่อสีน้ำเงิน R40:B15 และ R30:B3 ส่งผลต่อความเครียดที่พืชได้รับทำให้แคลลัสมีปริมาณ MDA สูง ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง และความสามารถใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ซึ่งบ่งบอกถึงการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ส่วนแคลสจากกลีบดอก เบญจมาศพันธุ์ สการ์เลทตอบสนองต่อแสง LED ในทุกรูปแบบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่งผลให้ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการยับยั้งอนุมูลอิสระของแคลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสง LED สีแดง ต่อสีน้ำเงินในอัตราส่วน R40:B15 และ R30:B3 มีแนวโน้มไปในทางที่ดีกว่าแคลสที่เพาะเลี้ยงภายใต้ แสง LED สีขาวและสีแดงต่อสีน้ำเงินในอัตราส่วน R30:B10

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรขยายการศึกษาผลของสัดส่วนแสง LED ในระยะยาวต่อการเจริญเติบโตจาก แคลสเป็นยอดหรือต้นใหม่

งานวิจัยนี้ศึกษาการพัฒนาแคลสภายใต้แสง LED ที่มีสัดส่วนต่างกัน แต่ยังไม่มีการศึกษา ต่อเนื่องถึงระยะการสร้างยอดใหม่ (shoot regeneration) หรือการชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์จาก แคลส ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

5.2.2 ควรศึกษาการตอบสนองต่อแสงในระดับชีวโมเลกุล

เพื่อให้เข้าใจกลไกการตอบสนองของแคลสต่อแสง LED ได้ดียิ่งขึ้น การศึกษาการแสดงออก ของยีน (gene expression) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ หรือสารชีวเคมีของพืช ภายใต้แสงที่ต่างกัน จะช่วยยืนยันผลทางสรีรวิทยาที่พบและสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีเพิ่ม ประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

5.2.3 ควรเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ LED กับแหล่งกำเนิดแสงชนิดอื่นในการ เพาะเลี้ยงแคลส

แม้ว่า LED จะได้รับการยอมรับในด้านประสิทธิภาพในการควบคุมแสง แต่การเปรียบเทียบกับแหล่งแสงอื่น เช่น หลอดฟลูออเรสเซนต์ หรือแสงธรรมชาติ ควบคู่กับการวิเคราะห์ต้นทุน จะช่วยให้ประเมินความคุ้มค่ามากยิ่งขึ้นในเชิงเศรษฐกิจสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- กัญจนนา แซ่เตี๋ยว, ลำแพน ขวัญพูล และวสันต์ แสงอินทร์. 2558. ผลของช่วงแสงต่อการเจริญเติบโตของลิลลี่และเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ. รายงานวิจัยคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ขวัญดาว จันทะหา, องค์กราภ หรีจันดา, ทูเรียน ทาเจริญ และช่อทิพา สกุศลสิงหาโรจน์. 2564. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและตายอดจากชิ้นส่วนใบดาวเรือง. หน้า 667-674. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรม (มหาวิทยาลัยแม่โจ้) ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวางของพืช. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- จันทรา เล็กเก็ม. 2534. คุณค่าทางโภชนาการและดัชนีการเก็บเกี่ยวผักพื้นเมืองที่มีแนวโน้มเป็นผักเศรษฐกิจของเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการสอนชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิตราภรณ์ ยูวานนท์, พรสวรรค์ พานิชเจริญ และสมภพ ทองใหญ่. 2565. ผลของคุณภาพแสงจากหลอด LED ต่อการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยหอมในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารเกษตรศาสตร์. 38(2): 120-130.
- จินดา ศรศรีวิชัย. 2524. สรีรวิทยาพืช ภาคการเจริญเติบโตและการควบคุม. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชัยวัฒน์ ต่วนภูวเสถียร, ศิริพร สินธุฉนิก และจุฑามาศ อ่อนจันทร์. 2564. ผลของแสง LED ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 52(1): 45-52.
- दनัย บุญยเกียรติ. 2539. สรีรวิทยาของพืช. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ธนาพร นพรัตน์ไพบูลย์. 2560. ผลกระทบของสัดส่วนของแสงสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน จากหลอด LED ต่อการ เจริญเติบโต และการพัฒนาของพืชเบญจมาศ คาร์เนชั่น ลิเซียนทัส และสตรอว์เบอร์รี่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาฟิสิกส์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ธรรม นามพร้อม. 2563. Indoor Farming Photosynthetic การสังเคราะห์แสงของพืชผักในอาคาร. [ออนไลน์] Available: <https://properea.com/indoor-farming-photosynthetic-13-05-2020/>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ธวัชชัย ไชยตระกูลทรัพย์. 2524. การเปลี่ยนแปลงปริมาณของไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรตในใบและยอดของลิ้นจี่พันธุ์สงฮวยในรอบปี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เนตรนภา เมยกลาง และเฉลิม เรื่องวิริยะชัย. 2557. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. วารสารวิจัย มช. (บศ.). 14 (4): 69-79.
- พจนา เพชรคอน. 2563. การสังเคราะห์แสงของพืช. คลังความรู้ SciMath. [ออนไลน์] Available: <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/10517-2019-07-18-01-41-56>.
- พันทิพา ลิ้มสงวน, สนธิชัย จันท์เปรม และเสริมศิริ จันท์เปรม. 2560. การชักนำให้เกิดแคลัสและต้นอ่อนจากกลีบดอกที่พัฒนาแล้วของเบญจมาศ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 48(3): 322-333.
- แพรววี ตะเพียนทอง, ลำแพน ขวัญพูล, กัญจนา แซ่เตียว. 2559. ผลของแสงสีจากหลอด LED ต่อการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์แคนเทอร์. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 3(2): 57-62.
- ภานุพล หงส์ศักดิ์. 2565. สรีรวิทยาไม้ดอก. จำนวน 200 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยขอนแก่น: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ภูวนาด นนทรีย์. 2532. การใช้ฮอร์โมนกับไม้ผลบางชนิด. กรุงเทพฯ: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. ลักษณะ รุจนะไกรกานต์ และ นิธิยา รัตนานนท์. 2533. หลักการวิเคราะห์อาหาร. เชียงใหม่: ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลือชัย บุตุคุป. 2554. สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 31(4): 443-455.
- วราพงษ์ เสนะวีระกุล, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และลิลลี่ กาวีตะ. 2553. การเปลี่ยนแปลงปริมาณ malondialdehyde และ total soluble sugar ของหน่อารูซี่ที่ทนแล้งได้ต่างกัน เมื่อชักนำด้วย polyethylene glycoll. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุภาพร สัมโย และอำนาจ อรรถลิ่งรอง. 2563. สถานการณ์การผลิตเบญจมาศ. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
- สุรวิษ วรรณไกรโรจน์, ยี่โก ทักษะทัต, เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี, เกวลิน คุณาศักดากุล, รมณีย์ เจริญทรัพย์, พนมพร วรรณประเสริฐ, เพชรรัตน์ จันทร์ทิณ และ Ray Lebon Ong. 2564. บทฐานงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ศูนย์การพิมพ์แก่นจันทร์ จำกัด.
- เสาวนีย์ นครศรี. 2555. การตอบสนองของพืชต่อช่วงแสง. [ออนไลน์] Available: <https://saowineenakhonsri>: การตอบสนองของพืชต่อช่วงแสง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- หทัยชนก หมั่นกล้า. 2556. พลังหลอดไฟแอลอีดี (Light emitting diode). **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 36-40.
- อดิศร กระแสชัย. 2539. การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกโดยวิธีการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อนันต์ เลิศสุทธิชवाल. 2562. การกลายพันธุ์ของเบญจมาศด้วยสาร EMS และ Cochicine. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อักษร ศรีเปล่ง. 2529. **พฤกษศาสตร์ทั่วไป**. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัจฉรา นิยมเดชา และมงคล คงเสน. 2556. เมทาบอลิซึมและคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ในการเพิ่มความเข้มสีไข่แดง. **วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์**. 5(4): 112-121.
- Akaneme, F.I., and Eneobong, E.E. 2008. Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. var. *Hondurensis* barr. and golf. II: effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. **African Journal Biotechnology**. 7: 757–765.
- Akbari, F., Mirjalili, M.H., Bakhtiar, Z. and Ahadi, H. 2025. Light-emitting diode enhances the growth and biosynthesis of anticancer lignans in mass shoot culture of *Linum album* Kotschy ex Boiss. (Linaceae). **Industrial Crops & Products**. 227: 120730.
- Alché, J.D.D. 2019. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. **Redox Biology**. 23: 101136.
- Aldi, M., Abbasi, B.H. and Haq, I. 2019. Red light-controlled callus morphogenetic patterns and secondary metabolites production in *Withania somnifera* L. **Biotechnology Reports**. 24: e00380.
- Alsoufi, A.S.M.M., Ahmed, Z.S. and Salim, A.M. 2021. The efficiency of interaction between cytokines and auxins in micropropagation of chrysanthemum plant (*Chrysanthemum indicum* L.). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. 735(1): 012048.
- Alvarenga, I.C.A., Pacheco, F.V., Silva, S.T., Bertolucci, S.K.V. and Pinto, J.E.B.P. 2015. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 122: 299–308.
- Al-Zubaidy, N.A., Ibrahim, M.M. and Musstta, M.A. 2020. The effect of growth regulators and different concentrations of sucrose in callus induction of sugar leaf plant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Stevai rebaudaina* and its content of stevoiside. **Plant Archives**. 20(2): 4492-4496.
- Attaya, A.S. 2021. LED light technology as a source of illumination and a promising method for *Stevia rebaudiana* elite propagation. **Egyptian Journal of Agronomy**. 43: 123-132.
- Bajwa, M.N., Khanum, M., Zaman, G., Ullah, M.A., Farooq, U., Waqas, M., Ahmad, N., Hano, C. and Abbasi, B.H. 2023. Effect of wide-spectrum monochromatic lights on growth, phytochemistry, nutraceuticals, and antioxidant potential of *in Vitro* callus cultures of *Moringa oleifera*. **Molecules**. 28: 1497.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. 99(1): 191-203.
- Bankarat, M.N., Abdel Fattah Rania, S., Badr, M. and El-Torky, M.G. 2010. *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. **African Journal Biotechnology**. 9(8): 1151-1158.
- Bates, L., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**. 39: 205-207.
- Batista, D.S., Felipe, S.H.S., Silva, T.D., de Casto, K.M., Mamedes-Rodrigues, T.C., Mirandd, N.A., Rios-Rios, A.M., Faria, D.V., Fortini, E.A., Chagas, K., Torres-Silva, G., Xavier, A., Arencibia, A.D. and Otoni, W.C. 2018. Light quality in plant tissue culture: does it matter. **In Vitro cellular & Development Biology – Plant**. 54: 195-215.
- Bogges, S.F., Stewart C.R., Aspinall, D. and Peleg, L.G. 1976. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. **Plant Physiology**. 58: 398-401.
- CCA Biochemical Co., Inc. 1998. **User guide of plant growth regulators**. Los Angeles, California. 243.
- Chen, L.L., Zhang, K., Gong, X.C., Wang, H.Y., Gao, Y.H., Wang, X.Q., Zeng, Z.H. and Hu, Y.A. 2019. Effects of different LEDs light spectrum on the growth, leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of potato plantlets *in vitro* and minituber production after transplanting in the greenhouse. **Journal of Integrative Agriculture**. 18(0): 2-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chen, X., Ye, C., Yang, H., Ji, W., Xu, Z., Ye, S., Wang, H., Jin, S., Yu, C. and Zhu, X. 2022. Callogenesis and plant regeneration in peony (*Paeonia* × *suffruticosa*) using flower petal explants. **Horticulturae**. 8(5): 357.
- Cheng, J., Guo, F., Liang, W., Wang, H., Chen, Y. and Dong, P. 2025. Callus culture system from *Lonicera japonica* Thunb anthers: light quality effects on callus quality evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**. 26: 2351.
- Cioć, M., Kalisz, A., Zupnik, M. and Pawłowska, B. 2019. Different LED light intensities and 6-benzyladenine concentrations in relation to shoot development, leaf architecture, and photosynthetic pigments of *Gerbera jamesonii* Bolus *in vitro*. **Agronomy**. 9: 358.
- Cioć, M., Tokarz, K., Dziurka, M. and Pawłowska. 2021. Energy-saving LED light affects the efficiency of the photosynthetic apparatus and carbohydrate content in *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook. f. axillary shoots multiplied *in vitro*. **Biology**. 10: 1035.
- Dar, S.A., Nawchoo, I.A., Tyub, S. and Kamili, A.N. 2021. Effect of plant growth regulators on *in vitro* induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. **Biotechnology Reports**. 32: e00688.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**. 97(4): 654–660.
- Doi, M., Takahashi, H. and Oda, A. 2004. Effects of light intensity on the growth and flowering of chrysanthemum. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. 73(4): 356-362.
- Ebisawa, M., Shoji, K., Kato, M., Shimomura, K., Goto, F. and Yoshihara, T. 2008. Supplementary ultraviolet radiation b together with blue light at night increased quercetin content and flavonol synthase gene expression in leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Environmental Control in Biology**. 46(1): 1-11.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F. and Bekhradnia, A.R. 2008. Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. **African Journal of Biotechnology**. 7(18): 3188-3192.
- Eisa, E.A., Tilly-Mándy, A., Honfi, P., Shala, A.Y. and Gururani, M.A. 2022. Chrysanthemum: a comprehensive review on recent developments on *in vitro* regeneration. **Biology**. 11(12): 1774.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Francis, D. and Sorrell, D.A. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. **Journal Plant Growth Regulation**. 33(1): 1-12.
- Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésón, Ó.S., Palsson, B.Ø. and Brynjólfsson, S. 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 97: 2395–2403.
- George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. 2008. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd edition. Springer Dordrecht.
- George, E.G. and Sherrington, P.D. 1984. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Handbook and Directory of Commercial Laboperations (Basingstoke: Exegetics Ltd.). 709.
- Giménez, M.J., Valverde, J.M., Valero, D., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M. and Castillo, S. 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. **Food Chemistry**. 160: 226–232.
- Gloria, B. 2019. **How to Choose the Best Indoor Lighting for Plants**. [Online] Available: <https://www.hgtv.com/outdoors/flowers-and-plants/houseplants/how-to-choose-the-best-indoor-lighting-for-plants>.
- Hodge, J.E. and Hofreiter, B.T. 1962 . Determination of reducing sugars and carbohydrates; in Whistler R.L. and Wolfrom M.L., eds., **Methods in Carbohydrate Chemistry**, Academic Press, New York.
- Hsaio, T.C. 1973. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**. 24: 519-570.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**. 25(9): 3159–3173.
- Imtiaz, M., Khattak, A.M., Khan, M.A., Jalal, F., Hussain, S., Said, F. and Bo, H. 2019. Rapid in vitro propagation of *Chrysanthemum morifolium* through shoot bud explants. **Pakistan Journal of Botany**. 51(3): 1093–1098.
- Janarthanam, B. and Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. 44(2): 84–89.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jang, E.B., Ho, T.T. and Park, S.Y. 2020. Effect of light quality and tissue origin on phenolic compound accumulation and antioxidant activity in *Camellia japonica* calli. **In Vitro Cellular & Devenlopmental Biology**. 56: 567-577.
- Jeong S.W., Park S., Jin J.S., Seo O.N., Kim G.S., Kim Y.H., Bae H., Lee G., Kim S.T., Lee W.S. and Shin S.C. 2012. Influences of four different light-emitting diode lights on flowering and polyphenol variations in the leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). **Journal of Agricultural and Food chemistry**. 60: 9793-9800.
- Jiang, K. and Asami, T. 2018. Chemical regulators of plant hormones and applications in basic research and agriculture. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 82(8): 1265-1300.
- Johkan, M., Shoji, K., Goto, F., Hashida, S.N. and Yoshihara, T. 2010. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. **HortScience**. 45(12): 1809-1814.
- Johkan, M., Shoji, K., Goto, F., Hashida, S.N. and Yoshihara, T. 2012. Blue and red light affect growth and morphogenesis of cucumber seedlings. **Environmental and Experimental Botany**. 75: 128-133.
- Kaviani, B., Hesar, A.A., Tarang, A., Zanjani, S.B., Hashemabadi, D. and Ansari, M.H. 2013. Effect of kinetin (Kn) and naphthalene acetic acid (NAA) on the micropropagation of *Matthiola incana* using shoot tips, and callus induction and root formation on the leaf explants. **African journal of Agricultural Research**. 8(30): 4134-4139.
- Khan, S.I., Fahima, K., Sadia, A. and Hoque, M.E. 2020. Callus induction and plantlet regeneration in chrysanthemum. **International Journal of Business, Social and Scientific Research**. 8(1): 6-10.
- Khurshid, R., Muhammad, A.U., Tungmunnithum, D., Samantha, D., Shah, M., Zaeem, A., Hameed, S., Christophe, H. and Bilal, H.A. 2020. Lights triggered differential accumulation of antioxidant and antidiabetic secondary metabolites in callus culture of *Eclipta alba* L. **PLoS ONE**. 15(6): e0233963.
- Kim, S.J., Hahn, E.J., Heo, J.W. and Paek, K.Y. 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**. 101: 143-151.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kreslavski, V.D., Lyubimov, V.Y., Shirshikova, G.N., Shmarev, A.N., Kosobryukhov, A.A., Schmitt, F.J., Friedrich, T. and Allakhverdiev, S.I. 2013. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**. 122: 1-6.
- Kumar, A., Singh, N. and Sharma, R. 2020. Light quality and intensity influence growth and secondary metabolites *in vitro* cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 143(1): 1–10.
- Latif, S.M.H., Boonkorkeaw, P., Boonchai, D., Wongchaochant, S. and Thenahom, A.A. 2019. Light quality affects shoot multiplication of *Vanilla pompano* schiede in micropropagation. **The Agricultural Science Society of Thailand**. 52(3): 142-151.
- Lee, S.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2007. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. plantlets. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 90: 141–151.
- Li, K.L., Wei, Y.X., Chong, Z.L., Meng, Z.G., Wang, Y., Liang, C.H., Chen, Q.J. and Zhang, R. 2024. Red and blue light promotes cotton callus induction and proliferation. **Scientia Agricultura Sinica**. 57(4): 638-649.
- Lian, T.T., Moe, M.M., Kim, Y.J. and Bang, K.S. 2015. Effects of different colored LEDs on the enhancement of biologically active ingredients in callus cultures of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. **Molecules**. 24: 4336
- Liao, Y., Suzuki, K., Yu, W., Zhuang, D., Takai, Y., Ogasawara, R., Shimazu, T. and Fukui, H. 2014. Night-break effect of LED light with different wavelengths on floral bud differentiation of *chrysanthemum morifolium* Ramat ‘Jimba’ and ‘Iwa no hakusen’. **Environmental Control in Biology**. 52(1): 45-50.
- Lichtenthaler, H. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**. 148(C): 350–382.
- Lin, K.H. 2020. Application of light-emitting diodes (LEDs) in plant tissue culture. **Biotechnology and Bioengineering**. 17(3): 201-211.
- Lin, Y., Li, J., Li, B., He, T. and Chun, Z. 2011. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. **Pant Cell Tissue and Organ Culture**. 105: 329-335.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- LuEsther, T.M. 2024. **Chrysanthemums: Chrysanthemum Classifications**. [Online] Available: <https://libguides.nybg.org/chrysanthemumform>.
- Massa, G.D., Kim, H.H., Wheeler, R.M. and Mitchell, C.A. 2008. Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience**. 43(7): 1951-1956.
- McCree, K.J. 1972. The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. **Agricultural Meteorology**. 9: 191–216.
- Mick, T. **Types of Grow Lights for Indoor Plants**. [Online] Available: <https://www.hgtv.com/outdoors/flowers-and-plants/houseplants/how-to-choose-the-best-indoor-lighting-for-plants>. 2016.
- Miler, N. and Muszczyk, P. 2015. Regeneration of callus and shoots from the ovules and ovaries of chrysanthemum *in vitro*. **8th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding**. Coimbra, Portugal.
- Miyashita, Y., Kitaya, Y., Kozai, T. and Kimura, T. 1995. Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro*: using light emitting diode as a light source for micropropagation. **Acta Horticulturae**. 393: 189-194
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**. 15(3): 473–497.
- Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Hamidinia, A. and Bekhradnia A.R. 2008. Determination of antioxidant activity, phenol and flavonoids content of *Parrotia persica* Mey. **Pharmacologyonline**. 2: 560-567.
- Nadeem, M., Abbasi, B.H., Younas, M., Ahmad, W., Zahir, A. and Hano, C. 2019. LED-enhanced biosynthesis of biologically active ingredients in callus cultures of *Ocimum basilicum*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. 190: 172-178.
- Nasri, F., Zakizadeh, H., Vafae, Y. and Mozafari, A.A. 2018. Callus induction and plant regeneration of *Chrysanthemum morifolium* and *C. coccineum* via direct and indirect organogenesis and genetic fidelity analysis using IRAP, ISSR and SCoT molecular markers. **Journal of Ornamental Plants**. 8(4): 265–284.
- Naznin, M.T., Lefsrud, M., Gravel, V. and Azed, M.O.K. 2019. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. **Plants**. 8(4): 93.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Nelson, J.A. and Bugbee, B. 2014. Economic analysis of greenhouse lighting: light emitting diodes vs. high intensity discharge fixtures. **PLoS ONE**. 9(6): e99010.
- Nhut, D.T, Takamura, T, Watanabe, H, Okamoto, K. and Tanaka, M. 2003. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 73: 43-52.
- Normasari, R., Arumingtyas, E.L., Retnowati, R. and Widoretno, W. 2023. The combination effect of auxin and cytokinin on callus induction of patchouli (*Pogostemon Cablin* Benth.) from leaf explants. 551–557. **Proceedings of the 3rd International Conference on Biology, Science and Education (IcoBioSE 2021)**, Sumatra, Indonesia.
- Obukosia, S.D., Kimani, E., Waithaka, K., Mutitu, E. and Kimani, P.M. 2005. Effects of growth regulators and genotypes on pyrethrum *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. 41(2): 162–166.
- Olga, V.G., Eugeny, P.S., Irina, V.G., Yulia, V.V., Elena, V.B., Yulia, A.K., Valeria, P.G., Olga, V.N., Victor, P.B. and Yuri, N.K. 2022. Growth of micropropagated *Solanum tuberosum* L. plantlets under artificial solar spectrum and different mono- and polychromatic LED lights. **Horticultural Plant Journal**. 8(2): 205-214.
- Park, S.Y., Lee, H.J. and Paek, K.Y. 2019. Effect of LED light quality on the growth and development of plantlets *in vitro*. **Journal of Plant Biotechnology**. 46(2): 87–92.
- Randall, W.C. and Lopez, R.G. 2015. Comparison of bedding plant seedlings grown under sole-source light-emitting diodes (LEDs) and greenhouse supplemental lighting from LEDs and high-pressure sodium lamps. **HortScience**. 50(5): 705-713.
- Ribeiro, I.G., Gayer, C.R.M., de Castro, T.C., Coelho, M.G.P. and Albarello, N. 2015. Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) under *in vivo* and *in vitro* culture conditions. **Journal of Medicinal Plants Research**. 9(1): 8–15.
- Roh, M.S. and Lawson, R.H. 1988. Influence of light and plant growth regulators on *in vitro* propagation of chrysanthemum. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 14(3): 235-243.

- Ryan, K.G., Swinny, E.E., Markham, K.R. and Winefield, C. 2002. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. **Phytochemistry**. 59(1): 23-32.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review of Plant Biology**. 57: 431-449.
- Saldarriaga, J.F., Cruz, Y. and López, J.E. 2020. Preliminary study of the production of metabolites from *in vitro* cultures of *C. ensiformis*. **BMC Biotechnology**. 20: 49.
- Shahidul, I.K.M., Fahima, K., Sadia, A. and Hoque, M.E. 2020. Callus induction and plantlet regeneration in chrysanthemum. **International Journal of Business, Social and Scientific Research**. 8(1): 6-10.
- Sharma, S., Villarmor, J.G. and Verslues, P.E. 2011. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant Physiology**. 157: 292-304.
- Shin, K.S., Murthy, H.N., Heo, J.W., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2007. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**. 30: 339-343.
- Shohael, A.M., Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J., Islam, R. and Paek, K.Y. 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and ascorbate-glutathione cycle in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. **Process Biochemistry**. 41(5): 1179-1185.
- Simpson, K.L., Tsou, I.S.T.C. and Chichester, C.O. 1989. Biochemical methodology for the assessment of carotene. **The International Vitamin A Consultative Group (IVACG)**.
- Smith, D. 1981. **Removing and analyzing total nonstructural carbohydrates from plant tissue**. Research Division, College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin. Madison. 13.
- Smith, D., Paulsen, G.M. and Raguse, C.A. 1964. Extraction of total available carbohydrates from grass and legume tissue. **Plant Physiology**. 39(6): 960-962.
- Spaargaren, J. and Geest, G.V., Chrysanthemum; in Van Huylenbroeck J., eds., **Ornamental Crops**, Springer, Cham, Switzerland. 2018: 319-348.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sumitomo, K., Higuchi, Y., Aoki, K., Miyamae, H., Oda, A., Ishiwata, M., Yamada, M., Nakayama, M. and Hisamatsu, T. 2012. Spectral sensitivity of flowering and FT-like gene expression in response to night-break like treatments in the chrysanthemum cultivar “Reagan”. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. 87(5): 461-469.
- Swarna, R.J., Yeasmin, D., Rahman, M. and Alam, F. 2016. Callus induction and indirect organogenesis in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **International Journal of Biosciences**. 9(3): 139-149.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2003. **Plant physiology**. Annals of Botany. 91(6): 750–751.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. **Plant Physiology**. 5th Edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Tariq, U., Ali, M. and Abbasi, B.M. 2014. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 130: 264-271.
- Tariq, U., Ali, S. and Mahmood, T. 2020. Light-emitting diodes (LEDs) improve *in vitro* regeneration and phytochemical content of chrysanthemum. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 140(2): 359-368.
- Teixeira da Silva, J.A., Lema-Rumińska, J., Tymoszyk, A. and Kulpa, D. 2015. Regeneration from chrysanthemum flower: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**. 37(2): 36.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**. 26(6): 618-631.
- Tobin, A.K., Pham, M.T. and Lee, E.J. 2021. Oxidative stress responses of *in vitro* plant cultures under high-intensity LED light. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 57(3): 290-299.
- Tymoszyk, A. and Zalewska, M. 2014. *In vitro* adventitious shoots regeneration from ligulate florets in the aspect of application in chrysanthemum breeding. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**. 13(2): 45–58.
- Wang, H., Gu, M., Cui, J., Shi, K., Zhou, Y., Yu, J. and Xia, X. 2009. Effects of light quality on CO₂ assimilation, chlorophyll-fluorescence quenching, expression of Calvin cycle genes and carbohydrate accumulation in *Cucumis sativus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 96(1): 30-37.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wang, H., Zhang, X., Li, Y., Chen, L., Xu, J. and Zhao, M. 2016. Light spectrum affects the antioxidant activity and phenolic contents of callus cultures in tea (*Camellia sinensis* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 124(3): 543–552.
- Wang, Y., Deng, H., Ma, L., Yan, L., Mu, Z., Mu, Y. and Gu, S. 2024. Effect of light quality on the growth and mechanical property of tomato grafted seedlings. **Chiang Mai Journal Science**. 51(2): e2024023.
- Yoosamran, V., Ruamrung, S., Duangkongsan, W. and Seatiew, K. 2018. Induced mutation of *Dendranthemum grandiflora* through tissue culture by Ethyl methanesulphonate (EMS). **International Journal of Agricultural Technology**. 14(1): 73-82.
- Yu, L.L., Song, C.M., Sun, L.J., Li, L.L., Xu, Z.G. and Tang, C.M. 2020. Effects of light-emitting diodes on tissue culture plantlets and seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Integrative Agriculture**. 19(7): 1743-1754.
- Yue, W., Ming, Q.L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.J. and Han, T. 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**. 36(2): 215–232.
- Zalewska, M., Lema-Rumińska, J., Miler, N., Gruszka, M. and Dabal, W. 2010. Induction of adventitious shoot regeneration in chrysanthemum as affected by the season. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. 47: 375-378
- Zhao, J., Thi, L.T., Park, Y.G. and Jeong, B.R. 2020. Light Quality Affects Growth and Physiology of *Carpesium triste* Maxi. **Agriculture**. 10(7): 258.
- Zubova, M.Y., Goncharuk, E.A., Nechaeva, T.L., Aksenova, M.A., Zaitsev, G.P., Katanskaya, V.M., Kazantseva, V.V. and Zagoskina, N.V. 2024. Influence of Primary Light Exposure on the Morphophysiological Characteristics and Phenolic Compounds Accumulation of a Tea Callus Culture (*Camellia sinensis* L.). **International Journal of Molecular Sciences**. 25: 10420.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

1.1.1 การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียม stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยเตรียมส่วนของ Macroelements (MS1-MS5) ให้มีความเข้มข้น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ และส่วนของ Microelements (MS6-MS8) ให้มีความเข้มข้น 100 เท่า ดังตารางด้านล่าง

MS	สารเคมี	ความเข้มข้น (mg/L)	ความเข้มข้นของ stock solution (g/L)	ปริมาตรของ stock solution
Macroelements			(100 เท่า)	
MS1	NH ₄ NO ₃	1,650.00	16.50	100 มิลลิลิตร
MS2	KNO ₃	1,900.00	19.00	100 มิลลิลิตร
MS3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	450.00	4.50	100 มิลลิลิตร
MS4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.00	3.70	100 มิลลิลิตร
MS5	KH ₂ PO ₄	170.00	1.70	100 มิลลิลิตร
Microelements			(10 เท่า)	
MS6	ZnSO ₄ ·5H ₂ O	86.00	8.60	10 มิลลิลิตร
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30	2.23	
	H ₃ BO ₃	6.20	0.62	
	KI	0.83	0.083	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.025	
	cuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0025	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0025	
Microelements			(10 เท่า)	10 มิลลิลิตร
MS7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.30	3.73	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	2.785	
Organic nutrients			(10 เท่า)	10 มิลลิลิตร
MS8	Myo-inositol	100.00	10.00	
	Nicotinic acid	0.50	0.05	
	Pyridoxine·HCl	0.50	0.05	
	Thiamine·HCl	0.10	0.01	
	Glycine	2.00	0.20	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเพื่อใช้วัดปริมาณฟีนอลิก

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 mg/ml ทำโดยละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) นำไปชั่งที่ 0.056 g ละลายในเอทานอล 10 ml เติมน้ำในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml และปรับปริมาตรสารละลายด้วยเอทานอลจนครบ 100 ml การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้น 0.075, 0.05, 0.025 และ 0.0125 mg/ml โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 mg/ml มา 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 และ 0.25 ml ใส่ลงในหลอดฟอลคอนขนาด 15 ml แล้ว ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 ml

1.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

นำกลั่น 4.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 ml จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน 5 วินาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % w/v ปริมาตร 4 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

เมื่อสมการ

$$Y = A * X + B \quad A=10.904 \quad B= 0.0307$$

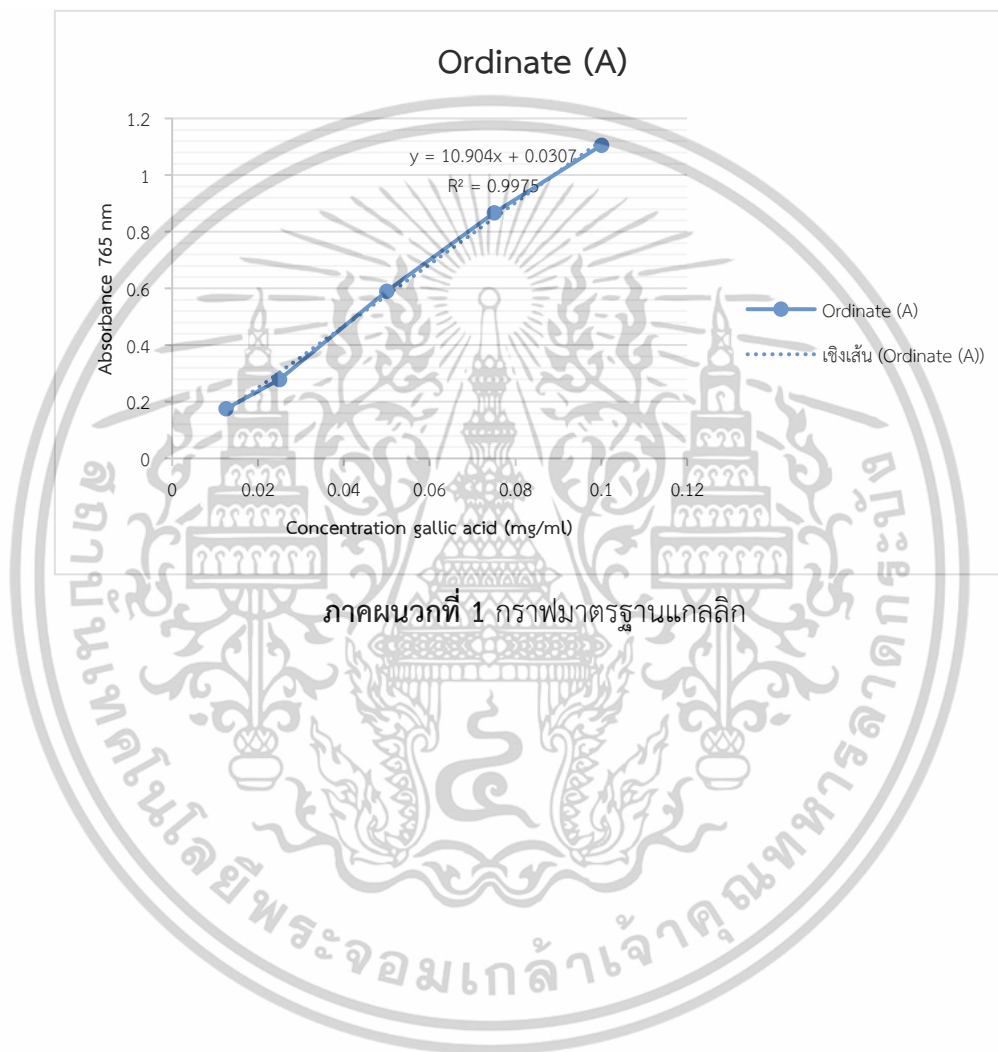
$$\text{แทนสมการได้ดังนี้ } y = 10.904x + 0.0307 \quad (R^2 = 0.9975)$$

หมายเหตุ เมื่อค่า Y= ความเข้มข้นของสาร (mg/L)

ค่า X = ค่าดูดกลืนแสง (Abs)

ดังแสดงในภาพผนวกที่ 1

Concentration	Ordinate (A)
0.0125	0.175
0.025	0.278
0.05	0.590333
0.075	0.867333
0.1	1.105



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การเตรียม reagent สำหรับวิเคราะห์ TNC และ RS

1.3.1 Nelson's reagent A

เตรียม anhydrous sodium carbonate (Na_2CO_3) 25 g ผสมกับ sodium potassium tartrate 25 g ผสมกับ sodium bicarbonate (NaHCO_3) 25 g และ anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) 200 g ผสมกับน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 l

1.3.2 Nelson's reagent B

เตรียม copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 15 g ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 หยด คนให้ละลาย (ขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้ดูดควัน)

1.3.3 Nelson's alkaline copper reagent

ผสม Nelson's reagent A ปริมาตร 20 ml กับ Nelson's reagent B 0.8 ml จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน ช้อนแนะนำ เมื่อผสมแต่ละครั้งควรใช้ทันทีและเตรียมให้พอดี

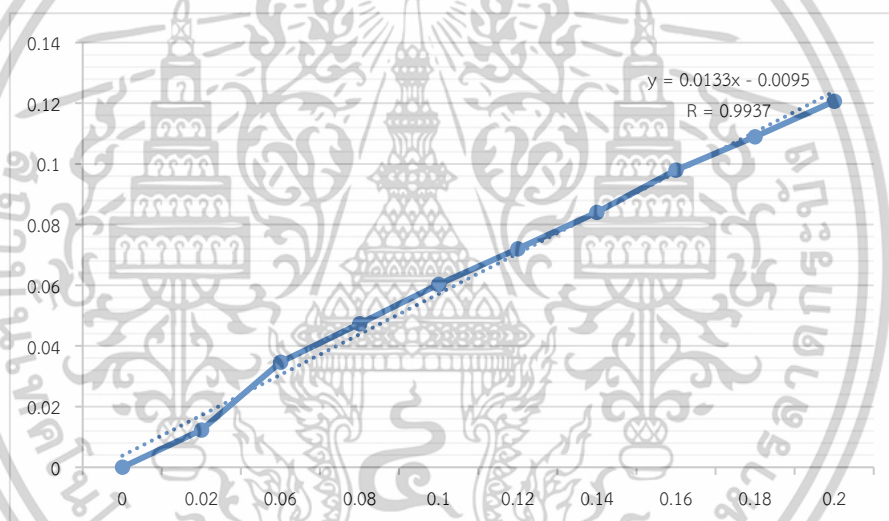
1.3.4 Arsenomolybolic acid reagent

เตรียม ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 25 g ละลายในน้ำกลั่น 450 ml เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 ml และเตรียม sodium dehydroarsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 g ผสมกับน้ำกลั่น 25 ml นำทั้งหมดมาผสมกันและเก็บไว้ในขวดสีชา สารละลายที่ได้ต้องมีสีเหลืองและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ก่อนนำไปใช้

1.3.5 การทำกราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น

โดยการเปรียบเทียบเป็นปริมาณน้ำตาล (mg D-glucose) ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 และ 0.20 mg/ml โดยใช้ความสัมพันธ์ของความเข้มข้น glucose (แกน y) กับค่า absorbance (แกน x) ได้หน่วยเป็น มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้งของพืช (mg D-glucose/DW)

Concentration (mg/l)	ค่า AB
0	0
0.02	0.012333
0.06	0.034667
0.08	0.047333
0.1	0.060333
0.12	0.072
0.14	0.084
0.16	0.098
0.18	0.109
0.2	0.120667



ภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานด้วยสารละลายกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	สรวิศ บุญประสพ
วัน เดือน ปีเกิด	19 มีนาคม 2541
ที่อยู่ปัจจุบัน	244 หมู่ที่ 1 ตำบลวังเย็น อำเภอเมืองกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี 71000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2563 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10520
ทุนที่ได้รับการศึกษา	ระดับปริญญาตรี ทุนการศึกษาโครงการบัณฑิตคืนถิ่น ในพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ระดับปริญญาโท ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียบการศึกษา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานวิจัย	Boonprasop, S., Saetiew, K. and Teeralak, M. (2024). Induction of calluses from petal of three chrysanthemum cultivars in vitro. <i>Acta Hortic.</i> 1404, 347-354
ประสบการณ์การทำงาน	พ.ศ. 2563 ผู้ช่วยนักวิจัย โครงการขึ้นทะเบียนพันธุ์เบญจมาศที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยสารเคมี พ.ศ. 2564-2566 ผู้ช่วยนักวิจัย โครงการการควบคุมระบบแสงจากหลอด LED ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและปริมาณสารประกอบทางเคมีของเบญจมาศในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้