ผลของไคโตซานและไธไดอะซูรอนในการเพาะเลี้ยงข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อสร้างสารสำคัญทางโภชนาการ

Effects of chitosan and thidiazuron on tissue culture of Khao Dawk Mali 105 rice for enhancement of nutritious substances

รงรอง หอมหวล[1*] สุลักษณ์ แจ่มจำรัส[1] มณฑา วงศ์มณีโรจน์[1] รัตนา เอการัมย์[1] พีรพงษ์ แสงวนางค์กูล[3] ชูศักดิ์ คุณุไทย[3] และ สนธิชัย จันทร์เปรม[2]

Rongrong Homhual[1] Surak Jamjumrus[1] Monthar Wongmaneeroj[1] Rattana Agarum[1] Peerapong Sangwanangkul[3] Choosak Kunuthai[3] and Sontichai Chanprame[2]

Abstract

The shoots of 3 weeks old *in vitro* grown seedlings of Khao Dawk Mali 105 were cut into 0.3 cm long and transferred to the MS medium containing thidiazuron (TDZ) at the concentrations of 0, 1, 2 and 3 mg/l incorporated with 0, 10, 20 and 30 mg/l of chitosan. After 2 months the highest average number of tillers per plant of 8.83 was found in the MS medium containing 2 mg/l TDZ and 20 mg/l chitosan. To improve the tillering ability, seedlings derived from seeds soaked in 1 mg/l chitosan for 1 hr and non-soaked seeds were cultured on MS basal salts medium containing 2 mg/l TDZ in combination with various concentrations of chitosan at 0, 5, 10, 15 and 20 mg/l for 1 month. It was found that the shoots derived from chitosan-soaked seeds were better proliferated than shoots derived from chitosan-unsoaked seeds, espectially, on MS containing 2 mg/l TDZ and 5 mg/l chitosan (11.14 plants/seed). Each plant was multiplied by subculturing to the same medium for 3 months and analyzed for antioxidant capacity. Total antioxidant capacity (TAC) was detected using Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay, chlorophyll a and b were also analysed.The results indicated that the plantlets derived from chitosan-soaked seeds and cultured on MS medium with 5-15 mg/l chitosan showed more total antioxidant capacity, chlorophyll a and b than those of unsoaked seeds and cultured on MS chitosan free medium.

Keywords: shoot tip, rice, antioxidant, chlorophyll, tissue culture, chitosan, growth regulator

---

[1]ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง คณะเกษตร กำแพงแสน ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Central Laboratory and Greenhouse Complex, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ภาควิชาพืชไร่-นา คณะเกษตร กำแพงแสน ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 73140

Department of Agronomy, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University , Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, 73140

[3]ศูนย์เทคโนโลยีพืชผลหลังเก็บเกี่ยว คณะเกษตร กำแพงแสน ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Postharvest Technology Center, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University , Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, 73140

รับเรื่อง : สิงหาคม 2557

* Corresponding author : rdirov@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยตัดยอดต้นกล้าข้าวที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อยาวประมาณ 0.3 ซม.ย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดดีที่สุดคือ สูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล.และ ไคโตซาน 20 มก./ล. (8.83 ยอด/เมล็ด) จากนั้นเพิ่มประสิทธิภาพการแตกกอของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยนำต้นกล้าที่มาจากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ในไคโตซานเข้มข้น 1 มก./ล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดที่แช่ไคโตซาน มีการแตกกอดีกว่าต้นกล้าจากเมล็ดที่ไม่แช่ไคโตซานโดยเฉพาะในสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับสารไคโตซาน 5 มก./ล. (11.14 ยอด/เมล็ด) การวิเคราะห์สารสำคัญทางโภชนาการทำโดยเพิ่มปริมาณต้นกล้าข้าวที่ได้จากแต่ละการทดลองในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 3 เดือน เพื่อนำต้นกล้าไปวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity ,TAC) โดยวิธี The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ บี โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ค่า absorbance ที่ A663 และ A646 พบว่า ต้นกล้าจากเมล็ดที่แช่ในไคโตซานและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับสารไคโตซานความเข้มข้นตั้งแต่ 5-15 มก./ล. มีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ คลอโรฟิลล์เอและบี มากกว่าต้นกล้าจากเมล็ดที่ไม่แช่และไม่ได้เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญ

คำนำ

ปัจจุบันนี้ประชาชนให้ความสนใจในเรื่องการดูแลสุขภาพเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะการบริโภคอาหารที่เน้นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ เช่น การบริโภคธัญพืชที่เสริมวิตามิน เกลือแร่ รวมไปถึงผลิตภัณฑ์จากธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และ ข้าวขาวดอกมะลิ105 เป็นต้น และเนื่องจากกระแสความต้องการของผู้บริโภคที่เน้นอาหารสุขภาพเพื่อดูแลร่างกายให้แข็งแรง อายุยืนยาว การบริโภคอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ จึงมีความต้องการเพิ่มสูงขึ้น ตามที่ทราบแล้วว่าข้าวขาวดอกมะลิ เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศ หากมีการเพิ่มมูลค่าของข้าวขาวดอกมะลิโดยเน้นการเป็นอาหารสุขภาพ เช่น การใช้ต้นกล้ามาผลิตเป็นเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ ตามกระแสความนิยมของผู้บริโภคจะทำรายได้ให้กับประเทศเพิ่มมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากส่งเมล็ดข้าวไปขายต่างประเทศ หากมีการพัฒนาเทคนิคการผลิต เพื่อให้ต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 สร้างสารสำคัญทางโภชนาการเพิ่มขึ้นจะมีความสำคัญในการผลิตต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสุขภาพโดยสามารถเพิ่มมูลค่าข้าวและผลิตภัณฑ์จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้มากขึ้น

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการสร้างสารสำคัญทางโภชนาการเป็นวิธีหนึ่งที่เป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ หรือสร้างสารสำคัญทางโภชนาการซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง เช่น สูตรอาหารเหมาะสม การใช้สารไคโตซาน แสง อุตร้าไวโอเลต (UV) และรังสี เป็นต้น จากรายงานของ Chandrkrachang (2002) กล่าวว่า สารไคโตซานเป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติและเป็นอนุพันธุ์ของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลของไคติน สกัดได้จากเปลือกกุ้ง กระดองปู แมลง ผนังเซลล์ของเชื้อรา และแกนหมึก มีบทบาทสำคัญทางการเกษตรหลายด้าน เช่น กระตุ้นการเจริญเติบโตของราก ยอดของพืชหลายชนิด เช่น ในกล้วยไม้มีการฉีดพ่นสารไคโตซานที่ราก พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต และการออกดอก (Wikitkankosol

and Thammasiri, 1992; Limpanavech *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไคโตซานเร่งการเจริญเติบโตของไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด เช่น กระตุ้นการสร้างคลอโรฟิลล์ทำให้ใบพืชมีสีเขียว พืชแข็งแรง โตไว เช่น ในอโกลนีมา (Homhual *et al.*, 2013) หรือบิโกเนีย กล็อกซิเนีย แววมยุรา ทำให้ออกดอกเร็วกว่าต้นที่ไม่ได้รับไคโตซาน (Ohta *et al.*, 2004) รวมทั้งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สร้างภูมิต้านทานให้กับพืช (Allan and Hadwiger, 1979) โดยกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในพืชแสดงออกมากขึ้น และมีการสร้างสารลิกนินเพื่อช่วยลดการทำลายของเชื้อ *Colletotrichum* ในพริกพันธุ์จินดา (Photchanachai *et al.*, 2006)

จากคุณสมบัติของไคโตซาน ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช การสร้างความแข็งแรง ทำให้พืชมีสีเขียวเพิ่มขึ้น อาจมีผลต่อการสร้างสารสำคัญทางโภชนาการเช่น คลอโรฟิลล์ วิตามิน เกลือแร่ ในพืชมากขึ้น การใช้ไคโตซานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่จะช่วยให้การเพาะเลี้ยงข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อให้ได้ต้นกล้าที่มีการสร้างสารสำคัญทางโภชนาการเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้ไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตไธไดอะซูรอน ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตทางต้น ใบ และการแตกกอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และส่งผลต่อการสร้างคลอโรฟิลล์ หรือสารต้านอนุมูลอิสระในต้นกล้า เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัยด้านพัฒนาคุณลักษณะของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นอาหารสุขภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ผลของ TDZ และไคโตซานที่มีต่อการแตกกอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร MS (1962) มาตัดรากออกและตัดยอดออกให้เหลือส่วนโคนยาวประมาณ 0.3 ซม. นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี TDZ ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 (บริษัท โอลิแซ็ก เทคโนโลยี จำกัด) ความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก./ล. เติมน้ำตาล 30 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีการทดลองทั้งหมด 16 สูตรอาหาร ทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ยอด โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 °ซ ให้แสงประมาณ 45 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ระยะเวลาให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อศึกษาจำนวนต้นการแตกกอ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ประสิทธิภาพการแตกกอของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ในไคโตซานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต

นำต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่งอกจากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1 มก./ล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเพาะในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร MS (1962) มาตัดรากออกและตัดลำต้นให้มีความสูงประมาณ 1 ซม. นำโคนต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรทดลองที่คัดเลือกจากการทดลองแรกแต่ปรับความเข้มข้นสารไคโตซานลดลงเป็น 0 5 10 15 และ 20 มก./ล. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการแตกกอของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ในไคโตซาน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 °ซ แสงประมาณ 45 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ระยะเวลาให้แสง10 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อศึกษาจำนวนต้นการแตกกอ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

การผลิตต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ105 จำนวนมากเพื่อการวิเคราะห์สารสำคัญทางโภชนาการ

นำกอต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล.ร่วมกับสารไคโตซาน 0 5 10 15 และ 20 มก./ล. มาเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นโดยตัดแบ่งแต่ละกอให้เหลือ 3 ต้น และตัดใบออกให้มีความสูงจากโคนขึ้นมาประมาณ 1 ซม. แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมดังกล่าวข้างต้น โดยตัดแบ่งแยกกอทุก 14 วัน เพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 3 เดือน ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 °ซ ให้เข้มแสงประมาณ 45 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ระยะเวลาให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อได้ปริมาณต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิมากพอแล้ว จึงนำมาวิเคราะห์สารสำคัญทางโภชนาการ

การวิเคราะห์สารสำคัญทางโภชนาการ

นำต้นกล้าที่มีอายุระหว่าง 14-20 วันจากทุกสูตรอาหารมาตัดส่วนของลำต้นรวมทั้งใบ น้ำหนักประมาณ 40-50 กรัม และคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นธัญพืช แล้ววิเคราะห์ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity ,TAC) โดยใช้วิธี The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay (Benzie and Strain,1996) และวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ เอ บี โดยใช้เครื่อง spectro photometer ที่ค่า absorbance ที่ A663 และ A646 (chlorophyll a=12.21(A_{663})– 2.81(A_{646}), chlorophyll b=20.13(A_{646})-5.03(A_{663})) ที่ศูนย์เทคโนโลยีพืชผลหลังเก็บเกี่ยว ม.เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลและวิจารณ์

ผลของ TDZ และไคโตซานที่มีต่อการแตกกอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ

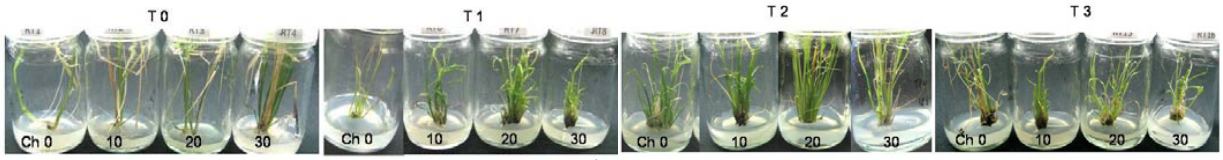
เมื่อย้ายยอดปลอดเชื้อของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ขนาด 0.3 ซม. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS มาเพาะเลี้ยงในอาหารทดลองสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ในอาหารทุกสูตรยอดของข้าวหอมมะลิ 105 มีการยืดตัวและแตกกอเพิ่ม เกิดเป็นกระจุกต้นกล้าเล็ก ๆ สามารถแตกกอได้เฉลี่ยตั้งแต่ 1.16-8.83 ต้น/กอ โดยสูตรอาหารที่มี TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 20 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.83 ต้น/กอ (ตารางที่1)

อาหารสูตร MS ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 10 20 และ 30 มก./ล. โดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้ข้าวมีลำต้นใหญ่ ยืดปล้อง แต่มีการแตกกอน้อยเฉลี่ยตั้งแต่ 1.16-2.5 ต้น/กอ การใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 1-2 มก./ล. สามารถชักนำให้กล้าข้าวขาวดอกมะลิ เกิดการแตกกอเพิ่มมากขึ้น ซึ่ง Thomas and Katterman (1986) กล่าวว่า เนื่องจาก TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพสูงในกลุ่ม cytokinin ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ในแคลลัสถั่วเหลือง และชักนำให้เกิดยอดในยาสูบ และ TDZ ยังมีประสิทธิภาพสูงกว่า BAP และ kinetin ในการชักนำให้เกิดยอดจากกลีบดอกของคาร์เนชั่น (Lu, 1993) มีงานทดลองการใช้ TDZ ในการกระตุ้นการเกิดยอดจำนวนมาก ในไม้เนื้อแข็งหลายชนิดที่ประสบความสำเร็จ เช่น แอปเปิล (Van Nieuwkerk *et al.*,1986) แพร์ (Singha and Bhatia,1988) พีท (Zimmerman and Scorza,1992) เมื่อนำ TDZ มาใช้ร่วมกับไคโตซาน โดยเฉพาะความเข้มข้น 10 และ 20 มก./ล. มีแนวโน้มชักนำให้ต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีสีเขียวเข้ม แข็งแรง และแตกกอเพิ่มขึ้นกว่าการใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว น่าจะเป็นผลมาจากไคโตซานช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ การสังเคราะห์แสงโดยเฉพาะการสร้างคลอโรฟิลล์ในใบข้าวซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Homhual *et al.* (2013) กล่าวว่า ไคโตซานเร่งการเจริญเติบโตของต้นอโกลนีมาทำให้ใบมีสีเขียว แข็งแรง โตไว และไคโตซานความเข้มข้น 10-15 มก./ล สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตสร้างใบใหม่หรือโปรโตคอร์มได้มากขึ้น ในกล้วยไม้ (Chandrkrachang,2002; Nge *et al.*,2006) สำหรับงานทดลองนี้เมื่อเพิ่มไคโตซานเป็น 30 มก./ล. ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลับทำให้ต้นข้าวเหี่ยวเฉา และการแตกกอลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2 เดือน (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนต้นเฉลี่ยต่อกอของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน

ไคโตซาน	**จำนวนต้นเฉลี่ย (ต้น)**			
(มก./ล.)	0	10	20	30
TDZ (มก./ล)				
0	1.16±0.28^{d}	1.60±0.57^{b}	2.16±0.28^{b}	2.50±0.50^{b}
1	4.16±0.28^{c}	6.33±1.52^{a}	7.33±1.15^{a}	4.83±1.00^{a}
2	7.00±0.00^{a}	6.50±0.50^{a}	8.83±1.00^{a}	5.00±0.00^{a}
3	5.16±0.28^{b}	6.33±0.57^{a}	7.50±0.50^{a}	5.66±0.57^{a}

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ วิเคราะห์โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 1 การแตกกอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 0 10 20 และ 30 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน

ประสิทธิภาพการแตกกอของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ในไคโตซานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต

เมื่อนำโคนของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ไคโตซาน มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่คัดเลือกไว้คือ MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซานที่ลดความเข้มข้นเป็น 0 5 10 15 และ 20 มก./ล. พบว่า ต้นกล้าที่มาจากเมล็ดที่ไม่แช่สารไคโตซานในอาหารทดลองทุกสูตรมีการเกิดยอดเฉลี่ย ตั้งแต่ 3.46-4.50 ต้น/เมล็ด และพบว่าการใช้ TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 20 มก./ล. มีจำนวนต้นที่แตกกอเฉลี่ยน้อยกว่าการใช้ไคโตซาน 15 มก./ล. ซึ่งแตกกอเร็วกว่าให้ต้นเฉลี่ยสูงสุด 4.50 ต้น/เมล็ด ภายในเวลา 1 เดือนเท่ากัน (ตารางที่ 2) ซึ่งต่างจากผลการทดลองที่ 1 สันนิษฐานว่าความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการแตกกอของกล้าข้าวขาวดอกมะลิในเวลา 1 เดือนน่าจะอยู่ที่ความเข้มข้น 15 มก./ล.และคาดว่าเมื่อเพาะเลี้ยงต้นต่อไปจนครบ 2 เดือนในอาหารที่มีไคโตซานร่วมกับ TDZ จะสามารถแตกกอเพิ่มขึ้น

สำหรับการแตกกอของต้นกล้าที่มาจากเมล็ดที่แช่ไคโตซาน 1 มก./ล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอาหารสูตรทดลองเดียวกันทุกสูตรมีความแตกต่างกันทางสถิติโดยมีจำนวนต้นเฉลี่ยตั้งแต่ 8.26-11.14 ต้น/เมล็ด สูตรที่มีการแตกกอดีที่สุดคือ สูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 มก./ล. และสารไคโตซาน 5 มก./ล. เกิดจำนวนต้นเฉลี่ย 11.14 ต้น/เมล็ด (ตารางที่ 2) ลักษณะของต้นกล้าจากเมล็ดที่แช่ไคโตซานมีสีเขียวเข้มและแตกกอได้เร็วกว่าต้นกล้าจากเมล็ดที่ไม่แช่ไคโตซานเนื่องจากไคโตซานที่สะสมอยู่ในเมล็ดร่วมกับ TDZ ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต การแตกกอของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อเปรียบเทียบจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 เดือนเท่ากัน

ในกรณีของต้นกล้าจากเมล็ดที่ไม่แช่สารไคโตซาน พบว่ามีแนวโน้มการแตกกอได้ดีในอาหารที่มีสารไคโตซาน 15 มก./ล.ในขณะที่ต้นกล้าจากเมล็ดที่แช่สารไคโตซานจะแตกกอได้ดี ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารไคโตซานต่ำลงคือ 5 มก./ล หรือที่ไม่ใช้ไคโตซานเลย สามารถกล่าวได้ว่า การแช่เมล็ดในสารไคโตซานร่วมกับการเพาะเลี้ยง

ในอาหารที่มีสารไคโตซานจะมีผลกระตุ้นการแตกกอได้ดี เมื่อใช้สารไคโตซานในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุจากการสะสมสารไคโตซานในเนื้อเยื่อที่พัฒนาจากเมล็ดอยู่ในปริมาณหนึ่งแล้ว เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารที่มีสารไคโตซานทำให้ใช้ความเข้มข้นไคโตซานในปริมาณน้อยลงก็มีผลต่อการกระตุ้นการแตกกอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้ ซึ่งมีงานทดลองที่คล้ายกันในการใช้ไคโตซานความเข้มข้นต่ำแช่เมล็ดรายงานโดย Wanich pongpan (2002) กล่าวว่าสารละลายของไคโตซานและน้ำที่อัตรา1:1000(1มก./ล) มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เมล็ดพันธุ์พืช 30 ชนิดในถาดเพาะเมล็ดพันธุ์ งอกสูงกว่าการใช้ไคโตซานในอัตราส่วนอื่น (0:1000 0.5:1000 1:2000) และระยะเวลาที่ใช้ในการงอกก็ลดลงเมื่อเทียบกับสภาพควบคุม

นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้สารไคโตซานความเข้มข้นไม่เกิน 15-20 มก./ล.กับพืชอื่นๆ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ได้ต้นกล้ามีสีเขียว แข็งแรง ออกรากดี และเพิ่มผลผลิต เช่น ไม้ดอก *Eustoma grandiflorum (Raf.)* Shinn 'Kairyou Wakamurasaki' (Ohta *et al*., 2000) บีโกเนีย (*Begonia hiemalis* Fotsch) (Ohta e*t al*., 2004) กล้วยไม้ (Pornpienpakdee *et al*., 2010 ; Yaemrakchat and Thammasiri, 2009) *D. phalaenopsis* (Nge *et al*., 2006) รวมทั้งส่งเสริมการออกดอกของ *Dendrobium* Eiskul ที่ปลูกในแปลงปลูก ทำให้ต้นกล้วยไม้มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่ และออกดอกเร็วกว่าต้นที่ไม่ได้รับไคโตซาน (Limpanavech *et al*., 2008) ไม้ประดับอโกลนีมา (Homhual *et al*., 2013) พืชเศรษฐกิจ เช่น ปาล์มน้ำมัน (Kanchanapoom *et al*., 2010) และ ข้าว โดยพ่นสารไคโตซานความเข้มข้น 10-15 ppm ในนาข้าวทำให้ผลผลิตข้าวมีปริมาณเพิ่มขึ้น 41.7 – 91.5% (Chandrkra chang, 2002)

การที่พืชมีการเจริญเติบโตดี แข็งแรง มีใบสีเขียวเข้ม น่าจะเนื่องจากไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8.7 เปอร์เซ็นต์ (Suzuki และ Shinshi, 1998) และมีบทบาทช่วยกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ไปมีผลต่อการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโต จำพวกออกซิน จิบเบอเรลลิน (Yin *et al*., 2006) และการสร้างคลอโรฟิลเพิ่มขึ้น (Homhual *et al*., 2013; Limpanavech *et al*., 2008; Kietsnontapat and Aroonrungsikul, 2008) ตลอดจนกระตุ้นการทำงานของเอมไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ที่พืชสร้างขึ้นเมื่อเกิดบาดแผลหรือเกิดสารสีน้ำตาลในกระบวนการสร้างสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) รวมถึงกระตุ้นให้พืชสร้างระบบกลไกการป้องกันตนเอง (Vander *et al.*1998) นอกจากนี้ไคโตซานช่วยเพิ่มการงอกของเมล็ด (Wanichpongpan, 2002) และสร้างสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งพบในใบโหระพา (Kim *et al*., 2005)

ตารางที่ 2 การแตกกอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดที่ไม่แช่และแช่สารไคโตซาน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 0 5 10 15 และ 20 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	จำนวนต้นเฉลี่ย (ต้น)	
	เมล็ดที่ไม่แช่ไคโตซาน	เมล็ดที่แช่ไคโตซาน
MS+ TDZ 2 มก./ล.	3.70±0.04^{b}	10.36±2.43^{a,b}
MS+ TDZ 2 มก./ล.+ไคโตซาน 5 มก./ล.	3.64±0.33^{b}	11.14±1.32^{a}
MS+ TDZ 2 มก./ล.+ไคโตซาน 10 มก./ล.	3.46±0.37^{b}	9.47±1.86^{b}
MS+ TDZ 2 มก./ล.+ไคโตซาน 15 มก./ล.	4.50±0.52^{a}	9.24±2.09^{b}
MS+ TDZ 2 มก./ล.+ไคโตซาน 20 มก./ล.	3.54±0.09^{b}	8.26±1.18^{c}

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ วิเคราะห์โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การผลิตต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อวิเคราะห์สารสำคัญทางโภชนาการ

เมื่อนำกอต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากเมล็ดที่แช่และไม่แช่สารไคโตซาน เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล.ร่วมกับสารไคโตซาน 0 5 10 15 และ 20 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การแตกกอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทั้งจากเมล็ดที่แช่และไม่แช่สารไคโตซาน ยังไม่เพียงพอต่อการนำใบมาสกัดเป็นน้ำคั้นได้ จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณโดยตัดแบ่งเป็นกระจุกๆ ละ 3 ต้น เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 3 เดือนโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 14 วัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้าให้มากขึ้น การแตกกอได้ต้นใหม่เพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 3 เท่า จึงตัดลำต้นและใบที่มีช่วงอายุระหว่าง 14-20 วันหลังการเปลี่ยนอาหาร มาคั้นน้ำจากใบข้าวไปวิเคราะห์สารสำคัญทางโภชนาการ

การวิเคราะห์สารสำคัญทางโภชนาการ

จากการวิเคราะห์สาระสำคัญทางโภชนาการ ในน้ำคั้นจากใบข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่งอกจากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ไคโตซานและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ตามตารางที่ 2 พบว่า การใช้ไคโตซานแช่เมล็ดก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ มีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ คลอโรฟิลล์ เอ และ บี ได้สูงกว่าต้นกล้าที่มาจากเมล็ดที่ไม่แช่สารไคโตซาน อย่างไรก็ตามจากการทดลอง พบว่า การเติมสารไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 5 มก./ล. ในอาหารมีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant activity :TAC) ในน้ำคั้นใบข้าวขาวดอกมะลิ 105 สูงสุด ทั้งในเมล็ดที่แช่ (35.71 mmol/l) และไม่แช่ไคโตซาน (36.31 mmol/l) (ตารางที่ 3) การวัดค่า TAC เป็นการวัดความสามารถโดยรวมของตัวอย่างน้ำคั้นจากใบข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยไม่คำนึงถึงชนิดและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิด ค่า TAC แสดงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง ที่ใกล้เคียงความเป็นจริง (Wang *et al*.,1996)

นอกจากไคโตซานมีบทบาทสำคัญ ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต การแตกกอของต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้ว ยังพบว่าการแช่เมล็ดในไคโตซานก่อนเพาะเลี้ยงส่งผลกระตุ้นให้ต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 สร้างปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าเมล็ดที่ไม่แช่ไคโตซาน จากรายงาน Tumwong (2008) กล่าวว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืชผักเขียวเข้ม ผลไม้ และสมุนไพร ประกอบด้วย วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน สารประกอบฟีโนลิกส์ (phenolic compounds) และอื่นๆ ฯลฯ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีประโยชน์ต่อสุขภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ที่เป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงหลายชนิด เช่น มะเร็ง หัวใจ ความเครียด สิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ฯลฯ

ในส่วนของการสร้างสารคลอโรฟิลล์ เอและบี เมื่อพิจารณาน้ำคั้นจากต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่แช่สารไคโตซานพบว่า มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และบี สูงในอาหารที่มีไคโตซานความเข้มข้น 10 มก./ล. ในขณะที่น้ำคั้นจากต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่ไม่แช่ไคโตซาน จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และบี สูงในอาหารที่มีสารไคโตซาน 15 มก./ล. จึงสามารถกล่าวได้ว่า การเติมสารไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10-15 มก./ล. ในอาหารมีแนวโน้มกระตุ้นการสร้างสารคลอโรฟิลล์ เอและบี ซึ่งคลอโรฟิลล์ เอและบี เป็นรงควัตถุ ที่พบในใบพืชสีเขียว ทำหน้าที่สังเคราะห์แสง คลอโรฟิลล์ เอ และบี มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน ต่างกันที่คลอโรฟิลล์ เอ มีหมู่เมททิล(-CH3) ส่วนคลอโรฟิลล์ บี เป็นหมู่อัลดีไฮด์ (-CHO) เกาะที่ตำแหน่ง side chain นอกจากนี้ คลอโรฟิลล์ เอ จะสะท้อนแสงในช่วงความยาวคลื่น 685 นาโนเมตร ทำให้มีสีน้ำเงินถึงเขียว ส่วนคลอโรฟิลล์ บี สะท้อนแสงในช่วงความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร ทำให้มีสีเหลืองถึงเขียว คลอโรฟิลล์จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง มีความสำคัญต่อสุขภาพในการช่วยต้านมะเร็ง บำรุงเลือด การล้างพิษในระบบทางเดินอาหาร แล้วยังสามารถช่วยบำรุงสุขภาพเหงือกและฟัน สมานแผลให้หายเร็วขึ้นอีกด้วย (Panprasong, 2012)

จากการทดลองสามารถกล่าวได้ว่า การเติมไคโตซานในอาหารควรใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่าง 5-15 มก./ล. มีแนวโน้มสนับสนุนการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ คลอโรฟิลล์ เอ และบี ในข้าวขาวดอกมะลิ

105 สอดคล้องกับรายงานของ Kietsnontapat and Aroonrungsikul (2008) กล่าวว่า การใช้สารไคโตซานความเข้มข้น 10 มก./ล. แช่เมล็ดข้าวสาลีพันธุ์อินทรี 1 และคลุกในวัสดุปลูกโดยใช้ความเข้มข้น 50 มก./ล. โดยใช้อัตราส่วนสารไคโตซาน 1 ลิตรต่อการคลุกวัสดุปลูกที่มีส่วนผสม ดิน:ขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1:3 ใส่ในกระบะเพาะหนาประมาณ 1.5 นิ้ว พบว่า น้ำคั้นใบข้าวที่ได้มีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณวิตามินซี คลอโรฟิลล์ และปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้

ตารางที่ 3 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ คลอโรฟิลล์ เอ และ บี จากน้ำคั้นต้นกล้าข้าวหอมมะลิ 105 จากต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดที่แช่และไม่แช่สารไคโตซาน และเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 0 5 10 15 และ 20 มก./ล.

สูตรอาหาร	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ TAC mM/L*		Chlorophyll a		Chlorophyll b	
	แช่ไคโตซาน	ไม่แช่ไคโตซาน	แช่ไคโตซาน	ไม่แช่ไคโตซาน	แช่ไคโตซาน	ไม่แช่ไคโตซาน
MS	-	22.79±0.11^{c}	-	118.55±0.98^{d}	-	41.47±0.53^{c}
2 mg/l TDZ	28.03±0.27^{b}	21.10±0.01^{cd}	153.70±1.08^{b}	121.79±0.21^{d}	63.29±0.36^{a}	47.53±0.35^{b}
2 mg/l TDZ+ 5 mg/l chitosan	35.71±0.31^{a}	36.31±0.00^{a}	126.51±0.54^{c}	110.74±0.30^{e}	41.45±0.17^{c}	38.40±0.14^{c}
2 mg/l TDZ+ 10 mg/l chitosan	25.37±0.04^{bc}	21.54±0.05^{cd}	164.66±0.62^{a}	144.80±1.05^{b}	58.28±0.39^{a}	53.84±0.64^{a}
2 mg/l TDZ+ 15 mg/l chitosan	34.55±0.11^{a}	19.56±0.24^{d}	133.69±0.08^{c}	157.07±1.23^{a}	44.81±0.03^{bc}	55.36±0.08^{a}
2 mg/l TDZ+ 20 mg/l chitosan	23.42±0.02^{c}	31.68±0.56^{b}	145.67±0.16^{b}	135.37±0.74^{c}	49.20±0.07^{b}	48.70±0.49^{b}

หมายเหตุ

คิดจากน้ำสกัดใบข้าว 100% ตรวจสอบปริมาณTAC mmol/Lด้วยวิธี The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay

สารคลอโรฟิลล์ เอ บี วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ค่า absorbance ที่ A663 และ A646 (Chlorophyll a=12.21(A_{663})– 2.81(A_{646}), Chlorophyll b=20.13(A_{646})-5.03(A_{663}))

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ วิเคราะห์โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สรุป

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นกล้าจากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อการแตกกอ คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. และไคโตซาน 20 มก./ล. (8.83 ต้น/กอ) หลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2 เดือน และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแตกกอของต้นกล้าได้โดยการแช่เมล็ดข้าวในสารไคโตซาน 1 มก./ล.เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อนำต้นกล้าจากเมล็ดที่แช่สารไคโตซานมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ 2 มก./ล. ร่วมกับไคโตซาน 5 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำให้ต้นแตกกอได้จำนวนต้นมากที่สุด (11.14 ต้น/กอ) หลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 เดือน ต้นกล้าที่ได้มีการเจริญเติบโตดี ใบมีสีเขียวเข้มกว่า ต้นกล้าจากเมล็ดที่ไม่แช่สารไคโตซาน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณคลอโรฟิลล์จากต้นกล้าที่มาจากเมล็ดที่แช่และไม่แช่ไคโตซานในอาหาร พบว่า การแช่เมล็ดก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไคโตซานความเข้มข้นตั้งแต่ 5-15 มก./ล. สนับสนุนการสร้างปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ คลอโรฟิลล์ เอ และ บี ได้สูงกว่าต้นกล้าจากเมล็ดที่ไม่แช่ไคโตซาน งานวิจัยที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีคุณภาพจำนวนมากและปลอดภัยสำหรับทำน้ำคั้นจากต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Allan, C.R. and L.A. Hadwiger. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. Exp. Mycol. 3: 258-287.

Benzie, I.F.F. and J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Analytic Biochem. 239: 70-76.

Chandrkrachang, S. 2002. The applications of chitin and chitosan in Thailand. Adv. in Chitin Sci..5: 458-462.

Homhual, R., M. Wongmaneeroj, S. Jamjumrus, K. Srathongprom and R. Agarum. 2013. Effects of growth regulators and chitosan on *in vitro* propagation of *Aglaonema*. Agri. Sci. J. 44 (3) : 297-307. (in Thai)

Kanchanapoom, K., A. Phongdara and K. Kanchanapoom. 2010. The effect of chitosan on the organogenesis of oil palm embryo-derived callus. Not. Bot. Horti Agrobo. 38: 213-217.

Kietsnontapat, N. and C. Aroonrungsikul. 2008. The effects of chitosan to produce increasing nutrition product in Thai cereal. pp. 277-278. *In* Proceedings of Kasetsart Univrsity Kamphaeng saen Campus in the 5th Kasetsart University, NakhonPathom. (in Thai)

Kim, H.J., F. Chen, X. Wang and N. C. Rajapakse. 2005. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocmum basilicum* L.). J. Agri. Food Chem. 53(9): 3696-3701.

Limpanavech, P., S. Chaiyasuta, R. Vongpromek, R. Pichyangkura, C. Khunwasi, S. Chadchawan, P. Lotrakul, R. Bunjongrat, A. Chaidee and T. Bangyeekhun. 2008. Chitosan effects on floral production, gene expression and anatomical changes in the *Dendrobium* Orchid. Scientia Hort. 116: 65-72.

Lu, Y.C. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29 : 92-96.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nge, K.L., N. New, S. Chandrkrachang and W. F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Sci. 170: 1185-1190.

Ohta, K., H. Atarashi, Y. Shimatani, S. Matsumoto, T. Asao and T. Hosoki. 2000. Effect of chitosan with or without nitrogen treatments on seedling growth in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. cv. *Kairyou Wakamurasaki*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 63-65.

Ohta, K., S. Morishita, K. Suda, N. Kobayashi and T. Hosoki. 2004. Effect of chitosan soil mixture treatment in the seedling storage on the growth and flowering of several ornamental plants. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73: 66-68.

Panprasong, N. 2012. Chlorophyll values of green. Update journal. 27(299) : 27-31. (in Thai)

Photchanachai, S., J. Singlaew and J. Thamthong. 2006. Effects of chitosan seed treatment on *Colletotrichum sp*. and seedling growth of chili cv. 'Jinda'. Acta Hort. 712: 585-590.

Pornpienpakdee, P., R. Singhasurasuk, P.Chaiyasap, R. Pichyangkun, R. Bunjongrat, S. Chadchawan and P. Limpanavech. 2010. Improving the Micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. Sci. Hortic. 124: 490-499.

Singha, S. and S.K. Bhatia. 1988. Shoot proliferation of pear cultivars on medium containing thidazuron and brnzylaminopurine. Hort Science. 23: 803.

Suzuki, K. and H. Shinshi. 1998. Regulation of chitinase gene expression by elicitor and ethylene. Chem. Reg. Plants. 33:44-54.

Thomas, J.C. and F.R. Katterman. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. Plant Physiol. 81: 681-683.

Tumwong, N. 2008.The amount of antioxidants phenolic compounds and vitamin C in vegetables and herbs. Journal of earth sciences. 8(1): 41-48.

Vander, P., K.M. Varum, A. Domatd, N.E.E. Gueddari and B.M. Moerschbacher. 1998. Comparison of the ability of partial Nacetylated chitosans and chitooligosacharides to elicit resistance reactions in wheat leaves, Plant Physiol. 118: 1353-1359.

Van Nieuwkerk, J.P., R.H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. Hort Science. 21 : 516-518.

Wang, H., G. Cao and R.L. 1996. Total Antioxidant Capacity of Fruits. J. Agric. Food Chem. 44(3): 701-705.

Wanichpongpan, P. 2002. Use of chitosan to increase the rate of germination of seeds. J. of Technol. Thonburi, 1: 70-74.(In Thai)

Wikitkankosol, P. and K. Thammasiri. 1992. Effects of Chitosan on Micropropagation of *Spathoglottis plicata.* PL-P09 *In* 35th Congress on Science and Technology of Thailand. (in Thai)

Yaemrakchat, J. and K.Thammasiri. 2009. Effects of chitosan on *Cattleya aurantiaca* protocorm development, The 35th Congress on Science and Technology of Thailand, The Tide Resort, Chonburi.

Yin, H., S. Li, X.Zhao, Y. Du and X. Ma. 2006. cDNA microarray analysis of gene expression in *Brassica napus* treated with oligochitosan elicitor, Plant Physiol. Bioch. 44: 910-916.

Zimmerman, T.W. and R. Scorza. 1992. Shoot growth and proliferation of peach under varying environmental prgimes. Hort Science 27 : 696.