ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi* Steud.) ในหลอดทดลอง

Effect of Chitosan on Growth of *In Vitro* Seedling Culture of *Dendrobium lindleyi* Steud.

วุฒิชัย ฤทธิ์*, บุญสนอง ช่วยแก้ว และ อรวรรณ ศรีน้ำคำ

Wuttichai Ritti*, Boonsanong Chourykaew and Orawan Sreenamkhum

หน่วยวิจัยชีววิทยาพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Plant Biology Research Unit, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University

Received : 28 March 2018

Accepted : 21 May 2018

Published online : 25 May 2018

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องผึ้งที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 หรือ 100 mg/L เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 100 mg/L ชักนำให้เกิดยอด 97.5% มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 9.30 ยอดต่อต้น และมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 2.56 เซนติเมตรต่อต้น ขณะที่สูตรอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 60 mg/L ชักนำให้เกิดราก 97.5% และมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 1.98 รากต่อต้น นอกจากนี้ยังพบว่าต้นอ่อนเอื้องผึ้งสามารถออกดอกในขวดทดลองได้ 1.13% เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 60 mg/L และ 100 mg/L ต้นอ่อนเอื้องผึ้งที่ย้ายเลี้ยงในโรงเรือนบนวัสดุปลูกกาบมะพร้าวสับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิต 82% เกิดราก 78% มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 2.00 รากต่อต้น มีจำนวนใบเฉลี่ย 2.12 ใบต่อต้น และมีความสูงเฉลี่ยดีที่สุด 2.80 เซนติเมตรต่อต้น ขณะที่วัสดุปลูกถ่านทุบส่งเสริมการเกิดยอด 76% และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.94 ยอดต่อต้น

คำสำคัญ : เอื้องผึ้ง, ไคโตซาน, หลอดทดลอง, วัสดุปลูก, การออกดอกในหลอดทดลอง

***Corresponding author. Email :** ritti59@gmail.com

Abstract

The study effect of chitosan on growth of *in vitro* seedling culture of *Dendrobium lindleyi* Steud. on semi-solid medium VW supplemented with different concentration of chitosan; 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 or 100 mg/L for 12 weeks. The result showed that the percentage of shoot formation (97.5%), the highest average of shoot numbers (9.30 shoots/plant) and highest of shoot length (2.56 cm/plant) could obtain when cultured on the medium with 100 mg/L chitosan. While, the culture of *D. lindleyi* Steud. seedling on the medium with 60 mg/L chitosan the result showed the percentage of root formation (97.5%) and highest average root numbers (1.98 roots/plant). Moreover, seedling could regenerate into inflorescence and flower bud (1.13%) when cultured on the medium with 60 mg/L and 100 mg/L chitosan. The plantlet of *D. lindleyi* Steud. gave the survival rate (82%) after 8 weeks on coconut husk chops in the greenhouse, the percentage of root formation (78%), the highest average root numbers (2.12 roots/plant), the average of leaf numbers (2.00 leaves/plant) and the highest average of shoot length (2.80 centimeter/plant). However, the plantlets were cultured on a charcoal piece showed the percentage of shoot formation (76%) and the average of shoot numbers (1.94 shoots/plant).

Key word: *Dendrobuim lindleyi* Steud., chitosan, *in vitro*, planting material, *in vitro* flowering

บทนำ

ประเทศไทยรายงานพบกล้วยไม้มากถึง 167 สกุล 1,140 ชนิด (Thaithong, 2008) นับเป็นแหล่งพันธุกรรมกล้วยไม้ที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมและระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi* Steud.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย พบทั่วประเทศตามป่าผลัดใบและป่าดงดิบ ความสูง 300 – 1,500 เมตรจากระดับน้ำทะเล ออกดอกช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤษภาคม (Wattatana & Indamusika, 2010) เอื้องผึ้งได้รับความนิยมในการปลูกเลี้ยงเนื่องจากมีลักษณะที่สวยงาม ส่งผลให้มีการลักลอบเก็บออกจากป่ามากขึ้น ประกอบกับพื้นที่ป่าธรรมชาติซึ่งเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยถูกบุกรุกแผ้วถาง ยิ่งส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรลดลงอย่างรวดเร็ว และมีแนวโน้มอาจเกิดการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต แนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการนำต้นเอื้องผึ้งออกจากแหล่งธรรมชาติ และป้องกันการสูญพันธุ์ที่อาจจะเกิดขึ้นได้ คือการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากและใช้ระยะเวลาสั้น (Trigiano & Gray, 2000; Razdan, 2002; Chawla, 2002; Chawla, 2003; Evans *et al*., 2003)

ไคโตซาน (Chitosan) เป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติ มีองค์ประกอบสำคัญในรูปของ D – glucosamine (2-amino-2-deoxy-glucose) (Dutta *et al*., 2004; Prasertsongskun & Purong, 2014) พบได้ในธรรมชาติโดยเป็นองค์ประกอบในเปลือกนอกของสัตว์พวก กุ้ง ปู แมลง เกล็ดปลา (Tungse *et al*., 2016) และผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิด (Palpandi *et al*., 2009) ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ปลอดภัยต่อมนุษย์ ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ไวไฟและไม่เป็นพิษต่อพืช (Hassni *et al*., 2004; Nge *et al*., 2006; Uthairatanakij *et al*., 2007; Prasertsongskun, 2012a) ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้ในการเกษตร ซึ่งสามารถช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตดี (Obsuwan & Sawangsri, 2010; Surajorn

et al., 2017) และนำไปใช้ในการป้องกันโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชหลายชนิด (Hirano, 1999; Kaur *et al*., 2012; Montri *et al*., 2014) เนื่องจากไคโตซานมีหมู่อะมิโนซึ่งแสดงสมบัติพิเศษหลายประการ เช่น การจับกับไอออนของโลหะได้ดี และมีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสามารถยับยั้งเชื้อราบางชนิดที่เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคพืช (Shadihi *et al*., 1999; Pillai *et al*., 2009; Suvathi, 2012; Xing *et al*., 2015) และเป็นตัวกระตุ้นให้พืชงอกราก เกิดใบใหม่ กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด (Barka *et al*., 2004; Asawatreratanakul & Asawatreratanakul, 2012; Junpatiw *et al*., 2014; Hamed *et al*., 2016; Pichyangkura & Chadchawan, 2015) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของเอื้องผึ้งมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องผึ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสม เพื่อขยายพันธุ์ต้นอ่อนเอื้องผึ้งให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น และเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุกรรมของเอื้องผึ้งให้คงอยู่ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมต้นพันธุ์สำหรับการทดลอง

เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องผึ้งบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1964) จนงอกเป็นต้นอ่อน จากนั้นคัดเลือกต้นอ่อนที่สมบูรณ์มีความสูง 1 – 1.5 เซนติเมตรมาใช้ในการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องผึ้ง

นำต้นอ่อนเอื้องผึ้งที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 6 เดือน ความสูง 1 – 1.5 เซนติเมตร ย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW (Vacine and Went, 1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 ml/L มันฝรั่ง 50 g/L กล้วยหอมห่าม 50 g/L น้ำตาล 20 g/L ผงถ่าน 2 g/L และผงวุ้น 7 g/L ปรับ pH 5.2 จากนั้นเติมไคโตซาน ออร์คิด ทีซี-80 (บริษัท โอลิแซ็กเทคโนโลยี จำกัด) ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 หรือ 100 mg/L ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้นต่อสูตรอาหาร วางเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ ความเข้มแสง 40 μmol/m^2/s ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกผลการเจริญเติบโตและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนเอื้องผึ้ง

ใช้ต้นอ่อนเอื้องผึ้งที่มีความสูง 2 เซนติเมตร ย้ายเลี้ยงบนวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน คือ กาบมะพร้าวสับ ถ่านทุบ และหินภูเขาไฟ วัสดุปลูกละ 50 ต้น วางเลี้ยงในโรงเรือน รดน้ำวันละครั้งในช่วงเช้า บันทึกอัตราการรอดชีวิต และการเจริญเติบโต ปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จากนั้นรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Duncan, 1955) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การทดลองที่ 1 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องผึ้ง

จากการเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องผึ้งบนอาหาร VW ที่เติมไคโตซานความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า ต้นอ่อนเอื้องผึ้งสามารถเจริญเติบโตและมีพัฒนาการได้ดี โดยเกิดยอดใหม่จากโคนต้นอ่อน ใบยืดยาวและแผ่กางออกได้ดี รวมถึงเกิดรากลักษณะอวบยาว มีสีเขียว เจริญแทงลงในอาหารเพาะเลี้ยง และรากที่เจริญเหนืออาหารเพาะเลี้ยงมีสีขาว ซึ่งเป็นส่วนของนวมหรือวีลาเมน (velamen) ที่ห่อหุ้มรากไว้เพื่อรักษาความชื้น (Chomicki *et al*., 2015) บางรากมีขนขนาดเล็กสีขาวปกคลุมบริเวณปลายราก (Figure 1) เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่เติมไคโตซานทุกความเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดที่สูงกว่าสูตรควบคุม เนื่องจากไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ รวมถึงมีส่วนประกอบที่เป็นโครงสร้างวงแหวนพอไพริน (porphyrin ring) ของคลอโรฟิลล์เอและบีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดี (Nakamura *et al*., 2010; Sunpapao & Pornsuriya, 2014; Malerba & Cerana, 2016) ซึ่งให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Prasertsongskun & Purong (2014) พบว่า กล้วยไม้เอื้องเงินหลวง (*D. formosum* Roxb. ex Lindl.) ที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 5 10 20 40 และ 60 ppm สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ดีทุกระดับความเข้มข้น เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม และรายงานของ Ieamkheng & Noosawat (2012) ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องจำปา (*D. moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.) บนอาหาร VW ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0% พบว่า สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมไคโตซานทุกความเข้มข้น รวมถึงรายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb.f.) บนอาหาร VW ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25 mg/L พบว่า อาหารที่เติมไคโตซานทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้สูงกว่าอาหารสูตรควบคุม (Prasertsongskun and Chaipakdee, 2011)

นอกจากนี้การเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องผึ้งบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 100 mg/L พบว่า สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 9.30 ยอดต่อต้น เกิดยอดใหม่ได้สูงถึง 97.5% มีจำนวนใบเฉลี่ย 1.74 ใบต่อต้น และส่งเสริมให้ต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 2.56 เซนติเมตรต่อต้น รวมถึงเกิดรากได้ดี 97.5% อย่างไรก็ตามพบว่ามีจำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และความสูงเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 90 mg/L คิดเป็น 8.65 ยอดต่อต้น 1.80 ใบต่อต้น และ 2.39 เซนติเมตรต่อต้นตามลำดับ ขณะที่อาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 60 mg/L ชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 1.98 รากต่อต้น และเกิดรากได้สูงถึง 97.5% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ (Tabel 1) (Figure 1) ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องจำปา (*D. moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.) บนอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 0.8% มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและต้นอ่อนได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 19.3 ยอดต่อขวด (Ieamkheng & Noosawat, 2012) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องผึ้ง พบว่า ให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากรายงานการเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Grammatophyllum speciosum* Blume บนอาหาร ½MS ที่เติมไคโตซาน 15 mg/L พบว่าส่งเสริมให้มีจำนวนโปรโตคอร์มใหม่เฉลี่ย จำนวนยอดเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด คิดเป็น 11.2 โปรโตคอร์ม 3.1 ยอด และ 1.8 ใบ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Sopalun *et al*., 2010) ขณะที่รายงานของ Restanto *et al*. (2016) ทำการ

เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) บนอาหาร VW ที่เติมไคซาน 15 ppm เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่ามียอดเฉลี่ยและโปรโตคอร์มเฉลี่ยมากที่สุด 6.66 ยอด และ 12.33 โปรโตคอร์มตามลำดับ และรายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cymbidium dayanum* Rchb.f. บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 1 mg/L ส่งเสริมให้เกิดยอดและรากได้สูงที่สุดคิดเป็น 79% และ 50% ตามลำดับ รวมถึงมีจำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด (Nahar *et al*., 2011) และรายงานการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องรงรอง (*Panisea uniflora* (Lindl.) Lindl.) บนอาหาร ½MS ที่เติมไคโตซาน 10 mg/L ชักนำให้เกิดยอดสูงที่สุด 67.5% และมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.92 ยอดต่อต้น (Ritti *et al*., 2016) เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติกระตุ้นการเจริญเติบโต และพัฒนาการของพืชได้เช่นเดียวกับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) (Kim, 2010; Prasertsongskun, 2012) ซึ่งพืชสามารถสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตได้เองตามธรรมชาติ และมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลึซึมต่างๆ เช่น กระตุ้นการแบ่งเซลล์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ และการยืดยาวของเซลล์ พืชบางชนิดต้องการในปริมาณมากจึงกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดี ขณะที่พืชบางชนิดหากได้รับมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต (Kermanee, 1993; Trigiano & Gray, 2000; Kanchanapoom, 2001; Chawla, 2003) รวมถึงโครงสร้างของไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่ปลดปล่อยออกมาโดยที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นการใช้ไคโตซานในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงควรคำนึงถึงระดับความเข้มข้นและปริมาณที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด รวมถึงปัจจัยด้านอื่นๆ เช่น ชิ้นส่วนพืช อายุพืช อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง (Wang *et al*., 1995; Boonkerd *et al*., 1996; Prasertsongskun, 2006; Prasertsongskun, 2012; Razdan, 2002; Evans *et al*., 2003)

นอกจากนี้ยังพบว่าต้นอ่อนเอื้องผึ้งสามารถเกิดดอกในขวดทดลองได้ เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 60 mg/L และ 100 mg/L คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การออดดอกทั้งหมด 1.13% (Figure 1g, Figure 1k) อย่างไรก็ตามพบว่า ดอกมีขนาดเล็ก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีเหลือง บางดอกมีสีขาวซีด และไม่สามารถติดฝักได้เองในหลอดทดลอง (Figure 1l) แตกต่างจากรายงานของ Ritti *et al*. (2012) ที่รายงานการออกดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้ดินว่านอึ่งสยาม (*Eulophia siamensis* Rolfe ex Downie) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 ml/L น้ำต้มมันฝรั่ง 50 g/L และน้ำตาล 20 g/L เป็นเวลา 14 เดือน ซึ่งย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม (subculture) 1 ครั้ง เมื่ออายุ 6 เดือน สามารถชักนำการเกิดดอกในหลอดทดลองคิดเป็น 6.8% และเกิดฝักแบบ parthenocarpic fruit ได้ในหลอดทดลอง และรายงานการเลี้ยงกล้วยไม้ *D. nobile* Lindl. ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร ½MS ที่เติม TDZ 0.1 mg/L สามารถเกิดตาดอกได้ดี 33.3-34.8% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือนหลังจากการเพาะเมล็ด (Wang *et al*., 2009) รวมถึงรายงานของ Chang *et al*. (2010) พบว่ากล้วยไม้ *E. graminea* Lindl. สามารถเกิดดอกในขวดทดลองได้ 5.3% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน แตกต่างจากรายงานของ Obsuwan & Sawangsri (2010) ที่ศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Dendrobium* 'Queen Pink' โดยย้ายเลี้ยงต้นอ่อนในอาหาร VW ที่เติม BA 22.2 µM และไคโตซาน 0 10 20 40 และ 60 mg/L เป็นเวลา 7 เดือน พบว่าไม่สามารถกระตุ้นการเกิดดอกในทุกทรีตเมนต์ อย่างไรก็ตามการเกิดดอกในหลอดทดลองของกล้วยไม้นั้น มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อัตราส่วนธาตุอาหาร (Duan & Yazawa, 1994; Kostenyuk *et al*., 1999; Tee *et al*., 2008) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Chang & Chang, 2003; Hee *et al*., 2007) อุณหภูมิ (Wang *et al*., 2009) ความเข้มแสงและระยะเวลาการได้รับแสง (Kostenyuk *et al*., 1999; Vaz *et al*., 2004) อายุพืชและชิ้นส่วนพืช (Sim *et al*., 2007; de Melo Ferreira

et al., 2006) รวมถึงความสมบูรณ์ของต้นอ่อนและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต้องเหมาะสมกับชนิดพืชนั้นๆ จึงจะสามารถเกิดดอกในหลอดทดลองได้ (Prasertsongskun, 2012b)

การทดลองที่ 2 ผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องผึ้ง

จากการย้ายเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องผึ้งในโรงเรือนบนวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ กาบมะพร้าวสับ ถ่านทุบ และหินภูเขาไฟ เมื่อมีอายุปลูกเลี้ยง 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเอื้องผึ้งที่ปลูกด้วยกาบมะพร้าวสับ มีอัตราการรอดชีวิตสูง 82% รองลงมาคือหินภูเขาไฟ และถ่านถุบ คิดเป็น 80% และ 76% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า กาบมะพร้าวสับส่งเสริมให้เกิดรากได้สูง 78% มีรากเฉลี่ยสูงที่สุด 2.00 รากต่อต้น รวมถึงมีใบเฉลี่ย 2.12 ใบต่อต้น และมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 2.80 เซนติเมตรต่อต้น โดยที่จำนวนรากเฉลี่ยและความสูงเฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับวัสดุปลูกอื่นๆ เนื่องจากกาบมะพร้าวสับสามารถเก็บรักษาความชื้นได้สูง เป็นข้อดีที่ช่วยให้รากสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว รวมถึงช่วยให้ต้นอ่อนฟื้นตัวและปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ไวมากขึ้น (Withner, 1959; Senavongse *et al*., 2014; Ritti *et al*., 2016) ขณะที่ถ่านทุบส่งเสริมการเกิดยอดได้สูง 76% และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.94 ยอดต่อต้น โดยที่จำนวนยอดเฉลี่ยและจำนวนใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในทุกวัสดุปลูก (Table 2) (Figure 2) สอดคล้องกับรายงานของ Radom & Inchonbot (2012) ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องผึ้ง (*D. lindleyi* Steud.) พบว่า เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนกาบมะพร้าว และรายงานการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ *E. graminea* Lindl. บนกาบมะพร้าว พบว่ามีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 3.23 ใบต่อต้น มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 11.27 รากต่อต้น รวมถึงมีความยาวรากเฉลี่ยและความสูงต้นอ่อนเฉลี่ยมากที่สุด 2.0 เซนติเมตร และ 5.81 เซนติเมตร ตามลำดับ (Montri & Saesong, 2014) และรายงานการปลูกเลี้ยงต้นกล้ากล้วยไม้ *P. uniflora* (Lindl.) Lindl. บนกาบมะพร้าวสับ ส่งเสริมให้มีอัตราการรอดชีวิตดีที่สุด 100% และเกิดยอดใหม่มากที่สุด 10% (Ritti *et al*., 2016) และรายงานการวิจัยของ Supinrach & Supinrach (2011) ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าคัทลียาลูกผสมเจ๊ียะหลิน (*Brassolaeliocattleya* Chia lin) และฟาแลนนอปซิสพริ้นเซสจุฬาภรณ์ (*Phalaenopsis* Princess Chulabhorn) พบว่า ต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตสูง 100% ทั้งสองชนิดเมื่อปลูกบนกาบมะพร้าว ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) รวมถึงรายงานการเลี้ยงกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) บนใยมะพร้าวสามารถชักนำให้มีใบเฉลี่ยและมีรากเฉลี่ยสูงที่สุด 4.05 ใบต่อต้นและ 9.90 รากต่อต้น ตามลำดับ (Thummasaeng *et al*., 2006) และรายงานผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญของกล้วยไม้เอื้องสายหลวง (*D. anosmum* Lindl.) พบว่า กาบมะพร้าวส่งเสริมให้มีจำนวนใบสูง 5.33 ใบต่อต้น และมีจำนวนรากเฉลี่ยดี 7.18 รากต่อต้น (Supinrach *et al*., 2013) อย่างไรก็ตาม พบว่า ต้นอ่อนเอื้องผึ้งที่ปลูกเลี้ยงบนหินภูเขาไฟมีความสูงต้นอ่อนเฉลี่ยที่น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับวัสดุปลูกกาบมะพร้าวและถ่านถุบ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) รวมถึงชักนำให้เกิดรากได้น้อยที่สุดคิดเป็น 70% อาจเนื่องจากหินภูเขาไฟมีคุณสมบัติในการระบายน้ำที่เร็วจึงทำให้สูญเสียความชื้นมากเกินไป

Table 1 Effect of chitosan on growth and development of seedling culture of *D. lindleyi* Steud. for 12 weeks.

Chitosan (mg/L)	Shoot formation (%)	Shoot no. Mean±SE	Leaf no. Mean±SE	Shoot length (cm) Mean±SE	Root formation (%)	Root no. Mean±SE
0	85	6.08±0.36^{c}	1.41±0.04^{de}	2.08±0.07^{cde}	97.5	1.20±0.12^{c}
10	90	7.68±0.45^{b}	1.44±0.04^{cde}	2.55±0.07^{a}	95	1.63±0.25^{bc}
20	95	5.63±0.37^{cd}	1.53±0.05^{bcd}	1.87±0.10^{e}	90	1.24±0.12^{c}
30	95	4.80±0.32^{d}	1.55±0.04^{bc}	1.44±0.07^{f}	90	1.18±0.07^{c}
40	95	4.97±0.21^{d}	1.38±0.03^{e}	2.09±0.05^{cd}	95	1.25±0.06^{c}
50	95	6.38±0.46^{c}	1.48±0.07^{b-e}	2.02±0.08^{de}	97.5	1.46±0.06^{bc}
60	97.5	5.65±0.31^{cd}	1.61±0.04^{b}	2.31±0.09^{b}	97.5	1.98±0.11^{a}
70	97.5	5.33±0.33^{cd}	1.52±0.04^{bcd}	2.03±0.09^{de}	82.5	1.30±0.11^{c}
80	95	6.33±0.33^{c}	1.60±0.04^{b}	2.28±0.06^{bc}	95	1.37±0.10^{c}
90	95	8.65±0.35^{ab}	1.80±0.04^{a}	2.39±0.04^{ab}	95	1.22±0.04^{c}
100	97.5	9.30±0.34^{a}	1.74±0.03^{a}	2.56±0.04^{a}	97.5	1.29±0.04^{b}

Means followed by the same letter in a column are not significantly different as indicated by DMRT ($p \leq 0.05$)

Table 2 Effects of coconut husk chops (CH), charcoal piece (CP) and volcanic rock (VR) on morphological changed of *D. lindleyi* Steud. seedlings after 8 weeks *ex vitro* greenhouse growth.

	Survival (%)	Shoot formation (%)	Shoot no. Mean±SE	Root formation (%)	Root no. Mean±SE	Leaf no. Mean±SE	Shoot length (cm) Mean±SE
CH	82	72	1.82±0.02^{a}	78	2.00±0.10^{a}	2.12±0.13^{a}	2.80±0.08^{a}
CP	76	76	1.94±0.01^{a}	76	1.86±0.08^{b}	2.04±0.09^{a}	2.54±0.07^{b}
VR	80	72	1.88±0.10^{a}	70	1.80±0.10^{b}	2.02±0.11^{a}	2.31±0.07^{c}

Means followed by the same letter in a column are not significantly different as indicated by DMRT ($p \leq 0.05$)

Figure 1 The growth and development from seedling of *D. lindleyi* Steud. for 12 weeks on VW medium without chitosan (a) and supplemented with chitosan at the concentration of 10 mg/L (b), 20 mg/L (c), 30 mg/L (d), 40 mg/L (e), 50 mg/L (f), 60 mg/L (g), 70 mg/L (h), 80 mg/L (i), 90 mg/L (j) and 100 mg/L (k); 100 mg/L (l) after 16 weeks of cultured.

Figure 2 Morphological characters of seedling *D. lindleyi* Steud. acclimatized *ex-vitro* for 8 weeks.

สรุปผลการวิจัย

ต้นอ่อนเอื้องผึ้งที่เลี้ยงบนอาหาร VW ที่เติมไคโตซาน 100 mg/L มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 9.30 ยอดต่อต้น และอาหารที่เติมไคโตซานความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มการชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย และความสูงต้นอ่อนเฉลี่ยได้สูงกว่าอาหารที่เติมไคโตซานความเข้มข้นต่ำ ขณะที่วัสดุปลูกกาบมะพร้าวส่งเสริมให้ต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยชีววิทยาพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

เอกสารอ้างอิง

Asawatreratanakul, P. & Asawatreratanakul, K. (2012). Chitosan induction of fungal resistance in papaya seedling (*Carica papaya* L.). *Thaksin University Journal*, *15*(3), 1-6. (in Thai).

Barka, E. A., Eullaffroy, P., Clement, C. & Vernet, G. (2004). Chitosan improves de-velopment and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, *22*, 608-614.

Boonkerd, N., Chandrkrachang, S. & Stevens, W. F. (1996). Effect of chitin on nodulation N_2fixation rhizobia-soybean symbiosis, chitin and chitosan. In *Proceedings of the 2nd Asia Pacific Symposium*. (pp. 183-187.) Thailand: AIT, Bangkok.

Chang, C. & Chang W. C. (2003). Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors in vitro*. *Plant Growth Regulation*, *39*, 217-221.

Chang, C., Hu, W. H., Chen, Y. C., Su, Y. L. & Chiu, Y. T. (2010) *In vitro* flowering and mating system of *Eulophia graminea* Lindl. *Botanical Studies*, *51*, 357-362.

Chawla, H. S. (2002). *Introduction to plant biotechnology*. USA: Science Publishers, Inc.

Chawla, H. S. (2003). *Plant biotechnology a practical approach*. USA: Science Publishers, Inc.

Chomicki, G., Bidel, L. P. R., Ming, F., Coiro, M., Zhang, X., Wang, Y., Basissac, Y., Allemand, C. J. & Renner, S. S. (2015). The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *New Phytologist, 205*, 1330–1341.

de Melo Ferreira, W., Kerbauy, G. B., Kraus, J. E., Pescador, R. & Suzuki, R. M. (2006). Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoot of *Dendrobium*. *Journal of Plant Physiology, 163*, 1126-1134.

Duan, J. X. & Yazawa, S. (1994). *In vitro* floral development in × *Doriella* Tiny (*Doritis pulcherring* × *Kingiella Philip-pinensis*). *Scientia Horticulturae, 59*, 253-264.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F test. *Biometrics, 11*, 1 – 42.

Dutta, P. K., Dutta, J. & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research, 63*, 20-31.

Evans, D. E., Coleman, J. O. D. & Kearns, A. (2003). *Plant cell culture*. London and New York: BIOS Science Publishers.

Hamed, I., Ozogul, F. & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology, 48*, 40-50.

Hassni, M. E., Hadrami, A. E., Daayf, F., Barka, E. A. & Hadrami, I. E. (2004). Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathologia Mediterranea, 43*, 195-204.

Hee, K. H., Loh, C. S. & Yeoh, H. H. (2007). Early *in vitro* flowering and seed production in culture in *Dendrobium* Chao Praya Smile (Orchidaceae). *Plant Cell Reports, 26*, 2055-2062.

Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International, 48*(8), 732-734.

Ieamkheng, S. & Noosawat, S. (2012). Effect of chitosan on *in vitro* growth and development of *Dendrobium moschatum.* In *The 9th National Kasetsart University Kamphaeng Saen Conference*. (pp. 2206-2212). (in Thai).

Junpatiw, A., Veenacoop, S., Saenphakdi, S. & Montri, N. (2014). Effect of chitosan and growing media on acclimatization of *Grammatophyllum speciosum* Blume. *Khon Kaen Agriculture Journal, 42*(3), 495-500. (in Thai).

Kanchanapoom, K. (2001). *Plant tissue culture*. (2nd ed). Bangkok: Chulalongkorn University Press. (in Thai).

Kaur, P., Thakur, R. & Choudhary, A. (2012). An *in vitro* study of the antifungal activity of silver/chitosan nanoformulations against important seed borne pathogens. *International Journal of Scientific & Technology Research, 1*(6), 83-86.

Kermanee, P. (1993). Plant tissue culture techniques. Bangkok: O.S. Printing House. (in Thai).

Kim, S. K. (2010). Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives biological activities and applications. USA: CRC Press.

Kostenyuk, I., Oh. B. J. & So, I. S. (1999). Induction of early flowering in *Cymbidium niveomarginatum* Mak *in vitro*. *Plant Cell Reports, 19*, 1-5.

Malerba, M. & Cerana, R. (2016). Chitosan effects on plant systems. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*, 1-15.

Montri, N. & Saesong, N. (2014). *In vitro* propagation of *Eulophia graminea* Lindl. *Khon Kaen Agriculture Journal, 42*(1), 596-601. (in Thai).

Montri, N., Saenphakdi, S. & Vinakub, S. (2014). Effect of growing media and chitosan on acclimatization of *Doritis pulcherrima* Lindl. seedlings from seed culture. *Khon Kaen Agriculture Journal*, *43*(3), 518-523. (in Thai).

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology, 15*, 473 – 497.

Nahar, S. J., Kazuhiko, S., Li, H. C. & Kaewjampa, N. (2011). Effect of plant growth regulators on organogenesis in protocorm-like body (PLBs) of *Cymbidium dayanum in vitro*. *Asian Research Publishing Network Journal of Agricultural and Biological Science, 6*(6), 28-33.

Nakamura, T., Nakayama, N., Yamamoto, R., Shimamura, S., Kim, Y., Hiraga, S., Ohyama, T., Komatsu, S. & Shimada, S. (2010). Nitrogen utilization in the supernodulating soybean variety “Sakukei 4” and its parental varieties, “Enrei” and “Tamahomare”. *Plant Production Science*, *13*(2), 123-131.

Nge, K. L., New, N., Chandrkrachang, S. & Stevens, W. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science, 170*, 1185-1190.

Obsuwan, K. & Sawangsri, K. (2010). The effect of chitosan on growth of *Dendrobium* Queen Pink in tissue culture. *Agricultural Sciences Journal*, *41*(3), 477-480. (in Thai).

Palpandi, C., Shanmugan, V. & Shanmugan, A. (2009). Extraction of chitin and chitosan from shell and operculum of mangrove gastropod *Nerita (Dostia) crepidularia* Lamarck. *International Journal of Medicine and Medical Sciences, 1*(5), 198-205.

Pichyangkura, R. & Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae, 196*, 49-65.

Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science, 34*, 641-378.

Prasertsongskun, S. & Chaipakdee, W. (2011). Effect of chitosan on growth and development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. *KKU Science Journal, 39*(1), 113-119. (in Thai).

Prasertsongskun, S. & Purong, H. (2014). Effect of chitosan on *in vitro* growth and development of *Dendrobium formosum* Roxb. *KKU Science Journal, 42*(1), 127-134. (in Thai).

Prasertsongskun, S. (2006). *Plant tissue culture and plant breeding*. Bangkok: Forepace publishing house. (in Thai).

Prasertsongskun, S. (2012a). Application of chitosan in plant tissue culture. *Journal of Yala Rajabhat University, 7*(2), 125-134. (in Thai).

Prasertsongskun, S. (2012b). *In vitro* flowering of orchid. *KKU Science Journal*, *40*(3), 645-653. (in Thai).

Radom, S. & Inchonbot, S. (2012). *Effect of different growing media on some types orchids, herbs*. The Office of Agricultural Research and Extension Maejo University. (in Thai).

Razdan, M. K. (2002). *Introduction to plant tissue culture*. (2nd ed.). USA: Science Publishers, Inc.

Restanto, D. P., Santoso, B., Kriswanto, B. & Supardjono, S. (2016). The application of chitosan for protocorm like bodies (PLB) induction of orchid (*Dendrobium* sp.) *in vitro*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia, 9*, 462 – 468.

Ritti, W., Chourykaew, B., Phrombangyuan, P. & Thaksin, S. (2016). Effect of chitosan on growth and development of *in vitro* seedling of *Panisea uniflora* (Lindl.) Lindl. *Songklanakarin Journal of Plant Science, 3*(4), 8-13. (in Thai).

Ritti, W., Thapyai, C. & Kongbangkerd, A. (2012). *In vitro* flowering of *Eulophia siamensis* Rolfe ex Downie. In *Proceedings of the 8th Naresuan Research Conference.* (pp. 477-483). (in Thai).

Senavongse, R., Saensouk, P. & Saensouk, S. (2014). *In vitro* tissue culture of *Dendrobium kontumense* Gagnep. *KKU Research Journal, 19*(3), 399-413. (in Thai).

Shadihi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Sciences & Technology*, *10*, 37-51.

Sim, G. E., Loh, C. S. & Goh, C. J. (2007). High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* Madame Thong-In (Orchidaceae). *Plant Cell Reports, 26*, 383-393.

Sopalun, K., Thammasiri, K. & Ishikawa, K. (2010). Effects of chitosan as the growth stimulator for *Grammatophyllum speciosum in vitro* culture. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation, 4*(11), 828 – 830.

Sunpapao, A. & Pornsuriya, C. (2014). Effects of chitosan treatments on para rubber leaf fall disease caused by *Phytophthora palmivora* Butler - a laboratory study. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 36*(5), 507-521. (in Thai).

Supinrach, I., Banchongsiri, S. & Boonta, K. (2013). Effect of growing media and irrigation frequencies on survival and growth of *Dendrobium anosmum*. In *The 3rd STOU Graduate Research Conference.* (pp. 1-12). (in Thai).

Supinrach, S & Supinrach, I. (2011). Study of medias on growth seedling *Cattleya* and *Phalaenopsis*. In *Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Plants.* (pp. 1-8). (in Thai).

Surajorn, P., Rungcharoenthong, P., Teeranitayatarn, K. & Amkha, S. (2017). The chitosan application for enhancing of plant growth, yield and secondary metabolite compounds in Khonkaen 3 sugarcane. *Khon Kaen Agriculture Journal, 45*(1), 224-229. (in Thai).

Suvathi, Y. (2012). Chitosan with microbial inhibition. *Government Pharmaceutical Organization R&D Newsletter, 19*(4), 4-5. (in Thai).

Tee, C. S., Mazah, M. & Tan, C. S. (2008). Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium* Sonia 17. *Biologia Plantarum, 52*(4), 723-726.

Thaithong, O. (2008). *Thai orchids*. (15th ed.). Bangkok: Baan Lae Suan Printing. (in Thai).

Thummasaeng, S., Suabnukarn, P., Naivinit, W. & Unpim, U. (2006). A study on growing media and fertilizer on Daeng Ubon orchid (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*). *Journal of Science & Technology, Ubon Ratchathani University, 8*(3), 26-35. (in Thai).

Trigiano, R. N. & Gray, D. J. (2000). *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. (2nd ed.). USA: CRC Press.

Tungse, W., Boonpattaro, D. & Suwanchatri, N. (2016). The study of chitosan from fish scale (*Lates calcarifer* and *Oreochromis niloticus*) and shrimp shell (*Litopenaeus vannamei*). In *Proceedings of The 6th SKRU Conference: Focus on Education and Culture for Community Development*. (pp. 1069-1077.) (in Thai).

Uthairatanakij, A., da Silva, J. A. T. & Obsuwan, K. (2007). Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotechnology, 1*(1), 1 – 5.

Vacin, E. and Went, F. (1949). Some pH changes in nutrient solution. *Botanical Gazette*, *110*, 605 – 613.

Vaz, A. P. A., Figueiredo-Ribeiro, R. de C. L. & Kerbauy, G. B. (2004). Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, and epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry, 42*, 411-415.

Wang, G. Y., Liu, P., Xu, Z. H. & Chua, N. H. (1995). Effect of ABA on the *in vitro* production of flower buds of *Dendrobium candidum* Wall. ex. Lindl. *Acta Botanica Sinica, 37*(5), 374-378.

Wang, Z. H., Wang, L. & Ye, Q. S. (2009). High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. *Scientia Horticulturae*, *122*, 328-331.

Wattatana, S & Indamusika, S. (2010). *Thai plants* (*Orchid 1*). Chiang Mai: The Botanical Garden Organization. (in Thai).

Withner, C. L. (1959). *The orchid: a scientific survey*. New York: The Ronald Press.

Xing, K., Zhu, X., Peng, X. & Qin, S. (2015). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development, 35*, 569-588.