วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

# การพ่นทางใบด้วยไคโตซานกระตุ้นการเจริญ การแตกยอด และสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพรมมิที่ปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์

# Foliar application of chitosan elicits growth, multiple shoot production and pharmacological secondary metabolites in Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) cultured under hydroponics

**อุรศรี สูยะศุนานนท์[1], พัทธนันท์ เขียวเขิน[1] และ เนริสา คุณประทุม[1]***

**Urasri Suyasunanont[1], Phatthanan Khiaokhoen[1] and Narisa Kunpratum[1]***

[1] *ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000*

[1] *Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Tha pho, Mueang, Phitsanulok, 65000*

**บทคัดย่อ:** พรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นพืชสมุนไพรที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ ความจำ และบำรุงสมอง มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญต่อระบบประสาท คือ สารบาโคไซด์เอ (bacoside $A_3$, bacopaside X, bacopaside II และ bacopasaponin C) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของตัวกระตุ้นไคโตซานต่อการเจริญและการสร้างสารบาโคไซด์เอ ในพรมมิที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์แบบน้ำลึก โดยการพ่นทางใบด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 0, 100, 200 และ 500 mg/l ในสัปดาห์ที่ 2-6 หลังจากการปรับสภาพ ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานส่งเสริมการเจริญของพรมมิ เพิ่มน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งและจำนวนยอด ไคโตซานทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการสะสมสารบาโคไซด์รวมเพิ่มมากขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม การศึกษาครั้งนี้ชี้ชัดว่าไคโตซาน (200 mg/l) จัดเป็นตัวกระตุ้นที่มีความปลอดภัย มีความคุ้มทุนทางเศรษฐกิจและมีประสิทธิภาพสำหรับส่งเสริมการเจริญ เพิ่มผลผลิต รวมทั้งกระตุ้นการสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิหรือสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรได้ และสามารถประยุกต์ใช้สำหรับการปลูกพรมมิเพื่อประโยชน์เชิงอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิ

**คำสำคัญ:** พรมมิ; ไคโตซาน; สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ; ตัวกระตุ้น; ไฮโดรโปนิกส์

**ABSTRACT:** Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) is a medicinal herb for enhancing cognitive ability, memory and brain maintenance. Brahmi has important bioactive substances for improving the nervous system which is bacoside A (bacoside A3, bacopaside X, bacopaside II and bacopasaponin C). The objective of this research was to study the effect of chitosan elicitor on growth and accumulation of bacoside A in Brahmi cultured in DFT hydroponic system. Brahmi plants were sprayed with chitosan at the concentrations of 0, 100, 200 and 500 mg/l every week during the $2^{nd}$ - and $6^{th}$ weeks after acclimatization. The results showed that chitosan promoted growth by increasing fresh weight, dry weight and shoot number. All concentrations of chitosan enhanced the accumulation of total bacoside with highest significantly difference from control. This study emphasizes that chitosan (200 mg/l) can be used as a safe, economical, and efficient elicitor for promoting plant growth and increasing secondary metabolites or bioactive compounds of magnificent medicinal plants. This finding can apply to Brahmi cultivating for supply dietary supplement industry.

**Keywords:** Brahmi; chitosan; secondary metabolites; elicitor; hydroponics

* Corresponding author: Narisak@nu.ac.th

Received: date; March 31, 2023 Revised: date; December 18, 2023

Accepted: date; March 18, 2024 Published: date; April 19, 2024

**บทนำ**

พรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นพืชน้ำสมุนไพรอยู่ในวงศ์ Plantaginaceae เจริญในบริเวณที่ชื้น มีน้ำขัง เช่น ริมขอบของแหล่งน้ำธรรมชาติ ขยายพันธุ์ได้ง่าย พรมมิมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือสารกลุ่ม triterpenoid saponin ได้แก่ bacoside (เช่น bacoside A1 -A3 และ bacoside B), bacopasaponin (เช่น bacopasaponin A-F), bacopaside (เช่น bacopaside I-V) (กรกนก, 2561) มีสรรพคุณช่วยเพิ่มความจำ บำรุงสมอง สามารถรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทและสมอง และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ พรมมินำมาเป็นส่วนผสมในตำรับยาอายุรเวทของอินเดียมาเป็นเวลานาน ในประเทศไทยมีรายงานการใช้พรมมิในหลายตำรับยา เช่น ยาเขียวมหาพรหมเป็นต้น (หมออาสา แพทย์แผนไทย, 2559) ประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ทำให้จำนวนผู้ป่วยโรคความจำเสื่อมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นความต้องการผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยาสำหรับรักษาโรคความจำเสื่อมจึงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ปัจจุบันพรมมิถูกนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร แก้ปัญหาสมาธิสั้นและเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำ พรมมิที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยานั้น ส่วนใหญ่นำมาจากธรรมชาติและการเพาะปลูกพรมมิในดินที่มีน้ำขังแบบดั้งเดิม ซึ่งจะใช้เวลาปลูกเลี้ยงนานประมาณ 3-4 เดือน แต่ในปัจจุบันสามารถเพิ่มผลผลิตพรมมิได้ในเวลาที่รวดเร็วและใช้พื้นที่น้อยด้วยวิธีการปลูกแบบไฮโดรโปนิกส์ (hydroponics) ซึ่งสามารถให้ผลผลิตสูงภายใน 4-6 สัปดาห์เท่านั้น ให้ผลผลิตทันตามความต้องการของตลาดอุตสาหกรรมยา สามารถควบคุมโรคและแมลงได้ดี หลีกเลี่ยงปัญหาสารเคมีปราบศัตรูพืช และสารโลหะหนักตกค้าง (Abdussalam and Ratheesh-Chandra, 2009) รวมทั้งใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกน้อยกว่าการปลูกดั้งเดิม (Maneeply et al., 2018; Hussain et al., 2010) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่กระบวนการผลิตยาเชิงการค้าให้ความสำคัญอย่างยิ่ง (Gubbannavar et al., 2013) มีรายงานการใช้ตัวกระตุ้น (elicitors) เช่น glycine, ferulic acid, phenylalanine, α-ketoglutaric acid, pyruvic acid ฮอร์โมนพืช แบคทีเรีย รา ไคโตซาน ความเครียด และแสงรังสียูวี เป็นต้น สามารถเพิ่มสารทุติยภูมิในพืชและสารออกฤทธิ์สำคัญในสมุนไพรได้ (Parale et al., 2010) ไคโตซาน (chitosan) เป็นสารไบโอโพลีเมอร์ชีวภาพประกอบด้วยกลูโคซามีนมากกว่า 90% ได้จากการสกัดเปลือกของสัตว์จำพวกกุ้งปูและหอยโดยใช้ด่างเข้มข้น ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม (ยงยุทธ, 2558) ไคโตซานสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเกษตร มีคุณสมบัติกระตุ้นการงอกและการเจริญของพืช รวมทั้งกระตุ้นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในพืชสมุนไพรหลายชนิด (Thakur et al., 2019) การใช้ไคโตซานเคลือบเมล็ดสามารถป้องกันโรคและแมลงได้ (Benhamou et al., 1994) ไคโตซานความเข้มข้น 2-8 mg/l สามารถต้านเชื้อรา (*Fusarium graminearum*) เชื้อก่อโรคที่สร้างความเสียหายให้กับเมล็ดข้าวสาลี และไคโตซานยังเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกได้ (Reddy et al., 1999) ไคโตซานถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยเพิ่มการเจริญของแคลลัส รวมทั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อต่าง ๆ การเพิ่มไคโตซาน 15 mg/l ในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญเป็น protocorm-like body (Nge et al., 2006) เมื่อให้ไคโตซานความเข้มข้น 0.4 g/l ช่วยเพิ่มการเจริญของกระเพราภายใต้สภาวะปกติและสภาวะเครียดได้ การใช้ไคโตซานนาโนพาทิเคิล (5 $\mu$g/l) สามารถกระตุ้นการเจริญของต้นกล้าข้าวสาลีได้

การพ่นไคโตซานทางใบสลับกับการให้ไคโตซานทางดินร่วมกับการให้ปุ๋ยจุลธาตุแก่ข้าวพันธุ์ กข.61 สามารถกระตุ้นการเจริญและการสร้างสารทุติภูมิ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลและกรดซาลิไซลิกได้ ทำให้เพิ่มผลผลิตและช่วยให้ข้าวต้านทานโรคและแมลงได้ (นุชนาฏ และคณะ, 2560) จากการศึกษาของ Salimgandomi and Shabrangi (2016) พบว่าการฉีดพ่นไคโตซานที่ความเข้มข้น 50-100 $\mu$M สามารถกระตุ้นสารฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระในเปเปอร์มินต์ (*Mentha piperita* L.) เพิ่มขึ้น และไคโตซานโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 200 และ 500 mg/l กระตุ้นสารโพลีฟีนอลสูงขึ้น (Yin et al., 2012) การพ่นทางใบด้วยไคโตซาน (100 และ 400 mg/l) สามารถกระตุ้นกรดโรสมารินิก (rosmarinic acid) และเควอซิทิน (quercetin) ในสมุนไพร *Dracocephalum kotschyi* เพิ่มขึ้นประมาณ 13 เท่า และอพิเจนิน (apigenin) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น 16 เท่า (Kahromi and Khara, 2021) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตและปริมาณสารบาโคไซด์เอในสมุนไพรพรมมิที่ปลูกโดยระบบไฮโดรโปนิกส์ด้วยไคโตซาน ซึ่งหากสามารถเพิ่มปริมาณพรมมิและเพิ่มปริมาณสารบาคาไซด์เอได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมผลิตยา เพื่อชะลอและรักษาโรคความจำเสื่อมในประชากรผู้สูงอายุได้

**วิธีการศึกษา**

**อิทธิพลของไคโตซานต่อการเจริญของพรมมิ**

นำยอดพรมมิยาวประมาณ 8 cm ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์แบบน้ำลึก (deep flow technique: DFT) โดยใช้สารละลายธาตุอาหารครึ่งสูตร Hoagland มีค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity: EC) เท่ากับ 1.5 mS/cm และ pH เท่ากับ 5.8 ให้พรมมิเจริญภายใต้ระบบไฮโดรโปนิกส์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นการปรับสภาพ (acclimatization) หลังจากการปรับสภาพจึงเริ่มนับอายุการเพาะเลี้ยง ทำการพ่นไคโตซานทางใบความเข้มข้น 0, 100, 200 และ 500 mg/l ในวันแรกของสัปดาห์ที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 (หลังจากการปรับสภาพ) บันทึกการเจริญเติบโตของพรมมิในวันที่ 2 หลังการพ่นไคโตซานทางใบ ได้แก่ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความสูง จำนวนยอด ความกว้าง ความยาวใบ โดยวัดใบคู่ที่ 4, 5 และ 6 นับจากยอด และวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์ สำหรับการเตรียมไคโตซาน ทำได้โดยชั่งไคโตซาน (ผงไคโตซานจากบริษัท เวชกิจ เคมีภัณฑ์ จำกัด) ตามปริมาณที่ต้องการ (100, 200 และ 500 mg) เติมน้ำกลั่น 50 ml นำไปตั้งบนเครื่องกวนให้ความร้อน (hot plate) รอจนเดือดจึงเติมกรดอะซิติกเจือจางหรือน้ำส้มสายชูด้วยหลอดหยดประมาณ 10 หยด คนให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นและหยดน้ำส้มสายชู (ไม่ควรใช้น้ำส้มสายชูเกิน 15 ml) จนสารละลายมีลักษณะเป็นเนื้อเจลสีเหลืองอ่อนจึงนำไปปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml

**การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ**

นำใบพรมมิ 0.05 g ไปบดด้วยโกร่งแช่เย็นจนละเอียด จากนั้นเติมสารละลาย 80% acetone : ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 min ดูดเฉพาะส่วนใสปริมาตร 200 $\mu$l ลงใน 96-well plate จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 441, 645 และ 663 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์ ตามสูตรด้านล่าง (Porra et al., 1989; Ramírez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2016)

$$\text{Chlorophyll a} = (12.25\ A_{663} - 2.25\ A_{645}) \times V/100 \times W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (20.30\ A_{645} - 4.91\ A_{663}) \times V/100 \times W$$

$$\text{Chlorophyll a + b} = (7.34\ A_{663} + 17.76\ A_{645}) \times V/100 \times W$$

$$\text{Carotenoid} = (4.46\ A_{441} - \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}) \times V/100 \times W$$

V หมายถึง ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร

W หมายถึง น้ำหนักสดของพรมมิที่ใช้สกัด

**การวิเคราะห์สารบาโคไซด์เอ ด้วยเทคนิค HPLC**

นำต้นพรมมิมาอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5-7 วัน จนพรมมิมีน้ำหนักแห้งคงที่ นำส่วนยอดมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียดแล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งพรมมิที่บดละเอียด 0.1 g ลงในหลอด 15 ml แล้วเติมเมทานอล 3 ml ตั้งทิ้งไว้ 1 hr หลังจากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 15 min เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่ให้โดนแสง จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่สกัดได้รวมกันแล้วปรับปริมาตรเท่ากับ 10 ml ทำการกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาด 0.45 $\mu$m แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ในขวดสีชา นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C และนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาสาร bacoside A3, bacopaside II, bacopaside X และ bacopasaponin C โดยใช้เทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent 1260 ใช้คอลัมน์ RP-18 column และมี 0.2% phosphoric acid : acetonitrile (65:35) เป็น mobile phase ใช้ระยะเวลาการชะ 30 min ใช้อัตราการชะที่ 1 ml/min โดยปริมาณที่ฉีด คือ 10 $\mu$l และใช้ UV detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 205 nm (Phrompittayarat et al., 2011) เทียบกับสารบาโคไซด์รวมมาตรฐานที่ประกอบด้วย bacoside A3, bacopaside II, bacopaside x และ bacopasaponin C

**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics 17.0

**ผลการศึกษาและวิจารณ์**

**ไคโตซานกระตุ้นการเจริญของพรมมิ**

เมื่อนำยอดพรมมิมาปลูกเลี้ยงด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์แบบน้ำลึก (DFT) หลังจากครบระยะปรับสภาพ 1 สัปดาห์พบมีรากงอกจากบริเวณลำต้นที่จุ่มในสารละลายธาตุอาหาร จากนั้นปลูกเลี้ยงพรมมิต่อเนื่องเป็นเวลา 6 สัปดาห์และทำการพ่นไคโตซานทางใบให้แก่พรมมิในทุกสัปดาห์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานสามารถกระตุ้นการเจริญของพรมมิทำให้พรมมิมีน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น โดยไคโตซานความเข้มข้น 200 mg/l ทำให้พรมมิมีน้ำหนักสด (84.75 g/plant) และน้ำหนักแห้ง (7.99 g/plant) มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือไคโตซานความเข้มข้น 500 mg/l สามารถเพิ่มน้ำหนักสด (62.90 g/plant) และน้ำหนักแห้ง (4.58 g/plant) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม **(Table 1)** ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Waewthongrak and Saleh (2020) รายงานว่าการรดต้นกล้ามะเขือเทศด้วยสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.5 mg/ml สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ต่อเนื่อง 4 สัปดาห์ ทำให้น้ำหนักแห้งต้นของมะเขือเทศสีดาเพิ่มขึ้น และการพ่นทางใบด้วยไคโตซานยังกระตุ้นการเจริญ ทำให้ผลมะเขือเทศมีน้ำหนักมากขึ้น (Sathiyabama et al., 2014) และให้ผลในทำนองเดียวกันในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น โหระพา (Kim et al., 2005) และถั่วงอก (No et al., 2003) เป็นต้น

**Table 1** Effect of foliar application of chitosan on growth of six-week-old hydroponically grown Brahmi using deep flow technique system

| Concentrations of chitosan (mg/l) | Parameters of growth | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Fresh weight (g/plant) | Dry weight (g/plant) | Shoot length (cm) | Shoot number per plant | Leaf size ($cm^2$) |
| 0 | 43.32±8.68$^{b}$ | 3.27±0.85$^{b}$ | 105.39±10.64 | 50.20±10.35$^{b}$ | 1.42±0.25 |
| 100 | 44.01±11.18$^{b}$ | 3.38±1.25$^{b}$ | 100.44±13.38 | 53.29±9.95$^{b}$ | 1.43±0.17 |
| 200 | 84.75±27.35$^{a}$ | 7.99±2.63$^{a}$ | 95.45±32.42 | 81.50±30.32$^{ab}$ | 1.52±0.41 |
| 500 | 62.90±17.79 $^{ab}$ | 4.58±1.56$^{b}$ | 105.53±10.00 | 95.80±25.38$^{a}$ | 1.39±0.22 |
| F-test | ** | ** | ns | ** | ns |
| CV. (%) | 48.1 | 49.7 | 62.0 | 40.6 | 50.3 |

Means±SD in the same column followed by the different letters are significantly different by Tukey's multiple compare test, ns indicated not significantly different, * indicated significant difference at $P<0.05$ and ** indicated significant difference at $P<0.01$

ไคโตซานเป็นสารชีวภาพที่ถูกนำมาใช้ทางเกษตรเพื่อกระตุ้นการเจริญและเพิ่มผลผลิตในพืชหลายชนิด จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่าไคโตซานกระตุ้นการเจริญของพรมมิที่ปลูกเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์ให้ชีวมวลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของไคโตซานประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคซามีน ($\beta$-1,4 D glucosamine และ $\beta$-1,4 N-acetyl-D-glucosamine) ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบจำนวนมาก ช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น Zhang et al. (2018) รายงานว่าไคโตซานกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง สามารถเพิ่มปริมาณของคลอโรฟิลล์และเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และยังพบว่าการพ่นด้วยไคโตซานให้กับข้าวที่ได้รับอุณหภูมิสูงในระยะแตกกอทำให้ค่า SPAD ของใบข้าวสูงขึ้นกว่าข้าวที่ไม่ได้รับไคโตซาน (สุชาดา และคณะ, 2556) และกล้วยไม้แวนด้า (*Vanda coerulea*) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อได้รับไคโตซานมีคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บีและคลอโรฟิลล์รวมเพิ่มขึ้น (Nag and Kumaria, 2018) ไคโตซานยังช่วยควบคุมเมแทบอลิซึมของคาร์บอนและไนโตรเจน เร่งการสลายอาหาร นอกจากไคโตซานจะใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญในสภาวะปกติแล้ว ยังนำมาใช้บรรเทาความ

เสียหายของพืชจากสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่นเดียวกับรายงานของ Ma et al. (2012) ที่พบว่าการให้ไคโตซานแก่เมล็ดข้าวสาลีทำให้ต้นกล้าที่ได้รับความเค็มเจริญดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานช่วยเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มปริมาณสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิซึ่งสารเหล่านี้สร้างภูมิคุ้มกันให้กับพืช มีคุณสมบัติเหมือนยาป้องกันโรค ทำหน้าที่ต้านทานเชื้อสาเหตุโรคได้ ดังนั้นจึงทำให้พืชมีความแข็งแรง เจริญเติบโตได้ดี ให้ผลผลิตสูง ไคโตซานจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Katiyar et al., 2015) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูง (500 mg/l) มีผลกระตุ้นการเจริญของพรมมิได้น้อยกว่าไคโตซานความเข้มข้น 200 mg/l ทั้งนี้อาจเนื่องจากไคโตซานที่ความเข้มข้นสูงกระตุ้นปริมาณเอทธิลีนเพิ่มขึ้น (Czékus et al., 2021) และชักนำการเสื่อมตามอายุ (senescence) (Vaseva et al., 2018) และเนื่องจากไคโตซานมีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคซามีนที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบจำนวนมาก ไคโตซานที่ความเข้มข้นสูงจึงอาจทำให้เพิ่มปริมาณไนโตรเจนในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทธิลีน (Khan et al., 2015)

การศึกษาครั้งนี้ยังพบชัดเจนว่า พรมมิที่ได้รับการพ่นทางใบด้วยไคโตซานมีการแตกยอดเพิ่มขึ้น โดยไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 mg/l ทำให้พรมมิมีจำนวนยอดเพิ่มขึ้น (95.80 shoot/plant) มากกว่าชุดควบคุม (50.20 shoot/plant) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **(Table 1 และ Figure 1)** ส่วนไคโตซานความเข้มข้น 200 mg/l สามารถชักนำการแตกยอดเพิ่มขึ้นได้เช่นกันโดยให้จำนวนยอด 81.50 shoot/plant จากงานวิจัยของ Acemi et al. (2018) พบว่าไคโตซานที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ช่วยกระตุ้นการแตกยอดของผักบุ้ง (*Ipomoea purpurea*) สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแตกยอดหรือกิ่งจากซอกใบเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยเพิ่มผลผลิตพืช จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไคโตซานส่งเสริมการเจริญของพรมมิโดยกระตุ้นการแตกกิ่งแขนงของพรมมิมากขึ้น ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกับฮอร์โมนอื่น ๆ ภายในพืช เช่น ไซโตไคนิน ออกซิน และจิบเบอเรลลิน โดยเฉพาะไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนสำคัญทำหน้าที่กระตุ้นการแตกตาข้าง ตัวอย่างเช่น 6-benzylaminopurine (BAP) ช่วยกระตุ้นการแตกยอดของจิงจ้อเหลือง (*Merremia quinquefolia*) ได้ดี เนื่องจากไซโตไคนินมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ DNA การแบ่งเซลล์ และควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นใยสปินเดิล และมีรายงานเปรียบเทียบการใช้ไคโตซานและไซโตไคนินพบว่าไคโตซานสามารถชักนำการแตกยอดได้ดีมีประสิทธิภาพสูงกว่าไซโตไคนิน โดยไคโตซานทำหน้าที่เหมือนสารทำลายการพักตัวของตา (bud-breaking agent) ทำให้ตาข้างเจริญขึ้นได้ ซึ่ง Colman et al. (2019) ระบุว่าไคโตซานไมโครพาติเคิล (chitosan microparticle) กระตุ้นการทำงานของไซโตไคนินและการแสดงออกของยีน ไคโตซานยังชักนำการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ฮอร์โมนออกซินที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออกซินออกซิเดสส่งผลให้ระดับออกซินเพิ่มขึ้น (Li et al., 2019) และกระตุ้นการทำงานของออกซิน (Colman et al., 2019) นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถชักนำให้เพิ่มปริมาณของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนกระตุ้นการแบ่งเซลล์เช่นกัน (Moenne and González, 2021)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบว่าการพ่นไคโตซานให้กับพรมมิในทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อความสูงและขนาดของใบ **(Table 1 และ Figure 1)** สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chamnanmanoontham et al. (2015) ที่พบว่าการแช่เมล็ดข้าวพร้อมกับการพ่นต้นกล้า 2 ครั้งที่อายุ 2 และ 4 สัปดาห์ด้วยไคโตซานทำให้ความสูงของต้นข้าวเหลืองปะทิว (LPT123) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ถึงแม้มีรายงานก่อนหน้าว่าไคโตซานสามารถส่งเสริมการเจริญโดยเพิ่มความสูงของอ้อย (ภคพล และคณะ, 2560) และโหระพาได้ (Kim et al., 2005) และไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mg/ml ทำให้มะเขือเทศสีดามีความสูงและจำนวนใบมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Waewthongrak and Saleh, 2020) จากการศึกษาที่ผ่านมามีงานวิจัยที่ระบุว่าไคโตซานอาจไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของพืชภายใต้สภาวะปกติอย่างชัดเจน แต่มีผลกับพืชที่ได้รับความเครียด (Ma et al., 2012)

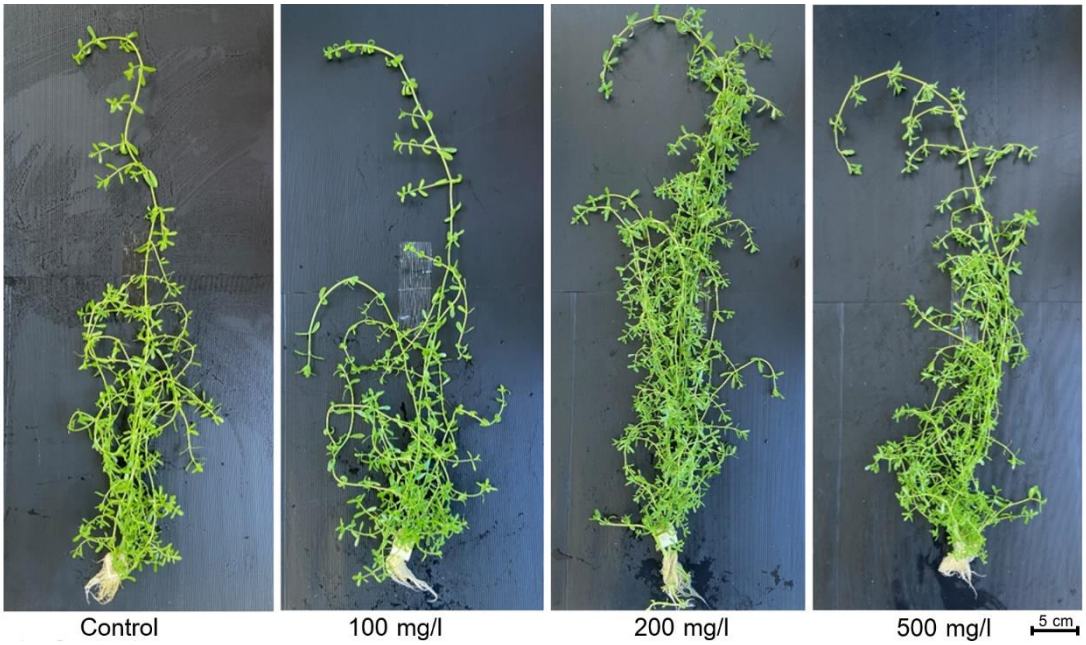


**Figure 1** Growth of six-week-old Brahmi plants grown in deep flow technique hydroponic system after treated with different concentrations of chitosan

**ไคโตซานต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์**

ปริมาณคลอโรฟิลล์หรือคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนต์เป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่นิยมวิเคราะห์เพื่อสะท้อนประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช การเจริญเติบโตและการตอบสนองของพืชต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ สำหรับไคโตซานจัดเป็นสารกระตุ้นการเจริญของพืชที่นิยมนำมาใช้ส่งเสริมให้พืชมีผลผลิตมากขึ้น จากการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอในพรมมิเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับไคโตซานในทุกความเข้มข้น โดยพบว่าไคโตซานความเข้มข้น 200 mg/l กระตุ้นให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอเพิ่มขึ้นสูงสุด (7.7 µg/gFW) ซึ่งใกล้เคียงกับพรมมิที่ได้รับไคโตซาน 100 mg/l ในทำนองเดียวกันปริมาณคลอโรฟิลล์บีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับไคโตซาน โดยเฉพาะไคโตซานความเข้มข้น 200 mg/l และ 100 mg/l รวมทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (คลอโรฟิลล์เอและบี) เพิ่มขึ้นสูงสุด (10.9 µg/gFW) ในพรมมิที่ได้รับไคโตซานความเข้มข้น 200 mg/l รองลงมาคือไคโตซานความเข้มข้น 500 mg/l (10.3 µg/gFW) ส่วนแคโรทีนอยด์พบว่าไคตานซานความเข้มข้น 200 mg/l และ 100 mg/l กระตุ้นปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นในระดับที่เท่ากัน **(Table 2)** อย่างไรก็ตามปริมาณรงควัตถุในพรมมิที่ได้รับไคโตซานเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2023) รายงานว่าการพ่นทางใบด้วยไคโตซานมีผลเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ของสมุนไพร *Pinellia ternate* แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม รวมทั้ง Al Kahtani et al. (2020) ยังพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีของพริกหวาน (sweet pepper) ที่เจริญภายใต้สภาวะปกติที่ได้รับไคโตซานไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม แต่การพ่นทางใบด้วยไคโตซานมีผลกระตุ้นให้ปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีเพิ่มขึ้นในพริกหวานที่ได้รับความเครียดเค็ม และจากการศึกษาของ Zhang et al. (2002) พบว่าไคโตซานมีผลเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นกล้าข้าวสาลีภายใต้สภาวะแล้งได้ รวมทั้ง Chamnanmanoontham et al. (2015) ยังได้แสดงให้เห็นว่าไคโตซานสามารถเพิ่มปริมาณของคลอโรฟิลล์ ทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มขึ้น ดังนั้นไคโตซานสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงทั้งสภาวะปกติและสภาวะเครียด และเพิ่มการสะสมสารอินทรีย์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตภายใต้สะภาวะเครียดได้ ซึ่งจากโครงสร้างของไคโตซานประกอบด้วยกลูโคซามีนมากกว่า 90% ที่มีหมู่อะมิโนมีผลต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ไคโตซานยังกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของรงควัตถุและการทำงานของคลอโรพลาสต์ เช่น LOC_Os09g17740 chlorophyll A-B binding protein ทำให้เพิ่มประสิทธิการสังเคราะห์ด้วยแสงและมีผลผลิตเพิ่มขึ้น (Chamnanmanoontham et al., 2015)

**Table 2** Effect of foliar application of chitosan on chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid contents of Brahmi leaves

| Concentrations of chitosan (mg/l) | Pigments (µg/gFW) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Chlorophyll a | Chlorophyll b | Chlorophyll a+b | Carotenoid |
| 0 | 7.1±0.7 | 2.9±0.3 | 9.9±0.9 | 4.0±0.4 |
| 100 | 7.6±0.9 | 3.2±0.4 | 9.7±1.3 | 4.3±0.5 |
| 200 | 7.7±1.3 | 3.3±0.6 | 10.9±2.0 | 4.3±0.7 |
| 500 | 7.3±0.7 | 3.0±0.2 | 10.3±0.8 | 4.2±0.4 |
| F-test | ns | ns | ns | ns |
| CV. (%) | 45.3 | 45.7 | 45.4 | 45.1 |

Means±SD in the same column followed by the different letters are significantly different by Tukey's multiple compare test ($P$<0.05), ns indicated not significantly different.

**ไคโตซานกระตุ้นการสะสมสารบาโคไซด์เอ**

สารบาโคไซด์เอเป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่พบในพรมมิ ซึ่งสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิในพืชทำหน้าที่ปกป้องพืชจากสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น ความเครียดแล้ง การเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคและแมลงศัตรูพืชหรืออาจเก็บไว้เป็นอาหารสะสม สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิในพืชส่วนใหญ่จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมักถูกสกัดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ จากการวิเคราะห์สารบาโคไซด์เอที่ประกอบด้วย bacoside A3, bacopaside II, bacopaside X และ bacopasaponin C ด้วยเทคนิค HPLC ในครั้งนี้ พบสาร bacoside A3 เป็นสารชนิดแรกที่ผ่านคอลัมน์ออกมาประมาณนาทีที่ 21 จากนั้นเป็น bacopaside II, bacopaside X ส่วน bacopasaponin C เป็นสารตัวสุดท้ายที่สกัดได้ในเวลาประมาณนาทีที่ 29 **(Figure 2)** การพ่นทางใบให้แก่พรมมิด้วยไคโตซานทุกความเข้มข้นกระตุ้นปริมาณ bacoside A3, bacopaside II และ bacopasaponin C และสารบาโคไซด์รวม (total bacoside) สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **(Table 3)** ส่วน bacopaside X มีเพียงไคโตซานความเข้มข้น 200 mg/l เท่านั้นที่ทำให้พรมมิมี bacopaside X มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การพ่นไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/l กระตุ้นการสะสมสารบาโคไซด์รวมได้สูงที่สุด (3.71 mg/gDW) รองลงมาคือไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 500 mg/l ให้สารบาโคไซด์รวมเท่ากับ 3.60 และ 3.47 mg/gDW ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการพ่นไคโตซานทุกความเข้มข้น (100, 200 และ 500 mg/l) มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นปริมาณสารบาโคไซด์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

การเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการเติมตัวกระตุ้นหรือใช้สารที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ เรียกวิธีนี้ว่า อิลิซิเตชั่น (elicitation) สำหรับพรมมิมีรายงานของ Sharma et al. (2015) ว่าคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ซึ่งจัดเป็นตัวกระตุ้นทางกายภาพ (abiotic elicitor) สามารถเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดย $CuSO_4$ ความเข้มข้น 45 mg/l ให้ปริมาณสารบาโคไซด์ (8.73 mg/gDW) มากกว่าชุดควบคุมประมาณ 1.42 เท่า นอกจากนี้การใช้ฮอร์โมนพืชเป็นตัวกระตุ้น เช่น เมทิลจัสโมเนทและกรดซาลิไซลิกยังช่วยเพิ่มการสร้างสารบาโคไซด์มากกว่าชุดควบคุม 2 และ 3 เท่า ตามลำดับ (Largia et al., 2015) ส่วนไคโตซานสามารถกระตุ้นการสะสมสารบาโคไซด์เนื่องจากไคโตซานจัดเป็นโมเลกุลกระตุ้นที่คล้ายเชื้อก่อโรค (pathogenassociated molecular patterns (PMAPs) มีโครงสร้างเหมือนกับผนังเซลล์ของราก่อโรค มีผลไปกระตุ้นระบบการป้องกันตัวเองและกระบวนการทางสรีวิทยาของพืช ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคและทนต่อสภาวะเครียดได้ (Li et al., 2020) เมื่อพืชได้รับตัวกระตุ้นพืชจะผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิต่าง ๆ เพื่อปกป้องตัวเองและขับไล่ศัตรูพืช จากรายงานของ Hadwiger et al. (1994) พบว่าไคโตซานชักนำการสร้างสารพิซาติน (pisatin) เป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิในกลุ่มไฟโตอะเลกซิน (phytoalexin) ทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อโรค พืชผลิตขึ้น

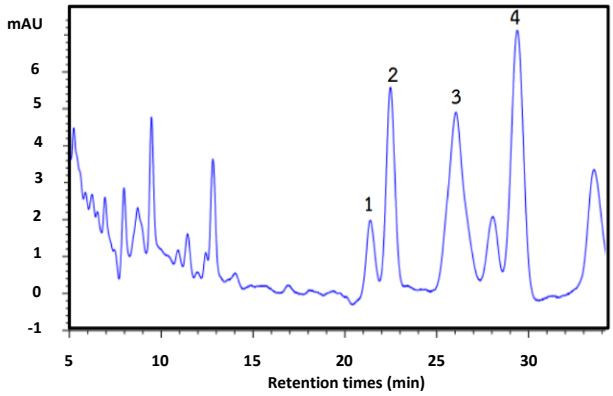


**Figure** 2 HPLC-chromatograms of control Brahmi shoot extract which show some derivatives of bacoside A; bacoside A3, bacopaside II, bacopaside x and bacopasaponin C at various retention times 21, 22, 26 and 29 min respectively. 1=bacoside A3, 2= bacopaside II, 3= bacopaside x, 4= bacopasaponin C

**Table 3** Effect of foliar application of chitosan on bacoside A accumulation

| Concentrations of chitosan (mg/l) | Bacoside A (mg/gDW) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Bacoside A3 | Bacopaside II | Bacopaside X | Bacopasaponin C | Total bacoside |
| 0 | 0.19±0.07$^{b}$ | 0.34±0.13$^{b}$ | 0.29±0.13$^{b}$ | 1.16±0.41$^{b}$ | 1.98±0.15$^{b}$ |
| 100 | 0.35±0.14$^{a}$ | 0.63±0.18$^{a}$ | 0.43±0.17$^{ab}$ | 2.19±0.54$^{a}$ | 3.60±0.92$^{a}$ |
| 200 | 0.40±0.13$^{a}$ | 0.81±0.17$^{a}$ | 0.45±0.17$^{a}$ | 2.04±0.49$^{a}$ | 3.71±0.75$^{a}$ |
| 500 | 0.41±0.15$^{a}$ | 0.80±0.25$^{a}$ | 0.43±0.14$^{ab}$ | 1.82±0.67$^{a}$ | 3.47±0.69$^{a}$ |
| F-test | ** | ** | * | ** | ** |
| CV. (%) | 46.7 | 39.4 | 53.9 | 56.7 | 41.1 |

Means±SD in the same column followed by the different letters are significantly different by Tukey's multiple compare test,

* indicated significant difference at $P<0.05$ and ** indicated significant difference at $P<0.01$

เพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นทั้งที่เป็นสิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitor) และสิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitor) สารพิซาตินยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ไคโตซานนิยมนำมาใช้เพื่อกระตุ้นการผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เช่น ไคโตซาน (150 mg/l) ที่เติมในอาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงรากของเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica*) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 hr สามารถกระตุ้นการสร้างสารพลัมบาจิน (plumbagin) ได้ (Jaisi and Panichayupakaranant, 2016) การพ่นด้วยไคโตซาน 0.03 % ให้แก่ช่ออ่อน สามารถเพิ่มสารกลุ่มโพลีฟลีนอล ได้แก่ เรสเวอราทรอล (resveratrol) และ piceid มากขึ้น 1.6 และ 3.8 เท่า ตามลำดับ (Lucini et al., 2018) นอกจากนี้ไคโตซานยังกระตุ้นการสร้างกรดโรส มารินิก (rosmarinic acid) และสารยูจีนอล (eugenol) ในโหระพาเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า และ 2.0 เท่า ตามลำดับ และไคโตซานยังมีผลต่อเอนไซม์ที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียด (oxidative stress) เช่น superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) และ catalase (CAT) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (Kim et al., 2005) ทำให้พืชแข็งแรงและเจริญเติบโตดีขึ้น ดังนั้นไคโตซานจึงจัดเป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพที่มีความปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ จึงควรนำมาใช้ในการเพิ่มผลผลิต รวมทั้งเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรต่าง ๆ และยังนำ

องค์ความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรให้เพียงพอต่อความต้องการของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิ ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับบำรุงสมอง เพิ่มความจำ ทำให้มีสมาธิ และป้องกันโรคสมองเสื่อมในประชากรของประเทศไทยที่กำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุที่คาดว่าจำนวนผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมจะมีเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

## สรุป

ไคโตซานมีผลเชิงบวกต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาพืช โดยช่วยส่งเสริมการเจริญและเพิ่มผลผลิตของพรมมิที่ปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์ได้ การปลูกพรมมิด้วยระบบไฮโดรไปนิกส์สามารถให้ผลผลิตสูงในระยะเวลาสั้นเพียง 6 สัปดาห์ และยังสามารถกระตุ้นพรมมิให้สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางการแพทย์ คือ บาโคไซด์เอโดยการใช้ตัวกระตุ้นคือไคโตซาน ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการเจริญและการสะสมสารบาโคไซด์เอ คือ 200 mg/l โดยวิธีการพ่นทางใบสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ต่อเนื่อง 5 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 2-6) สามารถเพิ่มผลผลิตให้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และการแตกยอดใหม่เพิ่มขึ้น 1.97, 2.44 และ 1.62 เท่าตามลำดับ และเพิ่มปริมาณสารบาโคไซด์เอได้ 1.87 เท่า

**คำขอบคุณ**

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณรายได้ รหัสโครงการ R2564C014

**เอกสารอ้างอิง**

กรกนก อิงคนินันท์. 2561. พรมมิ สมุนไพรบำรุงความจำ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร.

นุชนาฏ ตันสุวรรณ, ศุภชัย อำคา, กนกกร สินมา และกษิดิ์เดช ธีรนิตยาธาร. 2560. ผลของไคโตซานเพื่อเพิ่มผลผลิตและปริมาณสารทุติยภูมิในข้าว. แก่นเกษตร. 45: 1322-1327.

ภคพล สุราจร, พรไพรินทร์ รุ่งเจริญทอง, กษิดิ์เดช ธีรนิตยาธาร และศุภชัย อำคา. 2560. การให้ไคโตซานเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตคุณภาพผลผลิต และปริมาณสารทุติยภูมิในอ้อยปลูกพันธุ์ขอนแก่น 3. แก่นเกษตร. 45: 224-229.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2558. บทบาทของอีลิซิเตอร์ด้านสรีรวิทยาของพืช. วารสารดินและปุ๋ย. 37: 6-29.

สุชาดา บุญเลิศนิรันดร์, ระวีวรรณ สุวรรณศร, กิตติ บุญเลิศนิรันดร์ และประพฤติ พรหมสมบรูณ์. 2556. ผลของการฉีดพ่นไคโตซานต่อศักยภาพการให้ผลผลิตของข้าวภายใต้สภาพขาดน้ำที่ระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน. วารสารวิชาการ มทร. สุวรรณภูมิ. 1(1): 30-40.

หมออาสา แพทย์แผนไทย. 2559. พรมมิ สุดยอดสมุนไพรไทยรักษาโรคอัลไซเมอร์และบำรุงสมองชั้นเลิศ. กรุงเทพฯ.

Abdussalam, A., and P. Ratheesh-Chandra. 2009. Bio-accumulation of heavy metals in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell growing under different habitat. International Journal of Ecology and Development. 15: 66-73.

Acemi, A., B. Bayrak, M. Çakır, E. Demiryürek, E. Gün, N.E. El Gueddari, and F. Özen. 2018. Comparative analysis of the effects of chitosan and common plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth from nodal explants. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 54: 537-544.

Al Kahtani, M.D., K.A. Attia, Y.M. Hafez, N. Khan, A.M. Eid, M.A. Ali, and A.A. Khaled Abdelaal. 2020. Chlorophyll fluorescence parameters and antioxidant defense system can display salt tolerance of salt acclimated sweet pepper plants treated with chitosan and plant growth promoting rhizobacteria. Agronomy. 10(8): 1180.

Benhamou, N., P. Lafontaine, and M. Nicole. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. Phytopathology. 84(12): 1432-1444.

Chamnanmanoontham, N., W. Pongprayoon, R. Pichayangkura, S. Roytrakul, and S. Chadchawan. 2015. Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. Plant Growth Regulation. 75: 101-114.

Chen, F., Q. Li, Y. Su, Y. Lei, and C. Zhang. 2023. Chitosan spraying enhances the growth, photosynthesis, and resistance of continuous *Pinellia ternata* and promotes its yield and quality. Molecules. 28: 2053.

Colman, S.L., M.F. Salcedo, A.Y. Mansilla, M.J. Iglesias, D.F. Fiol, S. Martín-Saldaña, S. Alvarez, V.A. Chevalier, A.A. Casalongué, and C. Anahí. 2019. Chitosan microparticles improve tomato seedling biomass and modulate hormonal, redox and defense pathways. Plant Physiology and Biochemistry. 143: 203-211.

Czékus, Z., N. Iqbal, B. Pollák, A. Martics, A. Ördög, and P. Poór. 2021. Role of ethylene and light in chitosan-induced local and systemic defence responses of tomato plants. Journal of Plant Physiology. 263: 153461.

Hadwiger, L.A., T. Ogawa, and H. Kuyama. 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions. 7: 531-533.

Hussain, K., A. Abdussalam, P. Ratheesh-Chandra, and Nabeesa-salim. 2010. Bioaccumulation of heavy metals in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell growing under different habitat. International Journal of Ecology and Development. 15: 67-73.

Jaisi, A., and P. Panichayupakaranant. 2016. Increased production of plumbagin in *Plumbago indica* root cultures by biotic and abiotic elicitors. Biotechnology Letters. 38: 351-355.

Kahromi, S., and J. Khara. 2021. Chitosan stimulates secondary metabolite production and nutrient uptake in medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 101(9): 3898-3907.

Katiyar, D., A. Hemantaranjan, and B. Singh. 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. Indian Journal of Plant Physiology. 20: 1-9.

Khan, M.I.R., A. Trivellini, M. Fatma, A. Masood, A. Francini, N. Iqbal, A. Ferrante, and N.A. Khan. 2015. Role of ethylene in responses of plants to nitrogen availability. Frontiers in Plant Science. 6: 927.

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

Largia, M.J.V., G. Pothiraj, J. Shilpha, and M. Ramesh. 2015. Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa monnieri* (L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 122: 9-20.

Li, R., J. He, H. Xie, W. Wang, S.K. Bose, Y. Sun, J. Hu, and H. Yin. 2019. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). International Journal of Biological Macromolecules. 126: 91-100.

Li, K., R. Xing, S. Liu, and P. Li. 2020. Chitin and chitosan fragments responsible for plant elicitor and growth stimulator. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 68: 12203-12211.

Lucini, L., G. Baccolo, Y. Rouphael, G. Colla, L. Bavaresco, and M. Trevisan. 2018. Chitosan treatment elicited defence mechanisms, pentacyclic triterpenoids and stilbene accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) bunches. Phytochemistry. 156: 1-8.

Ma, L.J., Y.Y. Li, C.M. Yu, Y. Wang, X.M. Li, N. Li, Q. Chen, and N. Bu. 2012. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress. Protoplasma. 249: 393-399.

Maneeply, C., K. Sujipuli, and N. Kunpratum. 2018. Growth of Brahmi *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. by NFT and DFT hydroponic systems and their accumulation of saponin bacosides. NU. International Journal of Science. 15: 114-124.

Moenne, A., and A. González. 2021. Chitosan-, alginate-carrageenan-derived oligosaccharides stimulate defense against biotic and abiotic stresses, and growth in plants: A historical perspective. Carbohydrate Research. 503: 108298.

Nag, S., and S. Kumaria. 2018. *In vitro* propagation of medicinally threatened orchid *Vanda coerulea*: An improved method for the production of phytochemicals, antioxidants and phenylalanine ammonia lyase activity. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 7(4): 2973-2982.

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

No, H.K., K.S. Lee, I.D. Kim, M.J. Park, S.D. Kim, and S.P. Meyers. 2003. Chitosan treatment affects yield, ascorbic acid content, and hardness of soybean sprouts. Journal of Food Science. 68: 680-685.

Parale, A., R. Barmukh, and T. Nikam. 2010. Influence of organic supplements on production of shoot and callus biomass and accumulation of bacoside in *Bacopa monniera* (L.) Pennell. Physiology and Molecular Biology of Plants. 16: 167-175.

Phrompittayarat, W., K. Jetiyanon, S. Wittaya-Areekul, W. Putalun, H. Tanaka, I. Khan, and K. Ingkaninan. 2011. Influence of seasons, different plant parts, and plant growth stages on saponin quantity and distribution in *Bacopa monnieri*. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 33(2): 193-199.

Porra, R., W.A.A. Thompson, and P. Kriedemann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 975: 384-394.

Ramírez-Mosqueda, M.A, and L.G. Iglesias-Andreu. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 52: 154-160.

Reddy, B.M., J. Arul, P. Angers, and L. Couture. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 1208-1216.

Salimgandomi, S., and A. Shabrangi. 2016. The effect of chitosan on antioxidant activity and some secondary metabolites of *Mentha piperita* L. Journal of Pharmaceutical and Health Sciences. 4: 135-142.

Sathiyabama, M., G. Akila, and R.E. Charles. 2014. Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Sorauer. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 47: 1777-1787.

Sharma, M., A. Ahuja, R. Gupta, and S. Mallubhotla. 2015. Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. Natural Product Research. 29(8): 745-749.

Thakur, M., S. Bhattacharya, P.K. Khosla, and S. Puri. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 12: 1-12.

Vaseva, I.I., E. Qudeimat, T. Potuschak, Y. Du, P. Genschik, F.Vandenbussche, and D. Van Der Straeten. 2018. The plant hormone ethylene restricts *Arabidopsis* growth via the epidermis. Proceedings of The National Academy of Sciences. 115(17): E4130–E4139.

Waewthongrak, W., and N. Saleh. 2020. Effect of chitosan on growth of seeda tomato in vegetative stage. ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports. 23(3): 1-9.

Yin, H., X.C. Fretté, L.P. Christensen, and K. Grevsen. 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. hirtum). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60: 136-143.

Zhang, X.K., Z.L. Tang, and L. Zhan. 2002. Influence of chitosan on induction rapeseed resistance. Agricultural Science in China. 35: 287-290.

Zhang, X., K. Li, R. Xing, S. Liu, X. Chen, H. Yang, and P. Li. 2018. miRNA and mRNA expression profiles reveal insight into chitosan-mediated regulation of plant growth. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66: 3810-3822.