

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### 1. กลุ่มสารทดลอง

1.1 ออลิโกไคโตซานจากกุ้ง ขนาดโมเลกุลประมาณ 5,000 (O-5) จากบริษัท

Sigma - Aldrich

1.2 ออลิโกไคโตซานจากกุ้ง ขนาดโมเลกุลประมาณ 25,000 (O-80) จากบริษัท

นวัตกรรม จามจุรี จำกัด

1.3 ไคโตซานจากกุ้ง (Shrimp Chitosan) ขนาดโมเลกุลประมาณ 106 (SCS)

จากบริษัท Seafresh

##### 2. ตัวอย่างพืช

2.1 ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (*Oryza sativa* L. cv. PTT90071-93-8-1-1)

2.2 ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (*Oryza sativa* L. cv. PSL91014-16-1-1-5-1)

2.3 ข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง (*Oryza sativa* L. cv. KGTC82239-2)

##### 3. ตัวอย่างจุลินทรีย์

เชื้อรา *Pyricularia grisea*

##### 4. สารเคมี

|                                   |                          |
|-----------------------------------|--------------------------|
| 1. Acetic Acid                    | J.T. Baker (A.R.)        |
| 2. Acetonitrile                   | Merck (HPLC Grade)       |
| 3. Acrylamide                     | Fluka (A.R.)             |
| 4. Ammonium Persulphate           | Ajex Finechem            |
| 5. Bis-Acrylamide                 | Fluka (A.R.)             |
| 6. Bovine Serum Albumin           | Fluka BioChemika         |
| 7. Bromophenol Blue               | Ajax Finechem (Lab chem) |
| 8. Coomassie Brilliant Blue R-250 | Sigma (A.R.)             |
| 9. Copper (II) Sulfate            | Fisher Scientific (A.R.) |
| 10. Chitin                        | Fluka BioChemika         |
| 11. Chitosan From Shrimp          | Seafresh                 |

- |                                                 |                              |
|-------------------------------------------------|------------------------------|
| 12. Chitosan Low Molecular Weight (O-5)         | Sigma-Aldrich                |
| 13. Chitosan O-80                               | บริษัทนวัตกรรม จามจุรี จำกัด |
| 14. Cyanidin-3-glucoside                        | Sigma (A.R.)                 |
| 15. 3,5-Dinitrosalicylic Acid                   | Aldrich                      |
| 16. Ethanol                                     | Merck (A.R.)                 |
| 17. Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent            | Merck (A.R.)                 |
| 18. Formic Acid                                 | Lab Scan (A.R.)              |
| 19. Glycine                                     | Amresco                      |
| 20. Glycerol                                    | Fluka (A.R.)                 |
| 21. Hydrochloric Acid                           | J.T. Baker (A.R.)            |
| 22. 2-Mercaptoethanol                           | Fluka (A.R.)                 |
| 23. Methanol                                    | Merck (A.R.)                 |
| 24. <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine              | Fluka BioChemika             |
| 25. <i>N,N,N',N'</i> tetramethylethylenediamine | Bio-RAD                      |
| 26. Potato Dextrose Agar                        | BD Difco                     |
| 27. Protein Marker                              | GE Healthcare                |
| 28. Sodium Carbonate                            | QReC (A.R.)                  |
| 29. Sodium Dodecyl Sulphate                     | BDH                          |
| 30. Sodium Hydroxide                            | Merck (A.R.)                 |
| 31. Sodium Potassium Tartrate                   | Ajax Finechem (A.R.)         |
| 32. Sulfuric Acid                               | J.T. Baker (A.R.)            |
| 33. Trizma Base                                 | Riedel                       |
- 
5. อุปกรณ์และเครื่องมือ
1. Alcohol Burner
  2. Beaker
  3. Cuvette
  4. Centrifuge Tube
  5. Dropper
  6. Erlenmayer Flask

7. Graduate Cylinder
8. 0.45  $\mu\text{m}$  Membrane Filter (Nylon)
9. Microcentrifuge Tube
10. Micropipette
11. Pipette
12. Petridish
13. Rubber bulb
14. Spatula
15. Stirring Rod
16. Test Tube
17. Test Tube Rack
18. Wash Bottle
19. Loop
20. Needle
21. Analytical Balance
22. Autoclave Tommy (รุ่น ES-315)
23. Centrifuge Sorvall (รุ่น Biofuge pico และ รุ่น Legend RT+)
24. Colorimeter (Color Flex) Hunter lab
25. Digital balance Satorius (รุ่น CP 3202S)
26. Electrophoresis Atto
27. Electro Spray Ionization Mass Spectrophotometer (Micromass LCT)
28. Freezer -20°C
29. Freezer -80°C
30. High Performance Liquid Chromatography Agilent (1100 Series Shromatograph)
31. Inertsil ODS-3 Column Varian
32. Laminar Air Flow Boss Tech
33. pH Meter WTW (รุ่น InoLab pH 720)
34. Hot Plate and Magnetic Stirrer Lab.Companion (รุ่น HP-3000L)

|                                  |                                                        |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 35. UV-Visible Spectrophotometer | Shimadzu (รุ่น UV-1700 UV Probe Software Version 2.21) |
| 36. Spectrophotometer            | Thermo Spectronic (รุ่น Genesys 20)                    |
| 37. Water Bath                   | Memert (รุ่น WB 22)                                    |

## วิธีการทดลอง

### 1. ศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอลิโกไคโตซานชนิด O-5, O-80 และ SCS

#### 1.1 วิเคราะห์ค่า Degree of Deacetylation

นำอลิโกไคโตซานชนิด O-5, O-80 และ SCS น้หนัก 1 กรัม มาละลายในสารละลาย 0.25% (v/v) Acetic Acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนตลอดเวลาเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมงจะได้ Stock Solution ที่มีความเข้มข้น  $10,000 \text{ mgL}^{-1}$  จากนั้นนำสารละลายมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400 และ  $1,600 \text{ mgL}^{-1}$  นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 203 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟและคำนวณหาค่า % Degree of Deacetylation จากค่าความชันของกราฟดังสมการ

$$\% \text{ DD} = 100 - (K_x / K_{\text{SCS}}) \times 20$$

$K_x$  คือ ค่าความชันกราฟของ X

$K_{\text{SCS}}$  คือ ค่าความชันกราฟของ SCS

20 คือ หมู่อะซิทิลที่ยังเหลืออยู่ของ SCS

100 คือ หมู่อะซิทิลที่ต้องการกำจัด

#### 1.2 วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของอลิโกไคโตซานชนิด O-5, O-80 และ SCS ด้วยเทคนิค Electro Spray Ionization Mass Spectrophotometry (ESIMS)

นำอลิโกไคโตซานชนิด O-5, O-80 และ SCS ในสารละลาย 1% (v/v) Acetic Acid ความเข้มข้น  $2000 \text{ mgL}^{-1}$  อย่างละ 300 มิลลิลิตรไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Electro Spray Ionization Mass Spectrophotometer

### 2. ศึกษาผลของอลิโกไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวสางค์หยดพาลง

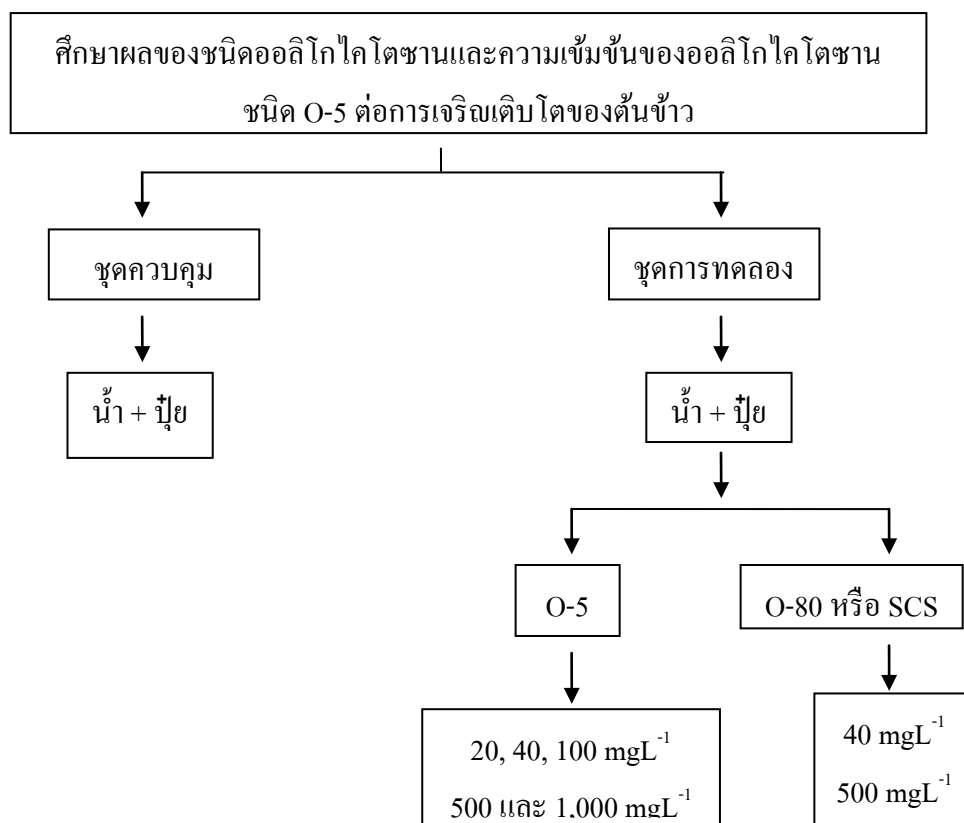
#### 2.1 การเตรียมสารละลายอลิโกไคโตซานชนิด O-5, O-80 และ SCS

นำออลิโกไคโดซานชนิด O-5, O-80 และ SCS ละลายในสารละลาย 0.25% (v/v) Acetic Acid ให้มีความเข้มข้น  $10,000 \text{ mgL}^{-1}$  จากนั้นเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

## 2.2 ผลของชนิดออลิโกไคโดซานและความเข้มข้นของออลิโกไคโดซานชนิด O-5 ต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวสัจหคัพพัทลุง

ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำสะอาด จากนั้นแช่เมล็ดข้าวในน้ำเป็นระยะเวลา 1 วันและห่อเมล็ดข้าวในผ้าขาวบางชุ่มน้ำอีกเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นจึงหว่านเมล็ดลงในกระถางปลูก (จำนวนประมาณ 50 เมล็ดต่อกระถาง) เมื่อต้นข้าวมีอายุ 1 เดือนทำการฉีดพ่นสารละลายออลิโกไคโดซาน ชนิด O-5 เข้มข้น 20, 40, 100, 500 และ  $1,000 \text{ mgL}^{-1}$  และสารละลายออลิโกไคโดซานชนิด O-80 และ SCS เข้มข้น 40 และ  $500 \text{ mgL}^{-1}$  อย่างละ 10 มิลลิลิตรด้วยความถี่ 2 สัปดาห์/ครั้งพร้อมทั้งวัดการเจริญเติบโตของต้นข้าวโดยการวัดความสูงของลำต้นซึ่งวัดจากข้อแรกของลำต้นจนถึงปลายยอดของใบ ทำการวัดจากยอดใบของต้นข้าวจำนวน 3 ใบต่อต้นข้าว 1 ต้น วัดความสูงของต้นข้าว ก่อนเริ่มฉีดพ่นและวัดความสูงของต้นข้าวอีกครั้งหลังจากฉีดพ่นแล้ว 2 สัปดาห์จากนั้นทำการวัดความสูงของต้นข้าวทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ดังนี้

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชุดควบคุม | ข้าวพันธุ์สัจหคัพพัทลุงเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 โดยให้น้ำควบคู่กับปุ๋ยสูตร 16-20-0 และสูตร 40-0-0                                                                                                                                                                                                   |
| ชุดทดลอง  | ข้าวพันธุ์สัจหคัพพัทลุงเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่กระตุ้นด้วยสารละลายออลิโกไคโดซานชนิด O-5 เข้มข้น 20, 40, 100, 500 และ $1,000 \text{ mgL}^{-1}$ ชนิด O-80 หรือ SCS เข้มข้น 40 และ $500 \text{ mgL}^{-1}$ พร้อมทั้งให้น้ำควบคู่กับปุ๋ยสูตร 16-20-0 และสูตร 40-0-0 ดังแผนผังการทดลอง (ดังภาพที่ 17) |



ภาพที่ 17 แผนผังการทดลองผลของชนิดของออลิโกไคโตซานและความเข้มข้นของ  
ออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวสังข์หยดพัทลุง

### 2.3 ผลของความถี่ในการฉีดพ่นออลิโกไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวสังข์หยดพัทลุง

ล้างเมล็ดข้าวด้วยน้ำสะอาด จากนั้นแช่เมล็ดข้าวในน้ำเป็นระยะเวลา 1 วันและห่อเมล็ดข้าวในผ้าขาวบางชุ่มน้ำอีกเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นจึงหว่านเมล็ดลงในกระถางปลูก (จำนวนประมาณ 50 เมล็ดต่อกระถาง) เมื่อต้นข้าวมีอายุ 1 เดือน ทำการฉีดพ่นสารละลายออลิโกไคโตซานชนิด O-5 เข้มข้น  $40 \text{ mgL}^{-1}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตรด้วยความถี่ 1, 2 และ 4 สัปดาห์/ครั้ง โดยชุดควบคุมใช้น้ำฉีดพ่นต้นข้าว ทำการวัดความสูงของต้นข้าวก่อนเริ่มฉีดพ่นและวัดความสูงของต้นข้าวอีกครั้งหลังจากฉีดพ่นแล้ว 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการวัดความสูงของต้นข้าวทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 1 เดือน

### 3. ศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในสารสกัดจากใบข้าว

## สังเคราะห์พัสดุ

### 3.1 การเก็บตัวอย่างใบข้าว

เลือกใบข้าวที่สมบูรณ์โดยตัดเฉพาะส่วนของใบข้าว (Leaf Blade) ทำการเก็บตัวอย่างใบข้าวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยด้วยสารละลายอลิโกไคโตซานชนิด O-5, O-80 และ SCS ในวันที่ 0, 1, 3, 5, 14 และ 28 วันของการฉีดพ่นสารละลายครั้งแรก

### 3.2 การเตรียมสารสกัดเอนไซม์

นำใบข้าวหนัก 1 กรัมมาบดเป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสารละลายบัฟเฟอร์ผสม (0.1 M Acetate Buffer pH 5 + 2.5% (v/v) 2-Mercaptoethanol + 5% (w/v) Polyvinyl polypyrrolidone) ในอัตราส่วน 1 : 3 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาหากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส

### 3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสด้วยเทคนิค Spectrophotometry

(ดัดแปลงจาก Krishnaveni, et al. (1999 : 1 - 7))

นำสารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรมาเติมสารละลาย 1.0% (w/v) Colloidal Chitin ใน Acetate Buffer pH 5.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีเป็นระยะเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic Acid (DNS) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร คั้นให้เดือดเป็นระยะเวลา 5 นาทีแล้วตั้งไว้ให้เย็น จากนั้นจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *N*-acetyl-D-glucosamine และ ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเอส โดยกำหนดให้ Specific Activity ของเอนไซม์ไคตินเอส 1 unit/mg เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินให้ เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1  $\mu\text{mol}$  ในระยะเวลา 1 นาทีต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1 มิลลิกรัม

### 3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก Lowry, Rosebrough, Farr and

Randall (1951 : 265 - 275))

#### 3.4.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

ใช้ BSA ปริมาณ 2 มิลลิกรัมมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรจะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 2 mg/mL นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6 และ 0.4 mg/mL ตามลำดับ

#### 3.4.2 การหาปริมาณของโปรตีน

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนและสารละลาย

โปรตีนมาตรฐาน BSA แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย Alkaline Copper (ภาคผนวก) ที่เตรียมขึ้นใหม่ปริมาตร 3.0 มิลลิตร วางทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent (ภาคผนวก) 0.3 มิลลิตรผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ อีกเป็นระยะเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานไปเขียนกราฟมาตรฐานของโปรตีนเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดตัวอย่างโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาเปรียบเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน BSA

### 3.5 การวิเคราะห์ลักษณะโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS - PAGE) (ดัดแปลงจาก Laemmli. (1970))

#### 3.5.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารสกัดเอนไซม์มาผสมกับ Sample Buffer สำหรับ SDS - PAGE (ภาคผนวก) ในอัตราส่วน 3 : 1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นระยะเวลา 3 นาที จากนั้นจึงทำการโหลดลงในเจลที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

#### 3.5.2 วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

แผ่นเจล (Slab Gel) ที่ใช้ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสมีขนาด 8 x 10 ซม.หนา 1 มม. ประกอบด้วย Polyacrylamide Gel 2 ส่วนคือ 4% Stacking Gel และ 10% Separating Gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 140 โวลต์เป็นระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นย้อมสีโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงและล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย Destaining จนกระทั่งเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

### 4. ศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อการป้องกันเชื้อราก่อโรคใหม่ในต้นข้าว

การทดลองชุดนี้ใช้ใบข้าวจากต้นข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง (พันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และให้เมล็ดข้าวมีสี) เปรียบเทียบกับใบข้าวจากต้นข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และให้เมล็ดข้าวไม่มีสี) และใบข้าวจากต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์ที่ต้านทานโรคไหม้) ที่ถูกกระตุ้น ด้วยออลิโกไคโตซานชนิด O-5 เข้มข้น 20, 40, 100, 500 และ 1,000 mgL<sup>-1</sup> ออลิโกไคโตซานชนิด O-80 และ SCS เข้มข้น 40 และ 500 mgL<sup>-1</sup> ฉีดพ่นด้วยความถี่ 2 สัปดาห์/ครั้งและที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย ออลิโกไคโตซาน

#### 4.1 การเตรียมเชื้อรา *Pyricularia grisea*

เลี้ยงเชื้อรา *Pyricularia grisea* บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ปฎิมาพร ปลอดภัย ภาค

วิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา) จากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์และเตรียม Spore Suspension ของเชื้อรา *Pyricularia grisea* จนได้จำนวนสปอร์อยู่ในช่วงประมาณ  $10^5$  -  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

#### 4.2 การทดสอบความต้านทานของใบข้าวต่อโรคเชื้อรากอโรไหม้

##### 4.2.1 การเตรียมใบข้าวสังข์หยดพัทลุง

เลือกใบข้าวที่มีอายุใกล้เคียงกันและไม่โดนศัตรูพืชทำลายเพื่อลดความแปรปรวน มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงนำใบข้าวไปจุ่มในสารละลาย Ethanol 70% (v/v)

##### 4.2.2 การบ่มเชื้อรา *Pyricularia grisea* ลงบนใบข้าวด้วยสปอร์ (Necrosis Test)

นำกระดาษกรองที่ขึ้นด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อวางในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นคว่ำ ใบข้าวบนกระดาษกรอง ทำการหยด Spore Suspension ของเชื้อรา *Pyricularia grisea* ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนใบข้าว โดยกำหนดให้ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสปอร์ บันทึกผลระดับ ความรุนแรงของโรคไหม้ดังแสดงในตารางที่ 5 ทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วันเพื่อเปรียบเทียบ ลักษณะ ขนาดของรอยไหม้

ตารางที่ 5 ระดับความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ (ดัดแปลงจาก Kleekron (2005 : 81))

| ระดับความรุนแรง<br>ของโรค | ลักษณะอาการ                                                                                        |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                         | ไม่ปรากฏอาการ                                                                                      |
| 1                         | ปรากฏจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กหรือปรากฏจุดสีน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่กว่าแต่บริเวณตรงกลางจุดไม่พบการสร้างสปอร์ |
| 2                         | ปรากฏจุดสีเทาอ่อนข้างกลมถึงยาวเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 - 2 มม. บริเวณขอบมีสีน้ำตาล          |
| 3                         | ปรากฏอาการโรคไหม้ขนาด 3 มม. หรือมีการติดเชื้อ 10% ของพื้นที่ใบ                                     |
| 4                         | มีการติดเชื้อโรคไหม้ 11 - 49% ของพื้นที่ใบ                                                         |
| 5                         | มีการติดเชื้อโรคไหม้ 50 - 74% ของพื้นที่ใบ                                                         |
| 6                         | มีการติดเชื้อโรคไหม้ 75 - 89% ของพื้นที่ใบ                                                         |
| 7                         | มีการติดเชื้อโรคไหม้ตั้งแต่ 90% ของพื้นที่ใบ                                                       |

## 5. ศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อผลผลิตของข้าวสาลีหัดพัทลุง

ทำการฉีดพ่นสารละลายออลิโกไคโตซานชนิด O-5 เข้มข้น 20, 40, 100, 500 และ 1,000 mgL<sup>-1</sup> ออลิโกไคโตซานชนิด O-80 และ SCS เข้มข้น 40 และ 500 mgL<sup>-1</sup> ด้วยความถี่ 2 สัปดาห์/ครั้งลงบนต้นข้าวสาลีหัดพัทลุงที่มีอายุ 2 เดือนจนกระทั่งต้นข้าวออกรวง เมื่อต้นข้าวสาลีหัดพัทลุงเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยวจึงทำการวัดผลผลิตเป็นจำนวนเมล็ดข้าวที่สมบูรณ์ต่อกอของต้นข้าวเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับออลิโกไคโตซาน

## 6. ศึกษาความเข้มของสีเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุงที่กระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซาน

### 6.1 ศึกษาความเข้มของสีเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุงด้วยเครื่องวัดสีแบบตั้งโต๊ะ Colorimeter

(Color Flex)

นำเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุงที่มีอายุ 30 วันนับจากวันที่ออกรวงของชุดควบคุมและชุดทดลองมาวางลงในจานแก้วจนเต็มจากนั้นจึงวางจานแก้วบน Point Insert เพื่อทำการวัดความเข้มสีของเมล็ดข้าวซึ่งจะแสดงค่าความเข้มสีในระบบ CIE L\* a\* b\* โดยกำหนดให้

ค่า L\* คือ ค่าความสว่าง

ค่า a\* คือ ค่าที่ใช้กำหนดความเป็นสีแดง/สีเขียว

(+ สีจะไปในทิศทางของสีแดง ; - สีจะไปในทิศทางของสีเขียว)

ค่า b\* คือ ค่าที่ใช้กำหนดความเป็นสีเหลือง/สีน้ำเงิน

(+ สีจะไปในทิศทางของสีเหลือง ; - สีจะไปในทิศทางของน้ำ

เงิน)

### 6.2 ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุง

6.2.1 การสกัดแอนโทไซยานินจากเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุง (ดัดแปลงจาก Abdel Aal and Hucl (1999 : 350 - 354))

นำเมล็ดข้าวมาผสมกับสารละลาย 1 N Hydrochloric Acid ใน Methanol (85 : 15 v/v) ในอัตราส่วน 1 : 10 น้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 1 ด้วยสารละลาย 1 N Hydrochloric Acid นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาทีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีเป็นระยะเวลา 10 นาที

**6.2.2 วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (Cyanidin-3-glucoside) ในเมล็ดข้าว  
สังข์หยดพัทลุงด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงจาก  
Kim, Hyun, Kim, Park, Kim, Kim, Lee, Chun and Chung (2007 : 4802 - 4809))**

นำสารสกัดแอนโทไซยานินจากเมล็ดข้าวสังข์หยดพัทลุงมากรองด้วย 0.45  $\mu\text{m}$  Membrane Filter (Nylon) จากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent, 1100 Series Chromatograph) Photodiode Array detector (PDA) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ChemStation V.8.04 Data โดยใช้คอลัมน์ชนิด Reversed-Phase C-18 Column (Inertsil ODS-3 Column) ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ด้วยระบบ Gradient (Gradient Mobile Phase) ในอัตราส่วนดังตารางที่ 6 ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ (Run Time) 30 นาที อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้ Cyanidin-3-glucoside เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 6 อัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ ณ เวลาต่าง ๆ

| นาทีที่ | 5% (v/v) Formic Acid (%) | 45% (v/v) Acetonitrile (%) |
|---------|--------------------------|----------------------------|
| 0-2     | 50                       | 50                         |
| 2-3     | 42.5                     | 52.5                       |
| 3-30    | 45                       | 55                         |