

คำนำ

รายงานนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ (ทุนวิจัยบัณฑิตศึกษา) ปีงบประมาณ 2556 ซึ่งรายงานการวิจัยฉบับนี้ได้สัมฤทธิ์ผลทุกประการตามวัตถุประสงค์ของโครงการที่ตั้งไว้ องค์ความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ขั้นพื้นฐานในการศึกษาผลกระทบของการป้องกันโรคใหม่ในข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรที่ปลูกข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุงในพื้นที่ภาคใต้นอกจากนี้ยังสามารถนำความรู้ที่ได้มาประยุกต์สำหรับการเรียนการสอนในระดับปริญญาตรีและระดับบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยหวังว่าข้อมูลจากโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเพิ่มผลผลิตของข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุงต่อไปในอนาคต

รองศาสตราจารย์ เกษม อัสวดีรัตน์กุล

นางสาว ธัญชนก พูนศิลป์

เมษายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ผลของออลิโกไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและกลไกการป้องกันโรคไหม้ในข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง” นี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ (ทุนวิจัยบัณฑิตศึกษา) ปีงบประมาณ 2556 ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดพัทลุง สถาบันวิจัยและพัฒนา และกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัย และให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์การวิจัยตลอดมา และขอขอบคุณบุคลากรและนิสิตในหลักสูตรวท.ม. (เคมีประยุกต์) สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยจนสามารถบรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ เกษม อัสวดีรัตน์กุล

นางสาว ธัญชนก พูนศิลป์

เมษายน 2557

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและกลไกการป้องกันตนเองในข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุงโดยให้ต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงที่มีอายุ 30 วันได้รับออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ที่ 20 40 100 500 และ 1,000 mgL⁻¹ O-80 และ SCS ที่ 40 และ 500 mgL⁻¹ เมื่อทำการทดสอบเอนไซม์ไคตินเนสในใบข้าวหลังจากฉีดพ่น 0 1 3 5 14 และ 28 วันพบว่า ความเข้มข้นและชนิดของออลิโกไคโตซานมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการชักนำการตอบสนองการป้องกันตนเองโดยต้นข้าวที่ได้รับออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ความเข้มข้น 100 mgL⁻¹ ฉีดพ่น 2 สัปดาห์/ครั้ง สามารถกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ไคตินเนสในต้นข้าวสูงสุด (22.05 x 10⁻² unit/mg) และเมื่อนำใบข้าวมาทดสอบความต้านทานต่อโรคไหม้พบว่า ต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้สามารถต้านทานเชื้อรา *Pyricularia grisea* ได้ สำหรับข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุงและพิษณุโลก 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ต้านทานโรคไหม้ที่ได้รับออลิโกไคโตซานชนิด O-5 สามารถต้านทานเชื้อรา *Pyricularia grisea* โดยลดการเกิดอาการแผลจุดดำจาก 100% เป็น 3.75% และ 50% ตามลำดับ สำหรับการศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงพิษณุโลก 2 และปทุมธานี 1 พบว่า O-5 O-80 และ SCS ที่ความเข้มข้น 20 - 40 mgL⁻¹ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นข้าวเพิ่มขึ้น 2.53 - 6.01 เท่าของชุดควบคุม เมื่อต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงเข้าสู่ระยะออกรวงพบว่าต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงที่ได้รับออลิโกไคโตซานทุกชนิด (O-5 O-80 และ SCS) ออกรวงเร็วกว่าชุดควบคุม 1 สัปดาห์และให้ผลผลิตมากกว่าชุดควบคุม โดยออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ความเข้มข้น 40 mgL⁻¹ กระตุ้นให้ต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดคิดเป็น 183 % ของชุดควบคุมจากนั้นนำเมล็ดข้าวสังข์หยดพัทลุงมาวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค spectrophotometry และ high performance liquid chromatography พบว่าต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงที่ได้รับออลิโกไคโตซานชนิด O-5 และ O-80 ความเข้มข้น 500 mgL⁻¹ มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าชุดควบคุมคิดเป็น 1.21 และ 1.18 เท่าของชุดควบคุมตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำออลิโกไคโตซานมาประยุกต์ในการควบคุมโรคไหม้ข้าว กระตุ้นการเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวสังข์หยดพัทลุง

Abstract

In this study, we examined the effect of oligochitosan on growth and self defense mechanism of Sung Yod Phatthalung rice. The 30 days of Sung Yod Phatthalung rice seedling (*Oryza sativa* L.) were treated with oligochitosan O-5 (20 40 100 500 and 1,000 mgL⁻¹) O-80 and SCS (40 and 500 mgL⁻¹). Chitinase activity in leave of rice seedlings were evaluated after 0 1 3 5 14 and 28 days of treatment. The result indicated that defense response induction of rice seedlings were affected by concentration and type of oligochitosan. The highest chitinase activity (22.05 x 10⁻² unit/mg) was observed within 5 days after oligochitosan treatment with O-5 at 100 mgL⁻¹ every 2 week. Necrosis test indicated that the leaves of Pathum Thani-1 rice seedling (blast disease resistance clone) could completely resistant against *Pyricularia grisea*. The O-5 treatment of Sung Yod Phatthalung rice seedling (sensitive clone) showed higher resistant against *P. grisea* than the Phitsanulok-2 rice seedling. Three clones of rice seedling could stimulate growth by treatment with 20-40 mgL⁻¹ of oligochitosan O-5 O-80 and SCS (2.53-6.01 fold increased when compared with the control). Interestingly, Sung Yod Phatthalung rice treated with oligochitosan started flowering 1 week earlier than the untreated control. Moreover, the highest of grain yield (1.83 fold increasing when compared with the control) was observed in oligochitosan treatment with O-5 at 40 mgL⁻¹. Total anthocyanins determination in Sung Yod Phatthalung rice by spectrophotometry and high performance liquid chromatography found that oligochitosan O-5 and O-80 at 500 mgL⁻¹ could slightly increase total anthocyanins 1.21 and 1.18 fold when compared with the control, respectively. Therefore, oligochitosans application are possibility for blast disease control, growth stimulation and total anthocyanins induction in Sung Yod Phatthalung rice plantation.

สารบัญ

บทที่	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานในการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
กรอบแนวคิดการวิจัย	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ข้าว	6
แอนโทไซยานินกับข้าวที่มีสี	13
งานวิจัยที่ทำการศึกษาด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและประโยชน์ต่อสุขภาพ ของแอนโทไซยานิน	20
โรคไหม้ข้าว	21
ไคตินและไคโตซาน.....	29
การประยุกต์ใช้ไคโตซาน.....	30
3 วิธีดำเนินการวิจัย	36
วัสดุและอุปกรณ์	36
วิธีการทดลอง	39

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	47
ศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของออลิโกไคโตซาน	47
ศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว	50
ศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในสารสกัด จากใบข้าวสับหยาบพัสดู	56
ศึกษาผลของออลิโกไคโตซานต่อการป้องกันเชื้อรากอโรคไหม้ในต้นข้าว	64
ศึกษาผลของชนิดออลิโกไคโตซานต่อผลผลิตของข้าวสับหยาบพัสดู	69
ศึกษาความเข้มข้นของสีและปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวสับหยาบพัสดู ที่ถูกกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซาน	71
5 บทย่อ สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	78
บทย่อ	78
สรุปผล	79
อภิปรายผล	82
ข้อเสนอแนะ	97
บรรณานุกรม	98
ภาคผนวก	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	คุณค่าทางโภชนาการในตัวอย่างข้าว 100 กรัม 13
2	ปริมาณแอนโทไซยานินชนิด Cyanidin-3-glucoside ในข้าวมีสีแดงพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกในประเทศไทย 14
3	ชนิดของแอนโทไซยานินที่พบในธรรมชาติ..... 17
4	โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานินและค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดโดยใช้ Acidified Methanol เป็นตัวทำละลาย..... 19
5	ระดับความรุนแรงของเชื้อโรคใหม่..... 44
6	อัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ ณ เวลาต่าง ๆ 46
7	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 203 นาโนเมตรของสารละลายอลิโกไคโตซาน ชนิด O-5, O-80 และ SCS 47
8	ผลการคำนวณหาค่า % Degree of Deacetylation ของสารละลายอลิโกไคโตซาน ชนิด O-5, O-80 และ SCS 48
9	ขนาดโมเลกุลของอลิโกไคโตซานและไคโตซาน 50
10	ความสูงต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยอลิโกไคโตซาน ชนิด O-5 ,O-80 และ SCS ในระยะเวลา 1 เดือน..... 51
11	ความสูงต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยอลิโกไคโตซาน ชนิด O-5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 1 เดือน..... 52
12	ความสูงต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยอลิโกไคโตซาน ชนิด O-5 โดยใช้ความถี่แตกต่างกันในระยะเวลา 1 เดือน..... 54
13	ผลของชนิดและความเข้มข้นของอลิโกไคโตซานต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตในต้นข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 55
14	ผลของชนิดและความเข้มข้นของอลิโกไคโตซานต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตในต้นข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 56
15	ผลของชนิดอลิโกไคโตซานต่อการกระตุ้นเอนไซม์ไคตินเอสในต้นข้าวสังข์หยดพัทลุง 57

ตารางที่	หน้า
16 ผลของออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการกระตุ้นเอนไซม์ไคตินเอสในต้นข้าวสาลีหัดพัทลุง.....	58
17 ผลของออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ความเข้มข้น 100 mgL ⁻¹ ในการกระตุ้นเอนไซม์ไคตินเอสในต้นข้าวสาลีหัดพัทลุง.....	59
18 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ด้วยความถี่แตกต่างกัน.....	60
19 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิด O-80 ด้วยความถี่แตกต่างกัน.....	61
20 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิด SCS ด้วยความถี่แตกต่างกัน	61
21 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์จากใบข้าวสาลีหัดพัทลุงที่ถูกกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิด O-5	63
22 ระดับความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้.....	64
23 การเกิดอาการแผลจุดดำที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> ระยะเวลา 7 วันบนใบข้าวสาลีหัดพัทลุงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 40 และ 500 mgL ⁻¹	65
24 การเกิดอาการแผลจุดดำที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> ระยะเวลา 7 วันบนใบข้าวสาลีหัดพัทลุงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ที่ความเข้มข้น 20-1,000 mgL ⁻¹	66
25 การเกิดอาการแผลจุดดำที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> ระยะเวลา 7 วัน บนใบข้าวปทุมธานี 1 สังกะหัดพัทลุงและพิษณุโลก 2 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ความเข้มข้น 40 mgL ⁻¹	68
26 ผลของชนิดออลิโกไคโตซานต่อการกระตุ้นผลผลิตของต้นข้าวสาลีหัดพัทลุง....	69
27 ผลของความเข้มข้นสารละลายออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ต่อการกระตุ้นผลผลิตของต้นข้าวสาลีหัดพัทลุง	70
28 ค่าสีในระบบ CIE L* a* b* ของเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุงจากต้นข้าวสาลีหัดพัทลุงที่ถูกกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิดต่าง ๆ	72
29 ค่าสีในระบบ CIE L* a* b* ของเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยออลิโกไคโตซานชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 mgL ⁻¹	72

ตารางที่	หน้า
30 ผลของชนิดออลิโกไคโตซานต่อการกระตุ้นปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวสาลีหอยคัพตุง.....	73
31 ผลของความเข้มข้นออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ต่อการกระตุ้นปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวสาลีหอยคัพตุง	75
32 การเตรียม 10% Separating Gel	113
33 การเตรียม 4% Stacking Gel	113
34 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรของสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.4-1.6 mg/mL.....	114
35 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน	115

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือก เมล็ดข้าวกล้องและเมล็ดข้าวขาวของข้าวปทุมธานี.1.....	12
2 ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือก เมล็ดข้าวกล้องและเมล็ดข้าวขาวของข้าวพิษณุโลก .2	12
3 ลักษณะข้าวเปลือก ข้าวกล้อง ข้าวซ้อมมือและข้าวขาวของข้าวสังข์หยดพัทลุง.....	12
4 Phenylpropanoid Metabolic Pathway	15
5 โครงสร้างของแอนโทไซยานิน	16
6 ลักษณะสปอร์ (Conidia) ของเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i>	22
7 การงอกของเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i>	23
8 ใบข้าวที่แสดงอาการโรคไหม้.....	23
9 ขบวนการเกิดโรคของ <i>Pyricularia grisea</i>	23
10 ลักษณะอาการโรคไหม้ในระยะต่าง ๆ ของข้าว.....	24
11 ลักษณะอาการโรคไหม้ของต้นข้าวในระยะกล้า	25
12 ลักษณะอาการโรคไหม้ของข้าวในระยะแตกกอ	25
13 ลักษณะอาการโรคไหม้ของข้าวในระยะออกรวง	26
14 กลไกการป้องกันตนเองเพื่อต่อต้านเชื้อราบนกรกในเซลล์ข้าว.....	29
15 โครงสร้างทางเคมีและปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล(Deacetylation) ของไคติน	30
16 กลไกของระบบการป้องกันตนเองของพืชแบบ SAR เมื่อพืชถูกเชื้อโรครุกราน	33
17 แผนผังการทดลองผลของชนิดของโอลิโกไคโตซานและความเข้มข้นของ โอลิโกไคโตซานชนิด O-5 ต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวสังข์หยดพัทลุง.....	41
18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 203 นาโนเมตรของสารละลายโอลิโกไคโตซาน ชนิด O-5, O-80 และ SCS	48
19 ผลการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโอลิโกไคโตซานชนิด O-5	49
20 ผลการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโอลิโกไคโตซานชนิด O-80	50
21 ผลของชนิดโอลิโกไคโตซานต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ ต้นข้าวสังข์หยดพัทลุง.....	51
22 ผลของความเข้มข้นสารละลายโอลิโกไคโตซานชนิด O-5 ต่อการกระตุ้น การเจริญเติบโตต้นข้าวสังข์หยดพัทลุง.....	53

ภาพที่	หน้า
37 ผลของชนิดออลิโกไคโตซานต่อการกระตุ้นผลผลิตในต้นข้าวสาลีหัดพัทลุง	70
38 ผลของความเข้มข้นของออลิโกไคโตซานชนิด O-5 ต่อผลผลิตข้าวสาลีหัดพัทลุง..	71
39 ผลของชนิดออลิโกไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 mgL ⁻¹ ต่อปริมาณแอนโทไซยานิน ในเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุง.....	73
40 โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน Cyanidin-3-glucoside	74
41 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุงจากต้นข้าว ในชุด Control, O-5, O-80 และ SCS ที่ความเข้มข้น 40 mgL ⁻¹	74
42 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุงจากต้นข้าว ในชุด Control, O-5, O-80 และ SCS ที่ความเข้มข้น 500 mgL ⁻¹	75
43 ผลของความเข้มข้นออลิโกไคโตซานชนิด 5-O ต่อการกระตุ้น Cyanidin-3- glucoside ในเมล็ดข้าวสาลีหัดพัทลุง	76
44 โครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ปริมาณ Cyanidin-3-glucoside ในข้าวสาลีหัดพัทลุง ชุด Control และชุดที่ถูกกระตุ้นด้วย O-5 ความเข้มข้น 20 และ 40 mgL ⁻¹	76
45 โครมาโทแกรมในการวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin-3-glucoside ในข้าวสาลีหัดพัทลุง ที่ถูกกระตุ้นด้วย O-5 ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 mgL ⁻¹	77
46 กลไกจำลองแสดงการกระตุ้นการสังเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยออลิโกไคโตซาน ในพืชชนิดอื่น ๆ	88
47 กลไกจำลองแสดงการเปลี่ยนแปลงภายในใบข้าวสาลีหัดพัทลุงเมื่อถูกกระตุ้นด้วย ออลิโกไคโตซาน	96
48 กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)	114
49 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log Molecular Weight และค่า Electrophoretic Mobility (μ) ของโปรตีนมาตรฐาน	115