ผลของไคโตซานต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและการต้านทานโรคใบไหม้ในข้าวสังข์หยดพัทลุง

Effect of Chitosan on Antioxidant Contents and Resistance of Rice Blast Disease in Sung Yod Phatthalung Rice

ศิรสิทธิ์ ศรีนวลปาน[1]* และ พรรณี อัศวตรีรัตนกุล[2]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90112

[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 90112

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านทานต่อโรคใบไหม้ในข้าวสังห์หยดพัทลุง ที่ผ่านการฉีดพ่นไคโตซานลงบนใบข้าว ความเข้มข้น 50, 100 และ 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการให้ไคโตซาน และให้ 0.025% กรดอะซีติก จากการทดลองพบว่า ไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 ppm ทำให้เมล็ดข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เป็น 220.75 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง, 2.98 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง และ 83.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนั้น เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Pyricularia grisea* แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านทานการเกิดนีโครซีส (necrosis) บนใบข้าวที่ผ่านการฉีดพ่นไคโตซานความเข้มข้น 500 ppm ได้อย่างชัดเจน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะนำไปประยุกต์ใช้เป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาข้าวให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพและการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราต่อไป

คำสำคัญ: ข้าว ไคโตซาน สารต้านอนุมูลอิสระ โรคใบไหม้

Abstract

This research was aimed to study the effect of chitosan on total polyphenol contents, anthocyanin contents, antiradical properties and resistance of rice blast disease in Sung Yod Phatthalung rice (*Oryza sativar* L.) cultivars. The chitosan was applied on rice leaves at concentrations of 50, 100 and 500 ppm compared with the control (without the chitosan and only adding a 0.025% acetic acid, respectively). The result showed that 500 ppm of chitosan could significantly increase the total polyphenol contents (220.75 mg GAE/100 g dry weight sample), anthocyanin contents (2.98 mg/100 g dry weight sample) and antiradical properties (83.15%) in the grain extracts of Sung Yod Phatthalung rice. In addition, Necrosis test on rice leaves treated with 500 ppm of chitosans clearly indicated the plant resistance againt *Pyricularia grisea*. Therefore, the future studies of chitosan activation mechanism will give more valuable information that possible to be applied in the healthy rice product development and fungal disease control.

Keywords: Rice; Chitosan; Antioxidant; Rice Blast Disease

** ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ srinuanpan.s@gmail.com โทร. 08 2429 3106*

1. บทนำ

ข้าวสังข์หยดพัทลุง เป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจังหวัดพัทลุง ซึ่งเป็นข้าวที่บ่งชี้ทางภูมิศาสตร์หรือข้าว GI (Geographical Indications) ที่มีคุณสมบัติอันโดดเด่นแตกต่างจากข้าวพันธุ์สายอื่นหลายประการทั้งในด้านรสชาติและคุณค่าทางโภชนาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีสารสีกลุ่มของแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ในปริมาณสูง เมื่อเทียบกับข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ มีรายงานวิจัยพบว่า สารแอนโทไซยานินจัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compound) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายและมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (Hu *et al*., 2003) อย่างไรก็ตาม แม้ข้าวสังข์หยดพัทลุงจะมีลักษณะอันโดดเด่นหลายประการ แต่มีข้อด้อยคือ ข้าวสังข์หยดพัทลุงเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ สาเหตุของโรคนี้เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่มีความสามารถในการทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงออกรวง และเข้าทำลายทุกส่วนของต้นข้าว (พูนศักดิ์, 2548) บริเวณที่เชื้อเข้าทำลายมากที่สุด คือ บริเวณใบและรวง (อภิชาต และคณะ, 2544) เชื้อราชนิดนี้จะแพร่ระบาดได้ดีในฤดูฝน เนื่องจากสภาพอากาศมีความชื้น เหมาะแก่การเจริญของเชื้อรา ส่งผลให้ใบมีแผลจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่กลางแผล ซึ่งสามารถลุกลามและกระจายไปทั่วบริเวณใบ ถ้ามีการระบาดที่รุนแรงจะทำให้ต้นข้าวตายในที่สุด เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีในการดูแล ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ระบบนิเวศ มีผลให้ต้นทุนการผลิตต่อไร่สูง ปัญหาด้านต้นทุนการผลิตและผลผลิตต่อไร่เป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อศักยภาพในการส่งออกข้าวของไทยในตลาดอาเซียน เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตต่อไร่ของไทยกับประเทศเพื่อนบ้าน

ไคโตซาน เป็นไบโอโพลิเมอร์จากธรรมชาติ สามารถสกัดได้จากไคตินที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิติลของไคติน ไคโตซานเป็นองค์ประกอบของสัตว์จำพวกกุ้ง หอย ปู และแมลง ตลอดจนเชื้อราและเห็ดบางชนิด ดังนั้นเมื่อไคโตซานสลายตัวจะช่วยเพิ่มธาตุอาหารให้แก่ดิน ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช และชักนำให้เกิดการต้านทานโรคในพืช ซึ่งไคโตซานสามารถกระตุ้นยีนที่สร้างภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรคในพืช (Pathogenesis) ได้แก่ Chitinase, β-glucanase, Phytoalexins, Lignins และยีนบางยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของพืช (Dzung, 2010) ปัจจุบันนิยมนำไคโตซานมาใช้ทางด้านการเกษตรมากขึ้น เนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช (เยาวพา และคณะ, 2556) สุชาดา และคณะ (2548) รายงานว่า การใช้ไคโตซานชนิดโพลิเมอร์แช่เมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ก่อนปลูกแล้วฉีดพ่นอีก 4 ครั้ง ทำให้มีการสะสมน้ำหนักแห้งช่วงหลัง และจำนวนหน่อต่อต้นเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการปลูกข้าวแล้วพ่นไคโตซานอัตรา 8 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ความยาวราก จำนวนราก ความยาวใบ และความสูงของต้นกล้าข้าวเพิ่มขึ้น (Lu *et al*, 2002) อย่างไรก็ตาม มีรายงานวิจัยน้อยมากเกี่ยวกับการใช้ไคโตซานในการเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและการต้านทานโรคใบไหม้ในข้าว ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อปริมาณแอนโทไซยานิน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง ตลอดจนนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้เป็นตัวกระตุ้น (Elicitor) ให้ต้นข้าวสังข์หยดพัทลุงสร้างภูมิ

ต้านทานและกลไกการป้องกันตนเองเพื่อต่อต้านเชื้อรา *Pyricularia grisea* ที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ รวมไปถึงการนำความรู้ที่ได้ไปเป็นทางเลือกในการควบคุมการเกิดโรคใบไหม้ในข้าว และพัฒนาข้าวให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมสารละลายไคโตซาน

ไคโตซานขนาดโมเลกุล 100 kDa และมี %DD เท่ากับ 80 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) ถูกนำไปละลายใน 0.025% กรดแอซีติก (v/v) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100 และ 500 ppm

2.2 การเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าว

ทำการปลูกข้าวสังข์หยดพัทลุงในกระถาง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุด จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดพ่นไคโตซานลงบนใบข้าวความเข้มข้น 50 ppm ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดพ่นไคโตซานลงบนใบข้าวความเข้มข้น 100 ppm ชุดการทดลองที่ 3 ฉีดพ่นไคโตซานลงบนใบข้าวความเข้มข้น 500 ppm ชุดการทดลองที่ 4 ฉีดพ่นน้ำเพียงอย่างเดียวลงบนใบข้าว ชุดการทดลองที่ 5 ฉีดพ่น 0.025% กรดแอซีติก (v/v) เพียงอย่างเดียวลงบนใบข้าว โดยทุกชุดการทดลองจะฉีดพ่นสารลงบนใบข้าวในปริมาตรที่เท่ากันคือ 100 มิลลิลิตร และมีการควบคุมปริมาณน้ำที่รดให้ในปริมาตรที่เท่ากันคือ 100 มิลลิลิตร ทุก ๆ 1 วัน เป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเมล็ดข้าวที่ได้จากการเพาะปลูก แล้วบดเมล็ดข้าวจนเป็นผงละเอียด แล้วเก็บตัวอย่างที่บดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

2.3 การสกัดสารพฤกษเคมี การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน และการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 การสกัดสารพฤกษเคมี ดัดแปลงจากวิธีของ นิพัทธา และวริพัสย์ (2553)

นำผงข้าวผสมกับกรดไฮโดรคลอริก (1.0 N) ในเมทานอล (85:15 v/v) อัตราส่วน 1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) และปรับพีเอชเท่ากับ 1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (4.0 N) นำไปเขย่าที่ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารสกัดมาหมุนเหวี่ยงที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการกรองสารสกัดด้วย Nylon Membrane filter 0.45 ไมครอน 1 ครั้ง เก็บส่วนใสไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าทำการวิเคราะห์

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีของ Yodmanee *et al.* (2011) นำสารสกัดมา 60 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-ciocalteu Reagent 1:10 (v/v) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 0.0075% สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่าง ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม โดยใช้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

2.3.3 การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน ดัดแปลงจากวิธีของ นิพัทธา และวริพัสย์ (2553)

นำสารสกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 nm และคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง ซึ่งคำนวณจากสมการ C = (A/ε) × (vol/1000) × MW × (1/น้ำหนักตัวอย่าง, กรัม) × 108 (เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน, A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้, ε คือ Molar Absorptivity, vol คือ ปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด, และ MW คือ มวลโมเลกุลของ Cyanidine-3-glucoside = 449)

2.3.4 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay

ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ใช้วิธีของธนาวัฒน์ และคณะ (2555) โดยการนำสารสกัดมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH (0.1 mM) 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้ Absolute Ethanol เป็น Blank และคำนวณหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.4 การศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ดัดแปลงจากวิธีของ Rodriuez *et al.* (2003)

ทำการบ่มเชื้อรา *Pyricularia grisea* โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น แล้วละลายเชื้อรากับน้ำปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 107 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและย้ายเชื้อรา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของไคโตซานความเข้มข้น 50, 100, 500 ppm และ 0.025% กรดอะซีติก เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมไคโตซานลงในอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา

2.5 การศึกษาการชักนำให้เกิดการต้านทานโรคใบไหม้ของต้นข้าวสังข์หยดพัทลุง หลังกระตุ้นด้วยไคโตซาน ดัดแปลงจากวิธีของ พรรณี และเกษม (2555)

ทำการบ่มสปอร์ของเชื้อราบนใบข้าวสังข์หยดพัทลุง ที่ถูกกระตุ้นด้วยไคโตซาน โดยนำสปอร์เชื้อรา *P. grisea* ที่ความเข้มข้น 107 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาหยดลงบนใบข้าวที่เตรียมไว้ แต่ละหยดมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยหยดห่างกันประมาณ 4 หยด/ตารางนิ้ว สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงไว้ในจานแก้วปราศจากเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบลักษณะและวัดขนาดของบาดแผล (Necrosis) บนใบข้าว

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 ผลของไคโตซานต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานิน

จากการศึกษาผลของไคโตซานต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานิน โดยได้ฉีดพ่นสารละลายไคโตซานที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ

คือ 50, 100 และ 500 ppm ผ่านทางใบข้าว เป็นเวลา 4 เดือน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการให้ไคโตซาน และให้ 0.025% กรดอะซีติก พบว่า การกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 ppm ให้ผลกระตุ้นดีที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้นไคโตซานที่ 100 และ 50 ppm ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งการกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถกระตุ้นให้เมล็ดข้าวมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นเป็น 220.75 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง (เพิ่มขึ้น 2.16 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) และ 2.98 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง (เพิ่มขึ้น 2.11 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับการกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ให้ปริมาณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 137.00 และ 167.83 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และยังให้ปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นเป็น 2.20 และ 2.50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าไคโตซานอาจไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์และสารพฤกษเคมีในข้าว โดยไปกระตุ้นการทำงานของ Phenylalanine Ammonialyase ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compound) ทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น (เยาวภา และคณะ, 2556) ซึ่งสอดคล้องกับ Salachna and Zawadzniska (2014) ที่รายงานว่าไคโตซานช่วยกระตุ้นกระบวนการที่สำคัญของพืชในระดับเซลล์และเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมี หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน นอกจากนั้น ธัญชนก และคณะ (2556) ยังพบว่าการใช้ไคโตซานในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นข้าว อาจทำให้เกิดการกระตุ้น Signal Transduction Pathway และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนพืช เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ให้น้ำเพียงอย่างเดียว (ไพฑูรย์, 2550)

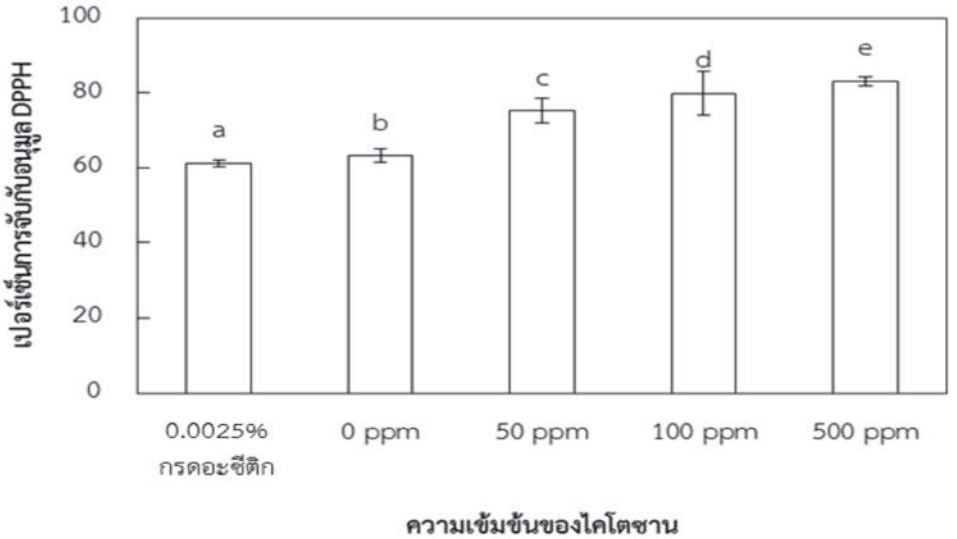
3.2 ผลของไคโตซานต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยนี้ได้เลือกวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay ในการทดสอบหาสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งรายงานผลเป็นค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และสารออกฤทธิ์สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระ พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากเมล็ดข้าวที่มีการกระตุ้นด้วยไคโตซานผ่านทางใบข้าว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยการกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 ppm ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การจับกับอนุมูล DPPH มากที่สุด รองลงมาคือ 100 และ 50 ppm ตามลำดับ ซึ่งการกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 50, 100 และ500 ppm มีค่าเปอร์เซ็นต์การจับกับอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้นเป็น 75.25, 79.95 และ 83.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คิดเป็น 1.19, 1.27 และ 1.32 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมตามลำดับ

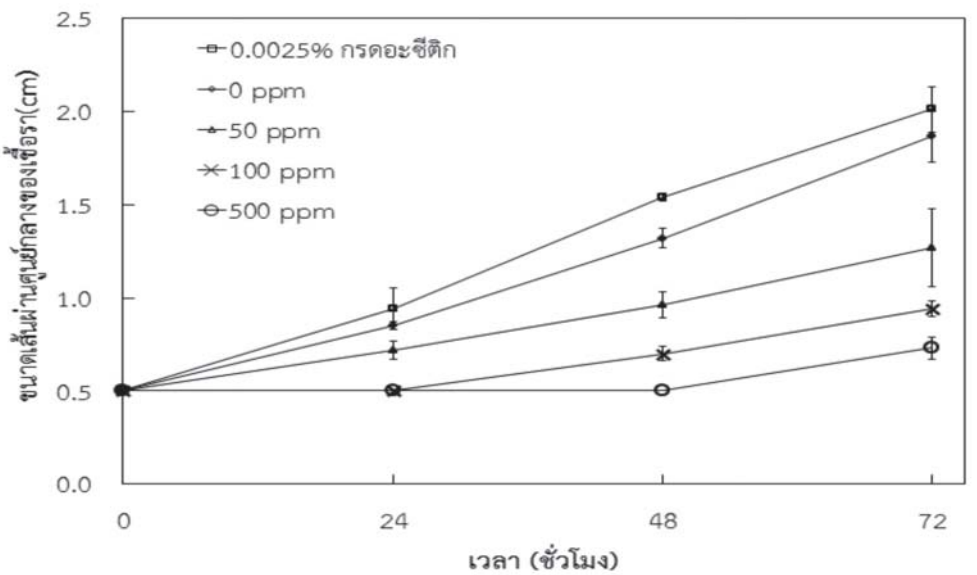
ตารางที่ 1 ผลของไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานิน

ความเข้มข้นของไคโตซาน (ppm)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง)
0.0025% กรดอะซิติก	99.92±2.87^{e}	1.34±0.15^{d}
0	102.04±8.72^{d}	1.41±0.33^{d}
50	137.00±7.60^{c}	2.20±0.08^{c}
100	167.83±2.16^{b}	2.50±0.17^{b}
500	220.75±3.17^{a}	2.98±0.11^{a}

จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กล่าวคือ ค่าเปอร์เซ็นต์การจับกับอนุมูลอิสระมาก หากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากโดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย Aromatic Ring แทนที่ด้วย Hydroxyl Group ที่สามารถใช้จับกับอนุมูลอิสรได้ (Sittikijyothin and Cherdwong charoen, 2011) ในขณะเดียวกันค่าเปอร์เซ็นต์การจับกับอนุมูลอิสระจะไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน เนื่องจากแอนโทไซยานินไม่ใช่องค์ประกอบหลักของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในเมล็ดข้าว สังข์หยดพัทลุง ทำให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่แสดงออกมานั้นอาจเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นที่พบในสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด เช่น กรดเฟอร์รูลิก กรดพารา-คูมาริก และกรดวานิลลิก เป็นต้น (Hu *et al*., 2003) ซึ่งสารที่พบเหล่านี้มีฤทธิ์ในการจับกับอนุมูล DPPH ได้ โดยสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว จะพบอยู่เฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อชั้นนอกและเนื้อเยื่อชั้นในเท่านั้น (Abdel-Aal *et al*., 2006) ดังนั้น การระบุความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโธไซยานิน จำเป็นต้องวิเคราะห์ปัจจัยหลายปัจจัยร่วมกัน เพื่อให้เกิดความแม่นยำต่อไป



รูปที่ 1 ผลของไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 2 ผลของไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea*

3.3 ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea*

เนื่องจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคใบไหม้ในข้าว ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อเกษตรกรไทยในการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวได้ลดลง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อรานี้ด้วยสารละลายไคโตซาน จึงทำการศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าว พบว่า ไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 ppm ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีที่สุด เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อราสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นดังกล่าว แต่ยังให้ผลการยับยั้งที่ดี เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ (รูปที่ 2) เช่นเดียวกับการทดลองของ Rodríguez *et al*. (2003) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นไคโตซานต่อการเจริญเส้นใยของเชื้อ *P. grisea* พบว่า ไคโตซานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 500 ppm ขึ้นไป มีผลยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อรา นอกจากนั้น Junior *et al*. (2014) ยังพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อรา *Botrytis cinerea* จะถูกยับยั้งการสร้างเส้นใยที่ความเข้มข้นของไคโตซานมากกว่า 500 ppm และจากผลการวิจัยนี้ ยังพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของไคโตซานน้อยกว่า 100 ppm ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญ อาจเกิดจากระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่น้อยเกินไป ซึ่งการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่เพิ่มขึ้น

ไคโตซานจะไปยับยั้งกระบวนการสร้างเส้นใย การสร้าง Germ Tube และการงอกของสปอร์เชื้อรา โดยการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณ Phospholipid Membrance ส่งผลให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง polycataonic ของไคโตซานกับ Electronegative Charges ของเยื้อหุ้มเซลล์ การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ (ธงชัย และคณะ, 2553) และเซลล์อยู่ในสภาวะ Oxidative Stress ทำให้เชื้อราตายได้ นอกจากนั้น ไคโตซานยังมีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับโครงสร้างดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอผิดปกติ ส่งผลต่อการสร้าง mRNA และการสร้างโปรตีน ส่งผลให้เชื้อราหยุดการเจริญ (Kauss *et al*., 1989) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 ppm ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าว

ตารางที่ 2 ขนาดของการเกิด Necrosis ที่แตกต่างกัน เมื่อบ่มใบข้าวด้วยสปอร์เชื้อรา *Pyricularia grisea* ความเข้มข้น 107 สปอร์ต่อมิลลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของการเกิด Necosis (cm)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ชุดควบคุม/น้ำกลั่น	0.00	0.00	0.00
ชุดควบคุม/เชื้อ	0.40	0.95	>1.0
ไคโตซาน 500 ppm/เชื้อ	0.20	0.20	0.30

3.4 ผลของไคโตซานต่อการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อโรคใบไหม้

ในการศึกษาไคโตซานต่อการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อโรคใบไหม้ในข้าว โดยพิจารณาจากขนาดของการเกิด Necosis ซึ่งเลือกใช้ใบข้าวที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 500 ppm มาทดสอบการเกิด Necosis เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงสังเกตเห็นนิโครซีสเกิดขึ้นบนใบข้าวที่ได้รับไคโตซาน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลได้เท่ากับ 0.2 เซนติเมตร ส่วนในใบข้าวที่ไม่ได้รับไคโตซานพบว่ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 และ 72 ชั่วโมง วัดขนาดของ เส้นผ่าศูนย์กลางบาดแผลบนใบข้าวที่ได้รับไคโตซาน 500 ppm ได้เท่ากับ 0.2 และ 0.3 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนใบข้าวที่ไม่ได้รับไคโตซานวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์ของบาดแผลได้เท่ากับ 0.95 และ >1.0 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนั้น ยังพบว่า ใบข้าวที่กระตุ้นด้วยไคโตซาน 500 ppm มีขอบของการเกิด Necosis ที่ชัดเจน โดยเซลล์บริเวณที่ติดเชื้อจะมีสีน้ำตาล ส่วนเซลล์บริเวณอื่นยังคงเป็นสีเขียว เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยไคโตซาน แสดงให้เห็นว่าเซลล์ข้าวมีการกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่ไปยังเซลล์บริเวณใกล้เคียงได้ ส่วนการเกิด necosis บนใบข้าวที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยไคโตซาน จะมีขนาดใหญ่และกว้างออกไปเรื่อย ๆ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราทำให้ใบข้าวเกิดโรคขึ้น และยังมีการเจริญของเชื้อไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ พรรณี และเกษม (2555) ที่ทำการกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อรา *P. botryosa* ด้วยไคโตซานบนใบมะละกอ นอกจากนั้นพบว่ายังมีการใช้ไคโตซานในการกระตุ้นการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อเชื้อราในพืชหลายชนิด เช่น ยางพารา (Chinnapun and Churngchow, 2006) กล้วยไม้ (Limpanavech *et al*., 2008) และดอกฟรีเซีย (Salachna and Zawadzinska, 2014) เป็นต้น โดยไคโตซานทำหน้าที่เป็น elicitor แบบ PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns) จะไปกระตุ้นกลไก Signal Transduction ภายในเซลล์ต้นข้าว ให้สังเคราะห์สารกลุ่ม PR protein (Pathogen related protein) เช่น Chitinase, Glucanase, Peroxidase หรือ Phytoalexin เพื่อไปทำลายเชื้อรา (พรรณี และเกษม, 2555)

4. สรุป

จากการศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านทานต่อโรคใบไหม้ในข้าวสังห์หยดพัทลุง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไคโตซาน ทำให้เมล็ดข้าว มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Pyricularia grisea* แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญและต้านทานการเกิดนิโครซีส (Necrosis) บนใบข้าวได้อย่างชัดเจน ที่ระดับความเข้มข้นไคโตซาน 500 ppm

5. เอกสารอ้างอิง

ธงชัย พุฒทองศิริ, กาญจนา ช้างสุวรรณ์, คันธารัตน์ สาทอง, และณัฐธิดา สระภู. (2553). การยืดอายุการเก็บเต้าหู้นมสดโดยใช้ไคโตซาน. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร.

5(2): 139-151.

ธนาวัฒน์ เพียศักดิ์, เบญจวรรณ สิงพงษ์, กัญญา เกิดศิริ และภูดิท เกิดศิริ. (2555). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชท้องถิ่น. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2555 ณ หอประชุมไพรพะยอม มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.

ธัญชนก พูนศิลป์, เกษม อัศวตรีรัตนกุล และ พรรณี อัศวตรีรัตนกุล. (2556). ผลของออลิโกไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและกลไกการป้องกันตนเองในข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 16(3): 21-28.

นิพัทธา ชาติสุวรรณ และ วริพัสย์ อารีกุล. (2553). พารามิเตอร์สี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณแอนโธไซยานินในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. (2548). เอกสารวิชาการ: ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี: กรมวิชาการเกษตร.

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล และเกษม อัศวตรีรัตนกุล. (2555). ผลของไคโตซานต่อการชักนำความต้านทานเชื้อราในต้นอ่อนมะละกอ. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 15(3): 1-6.

ไพฑูรย์ แสนบัวหลวง. (2550). ผลของไคโตซานต่อการเติบโตและปริมาณผลผลิตในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์ปทุมธานี 1. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เยาวพา จิระเกียรติกุล, ภาณุมาศ ฤทธิไชย และ กรรณิการ์ เจษฎาการุณ. (2556). ผลของไคโตซานต่อการเพิ่มจำนวนยอดขาวเย็นใต้ (*Dioscorea membrenacea*) ในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21(1): 11-18.

สุชาดา บุญเลิศนิรันดร์, กิตติ บุญเลิศนิรันดร์ และ อิสรา สุขสถาน. (2548). ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 วันที่ 1-4 ก.พ.2548. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และ ธีระยุทธ ตู้จินดา. (2544). วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย: เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

Abdel-Aal E-SM., J.C. Young, and I. Rabalski. (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(13): 4696-4704.

Abdel-Hameed, E.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. Food Chemistry, 114(4): 1271-1277.

Chinnapun, D. and N. Churngchow. (2006). Defense responses in *Hevea brasiliensis* induced by polypeptide elicitors

secreted by *Phytophthora palmivora*. Agricultural Science Journal. 37(6): 1035-1038.

Dzung, A.D., V.T.P. Khanh and T.T. Dzung. (2010). Research on impact of chitosan oligomer on biophysical characteristics, growth, development and drought resisistance of coffee. Carbohydrate Polymers. 84(2): 751-755.

Hu, C., J. Zawistowski, W. Ling and D.D. Kitts. (2003). Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(18): 5271-5277.

Junior, S.S, N.P.. Stamford, M.A.B. Lima, T.M.S. Arnaud, M.M. Pintado and B.F. Sarmento. (2014). Characterization and inhibitory activity of chitosan on hyphae growth and morphology of *Botrytis cinerea* plant pathogen. International Journal of Applied Research in Natural Products. 7(4): 31-38.

Kauss, H., W. Jeblick and A. Domard. (1989). The degrees of polymerization and N-macetilation of chitosan determine its ability elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. Planta. 178(3): 385-392.

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

Lu, J., C. Zhang, G. Hou, J. Zhang, C. Wan, G. Shen, J. Zhang, H. Zhou, Y. Zhu, and T. Hou. (2002). The biological effects of chitosan on rice growth. Acta Agriculure Shanghai. 18(4): 31-34.

Rodriguez, A.T., M.A. Ramirez, M.C. Napoles, R. Marquez, and R.M. Cardenas. (2003). Antifungal activity of chitosan and one of its hydrolysates on *Pyricularia grisea*, sacc. Fungus. Cultivos Tropicales. 24(2): 85-88.

Salachna, P and A. Zawadzinska. (2014). Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. Journal of Ecological Engineering. 15(3): 97-102.

Sittikijyothin, W. and D. Cherdwongcharoen suk. (2011). Free radical scavenging activity of seed coat extracts of sweet and sour tamarinds. Burapha Science Journal. 16(1): 47-55.

Yodmanee, S., P. Pakdeechanuan and T.T. Karrila. (2011). Physical, chemical and antioxidant properties of pigmented rice grown in Southern Thailand. International Food Research Journal. 18(3): 901-906.