รายงานการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ของการสะสมเอนไซม์ต้านทานอนุมูลอิสระและระดับการต้านทานต่อสภาวะออกซิเดทีฟในข้าวสายพันธุ์ไทยที่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้

A Study of the Relationship of Antioxidant Enzyme Accumulations and Oxidative Resistant Level Thai Rice Cultivars Infected with Blast

นางสาวกนกพร สมพรไพลิน

รุฬี ชุติไพจิตร

ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยและศึกษาในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีและสกลนครที่อนุเคราะห์สายพันธุ์ข้าว และศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานีที่อนุเคราะห์สายพันธุ์เชื้อราก่อโรคไหม้ที่ใช้สำหรับการทำวิจัยนี้

RCH
SB
191
.R5
ก124ก
ฉ.1

สชหม.....
เลขทะเบียน..... 116145
วัน,เดือน,ปี..... -2 พ.ค. 2554

b.12314122
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ(ภาษาไทย)การศึกษาความสัมพันธ์ของการสะสมเอนไซม์ต้านทานอนุมูลอิสระและระดับการต้านทานต่อสภาวะออกซิเดทีฟในข้าวสายพันธุ์ไทยที่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ) A Study of the Relationship of Antioxidant Enzyme Accumulations and Oxidative Resistant Level Thai Rice Cultivars Infected with Blast

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัดและ อีเมล์

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

สังกัดวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

(ปัจจุบันสังกัดสังกัดวิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง) E-mail: kskanokp@kmitl.ac.th

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ดร.สุธี ชุติไพรจิตร

สังกัดวิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำสำคัญ (Keywords) ข้าว, เชื้อราก่อโรคไหม้, เอนไซม์, อนุมูลอิสระ

บทคัดย่อ

ต้นกล้าข้าวที่ติดเชื้อราก่อโรคไหม้ได้นำมาใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยา (น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง) สรีรวิทยา (รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง และการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น) และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้านทานอนุมูลอิสระ (ซูเปอร์ออกไซดิสมิวเทส คะตาเลส และเปอร์ออกซิเดส) ในข้าวสายพันธุ์ไทยที่ติดเชื้อราก่อโรคไหม้ ต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทย 4 สายพันธุ์ (ข้าวสายพันธุ์สังข์หยด กล่ำ หางยี71 และปทุมธานี1) ในระยะที่มีใบที่สอง นำมาทำให้ติดเชื้อ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ด้วยสารละลายสปอร์ และเลี้ยงไว้ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าข้าวแต่ละสายพันธุ์แสดงความแตกต่างกันในการตอบสนองต่อเชื้อราก่อโรคไหม้ ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 แสดงความต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคไหม้สายพันธุ์นี้ได้สูงกว่าข้าวสายพันธุ์อื่น เมื่อศึกษาจากผลของการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา นอกจากนี้ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 ยังมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้าน อนุมูลอิสระทุกชนิดที่สูงกว่าข้าวสายพันธุ์อื่น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้านทานอนุมูลอิสระของข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 จะเพิ่มขึ้นร้อยละ 99.51 6.64 และ 26.68 สำหรับเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซดิสมิวเทส คะตาเลส และเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ ความสำคัญของเอนไซม์ที่ต้านทานอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในข้าวแต่ละสายพันธุ์แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของการต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์ไทย ข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาระบบของเอนไซม์ในการต้านทานอนุมูลอิสระ ที่จะเพิ่มการต้านทานสภาวะเครียดทางชีวภาพและใช้คัดเลือกสายพันธุ์พืชที่เหมาะสมสำหรับการเพาะปลูกภายใต้สภาวะเครียดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Rice seedlings infected with blast fungal were used for the differential study of the plant morphology (fresh and dry weight), physiology (photosynthetic pigments and lipid peroxidation) and antioxidant enzyme activity (superoxide dismutase, catalase and peroxidase) in comparing with the control. Thai rice seedlings of four cultivars (Sangyod, Khum, Hahngyi71 and Pathumthani1 cultivars) differing in their responsibility to blast fungal were infected with *Pyricularia grisea* strain 158162 spore suspensions. The second-leaves stage (7- or 8-day-old) seedlings were used to analyze blast response in the seedlings at 7 days, after inoculation with spore suspensions. Pathumthani1 cultivar presented the high blast-tolerant cultivar more than the other cultivars when observed the results of morphological and physiological change. Moreover, the Pathumthani1 cultivar showed higher activity of all antioxidant enzymes more than the other cultivars. Antioxidant enzyme activities of Pathumthani1 cultivar were increased 99.51, 6.64 and 26.68% for superoxide dismutase, catalase and peroxidase, respectively. Significant differences for enzymatic antioxidants among rice cultivars indicated towards the variation of blast tolerance in Thai rice. The data could be used to develop antioxidant enzyme system that will enhance in the biotic stress tolerance and select suitable plant cultivars for cultivation under stress conditions.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทนำ	1
วิธีการดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	5
อภิปราย/วิจารณ์	10
สรุปและเสนอแนะ	12
บรรณานุกรม	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หน้า

ภาพที่ 1 ปริมาณน้ำหนักสด (ก) และน้ำหนักแห้ง (ข) ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) 6

ภาพที่ 2 ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง: คลอโรฟิลล์เอ (ก) คลอโรฟิลล์บี (ข) และแคโรที-นอยด์ (ค) ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) 7

ภาพที่ 3 การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น โดยตรวจสอบจากปริมาณมาโลไดอัลดีไฮด์ ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) 8

ภาพที่ 4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (ก) คะตาเลส (ข) และเปอร์ออกซิเดส (ค) ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ (Introduction)

ประชากรโลกมากกว่าร้อยละ 50 บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า (family Gramineae) ซึ่งอยู่ในสกุล (genus) *Oryza* พืชพันธุ์นี้มีอยู่ประมาณ 25 ชนิด ในจำนวนนี้มีอยู่ 2 ชนิดที่ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารคือ *Oryza sativa* และ *Oryza glaberima* ข้าวปลูกมีโครโซมเป็นดิพลอยด์ (diploids) คือ 2n = 24 ข้าวป่าบางชนิดเป็นเตตระพลอยด์ (tetraploids) คือมีโครโมโซมเท่ากับ 48 โดยนักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาข้าวชนิดต่างๆพบว่าสามารถจำแนกข้าวได้ 3 กลุ่มคือ อินดิคา (*indica*) จาปอนิคา (*japonica*) และจาวานิคา (*javanica*) (อริตา อินทริน, 2543)

ประเทศแถบทวีปเอเชียเป็นบริเวณที่มีการเพาะปลูกข้าวได้มากที่สุดในโลกถึงร้อยละ 90 ซึ่งประเทศจีนและอินเดียเป็น 2 ประเทศที่ถือเป็นแหล่งผลิตข้าวที่ใหญ่ที่สุด แต่ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคภายในประเทศ ส่วนประเทศที่ส่งออกข้าวมากที่สุดในโลก คือ ประเทศไทย ข้าวมิใช่เป็นเพียงอาหารหลักที่สำคัญอย่างยิ่งของประเทศไทยแต่ยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกด้วย ประเทศไทยส่งออกข้าวได้ประมาณปีละ 7.55 ถึง 8.5 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าเฉลี่ย 2,490 ถึง 2,550 ล้านเหรียญสหรัฐฯ ประโยชน์ของข้าวนอกจากใช้บริโภคยังสามารถนำมาทำเป็นของหวานชนิดต่างๆ ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ และส่วนของรำที่ได้จากการสีข้าวก็สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ สกัดน้ำมันรำข้าว เป็นต้น ในการปลูกข้าวนี้พบว่ามีปัญหาที่สำคัญคือการติดเชื้อราก่อโรคไหม้ (blast disease) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตข้าว มีสาเหตุเกิดจากเชื้อราชื่อ *Pyricularia grisea* Cav. หรือเรียกอีกชื่อว่า *Magnaporthe grisea* โรคไหม้จะมีผลต่อปริมาณและคุณภาพของเมล็ดข้าวที่เพาะปลูก ซึ่งส่งผลต่อรายได้ของเกษตรกร

โรคไหม้ในข้าวเป็นโรคสำคัญที่มีผลกระทบต่อผลผลิตข้าวทั่วโลกอย่างมากมายมหาศาล ในทางตอนใต้ของจีนพบว่าการสูญเสียผลผลิตไปประมาณเกือบ 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลมาจากการทำลายของโรคไหม้ (Luo และคณะ 1998) ในปัจจุบันพบการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดในข้าวหลายชนิดในประเทศไทย ซึ่งส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ โรคไหม้จะมีผลให้ใบ ลำต้นต่อข้อ หรือคอรวงที่ระยะต่างๆ มีแผลจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่ตรงกลาง อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วไป ในกรณีที่เกิดโลกรุนแรง กล้าข้าวจะแห้งฟุบตาย การเข้าทำลายของเชื้อราในช่วงที่ข้าวออกรวง จะมีผลให้เมล็ดข้าวจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว จะปรากฏรอยแผลซ้ำสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวงทำให้เปราะหักง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก การเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะ ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะที่ข้าวออกรวง โดยสปอร์ของเชื้อจะสามารถฟุ้งกระจายไปในอากาศ เมื่อพบกับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์คือมีความชื้นสูง อุณหภูมิประมาณ 25 ถึง 30 องศา-เซลเซียส เมื่อสปอร์ตกบนใบข้าวโดยเฉพาะใบข้าวเปียกชื้นนานกว่า 10 ชั่วโมง สปอร์จะเริ่มงอกโดยใช้เวลาเพียง 30 ถึง 90 นาทีโดยอาศัยน้ำที่อยู่บนผิวใบในการงอกเส้นใยและสร้างแอพเพรสซอเรียมเพื่อทำหน้าที่ยึดเกาะ ในการเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้จะใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่า พรีเนเทรชั่นเพก (prenetration peg) แทงเข้าไปในใบและเจริญโดยอาศัยอาหารในใบ ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงเวลากลางคืนอุณหภูมิเย็นและมีความชื้นสูง ขบวนการตั้งแต่การงอกของสปอร์จนถึงการเข้าทำลายใบข้าวใช้เวลาทั้งสิ้น 24 ถึง 48 ชั่วโมง (Talbot และคณะ 1995; Koga และคณะ 1996; Ribot และคณะ 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปพืชจะมีกลไกการป้องกันการเกิดโรคเพื่อทำให้พืชได้รับความเสียหายจากโรคน้อยลง การป้องกันโรคของพืชอาจเกิดจากลักษณะโครงสร้างของพืชที่ทำให้เกิดการกีดขวางและยับยั้งการเข้าสู่เซลล์พืชของเชื้อก่อโรค พืชมีกลไกการสร้างสารจำพวกไฟโตอะเลคซิน (phytoalexin) ตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค มักจะพบการสะสมของสารกลุ่มนี้ปริมาณสูงในพืชที่เป็นโรค และพืชพันธุ์ที่ต้านทานโรคมีการสะสมได้รวดเร็วกว่าพันธุ์ที่เป็นไม่ต้านทาน สารเหล่านี้ได้แก่ กรดคลอโรนิค กรดคาเฟอิก และเฟลโวนอยด์ นอกจากนี้พืชยังมีกลไกส่งสัญญาณโมเลกุลทำให้เซลล์พืชจะตาย อย่างรวดเร็วหลังจากเชื้อเข้าสู่เซลล์ สัญญาณโมเลกุลมีหลายชนิดแต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันภายในเซลล์ สัญญาณโมเลกุลที่มีความสำคัญคืออนุมูลอิสระ หรือ ROS (reactive oxygen species) เป็นโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและสลายตัวอย่างรวดเร็ว จึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ซึ่งโมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัวที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Aksaranugraha, 2000) ภายในเซลล์ ถ้ามี ROS ปริมาณต่ำจะทำหน้าที่เป็นสัญญาณโมเลกุลอย่างเหมาะสม แต่ถ้ามีปริมาณที่มากเกินไปอนุมูลอิสระเหล่านี้จะสามารถทำลายองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ รวมทั้งการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เซลล์พืชถูกทำลาย (Vanloon, 1997; Izabela และ Wei, 2004)

ดังนั้นเซลล์พืชจึงต้องมีกลไกในการต้านทานต่ออนุมูลอิสระเหล่านี้ โดยการสะสมเอนไซม์ ที่ต้านทานต่ออนุมูลอิสระ (enzymatic antioxidant) เช่น ซูเปอร์ออกไซดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) คะตาเลส (catalase) เป็นต้น (Anderson,1991; Agrawal และคณะ 2003) รวมทั้งสะสมสารชนิดที่ไม่เป็นเอนไซม์ (non-enzymatic antioxidant) เช่น กลูต้าไทโอน (glutathione) แอสคอเบต (ascorbate) โทโคฟีรอล (tocopherol) เป็นต้น (Chung และคณะ 2001; Kim และ Shin, 2000; Mattice และคณะ 1998; Rimand และคณะ 2001; Kato-Noguchi และคณะ 2002) เพื่อให้เซลล์พืชนั้นสามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะเครียดจากโรคพืช (Kim และ Shin, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

การเตรียมต้นข้าวและชักนำให้เกิดโรคไหม้

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ (ข้าวสายพันธุ์สังข์หยด กล่ำ หางยี71 และปทุมธานี1) ฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่แอลกอฮอล์ร้อยละ 70 ประมาณ 2-3 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลายไฮเตอร์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 45 นาที และแช่ในสารละลายไฮเตอร์ร้อยละ 30 เป็นเวลา 30 นาทีตามลำดับ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 4 ถึง 5 ครั้ง นำเมล็ดข้าวดังกล่าวมาวางลงในอาหาร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร half-strength MS (เติมน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตร เกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.15 กรัมต่อลิตร ไฟต้าเจล 4 กรัมต่อลิตร) นำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการให้แสง 16 ชั่วโมง สภาวะมืด 8 ชั่วโมง (Jung, 2005) เมื่อข้าวเข้า สู่ระยะ 2 ใบ (อายุประมาณ 7 ถึง 8 วัน) ทำการทดลองให้ข้าวติดเชื้อราก่อโรคไหม้ (*Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162) โดยการสเปย์ (spay) สารละลายสปอร์ หลังจากนั้นนำบ่มมืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการวิเคราะห์หาการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง) และทำการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ ต่อไป

การตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

ทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณ คลอโรฟิลล์เอ บี และแคโรทีนอยด์ ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ โดยนำใบข้าวน้ำหนักสด 0.05 กรัม มาบดด้วยสารละลายไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาสกัดด้วยสารละลายอะซิโตน (acetone) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 662 644 และ 470 นาโนเมตรตามลำดับ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll A) คลอโรฟิลล์บี (chlorophyll B) และแคโรทีนอยด์ (caroteniond) ตามสูตร (Lichtenthaler, 1987; Shabala และคณะ 1998)

การวิเคราะห์ตรวจสอบการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น (Lipid peroxidation)

การวิเคราะห์ตรวจสอบการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น นำต้นข้าวแต่ละสายพันธุ์น้ำหนักสด 1.5 กรัม มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม กรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 20 และสารละลายผสมระหว่างกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 20 กับกรดไทโอบาร์ไบทูลิกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปทำให้เย็น และนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยตัวอย่างที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 600 และ 440 นาโนเมตรตามลำดับ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณตามสูตรของ Hodges (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ตรวจสอบเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ

การเตรียมสารสกัดเอนไซม์

นำต้นข้าวแต่ละสายพันธุ์น้ำหนักสด 0.5 กรัม มาบดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เย็น (พีเอช 7.8) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่มีสารไดโซเดียมเอททีลินเตตระอะซิเตทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และโพลีไวนิลโพไพโรลิโดนร้อยละ 2 นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบ เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (superoxide dismutase)

นำสารสกัดเอนไซม์เติมลงในสารละลายผสม (reaction mixture) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารพาราไนโตรบลูเตตราโซเลียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.25 ไมโครโมลาร์ สารเมทไทโอนีนความเข้มข้น 390 มิลลิโมลาร์ ไดโซเดียมเอททีลินเตตระอะซิเตทความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต 1.5 โมลาร์ และเติมไรโบฟลาวินความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ และหลังจากนั้นทำการเขย่าและวางทิ้งไว้ที่มีแสง ที่ความเข้มของแสง 300 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (Nandwal และคณะ 2006) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์-ดิสมิวเตสแสดงเป็นในหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยให้ 1 ยูนิตเท่ากับการเปลี่ยนแปลง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.1 ต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Manivannan และคณะ 2008)

การตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์คะตาเลส (catalase)

นำสารสกัดเอนไซม์เติมลงในสารละลายผสม 2.8 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 19 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร (Aebi, 1984) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสแสดงเป็นหน่วยการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แอกทินชั่น (extinction co-efficient) ที่ 36 ไมโครโมลาร์ต่อเซนติเมตร

การตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase)

นำสารสกัดเอนไซม์เติมลงในสารละลายผสม 2.95 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (พีเอช 6.0) 100 มิลลิโมลาร์ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และสารกัวไอออคอล 9 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร (Beffa และคณะ 1990) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแสดงเป็นหน่วยการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แอกทินชั่น (extinction co-efficient) ที่ 6.39 ไมโครโมลาร์ต่อเซนติเมตร

การตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีของ Bradford (1976) โดยการใช้โบวินเซรั่มอัลบูมินเป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐานโปรตีน

การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยการศึกษาทดลองครั้งนี้ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี DMRT (Duncan's new Multiple Range Test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัย (Results)

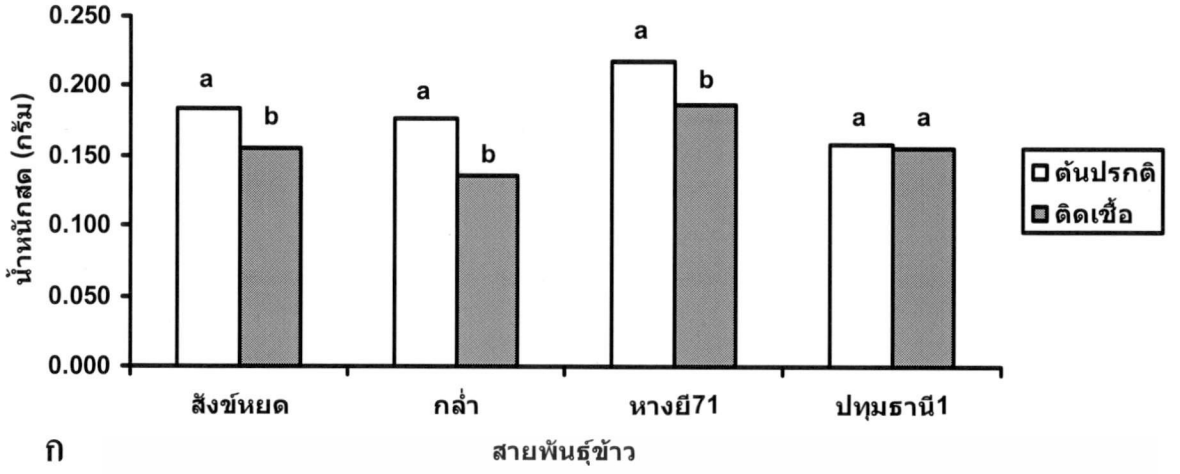
1. การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทยที่ติดเชื้อราก่อโรคไหม้

จากการทดลองโดยการนำต้นกล้าข้าวที่เข้าสู่ระยะ 2 ใบ (อายุประมาณ 7 ถึง 8 วัน) ทำการทดลองโดยให้ต้นกล้าข้าวติดเชื้อราก่อโรคไหม้ (*Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าต้นกล้าข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้ทำการทดสอบนั้นมีปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลง โดยต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 พบการลดลงของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีการลดลงอยู่ที่ร้อยละ 1.90 (0.155 กรัม) และ 9.82 (0.031 กรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ (0.158 และ 0.034 กรัม) ตามลำดับ ขณะที่ในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์หางยี71 สังข์หยด และกล่ำนั้นจะมีปริมาณน้ำหนักสดลดลงอยู่ที่ร้อยละ 14.22 15.30 และ 23.30 ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำหนักแห้งลดลงอยู่ที่ร้อยละ 12.50 14.81 และ 22.58 ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1ก และ ข)

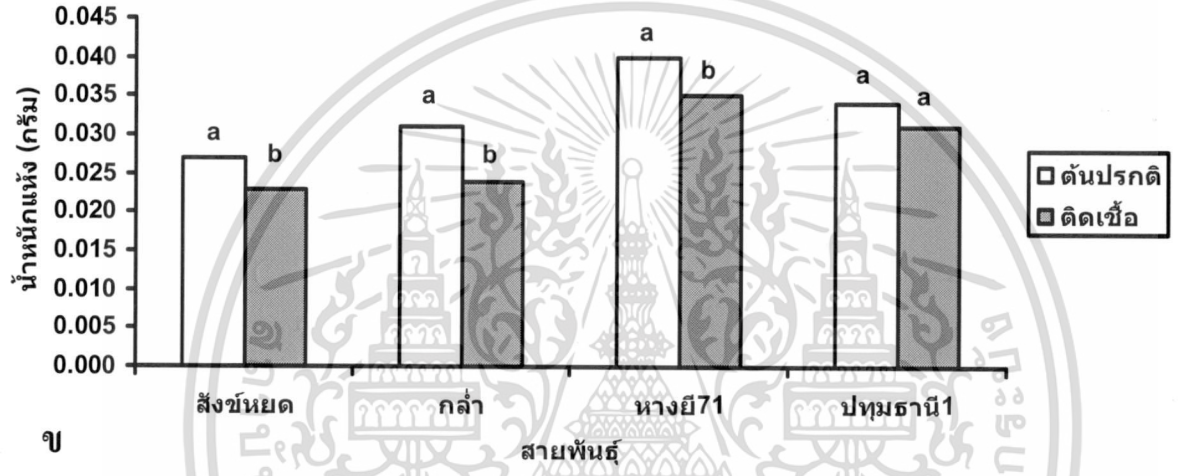
2. การศึกษาปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทยที่ติดเชื้อราก่อโรคไหม้

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทย 4 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราก่อโรคไหม้เป็นเวลา 7 วัน และทำการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง 3 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ พบว่าในต้นกล้าข้าวทุกสายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้นั้นจะมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงทั้ง 3 ชนิดลดลงในลักษณะเดียวกัน เมื่อทำการเปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ โดยพบการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคาโรทีนอยด์ที่ต่ำที่สุดในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 ที่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ ซึ่งมีการลดลงอยู่ที่ร้อยละ 12.70 (418.83 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) 10.44 (108.68 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) และ 4.36 (168.57 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ตามลำดับ ขณะที่ในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์หางยี71 สังข์หยด และกล่ำจะพบการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์เออยู่ที่ร้อยละ 14.11 18.62 และ 21.76 ตามลำดับ และการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์บีอยู่ที่ร้อยละ 12.77 13.17 และ 19.11 ตามลำดับ ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์จะพบการลดลงอยู่ที่ร้อยละ 5.47 8.95 และ 12.88 ตามลำดับ ซึ่งพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์สังข์หยด และสายพันธุ์กล่ำ (ภาพที่ 2ก ข และ ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก

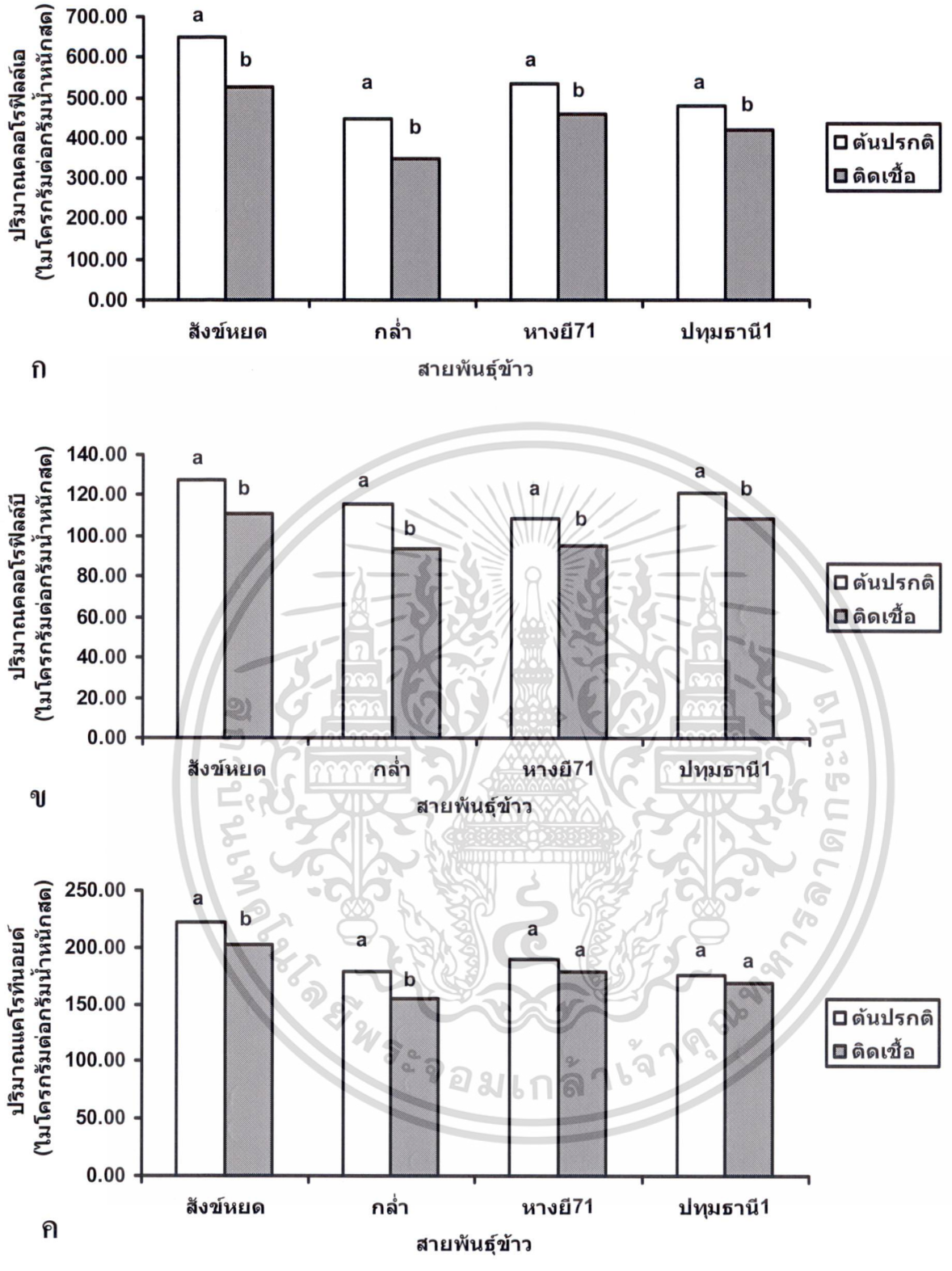


ข

ภาพที่ 1 ปริมาณน้ำหนักสด (ก) และน้ำหนักแห้ง (ข) ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



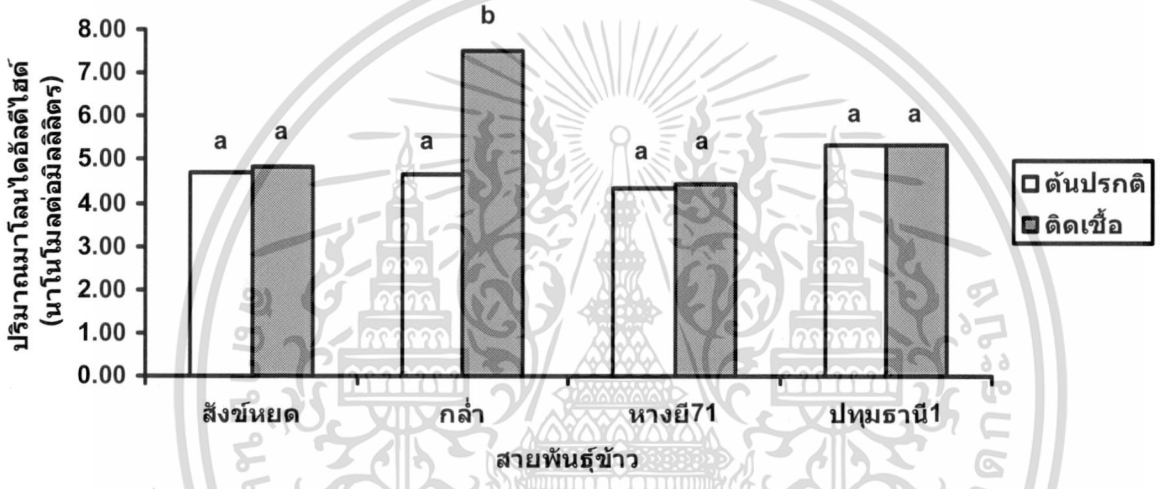
ภาพที่ 2 ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง: คลอโรฟิลล์เอ (ก) คลอโรฟิลล์บี (ข) และแคโรทีนอยด์ (ค) ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

116145

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทยที่ติดเชื้อราก่อโรคไหม้

ในการทดลองนี้ได้ทำการวัดการสะสมสารมาโลนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นที่เยื่อหุ้มเซลล์ของพืชเมื่อได้รับสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระ จากผลการทดลองจะพบว่าต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 ที่ได้รับเชื้อราที่ก่อโรคไหม้นั้นจะเกิดการสะสมมาโลนไดอัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับเชื้อที่ร้อยละ 0.38 (5.34 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร) ขณะที่ต้นกล้าข้าวสายพันธุ์หางยี 71 และสังข์หยดจะพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณมาโลนไดอัลดีไฮด์อยู่ที่ร้อยละ 2.06 และ 2.99 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณการเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าวในต้นกล้าข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ข้างต้นนั้นไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณสารมาโลนไดอัลดีไฮด์ในข้าวสายพันธุ์กล่ำนั้นพบว่ามีการเพิ่มขึ้นร้อยละ 61.08 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 3)

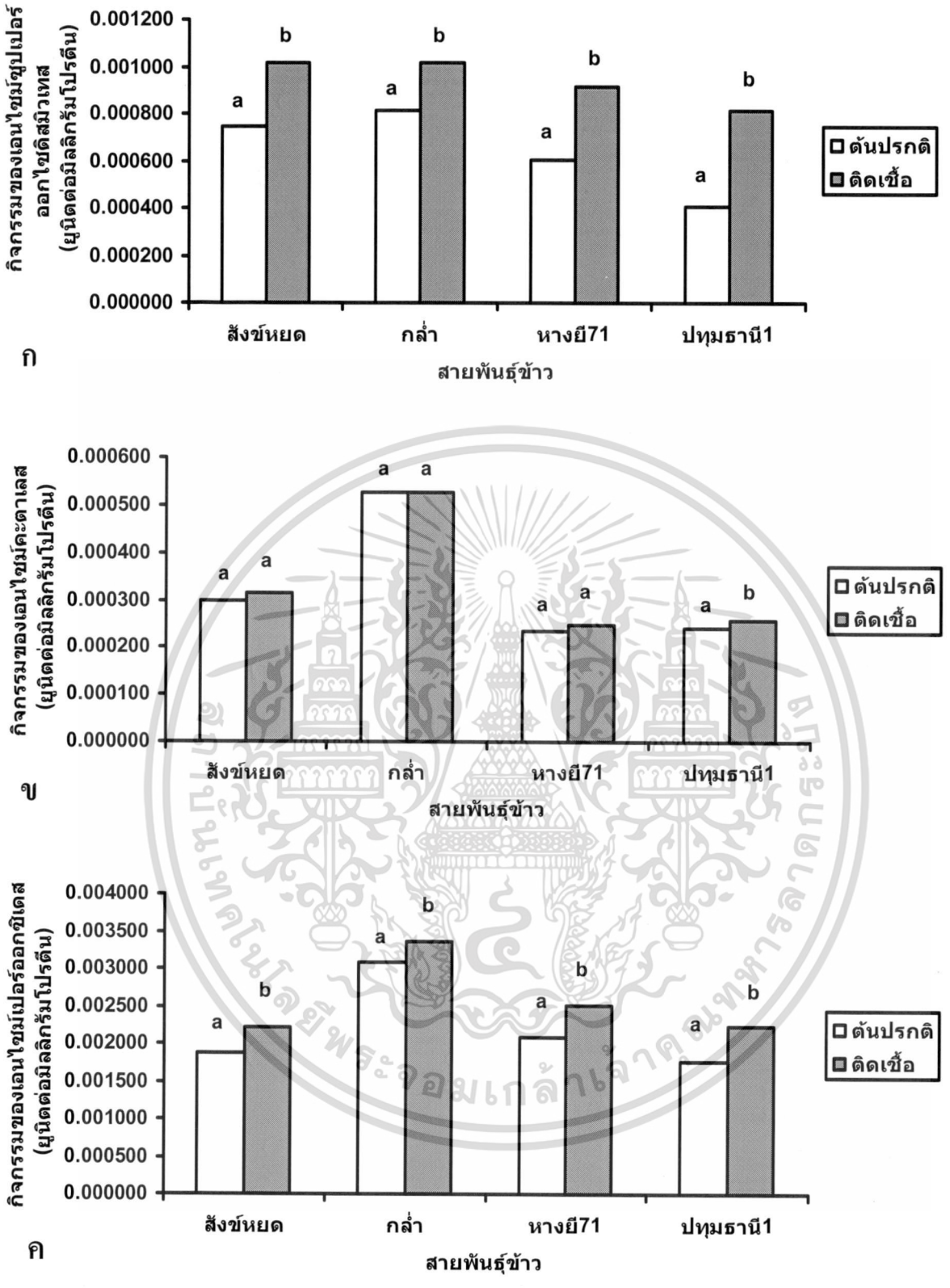


ภาพที่ 3 การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น โดยตรวจสอบจากปริมาณมาโลไดอัลดีไฮด์ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

4. การศึกษาการสะสมเอนไซม์ในการต้านทานอนุมูลอิสระในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทยที่ติดเชื้อราก่อโรคไหม้

ในการทดลองนี้ได้ทำการตรวจสอบปริมาณการสะสมเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการต้านทานต่ออนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คะตาเลส และเปอร์ออกซิเดส โดยพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการทดสอบทั้ง 3 ชนิดนั้น มีการสะสมเพิ่มขึ้นในต้นกล้าข้าวทุกสายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อราที่ก่อโรคไหม้ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับเชื้อ โดยพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คะตาเลส และเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นมากที่สุดในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 ที่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้อยู่ที่ร้อยละ 99.51 (0.00082 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) 6.64 (0.00026 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และ 26.68 (0.00224 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ตามลำดับ ขณะที่ข้าวสายพันธุ์หางยี71 สังข์หยด และกล่ำที่พบการเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสที่ร้อยละ 52.16 36.73 และ 25.12 ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสที่ร้อยละ 6.44 5.72 และ 0.38 ตามลำดับ แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบการเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ร้อยละ 20.57 17.87 และ 8.72 ตามลำดับ (ภาพที่ 4ก ข และ ค)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (ก) คะตาเลส (ข) และเปอร์ออกซิเดส (ค) ของต้นกล้าข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้และไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ค่าที่แสดงเป็นการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยที่ 5 ซ้ำ (n = 5) โดยที่ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

ในปัจจุบันพบว่าการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของข้าวนั้นมีปริมาณที่ลดลง เนื่องจากเกิดสภาวะเครียดที่เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตหรือการสร้างผลผลิตทั้งทางด้านกายภาพ และชีวภาพ โดยที่เชื้อราก่อโรคไหม้ในข้าวนั้นพบว่าเป็นหนึ่งในสภาวะเครียดทางชีวภาพที่ส่งผลต่อการเพาะปลูกข้าวในประเทศไทย จากงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ซึ่งเป็นปัจจัยพื้นฐานที่พบในการศึกษาการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่างๆ ที่ได้รับสภาวะเครียด (Bonman, 1992; Hossain และคณะ 2004) ขณะที่การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยานั้น โดยเฉพาะการลดลงของปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง จะเป็นหนึ่งในปัจจัยร่วมที่ใช้ในการศึกษาการต้านทานของพืชต่อสภาวะเครียดชนิดต่างๆ ด้วย (Barth และ Conklin 2003) จากการวิจัยนี้จะแสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงมีความแตกต่างกันภายในข้าวแต่ละสายพันธุ์ และสามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อราก่อโรคไหม้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ได้ทำมาก่อนหน้านี้ (Sudhakar และคณะ 2007)

นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะเครียดทางชีวภาพจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งจะส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระ (oxidative stress) ที่เป็นสภาวะเครียดทางกายภาพชนิดหนึ่ง ดังนั้นในการศึกษาถึงการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นนั้น สามารถศึกษาได้จากการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์-ออกซิเดชั่นที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเกิดการการเข้าทำลายของอนุมูลอิสระ (Liang และคณะ 2003; Kowalczyk และคณะ 2008) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวนั้นจะเกิดสารมาโลนไดอัลดีไฮด์สะสมขึ้นภายในเซลล์เมื่อมีการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิ-เดชั่นขึ้น การสะสมสารมาโลนไดอัลดีไฮด์ที่สูงจึงแสดงให้เห็นว่าเยื่อหุ้มเซลล์นั้นถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระได้มาก ลักษณะเช่นนี้จึงบ่งบอกได้ว่าพืชสายพันธุ์ใดสามารถต้านทานต่อการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระได้ดี (Barth และ Conklin 2003) จากงานวิจัยนี้จึงสามารถนำการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาทั้งหมดข้างต้นมาใช้เป็นปัจจัยในการวัดความสามารถ ในการต้านทานต่อสภาวะเครียดทางชีวภาพรูปแบบต่างๆ ได้ (Kovacik และคณะ 2007) และในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 มีความต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาจากปัจจัยต่างๆ ข้างต้น (ภาพที่ 1 2 และ 3)

การที่พืชได้รับสภาวะเครียดจากการสะสมอนุมูลอิสระที่เกิดจากการชักนำด้วยสภาวะเครียดทางชีวภาพในรูปแบบต่างๆนั้น พืชจำเป็นจะต้องมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ซึ่งจะทำลายโครงสร้างและออร์แกนเนลต่างๆ ภายในเซลล์ได้ (Panda, 2007) การสร้างและสะสมเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการต้านทานอนุมูล-อิสระนั้นเป็นหนึ่งในกลไกดังกล่าวที่จะทำให้พืชสามารถอยู่รอด และสร้างผลผลิตได้เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียด (Foyer และคณะ 1994; Shri และคณะ 2009) ในพืชทั่วไปนั้นจะพบการสร้างและสะสมเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์-ดิสมิวเตส คะตาเลส และเปอร์ออกซิเดส เมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะเครียดทั้งทางกายภาพและทางชีวภาพ (Gara และคณะ 2003; Singh และคณะ 2010) ในงานวิจัยนี้พบว่าต้นกล้าข้าวทุกสายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 นั้นจะมีการสะสมของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับเชื้อราก่อโรคไหม้ และพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวที่สูง ในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ที่มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคไหม้ที่ดี (ปทุมธานี1) สูงกว่าต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคไหม้ได้น้อย (หางยี71 สังข์หยด และกล่ำ) (ภาพที่ 4) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรม

ของเอนไซม์คะตาเลส และเปอร์ออกซิเดสนั้นให้ผลที่สอดคล้องกับการได้รับสภาวะเครียดทางชีวภาพในต้นข้าว-จาปอนิกา ส้ม มะเขือเทศ และพริกไทยที่ได้มีการรายงานก่อนหน้านี้ (Ueeda และคณะ 2006; Norasitpitak และคณะ 2007; Sudhakar และคณะ 2007; Hao และคณะ 2009) แต่ยังพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสที่ลดลงในต้น *Lactina sativa* สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสภาวะเครียดทางชีวภาพด้วยเช่นกัน (Sedlarova และคณะ 2007) ขณะที่การสร้างและสะสมเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในพืชภายใต้สภาวะเครียดทางชีวภาพนั้น ยังพบว่ามีการวิจัยและศึกษาอยู่ในขอบเขตที่จำกัดอยู่ (Hao และคณะ 2009) แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการต้านทานอนุมูลอิสระนั้นจะมีความแตกต่างกันในระหว่างสายพันธุ์ของพืชและชนิดของสภาวะเครียดที่พืชได้รับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง) และทางสรีรวิทยา (ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง และการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น) ในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทย 4 สายพันธุ์ต่อการติดเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 ให้ลักษณะการต้านทานต่อการติดเชื้อราก่อโรคไหม้ได้ดีที่สุด โดยทำการศึกษาจากการลดลงของปริมาณน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นที่น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าข้าวสายพันธุ์อื่น รองมาจะเป็นข้าวสายพันธุ์หางยี-71 และสังข์หยด ขณะที่ต้นกล้าข้าวสายพันธุ์กล่ำนั้นพบว่ามีการต้านทานต่อเชื้อราดังกล่าวได้น้อยที่สุด และเมื่อทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการต้านทานต่ออนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คะตาเลส และเปอร์ออกซิเดส พบว่าในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1 จะมีการเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด และมีการเพิ่มขึ้นที่ลดลง ในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคไหม้ได้น้อยลง ตามลำดับ (ข้าวสายพันธุ์หางยี71 สังข์หยด และกล่ำ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถที่จะออกฤทธิ์ในการสลายอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเข้าทำลายโดยเชื้อราก่อโรคไหม้ ส่งผลให้ต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ไทยสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อราก่อโรคไหม้ *Pyricularia grisea* สายพันธุ์ 158162 ได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (Bibliography)

อริตา อินทริน. 2543. การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์กข6 และขาวดอกมะลิ105 ในนาหว่าน. ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Method Enzym., 105: 121-126.

Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N. S. and Agrawal, V. P. 2002. Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (*OsPHGPX*) gene in seedling leaves, Gene, 283: 227-236.

Aksaranugraha, S. 2000. Free-radical production of exercise. J. Med. Chula., 47(3): 139-148.

Anderson, A. J. 1991. Phytoalexins and plant resistance. In sharma, R. P., salunkhe, D. K. (Eds.). Mycotoxins and phytoalexins. CRC Press, Boca Raton, pp. 569-594.

Barth, C., and Conklin, L. P. 2003. The lower cell density of leaf parenchyma in the *Arabidopsis thaliana* mutant lcd1-1 is associated with increased sensitivity to ozone and virulent *Pseudomonas syringae*. Plant J., 35: 206-218.

Beffa, R., Matin, H. V. and Pilet, P. E. 1990. In vitro oxidation of indoleacetic acid by soluble auxin-oxidases and peroxidase from maize root. Plant Physiol., 94: 485-491.

Bonman, J. M. 1992. Durable resistance to rice blast-environmental influences. Euphytica 63:115-123.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy. Biochem., 72: 248-254.

Chung, I. M., Ahn, J. K. and Yun, S. J., 2001. Identification of allelopathic compounds from rice (*Oryza sative* L.) straw and their biological activity. Canadian J. Plant Sci., 81: 815-819.

Foyer, C. H., Lelandais, M. and Kenert, K. J. 1994. Photooxidative stress in plants. Physiol. Plant, 92: 696-717.

Gara, L. D., Pinto, M. C., Tommasi, F. 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. Plant Physiol. Biochem., 41: 863-870.

Hao, Z. N., Wang, L. P. and Tao, R. X. 2009. Expression patterns of defence genes and antioxidant defence responses in a rice variety that is resistant to leaf blast but susceptible to neck blast. Physiol. Mol. Plant Pathol., 74: 167-174.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. and Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207: 604-611.

Hossain, M., Khalequzzaman, K. M., Mollah, M. R. A., Hussain, M. A. and Rahim, M. A. 2004. Reaction of breeding lines/cultivars of rice against brown spot and blast under field condition. Asian J. Plant Sci., 3:614-617.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Izabela, K. and Wei, Z. 2004. Transcription factor controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulator. Phytochemistry, 61: 107-114.

Jung, H. Y. 2005. The rice (*Oryza sativa*) Blast Lesion Mimic Mutant , blm, may confer resistance to blast pathogens by trigger multiple defense assosiciated singnaling pathway, J. Plant Physiol. Bio., 43: 397-406.

Kato-Noguchi, H., Ino, T., Sata, N. and Yamamura, S. 2002. Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. Physiol. Plantarum, 115: 401-405.

Kim, K. U. and Shin, D.H. 2000. Rice Allelopathy. Kyungpook National University, Taegu, pp. 57-82.

Koga, J., Howard, R. J. and Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea.* Ann. Rev. Microb., 50: 491-512.

Kovacik, J., Klejdus, B., Backor, M. and Repack, M. 2007. Phenylalaine ammoia-lyase activity and phenolic compound accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. Plant Sci., 172: 393-399.

Kowalczyk, L. P., Montillet, J. L., Agnel, J. P., Triantaphylides, C., Wielgat, B. and Maciejewska, U. 2008. Changes in the initial phase of lipid peroxidation induced by elicitor from *Phytophthora infestans* in *Solanum* species. J. Plant Physiol., 165: 1929-1939.

Liang, Y. C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. H. and Ding, R. X. 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Plant Physiol., 160: 1157-1164.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes . Methods Enzymol., 148: 350-380.

Luo, Y., Teng, P. S., Fabellar, N. G. and TeBeest, D. O. 1998. The effects of global temperature change on rice leaf blast epidermics: a simulation study in three agroecological zones. Agri. Eco. Envir., 68: 187-196.

Nandwal, A. S., Kukreja, S., Kumar, N., Sharma, K., Jain, M., Mann, A., and Singh, S. 2006. Plant water status, ethylene evolution. N_2-fixing efficiency, antioxidant activity and lipid peroxidation in *Cicer arietinum* L. nodules as affected by short-term salinization and desalinzation. J. Plant Physiol., 164: 1161-1169.

Norasitpitak, T., Petcharat, V. and Leelasuphakul, W. 2007. Time course inductions of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in wounded citrus leaves. J. Agr. Sci. 38: 1-5.

Manivannan, P., Abdul Jaleel C., Kishorekumar A., Sankar B., Somasundaram R., Panneerselvam R. 2008. Protection of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. plants from salt stress by paclobutrazol." J. Coll. Sur. B: Biointerfaces, 61: 315–318.

Mattice, J., Lavy, T., Skulman, B. and Dilday, R. 1998. Searching for allelochemicals in rice that control ducksalad. In; Olofsdotter, M., Editor, 1998. Allelopathy In Rice, Internationl Rice Research Institute, Manila, pp. 81-97.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Panda, S. K. 2007. Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. J Plant Physiol., 164:1419-1428.

Ribot, C., Hirsch, J., Balzergue, S., Tharreau, D., Notteghem, L.J., Lebrun, M.H. and Morel, B.J. 2008. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. J. Plant Physiol., 165: 114-124.

Rimand, A. M., Olofsdotter, M., Dayan, F. E. and Duke, S. O. 2001. Searching for rice allelochemicals: an example of dioassay-guided isolation. Agro. J., 93: 16-20.

Sedlarova, M., Luhova, L., Petrivalsky, M. and Lebeda, A. 2007. Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. Plant Physiol. Biochem., 45: 607-616.

Shabala, S. N., Shabala, S. I., Martynenko, A. I., Babourina, O. and Newman, I. A. 1999. Salinity effect on bioelectric activity, growth, Na^+ accumulation and chlorophyll flovorescence of maize leaves: A comparative survey and prospect for screenings. J. Plant Physiol., 25: 609-616.

Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi R. D. and Tuli, R. 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. Ecotoxicol. Environ. Saf., 72: 1102-1110.

Singh, B. K., Sharma, S. R. and Singh, B. 2010. Antioxidant enzymes in cabbage: Variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. Scientia Horti., 124: 9-13.

Sudhakar, N., Nagendra, P. D., Mohan, N., and Murugesan, K. 2007. Induction of system resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against cucumber mosaic virus by using ozone. J. Virol. Methods. 139: 71-77.

Talbot, G., Ashby, M. F., Gibson, L. J., Wegst, U. and Olive, R. 1995. The mechanical properties of natural material. I. Material property charts. Proceeding of the Royal Society A, London. 450: 123-140.

Ueeda, M., Kobota, M., and Nishi, K. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against Pytophthora blight in *Capasicum annum* cv. SCM334. Physiol. Mol. Plant Pathol., 67: 149-154.

Vanloon, L. C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. J. Plant Pathol., 103: 753-765.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้