



เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและการสลาย  
สโคพออลิตินในใบและเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อรา

*Phytophthora palmivora*

Lignifying Peroxidase and Scopoletin Peroxidase Induced in Leaves and  
Cell Suspension of *Hevea brasiliensis* by *Phytophthora palmivora*

จีระภา ชัยวงศ์

Jeerapa Chaiwong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Biochemistry  
Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์            เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและการสลาย  
สคอพอลิทินในใบและเซลล์แขวนลอยบางพาราที่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อรา  
*Phytophthora palmivora*  
ผู้เขียน                    นางสาวจีระภา ชัยวงศ์  
สาขาวิชา                ชีวเคมี

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงcharว)	.....ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงcharว)
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)	.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
	.....กรรมการ (ดร.เมธิณี รัตรสาร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสลายสคอพอลิทินและสร้างลิกนินใน  
ใบและเซลล์แขวนลอยยางพาราเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Phytophthora*  
*palmivora*

ผู้เขียน นางสาวจีระภา ชัยวงศ์  
สาขาวิชา ชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2550

### บทคัดย่อ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย เมื่อราคาน้ำยางเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้มีการขยายพื้นที่ไปบริเวณที่ไม่เคยปลูกยางพารามาก่อน มีการศึกษาเพื่อพัฒนาและวิจัยด้านต่างๆ เช่น ด้านพันธุวิทยา โรคและศัตรูยาง การดูแลรักษาสวนยาง เพื่อให้ได้ผลผลิตในระยะยาว การปลูกยางพาราต้องพิจารณาพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ และเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ปลูกนั้นๆ การต้านทานโรคของพืชเกิดจากหลายกลไก เช่น การเกิด hypersensitive cell death, การสร้าง pathogenesis related-proteins (PR-proteins), ไฟโตอเล็กซินและลิกนิน เป็นต้น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น PR-proteins ชนิดหนึ่ง พบในพืชทั่วไป มีหลายไอโซไซม์ทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น การสลายสคอพอลิทิน ซึ่งเป็นสารไฟโตอเล็กซินชนิดหนึ่งและเร่งปฏิกิริยาการสร้างลิกนิน เมื่อนำสารสกัดของใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 ในระยะ B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D มาแยกด้วยวิธี native PAGE ตรวจพบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดอะซิติก 4 ไอโซไซม์ (ไอโซไซม์ที่ 1, 2, 3 และ 4) พบไอโซไซม์ที่ 1 เพียงไอโซไซม์เดียวในใบยางระยะ B ไอโซไซม์ที่ 3 และ 4 ตรวจพบในระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D ส่วนไอโซไซม์ที่ 2 พบในระยะ D เท่านั้น แถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสปรากฏชัดเจนเมื่อใบยางมีความแก่มากขึ้น ไอโซไซม์ที่ 1 ที่พบในระยะ D เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เร็วกว่าในระยะอื่นๆ จึงเป็นไอโซไซม์ที่ใช้บ่งบอกความอ่อนแก่ของใบยางพาราได้ ในช่วงใบยางติดเชื้อในธรรมชาติ พบไอโซไซม์ที่ 2 ปรากฏชัดเจน ในขณะที่ไอโซไซม์ 3 และ 4 จางหายไป จากการนำใบยางระยะ B<sub>2</sub>-C มาทำให้เกิดบาดแผล พบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์เช่นเดียวกับใบในช่วงติดเชื้อในธรรมชาติ ใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างไอโซไซม์ที่ 2 ได้มากและเร็วกว่าในพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) และเป็นไอโซไซม์ที่เคลื่อนที่ได้ตรงกันกับไอโซไซม์เดียวที่พบในเซลล์แขวนลอย การเลือกใช้สับสเตรทต่างๆ ได้แก่ guaiacol, syringaldazine, o-dianisidine และสคอพอลิทิน สามารถบ่งบอกหน้าที่ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ ดังนี้ ไอโซไซม์ที่ 1, 3 และ 4 เป็นเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีอยู่แล้วในใบยางพาราอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน โดยไอโซไซม์ที่ 1 ทำหน้าที่สร้างทั้ง syringyl และ guaiacyl lignin ไอโซไซม์ที่ 3

และ 4 เกี่ยวข้องกับ syringyl lignin เพียงอย่างเดียว ส่วนไอโซไซม์ที่ 2 นั้นเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคทำหน้าที่สลายสคอพอลิทิน,  $H_2O_2$  และสร้าง guaiacyl lignin ภายหลังจากการนำเมลิตอ่อนของยางพารามาชักนำให้ได้เซลล์แขวนลอย ตรวจพบการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและกำจัดสารกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) ที่ถูกปล่อยออกมาจากกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ เมื่อเซลล์แขวนลอยยางพาราถูกกระตุ้นด้วย filtrate จาก *P. palmivora* ความเข้มข้นคิดเป็น 0.300 ไมโครกรัมโปรตีนต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 96 และ 104 ชั่วโมง ตามลำดับ สามารถชักนำการสังเคราะห์สคอพอลิทิน (ไฟโตอิเล็กซินในยางพารา) รวมทั้งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้สูงขึ้น ดังนี้ ชักนำการสังเคราะห์สคอพอลิทินสูงสุดที่ 80 ชั่วโมง ตรวจพบสคอพอลิทินเปอร์ออกซิเดส (S-POD) เพิ่มขึ้นที่เวลา 56 และ 80 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่จำเพาะกับ *o*-dianisidine (O-POD) พบในชั่วโมงที่ 32 และ 56 ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินคือ guaiacol (G-POD) กับ syringaldazine (Z-POD) มีการเพิ่มขึ้นที่ 32, 64 กับ 48, 72 ชั่วโมง การทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดอะซิติคในเซลล์แขวนลอยให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยผ่านคอลัมน์ ion exchange ชนิด DEAE-sepharose CL-6B ตรวจพบ 3 ไอโซไซม์ ( $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$ ) ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วย filtrate จาก *P. palmivora* เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคในยางพารา มีค่า  $K_m$  ของ  $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$  เท่ากับ 0.27, 0.71, 0.91 มิลลิโมลาร์ (*o*-dianisidine), 0.23, 0.26, 0.39 มิลลิโมลาร์ (สคอพอลิทิน), วัตไม้ไต้, 4.17, 3.92 มิลลิโมลาร์ (guaiacol) และ 0.12, 0.02, 0.29 มิลลิโมลาร์ (syringaldazine) ตามลำดับ ทำปฏิกิริยาเหมาะสมที่ pH 6.0, 5.0 และ 5.0 ตามลำดับ มีความเสถียรในช่วง pH 7.0-10.0 และสามารถคงความว่องไวได้ที่อุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส สารเคมีบางชนิด ได้แก่  $NaN_3$ ,  $\beta$ -Me และ DTT สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของ  $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$  ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ NaCl, SDS และ citric acid ช่วยเพิ่มกิจกรรมของ  $POD_1$  แต่จะยับยั้งกิจกรรมของ  $POD_2$  และ  $POD_3$

Thesis Title      Lignifying Peroxidase and Scopoletin Peroxidase in Leaves and Cell  
                         Suspension of *Hevea brasiliensis* induced by *Phytophthora palmivora*  
Author              Miss Jeerapa Chaiwong  
Major Program    Biochemistry  
Academic Year    2007

### **Abstract**

*Hevea brasiliensis* (rubber tree) is an important economic plant in Thailand. A higher cost of rubber latex causes expansion of land for growth. Researchers have studied and developed such as cultivar selection, disease and pest protection and look after for sustainable rubber plantation to obtain higher yield rubber latex. The growth of rubber depends on weather condition in each country and the resistant cultivar will be selected to propagate in the suitable area. Induced disease resistance in plant is based on multiple mechanisms such as hypersensitive cell death, biosynthesis of pathogenesis related-proteins (PR-proteins), phytoalexins and lignin. Peroxidase (POD) is one of the PR-proteins that found in most plants with several functions. Some peroxidases are involved in degradation of scopoletin (a phytoalexin) and some are related to the biosynthesis of lignin. To analyze the defense process of *Hevea*, four different stages of BPM-24 leaves (B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C, and D of ages) were used. Four POD isozymes (1, 2, 3 and 4) were found in leaf extract, however only isozyme 1 was found in stage B. The isozymes 3 and 4 increased in stage B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C and D, while the isozyme 2 was found only in stage D. Not only the intensity of POD isozymes increasing in correlation with the age of leaves, the isozyme 1 of stage D also moved in electric field slower than that of the other stages, therefore it may be used as marker of age in *Hevea brasiliensis* leaves. The isozyme 2 was increased in naturally infected leaves of *Hevea*, whereas the isozymes 3 and 4 were decreased. The same phenomenon was occurred in *Hevea* leaves after wounding and the rate including intensity of this induced POD isozyme in resistant cultivar was significantly higher than that in the susceptible cultivar. Only one band with similar mobility to isozyme 2 was observed in *Hevea* cell suspension. After scopoletin, *o*-dianisidine, guaiacol and syringaldazine were used to stain for POD activity; the results showed that isozymes 1, 3 and 4 localized in leaf were involved in lignin biosynthesis. The isozyme 1 was related to syringyl lignin and guaiacyl lignin

whereas isozyme 3, 4 were specific to syringyl lignin biosynthesis. The isozyme 2, a defense related one, should be involved in degradation of scopoletin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and biosynthesis of guaiacyl lignin.

During growth of *Hevea* cell suspension, the defense system that can protect them against reactive oxygen species (ROS), which was correlated with the enhancement of POD production. Activation of *Hevea* cell suspension with the culture filtrate of *P. palmivora* at concentration equivalent to 0.300 µg protein/g cell suspension for 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 96 and 104 h, respectively induced the accumulation of scopoletin and POD. The scopoletin production reached the highest level at 80 h after exposure, which was correlate to an increase of scopoletin peroxidase (S-POD) at 56 and 80 h. The activity of *o*-dianisidine peroxidase (O-POD) involved in the oxidation of ROS also enhanced in *Hevea* cell suspension at 32 and 56 h after the filtrate treatment. The lignifying PODs, guaiacol peroxidase (G-POD) and syringaldazine peroxidase (Z-POD) responded to filtrate at 32 and 64 h for G-POD, 48 and 72 h for Z-POD, respectively.

Partial purification of acidic POD by DEAE sepharose CL-6B showed that the POD from *Hevea* cell suspension consisted of 3 isozymes, POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> and POD<sub>3</sub>, which were purified to 15, 17 and 287-folds, respectively. The entire POD isozymes were increased after induced with filtrate from *P. palmivora*. Kinetics studies revealed that POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> and POD<sub>3</sub> had apparent K<sub>m</sub> values as follows, 0.27, 0.71, 0.91 mM for *o*-dianisidine, 0.23, 0.26, 0.39 mM for scopoletin, ND, 4.17, 3.92 mM for guaiacol and 0.12, 0.02, 0.29 mM for syringaldazine, respectively. The POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> and POD<sub>3</sub> have an optimum pH of 6.0, 5.0, and 5.0, respectively. The pH and temperature stabilities were 7.0-10.0 and 0-60 °C, respectively. The POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> and POD<sub>3</sub> were completely inhibited by NaN<sub>3</sub>, 2-mercaptoethanol ( $\beta$ -Me) and Dithiothreitol (DTT). NaCl, Sodium dodecyl sulfate (SDS) and citric acid could activate the POD<sub>1</sub> activity but suppressed the activities of POD<sub>2</sub> and POD<sub>3</sub>.

## กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีไม่ได้ หากขาดบุคคลที่สำคัญที่สุด คือ รองศาสตราจารย์ ดร. นันทา เชิงเช่าวี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้ อบรมสั่งสอน เสียสละเวลาให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ แก่ศิษย์เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์ และ ดร. เมธินี รัตตสาร ที่ให้ความกรุณาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาเสนอแนะ แก้ไข เพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์มีความถูกต้องสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และขอเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้กรุณาสนับสนุนเงินทุนบางส่วนในการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์จากโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศ ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่จากคุณพ่อ คุณแม่ หลวงลุง พี่ชาย พี่สาว และผู้มีพระคุณทุกท่าน รวมทั้งขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และ น้องๆ นักศึกษาปริญญาเอกและปริญญาโทในภาควิชาชีวเคมีทุกคนที่เป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด จึงทำให้ผู้ทำวิทยานิพนธ์สำเร็จการศึกษา

จีระภา ชัยวงศ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(14)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	36
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	37
วัสดุ	37
อุปกรณ์	39
วิธีการทดลอง	40
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	55
4. สรุปผลการทดลอง	103
เอกสารอ้างอิง	106
ภาคผนวก	119
ประวัติผู้เขียน	123



## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนต่อยีนของพืชและเชื้อรา	13
2.1 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิต	37
2.2 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE)	42
2.3 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS ซึ่งดัดแปลงเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน ยางพารา	44
2.4 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย	46
2.5 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (Tricine-SDS-PAGE)	49
3.1 แสดงค่าเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในระยะ การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยยางพาราเป็นเวลา 14 วัน	68
3.2 แสดงการสังเคราะห์สคอพอลิติน (nmole/ g fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์ แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย	72
3.3 แสดงการสังเคราะห์สคอพอลิติน (nmole/ g fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์ แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัม ต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย	75
3.4 แสดงการสังเคราะห์ S-POD ( $\Delta OD./ g$ fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์ แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัม ต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย	77
3.5 แสดงการสังเคราะห์ O-POD ( $\Delta OD./ g$ fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์ แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัม ต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย	79
3.6 แสดงการสังเคราะห์ G-POD ( $\Delta OD./ g$ fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์ แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัม ต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย	81
3.7 แสดงการสังเคราะห์ O-POD ( $\Delta OD./ g$ fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์ แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัม ต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย	83

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.8 แสดงปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย	85
3.9 แสดงผลแอกติวิตีของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสและโปรตีนรวมที่ได้จากแต่ละขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์	91
3.10 แสดงค่า $K_m$ , $V_{max}$ และ $V_{max}/K_m$ ของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์ DEAE-sepharose	92
3.11 แสดงค่าความสัมพันธ์ของแอกติวิตีเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่ทำปฏิกิริยาได้เหมาะสมในช่วง pH 2.0-10.0	95
3.12 แสดงค่าความสัมพันธ์ของแอกติวิตีเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่เสถียรในช่วง pH 2.0-10.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง	97
3.13 แสดงค่าความสัมพันธ์ของแอกติวิตีเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสที่เสถียรในช่วงอุณหภูมิ 0-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	99
3.14 แสดงผลของสารเคมีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสหลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที	101

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงส่วนประกอบของยางพารา	5
1.2 วงจรชีวิตของเชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp.	8
1.3 ลักษณะการตอบสนองต่อ <i>Phytophthora ramorum</i> ในพืชชนิดต่างๆ	10
1.4 ลักษณะของเชื้อรา <i>Phytophthora palmivora</i>	12
1.5 แสดงการเกิด hypersensitive ในพืชตอบสนองต่อการป้องกันตัวเอง จากเชื้อโรคก่อโรค	14
1.6 แสดงโครงสร้างของไฟโตเล็กซินชนิดต่างๆ	15
1.7 วิธีการสังเคราะห์สารประกอบไฟโตเล็กซินในทานตะวัน	16
1.8 แสดงโครงสร้างของลิกนิน	18
1.9 แสดงสารตั้งต้นของลิกนิน	19
1.10 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ลิกนินโดยสังเขป	19
1.11 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีหมู่ heme เป็น prosthetic	24
1.12 แสดงสับสเตรทชนิดต่างๆ ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส	25
2.1 แผ่นภาพรูปแบบอายุใบยางพาราตั้งแต่ชั้นอายุ A, B, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , C และ D	40
2.2 แสดงตำแหน่งการตัดใบยางพาราที่ชั่วโมงต่างๆ	41
2.3 แสดงการตัดใบยางพารา ขนาด 1X1 ตารางนิ้ว	41
2.4 แสดงผลอ่อนยางพาราอายุประมาณ 4-6 สัปดาห์ ภายหลังจากผสมเกสร	44
2.5 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา	44
2.6 แสดงขั้นตอนการย้ายเลี้ยง	46
2.7 <i>P. palmivora</i> เจริญในอาหารสูตร Henninger	48
3.1 แสดงใบยางพาราในระยะ B, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> -C และ D ในระยะที่ไม่ติดเชื้อ	56
3.2 แสดงแถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อย้อมด้วยสคอพอลิติน	56
3.3 แสดงแถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อย้อมด้วย guaiacol	57
3.4 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากใบยางพารา พันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 เมื่อย้อมด้วยสคอพอลิติน	59
3.5 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อย้อมด้วยสับสเตรทต่างๆ	61

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.6 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากใบยางและเซลล์แขวนลอย ยางพาราพันธุ์ BPM-24 ย้อมด้วยสคอพอลิติน	62
3.7 แสดงแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา	63
3.8 แสดงเซลล์แขวนลอยยางพารา	64
3.9 แสดงรูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสพันธุ์ BPM-24	65
3.10 แสดงค่าเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในระยะเวลาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย ยางพาราเป็นเวลา 14 วัน	67
3.11 แสดงค่าเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส ในระยะเวลาการเจริญเติบโต ของเซลล์แขวนลอยยางพาราเป็นเวลา 14 วัน	67
3.12 แบบแผนของแถบโปรตีนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ Tricine-SDS-PAGE ของ filtrate จากการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต	69
3.13 แสดงการสังเคราะห์สคอพอลิตินของเซลล์แขวนลอยยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate	72
3.14 แสดงการเรืองแสงของสคอพอลิตินภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต	73
3.15 แสดงเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ย้อมด้วย Evans blue	74
3.16 แสดงการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate	76
3.17 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate เมื่อใช้สคอพอลิตินเป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate	78
3.18 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate เมื่อใช้ o-dianisidine เป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate	80
3.19 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate	82
3.20 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร็อกซิเดส ที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate เมื่อใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate	84

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.21 แสดงปริมาณโปรตีนที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอยอย่างพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate	86
3.22 แสดงปริมาณโปรตีนในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา หลังจากบ่มด้วย filtrate หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE sepharose CL 6B	87
3.23 แสดงปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา หลังจากบ่มด้วย filtrate หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE sepharose CL 6B	88
3.24 แสดงปริมาณโปรตีนและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา หลังจากบ่มด้วย filtrate หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE sepharose CL 6B	89
3.25 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากเซลล์แขวนลอย ถูกกระตุ้นด้วย filtrate ย้อมด้วย o-dianisidine	90
3.26 แสดงการเขียนกราฟแบบ Michaelis-Menten	93
3.27 แสดงการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk plot	93
3.28 แสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของ $POD_1$ , $POD_2$ และ $POD_3$ ที่ทำปฏิกิริยาได้เหมาะสมในช่วง pH 2.0-10.0	96
3.29 แสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของ $POD_1$ , $POD_2$ และ $POD_3$ ที่เสถียรในช่วง pH 2.0-10.0	99
3.30 แสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของ $POD_1$ , $POD_2$ และ $POD_3$ เสถียรในช่วงอุณหภูมิ 0-80 องศาเซลเซียส	100
3.31 แสดงผลของสารเคมีต่อความสัมพันธ์ความว่องไวของ $POD_1$ , $POD_2$ และ $POD_3$	103

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

BSA	=	Bovine serum albumin
°C	=	Degree celsius
DEAE	=	Diethylaminoethyl
EDTA	=	Ethylenediaminetetra acetic acid
fresh wt	=	Fresh weight
g	=	Gram
G-POD	=	Guaiacol peroxidase
kDa	=	Kilodalton
mA	=	Milliampere
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
nmole/g	=	Nanomole per gram
µg	=	Microgram
µl	=	Microliter
µm	=	Micron
µM	=	Micromolar
OD.	=	Optical density
O-POD	=	o-dianisidine-Peroxidase
pH	=	-log hydrogen ion concentration
PDA	=	Potato dextrose agar
PDB	=	Potato dextrose broth
Scp	=	Scopoletin
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S-POD	=	scopoletin-Peroxidase
sp/ml	=	Spore per milliliter
TEMED	=	N,N,N,N,-tetramethylenediamine

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethylaminomethane) hydrochloride
Z-POD	=	syrygdazine-Peroxidase
UV	=	Ultraviolet
w/v	=	Weight per volume
$\alpha$	=	Alpha
$\beta$	=	Beta
$\lambda$	=	Lamda
%	=	Percent

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมานาน ได้มีการขยายต้นยางพาราแล้วนำไปปลูกในประเทศต่างๆ ของทวีปเอเชีย และมีหลักฐานเด่นชัดว่าเมื่อปี พ.ศ. 2442 พระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดี (คอซิมบี๊ ณ ระนอง) นำต้นยางพารามาปลูกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง เป็นครั้งแรก ต่อมาได้นำเข้ามาปลูกเป็นสวนยางพารามากขึ้น ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางทั้งประเทศประมาณ 12 ล้านไร่ และมีความสนใจปลูกยางพารามากขึ้น อีกทั้งเมื่อราคาน้ำยางพาราเพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการขยายพื้นที่ไปบริเวณที่ไม่เคยปลูกยางพารามาก่อน มีการศึกษาเพื่อพัฒนาและเร่งให้ต้นยางพารามีการเติบโตเร็ว การที่ยางพารามีความสำคัญต่อการพัฒนาประเทศ ทำรายได้ประมาณ 1 แสนล้านบาท และเกี่ยวพันกับความเป็นอยู่ของเกษตรกรชาวสวนยางพารามากกว่า 6 ล้านคน ในอนาคตการผลิตยางพาราจะมีการแข่งขันที่รุนแรงเพิ่มขึ้น คณะรัฐมนตรีได้อนุมัติให้มีโครงการปลูกยาง 1 ล้านไร่ ในปี 2547-2549 ทำให้เกษตรกรทั่วประเทศมีการขยายพื้นที่ปลูกยางพารากันอย่างมาก ยางพาราเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมหลายชนิด การพัฒนาอุตสาหกรรมยางพาราของประเทศได้เจริญรุดหน้าเรื่อยมาจนทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตและส่งออกยางพาราได้มากที่สุดในโลก เพื่อความก้าวหน้าในอุตสาหกรรมจึงได้มีการวิจัยด้านต่างๆ เช่น ด้านพันธุ์ยางพารา โรคและศัตรูยางพารา การดูแลรักษาสวนยางพารา การกำจัดวัชพืช การปลูกพืชคลุม การปลูกพืชแซมเพื่อเพิ่มพูนรายได้ให้แก่ชาวสวนยางพารา และมีการพัฒนายางพาราโดยเน้นการพัฒนาสวนยางพาราขนาดเล็ก เช่น การกรีดยางหน้าสูง การใช้ยาเร่งน้ำยาง การส่งเสริมการเพาะแปลงและขยายพันธุ์ยาง เพื่อให้ได้ผลผลิตในระยะยาว การปลูกยางพาราต้องพิจารณาพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ และเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ปลูกนั้นๆ *Phytophthora* spp. ที่ทำให้เกิดโรครับกับยางพารามีหลายชนิด ได้แก่ *P. palmivora* *P. botryosa* *P. heveae* *P. Meadii* และ *P. parasitica* ในประเทศไทยพบสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา 3 ชนิด คือ *P. palmivora* *P. botryosa* และ *P. nicotianae* โดยเชื้อรา *P. palmivora* มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก มีพืชอาศัยที่สามารถทำลายได้มากกว่า 138 ชนิด (Chee, 1968) เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้บนดิน น้ำและอากาศ ทำลายพืชได้ทั้งส่วนราก ลำต้น กิ่ง ใบและผลของโกโก้ กล้วยไม้ทุเรียน ยางพารา พริกไทย มันสำปะหลัง มะเขือเทศและยาสูบ เป็นต้น โดยเชื้อรานี้จะอาศัยอยู่



ข้ามฤดูปลูกบนเศษซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรีย์วัตถุในดินหรือบนพืชอาศัยบางชนิด นา  
 ฤทธิดา (2547) นำเชื้อสปอร์ของ *P. palmivora* ความเข้มข้น  $5 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา ทำให้หน้ายางเสีย มาบ่มใบยางพาราพันธุ์  
 ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) สังเกตความแตกต่างของขนาดรอยไหม้  
 พบว่าในพันธุ์อ่อนแอเกิดรอยไหม้แผ่กว้างกว่าพันธุ์ต้านทาน โดยพันธุ์ต้านทานสามารถกัก  
 บริเวณการลุกลามของรอยไหม้ที่เกิดจากเชื้อได้

การติดเชือรานในพืชนั้นเนื่องมาจากความสัมพันธ์ระหว่างยีนต่อยีน พืชมียีนที่  
 กำหนดความต้านทานและความอ่อนแอ ในขณะที่เชื้อราก็มียีนที่กำหนดความไม่รุนแรง และยีน  
 ที่กำหนดความรุนแรง ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างพืชกับเชื้อในลักษณะที่ไม่ทำให้พืชเกิดโรค  
 มีอยู่กรณีเดียวคือ พืชต้องมียีนต้านทานและเชื้อมียีนที่กำหนดความไม่รุนแรง ดังนั้นถึงแม้ว่า  
 เชื้อจะมียีนที่แสดงความไม่รุนแรงแต่ถ้าพืชมียีนอ่อนแอ เชื้อนั้นก็ทำให้พืชแสดงอาการของโรค  
 ได้ พืชไม่มีระบบภูมิคุ้มกัน แต่สามารถปรับตัวเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรคด้วยวิธีต่าง ๆ  
 กันดังนี้ ทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตายเรียกว่า hypersensitive cell  
 death โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล, สร้างสารปฏิชีวนะซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต  
 ของเชื้อโรคได้ เรียกว่า ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) สร้างโปรตีนขึ้นมาทำลายเชื้อโรคเรียกว่า  
 pathogenesis related-proteins (PR-proteins) ได้แก่ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส, ไคตินเนส  
 และเปอร์ออกซิเดส เกิดกระบวนการ lignification เพื่อกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามต่อไปยัง  
 เซลล์ข้างเคียง

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีอยู่ในพืชทั่วไป มีหลายไอโซไซม์ ทำหน้าที่แตกต่างกัน ใน  
 พืชแต่ละชนิดมีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการแสดงออกในแต่ละเนื้อเยื่อ  
 ควบคุมและตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่มากกระตุ้น Edwards และคณะ (1997) ตรวจพบกิจกรรม  
 ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของสคอพอลิติน ในทานตะวัน โดย  
 เร่งสคอพอลิตินเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีสีและไม่ละลายน้ำ เรียกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด  
 นี้ว่าสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส (S-POD) มีมวลโมเลกุล 46,000 กิโลดาลตัน ในใบของ  
 ทานตะวันพบกิจกรรมของ S-POD มากในบริเวณรอบๆ บาดแผลหลังจากกระตุ้นด้วย  $\text{CuCl}_2$   
 หรือ salicylic acid นอกจากนี้ยังพบ S-POD ในใบมันฝรั่ง, ยาสูบและถั่ว (Clarke, 1973; Goy  
*et al.*, 1993) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยังเกี่ยวข้องกับการช่วยซ่อมแซมผนังเซลล์ โดยจะเร่ง  
 กระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน ซูเบอร์ริน เพื่อสร้างความแข็งแรง  
 ให้กับเนื้อไม้ (Van Huystee and Zheng, 1993) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการ  
 เจริญเติบโตของเชื้อรา *P. infestans* ได้ (Friend *et al.*, 1973) ในใบยางพาราหลังติดเชือราน  
*P. botryosa* ใบยางพันธุ์ต้านทานจะตอบสนองต่อเชื้อรานชนิดนี้ โดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้าง

ลิกนินขึ้นบริเวณผนังเซลล์ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม ส่วนไบโอยางพันธุ์อ่อนแอเห็นปฏิกริยาการสร้างลิกนินไม่ชัดเจน ดังนั้นปฏิกริยาการสร้างลิกนินสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ (นิลุปล, 2545)

การทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ทำได้หลายวิธี Gabaldón และคณะ (2006) ศึกษากระบวนการเกิดลิกนินในขั้นตอนสุดท้ายที่เร่งปฏิกริยาโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในเซลล์แขวนลอยของต้นบานชื่น (*Zinnia elegans*) หลังจากเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ด้วย 4 คอลัมน์ ได้แก่ Phenyl-Sepharose, Superdex 75, SP Sepharose Fast Flow และ Concanavalin A-Sepharose 4B ตามลำดับ แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้ cinnamyl alcohol 3 ชนิด (coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol) พบว่า sinapyl alcohol เป็นสับสเตรทที่ดีที่สุด Martínez และคณะ (2008) ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพริกแดง (*Capsicum annuum*) โดยการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีการสกัดโปรตีนแยกออกจากสารชนิดอื่น แยกด้วย Triton X-114 ร่วมกับวิธีการตกตะกอนด้วย  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ภายหลังจากตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และยับยั้งด้วย 4-metoxi- $\alpha$ -naphthol พบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพียงแถบเดียว แล้วนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบดังกล่าวมาศึกษา  $V_{\text{max}}$  และ  $K_m$  (เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท) มีค่าเท่ากับ 0.495 และ 1.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากพริกหวานถูกยับยั้งด้วย ascorbic acid

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ตายอด ตาข้าง เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยมีประโยชน์หลายอย่างเช่น การขยายพันธุ์พืช, การผลิตต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรค, การผลิตสารสำคัญ, การอนุรักษ์พันธุกรรม การแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชและการปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นต้น ปัจจุบันการนำแคลัสหรือเซลล์แขวนลอยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาศึกษากระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับพืช นิยมนำมาใช้ทดสอบกันมากขึ้น Daayf และคณะ (2003) นำแคลัสอินทผลัมมาศึกษาการสะสมไฟโตอเล็กซินจากการกระตุ้นด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *albendum* (Foa) สามารถกระตุ้นให้แคลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออินทผลัมพันธุ์ต้านทาน (BSTN) มีการสะสมไฟโตอเล็กซินในปริมาณสูงกว่าแคลัสอินทผลัมพันธุ์อ่อนแอ (JHL) ได้ เพ็ญมาศ (2548) นำอิลิซิดินจากน้ำเลี้ยงของเชื้อรา *P. palmivola* มากระตุ้นแคลัสที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา พบว่าอิลิซิดิน 1 ไมโครกรัมต่อแคลัส 1 กรัม สามารถชักนำให้แคลัสทั้งพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) สังเคราะห์สคอพอลิดิน (ไฟโตอเล็กซินของยางพารา) โดยมีการสะสมของ สคอพอลิดินในเซลล์และปล่อยออกมาออกเซลล์ Egea และคณะ (2001) นำ

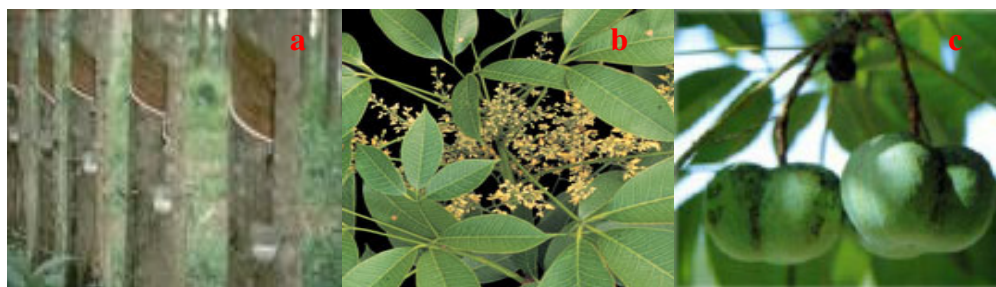
เซลล์แขวนลอยของพริกไทยพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ พบการศึกษาการสะสมของ เอนไซม์เปอร็อกซิเดส และลิกนิน เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (2008) นำ oligochitosan มากระตุ้นเซลล์แขวนลอยของยาสูบ เพื่อศึกษาการป้องกันตัวเองของพืช

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัย สนใจนำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา มาศึกษาเอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเอง ได้แก่การสร้างลิกนินและการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร็อกซิเดส โดยการชักนำจาก filtrate (น้ำเลี้ยง) ของ *P. palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคนิยางพารา นำเอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอย มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน แล้วศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส

## การตรวจเอกสาร

### 1.1 ยางพารา

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมานาน (รูปที่ 1.1) ในขณะนี้ได้มีความสนใจปลูกยางพารามากขึ้นเมื่อราคาน้ำยางเพิ่มสูงขึ้นเป็นประวัติการณ์ โดยมีการขยายพื้นที่ไปบริเวณที่ไม่เคยปลูกยางพารามาก่อน มีการศึกษาเพื่อพัฒนาและเร่งให้ต้นยางพารามีการเติบโตเร็ว จากการศึกษาที่ยางพารามีความสำคัญต่อการพัฒนาประเทศ ทำรายได้ประมาณ 1 แสนล้านบาท และเกี่ยวข้องกับความเป็นอยู่ของเกษตรกรชาวสวนยางมากกว่า 6 ล้านคน ในอนาคตการผลิตยางพาราจะมีการแข่งขันที่รุนแรงเพิ่มขึ้น คณะรัฐมนตรีได้อนุมัติให้มีโครงการปลูกยาง 1 ล้านไร่ ในปี 2547-2549 ทำให้เกษตรกรทั่วประเทศมีการขยายพื้นที่ปลูกยางกันอย่างมาก



รูปที่ 1.1 แสดงส่วนประกอบของยางพารา ได้แก่ ต้นยางพารา (a) ดอกยางพารา (b) ผลยางพารา (c)

ต้นยางพาราเป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่มขนาดใหญ่ที่มีอายุยืนนาน ยางพารามีน้ำยางในทุกระดับของต้น เปลือกของลำต้นจะเป็นบริเวณที่ให้น้ำยางมากที่สุด ในบรรดาต้นยางในสกุล *Hevea* พบว่า *Hevea brasiliensis* ซึ่งมีชื่อสามัญว่า rubber tree หรือ ต้นยางพารา เป็นชนิดที่ให้น้ำยางมากที่สุดและเนื้อยางมีคุณสมบัติทางวิทยาศาสตร์ดีกว่ายางชนิดอื่นๆ ในทางพฤกษศาสตร์ได้จัดอนุกรมวิธานของต้นยางพารา ดังนี้

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Rosidae

Order : Euphorbiales

Family : Euphorbiaceae

Genus : *Hevea*

Species : *Hevea brasiliensis*

(ที่มา : <http://www.kanchanapisek.or.th/kpc/BOOK/chapter4/t3-4-1.1.htm#sect1>)

ทางภาคใต้ ภาคตะวันออกและบางส่วนของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ  
ไทยเหมาะที่จะปลูกยางพารา เนื่องจากดินยางพาราชอบดินร่วนที่มีการระบายน้ำดี  
มีความเป็นกรด (pH) ในช่วง 4.0-5.5 ฝนตกสม่ำเสมอตลอดปีมีความชื้นสูงและพบว่าไม่ควร  
ปลูกในที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,000 ฟุต เพราะรากของต้นยางมีรากแก้วค่อนข้างตื้น ลึกลงดิน  
ไม่เกิน 1.5-2.0 เมตร มีรากแผ่ในผิวดินจึงมักล้มง่ายเมื่อโดนลมแรง ต้นยางสามารถกรีดให้น้ำ  
ยางได้เมื่ออายุประมาณ 5-6 ปี ถ้ากรีดด้วยความระมัดระวังก็สามารถกรีดเอาน้ำยางได้นาน  
กว่า 30 ปี ดังนั้นในการปลูกยางพาราจึงต้องพิจารณาพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะเหมาะสมกับ  
สภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ โดยในปี พ.ศ.2546 สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตรได้  
ให้คำแนะนำแก่เกษตรกรถึงปัจจัยที่ต้องพิจารณาในการใช้พันธุ์ยาง เพื่อให้เกษตรกรได้รับ  
ผลตอบแทนที่สูงจากผลผลิตที่สูงขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาประเทศต่อไป

สถาบันวิจัยยางกรมวิชาการเกษตร ได้ออกคำแนะนำพันธุ์ยาง ปี 2536 สำหรับ  
เกษตรกรทั่วไปไว้ดังนี้

- พันธุ์ยางชั้น 1 ได้แก่ ยางพันธุ์ดี แนะนำให้เกษตรกรปลูกโดยไม่จำกัดพื้นที่  
ปลูก
- พันธุ์ยางชั้น 2 ได้แก่ ยางพันธุ์ดี แนะนำให้เกษตรกรปลูกโดยจำกัดพื้นที่ปลูก  
ปลูกได้ไม่เกินร้อยละ 30 ของพื้นที่ปลูกยางที่ถือครอง แต่ละพันธุ์ควรปลูกไม่  
น้อยกว่า 7 ไร่
- พันธุ์ยางชั้น 3 ได้แก่ ยางพันธุ์ดี แนะนำให้เกษตรกรปลูกโดยจำกัดพื้นที่ปลูก  
ปลูกได้ไม่เกินร้อยละ 20 ของพื้นที่ปลูกยางที่ถือครอง แต่ละพันธุ์ควรปลูกไม่  
น้อยกว่า 7 ไร่

พันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกในแหล่งปลูกยางเดิม (ภาคใต้และภาคตะวันออก)

- พันธุ์ยางชั้น 1 BPM 24, สงขลา 362, RRIM 600, GT 1, PR 255, PR 261
- พันธุ์ยางชั้น 2 PB 217, RRIC 110, RRIC 100, PB 260, PB 255, PB 235
- พันธุ์ยางชั้น 3 KRS 251, PR 305, PR 302, RRIC 101, BPM 1, RRIM 712, KRS 250

พันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกในแหล่งปลูกยางใหม่ (ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

- พันธุ์ยางชั้น 1 RRIM 600, GT1, สงขลา 36, BPM 24, PR 255
- พันธุ์ยางชั้น 2 PB 235, PB 255

## 1.2 *Phytophthora* spp.

### 1.2.1 ลักษณะของ *Phytophthora* spp. และการเจริญเติบโต

มีการศึกษา *Phytophthora* ครั้งแรกในปี ค.ศ.1876 โดย Anton De Bary เชื่อชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ (late blight) ในมันฝรั่ง ต่อมาในปี ค.ศ.1995 Hawksworth และคณะ ได้จำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Phytophthora* ดังนี้

Kingdom: Chromista

Class: Oomycetes

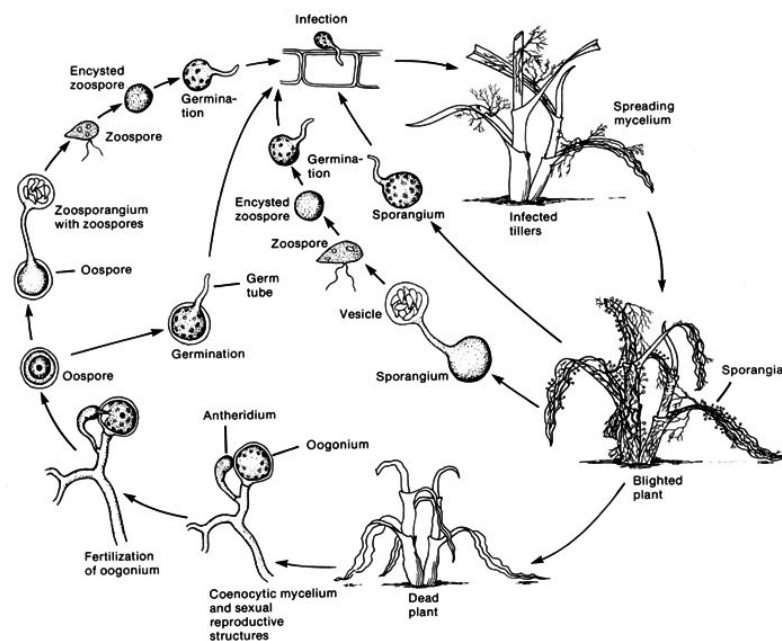
Order: Pythiales

Family: Pythiaceae

Genus: *Phytophthora*

*Phytophthora* ในภาษากรีก แปลว่า ผู้ทำลายพืช จากการศึกษาและวิจัยพบว่า *Phytophthora* มีถึง 63 สปีชีส์ (Erwin and Ribeiro, 1996) มีทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำและดิน เป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกันตามขวาง ผนังเซลล์ประกอบด้วย cellulose- $\beta$ -glucans จึงจัดอยู่ในอาณาจักรโครมิสตา (Chromista) เป็นพวกที่มีลักษณะรูปร่างและเจริญคล้ายรา (true fungi) อยู่ในกลุ่มโอโอไมซีต (Oomycetes) โดยเส้นใยเดี่ยวๆ (hypha) จะแตกกิ่งก้านเป็นกลุ่มเส้นใย (mycelium) สีขาวจนเป็นโคลน (รูปที่ 1.2) มีการสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจีโอฟอร์ (sporangiophore) ภายหลังที่เจริญเป็นสปอร์แรงเจียมแล้วสปอร์แรงจีโอฟอร์จะเจริญให้สปอร์แรงจีโอฟอร์ใหม่จากปลายอันเดิม และต้นสปอร์แรงเจียมไปด้านข้างของสปอร์แรงจีโอฟอร์ โดยส่วนที่เป็นสปอร์แรงจีโอฟอร์นั้นจะมีลักษณะพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียม

มีรูปร่างคล้ายไข่ไก่ตรงบริเวณฐานมีความกว้างกว่าส่วนบน ตรงปลายมีปุ่มซึ่งเป็นส่วนที่เปิดปล่อยให้ซุโอสปอร์ออกสู่ภายนอกทางด้านที่มีลักษณะเป็นปุ่ม (papilla) สามารถให้กำเนิดซุโอสปอร์ที่อุณหภูมิระหว่าง 12-15 องศาเซลเซียส และงอกลักษณะเป็นท่อ (germ tube) เข้าทำลายพืชได้โดยตรงที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส สำหรับโครงสร้างของซุโอสปอร์เกิดจากการแบ่งตัวของโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ภายในสปอร์แรงเจียม เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ซุโอสปอร์มี 2 หาง หางหนึ่งเป็นลักษณะ tinsel ซึ่งมีขนอ่อนเป็นจำนวนมาก ที่ทำหน้าที่โบกให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้า อีกหางหนึ่งเป็นแสหรือ whiplash ทำหน้าที่โบกถอยหลัง (Desjardin *et al.*, 1969) เมื่อซุโอสปอร์ถูกปล่อยออกจากสปอร์แรงเจียมและว่ายน้ำได้ระยะหนึ่งก็จะหยุดการเคลื่อนไหว ปลายหางแล้วจึงเข้าเกราะ (encystment) ซึ่งเกิดขึ้นโดยการกระตุ้นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์และการสัมผัสที่เย็น หลังจากนั้นก็จะงอกเป็น germ tube โดยการสร้างเส้นใยเจริญและสร้างซุโอสปอร์ขึ้นได้อีก การงอกของซุโอสปอร์สามารถกระตุ้นด้วยการเพิ่มออกซิเจนให้มากขึ้น



รูปที่ 1.2 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Phytophthora* spp.

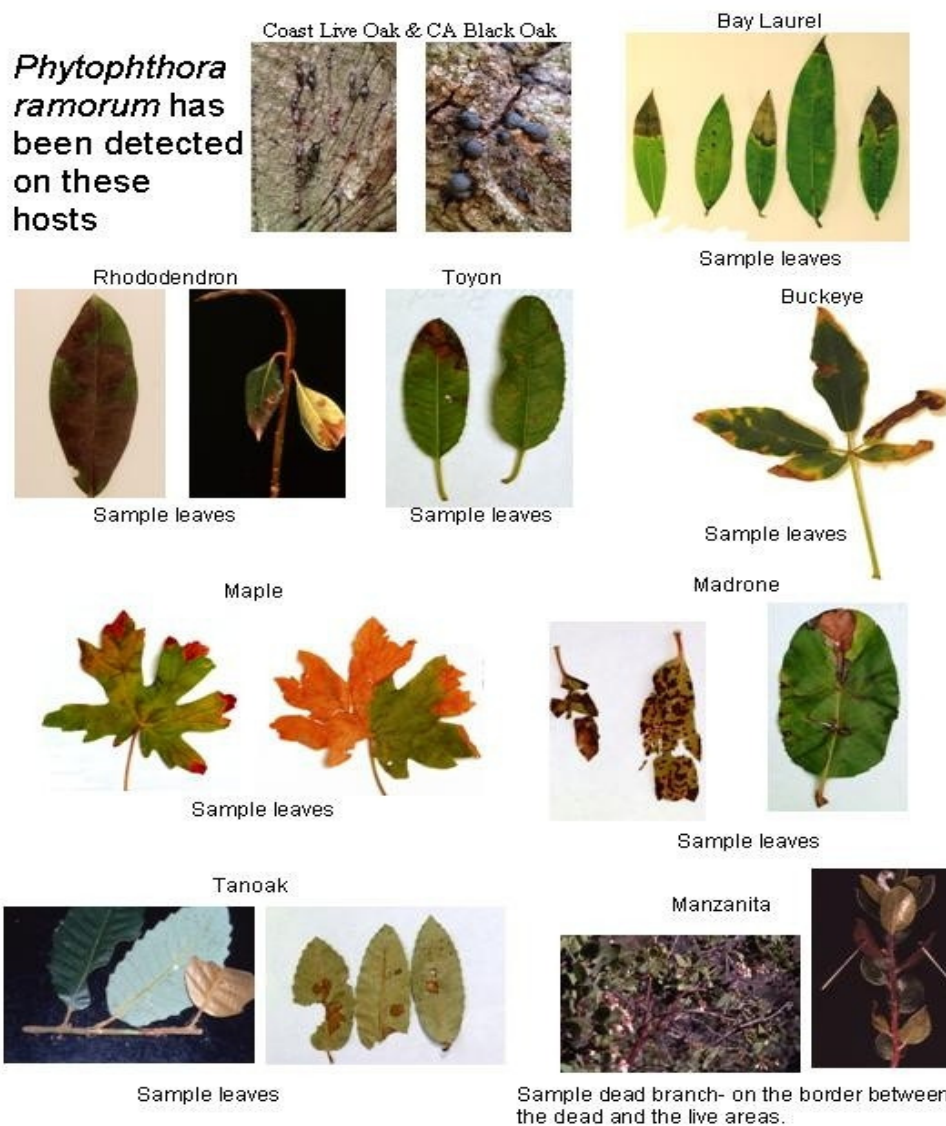
(ที่มา : <http://www.gebhardt.com.au/durian/phytophthora.html>)

*Phytophthora* สามารถอยู่ข้ามฤดูโดยอยู่ในรูปของโอโอสปอร์กับในรูปของเส้นใยที่อยู่ในพืชที่เป็นโรค เมื่อสภาพความชื้นเหมาะสมก็จะเกิดสปอร์แรงเจียมแล้วปล่อยซุโอสปอร์ที่เคลื่อนที่ในน้ำหรือกระเด็นไปกับฝนแล้วไปงอกเข้าทำลายพืช (ประสาทร, 2534) เช่น *P. cinnamomi* ซึ่งอาศัยในดินที่มีความชื้นแล้วจึงปล่อยซุโอสปอร์เข้าไปทำลายรากพืชทำให้เกิดโรครากเน่า ลักษณะของ *Phytophthora* แพร่กระจายโดยอาศัยน้ำพัดพาซุโอสปอร์ไป ใน

กรณีการเข้าทำลายเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นยางในสภาพธรรมชาติ การเกิดโรคระบาดที่เกิดจาก *Phytophthora* จะเข้าทำลายที่ส่วนฝัก ยอด ก้าน ใบ และแผ่นใบด้านล่างทางช่องเปิดของใบเท่านั้น ส่วนการระบาดในฝักจะถูกเชื้อเข้าทำลายก่อนแล้วแพร่พันธุ์เป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว จากนั้นเชื้อจะเข้าทำลายส่วนก้านใบทำให้ใบร่วง ในกรณีที่ต้นยางอ่อนยังไม่มีฝัก บริเวณยอดอ่อนจะถูก *Phytophthora* เข้าทำลายก่อนทำให้ยอดเน่า ต่อมาเชื้อจะลุกลามเข้าทำลายก้านใบและแผ่นใบในที่สุด สภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและจำนวนวันฝนตกเป็นปัจจัยสำคัญ โดยปกติโรคจะเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและรุนแรงในระยะที่มีฝนตกหนักติดต่อกันเป็นเวลาหลาย ๆ วันในบริเวณที่มี *Phytophthora* ระบาดอยู่ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในระหว่างเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายนของทุก ๆ ปี

*Phytophthora* spp. เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับกล้าพืชหลายชนิด (รูปที่ 1.3) เช่น ฝัก ไม้ดอก ไม้ประดับ พืชล้มลุกต่างๆ รวมทั้งไม้ยืนต้น ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าที่ราก ลำต้นและหัว เช่น *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่า โคนเน่าของทุเรียน *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าของส้มและยอดเน่าของสับปะรด *P. botryosa* สาเหตุโรคใบร่วงของยางพารา *P. infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ *P. fragariae* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของสตรอเบอรี่





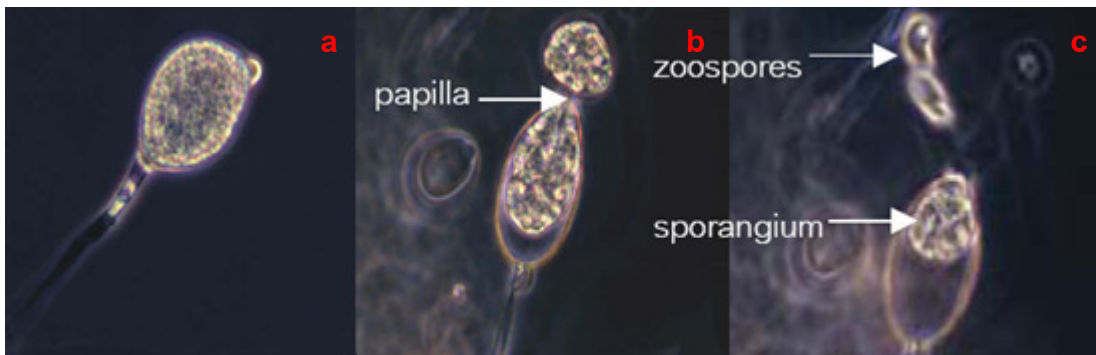
รูปที่ 1.3 ลักษณะการตอบสนองต่อ *Phytophthora ramorum* ในพืชชนิดต่างๆ  
(ที่มา: <http://ceris.purdue.edu/napis/gif/sod-np.jpg>)

อุไร และคณะ (2546) สำรวจโรคของยางพาราที่พบในแหล่งปลูกยางเดิมและแหล่งปลูกยางใหม่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างแบบจำลองการระบาดของโรค และพยากรณ์การระบาดของโรค โดยการสำรวจแหล่งระบาดและความรุนแรงของโรคทั้งในสวนยางทั่วไปและในสถานีทดลองยางในพื้นที่ปลูกยางภาคใต้ตอนบน ภาคใต้ตอนล่าง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าในจังหวัดพัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส มีการระบาดของโรคเกิดในช่วงเดือนมกราคม 2546 ความรุนแรงส่วนใหญ่อยู่ในระดับเล็กน้อย-ปานกลาง ยกเว้นบางพื้นที่ของจังหวัดพัทลุง บางพื้นที่ของจังหวัดสงขลา ความรุนแรงของโรคอยู่ใน

ระดับ 4-5 และช่วงเดือนกันยายน-ธันวาคม 2546 พบการระบาดของโรคใบร่วงและฝักเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. ในบางพื้นที่ของจังหวัดสตูล ตรัง ยะลา และนราธิวาส ความรุนแรงของโรคส่วนใหญ่อยู่ในระดับเล็กน้อย (ระดับ 1-3) ยกเว้นบางพื้นที่ของจังหวัดยะลา และนราธิวาส ช่วงเดือนธันวาคม 2546 เป็นโรคค่อนข้างรุนแรง (ระดับ 4-5)

*Phytophthora* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา มีอยู่หลายชนิด ได้แก่ *P. palmivora* *P. botryosa* *P. heveae* *P. meadii* และ *P. parasitica* ในประเทศไทยพบสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา 3 ชนิด คือ *P. palmivora* *P. botryosa* และ *P. nicotianae* โดย *P. palmivora* (รูปที่ 1.4) มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก มีพืชอาศัยที่สามารถทำลายได้มากกว่า 138 ชนิด (Chee, 1968) เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้บนดิน น้ำ และอากาศ ทำลายพืชได้ทั้งส่วนราก ลำต้น กิ่ง ใบและผลของโกโก้ กล้วยไม้ ทุเรียน ยางพารา พริกไทย มันสำปะหลัง มะเขือเทศและยาสูบ เป็นต้น โดยเชื้อรานี้จะอาศัยอยู่ข้ามฤดูปลูกบนเศษซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรีย์วัตถุในดินหรือบนพืชอาศัยบางชนิด

เพ็ญมาศ (2549) ทดสอบโดยใช้แคลลัสที่ได้จากเมล็ดอ่อนยางพารากับซูโอสปอร์ของ *P. palmivora* พบว่า  $1.5 \times 10^7$  ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้แคลลัสทั้งพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) สังเคราะห์สคอพอลิตินได้สูงสุด ซูโอสปอร์สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์ และปล่อยออกมานอกเซลล์ในปริมาณที่แปรผันตามระดับความต้านทานของยางพารา *P. palmivora* ผลิตภัณฑ์ในอาหารเหลวและสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านคอลัมน์ PD-10 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 หรือซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าที่อกซินเป็นโปรตีนหลักในอาหารเหลวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน และจัดเป็นโปรตีนในกลุ่มอิลิซิดิน เมื่อนำอิลิซิดินมากระตุ้นเมล็ดอ่อนยางพาราที่ความเข้มข้น 1, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อเมล็ดอ่อน 1 กรัม และมากระตุ้นแคลลัสที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อแคลลัส 1 กรัม พบว่าอิลิซิดินความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อเมล็ดอ่อน 1 กรัม และ 1 ไมโครกรัมต่อแคลลัส 1 กรัม เป็นความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เมล็ดอ่อนและแคลลัสทั้งพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) สังเคราะห์สคอพอลิติน (ไฟโตอิลิซิดินของยางพารา) ได้สูงสุด



รูปที่ 1.4 ลักษณะของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ลักษณะของซุโอสปอร์แรงเจียมก่อนปลดปล่อยซุโอสปอร์ (a) สปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* ที่ปลดปล่อยซุโอสปอร์ออกมาทาง papilla (b) ซุโอสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* 2 ซุโอสปอร์ที่กำลังว่ายอยู่บริเวณด้านบน (c)  
(ที่มา: [www.botany.hawaii.edu/.../Bot201/Oomyceta/Phytophthora.jpg](http://www.botany.hawaii.edu/.../Bot201/Oomyceta/Phytophthora.jpg))

### 1.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อรา

การเกิดโรคของพืชต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ความอ่อนแอของพืชและเชื้อราที่มีความรุนแรงต่อพืชชนิดนั้น การที่เชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในของพืชและชนิดของเชื้อราที่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งความสัมพันธ์นี้เกิดขึ้นได้ทั้งจำเพาะและไม่จำเพาะต่อพืช ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อราสามารถเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบได้แก่

#### 1.2.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนต่อยีน (Gene for Gene Theory)

พืชมียีนที่กำหนดความต้านทาน (resistant) เป็นยีนเด่น (dominant) และยีนที่กำหนดความอ่อนแอ (susceptible) เป็นยีนด้อย (recessive) ในขณะที่เชื้อมียีนที่กำหนดความไม่รุนแรง (avirulent) เป็นยีนเด่น และยีนที่กำหนดความรุนแรง (virulent) เป็นยีนด้อย ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างพืชกับเชื้อในลักษณะที่ไม่ทำให้พืชเกิดโรค มีอยู่กรณีเดียวคือพืชต้องมียีนต้านทานและเชื้อมียีนที่กำหนดความไม่รุนแรงแสดงออก (ตารางที่ 1.1) ดังนั้นถึงแม้ว่าเชื้อจะมียีนที่แสดงความไม่รุนแรงแต่ถ้าพืชมียีนอ่อนแอ เชื้อนั้นก็ทำให้พืชแสดงอาการของโรคได้

ตารางที่ 1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนต่อยีนของพืชและเชื้อรา

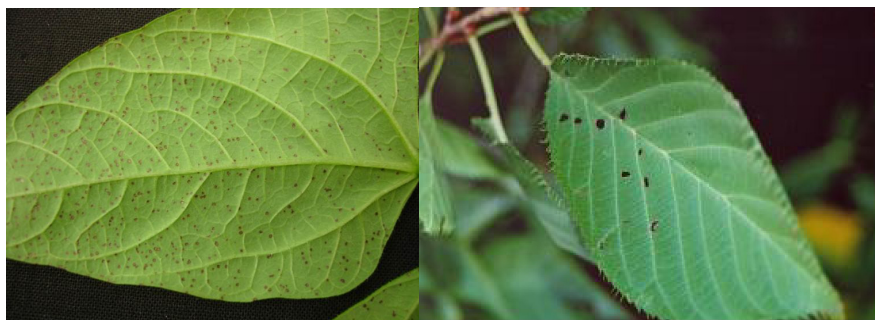
Gene in Pathogen	Gene in Plant	
	R (resistant) dominant	r (susceptible) recessive
A (avirulent) dominant	AR No infection	Ar Infection
a (virulent) recessive	aR Infection	ar Infection

### 1.2.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนของพืชและเชื้อรา

ปฏิกิริยาของโปรตีน (Protein Reaction) บริเวณผิวของพืชและเชื้อจะมีโปรตีนซึ่งเกิดจากการแสดงออกของยีน โปรตีนเหล่านี้จะมีผลต่อความสัมพันธ์ในการติดเชื้อของพืช กล่าวคือ โปรตีนของผิวพืชจะมีบริเวณที่เป็น Recognition site หรือบริเวณจดจำของเชื้อ ถ้าโปรตีนของพืชและเชื้อสามารถเข้ากันได้ พืชจะไม่แสดงปฏิกิริยาต่อต้านทำให้พืชนั้นเกิดการติดเชื้อ แต่ถ้าในกรณีที่โปรตีนของพืชและเชื้อไม่สามารถเข้ากันได้ พืชจะแสดงปฏิกิริยาต่อต้านในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

#### ก) การเกิด Hypersensitive cell death

Hypersensitive cell death เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองในการป้องกันโรคของพืชที่สำคัญ (รูปที่ 1.5) แสดงถึงความต้านทานโรคของพืช ในระหว่างบุกรุกของเชื้อโรคหรือถูกบุกรุกโดยสารพิษต่างๆ ที่บริเวณผิวเซลล์ เมื่อพืชติดเชื้อแล้วพืชซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานจะเกิดรอยไหม้สีน้ำตาล ซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดจากการตายอย่างรวดเร็วหลังจากเชื้อเข้าทำลาย ทำให้เชื้อโรคไม่ได้รับสารอาหารจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เชื้อจึงชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด อาการรอยไหม้พบได้โดยทั่วไปตามบริเวณส่วนของพืชที่เป็นโรค ได้แก่ ใบ ต้น โคนต้น ราก หัว ผัก ผล เป็นต้น ขนาดของโรคขึ้นอยู่กับส่วนของพืช ชนิดของพืช เชื้อที่บุกรุก สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมต่างๆ



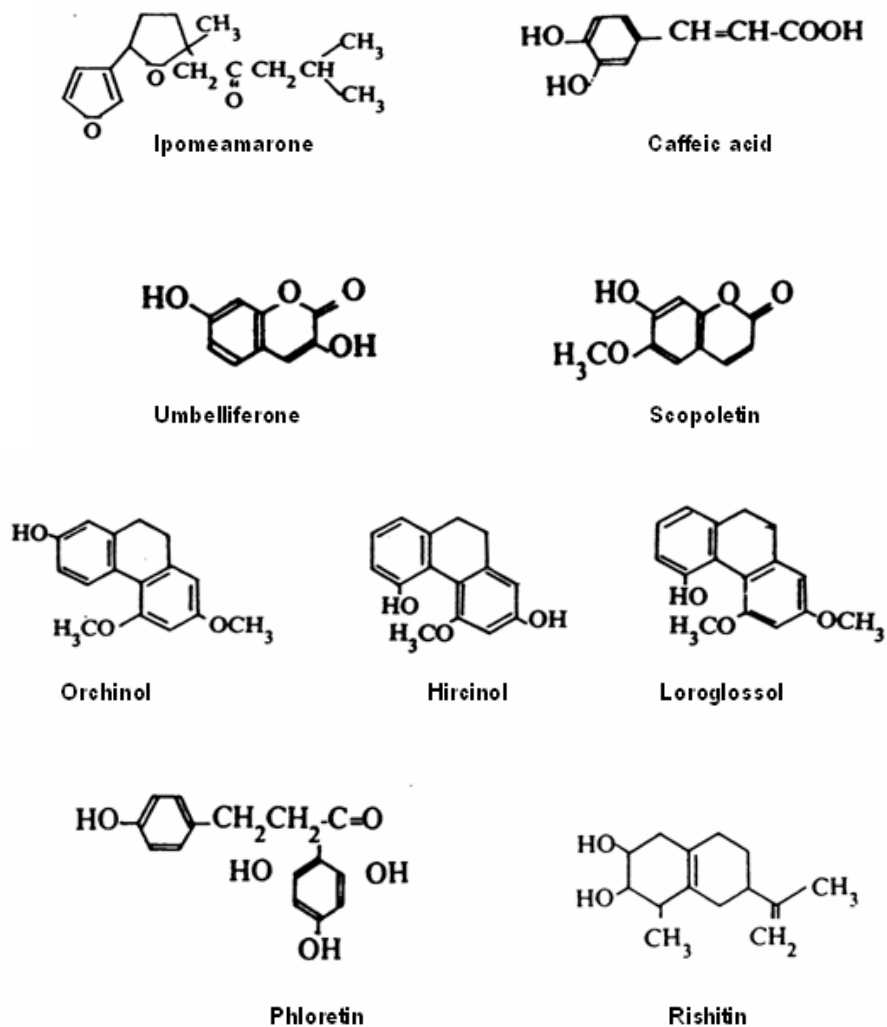
รูปที่ 1.5 แสดงการเกิด hypersensitive cell death ในพืชตอบสนองต่อการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคก่อโรค

(ที่มา: [www.padil.gov.au/viewPestLargeImage.aspx?id=3...](http://www.padil.gov.au/viewPestLargeImage.aspx?id=3...))

### ข) การสร้างสารไฟโตเล็กซิน (Phytoalexin)

พืชบางชนิดมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์พืช เพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อ โดยการผลิตสารประเภทไฟโตเล็กซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้นหลังจากเชื้อเข้าทำลายแล้ว และมีพืชต่อเชื้อโรค จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ มีมวลโมเลกุลต่ำ มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ พบในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้นจากอิทธิพลต่างๆ ทั้ง biotic และ abiotic ไฟโตเล็กซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช แต่ไม่เจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง ปฏิกิริยานี้เกิดในเนื้อเยื่อที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อโรค และเนื้อเยื่อของเซลล์ข้างเคียง อัตราการเกิดไฟโตเล็กซินขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และเกิดในเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น (ไฟโรจน์, 2525) วิธีการสังเคราะห์ไฟโตเล็กซิน (biosynthesis pathway) ในพืชทุกชนิดอาศัยวิถีของ shikimate, acetate-malonate และ acetate-mevalonate ซึ่งเป็นวิถีเมแทบอลิซึมแบบทุติยภูมิ ไฟโตเล็กซินบางชนิดสังเคราะห์โดยใช้เพียงวิถีเดียว บางชนิดต้องใช้วิถีในการสังเคราะห์ร่วมกันสองถึงสามวิถี (Kuc', 1995)

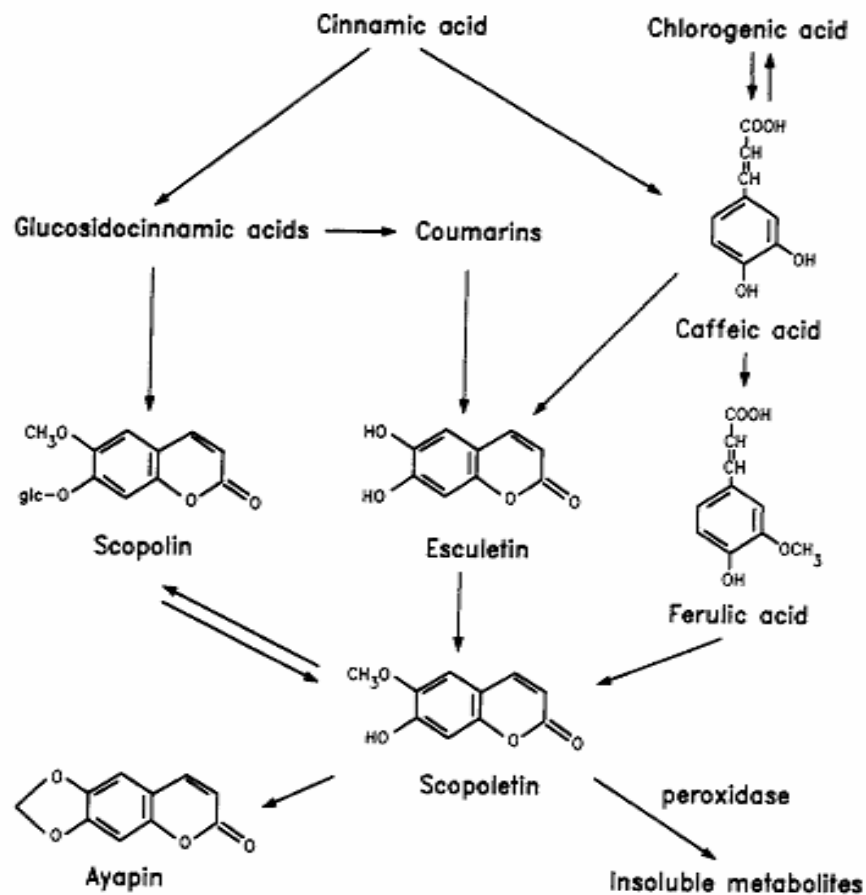
ไฟโตเล็กซินมีหลายชนิด (รูปที่ 1.6) บางชนิดอาจมีผลทำให้พืชเกิดปฏิกิริยา hypersensitive และบางชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช สารเหล่านี้โดยปกติจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยในเซลล์พืช แต่เมื่อเชื้อเข้าทำลายพืชจะมีการผลิตสารเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 1.6 แสดงโครงสร้างของไฟโตเอเลกซินชนิดต่างๆ

Gutierrez และคณะ (1994) นำใบของทานตะวัน (*Helianthus annuus*) มาศึกษา กระบวนการสะสมของสารประกอบ hydroxyl coumarin 2 ชนิด คือ สคอพอลิติน และอะยาพิน (ayapin) เหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ สคอพอลิตินให้เป็นสารประกอบที่มีสีและไม่ละลายน้ำ (รูปที่ 1.7) หลังจากกระตุ้นใบ ทานตะวันด้วย  $\text{CuCl}_2$  หรือน้ำตาลซูโครส เห็นการเรืองแสงภายใต้แสง UV นอกจากนี้ การกระตุ้นด้วย Triton-X100 ยังเกิดผลเช่นเดียวกัน ในขณะที่กระตุ้นด้วย salicylic acid, dichloroisonicotinic acid หรือ glutathione ไม่ทำให้เกิดการเรืองแสงภายใต้แสง UV การสร้างสารประกอบ hydroxyl coumarin ในพืชนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของอิเลกโตรที่นำมา กระตุ้นและอายุของเนื้อเยื่อพืช การสร้างอะยาพิน ในใบของทานตะวัน จากการกระตุ้น

ด้วยน้ำตาลซูโครสและ  $\text{CuCl}_2$  พบว่ามีการสร้างในปริมาณที่เท่ากัน ส่วนการสร้างสคอพอลิติน พบว่าการกระตุ้นด้วย  $\text{CuCl}_2$  มีการกระตุ้นได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส



รูปที่ 1.7 วิธีการสังเคราะห์สารประกอบไฟโตเอเล็กซินในทานตะวัน (ที่มา: Gutierrez *et al.*, 1994)

ในยางพารามีการศึกษากลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเป็นครั้งแรกโดย Tan และ Low (1975) พบว่าหลังจากใบยางติดเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* จะมีการสะสมสารเรืองแสงสีน้ำเงิน (สารเดิมไม่มีสี) ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มเติม โดยนำใบยางพารามาบ่มด้วยเชื้อรา *Microcyclus ulei* พบว่าสารเรืองแสงดังกล่าวคือ hydroxyl coumarin และให้ชื่อว่าสคอพอลิติน (Giesemann *et al.*, 1986) ซึ่งการสะสมสคอพอลิตินจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Garcia *et al.*, 1995b) แต่ใบยางที่ติดเชื้อรา *Corynespora cassicola* พบว่าความเข้มข้นของสคอพอลิตินในใบยางพันธุ์อ่อนแอมีปริมาณสูงกว่าในพันธุ์ต้านทาน (Breton *et al.*, 1997) ในขณะที่เชื้อก่อโรคในยางพาราตัวอื่นๆ เช่น เชื้อรา *P. palmivora* ที่เหนียวนำไปผลิตสคอพอลิตินในใบยางพารา 4 พันธุ์ แล้วสามารถบอกระดับ

ความต้านทานโรคได้ นั่นคือ พันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ PB235 (พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน) ผลิตสคอพอลิตินได้สูงกว่าพันธุ์ RRIT251 (พันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) (Churngchow and Rattarasarn., 2001) พันธุ์วีวี (2547) บ่มแคลล์พันธุ์ GT1 (ค่อนข้างต้านทาน) และพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) ด้วยชูโอสปอร์และอิลิซิดินจาก *P. palmivora* พบว่าชูโอสปอร์สามารถกระตุ้นแคลล์ให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในพันธุ์ GT1 มากกว่าพันธุ์ RRIM600 โดยปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินแปรผันตรงกับระดับความต้านทานโรคของยางพารา นอกจากนี้หลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดินพบว่าแคลล์มีอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าการกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์ รวมทั้งทำให้เกิดการตายของเซลล์ ได้เร็วกว่าการกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์ ในพืชอื่นๆ เช่นต้นยาสูบ เมื่อบ่มชูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. nicotianae* ในเซลล์แขวนลอยของยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ทั้งพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ พบว่าชูโอสปอร์สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แขวนลอยสร้างไฟโตอิเล็กซินได้ทั้งสองพันธุ์ โดยที่พันธุ์ต้านทานจะมีปริมาณการสร้างไฟโตอิเล็กซินสูงกว่าพันธุ์อ่อนแออย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดสอบโดยใช้ชูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ซึ่งยาสูบไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อราดังกล่าว พบว่าผลการทดลองให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (Perrone *et al.*, 2003) นอกจากนี้เมื่อบ่มต้นอ่อนของถั่วลิสง (*Arachis*) ด้วย *Bradyrhizobium* spp. พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้พืชสร้างไฟโตอิเล็กซินได้เช่นเดียวกัน (Azpilicueta *et al.*, 2004)

#### ค) การสังเคราะห์ Pathogenesis – related proteins (PR-proteins)

PR-proteins เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายให้กับตนเอง จากการรุกรานของเชื้อโรคหรือจากการกดดันด้วยสารเคมีและฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมถึงการถูกกดดันจากการเกิดบาดแผล (wounding) และอิลิซิดินต่างๆ โดยทั่วไปในพืชชั้นสูงมีการสะสม PR- proteins เพื่อทำหน้าที่ต่อต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคหรือไวรัส (Kitajima and Sato, 1999)

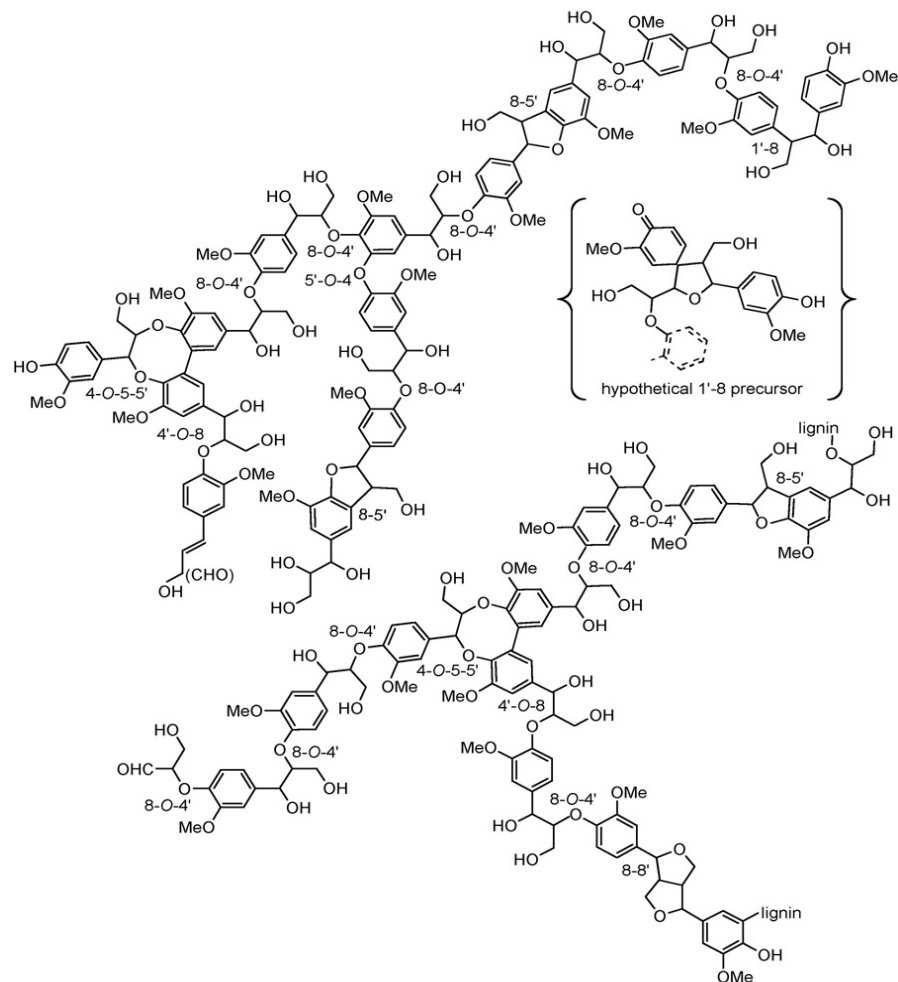
PR-proteins ที่พืชสร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ โดยการสร้างเอนไซม์สำหรับทำหน้าที่เป็น PR-proteins นั้นเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง แต่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อหรือถูกกดดันเท่านั้นไม่ใช่มาจากการควบคุมปกติของยีนพันธุกรรม ส่วนใหญ่ป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์ปานกลางถึงต่ำและมักไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคใด (Kauffmann *et al.*, 1987)

#### ง) การสังเคราะห์ลิกนิน (Lignifications)

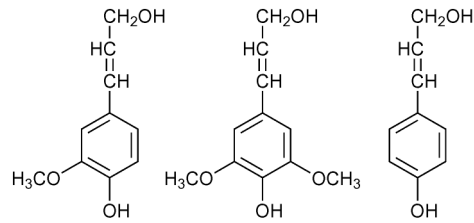
ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนฟีนอลิกเฮทเทอโรโพลิเมอร์ที่เชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์กระจายอยู่ภายในโพลีแซคคาไรด์ (รูปที่ 1.8) และเป็นองค์ประกอบของเพคตินที่ผนังเซลล์ของพืช ลิกนินเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงที่คอยค้ำจุนให้กับท่อลำเลียงน้ำของพืช



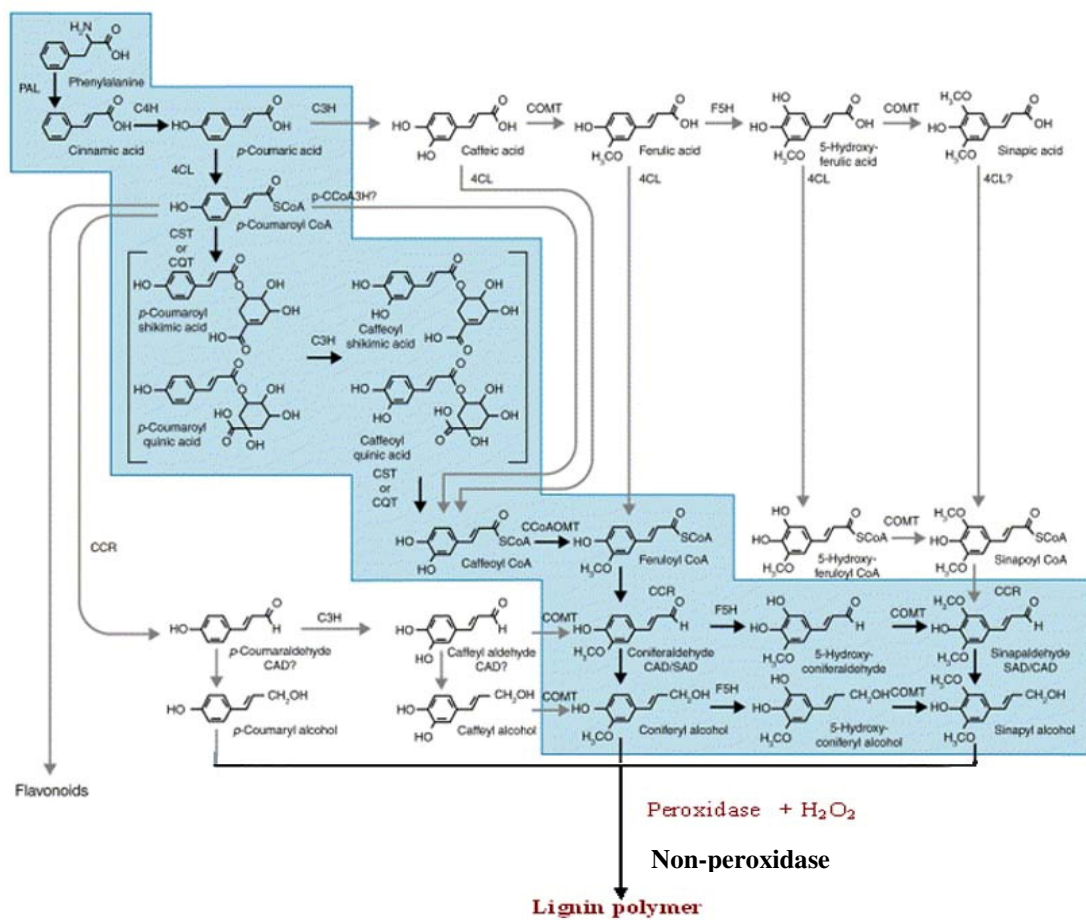
รวมทั้งช่วยค้ำจุนเนื้อเยื่ออื่นๆ เป็นโครงสร้างที่ยึดหดได้ขณะลำเลียงน้ำไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ลิกนินเกิดจากกระบวนการออกซิเดทีบโพลีเมอไรซ์เซชันของโมโนลิกนอล (cinnamyl alcohol) 3 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaryl, coniferyl และ sinapyl (แสดงในรูปที่ 1.9) เร่งปฏิกิริยาโดย xylem oxidase ทั้งที่เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และที่ไม่ใช่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ปล่อยสารออกมาคือ เฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ (แสดงในรูปที่ 1.10) (Ros-Barcelo *et al.*, 2002) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. infestans* ได้ (Friend *et al.*, 1973) และในยางพาราการกักบริเวณไม่ให้เชื้อ *Microcyclus ulei* ลูกกลมไปยังเซลล์ข้างเคียงโดยลิกนินเป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งในการต้านเชื้อรา (Garcia *et al.*, 1995) นอกจากนี้ในธรรมชาติพืชก็มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อใช้ในการโพลีเมอไรซ์ลิกนิน



รูปที่ 1.8 แสดงโครงสร้างของลิกนิน (ที่มา: <http://genomics.energy.gov/gallery/b2b/gallery-02.html>)



รูปที่ 1.9 แสดงสารตั้งต้นของลิกนิน ได้แก่ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol. (ที่มา: Kishimoto *et al.*, 2005)



รูปที่ 1.10 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลิกนินโดยสังเขป (ที่มา: ดัดแปลงจาก Ros-Barcelo *et al.*, 2002)

4CL, 4-(hydroxy)cinnamoyl CoA ligase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; CCoAOMT, caffeoyl CoA *O*-methyltransferase; CCR, cinnamoyl CoA reductase; COMT, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase; CQT, hydroxycinnamoyl CoA:quinic hydroxycinnamoyltransferase; CST, hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; *p*CCoA3H, *p*-coumaryl CoA 3-hydroxylase; SAD, sinapyl alcohol dehydrogenase.

พืชจะตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกันนินเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์พืชและกักเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามหรือแพร่กระจายออกไป นารถิตา (2546) บ่มใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน), RRIT251 (ต้านทานปานกลาง) และ RRIM600 (อ่อนแอ) ด้วยซูโอสปอร์ของ *P. palmivora* พบว่า ใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกันนินชัดเจนที่สุดในชั่วโมงที่ 24 หลังจากบ่มด้วยเชื้อรา โดยลิกันนินที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเป็นสีแดงตรงบริเวณเส้นกลางใบของใบยางพารา เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนใบยางพาราพันธุ์ RRIT251 และ RRIM600 พบการสร้างลิกันนินเล็กน้อยและไม่พบการสร้างลิกันนินเลย

Gabalón และคณะ (2006) ศึกษากระบวนการเกิดลิกันนินในขั้นตอนสุดท้ายที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในเซลล์แขวนลอยของต้นบานชื่น (*Zinnia elegans*) หลังจากเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ด้วย 4 คอลัมน์ คือ Phenyl-Sepharose, Superdex 75, SP Sepharose Fast Flow และ Concanavalin A-Sepharose 4B ตามลำดับ แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้โมโนลิกันอล 3 ชนิด (coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol) พบว่า sinapyl alcohol เป็นสับสเตรตที่ดีที่สุด แล้วนำ sinapyl alcohol มาทำปฏิกิริยากับ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ควบคุมอัตราการเติม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) แล้วศึกษากระบวนการเกิดออกซิโดรีดักชัน ผลการทดลองพบว่าเกิดการสร้างผนังเซลล์ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนลิกันนินในเซลล์แขวนลอยบานชื่น การเชื่อมต่อของโมโนลิกันอลด้วยพันธะ  $\beta$ -O-4 cross-coupling สารประกอบเชิงซ้อนลิกันนินในการทดลองนี้ พบว่ามีความอึดตัวซึ่งตรงกันข้ามกับการเกิดพันธะดังกล่าวในขณะที่พืชมีการเจริญเติบโต คือมีการเชื่อมต่อเป็นสารประกอบลิกันนินที่มีขนาดใหญ่และไม่มีการสลายตัว

Mandal และ Mitra (2008) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของลิกันนินในรากของต้นมะเขือเทศหลังจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิเตอร์ 4 ชนิด คือ สารสกัดจากเส้นใย (micelium) ของเชื้อรา *Fusarium* (FME), ไคโตซาน (CHT), น้ำเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* (FCF) และสารสกัดจากเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* (TME) พบว่าหลังจาก 24 ชั่วโมง อิลิซิเตอร์ทั้ง 4 ชนิดสามารถกระตุ้นการสร้าง ferulic acid ซึ่งเป็นที่สารเกี่ยวข้องกับการเกิดลิกันนิน โดยที่ FME และ CHT สามารถกระตุ้นให้เกิด ferulic acid ได้สูงสุด 3.71 และ 3.30 เท่า ตามลำดับ การสร้างลิกันนินที่ผนังเซลล์ของรากต้นมะเขือเทศ ตรวจพบว่าการกระตุ้นด้วย FME ดีกว่าการกระตุ้นด้วย CHT ปริมาณของลิกันนินเพิ่มขึ้น 3.6, 5.4 และ 7.1 เท่า ที่ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณของลิกันนินจากการกระตุ้นด้วย CHT เพิ่มขึ้น 2.8, 5.1 และ 6.8 ที่ 12, 24 และ 36 ชั่วโมงตามลำดับ ปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกันนิน สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง การที่ผนังเซลล์ของต้นมะเขือเทศมีการสร้าง

ลักษณะเพิ่มมากขึ้นทำให้เซลล์มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นเช่นกันจึงมีความสำคัญต่อการป้องกันตัวเองของพืชจากเชื้อต่างๆ

### 1.2.3 การเข้าสู่พืชของเชื้อรา

โดยส่วนใหญ่พืชจะติดเชื้อมีเชื้อสามารถเข้าสู่พืชได้ หลังจากนั้นจึงเพิ่มปริมาณและทำความเสียหายให้แก่พืช วิธีการเข้าสู่พืชของเชื้อมีได้หลายรูปแบบคือ

1.2.3.1 การเข้าสู่พืชโดยตรง เชื้อราบางชนิดสามารถแทงผ่านผนังเซลล์ของพืชได้โดยตรงด้วยแรงกล เช่น สปอร์ของ *Oidium* หรือ *Pythium* เมื่อออกสามารถแทงเส้นใยผ่านผนังเซลล์เข้าทำลายพืชได้โดยตรง

1.2.3.2 การเข้าสู่พืชโดยผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ สปอร์ของเชื้อราบางชนิดเมื่อตกลงบนผิวพืชแล้วจะงอกเส้นใยเข้าทำลายพืชโดยผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติเช่น ปากใบ, ต่อมคายน้ำ ซึ่งจะมีหยดน้ำเป็นฟิล์มบางๆ ทำให้เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์และ lenticels (ช่องเปิดทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซ)

1.2.3.3 การเข้าสู่พืชโดยผ่านทางบาดแผล บาดแผลที่เกิดกับพืชเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่เชื้อโรคสามารถเข้าทำลายได้ ซึ่งบาดแผลอาจเกิดจากหลายสาเหตุได้แก่

- สภาพธรรมชาติ เช่น การเกิดพายุหรือลมแรงทำให้พืชเกิดการเสียดสีกันจนเกิดบาดแผล การเกิดพายุลูกเห็บ หรือสภาพอากาศที่หนาวจัดทำให้เซลล์พืชแตกเป็นต้น

- สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น การกัดกินของสัตว์และแมลง การตัดแต่งกิ่งหรือการเก็บผลผลิตของมนุษย์ การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยทำให้รากพืชเกิดแผล เป็นต้น

- การเกิดรากแขนงทำให้เกิดการฉีกขาดบริเวณราก

- เชื้อโรคปล่อยสารเคมีบางชนิดเช่น toxin หรือ enzyme ออกมาย่อยผนังเซลล์ทำให้พืชเกิดบาดแผลก่อนเข้าทำลายพืช

เชื้อราแต่ละชนิดสามารถเข้าสู่พืชได้แตกต่างกัน บางชนิดอาจเข้าสู่พืชได้ทางบาดแผลหรือช่องเปิดธรรมชาติเท่านั้นไม่สามารถแทงเส้นใยเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรงได้ แต่เชื้อราบางชนิดอาจใช้ทั้ง 3 รูปแบบในการเข้าสู่พืช

### 1.2.4 กลไกการทำลายพืชของเชื้อรา

เมื่อเชื้อราเข้าสู่พืชได้แล้วต่อมาเป็นกระบวนการที่เชื้อทำให้พืชแสดงอาการของโรค ซึ่งโดยส่วนมากจะเป็นการทำลายเนื้อเยื่อพืชให้ตายหรือเสียหาย กลไกการทำลายพืชของเชื้อราได้แก่

### 1.2.4.1 การผลิตเอนไซม์

ก) เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ผนังเซลล์ของพืชแบ่งออกได้เป็น 3 ชั้น คือ middle lamella, primary cell wall และ secondary cell wall ซึ่งแต่ละชั้นมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน สารประกอบของผนังเซลล์มีอยู่ 3 ประเภทคือ pectin, cellulose และ hemicellulose นอกจากนี้ผนังเซลล์ยังถูกเคลือบด้วย cutin ในเชื้อราบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสารประกอบของผนังเซลล์เหล่านี้ได้

ข) เอนไซม์ย่อยสารประกอบภายในเซลล์ เชื้อราหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสารประกอบที่อยู่ในเซลล์พืชเช่น proteases, proteinases, peptidases ย่อยพวกโปรตีน amylase ย่อยแป้ง และ lipase, phospholipase ย่อยไขมัน

### 1.2.4.2 การผลิตสารพิษ

วิธีการหนึ่งที่เชื้อราทำความเสียหายให้แก่พืชคือการสร้างสารพิษที่มีผลต่อเนื้อเยื่อพืช สารพิษที่เชื้อราสร้างสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดได้แก่

ก) สารพิษที่เจาะจงต่อพืชอาศัย เชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดมีความจำเพาะต่อพืชอาศัยโดยสามารถทำลายพืชได้บางชนิดเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารพิษที่เชื้อราผลิตขึ้นมีผลเฉพาะต่อเนื้อเยื่อพืชชนิดนั้นแต่ไม่มีผลต่อพืชชนิดอื่น สารพิษที่เจาะจงต่อพืชอาศัยเช่น Victorin or HV toxin ผลิตโดยเชื้อ *Cochilobulus victoriae* สาเหตุโรคใบไหม้ของต้นโอ๊ค AM-toxin ผลิตโดย *Alternaria mali* สาเหตุโรคใบจุดของ apple และ *Alternaria alternata* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ ผลิตสารพิษ AL-toxin เป็นต้น

ข) สารพิษที่ไม่เจาะจงต่อพืชอาศัย สารพิษชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อทั้งพืชอาศัยและพืชชนิดอื่น แต่ไม่ทำให้พืชแสดงอาการเกิดโรค บทบาทของสารพิษชนิดนี้ในเชื้อราบางชนิดจะเป็นตัวเสริมความรุนแรงของโรคกล่าวคือทำให้พืชเกิดความเสียหายมากยิ่งขึ้น สารพิษในกลุ่มนี้เช่น oxalic acid ผลิตจากเชื้อ *Sclerotium* and *Sclerotina* spp. สารพิษ alternaric acid และ alternariol ผลิตจากเชื้อ *Alternaria* spp., fusaric acid และ lycomarasin ผลิตจาก *Fusarium oxysporum* และ cercosporin ผลิตจาก *Cercospora* spp. เป็นต้น

### 1.2.4.3 การผลิตฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโต

เชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดมีการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชมีรูปร่าง สรีระ ที่ผิดปกติไปจากเดิม สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เชื้อราผลิตขึ้นเช่น

ก) auxins ผลิตจากเชื้อ *Plasmodiophora brassicae* , *Plasmodiophora brassicae* และ *Ustilago maydis*

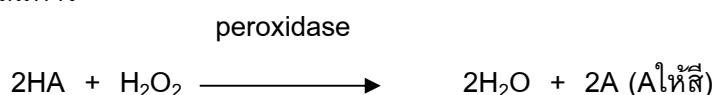
ข) gibberellins ผลิตจากเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

ค) ethylene ผลิตจากเชื้อ *Fusarium oxysporum*

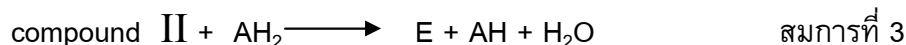
### 1.3 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

#### 1.3.1 ความหมายของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส : Peroxidase (EC : 1.11.1.7 donor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase) เป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ที่มีฮีมเกาะติดอยู่หรือเป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) จับกับเอนไซม์อย่างหนาแน่นด้วยพันธะโคเวเลนต์ มีลักษณะเป็นวงแหวนเตตระไพโรล (tetrapyrrole) จัดเป็นโปรโตพอร์ไฟริน IX (protoporphyrin IX) มีรูปร่างแบนราบ (planar) ภายในโครงสร้างของวงแหวนจะประกอบด้วยไอออนของเหล็กหนึ่งอะตอม (รูปที่ 1.9) โดยทั่วไปเหล็กจะมีตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะได้ 6 ตำแหน่งด้วยกัน โดย 4 ตำแหน่งของเหล็กจะสร้างพันธะกับอะตอมของไนโตรเจนของวงแหวนพอร์ไฟริน พันธะที่ 5 และ 6 ตั้งฉากกับระนาบของฮีม ซึ่งตำแหน่งที่ 5 จะสร้างพันธะกับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโนฮิสติดีนของโปรตีน และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถแสดงกิจกรรมต่างๆ ได้ โดยการแลกเปลี่ยนหมู่ต่างๆ ที่ตำแหน่งที่ 6 ของเหล็กทำให้เปอร์ออกซิเดส สามารถใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและออกซิไดซ์สารประกอบที่ให้อิเล็กตรอนกลายเป็นผลผลิตที่ปล่อยออกมาได้ ดังสมการ



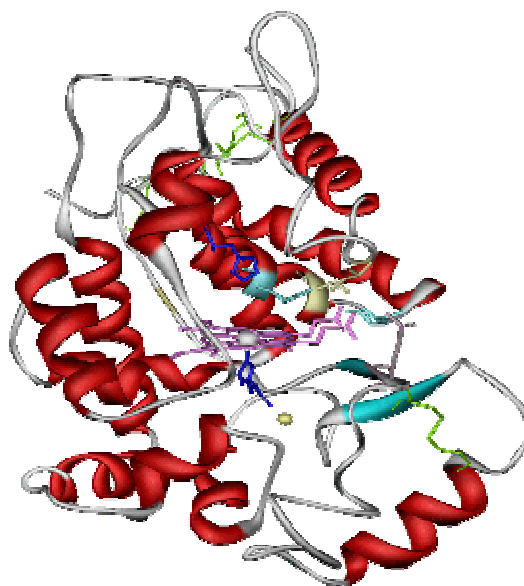
กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีดังนี้



โดยที่ E คือ ferric enzyme ที่เป็นรูปแบบในระยะพัก (resting)

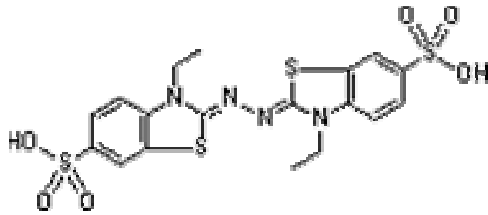
AH<sub>2</sub> คือ สับสเตรทในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์

AH คือ สับสเตรทที่ถูกออกซิไดซ์

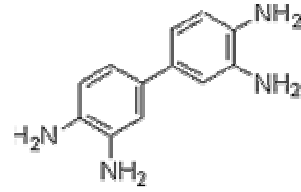


รูปที่ 1.11 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีหมู่ heme เป็น prosthetic (ที่มา: [www.tifr.res.in/~shyamal/research.html](http://www.tifr.res.in/~shyamal/research.html))

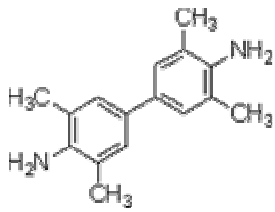
เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะออกซิไดซ์สับสเตรทได้ในสภาวะที่มี  $H_2O_2$  และสามารถ ใช้สับสเตรทหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกเอมีนและ สารประกอบอินทรีย์ (รูปที่ 1.12) ส่วนการเรียกชื่อเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเรียกตาม สับสเตรทที่ใช้ เช่น ถ้าใช้ guaiacol ซึ่งอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกเป็นสับสเตรท ก็จะ เรียกว่า guaiacol peroxidase (Vianello *et al.*, 1997) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสพบได้ในสิ่งมีชีวิต ชั้นต่ำ เช่น เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่ายเซลล์เดียวจนถึงพืชชั้นสูงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถแบ่งกลุ่มเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนและความสามารถในการ จับกับไอออนของโลหะได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ intracellular peroxidase กลุ่มที่ 2 คือ extracellular fungal peroxidase และกลุ่มที่ 3 คือ secretory plant peroxidase จากพืช ชั้นสูง (Sakharov and Sakharova, 2002)



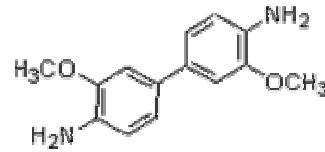
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)



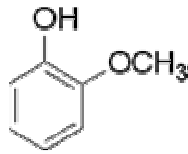
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)



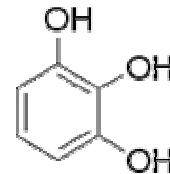
3, 3',5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB)



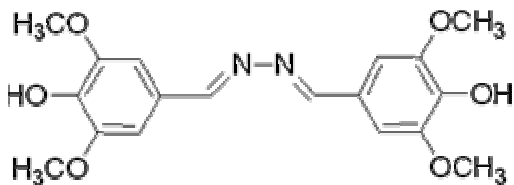
o-dianisidine



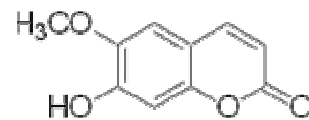
Guaiacol



Pyrogallol



Syringaldazine



สคอพอลิติน

รูปที่ 1.12 แสดงสับสเตรทชนิดต่างๆ ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

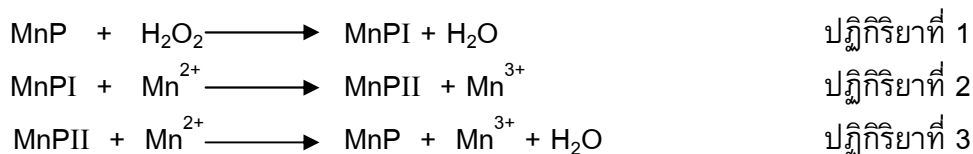
จากการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (heme peroxidase) แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

**กลุ่มที่ 1** Intracellular peroxidase เช่น cytochrome C peroxidase (CCP) ใน ยีสต์ เป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ พบที่ electron transport chain ในไมโทคอนเดรียและ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากความเป็นพิษของเปอร์ออกไซด์ เช่น



ascorbate peroxidase (AP) (Perez *et al.*, 2002) ในพืชชั้นสูงเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่ ย้ายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากคลอโรพลาสต์และไซโตซอล ส่วนในแบคทีเรียเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะทำงานร่วมกับเอนไซม์คะตาเลส (catalase) โดยป้องกันเซลล์จากสภาวะ oxidative stress

**กลุ่มที่ 2** Extracellular fungal peroxidase เช่น lignin peroxidase (LiP) และ manganese-peroxidase (MnP) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ของไกลโคโปรตีน โปรตีนกลุ่มนี้ ประกอบด้วย disulphide bridges 4 ตำแหน่ง และมี  $\text{Ca}^{2+}$  2 โมเลกุล MnP พบในเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนิน โดย MnP จะใช้  $\text{H}_2\text{O}_2$  เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและออกซิไดซ์  $\text{Mn}^{2+}$  ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีอยู่ในเนื้อไม้ (Young *et al.*, 2000 และ Kapich *et al.*, 2005) ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



โดยที่ MnP คือ Manganese peroxidase  
 $\text{Mn}^{2+}$  คือ Mn ในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์  
 $\text{Mn}^{3+}$  คือ Mn ในสภาวะที่ถูกออกซิไดซ์

สามารถพบเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในเชื้อราที่ก่อโรครากขาว (white-root disease) เช่น เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ในฟางข้าวสาลี (Arora *et al.*, 2002)

**กลุ่มที่ 3** คือ secretory plant peroxidase มีหน้าที่จำเพาะกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เช่น เคลื่อนย้าย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ออกจากคลอโรพลาสต์และไซโตซอล ออกซิไดซ์สารประกอบที่เป็นพิษ สร้างผนังเซลล์ ตบสนองในการป้องกันโรคจากบาดแผล กระบวนการสลาย indole-3-acetic acid (IAA) กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนและอื่นๆ โปรตีนกลุ่มนี้เป็นโมโนเมอร์ของไกลโคโปรตีน เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 แต่ต่างกันที่ตำแหน่งของ disulphide bridges ([http://InterProHeam\\_oxidase\\_plant-fungal-bacterial.html](http://InterProHeam_oxidase_plant-fungal-bacterial.html))

### 1.3.2 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์

ไอโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างต่างกันแต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกัน เอนไซม์บางตัวอาจมีไอโซไซม์ต่างกันภายในออร์แกเนลล์ (organelle) ต่างชนิดกัน เช่น ในไซโตซอล (cytosol) และไมโทคอนเดรีย ไอโซไซม์แต่ละชนิดอาจมีคุณสมบัติเหมาะสมกับสภาวะ

แวดล้อมต่างกัน ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์เดียวกันก็สามารถใช้ไอโซไซม์ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชและตรวจสอบความแตกต่างของพืชปกติกับพืชที่เป็นโรคได้

ในการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอาจมีไอโซไซม์ต่างกันในเรื่องเยื่อต่างๆ ของพืช การศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้เริ่มมีการศึกษาครั้งแรกใน radish หรือ horseradish ต่อมา Shannon และคณะ (1966) ได้ใช้เทคนิค ion exchange chromatography แยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ทั้งหมด 7 ไอโซไซม์ เมื่อใช้ CM-cellulose chromatography สามารถแยกได้ 5 ไอโซไซม์ ได้แก่ A, B, C, D และ E แล้วยืนยันผลด้วยเทคนิค DEAE-cellulose chromatography สามารถแยกไอโซไซม์ A ออกเป็น 3 ไอโซไซม์ย่อย ซึ่งเรียกว่า A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> และ A<sub>3</sub> Aibara และคณะ (1982) ประสบผลสำเร็จในการแยกไอโซไซม์ B และ C ได้ 5 ไอโซไซม์ย่อย ได้แก่ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub> และ C<sub>2</sub> ด้วย CM-cellulose chromatography ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวก็มีการแบ่งประเภทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามประจุที่เป็นองค์ประกอบได้ 3 ประเภท คือ ประเภทที่ 1 เป็นอะซิดิกเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ ไอโซไซม์ A ประเภทที่ 2 เป็นนิวตรอล เปอร์ออกซิเดส ได้แก่ ไอโซไซม์ B, C และประเภทที่ 3 เป็นเบสิกเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ D, E

วิธีการแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพตามธรรมชาติ สามารถศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสภาพที่เป็น oligomer ไม่ใช่เป็นหน่วยย่อย เช่น ในเซลล์แขวนลอยของเมล็ดละหุ่ง สามารถแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด extracellular ได้ 6 ไอโซไซม์ ซึ่งแยกย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม anionic มี 2 ไอโซไซม์ ได้แก่ A<sub>1</sub> และ A<sub>2</sub> ส่วนกลุ่ม cationic แยกได้ 4 ไอโซไซม์ ได้แก่ C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> และ C<sub>7</sub> เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาบ่มด้วยอิทธิฤทธิ์ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น และยังพบไอโซไซม์ใหม่อีก 3 ไอโซไซม์ ได้แก่ C<sub>1</sub>, C<sub>5</sub> และ C<sub>6</sub> (Bruce and West, 1989)

พืชจะมีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสขึ้นมาหลายไอโซไซม์ เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ช่วยซ่อมแซมผนังเซลล์ โดยจะเร่งกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน (lignin) ซูเบอร์ิน (suberin) เพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อไม้ (Van Huystee and Zheng, 1993) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. infestans* ได้ (Friend *et al.*, 1973) ในใบยางพาราหลังติดเชื้อรา *P. botryosa* ใบยางพันธุ์ต้านทานจะตอบสนองต่อเชื้อราชนิดนี้ โดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินขึ้นบริเวณผนังเซลล์ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม ส่วนใบยางพันธุ์อ่อนแอเห็นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินไม่ชัดเจน ดังนั้นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ (นิลกุล, 2545) เช่นเดียวกับใบยางพาราที่ติดเชื้อรา *Microcyclus ulei* ที่ใช้ปริมาณการสร้างลิกนินบอกระดับความต้านทานโรค (Garcia *et al.*, 1995a) รวมทั้งใบ

ยางพาราที่ถูกบ่มด้วยเชื้อรา *P. palmivora* หลังจาก 24 จนถึง 72 ชั่วโมง สามารถตรวจวัดลิกนินตามเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยของใบยางพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) แต่ในพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) พบการสร้างลิกนินในเส้นใบย่อยเท่านั้น (Rattarasarn, 2003) นอกจากนี้พืชถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราแล้ว การกระตุ้นด้วยสารเคมี การเกิดบาดแผล ก็ทำให้พืชสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น ในต้น *Ebenus cretia* ที่ถูกตัดแล้วบ่มด้วยกรด indolic-3-butyrlic สามารถชักนำให้รากงอกเร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการสังเคราะห์ลิกนิน (Syros *et al.*, 2004) Chen และคณะ (2002) รายงานว่าทองแดง (Copper : Cu) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นของต้น radish แต่ถ้าได้รับมากเกินไปก็จะยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระพวก reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นพืชจึงตอบสนองด้วยการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง cationic และ anionic เพื่อใช้กำจัด H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และสร้างลิกนิน บางไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเกี่ยวข้องกับระดับความต้านทานของพืชด้วย โดย Mohammadi และ Kazemi (2002) พบว่า ในเมล็ดข้าวสาลีที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Fusarium graminearum* มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (guaiacol-peroxidase) สูงสุดในช่วงน้ำนมมากกว่าช่วงออกรวง ช่วงสร้างแป้ง และช่วงรวงแก่ ตามลำดับ ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสก็สามารถบอกระดับความต้านทานของข้าวสาลีได้ด้วย คือ ข้าวสาลีพันธุ์ต้านทาน (Sumai # 3 และ Wang shui-bai) มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Falat และ Golestan)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสีของผลไม้และผัก jicama (*Pachyrizus ersus* L. Urban) เป็นพืชกินหัวมีรสหวาน และเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศเม็กซิโกและอเมริกากลาง ซึ่งต้องอาศัยความระมัดระวังมากในการเก็บเกี่ยวและขนส่ง เพราะบาดแผลสีน้ำตาลตรงบริเวณขั้วก้าน และรอยไหม้สีน้ำตาลจากการกระทบกระแทกกัน ทำให้ราคาตกต่ำ โดยพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสตรงบริเวณดังกล่าวสัมพันธ์กับการสร้างลิกนิน (Aquino-Bolanos และ Marcado-Silva, 2004) ในลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) ซึ่งพบเอนไซม์ทั้งสองในส่วนของเปลือกหุ้มรังไข่ที่โตเต็มที่ทั้ง 3 ชั้น คือ epicarp mesocarp และ endocarp แสดงว่าเอนไซม์ดังกล่าวนี้มีความสำคัญในการเปลี่ยนสีผิวทำให้ผลไม้มีสีน้ำตาล (Underhill and Critchley, 1995)

นุรฮามาลี (2547) ศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT 251 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบ พบแถบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ต้านทาน ได้แก่ พันธุ์ BPM-24 กับ PB235 วัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ในปริมาณสูงกว่ากลุ่มที่สอง ซึ่งเป็นกลุ่มพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ RRIT251 กับ RRIM600 ประมาณ 2-3 เท่า เมื่อนำมาตรวจความ

แตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) แล้วย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย *o*-dianisidine และ guaiacol พบ 2 ไอโซไซม์ (ไอโซไซม์ X และ Y) ในชุดควบคุม และ 3 ไอโซไซม์ (ไอโซไซม์ X, Y และ Z) ในชุดทดลอง มีไอโซไซม์ X เท่านั้น ที่แตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม กล่าวคือไอโซไซม์ X ในกลุ่มพันธุ์ต้านทานจะปรากฏแถบความว่องไวในตำแหน่งที่สูงกว่ากลุ่มพันธุ์อ่อนแอ เพื่อแยกความแตกต่างของไอโซไซม์นี้จึงเรียกไอโซไซม์ X ของพันธุ์ต้านทานว่า ไอโซไซม์  $X_1$  และพันธุ์อ่อนแอ เรียกว่า ไอโซไซม์  $X_2$  ส่วนไอโซไซม์ Z นั้นเป็นไอโซไซม์ที่มีอยู่แล้วในยางพารา

### 1.3.3 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการแยกตามคุณลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของเอนไซม์ที่ต้องการแยก มีหลายวิธีดังนี้

#### 1.3.3.1 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้านการละลาย

- ก) การเปลี่ยนแปลงค่า pH (isoelectric precipitation)
- ข) การเปลี่ยนแปลงค่าความแรงไอออน (change in ionic strength)
- ค) การลดค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (decrease in dielectric constant)

#### 1.3.3.2 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้านขนาดหรือ

มวล

- ก) เจลฟิลเตรชัน (gel filtration)
- ข) อุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration)
- ค) ไดอะไลซิส (dialysis)

#### 1.3.3.3 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้านประจุ

- ก) โครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)
- ข) ไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing)

#### 1.3.3.4 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้าน

ความจำเพาะ

- ก) โครมาโตกราฟีจำเพาะ (affinity chromatography)

Martínez และคณะ (2008) ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพริกแดง โดยการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยวิธีการสกัดโปรตีนแยกออกจากสารชนิดอื่น ด้วย Triton X-114 ร่วมกับวิธีการตกตะกอนด้วย  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ที่ความเข้มข้นระหว่าง 30-80 เปอร์เซ็นต์ การแยกโปรตีนด้วย Triton X-114 ที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถแยกสารได้ออกเป็น 2 ส่วน แยก

โปรตีนที่ชอบน้ำออกจากโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Brodier, 1981), สารประกอบฟีนอลิก (Núñez-Delicado *et al.*, 1996; Núñez-Delicado *et al.*, 2003) และสารประกอบคลอโรฟิลล์ (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1989) ภายหลังจากตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย 4-metoxi- $\alpha$ -naftol พบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพียงแถบเดียว นำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบดังกล่าวมาศึกษา  $V_{max}$  และ  $K_m$  (เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท) มีค่าเท่ากับ 0.495 และ 1.32 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากพริกแดงถูกยับยั้งด้วย ascorbic acid

Belcerz และคณะ (2007) แยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากกะหล่ำปลี (spring cabbage) ด้วยคอลัมน์ DEAE sepharose CL-6B ตรวจพบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด cationic และ anionic ที่มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 143.5 และ 5.49 เท่า ตามลำดับ มีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 และ 3.0 ตามลำดับ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสก่อนการทำบริสุทธิ์ เท่ากับ 6.0 ศึกษาความทนต่ออุณหภูมิในช่วง 20-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 2 ไอโซไซม์มีความไวต่ออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้สามารถคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ถึง 4 สัปดาห์ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด cationic และ anionic มาศึกษาค่า  $K_m$  โดยใช้ ABTS, *o*-dianisidine และ guaiacol พบว่ามีค่า  $K_m$  เท่ากับ 0.038, 0.357, 6.41 มิลลิโมลาร์ ที่เป็นชนิด cationic และ 0.0625, 0.286, 13.89 มิลลิโมลาร์ สำหรับชนิด anionic ตามลำดับ สับสเตรทที่มีความเหมาะสมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด cationic มากที่สุดคือ pyrogallol ส่วนสับสเตรทที่มีความเหมาะสมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด anionic คือ *o*-dianisidine

### 1.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำ เอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ตายอด ตา ข้าง เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังต้องทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และในสภาวะที่ควบคุมสิ่งแวดล้อมได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปในรูปแบบต่างๆ เช่น เกิดเป็นยอด เกิดเป็นราก เกิดเป็นเอ็มบริโอ หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า “แคลลัส” ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จำนวนมากได้

หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือต้องทำในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคือทุกขั้นตอนต้องปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยขั้นตอนในการทำ งานจะเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ชิ้นส่วนพืชแล้วตัดเอาเฉพาะส่วนที่ต้องการนำ มาวางเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองหรือขวดแก้วที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วเช่นกัน ขวดเพาะเลี้ยง

นี้จะถูกนำ มาวางเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ให้เป็นไปตามที่ ต้นพืชต้องการ ชั้นส่วนของพืชจะได้รับแร่ธาตุและสารอาหารจากอาหารสังเคราะห์และ เจริญเติบโตต่อไป ซึ่งการเจริญเติบโตของชั้นส่วนพืชนี้สามารถควบคุมได้โดยการเลือกใช้สูตร อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เช่น ฮอร์โมนพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ ของการเพาะเลี้ยงว่าต้องการให้ชั้นส่วนนั้นเจริญไปเป็นส่วนใด เช่น ถ้าต้องการให้เจริญไปเป็น ส่วนลำต้นก็สามารถทำ การชักนำโดยใช้ฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) หากต้องการ ให้เกิดรากอาจใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxin) หรืออาจจะใช้ฮอร์โมนหลายๆ ชนิดรวมกัน

### 1.5.1 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ อาหาร เพาะเลี้ยง ชั้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยอาหาร เพาะเลี้ยงนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงมี มากมายหลายสูตรให้เลือกใช้ เช่น สูตร Murashige and Skoog (MS) เป็นสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้ กับพืชต่างๆ ไป สูตร Vacin and Went (VW) เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลต่างๆ สูตร Woody Plant Medium (WPM) เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชพวกไม้เนื้อแข็งโดยทั่วไป สูตรอาหารเหล่านี้จะประกอบไปด้วย ธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ธาตุอาหารรองที่พืชต้องการในปริมาณเพียง เล็กน้อยเช่น โบรอน (B) โมลิบดีนัม (Mo) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ไอโอดีน (I) และธาตุอาหารอื่นๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโนและน้ำตาล นอกจากนี้อาจจะมี ส่วนประกอบอื่นๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรือที่เรียกว่าฮอร์โมนพืช หรือสาร จากธรรมชาติอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กล้วยหอม สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งจะมีสารช่วยเร่ง การเจริญเติบโตของพืชรวมอยู่ด้วย

### 1.5.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.5.2.1 การขยายพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชที่ ขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นได้ยาก หรือขยายได้ช้า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่ม จำนวนต้นได้จำนวนมากอย่างรวดเร็ว สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดปี ซึ่งต้นพันธุ์ที่ได้จะมี ลักษณะเหมือนเดิมทุกประการและให้ผลผลิตคุณภาพดี พืชหลายชนิดที่มีปัญหาในการ ขยายพันธุ์แบบปกติแต่ปัจจุบันประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืช เช่น กล้วยไม้ หน้าวัว และหน่อไม้ฝรั่ง

1.5.2.2 การผลิตต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรค พืชหลายชนิดจะมีเชื้อไวรัสแฝงตัวอยู่ในท่อน้ำเลี้ยง จึงเป็นการยากต่อการผลิตพันธุ์พืชที่ปราศจากโรค ดังนั้นการเพาะเลี้ยงส่วนของปลายยอดที่ยังไม่มีท่อน้ำเลี้ยงจะสามารถจัดการปนเปื้อนของไวรัสเหล่านั้นได้ มีพืชหลายชนิดที่ใช้เทคนิคนี้ได้สำเร็จ เช่น มันฝรั่ง สตรอเบอรี่ และ ขิง ฯลฯ

1.5.2.3 การผลิตสารสำคัญ พืชหลายชนิดสามารถผลิตสารสำคัญได้ ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้ เช่น สารตัวยารักษาโรค สีที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งการนำพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมได้จะสามารถชักนำให้เซลล์ของพืชผลิตสารในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

1.5.2.4 การอนุรักษ์พันธุกรรมและการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงไว้ในขวดและบังคับให้เติบโตอย่างช้าๆ ซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่และแรงงาน นอกจากนี้ยังสะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศเพราะอยู่ในขวดและปราศจากเชื้อโรค

1.5.2.5 การปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ เช่น การสร้างพืชโครโมโซมชุดเดียว การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การรวมเซลล์พืช (protoplast fusion) และพันธุวิศวกรรมของพืช

### 1.5.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ แคลลัสประกอบด้วย เซลล์พาเรเนอิม่าเพียงอย่างเดียว มีขนาดต่างๆ กัน มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ของแวกคิวโอลสูง แคลลัสที่เซลล์เกาะตัวกันแน่น เราเรียกว่า compact callus ถ้าเซลล์เกาะกันหลวมๆ เรียกว่า friable callus ภายในเซลล์ของแคลลัสส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุเป็นส่วนน้อยที่พบว่ามีสีเขียว เพราะมีคลอโรพลาสต์ สีเหลืองเพราะมีแคโรทีนอยด์และฟลาโวนอยด์ สีม่วงเพราะมีแอนโทไซยานิน ซึ่งมีปริมาณและชนิดของรงควัตถุดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยของแสง

ชิ้นส่วนของพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ สามารถที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จากรายงานพบว่าส่วนที่ให้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงสุดในพืชใบเลี้ยงคู่ คือ ส่วนของเอมบริโอ ใบเลี้ยง ลำต้น ส่วนใต้ใบเลี้ยง และราก ส่วนในพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ส่วนของเอมบริโอ ใบอ่อน ดอกอ่อน และเมล็ดที่เพิ่งเริ่มงอกดีที่สุด

เนื้อเยื่ออื่นๆ ของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ก็คือ แคมเบียม คอรัเทค ไล้ ท่อลำเลียงอาหาร และไซเลมพาเรนไคมา

### 1.5.3.1 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

ก) สารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะฮอร์โมนพืช เช่น ออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งการพัฒนาของพืชขึ้นอยู่กับสัดส่วนของฮอร์โมนสองกลุ่มนี้ คือ ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง พืชจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำ จะพัฒนาเป็นต้น และหากอยู่ในสัดส่วนที่ปานกลางหรือสมดุล ก็จะพัฒนาไปเป็นแคลลัส จากการศึกษาในหลายๆ พืช พบว่า ออกซินที่อยู่ในช่วง 0.01-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไคเนติน (ไซโตไคนินชนิดหนึ่ง) 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัส

ข) ธาตุอาหาร นอกจากธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบต่างๆ ไปของสูตรอาหารแล้วพบว่า อาหารเสริมจำพวกกรดอะมิโน (กลูตามีน แอสปาราจีน อาร์จินีน เพียวรีน และไพริมิดีน) เคซีนไฮโดรไลเซต มอลต์สกัด สารสกัดจากยีสต์และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส

ค) แหล่งของคาร์บอน แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแซคคาโรส ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์

ง) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น แสง การเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องการความเข้มแสงต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

### 1.5.3.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ก) เพื่อการขยายพันธุ์พืช เราสามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นพืชที่ได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัส

ข) เพื่อใช้ในการผลิตโปรโตพลาสต์ แคลลัสเหมาะแก่การนำไปผลิตเป็นโปรโตพลาสต์ เพราะง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์ และมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้ว

ค) เพื่อการผลิตสารเคมีจากพืชในหลอดทดลอง พืชบางชนิดสามารถผลิตสารชีวเคมี บางชนิดที่สามารถสกัดนำเอาไปใช้ในทางการแพทย์หรือทางอุตสาหกรรมได้

ง) เพื่อการผลิตพืชทนทาน เช่น ทนต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว ทนต่ออากาศร้อนและหนาว เป็นต้น



จ) เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น พันธุ์ต้านทานต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืช และพันธุ์ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อราแบคทีเรีย และไวรัส เป็นต้น

ฉ) เพื่อผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด โดยการใช้สารเคมีโคลนินชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซม

ช) เพื่อเก็บรักษาพันธุ์พืช

เพ็ญมาศ (2549) นำอิลิซิดินจาก *P. palmivora* มากระตุ้นแคลลัสที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อแคลลัส 1 กรัม พบว่าอิลิซิดินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อแคลลัส 1 กรัม สามารถชักนำให้แคลลัสพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) มีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิดินในเซลล์สูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมงและปล่อยออกมานอกเซลล์ทันที มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ที่ 6 ชั่วโมงต่อมา และมีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์สูงสุดที่เวลา 24 และปล่อยออกมานอกเซลล์เพียงเล็กน้อย เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท ในขณะที่เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะขึ้นสูงสุดช้ากว่า *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท ประมาณ 6 ชั่วโมง แคลลัสมีการสังเคราะห์สคอพอลิดินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในปริมาณที่แปรผันตามระดับความต้านทานของยางพารา โดยแคลลัสพันธุ์ต้านทานผลิตสคอพอลิดินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์ได้สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอประมาณ 3 เท่าและ 2 เท่าตามลำดับ แคลลัสสามารถตอบสนองต่อเชื้อโรคได้เช่นเดียวกับเมล็ดอ่อนและใบของยางพารา

Daayf และคณะ (2003) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedimis* (Foa) สามารถกระตุ้นให้แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออินผลัมพันธุ์ต้านทาน (BSTN) มีการสะสมไฟโตเล็กซินในปริมาณสูงกว่าแคลลัสปาล์มพันธุ์อ่อนแอ (JHL) ได้ พืชจะมีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสขึ้นมาหลายไอโซไซม์ เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกันได้แก่ ช่วยซ่อมแซมผนังเซลล์ โดยจะเร่งกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน ซูเบอร์ิน เพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อไม้ (Van Huystee and Zheng, 1993) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. infestans* ได้ (Friend et al., 1973) ในใบยางพาราหลังติดเชื้อรา *P. botryosa* ใบยางพันธุ์ต้านทานจะตอบสนองต่อเชื้อราชนิดนี้ โดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินขึ้นบริเวณผนังเซลล์ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม ส่วนใบยางพันธุ์อ่อนแอเห็นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินไม่ชัดเจน ดังนั้นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ (นิลกุล, 2545)

### 1.5.4 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หมายถึง การนำแคลลัสในรูปของ friable แคลลัส มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะสมแก่การนำมาเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ แคลลัส (friable callus) ซึ่งเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ ออกจากกัน นอกจากนี้อาจใช้ส่วนของใบก็ได้ แต่ต้องทำการย่อยเนื้อเยื่อเสียก่อน โดยใช้ เอนไซม์เพคตินเนส 0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้สารละลายโพแทสเซียมเดกเตรนซัลเฟต (potassium dextran sulfate) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

#### ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

- 1) เพื่อการศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์
- 2) เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์
- 3) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน
- 4) เพื่อการผลิตสารชีวเคมีบางชนิดในห้องทดลอง
- 5) เพื่อการผลิตเอ็มบริอยด์
- 6) เพื่อการผลิตพันธุ์ต้านทาน

Egea และคณะ (2001) นำเซลล์แขวนลอยของพริกไทยพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ มาศึกษาการตอบสนองต่ออิลิซิเตอร์ 2 ชนิด คือ lyophilized mycelium และ filtrate ของ *P. capsici* หลังจากถูกกระตุ้นพบว่าเซลล์แขวนลอยสร้าง PR-proteins ชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และมีการสะสมของลิกนิน ในพันธุ์ต้านทานพบว่ามีผนังเซลล์หนาขึ้น เนื่องจากการสะสมของลิกนินเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค การเพิ่มขึ้นของลิกนินสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งพบเฉพาะในสายพันธุ์ต้านทาน นอกจากนี้ในสายพันธุ์อ่อนแอยังพบ necrosis น้อยกว่าสายพันธุ์ต้านทาน เนื่องจากพันธุ์ต้านทานมีการตอบสนองแบบ hypersensitive cell death และยิ่งเชื่อว่า necrosis ที่เกิดขึ้นดังกล่าวเกิดจากการสะสมของลิกนิน

Wang และคณะ (2008) นำ oligochitosan มากระตุ้นเซลล์แขวนลอยของยาสูบ เพื่อศึกษาการป้องกันตัวเองของพืช ผลการทดลองพบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย oligochitosan ที่มีปริมาณสูงๆ ทำให้เซลล์แขวนลอยของยาสูบตาย oligochitosan ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยตายในชั่วโมงที่ 72 ถึง 40.6 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์แขวนลอย ลักษณะการตายของเซลล์แขวนลอยในพืชจะคล้ายกับการเกิด apoptosis ในเซลล์สัตว์ซึ่งนำไปสู่การหดตัวของไซโตพลาสซึมและเกิดการรวมตัวกันแน่นของโครมาติน

oligochitosan กระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยสร้าง  $H_2O_2$  เป็นสัญญาณไปสู่การตายของเซลล์ เพื่อต้องการยับยั้งการตายของเซลล์แขวนลอยที่มีผลเนื่องมาจาก  $H_2O_2$  จึงทำการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยโดยใช้ตัวกระตุ้น 2 ชนิดรวมกันคือ oligochitosan และตัวยับยั้งการสะสมของ  $H_2O_2$  พบว่าเซลล์แขวนลอยยังถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายเช่นเดิม จึงสันนิษฐานได้ว่าการตายของเซลล์แขวนลอยที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย oligochitosan ไม่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของ  $H_2O_2$

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในใบยางพารา
2. ศึกษา substrate specificity ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ เมื่อใช้ guaiacol, syringaldazine, o-dianisidine และสคอพอลิติน เป็นสับสเตรท
3. เตรียมเซลล์แขวนลอยจากเมล็ดอ่อนยางพารา ทดสอบเซลล์แขวนลอยที่ได้ด้วย filtrate จากเชื้อรา *P. palmivora*
4. ศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของยางพารา จากการกระตุ้นด้วย filtrate จาก *P. palmivora*
5. เตรียมเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นจาก filtrate ให้บริสุทธิ์บางส่วน
6. ศึกษาคุณสมบัติของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่เตรียมได้

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### วัสดุ

ตารางที่ 2.1 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิต

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.05	Merck
Acetic anhydride	102.09	Merck
Acrylamide	71.1	Merck
Agar	-	วิทยาธรรม
Ammonium sulfate	132.14	Merck
Ammonium persulfate	228.7	Merck
6-Benzyladenine (BA)	225.3	Sigma
Bovine serum albumin	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Calcium carbonate	100.09	Fluka
Citric acid	210.14	Carlo erba
Commassie brilliant blue G250	854.0	Sigma
Commassie brilliant blue R250	826.0	Sigma
Cupric sulphate-5-hydrate	249.68	Baker
2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	221.04	Sigma
3,5-dinitrosalicylic acid	228.19	Fluka chemical
3,3'-Dimethoxybenzidine dichloride (o-dianisidine)	317.2	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	98.15	Merck
Ethanol	46.07	Merck
Evans blue	960.82	Sigma
Ethylenediaminetetracetic (EDTA)	249.68	Baker
Glycine	960.9	Sigma

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	34.02	Sigma
MES hydrate	195.2	Sigma
Methanol	32.04	Carlo Erba
Murashige and Skoog basal salt mixture (MS)	-	Sigma
Myo-inositol	180.16	Sigma
Nicotinic acid	123.11	Sigma
N,N-methylene bisacrylamide	154.2	Merck
N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED)	116.2	Merck
O-dianisidine	317.2	Sigma
Potassium acetate	98.15	Merck
Potato dextrose agar	-	Difco
Phosphoric acid	98.0	Baker Analyzed
Phytigel	-	Sigma
Scopoletin	192.2	Sigma
Sephadex G-50	-	Sigma
Syringaldazine	360.37	Sigma
Sodium acetate	136.08	Carlo erba
Sodium chloride (NaCl)	58.44	BDH
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	288.4	Merck
Sodium dihydrogen phosphate	157.90	Carlo erba
Sodium hydroxide (NaOH)	40.0	BDH
Sucrose	342.30	Carlo erba
Thiazuron (TDZ)	220.3	Sigma
Tricine	179.18	Fluka
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121.1	Merck
Thiamine hydrochloride	337.27	Sigma
Urea (NH <sub>2</sub> .CO.NH <sub>2</sub> )	60.06	Unilab
V <sub>8</sub>	-	Campbell Soup

## อุปกรณ์

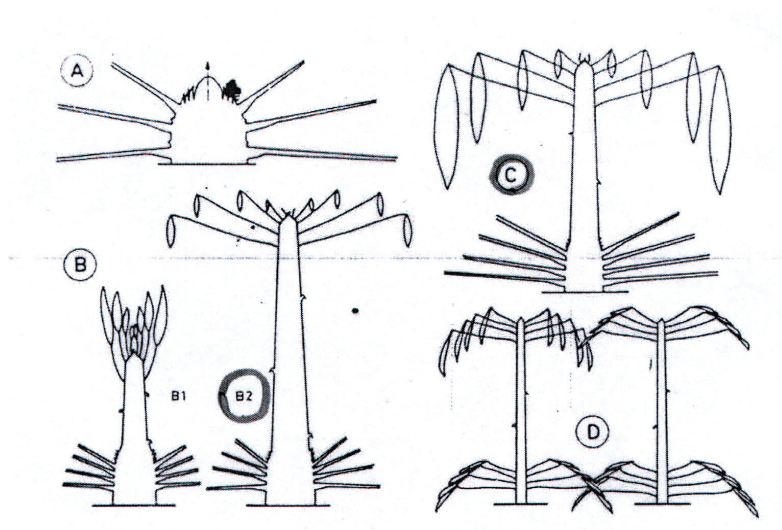
1. กล้องจุลทรรศน์ Olympus CH 40 (Japan)
2. กล้องถ่ายรูป Sony cybershot 7.1 ล้านพิกเซล digital (Japan)
3. ขวด Duran ขนาด 0.1, 0.25, 0.5, และ 1 ลิตร
4. ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 6 ออนซ์
5. คอลัมน์ PD-10 (Pharmacia)
6. เครื่องชั่งสองตำแหน่ง Diethelm model 12909657 (Japan)
7. เครื่องชั่งตำแหน่ง
8. ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร
9. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 และ 11 เซนติเมตร
10. ต้มมีดผ่าตัด
11. ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)
12. ไบโอมีดผ่าตัด เบอร์ 23
13. ปากคีบปลายแหลมความยาว 120 -150 มิลลิเมตร
14. ปีกเกอร์ ขนาด 0.1, 0.25, 1 และ 2 ลิตร
15. ปิเปตแก้ว ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร
16. ปิเปตแก้วตัดปลาย ขนาด 10 มิลลิลิตร
17. ไมโครอโตปิเปต พร้อมทิป ขนาด 50, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
18. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave SS-320 Tomy Japan)
19. Orbital shaker incubator, Paton scientific model 013422 (South Australia)
20. Centrifuge J2-21 operation, Beckam (USA)
21. Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
22. pH meter Cyberscan 1000 (Singapore)
23. Power supply model 1000/500, Biorad (USA)
24. Electroporesis apparatus, ATTA Cooperation (Japan)
25. Shimadzu UV-Vis recording spectrophotometer model UV160A (Japan)
26. Spectrofluorophotometer RF-1501 Shimadzu (Japan)
27. Freeze dryer และ Deep-freeze refrigerator, Sanyo (Japan)
28. UV box, Vilber Lourmat (France)

## วิธีการทดลอง

### 2.1 การศึกษาแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

#### 2.1.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางระยะต่างๆ เมื่อติดเชื้อในธรรมชาติ

นำใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) ในระยะ B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D ดังรูปที่ 2.1 ในช่วงที่ใบติดและไม่ติดเชื้อในธรรมชาติ มาบดในไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดด้วยสารสกัดในอัตราส่วน 2 มิลลิเมตรต่อใบยางพารา 1 กรัม สารสกัดประกอบด้วย phosphate buffer 20 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7.0 ประกอบด้วย Triton X-100 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ PVPP 3 เปอร์เซ็นต์ คั้นเอาเฉพาะน้ำ จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดส่วนใสไปย้อมความม่วงไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสใช้สคอพอลิตินเป็นสับสเตรท

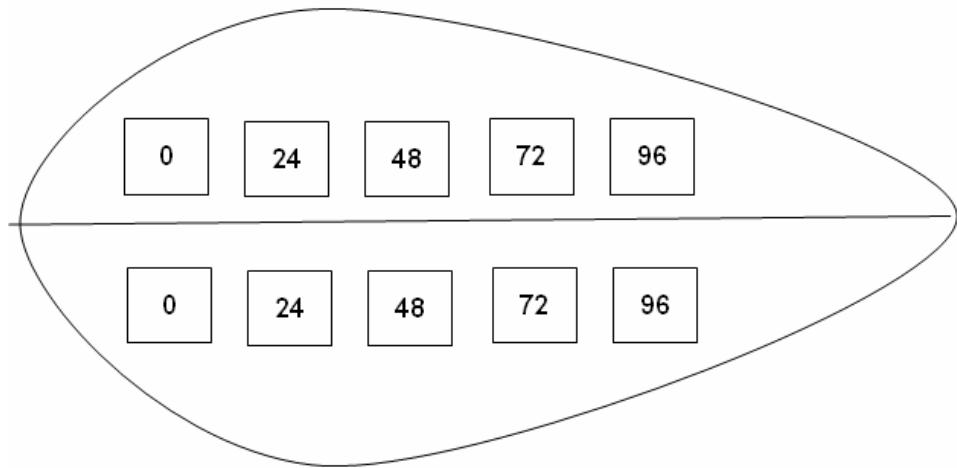


รูปที่ 2.1 แผนภาพรูปแบบอายุใบยางพาราตั้งแต่ชั้นอายุ A, B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C และ D (ที่มา: Breton et al., 1997)

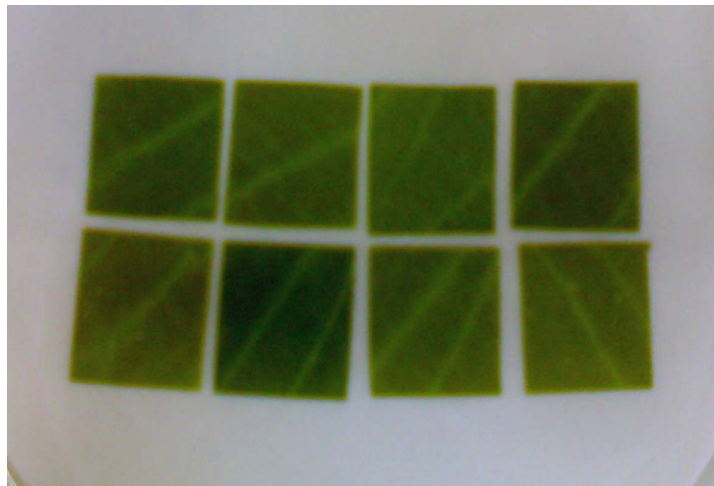
#### 2.1.2 การศึกษาแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกกระตุ้นด้วยบาดแผลของยางพารา 2 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคต่างกัน

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) โดยจะคัดเลือกใบยางที่มีอายุอยู่ระหว่างขั้น B<sub>2</sub>-C stage (Breton et

al., 1997) ตัดให้มีขนาด 1x1 ตารางนิ้ว จำนวน 50 ชิ้น (รูปที่ 2.2) วางบนกระดาษกรองชั้นเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง (รูปที่ 2.3) ทำการสกัดใบยางพาราตามข้อ 2.1.1 แล้วนำสารสกัดส่วนสีไปย้อมความม่วงไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส



รูปที่ 2.2 แสดงตำแหน่งการตัดใบยางพาราที่ชั่วโมงต่างๆ



รูปที่ 2.3 แสดงการตัดใบยางพารา ขนาด 1X1 ตารางนิ้ว นำมาวางบนกระดาษกรองชั้นแล้วเก็บที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ



### 2.1.3 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ เมื่อใช้ guaiacol, syringaldazine, o-dianisidine และสคอพอลิติน

การตรวจหาแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากแต่ละชั้นตอนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Davis (1964) ซึ่งใช้เจลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-HCl 0.5 โมลาร์ ที่ pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน ใช้โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-HCl 1.5 โมลาร์ ที่ pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง เตรียมสารละลายโปรตีนที่ได้จากสารสกัดโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ native PAGE 1 ส่วน บัฟเฟอร์ตัวอย่างประกอบด้วย Tris-HCl 0.2 โมลาร์ pH 6.8, glycerol 40 เปอร์เซ็นต์ และ bromophenol blue 0.4 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 15 ไมโครกรัม ต่อ 1 ช่องเจล สำหรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ Tris-HCl 0.025 โมลาร์ ที่มี glycine 0.2 โมลาร์, pH 8.3 กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ต่อเจล 1 แผ่น รองนสี bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนถึงขอบล่างของแผ่นเจล ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟฟ้า ย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 , เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และ กรดอะซิติก 7.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลายผสมของ เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 88 จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (3%)	Separating gel (7%)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	3.00 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.25 ml
10% Ammonium persulfate	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	13 $\mu$ l
Distilled water	3 ml	6 ml
Total volume	5 ml	13 ml

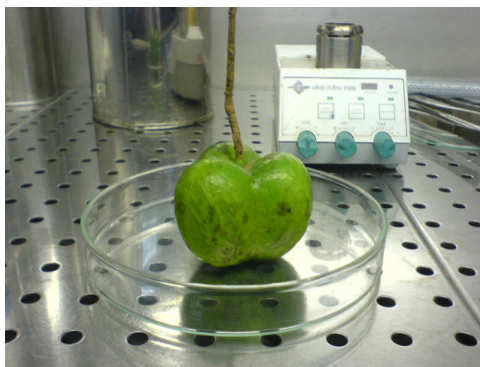
## 2.1.4 การย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเจลภายใต้การแยกโปรตีนโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ของ guaiacol,  $H_2O_2$  0.4 โมลาร์ ใน phosphate บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์, pH 6.5 ปรากฏสีแดงอิฐของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในขณะที่ *o*-dianisidine จะเห็นสีแดงส้ม เมื่อย้อมด้วย *o*-dianisidine 40 มิลลิโมลาร์,  $H_2O_2$  0.4 โมลาร์ ใน sodium acetate บัฟเฟอร์, pH 5.4 ส่วนสคอพอลิตินติดสีน้ำเงินเข้ม ตรวจสอบในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย phosphate บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์, pH 6.5 ที่มี  $H_2O_2$  3 มิลลิโมลาร์ และเมื่อย้อมด้วย syringaldazine ปรากฏสีชมพู ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย syringaldazine 40 มิลลิโมลาร์ และ  $H_2O_2$  3 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ปรากฏ และตรวจหาไอโซไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตัวของยางพารา

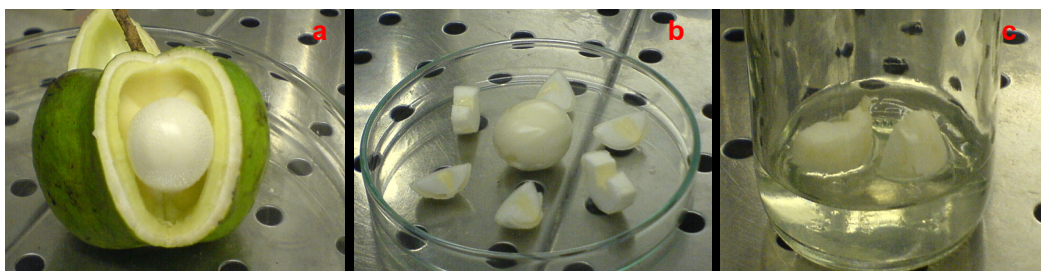
## 2.2 การชักนำเซลล์แขวนลอยจากเมล็ดอ่อนยางพารา

### 2.2.1 การคัดเลือกผลและชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา

ใช้เมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ BPM-24 (ต้านทานต่อ *P. palmivora*) อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ หลังจากผสมเกสร (ดังแสดงในรูปที่ 2.4) นำผลมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวหนังด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟ ทำเช่นนี้ 1-2 ครั้งจนแน่ใจว่าผิวหนังสะอาดปราศจากเชื้อ จากนั้นกรีดพูของผลออกเป็นรอยขนานกัน 2 แนวในแนวตั้ง แล้วกรีดอีกแนวตั้งขนานซึ่งขวางกับรอยตัดเดิม เปิดเปลือกผลออกจะเห็นเมล็ดอ่อนรูปร่างกลมขนาดเล็กติดอยู่กับรก ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดแยกเมล็ดออกจากผล ผ่าครึ่งเมล็ดอ่อนตามยาวเพื่อแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วผ่าเมล็ดอีกครั้งตามขวางเพื่อแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 ส่วน ดังนั้น 1 เมล็ดสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ส่วน นำเมล็ดที่ตัดแบ่งเป็นส่วน ๆ ไปเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัส MS-1 (ตารางที่ 2.3) วางเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส (ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแสดงในรูปที่ 2.5) เปลือกหุ้มเมล็ดจะใช้เวลาพัฒนาเป็นแคลลัสภายใน 3-4 สัปดาห์ เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงทำการย้ายเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มปริมาณแคลลัส MS-2 (ตารางที่ 2.3) ทุก 4 สัปดาห์



รูปที่ 2.4 แสดงผลอ่อนยางพาราอายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ ภายหลังจากผสมเกสร



รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา เรียงตามลำดับ  
 ขั้นที่ กรีดพูของผลออก (a), แบ่งเมล็ดอ่อนออกเป็น 6 ส่วน (b) และ วางเลี้ยงบน  
 อาหารสูตร MS-1 (c)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS ซึ่งดัดแปลงเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)	
	ชักนำแคลลัส (MS-1)	เพิ่มปริมาณ (MS-2)
$\text{KNO}_3$	1900	1900
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	1650
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	322.2	322.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	180.7	180.7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9	16.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	6.2

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)	
	ชักนำแคลลัส (MS-1)	เพิ่มปริมาณ (MS-2)
KI	0.83	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.25	37.25
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85	27.85
Thiamine.HCl	0.02	0.02
Pyridoxine.HCl	0.10	0.10
Nicotinic acid	0.10	0.10
Glycine	0.4	0.4
Myo-inositol	100	100
BA	1.0	1.0
2,4-D	1.0	1.0
Sucrose (%)	5	3
Phytigel agar (%)	0.23	0.23
pH	5.7	5.7

(ที่มา: ดัดแปลงจากประศาสตร์, 2538)

### 2.2.2 การชักนำเซลล์แขวนลอยจากแคลลัส

หลังจากทำการย้ายเลี้ยงเป็นจำนวน 3 ครั้ง ย้ายแคลลัสที่มีลักษณะร่วนไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเซลล์แขวนลอย วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 4$  องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 14 วัน ในการย้ายเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใช้เซลล์เริ่มต้นน้ำหนักประมาณ 0.3 กรัม เลี้ยงในอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร (รูปที่ 2.6) ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ (packed cell volume: PCV) หลังการย้ายเลี้ยงจนครบ 14 วัน สำหรับวิธีการวัดทำได้โดยการปล่อยให้เซลล์ตกตะกอนในหลอดเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 2 นาที เมื่อเซลล์ตกตะกอนหมดแล้ว อ่านค่าปริมาตรตะกอนเซลล์จากมาตรวัดข้างหลอด บันทึกผลการเจริญเติบโตและลักษณะเซลล์แขวนลอย นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟรูปแบบการเจริญเติบโต



รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนการย้ายเลี้ยง เลือกลงแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ (a) ย้ายลงในอาหารสูตรชักนำเซลล์แขวนลอย (b) เซลล์แขวนลอยหลังจากเจริญเติบโตเป็นเวลา 14 วัน (c)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)
	ชักนำเซลล์แขวนลอย
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	322.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	180.7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
Thiamine.HCl	0.02
Pyridoxine.HCl	0.10
Nicotinic acid	0.10
Glycine	0.4
Myo-inositol	100

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)
	ชักนำเซลล์แขวนลอย
2,4-D	1.0
TDZ	0.1
Sucrose (%)	3
pH	5.7

(ที่มา : ดัดแปลงจากเมฆาและสมปอง, 2536)

### 2.2.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้ *o*-dianisidine, guaiacol, syringaldazine และสคอพอลิตินเป็นสับสเตรท

นำเซลล์แขวนลอยในช่วงระหว่างการเจริญเติบโตมาทำการสกัดตามข้อ 2.1.1 แล้วนำสารสกัดส่วนโสมาศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย *o*-dianisidine 7.88 มิลลิโมลาร์, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3 มิลลิโมลาร์ ใน sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4 ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ตามวิธีของ Shannon และคณะ (1966) แล้วเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่มี guaiacol 0.67 มิลลิโมลาร์, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3 มิลลิโมลาร์ ใน potassium phosphate บัฟเฟอร์ pH 7.0 ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (Perez *et al.*, 2002) ส่วนในปฏิกิริยาที่ใช้ syringaldazine ประกอบด้วย syringaldazine 0.1 มิลลิโมลาร์, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 มิลลิโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ sodium phosphate บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์, pH 7.4 ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Quiroga *et al.*, 2000) และในปฏิกิริยาที่ใช้สคอพอลิติน ประกอบด้วย สคอพอลิติน 0.1 มิลลิโมลาร์, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 มิลลิโมลาร์ ใน potassium phosphate บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์, pH 6.5 ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อ 1 นาที ( $\cdot OD./min$ ) แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

## 2.3 การเตรียมน้ำเลี้ยง (filtrate) ของ *P. palmivora*

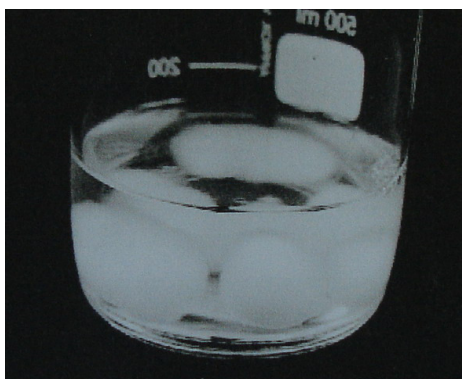
### 2.3.1 การเตรียม *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์

*P. palmivora* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางสงขลา ทางศูนย์วิจัยยางสงขลาได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์ โดยการเก็บตัวอย่างจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วง จากนั้นผู้วิจัยได้นำสารตัวอย่างมาทำการแยก *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์ (isolate) อีกครั้ง โดยการกระตุ้นการสร้างซุโอสปอร์ออกมา เพื่อให้ได้สปอร์เดี่ยว (monospore) แล้วนำมาเลี้ยงบน

อาหาร Potato Dextrose Agar, PDA ย้ายโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงบนอาหาร PDA อีกครั้ง หลังจากนั้นเลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส จึงจะสามารถนำไปใช้งานได้

### 2.3.2 การเตรียม filtrate จาก *P. palmivora*

ตัดชิ้นอาหารที่มี *P. palmivora* ( $\varnothing = 0.6$  เซนติเมตร) จำนวน 1 เม็ดต่อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร Henninger ซึ่งประกอบไปด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 เปอร์เซ็นต์,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 เปอร์เซ็นต์, Asparagine 0.1 เปอร์เซ็นต์, Thiamine 0.0001 เปอร์เซ็นต์, Yeast extract 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ D-Glucose 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเขย่าในที่มืดที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน *P. palmivora* จะค่อยๆ ผลิตอิธิซิดินและโปรตีนต่าง ๆ ออกมาใน filtrate (รูปที่ 2.7) เมื่อครบกำหนดนำมากรองเส้นใยออกด้วย vacuum นำ filtrate ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 2.7 แสดง *P. palmivora* เจริญในอาหารสูตร Henninger ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

### 2.3.3 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนใน filtrate

นำ filtrate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมแบรดฟอร์ด 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

### 2.3.4 การตรวจสอบขนาดของโปรตีนต่าง ๆ ใน filtrate ด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด 7x8 เซนติเมตร หนา 0.75 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ซึ่งมีส่วนประกอบของเจلدังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (Tricine-SDS-PAGE)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (16.5%)
49.5% Acrylamide-bisacrylamide	0.40 ml	4.33 ml
3.0 M Tris-HCl, pH 8.45+0.3% SDS	1.2 ml	4.33 ml
10% Ammonium persulfate	50 µl	200 µl
TEMED	10 µl	13 µl
Deionized water	3.34 ml	4.00 ml
Total volume	5.0 ml	13.0 ml

(ที่มา: ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli, 1970)

นำสารละลายตัวอย่าง (ดูภาคผนวก) และสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วย Phosphorylase b 97.4 กิโลดาลตัน, BSA 66.2 กิโลดาลตัน, Ovalbumin 45.0 กิโลดาลตัน, Carbonic anhydrase 31.0 กิโลดาลตัน, Soybean trypsin inhibitor 21.5 กิโลดาลตัน) ใส่ในแต่ละช่องเจล ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 โมลาร์, Tricine 0.1 โมลาร์ และ SDS 0.1 เปอร์เซ็นต์, pH 8.25 เปิดกระแสไฟฟงที่ 30 มิลลิแอมป์ ใช้ระยะเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง สีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่ไปจนเกือบถึงขอบล่างของแผ่นเจล (ห่างจากขอบล่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร) ปิดกระแสไฟและนำเจลมาย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต



## 2.4 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง filtrate ของ *P. palmivora* กับเซลล์แขวนลอย ยางพารา

### 2.4.1 การบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ filtrate ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วัน มาบ่มด้วย filtrate ใช้เซลล์ 0.5 กรัม ใน 5 มิลลิลิตรของ MES hydrate บัฟเฟอร์ (MES) ที่ประกอบด้วย MES บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์, MS 5 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่คิดเป็นโปรตีนรวม 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สังเกตผลการเรืองแสงของสคอพอลิตินด้วยตาเปล่าทุก 12 ชั่วโมง โดยการนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) เมื่อครบเวลาที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แยกเซลล์แขวนลอยออกจาก MES บัฟเฟอร์ โดยการกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำ MES บัฟเฟอร์ไปตรวจวัดการสังเคราะห์สคอพอลิติน เพื่อหาความเข้มข้นของ filtrate ที่เหมาะสมคือสามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยมีการสังเคราะห์สคอพอลิตินมากที่สุดสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

### 2.4.2 การบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate เพื่อศึกษากลไกการป้องกันตัวเอง ของพืช

วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 แต่บ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากข้อ 2.4.1 คือ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย (ความเข้มข้นที่ให้ค่าสคอพอลิตินสูงสุด) เมื่อถึงเวลาที่กำหนด คือ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อแยกเซลล์แขวนลอยออกจาก MES บัฟเฟอร์ เพื่อนำไปศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่ปล่อยลงใน MES บัฟเฟอร์และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยต่อไป

### 2.4.3 การสกัดเนื้อเยื่อเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการบ่มในข้อ 2.4.2 มาสกัดใน Sodium Phosphate บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ที่มี PVP 3 เปอร์เซ็นต์ และ Triton-X100 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำสารสกัดส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 2.4.4 การศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน

นำ MES บัฟเฟอร์ จากการทดสอบเซลล์แขวนลอยมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารตั้งกล่าวมาวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น ( $\lambda$  excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย ( $\lambda$  emission) 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณและเวลาในการสังเคราะห์สคอพอลิติน

#### 2.4.5 การศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส) เมื่อใช้ o-dianisidine, guaiacol, syringaldazine และสคอพอลิตินเป็นสับสเตรท

นำสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการบ่มด้วย filtrate มาศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของพืช ทดสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามข้อ 2.2.3 โดยใช้ o-dianisidine, guaiacol, syringaldazine และสคอพอลิตินเป็นสับสเตรท จากนั้นคำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อ 1 นาที ( $\cdot OD./min$ ) แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

### 2.5 การทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์บางส่วน

#### 2.5.1 การบ่มเซลล์แขวนลอยเพื่อเตรียมทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส บริสุทธิ์บางส่วน

ใช้ความเข้มข้นของ filtrate ที่ให้ค่าการกระตุ้นสคอพอลิตินสูงสุดจาก 2.4.1 จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยปริมาณ 43 กรัม เก็บเซลล์แขวนลอยที่ 80 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดตามข้อ 2.1.1 ในอัตราส่วนสารสกัด 1 มิลลิเมตรต่อเซลล์แขวนลอยยางพารา 1 กรัม แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

#### 2.5.2 การทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยจากข้อ 2.5.1 มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปตกตะกอนโปรตีนด้วย  $(NH_4)_2 SO_4$  ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ละลายกลับด้วย phosphate บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ PD-10 (กำจัดเกลือออก) หลังผ่าน PD-10 ปริมาตรจะเพิ่มขึ้นเป็น 12 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปลง

คอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B (ion exchange) ปริมาตรคอลัมน์ 20 มิลลิลิตร เซคอลัมน์ โดยใช้ความเข้มข้นของ NaCl 0.05 - 0.1 โมลาร์ ใน phosphate บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บหลอดละ 3 มิลลิลิตร

### 2.5.3 การตรวจหาโปรตีนหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-sephrose

หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose นำสารละลายที่ได้ทุกๆ 2 หลอดมาวัดปริมาณโปรตีน โดยนำสารละลาย 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

### 2.5.4 การวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังจากผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารละลายที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose ทุกๆ 2 หลอดมาวัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย *o*-dianisidine 7.88 มิลลิโมลาร์, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3 มิลลิโมลาร์ ใน sodium acetate, pH 5.4 ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อ 1 นาที ( $\cdot$ OD./min) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ

### 2.5.5 การตรวจหาเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ด้วยวิธีเเล็กโตรโฟริซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) ด้วยคอลัมน์ Ion exchange แบบ anionic

การตรวจหาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ ทำได้โดยการนำยอดพีคที่ได้จากการวัดที่ได้จากข้อ 2.5.4 ซึ่งพบว่ามียอดพีคจากการกระตุ้นด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น NaCl 0.07, 0.08 และ 0.09 M มาแยกโปรตีนด้วยวิธี native PAGE ทำการย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย sodium acetate บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์, pH 5.4, *o*-dianisidine 40 มิลลิโมลาร์ และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 โมลาร์ แช่แผ่นเจลในสารละลายนี้ 10 นาที ปรากฏแถบโปรตีนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นสีแดง-ส้ม เปรียบเทียบแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ปรากฏ

## 2.6 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

### 2.6.1 $K_m$ , $V_{max}$ ของแต่ละสับสเตรท

นำยอดฟีดของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดทดลองมาหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตรวจวัดในช่วงความเข้มข้น 0-1 มิลลิโมลาร์ ของ *o*-dianisidine, guaiacol, syringaldazine และสคอพอลิติน ในปฏิกิริยาที่มี  $H_2O_2$  (3.3, 3.3, 1.0 และ 1.0 มิลลิโมลาร์) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460, 470, 530 และ 595 นาโนเมตร ตามลำดับ นำค่า  $V_{max}$  และ  $K_m$  ที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweaver-Burk ตามสูตร  $\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$

### 2.6.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมและความคงตัวที่ pH ต่าง ๆ ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากข้อ 2.6.1 พบว่าสับสเตรทที่มีค่า catalytic power ( $V_{max}/K_m$ ) ที่เหมาะสมที่สุดคือ *o*-dianisidine ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมทำได้โดยนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปวัดความว่องไวในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย *o*-dianisidine 7.88 มิลลิโมลาร์,  $H_2O_2$  3.3 มิลลิโมลาร์ ใน pH มาตรฐาน ที่ pH 2-10 วัดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

นำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปบ่มที่ pH 2-10 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 5.4 แล้วนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมาวัดความว่องไวโดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย *o*-dianisidine 7.88 มิลลิโมลาร์,  $H_2O_2$  3.3 มิลลิโมลาร์ ใน sodium acetate, pH 5.4 วัดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

คำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อ 1 นาที ( $\bullet OD./min$ ) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ pH ต่าง ๆ

### 2.6.3 การศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ตรวจวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท นำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปบ่มที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปรับอุณหภูมิโดยการแช่ในกระบอกน้ำแข็งก่อนนำไปวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส คำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อ 1 นาที

(•OD./min) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิต่างๆ

#### 2.6.4 การศึกษาผลของสารเคมีต่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

นำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปบ่มใน 1 มิลลิโมลาร์ ของตัวยับยั้งต่างกัน ได้แก่ EDTA, CuSO<sub>4</sub>, NaN<sub>3</sub>, ascorbic acid, NaCl, citric acid, β-Me, salicylic acid, SDS และ dithiothreitol (DTT) ที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้ o-dianisidine เป็นสับสเตรท คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{100 (Ac - Ai)}{Ac}$$

Ac

Ac = ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ไม่มีตัวยับยั้ง

Ai = ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีตัวยับยั้ง

คำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อ 1 นาที (•OD./min) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

### บทที่ 3

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 3.1 ผลการศึกษาแถบของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในใบยางพารา

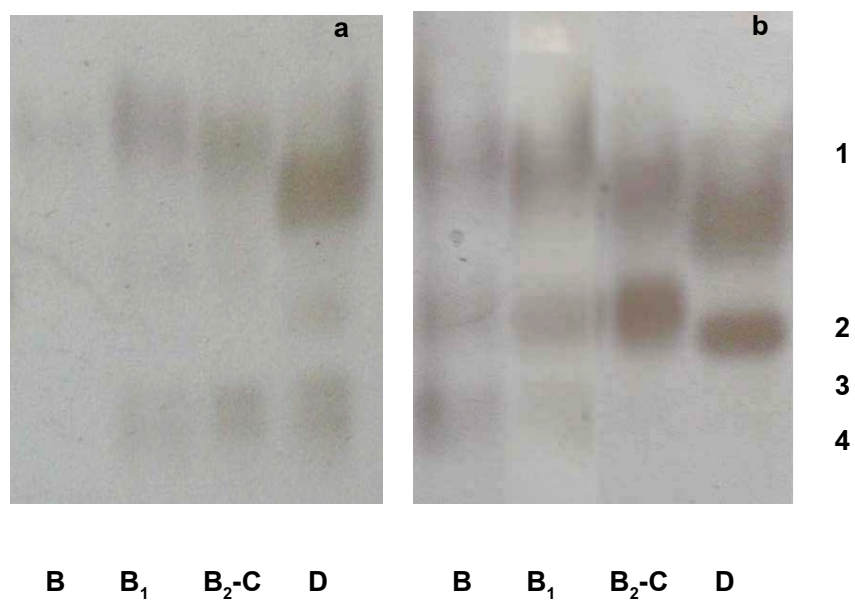
#### 3.1.1 ผลการศึกษาแถบของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในใบยางระยะต่าง ๆ เมื่อมีการติดเชื้อในธรรมชาติ

จากการนำใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) ระยะ B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D ในช่วงที่ใบติดและไม่ติดเชื้อในธรรมชาติ (รูปที่ 3.1) มาสกัดด้วย phosphate buffer 20 มิลลิโมลาร์, pH 7.0 ที่มี Triton X-100 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ PVPP 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำสารสกัดใบยางไปแยกแถบของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส ด้วยวิธี native PAGE และย้อมความม่วงไวของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส โดยใช้สคอพอลิตินและ guaiacol เป็นสับสเตรท พบว่ามีแถบของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสชนิดอะซิติค ในใบยางช่วงที่ไม่ติดเชื้อ ประมาณ 4 แถบ (รูปที่ 3.2 และรูปที่ 3.3 ตามลำดับ) ใบยางในระยะ B จะเห็นแถบที่ 1 แถบเดียว โดยจะเห็นแถบที่ 3 และ 4 เพิ่มขึ้นในระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D แต่จะพบแถบที่ 2 ในระยะ D เท่านั้น โปรตีนทั้ง 4 แถบที่พบในแต่ละระยะจะเห็นชัดเจนเมื่อใบยางมีความแก่มากขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้แถบที่ 1 ที่พบในระยะ D เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าระยะอื่นและอาจใช้แถบนี้บอกความอ่อนแก่ของใบยางพาราได้

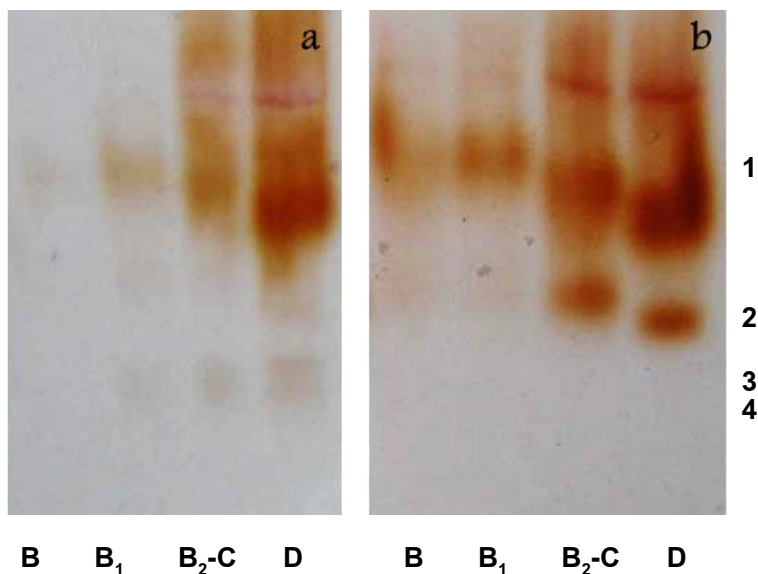
แถบเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในใบยางพาราในช่วงที่ติดเชื้อในธรรมชาตินั้นเห็นชัดเจนเพียง 2 แถบ คือ แถบที่ 1 และ 2 และเห็นชัดเจนตามความแก่ของใบยาง เมื่อย้อมด้วย guaiacol ซึ่งเป็นสับสเตรทที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินจะเห็นแถบที่ 1 ชัดกว่าแถบที่ 2 (รูปที่ 3.3) ในขณะที่ย้อมด้วยสคอพอลิตินจะเห็นแถบที่ 2 ชัดเจนกว่า (รูปที่ 3.2) โดยพบว่าแถบที่ 3 และ 4 ในระยะติดเชื้อจะจางหายไปเมื่อเทียบกับใบยางในระยะที่ไม่ติดเชื้อ เนื่องจากในขณะที่ใบยางพาราติดเชื้อจะหยุดการสร้างเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสแถบที่ 3 และ 4 และ/หรืออาจเปลี่ยนโครงสร้างจากแถบที่ 3 และ 4 ไปเป็นแถบที่ 2 ที่เคลื่อนที่ได้ช้าลง สารสกัดจากใบยางในระยะที่ติดเชื้อมีแถบที่ 2 ชัดเจนขึ้น ซึ่งบ่งบอกว่าแถบเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส แถบที่ 2 มีความเกี่ยวข้องเกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคของยางพารา นอกจากนี้ระหว่างการศึกษาเจริญเติบโตของใบยางพาราพบแถบที่ 1 ชัดขึ้นและย้อมติด guaiacol อาจเป็นไปได้ว่าแถบของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินเพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับใบยางพารา



รูปที่ 3.1 แสดงใบยางพาราในระยะ B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D ในระยะที่ไม่ติดเชื้อ



รูปที่ 3.2 แสดงแถบแอนไซม์เปอร้ออกซิเดสในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อย้อมด้วยสคอพอลิติน ช่วงใบไม่ติดเชื้อ (a) และ ช่วงใบติดเชื้อ (b) ระยะการเจริญเติบโต B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D



รูปที่ 3.3 แสดงแถบแอนไชม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อย้อมด้วย guaiacol ช่วงใบไม่ติดเชื้อ (a) และ ช่วงใบติดเชื้อ (b) ระยะการเจริญเติบโต B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D

### 3.1.2 ผลการศึกษาแถบของแอนไชม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผลในใบยางพารา 2 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคต่างกัน

เมื่อนำใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) มาทำให้เกิดบาดแผล โดยตัดให้มีขนาด 1 x 1 ตารางนิ้ว แล้ววางบนกระดาษกรองขึ้นเป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบแถบของแอนไชม์เปอร์ออกซิเดส ด้วยวิธี native PAGE โดยใช้สโคพอลิดินเป็นสับสเตรท พบว่าในชุดทดลองที่กระตุ้นการสร้างแอนไชม์เปอร์ออกซิเดสด้วยการทำให้เกิดบาดแผล ปรากฏแถบความว่องไวของแอนไชม์เปอร์ออกซิเดสชนิดอะซิติก 4 แถบ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งปรากฏเพียง 3 แถบ (1, 3 และ 4) เมื่อเวลาผ่านไปแถบที่ 3 และ 4 จะค่อยๆ จางหายไป แถบความว่องไวที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (แถบที่ 2) น่าจะถูกกระตุ้นจากการทำให้เกิดบาดแผล ความเข้มของแถบที่ 2 ในสายพันธุ์ BPM-24 ย้อมติดได้ชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่พันธุ์ RRIM600 เห็นชัดเจนที่ 72 ชั่วโมง นอกจากนี้แถบที่ 2 ในพันธุ์ BPM-24 ติดสีเข้มกว่าในพันธุ์ RRIM600 แสดงว่าพันธุ์ BPM-24 ตอบสนองต่อการเกิดบาดแผลได้รวดเร็วและมีปริมาณสูงกว่า และพบว่าแถบที่ 1 ของใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าของพันธุ์ RRIM600 (รูปที่ 3.4) จึงอาจใช้ไอโซไซม์นี้บ่งบอกสายพันธุ์ของยางพาราได้



ลักษณะแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (แถบที่ 2) และแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่หายไป (แถบที่ 3 และ 4) จากการถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผลเป็นไปในลักษณะเดียวกับใบในช่วงที่ติดเชื้อในธรรมชาติ แสดงว่าแถบที่ 2 ที่เกิดจากการทำให้เกิดบาดแผลในใบยางพาราเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

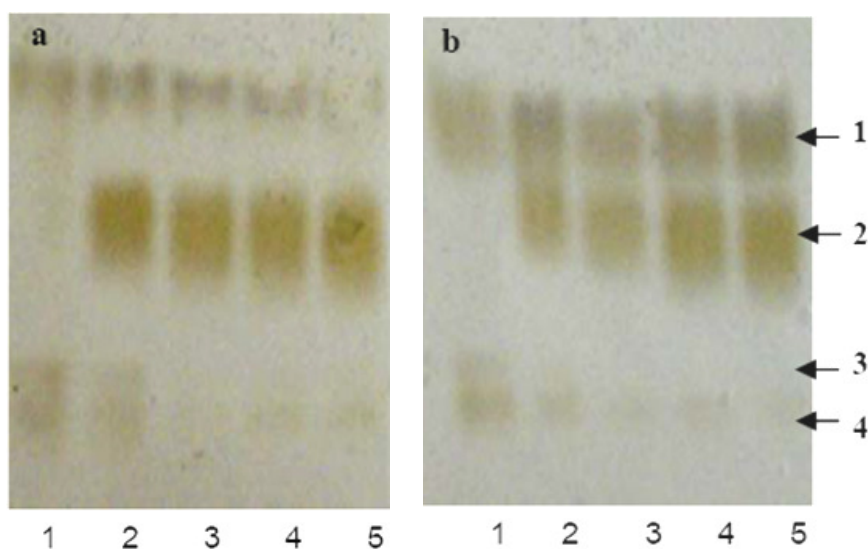
นอกจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส สามารถแยกระดับความต้านทานโรคในยางพาราได้แล้ว ในพืชชนิดอื่นได้มีรายงานไว้ด้วยเช่นกัน เช่น เมล็ดข้าวสาลีพันธุ์ต้านทาน (Suma # 3 และ Wang shui-bai) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Fusarium graminearum* มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงขึ้น ในระยะที่มีการสร้างน้ำนม ระยะออกทรง ระยะสร้างแป้ง และระยะเก็บเกี่ยว ตามลำดับ และมีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Falat และ Golestan) (Mohammadi and Kazemi, 2002)

Jung และคณะ (2002) ใช้เชื้อรา *Phytophthora capsici* กระตุ้นให้สร้างไอโซไซม์ใหม่ ๆ ในใบพริกไทย เมื่อย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จะปรากฏไอโซไซม์ 3 แถบโดยมี 1 แถบหลัก ขนาดโมเลกุล 53 กิโลดาลตัน และ 2 แถบรอง ขนาดโมเลกุล 45 และ 114 กิโลดาลตัน เมื่อนำใบพริกไทยมาบ่มด้วยเชื้อ *P. capsici* ร่วมกับเชื้อปฏิปักษ์ คือ *Paenibacillus illinoensis* ปรากฏเพียง 2 แถบ ที่มีขนาดโมเลกุล 53 และ 114 กิโลดาลตัน จึงสรุปได้ว่าไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสขนาดโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อพริกไทยติดเชื้อ แสดงว่าแถบความว่องไวนี้เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรค

จากการทดลองของพันธ์ศรี (2547) ได้ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสของยางพารา เมื่อกระตุ้นด้วยอิลิซิตินและซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* พบว่า อิลิซิตินกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้เร็วกว่าซูโอสปอร์ เนื่องจากอิลิซิตินเป็นสารที่มาจากเชื้อราที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงแทรกเข้าสู่เซลล์แคลลัสได้ง่ายกว่าการเจาะของซูโอสปอร์ โดยพบว่าแคลลัสยางพาราพันธุ์ GT1 (พันธุ์ต้านทาน) สร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ได้มากกว่าพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) ประมาณ 6 เท่า แถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสและใบยางปรากฏแถบความว่องไวที่เหมือนกัน นอกจากนี้การสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อต้านทานการบุกรุกจากเชื้อโรคก็เป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันโรค จึงสามารถใช้ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบอกระดับความต้านทานโรคได้ด้วย

นุรอมาลี (2547) ศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบ แบ่งเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ต้านทาน ได้แก่ พันธุ์ BPM-24 กับ PB235 วัดความ

ว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ในปริมาณสูงกว่ากลุ่มที่สอง ซึ่งเป็นกลุ่มพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ RRIT251 กับ RRIM600 ประมาณ 2-3 เท่าเมื่อนำมาตรวจความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) แล้วย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย *o*-dianisidine และ guaiacol พบ 2 ไอโซไซม์ (ไอโซไซม์ X และ Y) ในชุดควบคุม และ 3 ไอโซไซม์ (ไอโซไซม์ X, Y และ Z) ในชุดทดลอง มีไอโซไซม์ X เท่านั้น ที่แตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม กล่าวคือไอโซไซม์ X ในกลุ่มพันธุ์ต้านทานจะปรากฏแถบความว่องไวในตำแหน่งที่สูงกว่ากลุ่มพันธุ์อ่อนแอ เพื่อแยกความแตกต่างของไอโซไซม์นี้จึงเรียกไอโซไซม์ X ของพันธุ์ต้านทานว่า ไอโซไซม์  $X_1$  และของพันธุ์อ่อนแอ เรียกว่า ไอโซไซม์  $X_2$



รูปที่ 3.4 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 (a) และ RRIM600 (b) ย้อมด้วยสคอพอลิติน

ช่องที่ 1 : ชุดควบคุม

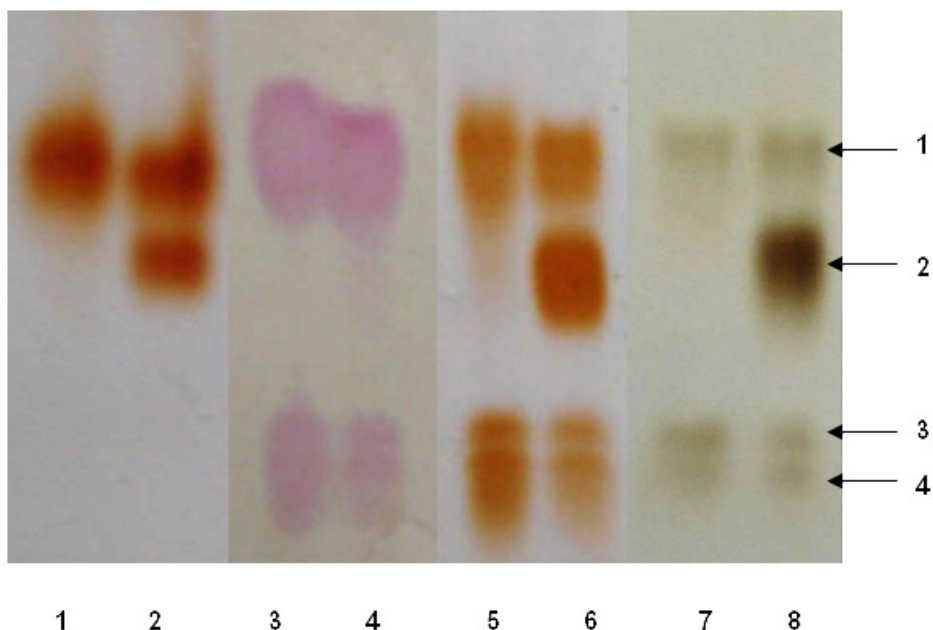
ช่องที่ 2, 3, 4 และ 5 : สารสกัดจากใบที่ทำให้เกิดบาดแผลและวางบนกระดาษกรองขึ้นเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

### 3.1.2 ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์เมื่อใช้ guaiacol, syringaldazine, *o*-dianisidine และสคอพอลิติน เป็นสับสเตรท

ไบบางพาราสายพันธุ์ BPM-24 ซึ่งตอบสนองได้ดีกว่าพันธุ์ RRIM600 มาศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทโดยนำไบบางมาทำให้เกิดบาดแผล แล้ววางบนกระดาษกรองขึ้นเป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม) และ 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบแอกติวิตี้ด้วยวิธี native PAGE

โดยใช้ guaiacol, syringaldazine, *o*-dianisidine และสคอพอลิตินเป็นสับสเตรท ซึ่งแต่ละตัวจะบ่งบอกกระบวนการป้องกันโรคที่เกี่ยวข้อง กล่าวคือ guaiacol และ syringaldazine ใช้ตรวจสอบไอโซไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินเพื่อสร้างความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ เพราะ guaiacol และ syringaldazine มีโครงสร้างคล้ายกับ coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง guaiacyl lignin และ syringyl lignin ตามลำดับการใช้ สคอพอลิตินเป็นสับสเตรท เพื่อศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์สคอพอลิตินให้กลายเป็นสารประกอบมีสีที่ไม่ละลายน้ำ (Gutierrez *et al.*, 1994) เนื่องจากยางพาราสร้างสคอพอลิตินขึ้นมากำจัดเชื้อที่เข้ามาลุกลาม ในขณะที่เดียวกันพืชก็มีวิธีการกำจัดสารชนิดนี้ เพื่อป้องกันความเสียหายภายในเซลล์ด้วย ดังนั้นสคอพอลิตินใช้เป็นสับสเตรทเพื่อตรวจสอบไอโซไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดทั้งสคอพอลิตินและ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ภายในเซลล์ ส่วน *o*-dianisidine ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็นหลัก จากรูปที่ 3.5 แถบที่ 1 สามารถย้อมติดได้ทุกสับสเตรท ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่มีอยู่แล้วในใบยางพาราและน่าจะเกี่ยวข้องกับลิกนิน เนื่องจากย้อมติดได้อย่างจำเพาะกับ guaiacol และ syringaldazine ต่างจากแถบที่ 2 ซึ่งถูกกระตุ้นจากการเกิดบาดแผลในใบยางพาราย้อมติด *o*-dianisidine และสคอพอลิติน เป็นหลัก และย้อมติด guaiacol เล็กน้อย แถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบนี้เกี่ยวข้องกับสลาย สคอพอลิตินและสร้างลิกนินชนิด guaiacyl lignin และเป็นแถบที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรค ส่วนแถบที่ 3 และ 4 สามารถย้อมติดได้ทั้ง syringaldazine, *o*-dianisidine และสคอพอลิติน แต่สังเกตได้ว่ามีความจำเพาะกับ syringaldazine เนื่องจากย้อมติดสีได้อย่างจำเพาะกับ syringaldazine มากที่สุด ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่มีอยู่แล้วในใบยางพาราและน่าจะเกี่ยวข้องกับลิกนินกลุ่ม syringyl lignin เพียงอย่างเดียว

นุรอามาลี (2547) ตรวจสอบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ตรวจพบความว่องไวได้ 3 ไอโซไซม์ (X, Y และ Z) ซึ่งมีไอโซไซม์ Y เท่านั้น ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค โดยจะทำหน้าที่โพลิเมอไรซ์โมโนลิกนอลให้เป็นลิกนินชนิดต่าง ๆ กัน และไอโซไซม์ Y สามารถย้อมติดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยสับสเตรทหลายชนิด ได้แก่ *o*-dianisidine, guaiacol, สคอพอลิติน, coniferyl alcohol และ syringaldazine



รูปที่ 3.5 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสจากไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อย้อมด้วยสับสเตรตต่างๆ

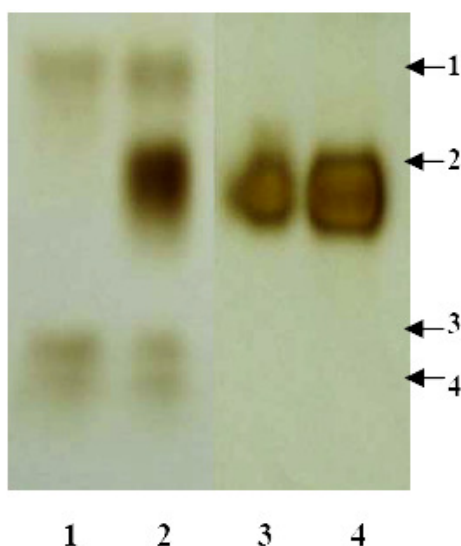
ช่องที่ 1, 3 5 และ 7: ชุดควบคุม

ช่องที่ 2, 4, 6 และ 8: สารสกัดจากใบที่ทำให้เกิดบาดแผลและวางบนกระดาษกรองขึ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมด้วย guaiacol (ช่อง 1 และ 2) syringaldazine (ช่อง 3 และ 4) *o*-dianisidine (ช่อง 5 และ 6) และสคอพอลิดิน (ช่อง 7 และ 8) ตามลำดับ

### 3.1.3 ผลการศึกษาเปอร้ออกซิเดสไอโซไซม์ในใบและเซลล์แขวนลอย ยางพารา

เมื่อนำไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 มาทำให้เกิดบาดแผลแล้ววางบนกระดาษกรองขึ้นเป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม) และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่บ่มด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย ที่ 0 และ 80 ชั่วโมง ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ตามการทดลองข้อ 3.4.1 แล้วตรวจสอบไอโซไซม์จากสารสกัดไบบางพารา ปรากฏว่ามี 4 แถบ (1, 2, 3 และ 4) โดยพบแถบความม่วงไวที่ถูกสร้างขึ้นใหม่เป็นแถบที่ 2 แสดงว่าถูกกระตุ้นจากการเกิดบาดแผล ในขณะที่ในเซลล์แขวนลอยปรากฏเพียงแถบเดียว ซึ่งเคลื่อนที่ได้ใกล้เคียงกับแถบที่ 2 ในไบบางพารา และเมื่อทำการบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate เป็นเวลา 80 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์เปอร้ออกซิเดส (แถบที่ 2) ในเซลล์แขวนลอยมีปริมาณสูงขึ้นและน่าจะเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคเพราะถูกกระตุ้นด้วย filtrate

จากเชื้อรา การที่พบแถบไอโซไซม์ที่ 2 ในเซลล์แขวนลอยตั้งแต่แรกนั้นอาจเนื่องมาจากการถูกกระตุ้นโดยการเขย่าเซลล์ในอาหารตลอดเวลา



รูปที่ 3.6 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางและเซลล์แขวนลอยยางพาราพันธุ์ BPM-24 ย้อมด้วยสคอพอลิติน

ช่องที่ 1 : ชุดควบคุมในใบยางพารา

ช่องที่ 2 : สารสกัดจากใบที่ทำให้เกิดบาดแผลและวางบนกระดาษกรองขึ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ช่องที่ 3 : ชุดควบคุมในเซลล์แขวนลอย

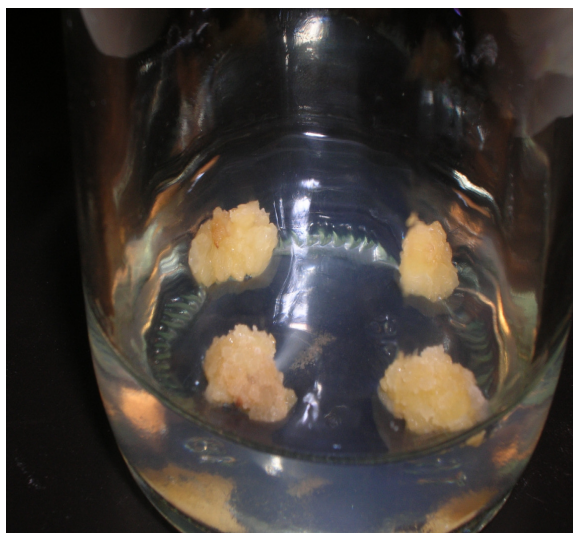
ช่องที่ 4 : เซลล์แขวนลอยที่ปั่นด้วย filtrate เป็นเวลา 80 ชั่วโมง

### 3.2 การชักนำเซลล์แขวนลอยจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา

#### 3.2.1 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ด

เมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์ BPM-24 ที่มีอายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการนำมาวางเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้การวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้มีลักษณะฟู สีเหลืองอ่อนและเกาะกันหลวมๆ (friable callus) เลือกใช้แคลลัสในช่วงอายุประมาณ 3 สัปดาห์หลังการย้ายเลี้ยง 3 ครั้ง สำหรับเตรียมเซลล์แขวนลอยและใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่างๆ ในยางพารา

โดยทั่วไปการชักนำแคลลัสและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จก็ต่อเมื่อนำชิ้นส่วนพืชที่มีกิจกรรมเนื้อเยื่อเจริญมาทำการเพาะเลี้ยง ผลยางพาราที่พัฒนามาระยะหนึ่งแต่ยังไม่ถึงระยะสุกจนแก่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญที่มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง อย่างไรก็ตามที่มีศักยภาพสูงและประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง คือ เปลือกหุ้มเมล็ด (สมปอง, 2539)



รูปที่ 3.7 แสดงแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราอายุประมาณ 4 สัปดาห์ หลังจากย้ายเลี้ยง ครั้งที่ 3

### 3.2.2 ผลการชักนำเซลล์แขวนลอยจากแคลลัส

การชักนำเซลล์แขวนลอยทำได้โดยการย้ายแคลลัสที่มีลักษณะ friable ไปเลี้ยงในอาหารเหลวแล้วเขย่าเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม แคลลัสยางพารามีสองประเภท เช่นเดียวกับแคลลัสพืชอื่นๆ คือแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่น เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวแล้วเขย่าเลี้ยงไม่สามารถชักนำเซลล์แขวนลอยได้ แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนแคลลัสอีกประเภทหนึ่งคือแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ เมื่อย้ายแคลลัสประเภทนี้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวแล้วเขย่าเลี้ยงสามารถชักนำเซลล์แขวนลอยได้ (สมปอง, 2539) เซลล์แขวนลอยยางพาราสามารถชักนำได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เช่น แคลลัสจากอับละอองเกสร (พจมาลย์ และ สมปอง, 2542) และจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน (Te-chato and Chartikul, 1993b; Sushamakumari *et al.*, 2000) เป็นต้น

จากรายงานของ เพ็ญมาศ (2549) ชักนำเซลล์แขวนลอยยางพารายังไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้มากนักและเซลล์แขวนลอยที่ได้มีลักษณะเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มก้อน ทั้งนี้

อาจเนื่องมาจากเลี้ยงเซลล์ในอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนชนิด 2,4-D กับ BA ผู้วิจัยจึงนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำเซลล์แขวนลอยที่เปลี่ยนชนิดของฮอร์โมนจาก BA เป็น TDZ ฮอร์โมนชนิด TDZ มีผลกระตุ้นกิจกรรมของไซโตไคนินโดยทำหน้าที่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นการแบ่งเซลล์ การแตกตาข้าง และชะลอการเสื่อม TDZ มีผลเพิ่มการสะสมไอออนของธาตุอาหารบางอย่าง และสารเมทาบอลิท์ซึ่งประกอบด้วยโพรลีน และกรดแอมโมไนค พบไรโบโซมและโพลีโซมจำนวนมากในไซโทพลาสซึม ทำให้การสังเคราะห์โปรตีน และกิจกรรมภายในเซลล์เกิดขึ้นมาก (Chvojka *et al.*, 1992 และ Huetteman and Preece, 1993; อ้างโดย ภาณุพงศ์ และสมปอง, 2546)

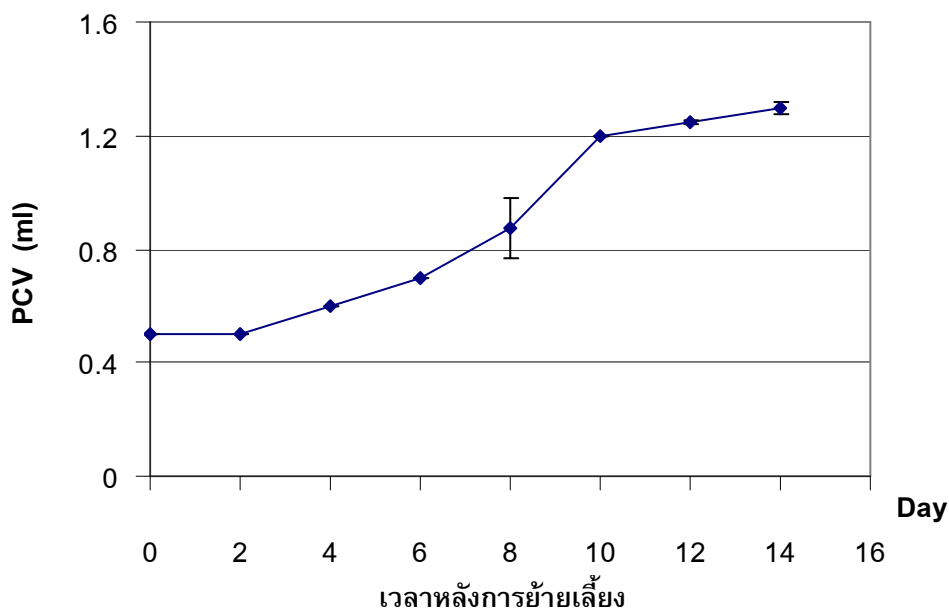
ผู้วิจัยเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอย่างพาราในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 2$  องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการย้ายเลี้ยงโดยใช้เซลล์น้ำหนัก 0.3 กรัม ได้เซลล์สี่เหลี่ยมอ่อนกระจายตัวและแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (รูปที่ 3.8) เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตเป็น 3 ระยะ คือ ระยะ lag phase, log phase และ stationary phase การใช้ตะกอนเซลล์เริ่มต้นน้อยกว่านี้อาจส่งผลให้การเจริญของเซลล์แขวนลอยไม่ดี การใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเจริญได้ดี แต่หากใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นมากเกินไปอาจมีผลทำให้เกิดการสะสมสารชีวเคมีและอนุพันธ์ของน้ำยางทำให้อาหารเพาะเลี้ยงขุ่น (ชวนพิศ, 2544)

การใช้ฮอร์โมนในการเลี้ยงที่เหมาะสมจะทำให้เซลล์พืชมีการแบ่งเซลล์ได้ดี จากงานวิจัยของ Santos-Gomes และ คณะ (2002) พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเติม BA ทำให้ได้เซลล์มีลักษณะเกาะกลุ่มกัน ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเติมไคนะตินจะได้เซลล์ส่วนใหญ่ที่มีลักษณะแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (majority single cell suspension)



รูปที่ 3.8 แสดงเซลล์แขวนลอยอย่างพารา หลังการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 เป็นเวลา 14 วันในอาหารสูตร MS เต็ม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยโดยการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ (PCV) โดยใช้ปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.5 มิลลิลิตร พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเป็น 3 ระยะ คือระยะที่ 1 lag phase อยู่ในช่วง 1-2 วัน หลังการย้ายเลี้ยง ระยะที่ 2 log phase อยู่ในช่วง 2-10 วัน และระยะที่ 3 stationary phase อยู่ในช่วงวันที่ 10-14 หลังการย้ายเลี้ยง (รูปที่ 3.9)



รูปที่ 3.9 รูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสพันธุ์ BPM-24 ทำการย้ายเลี้ยงทุกวันเป็นเวลา 14 วัน (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง  $\pm$  SD)



### 3.2.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

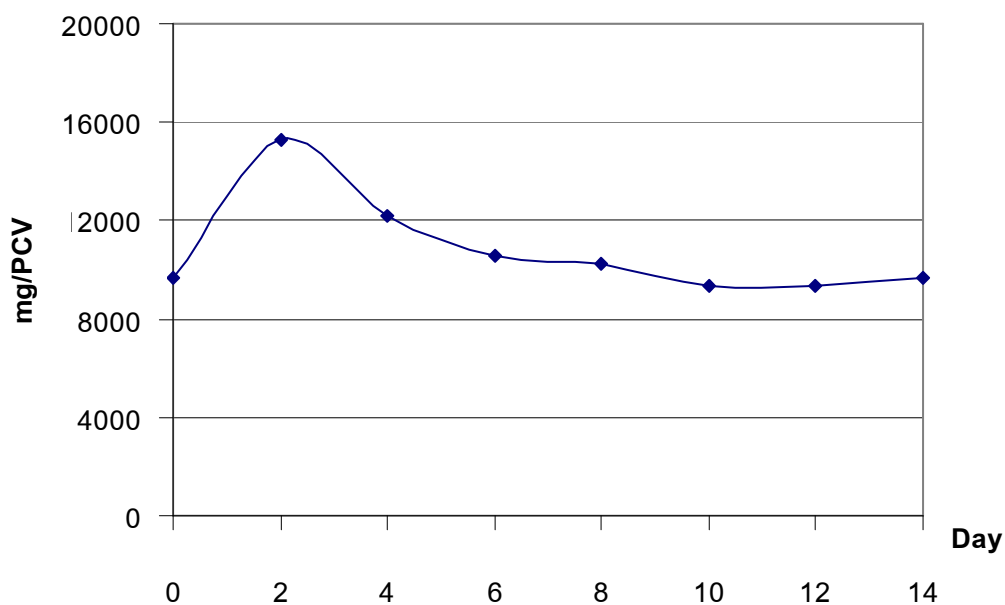
หลังจากเพิ่มปริมาณเซลล์แขวนลอยโดยคัดเลือกเซลล์เดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร MS สูตรชักนำการเกิดเซลล์แขวนลอย วัดปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเป็นเวลา 14 วัน แล้วสกัดเซลล์แขวนลอยเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ตารางที่ 3.1) โดยการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนนั้นเพิ่มขึ้นในช่วง 2 วันแรก มีค่าสูงสุดเป็น 15,307 มิลลิกรัมต่อ PCV ดังแสดงในรูปที่ 3.10

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้ *o*-dianisidine (O-POD), guaiacol (G-POD), syringaldazine (Z-POD) และสกอฟอลิดิน (S-POD) เป็นสับสเตรท (รูปที่ 3.11) พบว่าในระหว่างการเจริญเติบโต ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 4 ไอโซไซม์เพิ่มขึ้นในช่วง 0-8 วัน หลังจากนั้นจะคงที่ โดย Z-POD จะเพิ่มสูงตั้งแต่วันที่ 2 แล้วลดลงและเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 8 ปริมาณ 15.8 และ 15.1  $\Delta OD./ PCV$  ตามลำดับ ในขณะที่ S-POD และ O-POD เพิ่มสูงสุดที่วันที่ 4 และวันที่ 6 เท่ากับ 11.0 และ 9,530  $\Delta OD./ PCV$  ตามลำดับ โดย O-POD นั้นมีในปริมาณมากตั้งแต่ต้น แต่ G-POD จะมีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ มีการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 6 เท่ากับ 6.06  $\Delta OD./ PCV$

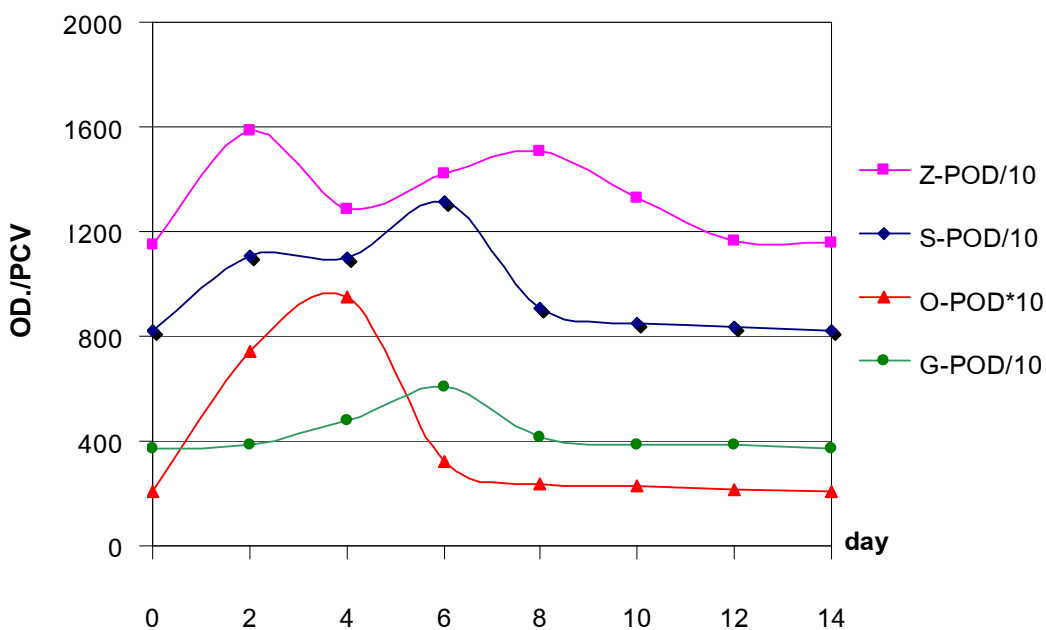
ในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ โดยปกติแล้วเซลล์จะปล่อยสารจำพวก reactive oxygen species (ROS) เช่น  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  และเมื่อเซลล์ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นทำให้เซลล์สร้างสารดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นด้วย อาจมีผลทำให้เซลล์เกิดโรคและตายได้ ดังนั้นเซลล์จึงมีวิธีการกำจัดสารกลุ่ม ROS เพื่อป้องกันความเสียหาย (Asada and Takahashi, 1987; Asada, 1999; Dat, 2000) ROS ทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดทีฟต่างๆ ได้แก่ ไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน, การหยุดทำงานของเอนไซม์ และเกิด DNA degradation เป็นต้น นอกจากนี้ ROS จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคและตายของเซลล์แล้ว ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคอีกด้วย (Mittler, 2002) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแอนติออกซิแดนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นมีหลายชนิด โดยมีหน้าที่ยับยั้งสารกลุ่ม ROS (Adachi *et al.*, 2000; Ookawara *et al.*, 2003; Comhair *et al.*, 2001) ทำให้ผู้วิจัยสนใจการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยอย่างพาราในช่วงระหว่างการเจริญเติบโต

Kim และคณะ (2004) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแอนติออกซิแดน ได้แก่ SOD, GPX และ G-POD ในเซลล์แขวนลอยของม้านเทศในระหว่างการเจริญเติบโตภายใต้ความเครียดจากกระบวนการออกซิเดทีฟพบว่า SOD, GPX และ

G-POD ภายในเซลล์แขวนลอยเพิ่มขึ้นหลังจากทำการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวในน้ำเลี้ยงเซลล์ (นอกเซลล์) มากกว่าภายในเซลล์



รูปที่ 3.10 แสดงค่าเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ในระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย ยางพาราเป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 3.11 แสดงค่าเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยยางพาราเป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าเปลี่ยนแปลงของโปรตีน (mg/PCV) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ( $\Delta OD./PCV$ ) ในระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยอย่างพาราเป็นเวลา 14 วัน

เวลา (วัน)	PCV (ml)	ปริมาณ โปรตีน mg/PCV	ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ( $\Delta OD./PCV$ )			
			Z-POD	S-POD	O-POD	G-POD
0	0.50	9,658	115	82	2,070	37
2	0.50	15,307	158	111	7,440	38
4	0.60	12,200	129	110	9,530	48
6	0.70	10,590	142	131	3,200	61
8	0.88	10,246	151	91	2,330	41
10	1.20	9,333	133	85	2,300	39
12	1.25	9,376	116	83	2,140	38
14	1.30	9,658	115	82	2,070	37

จากการทดลองเซลล์แขวนลอยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในช่วงการเจริญเติบโตที่น้อยที่สุดคือหลังจาก 10 วัน ซึ่งผู้วิจัยต้องการศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีผลมาจากการถูกกระตุ้นด้วยอิทธิฤทธิ์ต่างๆ เพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์แขวนลอยในช่วงอายุ 14 วันหลังจากย้ายเลี้ยง ในการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของเซลล์แขวนลอย

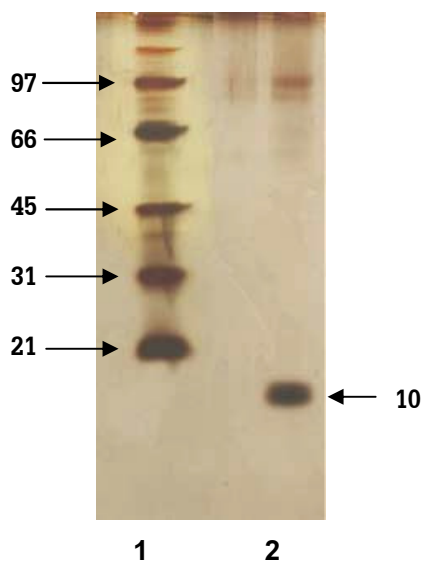
### 3.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ filtrate

ตัดเส้นใย *P. palmivora* ( $\emptyset = 0.5$  เซนติเมตร) จากจานอาหาร PDA จำนวน 1 ชิ้น ต่อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงสูตร Henninger แล้วเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบกำหนดนำมากรองเส้นใยของ *P. palmivora* ออกด้วย vacuum นำ filtrate ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่ามีแถบโปรตีนหลัก 1 แถบมีสีเข้มและหนาที่บ่งชี้ชัดเจน ซึ่งเมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลของแถบบ่งกล่าวเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานพบว่าเป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.12)

การทดลองของ Rattarasarn (2003) พบว่าสามารถใช้อิทธิฤทธิ์ (โปรตีนขนาด 10 กิโลดาลตัน) ที่บริสุทธิ์ ซึ่งมีชื่อเฉพาะว่า palmivorein (Churngchow and Rattarasarn, 2000) เพื่อการบอกระดับความต้านทานของโรคได้ เพราะอิทธิฤทธิ์ดังกล่าวทำให้เกิดการสร้างสคอพอลิ

ดินในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) ได้มากกว่าที่พบในพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) จากการทดลองของนารถธิดา (2546) ทำการเลี้ยง *P. palmivora* ในอาหารสูตร PDB เป็นเวลา 21 วัน แล้วทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการผ่านคอลัมน์ PD-10 ศึกษาผลเปรียบเทียบกับอิลิซิดินที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่าอิลิซิดินบริสุทธิ์และอิลิซิดินที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นเพ็ญมาศ (2549) นำอิลิซิดินที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนมาทดสอบกับแคลัสพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สคอพอลิดินในพันธุ์ BPM-24 ได้มากกว่าพันธุ์ RRIM600

Filtrate ที่มาจาก *P. palmivora* ในอาหารเลี้ยงสูตร Henninger ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้เวลาในการเลี้ยงสั้นกว่าคือ 15 วัน และยังมีราคาถูกกว่าอาหารสูตร PDB พบว่ามีโปรตีนหลักที่ผลิตออกมาในน้ำเลี้ยงเป็นอิลิซิดินและมีความบริสุทธิ์เทียบเท่ากับอิลิซิดินที่เลี้ยงในอาหารสูตร PDB ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ filtrate ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Henninger มาทดสอบกับเซลล์แขวนลอยยางพาราเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อไป



รูปที่ 3.12 แบบแผนของแถบโปรตีนแบบ Tricine-SDS-PAGE ของ filtrate จากการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

แถวที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย Phosphorylase b 97.4 กิโลดาลตัน BSA 66.2 กิโลดาลตัน, Ovalbumin 45.0 กิโลดาลตัน, Carbonic anhydrase 31.0 กิโลดาลตัน และ Soybean trypsin inhibitor 21.5 กิโลดาลตัน

แถวที่ 2 แถบโปรตีนจาก filtrate

Polkowska-Kowalczyk และคณะ (2003) ได้นำ filtrate ของ *P. infestans* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Henninger มากกระตุ้นใบมะเขือ 3 สายพันธุ์ (*S. nigrum*, cv Bzura และ Clone H-8105) เพื่อศึกษากระบวนการออกซิเดทีป ได้แก่การเกิด ROS, ไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน และ เอนไซม์ไลพอกซิเนส (LOX) พบว่า ROS ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ filtrate โดยใบของมะเขือพันธุ์อ่อนแอ (Clone H-8105) สร้าง ROS ได้มากกว่าพันธุ์ต้านทาน (cv Bzura และ *S. nigrum*) ระดับการสร้าง ROS ที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากความแตกต่างของยีนต้านทาน พบการเกิดกระบวนการไลปิดเปอร์ออกซิเดชันเฉพาะในสายพันธุ์ต้านทาน (*S. nigrum*) และเกิดหลังจากกระบวนการ oxidative burst (Polkowska-Kowalczyk and Maciejewska, 2001) การสร้างเอนไซม์ LOX ถูกกระตุ้นมาจาก  $H_2O_2$  พบในพันธุ์ต้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ เอนไซม์ LOX ส่งผลให้เกิดกระบวนการเมมเบรนเปอร์ออกซิเดชันทำให้เซลล์ตาย (Maccarrone *et al.*, (2002) นอกจากนี้ Macri และคณะ (1994) รายงานว่า  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นน้อยๆ สามารถกระตุ้นการเกิดเอนไซม์ LOX ในขณะที่  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นสูงๆ ลดระดับการสร้างเอนไซม์ LOX ให้น้อยลง

### 3.4 ผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง filtrate ของเชื้อรา *P. palmivora* กับเซลล์แขวนลอยยางพารา

#### 3.4.1 ผลการบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ filtrate ที่เหมาะสม

หลังจากบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการสร้างสคอพอลิตินที่ปล่อยออกนอกเซลล์แขวนลอย (extracellular) พบว่าทั้งอัตราเร็วและปริมาณในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของเซลล์แขวนลอย เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย มีค่าสูงสุดคือ 9.13 นาโนโมลต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย ที่ 72 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงที่ 96 ชั่วโมง ในขณะที่ filtrate ความเข้มข้น 0.150 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย กระตุ้นการสร้างสคอพอลิตินได้สูงสุดเท่ากับ 8.55 นาโนโมลต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย ในชั่วโมงที่ 96 (ตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.12)

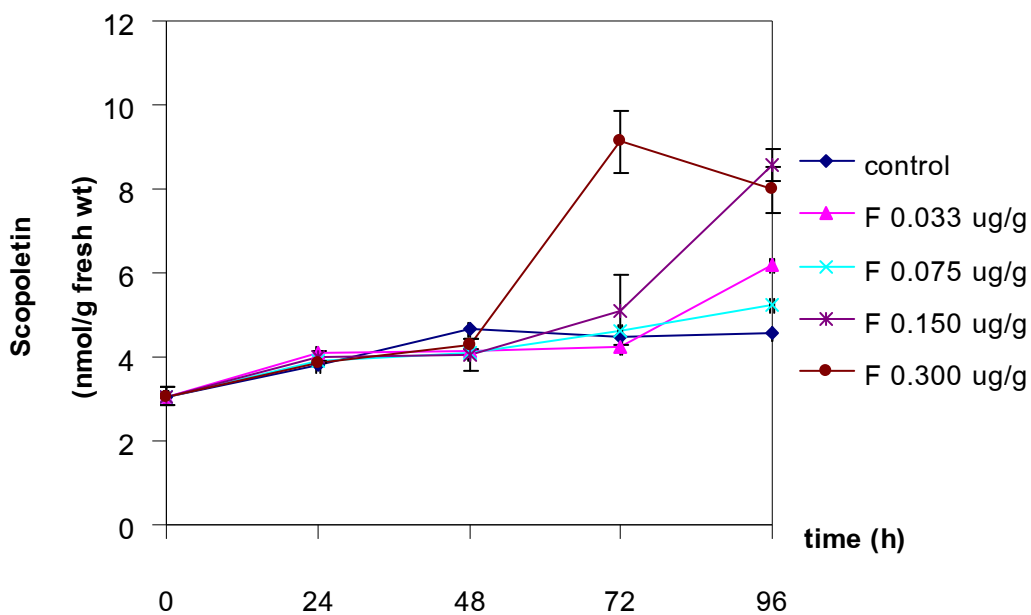
จากรายงานของ Li และคณะ (1997) ได้รายงานว่ามีไฟโตเอเล็กซินถูกผลิตและเก็บสะสมใน vascular parenchyma cell ที่พร้อมจะถูกปล่อยเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิทธิพลต่างๆ ดังนั้นเมื่อพืชถูกกระตุ้นด้วยอิทธิพลหรือเชื้อโรคต่างๆ จึงมีการเหนี่ยวนำให้สารตั้งต้น คือ coumarin จากวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid pathway) เปลี่ยนเป็นสคอพอลิตินแล้วปล่อยออกมาออกนอกเซลล์ ด้วยเหตุผลนี้เองที่อาจทำให้สามารถตรวจสอบการสะสมของสคอพอลิ

ดินได้เร็วกว่าเอนไซม์เปอร็อกซิเดส ทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Gomez Vasquez และคณะ (2004) เมื่อทดสอบใบและเซลล์แขวนลอยของมันสำปะหลังด้วยผนังเซลล์ของยีสต์ (cell wall glucan elicitor) พบว่ามีการสังเคราะห์สคอพอลิทินและเอนไซม์เปอร็อกซิเดสเพิ่มขึ้นทั้งในและนอกเซลล์ ทำให้ผู้วิจัยเลือกวิเคราะห์การสังเคราะห์สคอพอลิทินของเซลล์แขวนลอยเพื่อตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ filtrate ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย และเลือกใช้ filtrate ที่ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย ในการทดลองต่อไป เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นการเกิดสคอพอลิทินได้สูงกว่าและเร็วกว่าที่ความเข้มข้น 0.150 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย

ตารางที่ 3.2 แสดงการสังเคราะห์สคอพอลิทิน (nmole/ g fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย

เวลา	ชุดควบคุม	ชุดทดลองกระตุ้นด้วย filtrate (ug/g)			
		0.033	0.075	0.150	0.300
0	3.06±0.21	3.06±0.21	3.06±0.21	3.06±0.21	3.06±0.21
24	3.79±0.27	4.10±0.08	3.92±0.11	4.01±0.12	3.87±0.01
48	4.69±0.28	4.12±0.18	4.11±0.00	4.06±0.39	4.30±0.14
72	4.46±0.05	4.24±0.16	4.63±0.26	5.12±0.84	9.13±0.73
96	4.57±0.15	6.17±0.32	5.26±0.28	8.55±0.38	7.99±0.55

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

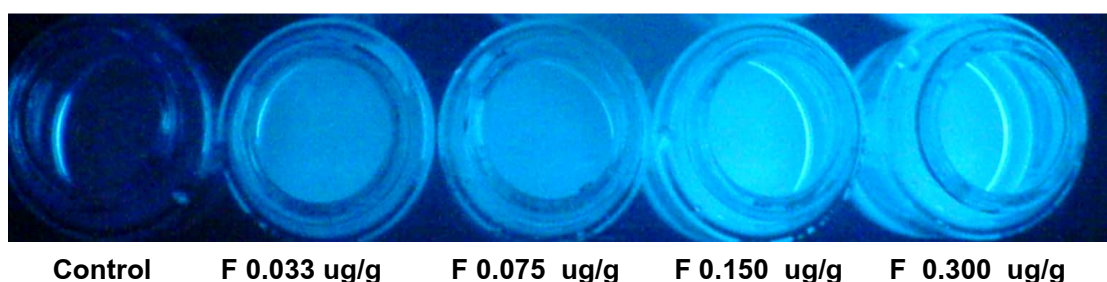


รูปที่ 3.13 แสดงการสังเคราะห์สโคพออลิตินของเซลล์แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ filtrate ต่อการสังเคราะห์สโคพออลิตินในเซลล์แขวนลอยยางพารา พบว่าทั้งปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สโคพออลิตินขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ filtrate ที่ทดสอบ โดยความเข้มข้นของ filtrate ที่สูงขึ้น จะมีการสังเคราะห์สโคพออลิตินเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ filtrate ที่สูงเกินไปให้การสังเคราะห์สโคพออลิตินลดลงอย่างรวดเร็ว (ข้อมูลไม่ได้แสดง) การกระตุ้นเซลล์ของพืชด้วยอิลิซิเตอร์ที่ความเข้มข้นสูงมากนั้นส่งผลให้เซลล์ตายไม่มีการตอบสนองต่อการป้องกันตัวเองของพืช เช่นการสร้างสารไฟโตเล็กซิน, สารกลุ่ม ROS และ PR-proteins เป็นต้น สอดคล้องกับ นุระอามาลี (2547) ซึ่งรายงานว่าการโจมตีของยางพาราด้วยซูโอสปอร์ของ *P. palmivora* ที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์สูงเกินไปจะทำให้เห็นการลุกลามชัดเจนทำให้ยางพาราไม่สามารถสังเคราะห์สโคพออลิตินมายับยั้ง *P. palmivora* ได้ แต่หากใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เหมาะสมสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสโคพออลิตินในปริมาณสูง นอกจากนี้ เพ็ญมาศ (2549) นำอิลิซิเตอร์จากเชื้อรา *P. palmivora* ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน มาทดสอบในแคลลัสยางพารา พบว่าเมื่อใช้อิลิซิเตอร์ที่ความเข้มข้นสูงเกินไปมีผลให้การสังเคราะห์สโคพออลิตินลดลงอย่างรวดเร็ว Gutierrez และคณะ (1994) นำใบทานตะวันมากระตุ้นด้วย  $\text{CuCl}_2$  เพื่อศึกษาสโคพออลิติน พบว่าหลังจากกระตุ้นใบทานตะวันด้วย  $\text{CuCl}_2$  สามารถเหนี่ยวนำการสร้างสโคพออลิตินได้ และตรวจพบกิจกรรมของ

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เร่งสคอพอลิตินให้เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ สคอพอลิตินสามารถถูกออกซิไดส์ได้ด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและเรียกเอนไซม์ชนิดนี้ว่าสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส (S-POD) สคอพอลิตินที่มีการสังเคราะห์ขึ้นในปริมาณสูงเกินไปก็จะเป็นพิษต่อเซลล์พืช (Cooper and William, 2004) ส่งผลให้เซลล์ของพืชตายมีผลให้เซลล์สร้างสคอพอลิตินได้ลดลง

นำ MES บัฟเฟอร์ไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) สามารถสังเกตเห็นด้วยตาเปล่า วิเคราะห์สคอพอลิตินที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ จากการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอยเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง พบว่าที่ filtrate ที่ความเข้มข้น 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย มีการเรืองแสงของสคอพอลิตินสูงที่สุดและเรืองแสงใน MES บัฟเฟอร์ ตามความเข้มข้นของ filtrate ที่ใช้กระตุ้นเซลล์แขวนลอย (รูปที่ 3.14) การสังเกตการเรืองแสงของสคอพอลิตินภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่ย่างและรวดเร็ว



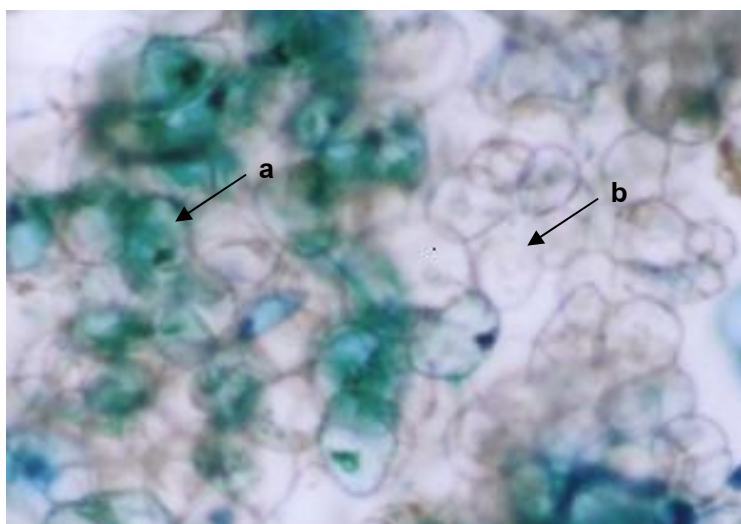
รูปที่ 3.14 แสดงการเรืองแสงของสคอพอลิตินภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต ปล่อยออกมาใน MES บัฟเฟอร์ (นอกเซลล์) หลังจากการบ่มแขวนลอยอย่างพาราด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง

การใช้ปริมาณ filtrate ในการกระตุ้นสูงเกินไปจะเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แขวนลอย เมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วย Evans blue สังเกตเห็นว่าเซลล์ที่เกิดการตายจะย้อมติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 3.15) เนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้วไม่สามารถผลักสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ในเซลล์ออกมาได้ทำให้เห็นสีน้ำเงินของ Evans blue

การศึกษการตายของเซลล์แขวนลอยมักนิยมใช้ Evans blue ในการย้อม เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Song และคณะ (1999) ได้ศึกษการตายของเซลล์แขวนลอยในถั่วเหลืองที่ถูกทดสอบด้วย phosphoinositide-specific phospholipase C inhibitor U-73122 (100 ไมโครโมลาร์) ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ จากการศึกษา



พบว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ในขณะที่เซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินชัดเจนเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เซลล์ที่มีชีวิตจะเห็นการเรืองแสงเป็นสีเขียวในขณะที่เซลล์ตายจะปรากฏเป็นสีแดง และให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อใช้เซลล์แขวนลอยของยาสูบ



รูปที่ 3.15 แสดงเซลล์แขวนลอยของยาสูบที่ย้อมด้วย Evans blue เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (x400) กลุ่มเซลล์ตายของเซลล์แขวนลอยที่ย้อมติดสีน้ำเงิน (a), กลุ่มเซลล์ที่มีชีวิตไม่ติดสีของ Evans Blue (b)

### 3.4.2 การบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate เพื่อศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของพืช

#### 3.4.2.1 ผลการสร้างสคอพอลิตินที่ปล่อยออกมาจากเซลล์แขวนลอย

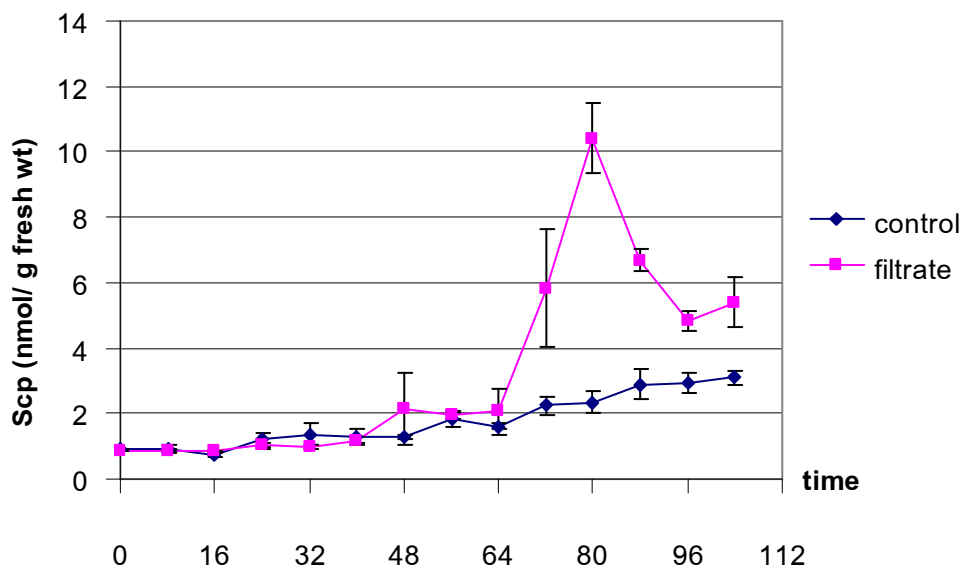
จากการทดลองบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย (ความเข้มข้นที่ให้ค่าสคอพอลิตินสูงสุดจากข้อ 3.4.1) เมื่อถึงเวลาที่กำหนด 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง นำ MES บัฟเฟอร์ จากการทดสอบเซลล์แขวนลอยซึ่งเป็นชุดทดลองและชุดควบคุม ที่แยกเซลล์แขวนลอยออกแล้ว มาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารตัวอย่างมาวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer พบว่ามีการสร้างสคอพอลิตินในชุดทดลองสูงกว่าในชุดควบคุมหลังจาก 60 ชั่วโมงและมีค่าสูงสุดที่ 80 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.16) หลังจากนั้นสคอพอลิตินในชุดทดลองจะค่อยๆ ลดลง

Valle และคณะ (1997) ทำการทดสอบเซลล์แขวนลอยของ *Ulmus pumila* และ *U. campestris* ซึ่งต้านทานและอ่อนแอต่อ Dutch elm disease (DED) ตามลำดับ โดยการป่นด้วยสปอร์ของ *Ophiostoma ulmi* พบว่ามีการสะสมของสคอพอลิตินในเซลล์อย่างรวดเร็วแล้วปล่อยสคอพอลิตินลงในอาหารและเป็นไปในทำนองเดียวกับ เพ็ญมาศ (2548) ซึ่งรายงานว่าการนำอิลิซิตินจากน้ำเลี้ยง *P. palmivora* ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน มาทดสอบกับเมล็ดอ่อนและแคลลัสยางพารา พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในเซลล์และปล่อยสคอพอลิตินออกมานอกเซลล์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3.3 แสดงการสังเคราะห์สคอพอลิติน (nmole/ g fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัม ต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	0.91±0.01	0.85±0.02
8	0.92±0.11	0.88±0.01
16	0.75±0.07	0.87±0.01
24	1.20±0.19	1.01±0.09
32	1.37±0.32	0.98±0.06
40	1.31±0.24	1.14±0.11
48	1.29±0.08	2.16±1.10
56	1.81±0.19	1.94±0.12
64	1.62±0.11	2.06±0.71
72	2.24±0.27	5.82±1.80
80	2.34±0.32	10.41±1.07
88	2.88±0.45	6.69±0.31
96	2.95±0.29	4.81±0.31
104	3.10±0.21	5.40±0.75

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 3.16 แสดงผลการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอยยารพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง

#### 3.4.2.2 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งเกิดจากการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate

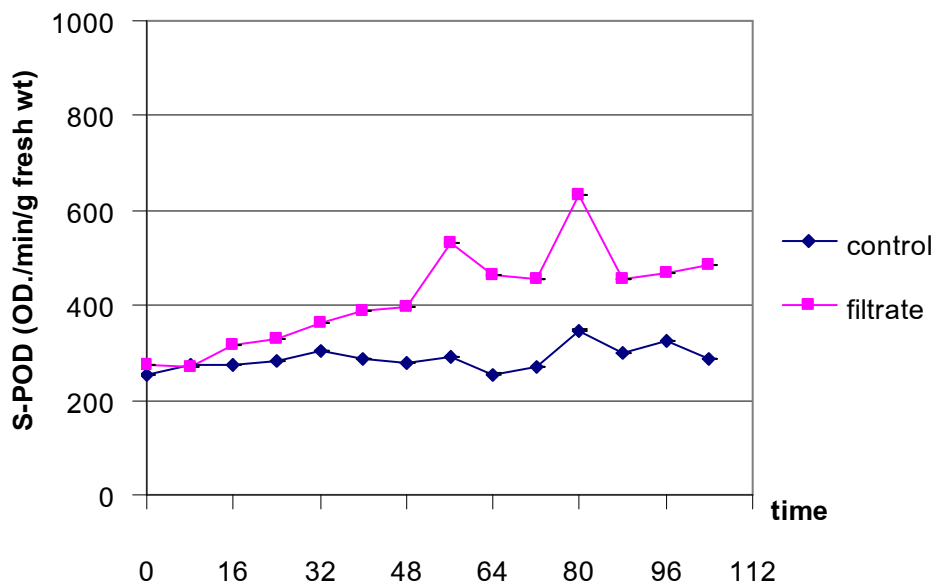
หลังจากบ่มเซลล์แขวนลอยพันธุ์ BPM-24 ด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมของเซลล์แขวนลอย ที่เวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดมาศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สคอพอลิตินเป็นสับสเตรท พบว่า filtrate สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงในช่วง 56 และ 80 ชั่วโมงตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 530 และ 633  $\Delta OD./g$  fresh wt (ตารางที่ 3.4 และ รูปที่ 3.17) ในช่วงเวลา 56 ชั่วโมง ที่ S-POD สูงขึ้น อาจสร้างขึ้นมาเพื่อลดความรุนแรงของ  $H_2O_2$  ที่เกิดจากกระบวนการ oxidative burst ส่วนในช่วงเวลาที่ S-POD สูงขึ้น 80 ชั่วโมงเป็นช่วงเวลาที่สอดคล้องกับการปล่อยสคอพอลิตินออกมาจากเซลล์แขวนลอยที่ 80 ชั่วโมง จึงเป็นไปได้ที่เซลล์แขวนลอยยารพาราสังเคราะห์ S-POD ออกมาเพื่อใช้ในการสลายสคอพอลิติน Edwards และคณะ (1997) ตรวจพบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในกระบวนการเมทาบอลิซึมของสคอพอลิติน ในทานตะวัน ตรวจวัดสคอพอลิตินเพิ่มขึ้นใน 24 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นสคอพอลิตินจะหายไปอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถวัดปริมาณได้ พบว่าปริมาณของสคอพอลิตินลดลงสัมพันธ์กับความว่องไวที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์

เปอร์ออกซิเดสโดยเร่งให้เกิดสารประกอบที่มีสีและไม่ละลายน้ำ สคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส (S-POD) มีมวลโมเลกุล 46,000 กิโลดาลตัน ในใบของทานตะวันพบกิจกรรมของ S-POD มากในบริเวณรอบๆ บาดแผลหลังจากกระตุ้นด้วย  $\text{CuCl}_2$  หรือ salicylic acid นอกจากนี้ยังพบ S-POD ในใบมันฝรั่ง, ยาสูบและถั่ว (Clarke, 1973; Goy *et al.*, 1993) พืชผลิตสารไฟโตอเล็กซินขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราแต่ก็เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชด้วย นอกจากนี้  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่เกิดจากกระบวนการ oxidative burst ก็มีพิษต่อเซลล์พืชจึงถูกกำจัดออกโดยการทำปฏิกิริยาระหว่างสคอพอลิติน และ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสคอพอลิตินที่ผลิตขึ้นมา มีหน้าที่ 2 ประการคือ เป็นไฟโตอเล็กซินและเป็น detoxifying agent ซึ่งทำหน้าที่กำจัด  $\text{H}_2\text{O}_2$  ออกจากเซลล์

ตารางที่ 3.4 แสดงการสังเคราะห์ S-POD ( $\Delta\text{OD./ g fresh wt}$ ) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัม เซลล์แขวนลอย

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	253.05±0.02	275.25±0.02
8	274.05±0.03	271.50±0.03
16	274.05±0.04	316.65±0.01
24	284.55±0.03	331.20±0.01
32	303.90±0.02	362.25±0.01
40	288.75±0.07	386.70±0.04
48	279.30±0.25	396.90±0.04
56	290.85±0.09	530.25±0.04
64	255.15±0.44	462.75±0.05
72	271.95±0.09	454.50±0.02
80	348.00±0.16	633.00±0.06
88	300.00±0.06	454.50±0.04
96	324.00±0.04	467.25±0.06
104	285.00±0.11	486.00±0.08

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 3.17 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อใช้สคอปอลิดินเป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง

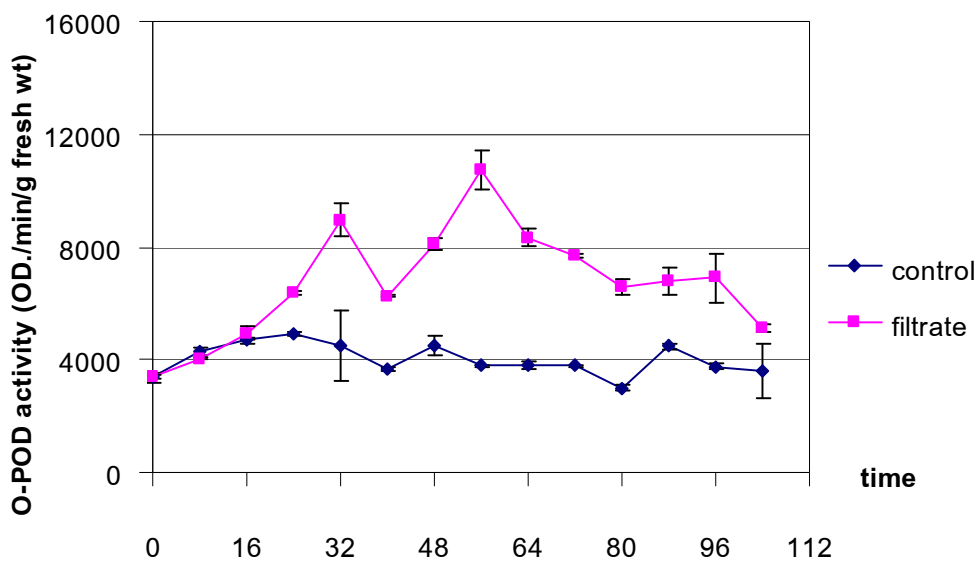
สำหรับความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ใช้ o-dianisidine เป็นสับสเตรท พบค่าความว่องไวของ O-POD ค่อยๆ เพิ่มขึ้นและสูงที่สุดที่เวลา 32 และ 56 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 8,963 และ 10,755  $\Delta$ OD./g fresh wt ตามลำดับ ซึ่งพบว่าชุดทดลองมีค่าความว่องไวของ O-POD สูงกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 3.5 และ รูปที่ 3.18)

Papadakis และคณะ (2001) พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากสารสกัดใบองุ่นสามารถใช้ ascorbate เป็นสับสเตรทในการกำจัด  $H_2O_2$  ออกจากเซลล์ได้ เพราะในการสังเคราะห์แสงของพืชจะเกิดการสะสม ROS ซึ่งรวมถึง  $H_2O_2$  ที่เป็นพิษต่อเซลล์พืช ดังนั้นจึงกำจัด  $H_2O_2$  ออก โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล เพื่อเปลี่ยน  $H_2O_2$  เป็นน้ำ และเกิดอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอล ที่พร้อมจะทำปฏิกิริยากับ ascorbate เกิดเป็นอนุมูลอิสระของ monodehydroascorbate แล้วเกิดการโพลีเมอไรซ์กัน จนได้ dehydroascorbic acid และ ascorbate ซึ่งพร้อมจะเกิดปฏิกิริยากำจัด  $H_2O_2$  ต่อไป (Perez *et al.*, 2002)

ตารางที่ 3.5 แสดงการสังเคราะห์ O-POD ( $\Delta OD./g$  fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัม เซลล์แขวนลอย

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	3375±191	3420±64
8	4298±159	4050±64
16	4680±127	4950±212
24	4905±64	6360±85
32	4500±1273	8963±583
40	3668±95	6263±53
48	4500±318	8100±212
56	3803±32	10755±700
64	3803±159	8325±318
72	3780±64	7695±64
80	2993±95	6563±265
88	4478±95	6788±477
96	3758±95	6900±849
104	3600±955	5138±159

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 3.18 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง

เมื่อนำสารสกัดมาศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท จากการบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate พบว่าความว่องไวของ G-POD ในชุดทดลองมีอัตราการเพิ่มขึ้นชัดเจนกว่าในชุดควบคุม ในชุดทดลองมีแนวโน้มสูงขึ้น และสูงที่สุดที่เวลา 64 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 81.0  $\Delta$ OD./g fresh wt สูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 2.5 เท่าที่เวลาเดียวกัน (รูปที่ 3.19) เมื่อเวลาผ่านไป 104 ชั่วโมง G-POD จากชุดทดลองมีค่าลดลงเป็น 50.1  $\Delta$ OD./g fresh wt ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 59.7  $\Delta$ OD./g fresh wt เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มขึ้นของ O-POD และ G-POD จากการที่เซลล์แขวนลอยสังเคราะห์ขึ้นมาของชุดทดลอง พบว่า O-POD (32 และ 48 ชั่วโมง) ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาก่อน G-POD (64 ชั่วโมง) สอดคล้องกับ เพ็ญมาศ (2549) ซึ่งรายงานว่า การบ่มแคลลัสด้วยอิลิซิตินที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อแคลลัส 1 กรัม พบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทดสอบโดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรทมีค่าสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงในเซลล์ และมีการปล่อยออกมาจากเซลล์เล็กน้อยสูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง ในขณะที่ใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมงในเซลล์แล้วปล่อยออกมาจากเซลล์เล็กน้อยและสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง การที่ O-POD และ G-POD ในแคลลัสเกิดขึ้นก่อนในเซลล์แขวนลอยอาจเนื่องมาจากการใช้ความเข้มข้นของโปรตีนสูงถึง 1 ไมโครกรัมต่อแคลลัส 1 กรัม

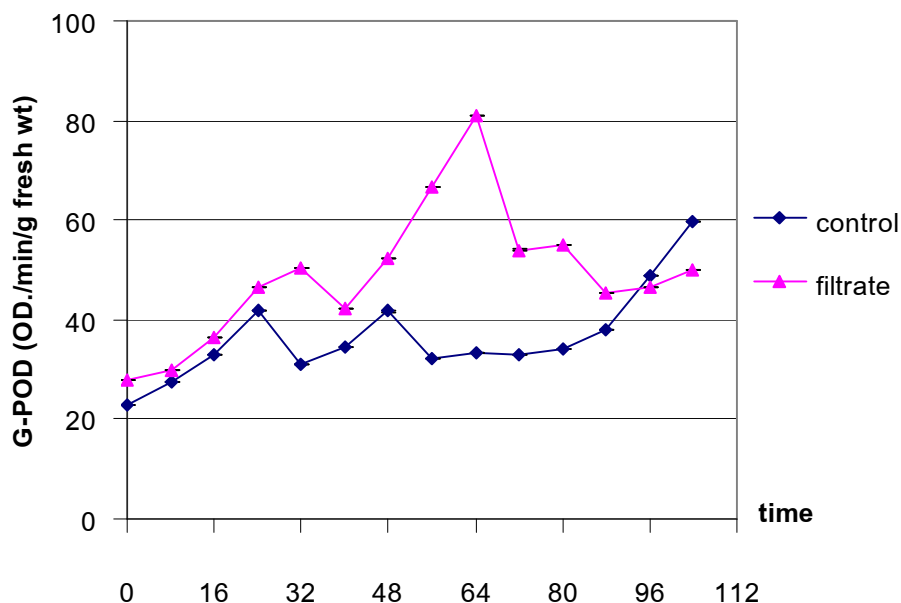
ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย (0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย)

ตารางที่ 3.6 แสดงการสังเคราะห์ G-POD ( $\Delta$ OD./g fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัม เซลล์แขวนลอย

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	22.8±0.00	28.1±0.01
8	27.5±0.01	29.9±0.01
16	33.0±0.01	36.5±0.01
24	42.0±0.02	46.5±0.04
32	30.9±0.00	50.4±0.00
40	34.4±0.02	42.2±0.00
48	41.7±0.07	52.2±0.00
56	32.3±0.03	66.6±0.01
64	33.2±0.00	81.0±0.04
72	32.9±0.01	54.0±0.09
80	34.1±0.00	55.2±0.02
88	38.1±0.03	45.3±0.03
96	48.9±0.01	46.5±0.02
104	59.7±0.01	50.1±0.00

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)





รูปที่ 3.19 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง

หลังจากนำสารสกัดมาศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรท โดยปมเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate พบว่าค่าความว่องไวของ Z-POD ในชุดทดลองมีแนวโน้มสูงขึ้นและสูงที่สุดที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 182.3  $\Delta$ OD./g fresh wt สูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 2.8 เท่าที่เวลาเดียวกัน (ตารางที่ 3.7 และ รูปที่ 3.20) มีแนวโน้มลดลงที่เวลา 56 และ 64 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 159.5  $\Delta$ OD./g fresh wt

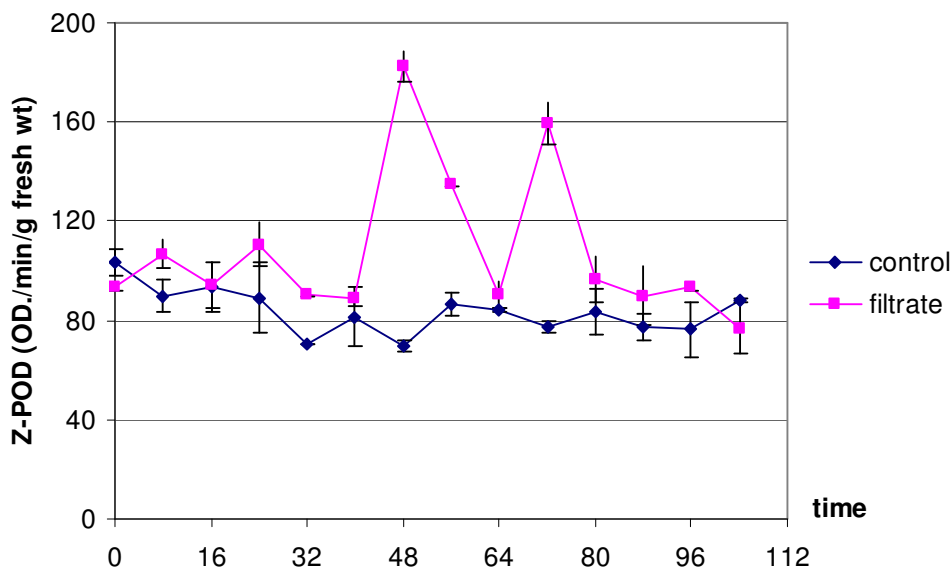
Egea และคณะ (2001) นำเซลล์แขวนลอยของฟริกไทยพันธุ์ ต้านทานและอ่อนแอ มาศึกษาการตอบสนองต่ออิทธิฤทธิ์ 2 ชนิด คือ lyophilized mycelium และ filtrate ของ *P. capsici* หลังจากถูกกระตุ้น พบว่าเซลล์แขวนลอยสร้าง PR-proteins ชนิดหนึ่ง คือเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และมีการสะสมของลิกลิน ในพันธุ์ต้านทานพบว่ามีส่วนเซลล์หนาขึ้น เนื่องจากมีการสะสมของลิกลินเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค การเพิ่มขึ้นของลิกลินสัมพันธ์กับความว่องไวที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งพบเฉพาะในสายพันธุ์ต้านทาน นอกจากนี้ในสายพันธุ์อ่อนแอยังพบ necrosis น้อยกว่าสายพันธุ์ต้านทาน เนื่องจาก

พันธุ์ต้านทานมีการตอบสนองแบบ hypersensitive cell death และยังเชื่อว่า necrosis ที่เกิดขึ้นดังกล่าวเกิดจากการสะสมของลิกนิน

ตารางที่ 3.7 แสดงการสังเคราะห์ Z-POD ( $\Delta OD./g$  fresh wt) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัม เซลล์แขวนลอย

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	103.5±5.1	93.6±1.5
8	90.0±6.8	106.7±5.7
16	93.5±10.0	94.2±9.5
24	89.1±14.0	110.7±8.7
32	70.7±0.2	90.8±1.1
40	81.6±11.9	88.8±2.7
48	69.8±2.3	182.3±6.2
56	86.9±4.5	134.6±0.7
64	84.2±1.0	90.6±5.5
72	77.7±2.3	159.5±8.7
80	83.4±9.3	96.5±9.1
88	77.3±5.3	89.9±12.0
96	76.5±11.0	93.6±1.7
104	88.2±1.0	76.8±10.2

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 3.20 แสดงการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอย ยางพารา เมื่อใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรท หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณโปรตีนของการทดลองนี้ (รูปที่ 3.21) พบว่าปริมาณโปรตีนในชุดทดลองหลังจากชั่วโมงที่ 56 ลดลงเรื่อยๆ คือ ที่ 0 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนประมาณ 2.76 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เมื่อเวลาผ่านไป 56 ชั่วโมง ลดลงเหลือประมาณ 2.44 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย ที่ 104 ชั่วโมง มีโปรตีนเท่ากับ 1.82 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย (ตารางที่ 3.8) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนในชุดควบคุมมีค่าที่ค่อนข้างคงที่ ในการทดลองนี้ต่างจากการทดลองของนุรอามานี (2547) ที่ทำการตัดใบยางให้มีขนาด 1x1 ตารางนิ้ว แล้วบ่มด้วยซิวโอสปอร์ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^7$  วิเคราะห์ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ระยะเวลาการบ่มต่างกัน คือ 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งในชุดควบคุมและชุดทดลองลดลงเรื่อยๆ ตามเวลาที่ทำการทดลอง คือ ที่ 0 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนประมาณ 5.15 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมใบยาง เมื่อเวลาผ่านไปที่ 144 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือครึ่งหนึ่งจากค่าเริ่มต้น และพบว่าหลังบ่มด้วยซิวโอสปอร์ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จะแปรผกผันกับปริมาณโปรตีนรวม การที่ปริมาณโปรตีนลดลงทั้งในชุดควบคุมและในชุดทดลองนั้นอาจเนื่องมาจากการตัดใบยาง โดยการทำให้ใบยางเกิดบาดแผลทำให้เซลล์ในใบอาจหยุดการสร้างโปรตีนในการเจริญเติบโตหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิต เพื่อปกป้องตัวเซลล์เองจึงสร้างโปรตีนกลุ่ม PR-proteins อย่างเดียว

ทำให้พบปริมาณโปรตีนทั้งในชุดควบคุมและในชุดทดลองลดลง การทดลองในเซลล์แขวนลอย โดยกระตุ้นด้วย filtrate ที่มากเกินไป ส่งผลให้เซลล์แขวนลอยตายอย่างรวดเร็ว แล้วปล่อยโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ออกมามานอกเซลล์ เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนภายในเซลล์จึงมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจัดเป็น PR-proteins ชนิดหนึ่ง สมปอง และคณะ (2538) ได้จำแนกแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *Phytophthora* spp. โดยนำแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดมาบ่มด้วยเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในอาหารเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นนำไปสกัดและศึกษาโปรตีนกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อตรวจสอบกลไกการต้านทานต่อสารจากเชื้อข้างต้น พบว่า แคลลัสชุดควบคุมที่ไม่บ่มด้วยเชื้อจะปรากฏแถบค่าความไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 2 แถบ ส่วนในชุดทดลองที่บ่มด้วยเชื้อจะปรากฏ 4-6 แถบ แต่เมื่อย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie blue พบว่าทั้งก่อนและหลังบ่มด้วยเชื้อจะเห็นเพียงแถบเดียวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 ดาลตัน ดังนั้นปริมาณโปรตีนรวมไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างแคลลัสที่ต้านทานและไม่ต้านทาน ในขณะที่ไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความเหมาะสมต่อการจำแนกดังกล่าว พันธุ์ศรี (2547) พบว่าแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราสองพันธุ์ มีจำนวนไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแตกต่างกัน โดยแคลลัสพันธุ์ GT1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยซุโอสปอร์มีจำนวน 1 ไอโซไซม์ ส่วนแคลลัสพันธุ์ RRIM600 มี 2 ไอโซไซม์และไม่พบการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดควบคุม

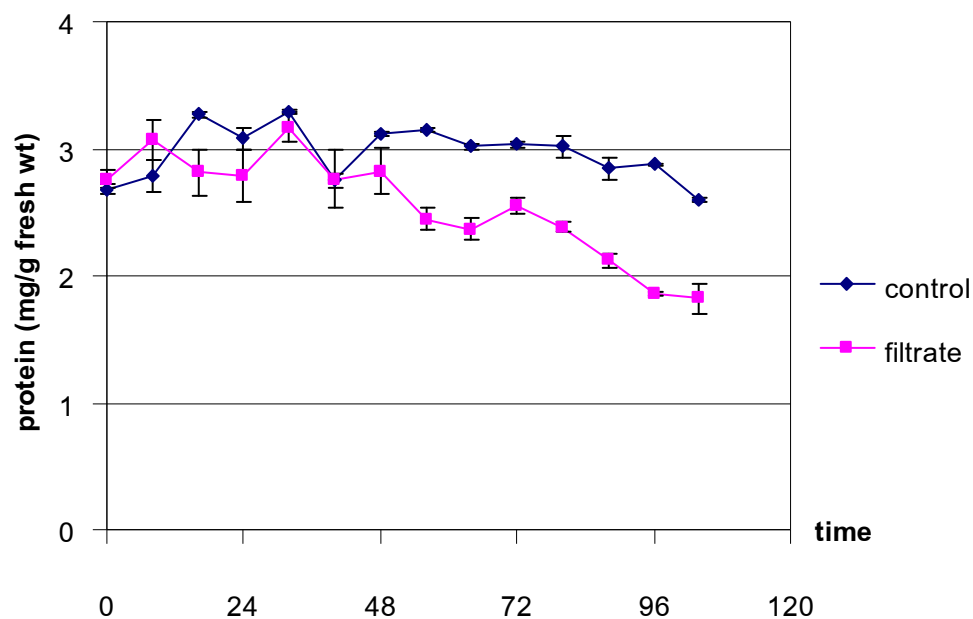
จากการทดลองครั้งนี้คาดว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงอาการของโรคได้ คือ เมื่อพืชติดเชื้อจะทำให้เกิดโรคอย่างช้าๆ และเหนี่ยวนำความไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น จนถึงขั้นที่เกิดโรครุนแรงแล้วเซลล์ตาย ส่งผลให้การสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคงที่หรือลดลง

ตารางที่ 3.8 แสดงปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย) ที่เวลาต่างๆ ในเซลล์แขวนลอยยางพารา เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	2.68±0.07	2.76±0.04
8	2.79±0.15	3.07±0.13
16	3.27±0.18	2.81±0.02
24	3.08±0.20	2.79±0.09

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
32	3.30±0.11	3.17±0.01
40	2.75±0.23	2.76±0.06
48	3.12±0.18	2.82±0.02
56	3.15±0.09	2.44±0.01
64	3.02±0.09	2.37±0.02
72	3.04±0.06	2.55±0.02
80	3.02±0.04	2.38±0.08
88	2.85±0.05	2.12±0.09
96	2.88±0.01	1.86±0.01
104	2.60±0.12	1.82±0.02

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

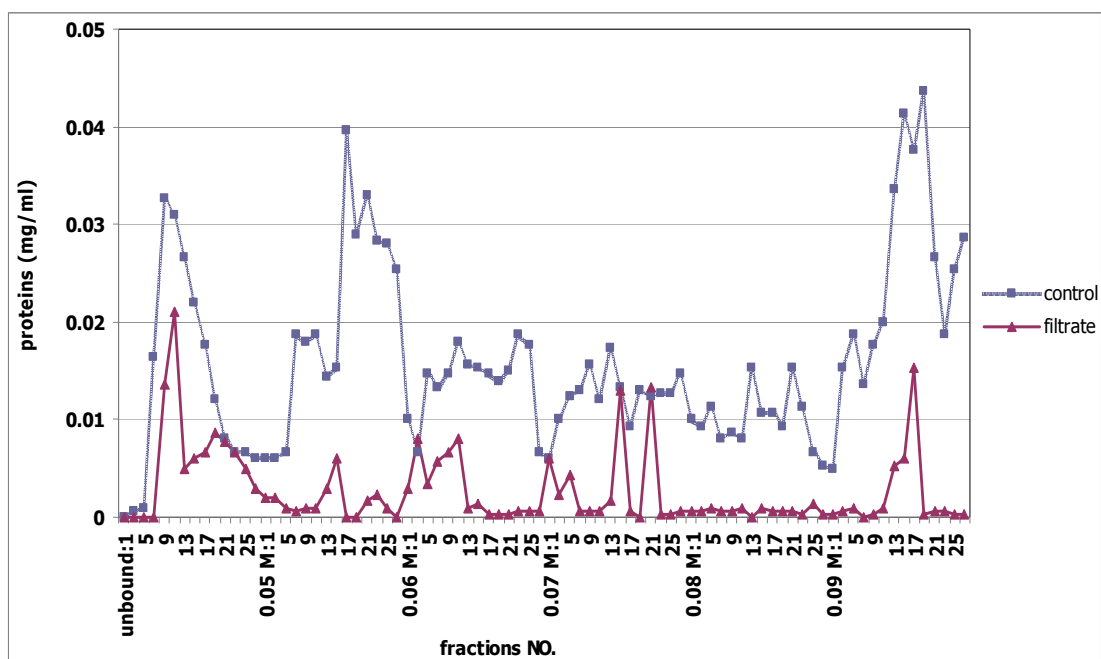


รูปที่ 3.21 แสดงปริมาณโปรตีนที่เวลาต่างๆ ของเซลล์แขวนลอยยางพารา หลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมเซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชั่วโมง

### 3.5 ผลการทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

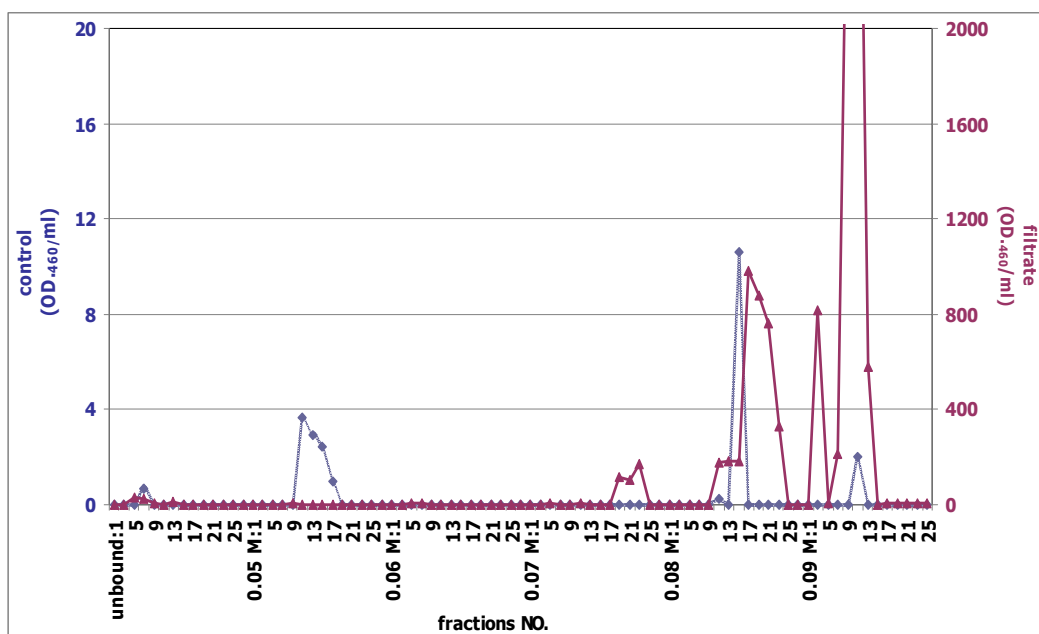
#### 3.5.1 ผลการศึกษาความแตกต่างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย filtrate โดยผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

หลังจากบ่มเซลล์แขวนลอยพันธุ์ BPM-24 ด้วย filtrate ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมของเซลล์แขวนลอย เก็บเซลล์แขวนลอยที่ 80 ชั่วโมง นำสารสกัดไปตกตะกอนโปรตีนด้วย  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ที่ความอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ PD-10 (ซึ่งจะกำจัดเกลือออกไป) นำสารละลายที่ได้ไปลงคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B (ion exchange) มีคุณสมบัติในการแยกได้ตามประจุของโปรตีน ปริมาตรคอลัมน์ 12 มิลลิลิตร ชะคอลัมน์โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือ 0.05 - 0.10 โมลาร์ NaCl ใน phosphate บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 เก็บ fraction ละ 3 มิลลิลิตร พบปริมาณโปรตีนที่ถูกชะออกมาในแต่ละ fraction ของชุดควบคุมสูงกว่าในชุดทดลอง โปรตีนที่อยู่ในเซลล์แขวนลอยในชุดควบคุมถูกชะออกมา 3 ช่วง ได้แก่ ช่วงไม่จับกับเกลือ (unbound), ช่วง 0.05 โมลาร์ NaCl และ ช่วง 0.09 โมลาร์ NaCl ปริมาณโปรตีนในชุดควบคุมจะมีมากกว่าในชุดทดลองสัมพันธ์กับการทดลองข้อ 3.4.2.2 ซึ่งเมื่อกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate เป็นเวลานานขึ้นนั้นค่าโปรตีนจะลดลง โดยโปรตีนที่เหลืออยู่ในเซลล์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนกลุ่ม PR-proteins

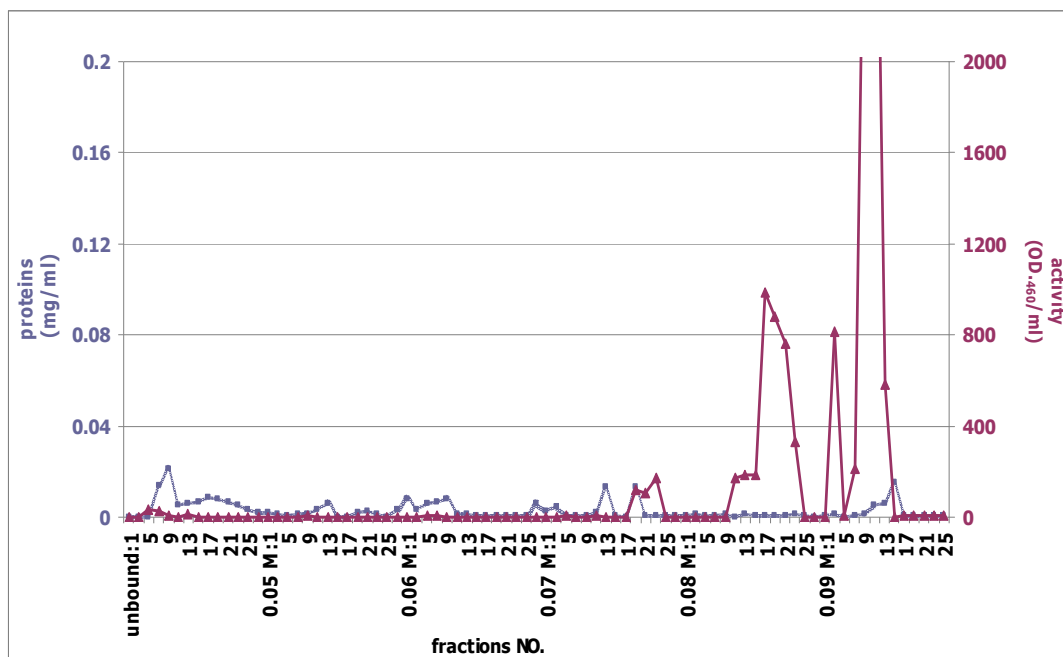


รูปที่ 3.22 แสดงปริมาณโปรตีนในเซลล์แขวนลอยอย่างพาราที่บ่มด้วย filtrate หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE sepharose CL 6B

หลังการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B วัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแต่ละหลอด โดยใช้ o-dianisidine เป็นสับสเตรท เนื่องจากเป็นสับสเตรทที่มีความไวต่อเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากที่สุด โดยคิดค่าความว่องไวเป็น  $\Delta OD./ml$  พบความว่องไวในชุดควบคุม 3 ช่วงของเกลือ NaCl คือ 0.05, 0.07 และ 0.09 โมลาร์ (รูปที่ 3.23) มีค่าความว่องไวเท่ากับ 3.8, 11 และ 2  $\Delta OD./ml$  ตามลำดับ ส่วนในชุดทดลองนั้นตรวจพบความว่องไวช่วงเกลือความเข้มข้น 0.07, 0.08 และ 0.09 โมลาร์ พบค่าความว่องไวที่ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้นในช่วงเกลือดังกล่าวเท่ากับ 390, 1,000 และ 3,800  $\Delta OD./ml$  ตามลำดับ (รูปที่ 3.24) มีความว่องไวมากที่สุดในช่วงเกลือ 0.09 โมลาร์ และพบว่าความว่องไวที่ออกในช่วงเกลือ 0.05 โมลาร์ ของ NaCl ที่พบในชุดควบคุมนั้นหายไป



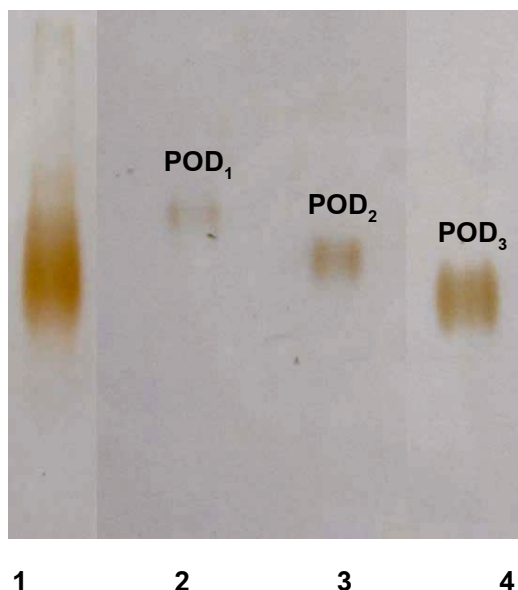
รูปที่ 3.23 แสดงความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา หลังจากป่มด้วย filtrate หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE sepharose CL-6B



รูปที่ 3.24 แสดงปริมาณโปรตีนและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยยางพารา หลังจากบ่มด้วย filtrate หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE sepharose CL-6B

เมื่อนำยอดของพีคที่ได้จากการแยกเซลล์แขวนลอยในชุดทดลองคือยอดพีคที่ออกมาที่ความเข้มข้น 0.07, 0.08 และ 0.09 โมลาร์ NaCl มาแยกโปรตีนด้วยวิธี native PAGE แล้วทำการย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท เห็นแถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากชุดทดลอง 3 แถบ คือแถบจากเกลือ 0.07, 0.08 และ 0.09 โมลาร์ NaCl ซึ่งมีความเข้มและหนาสัมพันธ์กับค่าความว่องไวที่วัดได้จากแต่ละหลอด โดยจะเรียกแถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แต่ละแถบว่า POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ตามลำดับ (รูปที่ 3.25) แถบ POD<sub>3</sub> นั้นเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด ส่วนแถบ POD<sub>1</sub> เคลื่อนที่ได้ช้าสุด จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยยางพารา หลังจากการถูกระตุ้นด้วย filtrate





รูปที่ 3.25 แสดง native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากเซลล์แขวนลอยหลังจากถูกกระตุ้นด้วย filtrate ย้อมด้วย o-dianisidine

ช่องที่ 1 : สารสกัดเซลล์แขวนลอยหลังจากผ่าน PD-10

ช่องที่ 2, 3 และ 4: ยอดพีคหลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.07 (POD<sub>1</sub>), 0.08 (POD<sub>2</sub>) และ 0.09 (POD<sub>3</sub>) M ตามลำดับ

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจ ศึกษาคุณสมบัติของ PR-proteins (เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส) ที่มาจากการกระตุ้นด้วย filtrate จึงทำการเลือก POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> มาทำการศึกษาความจำเพาะในแต่ละสับสเตรท ได้แก่ o-dianisidine, guaiacol, syringaldazine และสคอพอลิติน แล้วเลือกสับสเตรทที่เหมาะสมที่สุดมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ pH ที่เหมาะสม ความทนต่อ pH ความทนต่ออุณหภูมิ และสารเคมีที่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากตารางที่ 3.9 แต่ละขั้นตอนแสดงค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากการผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โดยวิธีต่างๆ โดยจะสังเกตได้ว่าค่าความบริสุทธิ์จะสูงที่สุดเมื่อผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-sepharose CL 6B และยังสามารถแยกไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้อีกด้วย

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 3 ไอโซไซม์ คือ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ที่ทำการแยกโดยวิธีแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE-sepharose CL 6B มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 15, 17 และ 287 เท่าตามลำดับ โดยแถบ POD<sub>3</sub> มีความบริสุทธิ์สูงมากที่สุด ค่าความบริสุทธิ์ของ POD<sub>1</sub> และ POD<sub>2</sub> แปรผันตามกับปริมาณโปรตีนรวม ส่วนค่าความบริสุทธิ์ของ POD<sub>3</sub>

แปรผกผันกับปริมาณโปรตีนรวม ปริมาณโปรตีนรวมที่ได้นั้นมีปริมาณน้อยคิดเป็น 0.0016, 0.044 และ 0.022 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ตามลำดับ

ตารางที่ 3.9 แสดงผลความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโปรตีนรวมที่ได้จากแต่ละขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์

Purification step	Total protein (mg)	Protein yield (%)	Total activity (u)	Activity recovery (%)	Specific activity (u/mg)	Fold purification
Crude	82	100	340,000	100	4,146	1
80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	34	42	182,400	54	5,333	1.29
PD-10	39	48	178,800	53	4,533	1.09
<b>DEAE-Sepharose CL-6B</b>						
POD <sub>1</sub>	0.0013	0.0016	214	0.063	64,769	15
POD <sub>2</sub>	0.036	0.044	2,484	0.73	69,000	17
POD <sub>3</sub>	0.018	0.022	21,420	6.30	1,190,000	287

### 3.5.2 ค่า $K_m$ , $V_{max}$ ของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub>

ค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub>) ตรวจวัดในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 มิลลิโมลาร์ ของ *o*-dianisidine, guaiacol, syringaldazine และสคอพอลิดิน ในปฏิกิริยาที่มี H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460, 470, 530 และ 595 นาโนเมตร ตามลำดับ แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ Lineweaver-Burk (รูปที่ 3.27) จากผลที่แสดงในตารางที่ 3.10 ค่าของ  $K_m$  ที่มาจากการทดสอบด้วยสับสเตรทหลายชนิด พบว่าค่า  $K_m$  ของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> เท่ากับ 0.27, 0.71, 0.91 มิลลิโมลาร์ (*o*-dianisidine); วัดไม่ได้, 4.17, 3.92 มิลลิโมลาร์ (guaiacol); 0.12, 0.02, 0.29 มิลลิโมลาร์ (syringaldazine) และ 0.23, 0.26, 0.39 มิลลิโมลาร์ (สคอพอลิดิน) ตามลำดับ หากแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกเป็น 2 หน้าที่คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับ ROS และไฟโตอเล็กซิน โดยใช้ค่า  $K_m$  เป็นตัวแบ่งหน้าที่ พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน syringaldazine เป็นสับสเตรทที่มีความไวกว่า guaiacol โดย POD<sub>2</sub> มีความจำเพาะกับการสร้างลิกนินมากที่สุด และเปรียบเทียบสับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับ ROS และ

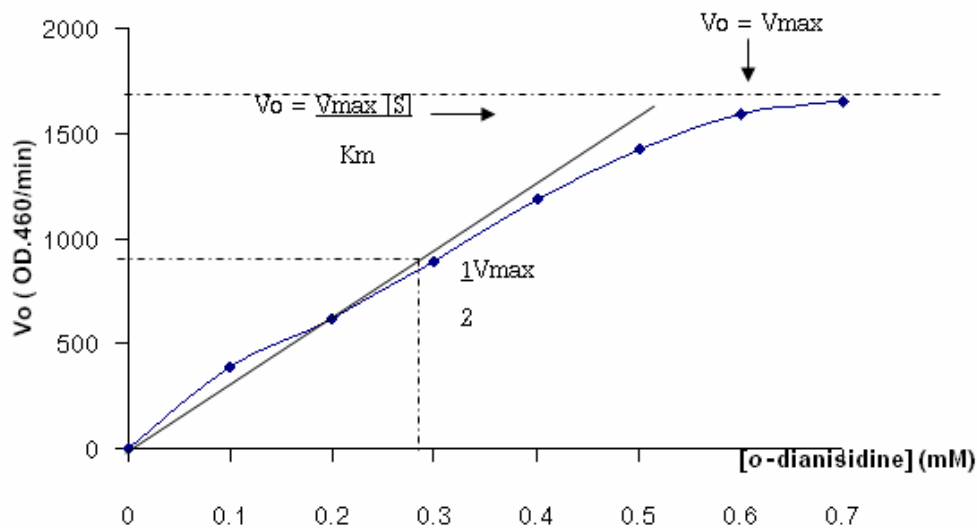
ไฟโตอิเล็กซิน พบว่า สคอพอลิดินมีความไวในการจับกับ  $POD_2$  และ  $POD_3$  มากกว่า *o*-dianisidine ส่วน  $POD_1$  นั้นมีความไวในการจับใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3.10 แสดงค่า  $K_m$ ,  $V_{max}$  และ  $V_{max}/K_m$  ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์ DEAE-sepharose

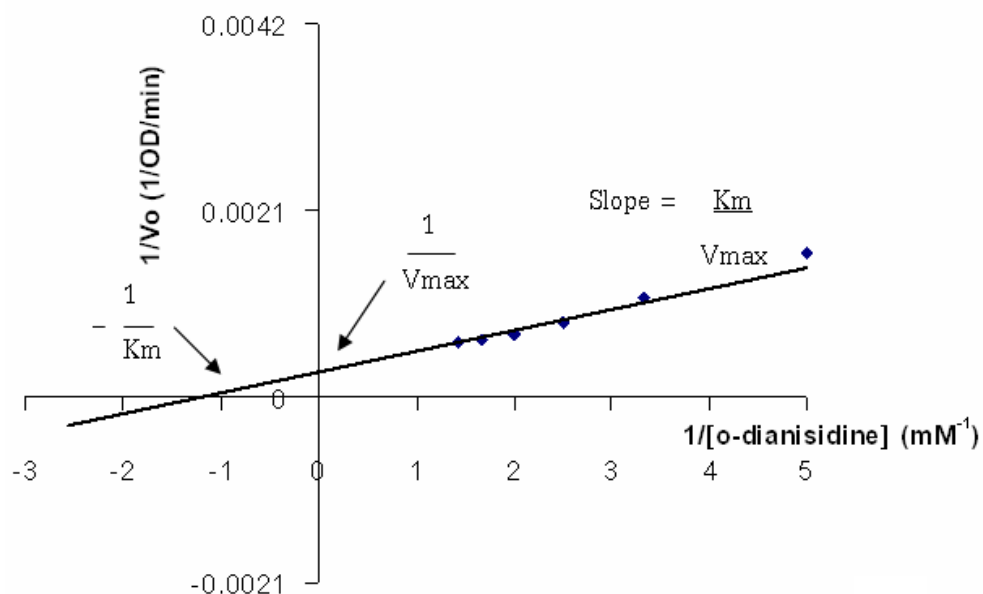
Substrate	$K_m$ (mM)	$V_{max}$	$V_{max}/K_m$
		(U/mg protein)	(U/mg protein/mM)
O-dianisidine	$POD_1$	0.27	71.43
	$POD_2$	0.71	333.30
	$POD_3$	0.91	3333.30
Scopoletin		0.23	1.54
		0.26	3.70
		0.39	71.43
Guaiacol		ND*	ND*
		4.17	2.22
		3.92	17.24
Syringaldazine		0.12	4.00
		0.02	1.66
		0.29	100.00

หมายเหตุ ND\* เป็นค่าที่ไม่สามารถวัดได้

ค่า  $K_m$  ของ  $POD_1$  (0.27 มิลลิโมลาร์, *o*-dianisidine) จากการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกับ  $K_m$  ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (anionic form) ในกระหล่ำปลีที่ผ่านการแยกโดยการตกตะกอนด้วยเกลือ  $(NH_4)_2SO_4$  40-75 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B มี  $K_m$  เท่ากับ 0.286 (Belcarz *et al.*, 2007) ต่างจากค่า  $K_m$  (1.310 มิลลิโมลาร์, *o*-dianisidine) ในต้นชัลเวีย (*Salvia virgata* Jacq) (Dogan *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Kim และ Lee (2005) ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในกลุ่ม cationic ที่แยกได้จากผักกาดหัว โดยเรียกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดนี้ว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส Cs แล้ววัดค่า  $K_m$  (*o*-dianisidine) ได้เท่ากับ 1.18 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 3.26 แสดงการเขียนกราฟแบบ Michaelis-Menten



รูปที่ 3.27 แสดงการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk plot

Lee และคณะ (2002) ทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากเจอร์เนียม พบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 58 กิโลดาลตัน จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE sephacel, CM-cellulose และ Sephacryl S-200 ตามลำดับ และศึกษาค่า  $K_m$  ด้วยสับสเตรทหลายชนิด เช่น *o*-

dianisidine (0.31 มิลลิโมลาร์), สคอพอลิติน ( 0.01 มิลลิโมลาร์) และ guaiacol (7.3 มิลลิโมลาร์) พบว่ามีค่า  $K_m$  คล้ายกับ  $POD_1$  (0.27 มิลลิโมลาร์, o-dianisidine) ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยยางพารา แต่ต่างจากค่า  $K_m$  ของสคอพอลิติน (0.23-0.39 มิลลิโมลาร์) และ guaiacol (3.92-4.17 มิลลิโมลาร์) ในเซลล์แขวนลอยยางพารา

นอกจากนี้ค่า  $K_m$  ของ  $POD_2$  และ  $POD_3$  เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท ที่พบในเซลล์แขวนลอยยางพาราใกล้เคียงกับค่า  $K_m$  ในวนิลา 3.8 มิลลิโมลาร์ ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ gel filtration และ sephacryl S-200 (Marquez *et al.*, 2007) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่พบในใบปาล์มน้ำมัน 3.96 มิลลิโมลาร์ (Deepa and Arumugan, 2002) และในรากของเทอร์นิฟ 3.7 มิลลิโมลาร์ (Duarte-Vazquez *et al.*, 2001) แต่ค่า  $K_m$  ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยยางพาราต่างจากในใบชา 1.66 มิลลิโมลาร์ (Chen and Asada, 1989) และต่างจากใบชาที่มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ (Mamuka *et al.*, 1997)

Chen และคณะ (2002) ศึกษาผลของ  $Cu^{2+}$  ในระหว่างการเจริญเติบโตของผักกาดหัว โดยทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (syringaldazine) ในแต่ละไอโซไซม์และปริมาณลิกนิน ทำการแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B ศึกษาแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธี isoelectric focusing พบแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 4 แถบที่ค่า  $pI$  เท่ากับ 3.5, 5.1, 8.3 และ 8.6 โดยมีค่า  $K_m$  เท่ากับ 0.255, 0.435, 0.15 และ 0.058 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งค่า  $K_m$  จาก เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในผักกาดหัวที่มีค่า  $pI$  เท่ากับ 3.5 (0.255 มิลลิโมลาร์) และ 8.3 (0.15 มิลลิโมลาร์) คล้ายกับค่า  $K_m$  ของ  $POD_3$  ในเซลล์แขวนลอยยางพารา (0.29 มิลลิโมลาร์) และ  $POD_1$  (0.12 มิลลิโมลาร์) เมื่อใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรท

เมื่อเรียงลำดับความเหมาะสมของสับสเตรทจากค่า  $V_{max}/K_m$  (catalytic power) ซึ่งเป็นตัวแปรที่ดีมากในการหาสับสเตรทที่เหมาะสม (Dogan *et al.*, 2002) พบว่าค่า catalytic power ใน  $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$  ของ o-dianisidine > syringaldazine > สคอพอลิติน > guaiacol จากการเปรียบเทียบดังกล่าว o-dianisidine เป็นสับสเตรทที่มีค่า catalytic power ที่ดีที่สุด (ตารางที่ 3.10)  $POD_3$  จะมีประสิทธิภาพในการจับสูงกว่า  $POD_2$ ,  $POD_1$  ตามลำดับ

### 3.5.3 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมและค่าคงตัวในแต่ละ pH

จากการหา pH ที่เหมาะสมด้วยการวัด  $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$  โดยใช้ o-dianisidine เป็นสับสเตรท ซึ่งประกอบด้วย o-dianisidine 7.88 มิลลิโมลาร์  $H_2O_2$  3.3 มิลลิโมลาร์ ใน pH มาตรฐานช่วง 2.0-10.0 แล้ววัดค่าการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาว

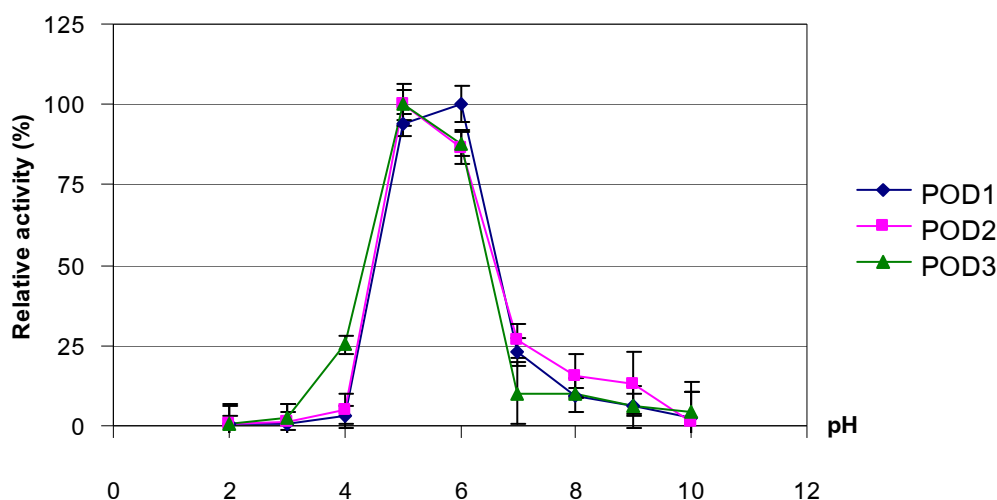
คลื่น 460 นาโนเมตร จากค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ได้มาจากแต่ละ pH นำมาคิดเป็นค่าความสัมพันธ์ความว่องไว (relative activity) โดยคิดเทียบจากค่าความว่องไวที่ได้สูงสุดของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแต่ละไอโซไซม์พบว่า  $POD_1$  จะทำปฏิกิริยาเหมาะสมที่ pH 6.0 ส่วน  $POD_2$  และ  $POD_3$  จะทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ pH 5.0 ซึ่งเป็นค่า pH ที่ทำปฏิกิริยาได้ดีไม่ต่างจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่มีค่า pH เท่ากับ 5.4 (ตารางที่ 3.11 และ รูปที่ 3.28)

การศึกษา pH ที่เหมาะสมในวนิลา (Marquez *et al.*, 2007) พบค่า pH ทำงานได้ดีที่ 3.8 เกี่ยวเนื่องจากเอนไซม์ที่พบนั้นอยู่ในสภาพที่เป็นกรดจึงอาจทำงานได้ดีในช่วง pH นั้น (Deepa and Arumugan, 2002) Thongsook และ Barrett (2005) ศึกษา pH ที่เหมาะสมจากการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในหลายเนื้อเยื่อพืช พบ pH ที่อยู่ในช่วง 4.5-6.5 สอดคล้องกับ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในปาล์มน้ำมันที่ pH 5.0 (Deepa and Arumugan, 2002) เหมือนกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากบิล็อกโคลี่ที่รายงานค่า pH ที่เหมาะสมที่ pH 6.0 สำหรับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เป็นกลาง และเหมาะสมที่ pH 4.0 สำหรับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เป็นกรด (Thongsook and Barrett, 2005)

ตารางที่ 3.11 แสดงค่าความสัมพันธ์ความว่องไวของ  $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$  ที่ทำปฏิกิริยาได้เหมาะสมในช่วง pH 2.0-10.0

pH	Relative activity (%)		
	$POD_1$	$POD_2$	$POD_3$
2.0	0.4±2.8	0.7±5.4	0.6±5.9
3.0	0.7±3.3	1.2±5.5	2.8±4.2
4.0	2.8±3.7	5.1±4.6	25.3±2.9
5.0	93.6±3.2	100.0±4.7	100.0±6.5
6.0	100.0±5.5	86.7±5.1	87.8±3.8
7.0	22.8±4.3	26.5±5.4	10.2±9.6
8.0	9.6±5.2	15.7±6.5	10.2±1.5
9.0	6.0±6.7	13.3±9.6	6.5±3.2
10.0	2.2±8.2	1.0±9.6	4.1±9.5

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 3.28 แสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ที่ทำปฏิกิริยาได้เหมาะสมในช่วง pH 2.0-10.0

หลังจากบ่มเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิห้อง ใน pH มาตรฐานช่วง pH 2.0-10.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปรับ pH ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น 5.4 แล้ววัดความว่องไวของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> โดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท ซึ่งประกอบด้วย *o*-dianisidine 7.88 มิลลิโมลาร์ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3 มิลลิโมลาร์ ใน sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4 ผลการศึกษาพบว่าที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของค่าความสัมพันธ์ความว่องไว POD<sub>1</sub> มีความเสถียรและทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 7 (ในช่วง pH 5.0 – 9.0) ในขณะที่ POD<sub>2</sub> เสถียรและทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 10.0 (ในช่วง pH 8.0 - ≥10) ส่วน POD<sub>3</sub> มีความเสถียรและทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 9 (ช่วง pH 5.0 - ≥10) (ตารางที่ 3.12) โดยพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซมัลไซม์ที่ทำการแยกมาจากเซลล์แขวนลอยของยางพารา นั้นมีค่าความเสถียรที่ pH ต่างกัน POD<sub>2</sub> เป็นไอโซมัลไซม์ที่เสถียรมากที่สุดใน pH ที่เป็นตัวต่าง (pH 10.0) ส่วน POD<sub>3</sub> เป็นไอโซมัลไซม์ที่เสถียรมากที่สุดใน pH ที่เป็นตัวกรด (pH 3.0)

POD<sub>1</sub> เกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดที่ pH 6.0 และมีความเสถียรที่ pH 7.0 (รูปที่ 3.29) ทำให้ทราบว่า POD<sub>1</sub> ทำงานและมีความคงตัวในสภาพที่เป็นกลาง โดยจะสูญเสียความว่องไวเมื่อทำปฏิกิริยาหรืออยู่ในสภาพที่เป็นกรดหรือต่างมาก ๆ ซึ่งต่างจาก POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> พบว่าเกิดปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่เป็นตัวต่าง (pH 7.9) โดย POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> จะมีความเสถียรค่อนข้างน้อยที่ pH 5.0 มีความเสถียรเพิ่มขึ้นตามค่าของ pH ที่เพิ่มขึ้น พบว่ามีความเสถียรที่สุดที่ pH 9.0 และ 10.0 ตามลำดับ จากการทดลองสังเกตได้ว่า POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> มีช่วง pH ที่แตกต่างกันอย่างมากระหว่าง pH ที่เหมาะสม (pH 5.0) กับความเสถียรต่อ pH (pH 9.0-10.0)

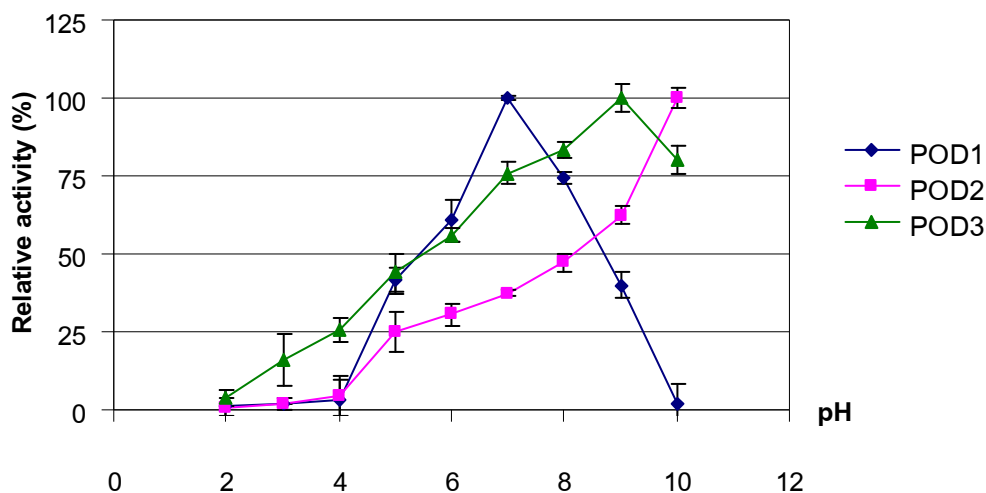
โดยความเสถียรลดลงเมื่อ pH ลดลง ซึ่งเป็นไปได้ว่าหลังจากการบ่มที่แต่ละช่วง pH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อาจเกิดการแยกของ prosthetics group ที่เป็นกลุ่ม heme จาก active site ของ เอนไซม์ (Deepa and Arumugan, 2002) นอกจากนี้มีการรายงานว่ามีการปล่อยหมู่ heme ให้เป็นอิสระอย่างรวดเร็วในช่วง pH ที่ต่ำกว่า 4 ทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูญเสียความว่องไว (Thongsook and Barrett, 2005) จากการทดลองนี้สัมพันธ์กับการทดลองของ Marquez และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าหลังการทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในวานิลลาให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephacryl S 200 แล้วศึกษา pH ที่เหมาะสมและความเสถียรต่อ pH มีค่าเท่ากับ 4.0 และ 12.0 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.12 แสดงค่าความสัมพันธ์ความว่องไวของ  $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$  ที่เสถียรในช่วง pH 2.0-10.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

pH	Relative activity (%)		
	$POD_1$	$POD_2$	$POD_3$
2.0	1.4±5.3	0.9±2.7	3.8±2.8
3.0	2.1±0.1	2.2±8.4	15.9±1.9
4.0	3.3±6.3	4.4±4.0	25.8±6.2
5.0	41.4±4.3	25.0±5.8	43.9±6.6
6.0	60.7±6.9	30.6±2.4	56.1±3.5
7.0	100.0±0.4	37.5±3.5	75.8±1.0
8.0	74.5±2.0	47.2±2.6	83.3±2.8
9.0	40.0±4.1	62.5±4.2	100.0±2.7
10.0	1.9±6.2	100.0±4.4	80.3±3.2

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)





รูปที่ 3.29 แสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ที่เสถียรในช่วง pH 2.0-10.0

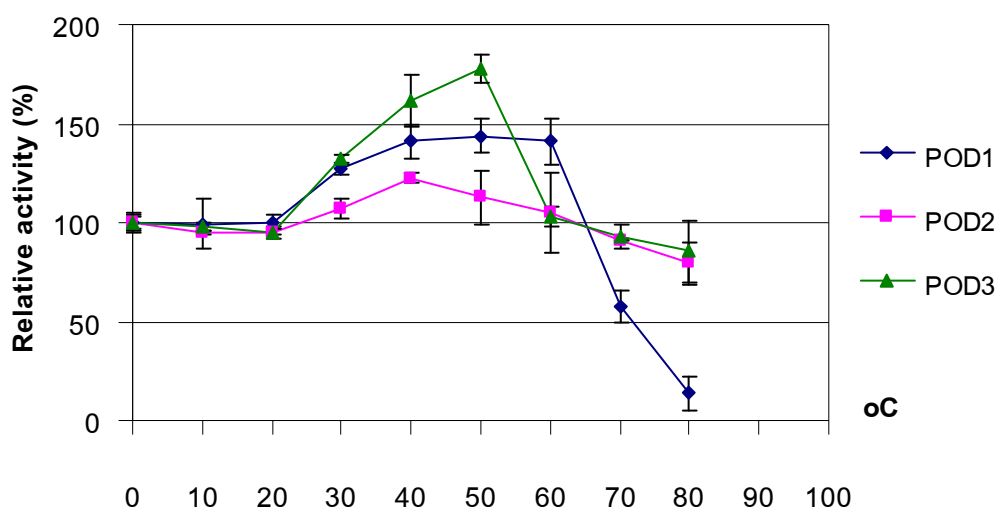
### 3.5.4 ผลการศึกษาค่าคงตัวที่อุณหภูมิต่างกัน

จากการตรวจวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิต่างๆ โดยนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปบ่มที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปรับอุณหภูมิโดยการแช่ในกระบอกน้ำแข็งก่อนนำไปวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท ซึ่งประกอบด้วย *o*-dianisidine 7.88 มิลลิโมลาร์ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3 มิลลิโมลาร์ ใน sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.4 พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากเซลล์แขวนลอยของพาราเสถียรที่อุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.13 และ รูปที่ 3.30) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (70-80 องศาเซลเซียส) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทุกไอโซไซม์จะสูญเสียความว่องไว โดย POD<sub>1</sub> จะคงความเสถียรได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วน POD<sub>2</sub> เสถียรที่สุดที่ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ POD<sub>3</sub> จะเสถียรที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.13 แสดงค่าความสัมพันธ์ความว่องไวของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ที่เสถียรในช่วง อุณหภูมิ 0-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Thermal	Relative activity (%)		
	POD <sub>1</sub>	POD <sub>2</sub>	POD <sub>3</sub>
0	100.0±3.0	100.0±5.1	100.0±4.5
10	99.0±12.6	95.1±1.2	98.1±1.8
20	100.5±3.9	95.1±3.3	95.4±1.5
30	127.1±2.4	106.9±4.8	132.4±1.8
40	141.0±8.7	122.5±2.7	162.0±13.2
50	143.8±8.4	112.7±13.5	177.8±7.2
60	141.0±11.7	104.9±20.1	102.8±4.8
70	57.6±8.1	91.2±0.3	93.1±5.7
80	13.8±8.4	79.4±10.8	85.6±15.6

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 3.30 แสดงความสัมพันธ์ความว่องไวของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> เสถียรในช่วง อุณหภูมิ 0-80 องศาเซลเซียส

มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งในพืชที่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดย Vamos-Vigyazo, (1980) ทำการบ่มเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที เพื่อทำการหยุดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่พบในถั่วเขียว อย่างไรก็ตามความทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนั้นจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบเอนไซม์และสภาวะที่ทำการศึกษาเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง pH และ สับสเตรทที่นำมาใช้ทดลอง นอกจากนี้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ตรวจพบกรดอะมิโนชนิด cysteine เป็นจำนวนมากในสายโพลีเปปไทด์ (Deepa and Arumugan, 2002)

จากรายงานของ Belcarz และคณะ (2007) แยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จาก spring cabbage ด้วยคอลัมน์ DEAE sepharose CL-6B ได้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 2 ไอโซไซม์ (cationic และ anionic) ศึกษาความทนต่ออุณหภูมิในช่วง 20-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 2 ไอโซไซม์ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากวานิลลา เมื่อศึกษาความทนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 0-80 องศาเซลเซียส โดยบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ pH 7, 9 และ 11 พบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่ 70 องศาเซลเซียสที่ pH 7 ส่วนที่ pH 11 ที่อุณหภูมิดังกล่าวสูญเสียความว่องไว (Marquez *et al.*, 2007)

### 3.5.5 ผลการศึกษาสารเคมีที่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากการนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปบ่มใน 1 มิลลิโมลาร์ ของสารเคมีชนิดต่างกันได้แก่ EDTA, CuSO<sub>4</sub>, NaN<sub>3</sub>, ascorbic acid, NaCl, citric acid,  $\beta$ -Me, salicylic acid, SDS และ DTT ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่า NaN<sub>3</sub>,  $\beta$ -Me และ DTT 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ได้อย่างสมบูรณ์ (0 เปอร์เซ็นต์ ของ ค่าความสัมพันธ์ความว่องไว) การยับยั้งของ NaN<sub>3</sub> นั้นไปแข่งจับกับ Fe<sup>2+</sup> ที่สร้างพันธะอยู่กับอะตอมไนโตรเจนของวงแหวนพอร์ไฟรินหรืออะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโนฮิสติดีนที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีการรายงานว่า NaN<sub>3</sub> (1 มิลลิโมลาร์) สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักกาดหัวได้อย่างสมบูรณ์ (0.1-0.5 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นต์) (Kay *et al.*, 1967) และจากในปาล์มน้ำมันใน NaN<sub>3</sub> 1 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งได้เพียง 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 20 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ (Deepa และ Arumugan, 2002) NaN<sub>3</sub> 1 มิลลิโมลาร์ ยังยับยั้งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากวานิลลาได้อย่างสมบูรณ์ (Marquez *et al.*, 2007) ในขณะที่  $\beta$ -Me สามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโครงสร้างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ส่วน DTT ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยการทำให้

ปฏิกิริยากับ  $Fe^{2+}$  ที่บริเวณ active centre ในหมู่ heme ที่เป็น prosthetics group ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Debowska และ Podstolski, 2001)

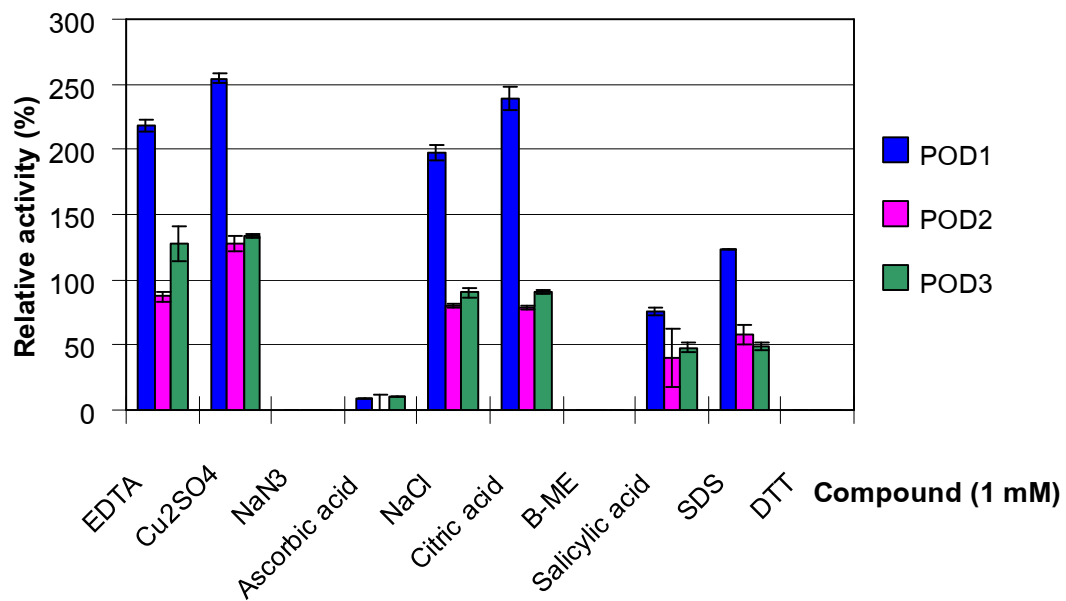
Ascorbic acid สามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้เช่นกัน มีคุณสมบัติเป็น reducing agent โดยการแบ่งไฮโดรเจนอะตอมให้กับสารกลุ่ม ROS ( $H_2O_2$ ) ที่เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Weber *et al.*, 1996)

EDTA 1 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองนี้ สามารถเพิ่มและลดการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา โดย EDTA มีคุณสมบัติเป็น chelating agent กับ  $Fe^{2+}$  อะตอมที่เป็น prosthetics group ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีผลทำให้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเปลี่ยนรูปร่างแล้วมีการเปลี่ยนแปลงผลของความว่องไว นอกจากนี้คุณสมบัติของสารเคมีประเภทโลหะหนัก  $Cu^{2+}$  สามารถเพิ่มความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากการทดลองนี้ได้ทุกไอโซไซม์ โดยอาจเป็นผลเนื่องมาจากมีคุณสมบัติเป็นโคแฟกเตอร์ ในขณะที่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำงานส่งผลให้ความว่องไวในเซลล์แขวนลอยอย่างพาราเพิ่มขึ้นทุกไอโซไซม์

ตารางที่ 3.14 แสดงผลของสารเคมีต่อค่าความสัมพันธ์ความว่องไวของ  $POD_1$ ,  $POD_2$  และ  $POD_3$  หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

Compound (1 mM)	Relative activity (%)		
	$POD_1$	$POD_2$	$POD_3$
EDTA	218.5±4.4	87.0±3.7	127.4±13.1
$Cu_2SO_4$	254.6±3.3	127.3±6.2	133.9±1.3
$NaN_3$	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Ascorbic acid	9.2±0.3	0.0±12.5	10.1±0.4
NaCl	197.5±5.6	80.7±1.6	89.9±3.1
Citric acid	238.7±8.7	78.9±1.6	91.1±1.2
$\beta$ -ME	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Salicylic acid	75.6±2.7	40.4±22.5	47.6±3.7
SDS	122.7±0.1	58.4±7.5	48.8±2.8
DTT	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 3.31 แสดงผลของสารเคมีต่อความสัมพันธ์ความว่องไวของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub>

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

#### 1. แถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในยางพารา (*H. brasiliensis*)

- แถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดอะซิติก ในใบยางพันธุ์ BPM-24 ระยะ B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D มีประมาณ 4 แถบ ใบยางในระยะ B พบแถบที่ 1 แถบเดียว โดยเห็นแถบที่ 3 และ 4 เพิ่มขึ้นในระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D พบแถบที่ 2 ในระยะ D เท่านั้น แถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 4 แถบที่พบในแต่ละระยะจะเห็นชัดเจนเมื่อใบยางมีความแก่มากขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ แถบที่ 1 ที่พบในระยะ D เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น เป็นแถบที่บ่งบอกความอ่อนแก่ของใบยางพารา ในขณะที่ใบยางติดเชื้อในธรรมชาติพบว่าแถบที่ 3 และ 4 จางหายไปและเห็นแถบที่ 2 ชัดเจนขึ้น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบที่ 2 เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคในธรรมชาติ และแถบที่ 1 เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับใบยางพารา นอกจากนี้แถบที่ 1 และ 2 ที่พบในระยะ B<sub>2</sub>-C และ D เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าระยะอื่นและอาจใช้แถบที่ 1 บอกรความอ่อนแก่ของใบยางพาราได้

- แถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผลในใบยางพารา 2 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคต่างกัน ได้แก่ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) พบการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 4 แถบ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งปรากฏเพียง 3 แถบ (1, 3 และ 4) เมื่อเวลาผ่านไปแถบที่ 3 และ 4 จะค่อยๆ จางหายไป แถบความว่องไวที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (แถบที่ 2) ถูกกระตุ้นจากการทำให้เกิดบาดแผล เป็นไปในลักษณะเดียวกับใบในช่วงที่ติดเชื้อในธรรมชาติ ทำให้ทราบว่าแถบที่ 2 เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค โดยความเข้มของแถบที่ 2 ในสายพันธุ์ BPM-24 เห็นชัดกว่าพันธุ์ RRIM600

- สับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 4 ชนิด ได้แก่ guaiacol, syringaldazine, o-dianisidine และสคอพอลิติน สามารถบ่งบอกกระบวนการป้องกันโรคที่เกี่ยวข้อง กล่าวคือ guaiacol และ syringaldazine ใช้ตรวจสอบไอโซไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินเพื่อสร้างความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ เพราะ guaiacol และ syringaldazine มีโครงสร้างคล้ายกับ coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง guaiacyl lignin และ syringyl lignin ตามลำดับ สคอพอลิตินใช้เป็นสับสเตรทเพื่อตรวจสอบไอโซไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดทั้งสคอพอลิตินและ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ภายในเซลล์ ส่วน o-dianisidine เกี่ยวข้องกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล เพื่อเปลี่ยน H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ไปเป็นน้ำ แถบที่ 1 เป็นแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่แล้วในใบยางพาราเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินทั้งชนิด syringyl และ guaiacol lignin แถบที่ 3 และ 4 เกี่ยวข้องกับ syringyl lignin เพียงอย่างเดียว ส่วนแถบที่ 2 นั้น

เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคทำหน้าที่สลายสคอพอลิทิน,  $H_2O_2$  และสร้างลิกนินชนิด guaiacyl lignin

- ผลการศึกษาเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในใบและเซลล์แขวนลอยของพารา ไอโซไซม์จากใบของพาราชนิดอะซิติก มี 4 แถบ (1, 2, 3 และ 4) ในขณะที่ในเซลล์แขวนลอยปรากฏเพียงแถบเดียว เคลื่อนที่ได้ใกล้เคียงกับแถบที่ 2 ในใบของพารา แถบที่ 2 ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยถูกกระตุ้นจากการเขย่าและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate จาก *P. palmivora* มีความเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

## 2. การชักนำเซลล์แขวนลอยจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของพารา

- หลังจากย้ายแคลล์อายุประมาณ 3 สัปดาห์ ไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำเซลล์แขวนลอยที่เปลี่ยนชนิดของฮอร์โมน โดยทำการเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ได้เซลล์สี่เหลี่ยมอ่อน กระจายตัวและแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตเป็น 3 ระยะ คือ ระยะ lag phase (1-2 วัน), log phase (2-10 วัน) และ stationary phase (10-14 วัน)

- ในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย มีปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้นและชะลออัตราการเพิ่มของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส หลังการย้ายเลี้ยงในวันที่ 10 พบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโต

## 3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ filtrate

- filtrate จาก *P. palmivora* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Henninger มีโปรตีนหลักขนาด 10 กิโลดาลตัน ที่มีคุณสมบัติเป็นอิลิซิทิน มีชื่อเฉพาะว่า palmivorein มีความบริสุทธิ์เทียบเท่ากับ filtrate ได้จาก *P. palmivora* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร PDB แล้วผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

## 4. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง filtrate ของเชื้อรา *P. palmivora* กับเซลล์แขวนลอยของพารา

- เซลล์แขวนลอยของพาราที่ป่มด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.300 กรัมต่อ 1 กรัม เซลล์แขวนลอย สามารถชักนำการสังเคราะห์สคอพอลิทินสูงสุดที่ 80 ชั่วโมง เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด S-POD เพิ่มขึ้นที่เวลา 56 และ 80 ชั่วโมง ทำหน้าที่ออกซิไดซ์  $H_2O_2$  ไปเป็นน้ำ (ที่ 56 ชั่วโมง) และสลายสคอพอลิทิน (ที่ 80 ชั่วโมง) O-POD ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล และ  $H_2O_2$  ตรวจพบในชั่วโมงที่ 32 และ 56 ตามลำดับ ในขณะที่ G-POD กับ

Z-POD ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์จากการถูกกระตุ้น เซลล์แขวนลอยด้วย filtrate มีการเพิ่มขึ้นที่ 32, 64 และ 48, 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

### 5. การทำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์บางส่วนและคุณสมบัติของเอนไซม์

- เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ผ่านคอลัมน์ ion exchange ชนิด DEAE-sepharose CL-6B มี 3 ไอโซไซม์ ได้แก่ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 15, 17 และ 287 เท่า ตามลำดับ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซไซม์เพิ่มขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วย filtrate จาก *P. palmivora* เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคในยางพารา มีค่า K<sub>m</sub> ของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> เท่ากับ 0.27, 0.71, 0.91 มิลลิโมลาร์ (*o*-dianisidine), 0.23, 0.26, 0.39 มิลลิโมลาร์ (สคอพอลลิติน), วัตไม้ได้, 4.17, 3.92 มิลลิโมลาร์ (guaiacol) และ 0.12, 0.02, 0.29 มิลลิโมลาร์ (syringaldazine) ตามลำดับ จากค่า K<sub>m</sub> syringaldazine สามารถจับกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซไซม์ได้ดีที่สุด

- นำ *o*-dianisidine ที่เป็นสับสเตรทเหมาะสมที่สุด (catalytic power) โดย POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> จะทำปฏิกิริยาเหมาะสมที่ pH 6.0, 5.0 และ 5.0 ตามลำดับ เป็นค่า pH ที่ทำปฏิกิริยาได้ดีไม่ต่างจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่มีค่า pH เท่ากับ 5.4 และมีความเสถียรที่ pH 7.0, 9.0 และ 10.0 ตามลำดับ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดอะซิติกที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเซลล์แขวนลอยยางพารามีความทนในสภาวะที่เป็นกลางถึงต่าง

- POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ที่ได้จากเซลล์แขวนลอยยางพาราเสถียรและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นที่ 70-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทุกไอโซไซม์จะสูญเสียความว่องไว

- 1 มิลลิโมลาร์ ของ NaN<sub>3</sub>, β-Me และ DTT สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของ POD<sub>1</sub>, POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub> ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ NaCl, SDS และ citric acid ช่วยเพิ่มความว่องไวของ POD<sub>1</sub> แต่จะยับยั้งความว่องไวของ POD<sub>2</sub> และ POD<sub>3</sub>



### เอกสารอ้างอิง

- ชวนพิศ นิยะกิจ. 2544. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพาราและการปลูกถ่าย ยีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นารธิตา รอดโพธิ์ทอง. 2546. การคัดเลือกยางพันธุ์ต้านทานจากเชื้อพันธุ์ (germplasm) โดยใช้ชูโอสปอร์และท็อกซินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิลุบล บุญหวังช่วย. 2545. ผลของอิซิดินและชูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora botryose* ต่อใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นุรอมาลี ดีนามอ. 2547. ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นันทา เชิงเขาว์, เมธิณี รัตตสาร และนิลุบล บุญหวังช่วย. 2544. ปฏิกริยาตอบสนองของยางพาราต่อสปอร์และท็อกซินจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, 158 หน้า. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และสมปอง เตชะโต. 2542. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงเซลล์ชั้นเพนชัน การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21, 169-177.
- พันธ์วศรี แสงสุวรรณ. 2547. ปฏิกริยาตอบสนองของแคลลัสยางพาราต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- เพ็ญมาศ นาคอุดม. 2548. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์แขวนลอยของพาราบักซูโอสปอร์และอิลลิซิดิน ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 2525. หลักวิชาโรคพืช, 386 หน้า. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภาณุพงศ์ หนูชุม และสมปอง เตชะโต. 2546. ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณและการยืดยาวของยอดผักเหลียง (*Gnetum gnemon* Linn.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 25, 565-575.
- สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ, 126 หน้า. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมปอง เตชะโต และชวนพิศ นิยะกิจ. 2543. ผลของอายุผลและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสในพืชสกุล *Garcinia* วารสารเกษตร 16, 31-45.
- อุไร จันทรประทีน, นริสา จันทรเรือง, เพียว รมรื่นสุขารมย์, อารมณ โรจน์สุจิตร์, อนุสรณ์ แรมลี และ เกษตร แนบสนิท. 2546. การสำรวจโรคในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์. บทคัดย่อ งานวิจัยและพัฒนายางพารา. กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยยาง.
- Adachi, T., Wang, J. and Wang, X.L. 2000. Age-related change of plasma extracellular-superoxide dismutase. Clin. Chim. Acta. 290, 169–178.
- Aibara, S., Yamashita, H., Mori, E., Kato, M. and Morita, Y. 1982. Isolation and characterization of five neutral isozymes of horseradish peroxidase. Biochem. 92, 531-539.
- Arora, D.S., Chander, M. and Gill, P.K. 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. Int. Biodet. Biodeg. 50, 115-120.

- Aquino-Bolanas, E.N. and Mercado-Silva, E. 2004. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Post. Biol. Tech.* 33, 275-283.
- Asada, K. and Takahashi, M., 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J., *et al.* (Eds.), *Photoinhibit.* 227–287.
- Asada, K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Azpilicueta, C.E., Zawoznik, M.S. and Tomaro, M.L. 2004. Phytoalexins synthesis is enhanced in ground nut plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*). *Crop. Prot.* 23, 1069–1074.
- Belcarz, A., Grazyna, G., Barbara, K. and Pawel, K. 2007. Spring cabbage peroxidases – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochem.* 69, 627–636.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Breton, F., Sanier, C. and Auzac, J. 1997. Scopoletin production degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. *J. Plant Physiol.* 151, 595-602.
- Brodier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *Biol. Chem.* 56, 1604–1607.
- Bruce, R.J. and West, C.A. 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectin fragments in suspension culture of castor beans. *Plant Physiol.* 91, 889-897.
- Buffard, D. Bread, C. Huystee, R.B. Asemota, O. Pierre, M. Dang Ha D.B. and Esnault, R. 1990. Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic

- peroxidases from cultured peanut cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 8874–8878.
- Chee, K.H. 1968. *Phytophthora* leaf disease in Malaysia. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 21, 79-87.
- Chen, E., Chen, Y., Chen, L. and Liu, Z. 2002. Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiol. Biochem.* 40,439-444.
- Chen,G. and Asada, K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plan Cells Physiol.* 30, 1987-1998.
- Christophe, H., Mohamed, A., Ophélie, F., Lamine, B., Eric, D., François, M., Frédéric, L. and Eric, L. 2008. Molecular characterization of cell death induced by a compatible interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *linii* and flax (*Linum usitatissimum*) cells. *Plant Physiol. Biochem.* Article in Press, 1-11.
- Churugchow, N. and Rattarasarn, M. 2000. The elicitor secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochem.* 54, 33-38.
- Churugchow, N. and Rattarasarn, M. 2001. Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. *J. Plant Physiol.* 158, 875-882.
- Clarke, D.D. 1973. The accumulation of scopolin in potato tissue in response to infection. *Physiol. Plant Pathol.* 3, 347–358.
- Comhair, S.A., Bhatiana, P.R., Farver, C., Thunnissen, F.B. and Erzurum, S.C. 2001. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J.* 15, 70–78.
- Cooper, R.M. and Williams, J.S. 2004. Elemental sulphur as an induced antifungal substance in plant defence. *J. Exp. Bot.* 55, 1947-1953.

- Daayf, M., Bellaj, M., Hassni, F. and Hadrami, I. 2003. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium. *Envi. Exp. Bot.* 49, 41-47.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II: method and application to human serum protein. *Ann. NY. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Dat, J. 2000. Dual function of the active oxygen species during plant stress responses, *Cell Mol. Life Sci.* 57, 779–795.
- Debowska, R. and Podstolski, A. 2001. Properties of diphenolase from *Vanilla planifolia* (Andr.). Shoot primordia cultured in vitro. *J. Agri. Food Chem.* 49, 3432–3437.
- Deepa, S. and Arumughan, C. 2002. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochem.* 61, 503–511.
- Desjardin, P.R., Zentmyer, G.A. and Reynolds, D.A. 1969. Electron microscope observations of the flagellar hairs of *Phytophthora palmivora* zoospores. *Can. J. Bot.* 47, 1077-1079.
- Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Arslan O. and Alkan, M. 2007. Variations of peroxidase activity among *Salvia* species. *J. Food Eng.* 79, 375–382.
- Dogan, M., Arslan, O., & Dogan, S. 2002. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars. *Int. J. Food Sci. Tech.* 37, 415–423.
- Duarte-Vazquez, M. A., Garcia-Almendarez, B. E., Regalado, C., Whitaker, J. R. 2001. Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from turnip (*Brassica napus* L. var. *purple top white globe*) roots. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4450-4456.
- Edwards, R., Stones, T. M., Gutierrez-Melladot, M. C. and Jorjrin, J. 1997. Characterization and inducibility of a scopoletin degrading enzyme from sunflower. *Phytochem.* 45, 1109-1114.

- Egea, C., Ahmad, A.S., Candela, M. and Candela, M.E. 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 158, 151-158.
- Erwin, D.C. and Riberio, O.K. 1996. *Phytophthora palmivora*. In Chee, K.H., *Phytophthora Disease Worldwide*. pp. 243-244. Minnesota : APS Press.
- Friend, J., Reynolds, S.B. and Aveyard, M.A. 1973. Phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid lignin in potato tuber inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 3, 495-507.
- Jung, W.J., Jin, Y.L., Kim, Y.C., Kim, K.Y., Park, R.D. and Kim, T.H. 2004. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biol. Control.* 30, 645-652.
- Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Merino, F., Cuello, J., Pedreño, M.A. and Ros Barceló, A. 2006. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS Letters* 580, 4311–4316.
- Garcia, D., Cazaux, E., Rivano, F. and Auzac, J.D. 1995a. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight, in *Hevea* spp. *Eur. J. For. Path.* 25, 282-292.
- Garcia, D., Sanier, C., Machiex, J.J. and Auzac, J. 1995b. Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. ARX and evaluation of its fungi toxicity for three leaf pathogens of rubber tree. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47, 213-223.
- Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T. and Grcppin, H. 1982. *A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants*, p. 1. University of Geneva Press, Geneva, Switzerland.
- Giesemann, A., Biehland, B. and Lieberei, R. 1986. Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Phytopathol.* 117, 373-376.

Gómez-Vásquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J.R. and Cooper, R.M. 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann. Bot.* 94, 87-97.

Goy, P. A., Signer, H., Reist, R., Aichholz, R., Blum, W., Schmidt, E. and Kessmann, H., 1993. Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi*. *Planta*, 191-200.

Gutierrez, M.C., Parry, A., Tena, M., Jorin, J. and Edwards, R. 1994. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexin in sunflower. *Phytochem.* 38, 1185-1191.

<http://ceris.purdue.edu/napis/gif/sod-np.jpg>. (สืบค้นวันที่ 10/02/2551)

<http://genomics.energy.gov/gallery/b2b/gallery-02.html>. (สืบค้นวันที่ 11/02/2551)

[http://InterProHeam peoxidase,plant-fungal-bacterial.html](http://InterProHeam%20peoxidase,plant-fungal-bacterial.html). (สืบค้นวันที่ 03/03/2551)

<http://www.kanchanapisek.or.th/kpc/BOOK/chapter4/t3-4-l1.htm#sect1>. (สืบค้นวันที่ 26/02/2551)

<http://www.gehardt.com.au/durian/phytophthora.html>. (สืบค้นวันที่ 10/03/2551)

<http://www.botany.hawaii.edu/.../Bot201/Oomyceta/Phytophthora.jpg>. (สืบค้นวันที่ 29/01/2551)

<http://www.padil.gov.au/viewPestLargeImage.aspx?id=3...> (สืบค้นวันที่ 12/03/2551)

Kapich, A.N., Steffen, K.T., Hofrichter, M. and Hatakka, A. 2005. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 371-377.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 8<sup>th</sup> ed. Willingford, UK : CAB International.

- Jung, W.J., Jin, Y.L., Kim, Y.C., Kim, K.Y., Park, R.D. and Kim, T.H. 2004. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biol. Control* 30, 645-652.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. 1987. Biological function of; pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-beta-glucanase activity. *EMBO* 6, 3209-3212.
- Kay, E., Leland, M., and Jow, Y. 1967. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. *J. Biol. Chem.* 242, 2470–2473.
- Kim, Y. H., Kim, Y., Cho, E., Kwak, S., Kwon, S., Bae, J., Lee, B., Meen, B. and Huh, G. H. 2004. Alterations in intracellular and extracellular activities of antioxidant enzymes during suspension culture of sweetpotato. *Phytochem.* 65, 2471-2476.
- Kim, S. and Lee, D. 2005. Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs in *Raphanus sativus*. *Plant Physiol.* 162, 609-617.
- Kishimoto, T., Uraki, Y. and Ubukata, M. (2005). Easy synthesis of  $\beta$ -O-4 type lignin related polymers. *Org. Biomol. Chem.* 3, 1067 – 1073.
- Kitajima, S. and Sato, F. 1999. Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. *Biochem.* 125, 1-8.
- Kuc', J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33, 275-291.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, S., Kim, E., and Lee, M. 2002. Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. *Phytochem.* 58, 859–864.



- Li, Z.S., Alfenito, M., Rea, P.A., Walbot, V. and Dixon, R.A. 1997. Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochem.* 45, 689-693.
- Macri, F., Braidot, E., Petrusa, E. and Vianello, A. 1994. Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1215, 109-14.
- Mamuka, K., Winkel, C. and Thorneley, R. 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol.* 114, 1237-1245.
- Mandal S. and Mitra A. 2008. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* Article in press.
- Marco, A., Guzzardi, P. and Jamet, E. 1999. Isolation of tobacco isoperoxidase accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism, *Plant Physiol.* 120, 371–381.
- Marquez, O., Waliszewski, K. N., Oliart, R. M. and Pardo, V. T. 2007. Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla. *Food Sci. Tech.* article in press.
- Martinez, A. S., Fortea, M.I., Amor F.M. and Nez-Delgado, E. 2008. Kinetic characterization and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. *Food Chem.* 107, 193-199.
- Mittler, R.O. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trend Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mohammadi, M. and Kazemi, H. 2002. Change in peroxidase and phenol oxidase in susceptible and resistance. *Plant Sci.* 162, 491-498.

- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15, 473–479.
- Núñez-Delicado, E., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A. and García-Carmona, F. 1996. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase, *J. Chromatogr.* 680, 105–112.
- Núñez-Delicado, E., Sojo, M.M., García-Carmona, F. and Sánchez-Ferrer, A. 2003. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase, *J. Agri. Food Chem.* 51, 2058–2063.
- Ookawara, H., Eguchi, M., Nishimura, T., Kizaki, E., Takayama, D., Saitoh, H. O. and Suzuki, K. 2003. Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 914–919.
- Papadakis, A.K., Siminis, C.I. and Roubelakis-Angelakis, K.A. 2001. Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiol.* 126, 434-441.
- Perez, F.J., Villegas, D. and Mejia, N. 2002. Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in grapevine leaves. *Phytochem.* 60, 573-580.
- Perrone, S.T., McDonald, K.L., Sutherland, M.W. and Guest, D.I. 2003. Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62, 127-135.
- Polkowska-Kowalczyk, L., Wielgat, B. and Maciejewska, U. 2003. Changes in the antioxidant status in leaves of *Solanum* species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.* 164, 1268-1277.
- Polkowska-Kowalczyk, L. and Maciejewska, U. 2001. The oxidative processes induced in cell suspensions of *Solanum* species by culture filtrate of *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.* 56, 235-244.

- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., de Forchetti, S.M., Tigier, H. and Valpuesta, V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122, 1119-1128.
- Rattarasarn, M. 2003. Defense response of *Hevea brasiliensis* against zoospores and elicitor from *Phytophthora palmivora*. Ph. D. dissertation in Biochemistry Prince of Songkla University.
- Ravindra, N., and Van-Huystee, R. 1984. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiology*, 75, 956–958.
- Ros-Barcelo, A., Pomar, F., Lopez-Serrano, M., Martinez, P. and Pedreno, M.A. 2002. Developmental regulation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol Biochem* 40, 325–332.
- Sakharov, I.Y. and Sakharova, I.V. 2002. Extremely high stability of African oil palm tree peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1598, 108-114.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. and García-Carmona, F. 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114, *Plant Physiol.* 91, 1481–1487.
- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F. and García-Carmona, F. 1993. Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system, *J. Agri. Food Chem.* 41, 1583–1586.
- Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B. and Fernandes-Ferreira, M. 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* 162,981-987.
- Shannon, M.L., Key, E. and Lew, Y.J. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish root. *J. Biochem.* 9, 2166-2172.

- Song, J., I. Kanazawa, S.K., Murata, T. and Yokoyama, K.K. 1999. Color coding the cell death status of plant suspension cells. *BioTech.* 26, 1060-1062.
- Sushamakumari, S., Asokan, M.P., Anthony, P., Lowe, J.B. and Davey, M.R. 2000. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. *Plant cell* 2, 253-261.
- Syros, T., Yupsanis, T., Zafidiadis, H. and Economou, A. 2004. Activity and isoforms of peroxidase, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *J. Plant Physiol.* 161, 69-77.
- Takao, K., Yasumitsu, U. and Makoto, U. 2005. Easy synthesis of b-O-4 type lignin related polymers. *Org. Biomol. Chem.* 3, 1067–1073.
- Tan, A.M. and Low, F.C. 1975. Phytoalexin production by *Hevea brasiliensis* in response to infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on the other fungi. *Proceeding of Intercational Rubber Conference. RRIM600.* Kuala Lumpur, Malaysia. 3, 217-227.
- Te-chato, S. and Chartikul, M., 1993a. Certain factors affecting callus formation integument of immature seed. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 15, 227-233.
- Te-chato, S. and Chartikul, M., 1993b. Tissue culture of rubber : somatic embryogenesis induction from integument subsequent to plantlet regeneration. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 15: 235-241.
- Te-chato, S., Niyagij, C. and Suranilpong, P. 2002. Callus formation from protoplasts derived from cell suspension culture of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Thai J. Agric. Sci.* 35, 165-173.
- Thongsook, T., and Barrett, M. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica) peroxidases. *J. Agri. Food Chem.* 53, 3206–3214.

- Underhill, S. and Critchley, C. 1995. Cellular localisation of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chinensis* Sonn. *Pericarp*. Aust. J. Plant Physiol. 22, 627 – 632.
- Valle, T., Lopez, J.L., Hernandez, J.M. and Corchete, P. 1997. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostom ulmi* spores. Plant Sci. 125, 97-101.
- Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutrit. 15, 49–127.
- Van Huystee, R.B. and Zheng, X. 1993. Cationic peanut peroxidase and the oxidation of ferulic acid. Phytochem. 34, 933-939.
- Vianello, A., Zancani, M., Nagy, G. and Macri, F. 1997. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membrane oxidizes ascorbate. J. Plant Physiol. 150, 573-577.
- Wang, W., Li, S., Zhao, X., Du, Y. and Lin, B. 2008. Oligochitosan induces cell death and hydrogen peroxide accumulation in tobacco suspension cells. Pest. Biochem. Physiol. 90, 106-113.
- Youngs, H.L., Sundaramoorthy, M. and Gold, M.H. 2000. Effect of cadmium on manganese peroxidase competitive inhibition of  $Mn^{2+}$  oxidation and thermal stabilization of the enzyme. Eur. J. Biochem. 267, 1761-1769.
- Zemek, J., Kosikova, B., Augustin, J. and Joniak, D. 1979. Antibiotic properties of Lignin components. Folia Microbiol. 24, 483–486.

ภาคผนวก

### 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา **Potato Dextrose Agar (PDA)**

นำ PDA ปริมาณ 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส และเทใส่จานแก้วปราศจากเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 มิลลิลิตร

### 2. การเตรียมบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ **Tris-Tricine (Tris-Tricine sample buffer)**

เตรียมบัฟเฟอร์ตัวอย่างโดยการใส่ Tris-HCl 0.5 โมลาร์, pH 6.8 ผสม Glycerol 2.4 มิลลิลิตร, SDS 10 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร, 2-mercaptoethanol 0.2 มิลลิลิตร และ Coomassie brilliant blue G-250 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร สุกท้ายปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร โดยการใช้น้ำกลั่นปลอดไอออน (deionized water) 4 มิลลิลิตร

### 3. การเตรียมสารตัวอย่าง **Tricine-SDS-PAGE**

โดยการนำสารตัวอย่าง 3 ส่วนผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วนที่ได้จากการเตรียมในข้อ 2 จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีนตามที่ต้องการ ก่อนทำอิเล็กโทรโฟรีซิสต้องนำสารตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที

### 4. การเตรียมโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (**low molecular weight**)

นำโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำมาเจือจางกับ Tris-Tricine sample buffer ในอัตราส่วน 1 : 20 ต่อมานำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปใช้ครั้งละ 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่องเจล

### 5. การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด

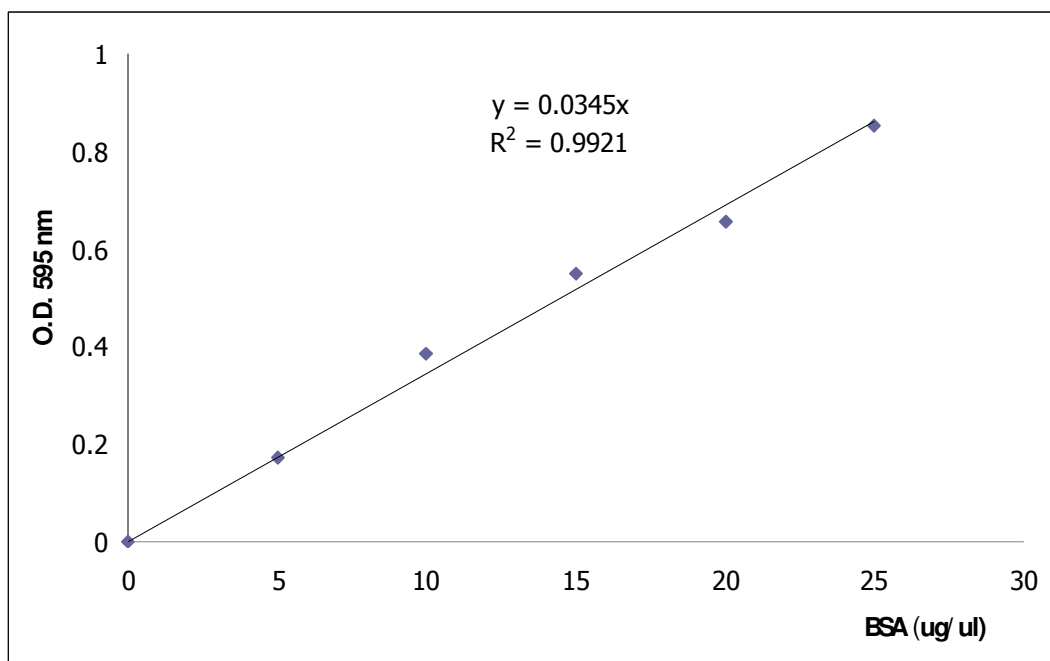
ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ใน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม phosphoric acid 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

### 6. การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน

ละลาย BSA จำนวน 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร

## 7. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA



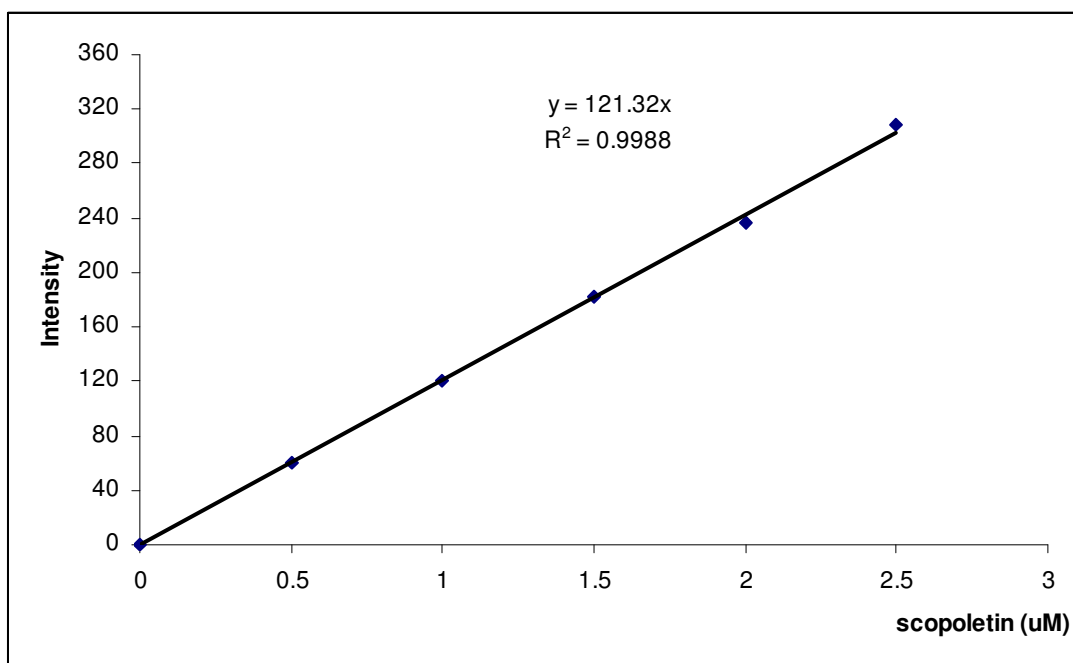
กราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA) โดยใช้ปริมาณของโปรตีน BSA เป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

## 8. การเตรียมสคอพอลิตินมาตรฐาน

ละลายสคอพอลิติน จำนวน 96.1 มิลลิกรัมใน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร จะได้สคอพอลิตินที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการเจือจางสารละลายสคอพอลิตินแบบ serial dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสคอพอลิตินเท่ากับ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น ( $\lambda$  excitation) 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย ( $\lambda$  emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน กราฟมาตรฐานสคอพอลิตินโดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินเป็น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 ไมโครโมลาร์ อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร



( $\lambda$  excitation) และความยาวปลดปล่อย 440 นาโนเมตร ( $\lambda$  emission) ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน



กราฟมาตรฐานสคอพอลิติน โดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครโมลาร์ อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร ( $\lambda$  excitation) และความยาวคลื่นปลดปล่อย ( $\lambda$  emission) ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวจิระภา ชัยวงศ์  
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 4822014  
 วุฒิการศึกษา  
 วุฒิ ชื่อสถาบัน ปีที่สำเร็จการศึกษา  
 วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2548  
 (เคมี-ชีววิทยา)

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประเภททุนอุดหนุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2548

## ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์

จิระภา ชัยวงศ์ และ นันทา เชิงเชาว์. 2550. เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสลาย scopoletin และสร้างลิกนินในยางพารา. การประชุมงานวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 20-22 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ 2550, โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อำเภอเมือง จังหวัด พิษณุโลก.