



โปรตีเอสอินฮิบิเตอร์จากเซลล์แขวนลอยยางพาราหลังถูกกระตุ้นด้วย  
คอปเปอร์ซัลเฟต

**Protease inhibitors (PIs) from *Hevea brasiliensis* Cell Suspension after  
Triggering by Copper Sulfate**

อรารรณ บุญยะแตง  
**Orawan Bunyatang**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

**2552**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์จากเซลล์แขวนลอยของพาราหลังถูกกระตุ้นด้วย  
   คอปเปอร์ซัลเฟต  
ผู้เขียน                      นางสาวอรรรณ บุกณะแต่ง  
สาขาวิชา                    ชีวเคมี

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเขียว)

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเขียว)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์เกษม อัสวศิริรัตนกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

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

ชื่อวิทยานิพนธ์	โปรตีเอสอินฮิบิเตอร์จากเซลล์แขวนลอยยางพาราหลังถูกกระตุ้นด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต
ผู้เขียน	นางสาวอรวรรณ บุญยะแต่ง
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2551

### บทคัดย่อ

โปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ (protease inhibitors, PIs) ในพืชเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดเล็ก พบมากในเนื้อเยื่อสะสม เช่น ส่วนของหัวใต้ดินและเมล็ด และยังพบในส่วนอื่นๆ ของพืชได้อีกด้วย การเกิดบาดแผล การโจมตีด้วยแมลง หรือเชื้อก่อโรคต่างๆ (pathogens) กระตุ้นให้มีการผลิต PIs เพิ่มมากขึ้นในพืช โดยกลุ่มของ PIs ที่มีการศึกษากันอย่างมากในพืชจะเป็นกลุ่มซึ่งยับยั้งเซอรีนโปรตีเอส (serine protease) ที่ได้จากสัตว์ เมื่อศึกษาผลของ PIs ที่สกัดจากส่วนต่าง ๆ ของยางพารา ได้แก่ ใบยางในระยะอ่อนแก่ต่างกัน เมล็ดอ่อน และเซลล์แขวนลอยต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส พบว่าสารสกัดจากใบให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดจากเซลล์แขวนลอย แต่สารสกัดจากเมล็ดไม่พบผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส โดยสารสกัดมีความจำเพาะในการเลือกจับกับเอนไซม์ซับติลิซินเอ (subtilisin A) แต่ไม่จับกับเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) เมื่อใช้เอโซเคซีน (azocasein) เป็นสับสเตรท นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลการเขย่าเซลล์แขวนลอยยางพาราใน MES บัฟเฟอร์ พบว่าส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ PIs ในเซลล์แขวนลอยเพียงเล็กน้อยจึงใช้ MES เป็นบัฟเฟอร์สำหรับทดสอบการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต ซึ่งการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของโปรตีนต่างๆ รวมทั้ง PIs เนื่องจากให้ผลการยับยั้งซับติลิซินเอได้ดีที่สุด นั่นคือส่งผลให้กิจกรรมของ PIs เพิ่มขึ้น และเป็นความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟตที่ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบ PIs จากสารสกัดเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ส่งออกมานอกเซลล์ (MES บัฟเฟอร์) หลังการกระตุ้น พบว่าแอกติวิตีของ PIs จากส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ให้เปอร์เซ็นต์

การยับยั้งสูงกว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอย และมีโปรตีนรวมที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณต่ำ แสดงว่า PIs มีบทบาทในการผลิตเพื่อส่งออกมาภายนอกเซลล์มากกว่าที่จะเก็บสะสมภายในเซลล์ ดังนั้นตัวอย่างจากส่วนที่ปล่อยออกมาจากเซลล์จึงมีความเหมาะสมในการศึกษาการทำบริสุทธิ์ โดยหลังนำตัวอย่างจากส่วนที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ผ่านคอลัมน์ ion exchange (DEAE-sepharose CL-6B) และชะด้วย 0.06 M NaCl ใน 20 mM Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วนำไปผ่าน preparative gel electrophoresis แบบไม่แปลงสภาพตามด้วยแบบแปลงสภาพ จะให้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียวของ PIs ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 25.12 kDa และคิดเป็นปริมาณโปรตีน  $3.14 \times 10^{-3}$  mg/g เซลล์แขวนลอย จากการศึกษาคุณสมบัติของ PIs ที่เตรียมได้พบว่า สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 80 °C เสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นเบส (คงทนต่อ pH ในช่วง 2-10) ปริมาณโปรตีนที่ให้ผลยับยั้งสับติลซินเอได้ครึ่งหนึ่ง (IC<sub>50</sub>) คือ 167 ng หรือคิดเป็น 6.6 pmole และ PIs ปริมาณ 250 ng หรือ 100 nM สามารถยับยั้งการงอกของซุโอสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในยางพารา

**Thesis Title** Protease inhibitors (PIs) from *Hevea brasiliensis* Cell  
Suspension after Triggering by Copper Sulfate

**Author** Miss Orawan Bunyatang

**Major Program** Biochemistry

**Academic Year** 2008

### **Abstract**

Plant Protease inhibitors (PIs) are generally small proteins that have mainly been occurred in storage tissues such as tubers and seeds, and also in the aerial parts of plants. They are induced by plants in response to injury or attack by insects or pathogens. The most studied group of PIs in plants is the inhibitor of animal serine protease. Studying of PIs activity from different parts of rubber plant (*Hevea brasiliensis*), including leaf at different stages, seeds and cell suspension, showed that PIs activity was highest in the crude extract from leaves followed by that from the cell suspension whereas no PIs activity could be detected in the rubber seeds. The PIs in rubber leaf and cell suspension extract exhibited a strong inhibitory activity against subtilisin A whereas trypsin and chymotrysin were not inhibited by these PIs when azocasein was used as substrate. The enzyme activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and PIs level were not significantly enhanced during shaking in MES buffer. Therefore, this buffer was appropriate for studying the effect of copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ), an abiotic elicitor, on *Hevea* cell suspension. We found that the inhibitory effect on subtilisin A activity was very strong, without cell death, in *Hevea* cells treated with 20  $\mu\text{M}$  of  $\text{CuSO}_4$  for 48 h, hence,  $\text{CuSO}_4$  could induce *Hevea* defense responses including PIs production. Comparison of intracellular and extracellular PIs in MES buffer from cell suspension induced by  $\text{CuSO}_4$  showed that PIs from MES buffer exhibited higher activity but lower total protein level than the extract from cell suspension. This result suggesting that PIs could be produced and delivered out of tissue more than be stored

inside thus the sample from MES buffer was used for further purification. PIs was purified by anion exchange chromatography on a DEAE-Sepharose CL-6B and eluted with 0.06 M NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.0. The active fraction was submitted to native and SDS preparative gel electrophoresis, respectively. After Eelectrophoresis and staining with silver nitrate, a single band of PIs with molecular weight 25.12 kDa was revealed under Tricine-SDS-PAGE. The yield of purified protein was  $3.14 \times 10^{-3}$  mg/g cell suspension. These PIs were stable up to 80 °C and in a broad pH range (2-10). The half maximal (50%) inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of PIs on subtilisin A activity was determined and found that its  $IC_{50}$  was 167 ng or 6.6 pmole. In addition, the concentration of PIs 250 ng or 100 nM also inhibited the germination of zoospore of rubber tree pathogen, *Phytophthora palmivora*.

## กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีไม่ได้ หากขาดบุคคลที่สำคัญที่สุดคือ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเซาว์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้ เสียสละเวลาให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องแก่ศิษย์เสมอมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมี และรองศาสตราจารย์เกษม อัครศิริรัตนกุล กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความกรุณาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาเสนอแนะแก้ไขเพิ่มเติมทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ และขอแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยตลอดมา รวมถึง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนการศึกษาและเงินเพื่อวิทยานิพนธ์ในโครงการความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี

สุดท้ายผู้ทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณกำลังใจอันยิ่งใหญ่ของคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน ที่มีได้กล่าวนามซึ่งเป็นกำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมาจนสำเร็จ

อรวรรณ บุนยะแต่ง

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
รายการกราฟ	(12)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(15)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	46
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
วัสดุ	47
อุปกรณ์	49
วิธีการทดลอง	51
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	67
4. สรุปผลการทดลอง	101
เอกสารอ้างอิง	104
ภาคผนวก	115
ประวัติผู้เขียน	121



## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนต่อยีนของพืชและเชื้อรา	15
1.2 กลุ่มของ PIs ตามความสัมพันธ์จากการจับกันระหว่างโปรตีนกับตัวยับยั้ง	31
1.3 กลุ่มของ PIs ในพืชตามพื้นฐานลำดับกรดอะมิโน	32
2.1 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิต	47
2.2 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา	52
2.3 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย	53
2.4 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (Tricine-SDS-PAGE)	60
2.5 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)	61
2.6 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) สำหรับย้อมโปรตีนด้วยซิลเวอร์ไนเตรต	62
3.1 ปริมาณโปรตีนจากสารสกัดเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ส่งออกมาออกเซลล์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ	76
3.2 เปรียบเทียบลักษณะการงอกของซุโอสปอร์ของเชื้อ <i>P. palmivora</i> ระหว่างชุดทดสอบ และชุดควบคุม	96
3.3 แสดงการงอกของซุโอสปอร์ของเชื้อ <i>P. palmivora</i> เปรียบเทียบ ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุมที่เวลาต่างๆกัน	99

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ส่วนประกอบของยางพารา	5
1.2 ระยะต่างๆของเชื้อไฟทอปทอรา	8
1.3 วงจรชีวิตของเชื้อไฟทอปทอรา	9
1.4 ลักษณะของเชื้อ <i>Phytophthora palmivora</i>	10
1.5 โรคในยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา <i>Phytophthora palmivora</i> และ <i>Phytophthora botryosa</i>	12
1.6 การตอบสนองของพืชเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภายนอก	16
1.7 การเกิด hypersensitive cell death ในพืชเพื่อป้องกันตัวเองจากเชื้อก่อโรค	18
1.8 วิธีกำรสังเคราะห์สารประกอบไฟโตอเล็กซินในทานตะวัน	20
1.9 โครงสร้างของไฟโตอเล็กซินชนิดต่างๆ	21
1.10 โครงสร้างของลิกลิน	22
1.11 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ลิกลินโดยสังเขป	23
1.12 การตอบสนองของพืชโดยการสังเคราะห์ PR-proteins	24
1.13 กลุ่มต่างๆของ PR-proteins	25
1.14 การควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับการสร้าง	28
1.15 บริเวณควบคุมการเร่ง การเข้าจับของสับสเตรทต่อเอนไซม์	28
1.16 ฟังก์ชันการทำงานแบบต่างๆของ protease inhibition	29

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
1.17	การเหนี่ยวนำสัญญาณในระบบการป้องกันตนเองของพืชด้วยอิลิซิเตอร์	37
1.18	ลักษณะของคอปเปอร์ซัลเฟต	37
2.1	ผลอ่อนยางพาราอายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ ภายหลังจากผสมเกสร	51
2.2	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา	51
2.3	ขั้นตอนการย้ายเลี้ยง คือเลือกแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ	53
2.4	แผ่นภาพแสดงใบยางพาราช่วงอายุต่างๆ A, B, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , C และ D	56
2.6	<i>P. palmivora</i> ที่เจริญในอาหารสูตร Henninger	65
3.14	แถบโปรตีนที่ทดสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R	84
3.16	แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ ion-exchange และชะด้วยเกลือ 0.06 M	87
3.17	แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำริสซูร์์โดยวิธี Preparative gel electrophoresis แบบไม่แปลงสภาพ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท	88
3.19	แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำริสซูร์์โดยวิธี Preparative gel electrophoresis แบบแปลงสภาพ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพและ ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท	90
3.21	แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างแต่ละขั้นตอนการทำริสซูร์์ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท	92

## รายการกราฟ

กราฟที่	หน้า	
3.1	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัด Pls จากเซลล์แขวนลอยอย่างพาราพันธุ BPM-24 ต่อเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ	67
3.2	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัด Pls จากส่วนต่างๆของยางพาราพันธุ BPM-24	69
3.3	ปริมาณโปรตีนในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และปริมาณโปรตีนที่เซลล์แขวนลอยปลดปล่อยออกมา ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	71
3.4	ปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่เซลล์แขวนลอยปลดปล่อยออกมา ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	72
3.5	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ Pls จากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	73
3.6	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ Pls จากสารสกัดเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้นต่างๆ	75
3.7	ปริมาณความเข้มข้นสคอพอลิตินที่ส่งออกมานอกเซลล์แขวนลอย ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ	76
3.8	ปริมาณโปรตีนจากสารสกัดเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ	77
3.9	เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์แขวนลอยอย่างพารา ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ	77

## รายการกราฟ (ต่อ)

กราฟที่	หน้า	
3.10	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ PIs จากส่วนเนื้อของเซลล์แขวนลอยอย่างพารา ณ เวลาต่าง ๆ กัน ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม	79
3.11	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ PIs จากส่วนที่ถูกส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา ต่าง ๆ กัน ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม	79
3.12	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลิซินเอของ PIs ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากตัวอย่างในเซลล์แขวนลอย และจากส่วนที่ส่งออกนอกเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วย คอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น $20 \mu\text{M}$ ที่เวลา 48 ชม.	81
3.13	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลิซินเอเมื่อใช้สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา ที่กระตุ้นด้วย $20 \mu\text{M}$ คอปเปอร์ซัลเฟต แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม ซัลเฟต และอะซีโตน	83
3.15	ปริมาณโปรตีนและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลิซินเอของ PIs หลังผ่านคอลัมน์ ion-exchange จากตัวอย่างส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์	86
3.18	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลิซินเอจากตัวอย่างในแต่ละหลอดที่ผ่านการทำ บริสุทธิ์แบบ Preparative gel electrophoresis	89
3.20	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลิซินเอจากตัวอย่างที่ pool รวมกัน	91
3.22	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลิซินเอของ PIs ที่บริสุทธิ์แล้ว ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ $90^{\circ}\text{C}$	93
3.23	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลิซินเอของ PIs ที่บริสุทธิ์แล้ว ที่พีเอช 2-10	93
3.24	ปริมาณ PIs ต่อการยับยั้งสับติลิซินเอที่ให้ผลการยับยั้งเป็นครึ่งหนึ่ง ของการยับยั้งทั้งหมด	94

## รายการกราฟ (ต่อ)

กราฟที่	หน้า
3.25 เปอร์เซนต์การย่อยเอโซเคซินของสารสกัดโปรตีนจากฟิลเตรท เส้นใยเชื้อ <i>P. palmivora</i> และสับติลลินเอ	95

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

BSA	=	Bovine serum albumin
°C	=	Degree celsius
DEAE	=	Diethylaminoethyl
EDTA	=	Ethylenediaminetetra acetic acid
fresh wt	=	Fresh weight
g	=	Gram
kDa	=	Kilodalton
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
nmole/g	=	Nanomole per gram
μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
μm	=	Micron
μM	=	Micromolar
O.D.	=	Optical density
pH	=	-log hydrogen ion concentration
PAL	=	Phenylalanine ammonia lyase
PDA	=	Potato dextrose agar
PDB	=	Potato dextrose broth
POD	=	Peroxidase (o-dianisidine as substrate)
PPO	=	Polyphenoxidase
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sp/ml	=	Spore per milliliter
TEMED	=	N,N,N,N,-tetramethylenediamine
Tris-HCl	=	Tris(hydroxymethylaminomethane) hydrochloride
UV	=	Ultraviolet

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

$\beta$	=	Beta
%	=	Percent
w/v	=	Weight per volume
$\alpha$	=	Alpha
h	=	hour



# บทที่ 1

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชตระกูล Euphobiaceae เป็นไม้ยืนต้น มีถิ่นกำเนิดในป่าเขตร้อน ซึ่งมีฝนตกชุกแถบอเมริกาใต้ ยางพาราถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยประมาณปีพ.ศ. 2442 โดยพระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดี (คอซิมบี๊ ณ ระนอง) ปลูกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรังเป็นครั้งแรก ต่อมาได้นำไปปลูกเป็นสวนยางพารามากขึ้นและได้มีการขยายพื้นที่ปลูกออกไปในจังหวัดภาคใต้รวม 14 จังหวัด ตั้งแต่ชุมพรลงไปถึงจังหวัดที่ติดชายแดนประเทศมาเลเซีย ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางทั้งประเทศประมาณ 12 ล้านไร่ และมีความสนใจปลูกยางพารามากขึ้น อีกทั้งเมื่อราคาน้ำยางพาราเพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการขยายพื้นที่ไปยังบริเวณที่ไม่เคยปลูกยางพารามาก่อน ปัจจุบันประเทศไทยสามารถส่งออกยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลก จึงถือได้ว่ายางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ ส่งผลให้มีการศึกษาเพื่อพัฒนาและเร่งให้ต้นยางพารามีการเติบโตเร็ว การที่ยางพารามีความสำคัญต่อการพัฒนาประเทศและเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมหลายชนิด ดังนั้นเพื่อความก้าวหน้าในอุตสาหกรรมจึงได้มีการวิจัยด้านต่างๆ เช่น ด้านพันธุ์ยางพารา โรคและศัตรูยางพารา การดูแลรักษาสวนยางพารา การกำจัดวัชพืช การปลูกพืชคลุม การปลูกพืชแซมเพื่อเพิ่มพูนรายได้ให้แก่ชาวสวนยางพารา และมีการพัฒนายางพาราโดยเน้นการพัฒนาสวนยางพาราขนาดเล็ก เช่น การกรีดยางหน้าสูง การใช้ยาเร่งน้ำยาง การส่งเสริมการเพาะแปลงและขยายพันธุ์ยาง เพื่อให้ได้ผลผลิตในระยะยาว การปลูกยางพาราต้องพิจารณาพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ และเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ปลูกนั้นๆ เนื่องจากยางพาราเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนที่มีความชื้นในอากาศค่อนข้างสูงและมีฝนตก จากลักษณะและสภาพอากาศดังกล่าว จึงทำให้เกษตรกรประสบปัญหาจากเชื้อโรคต่างๆได้ เมื่อมีการกรีดยางน้ำยางมาใช้ประโยชน์หน้ายางจะถูกกรีดยางเป็นช่องทางให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่ระบบท่อลำเลียงภายในลำต้นทำให้เกิดโรค ส่งผลให้ผลผลิตลดลง หรืออาจทำให้ยางพาราตายได้

ไฟทอปทอรา (*Phytophthora*) มีบทบาทสำคัญทางด้านโรคพืชมากที่สุด นอกจากมีพืชอาศัยที่สำคัญทางเศรษฐกิจจำนวนมากแล้ว ยังเข้าทำลายพืชได้ทั้งส่วนราก ลำต้น กิ่ง ใบและผลของพืช โดยเชื้อดังกล่าวแพร่กระจายไปทั่วโลก และมีพืชอาศัยที่สามารถทำลายได้มากกว่า 138 ชนิด (Chee, 1968) ตัวอย่างเช่น โกโก้ กล้วยไม้ ทุเรียน ยางพารา พริกไทย มันสำปะหลัง มะเขือเทศและยาสูบ ในยางพาราอาการของโรค คือ ใบจะร่วงทั้งที่มีสีเขียวสด

หรือสีเหลือง โดยมีลักษณะเด่นที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน คือ มีรอยขีดดำตรงบริเวณ ก้านใบ และที่จุดกึ่งกลางของรอยขีดจะมีหยดน้ำยางสีขาวเกาะติดอยู่ เมื่อนำใบยางพาราที่ร่วง ขึ้นมาสลัดเบา ๆ ใบย่อยจะหลุดออกทันที ต้นยางพาราที่เกิดโรคใบร่วงนี้แล้ว จะไม่ผลิใบ ยางพาราออกมาใหม่ในปีนั้น ๆ (ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่แตกต่างจากต้นยางพาราที่เป็นโรคใบ ร่วงซึ่งเกิดจากสาเหตุอื่น) แต่จะผลิใบใหม่ตามปกติเมื่อถึงฤดูผลิใบของปีถัดไป ถ้าเป็นผล ยางพาราที่ถูกทำลายจะเน่าดำค้างติดอยู่บนต้นเป็นเวลานาน ไม่แตกและร่วงหล่นตามธรรมชาติ *Phytophthora* spp. ที่ทำให้เกิดโรคกับยางพารามีหลายชนิด ได้แก่ *P. palmivora* *P. botryosa* *P. heveae* *P. medii* และ *P. parasitica* ในประเทศไทยพบสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคใน ยางพารา 3 ชนิด คือ *P. palmivora*, *P. botryosa* และ *P. nicotianae* ชื่อ *Phytophthora palmivora* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วง (leaf fall) และเส้นดำ (black stripe) ในยางพาราซึ่ง โรคดังกล่าวนี้เป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรชาวสวนยางเป็นอย่างมาก เพราะเมื่อเกิดโรค แล้วผลเสียที่ตามมาคือใบร่วงก่อนเวลาอันสมควร หน้ายางเสียหายทำให้การกรีดยางทำได้ยาก หรือไม่สามารถกรีดยางได้

พืชโดยทั่วไปมีกลไกการป้องกันโรค โดยต่อต้านเชื้อโรคทำให้พืชได้รับความเสียหายจากโรคพืชน้อยลง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูง ซึ่งยางพาราเองก็มี กลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเช่นเดียวกับพืชทั่วไป คือ สามารถปรับตัวเพื่อต่อต้านการบุกรุก ของเชื้อโรคด้วยวิธีต่าง ๆ กันดังนี้ ทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตายเรียกว่า ไฮเปอร์เซนซิทีฟเซลล์เดธ (hypersensitive cell death) โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล (Friend *et al.*, 1973), สร้างสารปฏิชีวนะซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ เรียกว่า ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins), สร้างโปรตีนขึ้นมาทำลายเชื้อโรคเรียกว่าพาโทรเจนเน-ซิสรีเลทเต็ดโปรตีน (pathogenesis related-proteins, PR-proteins) ได้แก่ เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase), เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ( $\beta$ -1,3-glucanase), โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ (proteinase inhibitors, PIs) และเกิดกระบวนการลิกนิฟิเคชัน (lignification) เพื่อกักบริเวณ เชื้อโรคไม่ให้ลุกลามต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง (Guest and Brown, 1997)

PIs เป็น PR- proteins ชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ในพืชหลายตระกูล PIs ในพืชเป็น กลุ่มโปรตีนที่มีขนาดเล็ก พบมากในเนื้อเยื่อสะสม เช่น ส่วนของหัวใต้ดินและเมล็ด และยังพบ ในส่วนอื่นๆของพืชได้อีกด้วย พืชจะผลิต PIs เพิ่มมากขึ้นเมื่อเกิดบาดแผล ถูกโจมตีด้วยแมลง หรือด้วยเชื้อก่อโรคต่างๆ (De Leo *et al.*, 2002) PIs ในกลุ่มเซอรินโปรตีเอส (serine protease) เป็นกลุ่มของ PIs ที่มีการศึกษากันอย่างมากในพืช โดยเป็นกลุ่มที่ยับยั้งเซอรินโปรตี-เอสที่ผลิตมาจากสัตว์บางชนิด เซอรินโปรตีเอสดังกล่าวได้แก่ ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และซับติลิสิน (subtilisin) ซึ่งนอกจากเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการ ยับยั้งเชื้อรา (antifungal activity) แล้วยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งแอลฟา อะไมเลส

( $\alpha$ -amylase) ที่ผลิตโดยแมลงได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม PIs ในกลุ่มนี้ไม่ยับยั้งโปรตีเอสที่มาจากแบคทีเรียและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากแมลงหรือยับยั้งการโจมตีจากแมลง และยังยับยั้งเชื้อราได้อีกด้วย (Selitrennikoff, 2001) PIs ที่พบในธรรมชาติโดยทั่วไปจะผลิตขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตมาจากเชื้อก่อโรคต่างๆ (Ryan, 1990) นอกจากนี้ PIs ยังมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่างๆทางชีวเคมีสำหรับ PIs บางชนิดนอกจากจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสแล้ว ยังทำหน้าที่อย่างอื่นอีก เช่น เป็นปัจจัยอย่างหนึ่งต่อกระบวนการเติบโตของพืช (Lawrence and Koundal, 2002)

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ ) เป็นอไบโอติกอิลิซิเตอร์ (abiotic elicitor) ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่างๆในพืช โดยการเหนี่ยวนำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงแอกติวิตี (activity) ของเอนไซม์ต่างๆ (Savitha *et al.*, 2006) โดยจากการศึกษาผลของการกระตุ้นต้นทานตะวันด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น  $50 \mu\text{M}$  พบว่าส่งผลให้ระดับเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) และปริมาณโปรตีนลดลง ขณะที่เอนไซม์คะตะเลส (catalase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase, PAL) ซึ่งเป็น antioxidant enzyme มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับพืชโดยทั่วไปเมื่อย่างพาราถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตในความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์จะส่งผลต่อระบบกลไกต่างๆ ภายในเซลล์ ยังผลให้มีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะ และเอนไซม์ต่างๆออกมารวมทั้ง PIs เพื่อป้องกันตนเองจากการรบกวนด้วยโลหะหนัก (Jouilli and Ferjani, 2003)

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัย สนใจนำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา มาศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตต่อการผลิต PR-proteins ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเอง ได้แก่ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ โดยการบ่มเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตในความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม นำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์แขวนลอย มาทดสอบแอกติวิตีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ และทำโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ให้บริสุทธิ์ แล้วศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์รวมทั้งความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Phytophthora palmivora*

## การตรวจเอกสาร

### 1.1 ยางพารา

พืชในสกุลฮีเวีย (*Hevea*) หรือสกุลยางจัดอยู่ในพืชวงศ์ Euphorbiaceae พืชสกุลนี้มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปอเมริกาใต้และมีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาค่อนข้างแปรปรวนสามารถแพร่กระจายพันธุ์ได้ในระบบนิเวศวิทยาที่มีความหลากหลาย พืชในสกุลนี้มีประมาณ 9 ชนิดที่รู้จักกันดี คือ *Hevea benthamiana*, *Hevea brasiliensis*, *Hevea collina*, *Hevea quianensis*, *Hevea confuse*, *Hevea pauciflora*, *Hevea spruceana*, *Hevea microphylla* และ *Hevea nilida* บางพันธุ์มีคุณลักษณะพิเศษสามารถอาศัยในสภาพภูมิประเทศภายในเขตจำกัด บางพันธุ์อ่อนแอต่อสภาพแวดล้อม พืชสกุลฮีเวียจะมีน้ำยางในทุกส่วนของต้น ใบประกอบด้วย 3 ใบย่อย ขอบใบเรียบ มีก้านใบย่อยและปลายก้านใบย่อยจะมีต่อมน้ำหวานปรากฏให้เห็น ดอกเพศผู้และเพศเมียจะอยู่ในช่อดอกเดียวกัน ช่อดอกเป็นแบบ panicle cyme ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 5 แฉกแต่ไม่มีกลีบดอกให้เห็น เกสรตัวผู้มี 5-10 อัน ก้านเกสรตัวผู้จะรวมเป็นแท่ง ยอดเกสรตัวเมียมี 2 แฉก ผลมีเปลือกแข็งโดยธรรมชาติสามารถแตกแยกออกได้เอง (รูปที่ 1.1) ในทางพฤกษศาสตร์ได้จัดอนุกรมวิธานของต้นยางพารา ดังนี้

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Rosidae

Order : Euphorbiales

Family : Euphorbiaceae

Genus : *Hevea*

Species : *brasiliensis*

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

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมานาน (รูปที่ 1.1) ในขณะนี้ได้มีความสนใจปลูกยางพารามากขึ้นเมื่อราคาน้ำยางเพิ่มสูงขึ้นเป็นประวัติการณ์ โดยมีการขยายพื้นที่ไปบริเวณที่ไม่เคยปลูกยางพารามาก่อน มีการศึกษาเพื่อพัฒนาและเร่งให้ต้นยางพารามีการเติบโตเร็ว จากการศึกษาที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาประเทศ ทำรายได้ประมาณ 1 แสนล้านบาท และเกี่ยวพันกับความยั่งยืนของเกษตรกรชาวสวนยางมากกว่า 6 ล้านคน ในอนาคตการผลิต

ยางพาราจะมีการแข่งขันที่รุนแรงเพิ่มขึ้น คณะรัฐมนตรีได้อนุมัติให้มีโครงการปลูกยาง 1 ล้านไร่ ในปี 2547-2549 ทำให้เกษตรกรทั่วประเทศมีการขยายพื้นที่ปลูกยางกันอย่างมากมาย



รูปที่ 1.1 ส่วนประกอบของยางพารา (A) คือต้นยางพารา (B) คือดอกยางพารา และ (C) คือผลยางพารา

ทางภาคใต้ ภาคตะวันออกและบางส่วนของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเหมาะที่จะปลูกยางพารา เนื่องจากต้นยางพาราชอบดินร่วนที่มีการระบายน้ำได้ดี ความเป็นกรด (pH ในช่วง 4.0-5.5) ฝนตกสม่ำเสมอตลอดปีมีความชื้นสูงและพบว่าไม่ควรปลูกในที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,000 ฟุต เพราะต้นยางมีรากแก้วค่อนข้างตื้น ลึกลงดินไม่เกิน 1.5-2.0 เมตร มีรากแผ่ในผิวดินจึงมักล้มง่ายเมื่อโดนลมแรง ต้นยางพาราสามารถกรีดให้น้ำยางได้เมื่ออายุประมาณ 5-6 ปี ถ้ากรีดด้วยความระมัดระวังก็สามารถกรีดเอาน้ำยางได้นานกว่า 30 ปี ดังนั้นในการปลูกยางพาราจึงต้องพิจารณาพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ โดยในปี พ.ศ.2546 สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตรได้ให้คำแนะนำแก่เกษตรกรถึงปัจจัยที่ต้องพิจารณาในการใช้พันธุ์ยาง เพื่อให้เกษตรกรได้รับผลตอบแทนที่สูงจากผลผลิตที่สูงขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาประเทศต่อไป

ในคำแนะนำพันธุ์ยางปี 2546 สถาบันวิจัยยางกรมวิชาการเกษตรได้แนะนำพันธุ์ยางเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยาง กลุ่ม 2 พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ และกลุ่ม 3 พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้ โดยกลุ่มพันธุ์ยางชั้น 1 แนะนำเกษตรกรปลูกได้โดยไม่จำกัดเนื้อที่ปลูก และได้เพิ่มการแนะนำพันธุ์ยางใหม่ของไทยในกลุ่มพันธุ์ยางชั้น 2 ที่ยังต้องศึกษาการปรับตัวในสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยพันธุ์ยางแต่ละพันธุ์ มีลักษณะเด่นในเรื่องผลผลิต ความต้านทานโรค และข้อจำกัดที่แตกต่างกัน เพื่อให้เกษตรกรพิจารณาเลือกปลูกได้ตามความเหมาะสมของแหล่งปลูกยางและวัตถุประสงค์ต่อไป

### กลุ่ม 1 พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยาง

- พันธุ์ยางชั้น 1 : สถาบันวิจัยยาง 251, สถาบันวิจัยยาง 226, BPM-24 และ RRIM 600
- พันธุ์ยางชั้น 2 : สถาบันวิจัยยาง 209, สถาบันวิจัยยาง 214\*, สถาบันวิจัยยาง 218\*, สถาบันวิจัยยาง 225, สถาบันวิจัยยาง 250, สถาบันวิจัยยาง 319, สถาบันวิจัยยาง 405, สถาบันวิจัยยาง 406, สถาบันวิจัยยาง 410, สถาบันวิจัยยาง 411, สถาบันวิจัยยาง 416, Haiken 2, PR 302\*, PR 305, RRIC 100\* และ RRIC 101

### กลุ่ม 2 : พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้

- พันธุ์ยางชั้น 1 : PB 235, PB 255\*, PB 260\* และ RRIC 110
- พันธุ์ยางชั้น 2 : สถาบันวิจัยยาง 312, สถาบันวิจัยยาง 325, สถาบันวิจัยยาง 403, สถาบันวิจัยยาง 404, สถาบันวิจัยยาง 407, สถาบันวิจัยยาง 408, สถาบันวิจัยยาง 409, สถาบันวิจัยยาง 412, สถาบันวิจัยยาง 413 และ RRIC 121

### กลุ่ม 3 : พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้

- พันธุ์ยางชั้น 1 : ฉะเชิงเทรา 50, AVROS 2037 และ BPM 1
- พันธุ์ยางชั้น 2 : สถาบันวิจัยยาง 401, สถาบันวิจัยยาง 414, สถาบันวิจัยยาง 415, RRII 118 และ RRII 203

\* ไม่แนะนำให้ปลูกในพื้นที่ปลูกยางใหม่

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

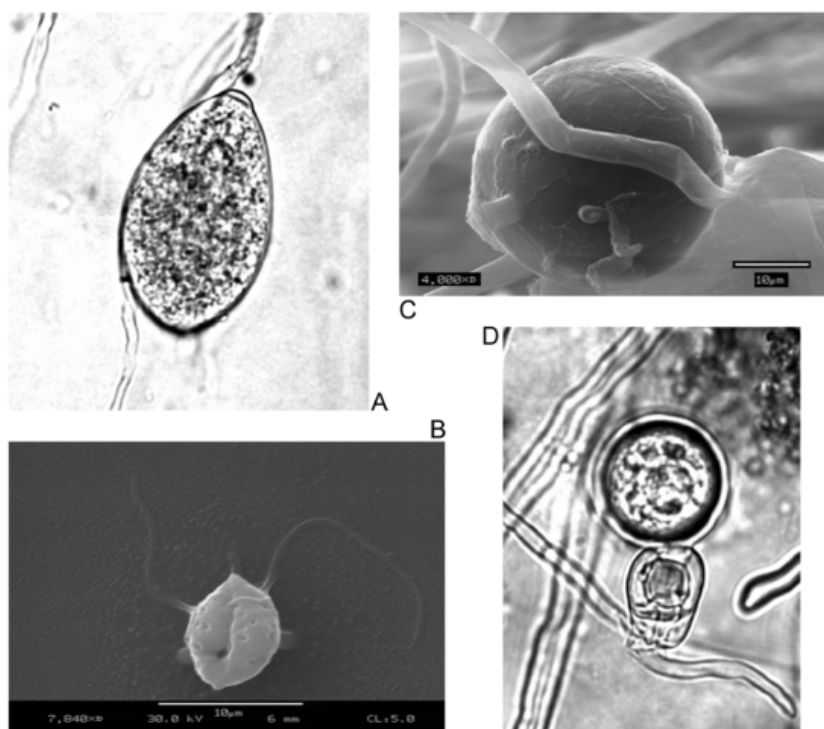
ยางพาราพันธุ์ BPM-24 มีลักษณะประจำพันธุ์คือ ใบมีสีเขียว รูปร่างป้อมกลาง ใบ ฉัตรใบมีลักษณะคล้ายรูปกรวย ลักษณะลำต้นตรง เมื่ออายุน้อยกิ่งมีขนาดปานกลาง แตกกิ่งมาก ช่วงอายุมากจะกิ่งกึ่งมาก พุ่มใบค่อนข้างทึบ ทรงพุ่มมีขนาดปานกลาง เริ่มผลัดใบเร็วและทยอยผลัดใบ เปลือกเดิมหนามาก เปลือกงอกใหม่หนาปานกลาง ค่อนข้างต้านทานโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปทอราและโรคเส้นดำ ต้านทานโรคราแป้ง โรคใบจุดหนูน และโรคราสีชมพู

ระดับปานกลาง มีจำนวนต้นที่เปลือกแห้งปานกลาง ด้านทานลมระดับปานกลาง ให้ผลผลิตเนื้อ  
 ยางสูงมากในระยะแรกของการเปิดกรีด และมีความต้านทานโรคค่อนข้างสูง

ในยางพารามีการศึกษากลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเป็นครั้งแรกโดย Tan และ Low พบว่าหลังจากใบยางติดเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* จะมีการสะสมสารเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสง UV (Tan and Low, 1975) ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มเติม โดยนำใบยางพารามาบ่มด้วยเชื้อรา *Microcyclus ulei* พบว่าสารเรืองแสงดังกล่าวคือ hydroxycoumarin และให้ชื่อว่า สคอพอลิติน (scopoletin) (Giesemann *et al.*, 1986) ซึ่งการสะสมสคอพอลิตินจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Garcia *et al.*, 1995) แต่ใบยางที่ติดเชื้อรา *Corynespora cassiicola* พบว่าความเข้มข้นของสคอพอลิตินในใบยางพันธุ์อ่อนแอมีปริมาณสูงกว่าในพันธุ์ต้านทาน (Breton *et al.*, 1997) ซึ่งตรงกันข้ามกับเชื้อก่อโรคในยางพาราตัวอื่นๆ เช่น เชื้อรา *P. palmivora* ที่เหนี่ยวนำให้ผลิตสคอพอลิตินในใบยางพารา 4 พันธุ์ แล้วสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ นั่นคือ พันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และ พันธุ์ PB235 (พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน) ผลิตสคอพอลิตินได้สูงกว่าพันธุ์ RRIT251 (พันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) (Chungchow and Rattarasarn, 2001) เช่นเดียวกับการใช้เอลิซิเตอร์ของเชื้อรานี้ (เอลิซิติน; elicitin) สามารถกระตุ้นทั้งข้อปล้องและแคลลัสจากเมล็ดอ่อน ให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในพันธุ์ค่อนข้างต้านทาน (GT1) มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ (พันธุ์วศรี แสงสุวรรณ 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการบ่มใบยางด้วยเชื้อรา *P. botryosa* ที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา พบว่า การสังเคราะห์สคอพอลิติน มีปริมาณและอัตราเร็วแปรผันตามความต้านทานโรคของใบยาง คือ พันธุ์ BPM-24 สูงกว่า พันธุ์ RRIM600 (นิลุบล บุญหวังช่วย 2002)

## 1.2 *Phytophthora* spp.

เชื้อไฟทอปทอราจัดอยู่ใน Class Oomycetes เป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกันกับ Zygomycetes ลักษณะทั่วไปคล้ายกับ Zygomycetes ยกเว้น asexual spores (zoospore) เป็นชนิดที่ว่ายน้ำได้ เชื้อไฟทอปทอราจะผลิตทั้ง sexual และ asexual spores โดยสปอร์แรงเจียม (sporangia), ซูโอสปอร์ (zoospores) และคลามิดิโอสปอร์ (chlamydospores) เป็น asexual ส่วนโอโอสปอร์ (oospores) เป็น sexual ซึ่งเกิดจากการผสมกันของโอโอโกเนียม (oogonium) และแอนเทอริเดียม (antheridium) ซึ่งมีขนาดต่างกัน (รูปที่ 1.2)



รูปที่ 1.2 ระยะต่างๆของเชื้อไฟทอปทอรา (A) sporangium (B) zoospore (C) chlamydospore (D) oospore (ที่มา <http://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora>)

ในปี ค.ศ.1876 Anton De Bary เป็นคนแรกที่ทำการศึกษาเชื้อไฟทอปทอรา แล้วพบว่าเชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ (late blight) ในมันฝรั่ง ต่อมาในปี ค.ศ.1995 Hawksworth และคณะได้จำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อไฟทอปทอรา ดังนี้

Domain : Eukaryota

Kingdom : Chromista

Phylum : Heterokontophyta

Class : Oomycetes

Order : Peronosporales

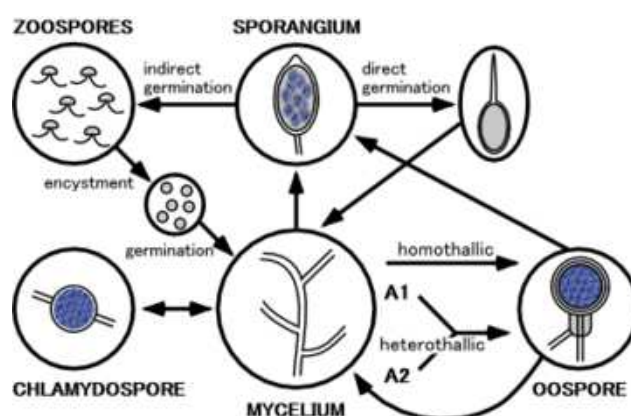
Family : Pythiaceae

Genus : *Phytophthora*

ไฟทอปทอราในภาษากรีกแปลว่าผู้ทำลายพืช จากการศึกษาและวิจัยพบว่า *Phytophthora* มีถึง 63 สปีชีส์ (Erwin and Ribeiro, 1996) มีทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำและในดิน เป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกันตามขวาง ผนังเซลล์ประกอบด้วย cellulose- $\beta$ -glucans จึงจัดอยู่ในอาณาจักรโครมิสตา (Chromista) เป็นพวกที่มีลักษณะรูปร่างและเจริญคล้ายรา (true fungi)



อยู่ในกลุ่มโอโอไมซีต (Oomycetes) โดยเส้นใยเดี่ยวๆ (hypha) จะแตกกิ่งก้านเป็นกลุ่มเส้นใย (mycelium) สีขาวจนเป็นโคลน (รูปที่ 1.3) มีการสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจีโอฟอร์ (sporangiophore) ภายหลังที่เจริญเป็นสปอร์แรงเจียมแล้วสปอร์แรงจีโอฟอร์จะเจริญให้สปอร์แรงจีโอฟอร์ใหม่จากปลายอันเดิม และดันสปอร์แรงเจียมไปด้านข้างของสปอร์แรงจีโอฟอร์ โดยส่วนที่เป็นสปอร์แรงจีโอฟอร์นั้นจะมีลักษณะพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียมมีรูปร่างคล้ายไขไก่ตรงบริเวณฐานมีความกว้างกว่าส่วนบน ตรงปลายมีปุ่มซึ่งเป็นส่วนที่เปิดปล่อยให้ซุโอสปอร์ออกสู่ภายนอกทางด้านที่มีลักษณะเป็นปุ่ม (papilla) สามารถให้กำเนิดซุโอสปอร์ที่อุณหภูมิระหว่าง 12-15 °C และงอกลักษณะเป็นท่อ (germ tube) เข้าทำลายพืชได้โดยตรงที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 °C สำหรับโครงสร้างของซุโอสปอร์ เกิดจากการแบ่งตัวของโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ภายในสปอร์แรงเจียม เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ซุโอสปอร์มี 2 หาง หางหนึ่งเป็นลักษณะ tinsel ซึ่งมีขนอ่อนเป็นจำนวนมาก ที่ทำหน้าที่โบกให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้า อีกหางหนึ่งเป็นแสหรือ whiplash ทำหน้าที่โบกถอยหลัง (Desjardin *et al.*, 1969) เมื่อซุโอสปอร์ถูกปล่อยออกจากสปอร์แรงเจียมและว่ายน้ำได้ระยะหนึ่งก็จะหยุดการเคลื่อนไหว ปลดหางแล้วเข้าเกราะ (encystment) ซึ่งเกิดขึ้นโดยการกระตุ้นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์และการสัมผัสเทือน หลังจากนั้นก็จะงอกเป็น germ tube พัฒนาเป็นเส้นใยและสร้างซุโอสปอร์ขึ้นได้อีก การงอกของซุโอสปอร์ สามารถกระตุ้นด้วยการเพิ่มออกซิเจนให้มากขึ้น



รูปที่ 1.3 วงจรชีวิตของเชื้อไฟทอปทอรา

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

ไฟทอปทอราสามารถอยู่ข้ามฤดูโดยอยู่ในรูปของโอโอสปอร์กับในรูปของเส้นใยที่อยู่ในพืชที่เป็นโรค เมื่อสภาพความชื้นเหมาะสมก็จะเกิดสปอร์แรงเจียมแล้วปล่อยซุโอสปอร์ที่เคลื่อนที่ในน้ำหรือกระเด็นไปกับฝนแล้วไปงอกเข้าทำลายพืช (รูปที่ 1.4) (ประสาทพร สมิตะมาน 2534) สภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงนั้น ขึ้นอยู่กับ

ปริมาณน้ำฝนและจำนวนวันฝนตกเป็นปัจจัยสำคัญ โดยปกติโรคจะเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและรุนแรงในระยะเวลาที่มีฝนตกหนักติดต่อกันเป็นเวลาหลาย ๆ วัน ในบริเวณที่มีเชื้อไฟทอปทอรา ระบาดอยู่ ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในระหว่างเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายนของทุก ๆ ปี



รูปที่ 1.4 ลักษณะของเชื้อ *Phytophthora palmivora* (A) ลักษณะของซุโอสปอร์แรงเจียมก่อนปลดปล่อยซุโอสปอร์ (B) สปอร์แรงเจียมของเชื้อ *P. palmivora* ที่ปลดปล่อยซุโอสปอร์ออกมาทาง papilla (C) ซุโอสปอร์แรงเจียมของเชื้อ *P. palmivora* 2 ซุโอสปอร์ที่กำลังว่ายอยู่บริเวณด้านบน

(ที่มา: [www.botany.hawaii.edu/.../Bot201/Oomyceta/Phytophthora.jpg](http://www.botany.hawaii.edu/.../Bot201/Oomyceta/Phytophthora.jpg))

*Phytophthora* spp. เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรكبกกล้าพืชหลายชนิด เช่น ผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ พืชล้มลุกต่างๆ รวมทั้งไม้ยืนต้น ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าที่ราก ลำต้นและหัว เช่น *P. palmivora* ทำให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่าของทุเรียน *P. parasitica* ทำให้เกิดโรครากเน่าของส้มและยอดเน่าของสับปะรด *P. botryosa* ทำให้เกิดโรคใบร่วงของยางพารา *P. infestans* ทำให้เกิดโรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ *P. fragariae* ทำให้เกิดโรครากและโคนเน่าของสตรอเบอร์รี่

เชื้อไฟทอปทอราสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารามีอยู่หลายชนิด ได้แก่ *P. palmivora*, *P. botryosa*, *P. Heveae*, *P. medicaginis* และ *P. parasitica* ในประเทศไทยพบสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา 3 ชนิด คือ *P. palmivora*, *P. botryosa* และ *P. nicotianae* โดย *P. palmivora* มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก มีพืชอาศัยที่สามารถทำลายได้มากกว่า 138 ชนิด (Chee, 1968) เป็นเชื้อโรคที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ทั้งบนดิน ในน้ำและอากาศ ทำลายพืชได้ทั้งส่วนราก ลำต้น กิ่ง ใบและผลของโกโก้ กล้วยไม้ ทุเรียน ยางพารา พริกไทย มันสำปะหลัง มะเขือเทศและยาสูบ เป็นต้น โดยเชื้อชนิดนี้จะอาศัยอยู่ข้ามฤดูปลูกบนเศษซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรีย์วัตถุในดินหรือบนพืชอาศัยบางชนิด เชื้อไฟทอปทอราสามารถทำลายต้นยางพาราได้ทุกส่วนไม่ว่าจะเป็นใบอ่อน ใบโตเต็มที่ ใบแก่ ก้านใบ ผลอ่อน ผลที่โตเต็มที่ และหนักรีดของยาง โดยก่อให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆ ของ

ยางพารา เมื่อเชื้อราเข้าทำลายใบ จะก่อให้เกิดจุดสีเทาเข้ม ค่อนข้างกลม ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้น มีลักษณะไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ เมื่อแผลมาชนกันก่อให้เกิดรอยแผลสีดำขนาดใหญ่ ทำให้ใบเหี่ยวและร่วง จากนั้นอาการจะลุกลามไปยังก้านใบ เกิดรอยแผลเป็นทางดำที่ส่วนล่างของก้านใบและมีคราบน้ำยางบริเวณกลางแผล ทำให้ก้านใบร่วงหลุดจากต้น (รูปที่ 1.5 A, B) ถ้าอาการรุนแรงเชื้อจะเข้าทำลายยอดอ่อนทำให้ยอดเน่าเป็นสีน้ำตาลและเกิดอาการเน่าตายตามลงไป และเชื้อยังสามารถเข้าทำลายผลยางพาราได้ทั้งผลอ่อนและผลแก่ โดยก่อให้เกิดผลเน่าสีดำชุ่มน้ำ แล้วทำให้ผลหลุดร่วงจากลำต้น (รูปที่ 1.5 C) รวมทั้งก่อให้เกิดโรคเส้นดำซึ่งเป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกยางทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในท้องที่ที่เกิดโรคใบร่วงและผลเน่าระบาดเป็นประจำทุกปี ลักษณะอาการของโรคในระยะแรกจะสังเกตเห็นรอยชำเนื่อรอยกรีดโดยมีสีผิดปกติ ระยะต่อมาจะกลายเป็นรอยปุ่มสีดำหรือน้ำตาลดำ เป็นเส้นขยายขึ้นลงตามแนวขนานกับลำต้น เมื่อเจ็อนเปลือกออกจะเห็นรอยปุ่มสีดำเป็นลายเส้นดำบนเนื้อไม้ อาการขั้นรุนแรงเปลือกหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคปริเน่า มีน้ำยางไหล และเปลือกจะเน่าหลุดออกมา เปลือกที่งอกใหม่จะเสียหายจนทำการกรีดยางชำบนหน้าที่เป็นเปลือกงอกใหม่ไม่ได้ (รูปที่ 1.5 D) ทำให้ต้นยางมีระยะเวลาที่ให้ผลผลิตสั้นลงเป็นเวลา 8-16 ปี จึงจัดได้ว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยางธรรมชาติและเป็นอันตรายแก่ต้นยางมากที่สุดโรคหนึ่งในประเทศไทย (รูปที่ 1.5)



รูปที่ 1.5 โรคในยางพาราที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryosa*

- A. สนวนยางที่เกิดโรคใบร่วงจากเชื้อในกลุ่ม *Phytophthora spp.*
- B. เชื้อ *Phytophthora spp.* ที่เกิดบริเวณก้านใบ
- C. ฝักยางที่ถูกเชื้อ *Phytophthora spp.* ทำลาย
- D. โรคเส้นดำ (black stripe)

(ที่มา : [www.rubberthai.com/information/sick-rubber](http://www.rubberthai.com/information/sick-rubber))

### 1.3 การเข้าสู่พืชของเชื้อรา

โดยส่วนใหญ่พืชจะติดเชื้อก็ต่อเมื่อเชื้อสามารถเข้าสู่พืชได้ หลังจากนั้นจึงเพิ่มปริมาณและทำความเสียหายให้แก่พืช วิธีการเข้าสู่พืชของเชื้อมีได้หลายรูปแบบคือ

1.3.1 การเข้าสู่พืชโดยตรง เชื้อราบางชนิดสามารถแทงผ่านผนังเซลล์ของพืชได้โดยตรงด้วยแรงกล เช่น สปอร์ของ *Oidium* หรือ *Pythium* เมื่องอกสามารถแทงเส้นใยผ่านผนังเซลล์เข้าทำลายพืชได้โดยตรง

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

1.3.3 การเข้าสู่พืชโดยผ่านทางบาดแผล บาดแผลที่เกิดกับพืชเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่เชื้อโรคสามารถเข้าทำลายได้ ซึ่งบาดแผลอาจเกิดจากหลายสาเหตุได้แก่

- สภาพธรรมชาติ เช่น การเกิดพายุหรือลมแรงทำให้พืชเกิดการเสียดสีกันจนเกิดบาดแผล การเกิดพายุลูกเห็บ หรือสภาพอากาศที่หนาวจัดทำให้เซลล์พืชแตก เป็นต้น
- สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น การกัดกินของสัตว์และแมลง การตัดแต่งกิ่งหรือการเก็บผลผลิตของมนุษย์ การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยทำให้รากพืชเกิดแผล เป็นต้น
- การเกิดรากแขนงทำให้เกิดการฉีกขาดบริเวณราก
- เชื้อโรคปล่อยสารเคมีบางชนิดเช่น toxin หรือ enzyme ออกมาย่อยผนังเซลล์ทำให้พืชเกิดบาดแผลก่อนเข้าทำลายพืช

เชื้อราแต่ละชนิดสามารถเข้าสู่พืชได้แตกต่างกัน บางชนิดอาจเข้าสู่พืชได้ทางบาดแผลหรือช่องเปิดธรรมชาติเท่านั้นไม่สามารถแทงเส้นใยเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรงได้ แต่เชื้อราบางชนิดอาจใช้ทั้ง 3 รูปแบบในการเข้าสู่พืช

#### 1.4 กลไกการทำลายพืชของเชื้อรา

เมื่อเชื้อราเข้าสู่พืชได้แล้วต่อมาเป็นกระบวนการที่เชื้อทำให้พืชแสดงอาการของโรค ซึ่งโดยส่วนมากจะเป็นการทำลายเนื้อเยื่อพืชให้ตายหรือเสียหาย กลไกการทำลายพืชของเชื้อราได้แก่

##### 1.4.1 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

##### 1.4.2 การผลิตสารพิษ

วิธีการหนึ่งที่เชื้อราทำความเสียหายให้แก่พืชคือการสร้างสารพิษที่มีผลต่อเนื้อเยื่อพืช สารพิษที่เชื้อราสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดได้แก่

ก) สารพิษที่เจาะจงต่อพืชอาศัย เชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดมีความจำเพาะต่อพืชอาศัยโดยสามารถทำลายพืชได้บางชนิดเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้นมีผลเฉพาะต่อเนื้อเยื่อพืชชนิดนั้นแต่ไม่มีผลต่อพืชชนิดอื่น สารพิษที่เจาะจงต่อพืชอาศัยเช่น Victorin หรือ HV toxin ผลิตโดยเชื้อ *Cochilobulus vitoriae* สาเหตุโรคใบไหม้ของต้นโอ๊ก AM-toxin ผลิตโดย *Alternaria mali* สาเหตุโรคใบจุดของ apple และ *Alternaria alternata* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ ผลิตสารพิษ AL-toxin เป็นต้น

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

### 1.4.3 การผลิตฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโต

เชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดมีการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชมีรูปร่าง สรีระ ที่ผิดปกติไปจากเดิม สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เชื้อราผลิตขึ้นเช่น

ก) auxins ผลิตจากเชื้อ *Plasmiodiophora brassicae* และ *Ustilago maydis* ซึ่งฮอร์โมนออกซินเป็นกลุ่มของสารที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ (cell enlargement)

ข) gibberellins ผลิตจากเชื้อ *Gibberella fujikoroii* โดยฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation)

ค) ethylene ผลิตจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเอทิลีนเป็นก๊าซชนิดหนึ่งและจัดเป็นฮอร์โมนพืชโดยมีผลควบคุมการแก่ชรา การสุก รวมทั้งการออกดอกของพืชบางชนิด และเกี่ยวข้องกับการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล การเหลืองของใบ การงอกของหัวพืช และเมล็ดพืชบางชนิด

### 1.5 ระบบป้องกันตัวเองของพืช (plant defense)

พืชมียีนที่กำหนดความต้านทาน (resistant) เป็นยีนเด่น (dominant) และยีนที่กำหนดความอ่อนแอ (susceptible) เป็นยีนด้อย (recessive) ในขณะที่เชื้อมียีนที่กำหนดความไม่รุนแรง (avirulent) เป็นยีนเด่น และยีนที่กำหนดความรุนแรง (virulent) เป็นยีนด้อย ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างพืชกับเชื้อในลักษณะที่ไม่ทำให้พืชเกิดโรค มีอยู่กรณีเดียวคือ พืช

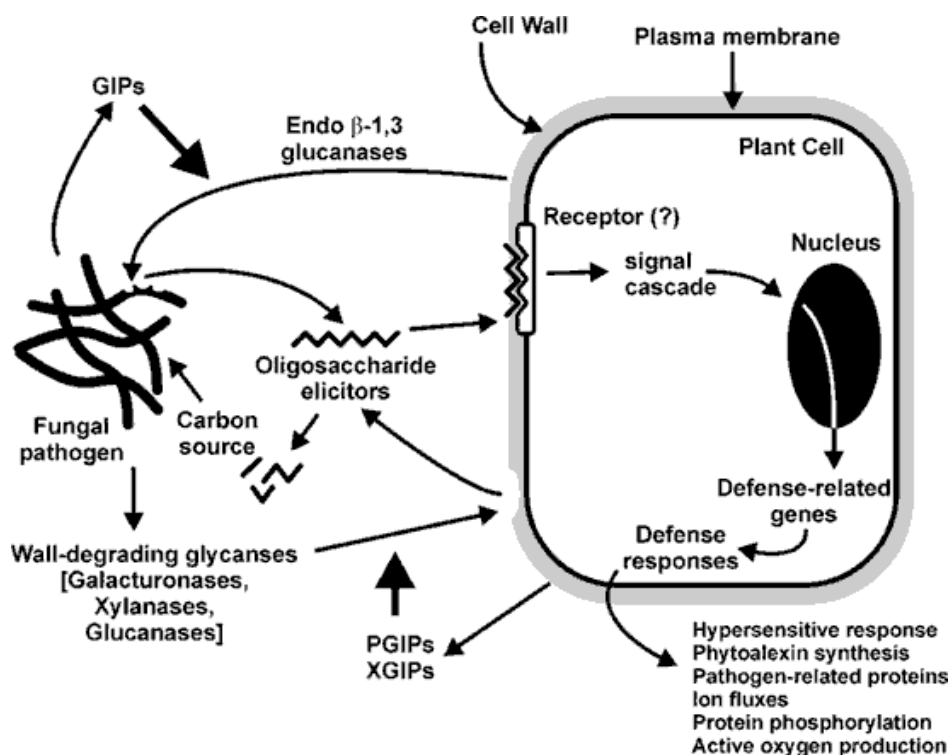
ต้องมียีนต้านทานและเชื้อมียีนที่กำหนดความไม่รุนแรงแสดงออก (ตารางที่ 1.1) ดังนั้นถึงแม้ว่าเชื้อจะมียีนที่แสดงความไม่รุนแรงแต่ถ้าพืชมียีนอ่อนแอ เชื้อนั้นก็ทำให้พืชแสดงอาการของโรคได้

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

ปฏิกิริยาของโปรตีน (protein reaction) บริเวณผิวของพืชและเชื้อจะมีโปรตีนซึ่งเกิดจากการแสดงออกของยีน โปรตีนเหล่านี้จะมีผลต่อความสัมพันธ์ในการติดเชื้อของพืช กล่าวคือ โปรตีนของผิวพืชจะมีบริเวณที่เป็น recognition site หรือบริเวณจดจำของเชื้อ ถ้าโปรตีนของพืชและเชื้อสามารถเข้ากันได้ พืชจะไม่แสดงปฏิกิริยาต่อต้านทำให้พืชนั้นเกิดการติดเชื้อ แต่ถ้าในกรณีที่โปรตีนของพืชและเชื้อไม่สามารถเข้ากันได้ พืชจะแสดงปฏิกิริยาต่อต้านในรูปแบบต่างๆ

พืชโดยทั่วไปมีกลไกการป้องกันโรค โดยต่อต้านเชื้อโรคทำให้พืชได้รับความเสียหายจากโรคน้อยลง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูง การป้องกันโรคของพืชอาจเกิดจากลักษณะโครงสร้างของพืชเอง ทำให้เกิดการกีดขวางและยับยั้งการเจริญลุกลามของเชื้อเข้าสู่พืช หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีในเซลล์และเนื้อเยื่อพืช โดยการสร้างสารที่เป็นพิษต่อเชื้อโรคหรือไปยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค พืชมีระบบป้องกันตัว 2 แบบ คือ 1. constitutive defense response (ระบบป้องกันที่มีอยู่แล้ว) ระบบนี้จะทำงานอยู่ตลอดเวลา ซึ่งจะมีความจำเพาะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของพืช (species-specific) และระบบจะมีการเก็บรวบรวมสาร ซึ่งอาจใช้เป็น precursor สำหรับตอบสนองได้ทันทีที่มีการโจมตีเกิดขึ้น การป้องกันเชิงกายภาพ คือ บริเวณชั้นคิวติเคิลและผนังเซลล์ จะมีสารจำพวก คิวติน แวกซ์ และ ซุเบอร์ิน เคลือบอยู่เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้ามารุกราน และ 2. induced defense response (ระบบป้องกันที่สร้างขึ้นหลังได้รับเชื้อ) เป็นระบบที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจพบการติดเชื้อซึ่งมีการตอบสนองได้หลายลักษณะดังรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 การตอบสนองของพืชเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภายนอก  
(ที่มา : <http://cell.ccrc.uga.edu/~mao/plapath/elicitor.gif>)

### 1.5.1 โครงสร้างป้องกันเชื้อโรค (structural defense before infection)

กลไกการป้องกันตนเองของพืชมีโครงสร้างต่างๆ หลายชั้น โดยชั้นแรกที่จะเข้าสู่พืช คือ ทางผิวของพืช เมื่อเชื้อเข้าไปแล้วจะเจริญเติบโตทำลายพืช โดยอาจจะทำลายที่ใดที่หนึ่งเฉพาะบริเวณที่มันเข้าไป (localized infection) หรือไปเจริญในท่อน้ำท่ออาหาร (vascular bundle) แล้วทำให้อาการของพืชไปแสดงที่อื่นด้วย (systemic infection) โดยโครงสร้างส่วนแรกของพืชที่เป็นเกราะป้องกันการเจาะผ่านของเชื้อ คือ ผิว ซึ่งประกอบด้วยไข (wax) ที่คลุมผิวพืช ขนของพืช ความหนาของ cuticle ซึ่งทั้งหมดนี้ช่วยในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค นอกจากนี้ความหนาและความเหนียวของเซลล์ผิวของพืช (epidermis) ก็เป็นปัจจัยในการทำให้พืชต้านทานโรค ช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ ซึ่งเป็นช่องที่พืชใช้คายน้ำ เชื้อโรคก็สามารถผ่านเข้าไปได้ พืชบางชนิดที่ต้านทานโรคก็เพราะมีปากใบแคบและมีขอบยกสูงหนา นอกจากนี้ระยะเวลาปิดเปิดของปากใบก็มีส่วนในการทำให้พืชต้านทานโรคได้ เช่น ข้าวสาลีพันธุ์ต้านทานบางพันธุ์ ปากใบจะเปิดสายมาก ทำให้สปอร์ที่อยู่ในหยดน้ำใกล้ปากใบซึ่งออกตั้งแต่เช้าถูกแดดเผาตายก่อนปากใบจะเปิด ทำให้เชื้อที่แขวนลอยอยู่ในน้ำไม่สามารถเข้าไปได้



### 1.5.2 โครงสร้างป้องกันโรคหลังเชื้อเข้าสู่พืช (structural defense after infection)

เชื้อโรคเมื่อเข้าสู่พืชแล้วโดยเจาะผ่านโครงสร้างป้องกันของพืชที่อยู่ผิว นอกหรือภายในพืชก็ตาม พืชจะแสดงปฏิกิริยาโต้ตอบทางโครงสร้างลักษณะต่างๆ ออกมาเป็นระดับคือ

1.5.2.1 เนื้อเยื่อประกอบด้วยเซลล์เจริญเป็นชั้น (cork layers) ชั้นที่เกิดขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อและสารพิษที่เชื้อขับถ่ายออกมาขยายวงกว้างออกไปอีกและยังรับการไหลเวียนของน้ำและอาหารจากเนื้อเยื่อปกติไปยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ทำให้เชื้อและเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วอยู่ในขอบเขตของแผลที่เห็นเป็นจุดหรือฟองพูนแยกส่วนออกมาจากเนื้อเยื่อปกติ

1.5.2.2 การเกิดการแตกปริของเนื้อเยื่อ (abscission region) ซึ่งเป็นช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เป็นชั้นทั้งสองข้างรอบบริเวณติดเชื้อของเนื้อเยื่อพืช (protective layers) เกิดกับใบอ่อนของไม้ผลบางชนิด โดย middle lamella ของเซลล์ที่อยู่ระหว่างชั้นทั้งสองนั้นถูกย่อยตลอดตามความหนาของใบทำให้เนื้อเยื่อส่วนดีถูกตัดขาดออกจากบริเวณตัวเชื้อหรือแผลของพืชที่เป็นโรค ป้องกันโรคไม่ให้เชื้อโรคและสารพิษที่เชื้อโรคสร้างขึ้นลุกลามไปยังเนื้อเยื่อปกติ

1.5.2.3 การเกิด tylosis ในท่อไซเลม การเกิด tylose เป็นการเจริญของโปรโตพลาสซึมของเซลล์พาราเนไคมา (parenchyma) ที่อยู่ติดกับท่อไซเลม มีขนาดใหญ่และมีจำนวนมาก จนทำให้ท่ออุดตัน โดยเกิดในระหว่างที่เชื้อโรคเข้าทำลายทางกลุ่มท่อลำเลียง พืชพันธุ์ต้านทานต่อโรคจะเกิด tylose ได้มากและรวดเร็วก่อนที่เชื้อจะลุกลามไปถึง โดยเชื้อยังเจริญอยู่แค่ส่วนราก หากเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค เชื้อจะเจริญไปถึงก่อนแล้วจึงเกิด tylose ภายหลัง ทำให้ไม่สามารถกีดกันการลุกลามของเชื้อได้

1.5.2.4 การสะสมยางเหนียว (gum) เนื้อเยื่อพืชสร้างยางเหนียวขึ้นรอบบริเวณแผลที่เกิดจากเชื้อโรคหรือจากสาเหตุอื่นๆ โดยยางจะถูกสะสมอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์หรือภายในเซลล์ โดยการสะสมของยางจะเกิดอย่างรวดเร็ว ทำให้เชื้อบางชนิดชะงักการเจริญเติบโต ไม่สามารถขยายขอบเขตออกไปได้อีก เชื้อจะถูกจำกัดอยู่เฉพาะในแผล ซึ่งอัตราการสะสมของยางมีแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดและพันธุ์พืช

### 1.5.3 การเกิด Hypersensitive cell death

Hypersensitive cell death เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองในการป้องกันโรคของพืชที่สำคัญ (รูปที่ 1.5) แสดงถึงความต้านทานโรคของพืช ในระหว่างบุกรุกของเชื้อโรคหรือถูกบุกรุกโดยสารพิษต่างๆ ที่บริเวณผิวเซลล์ เมื่อพืชติดเชื้อแล้วพืชซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานจะเกิด

รอยไหม้สีน้ำตาล ซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดจากการตายอย่างรวดเร็วหลังจากเชื้อเข้าทำลาย ทำให้เชื้อโรคไม่ได้รับสารอาหารจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เชื้อจึงชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด อาการรอยไหม้พบได้โดยทั่วไปตามบริเวณส่วนของพืชที่เป็นโรค ได้แก่ ใบ ต้น โคนต้น ราก หัว ผัก ผล เป็นต้น ขนาดของโรคขึ้นอยู่กับส่วนของพืช ชนิดของพืช เชื้อที่บุกรุก สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ



รูปที่ 1.7 การเกิด hypersensitive cell death ในพืชเพื่อป้องกันตัวเองจากเชื้อก่อโรค

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

Breton และคณะ (1997) ได้บ่มใบยางพาราด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* ซึ่งก่อให้เกิดโรคใบจุดก้างปลา (fish bone disease) พบว่าหลัง 24 ชั่วโมง เชื้อราทำให้เกิดรอยไหม้สีน้ำตาลบนใบยาง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างใบยางพันธุ์ต้านทาน (GT1) กับพันธุ์อ่อนแอ (PB260) โดยขนาดรอยไหม้บนใบยางพันธุ์ต้านทานมีลักษณะเป็นจุด แสดงถึงการเกิด hypersensitive cell death ซึ่งตรงกันข้ามกับขนาดรอยไหม้ในใบยางพันธุ์อ่อนแอ ที่พบแผลสีน้ำตาลขนาดใหญ่ และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ขนาดรอยไหม้ก็แผ่ขยายลุกลามออกไป จนเกิดเป็นรอยต่าง (discolor) บริเวณเส้นใบที่อยู่รอบบาดแผล ซึ่งแสดงถึงการเกิดโรคก้างปลา ใบยางพันธุ์ต้านทานสามารถกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียง ส่วนพันธุ์อ่อนแอพบขนาดรอยไหม้ใหญ่และแผ่กว้าง แสดงถึงการเกิดโรค คือ เกิดปฏิกิริยา compatible ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อนแอ ส่วนปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์ต้านทาน เรียกว่า ปฏิกิริยา incompatible แต่ถ้ามีการเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อโรค ปฏิกิริยานี้ก็สามารถเปลี่ยนเป็น compatible ได้เช่นกัน ดังนั้นลักษณะของรอยไหม้ที่เกิดจากการตอบสนองของใบยางต่อเชื้อก่อโรคสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ เช่น การทดลองของนารถิตา รอดโพธิ์ทอง (2546) ที่แสดงให้เห็นว่า ขนาดรอยไหม้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยซุสเปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* บนใบยางพาราทั้ง 17 พันธุ์ พบว่าขนาดรอยไหม้ ซึ่งเกิดขึ้นจากการเจาะใบยางด้วยเชื้อรา มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน สามารถคัดแยกได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ต้านทานที่เห็นขนาดรอยไหม้เล็ก บาดแผลมีขอบเขต

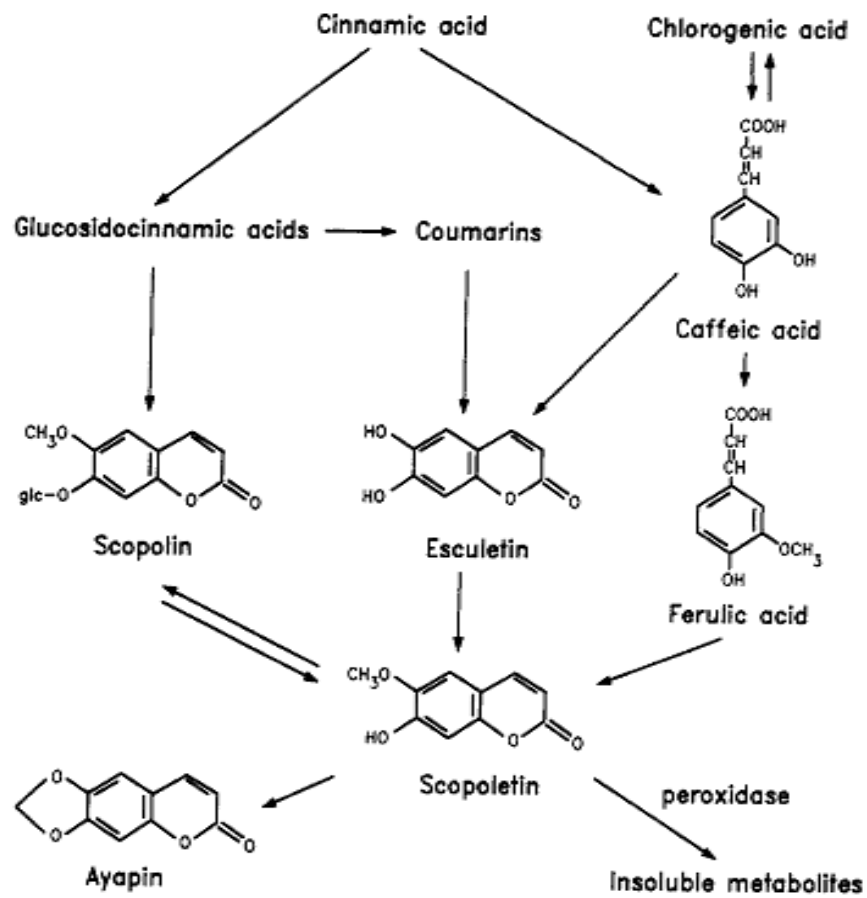
ชัดเจน แสดงว่าเซลล์ของใบยางพาราในกลุ่มนี้มีความสามารถในการกักบริเวณของเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ กลุ่มพันธุ์ต้านทานปานกลางมีขนาดรอยไหม้ใหญ่กว่าในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน แต่มีขนาดเล็กกว่าในกลุ่มพันธุ์อ่อนแอที่มีขนาดรอยไหม้แผ่กว้างออกไปอย่างรวดเร็ว แสดงถึงความล้มเหลวของใบในการกักเชื้อโรคไว้

#### 1.5.4 การป้องกันที่เกิดจากปฏิกิริยาของไซโตพลาสซึมของเซลล์ (cytoplasmic defense reaction)

ไซโตพลาสซึมไปปกคลุมกลุ่มของเส้นใย โดยนิวเคลียสของพืชจะเคลื่อนตามไปด้วย แล้วโปรโตพลาสซึมของเซลล์จะเริ่มหายไปในขณะที่เส้นใยของเชื้อเจริญเพิ่มขึ้น บางครั้งเซลล์พืชที่เชื้อเข้าทำลายจะสังเกตเห็นไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้น ไซโตพลาสซึมจะกลายเป็นเม็ดเด่นชัด เส้นใยของเชื้อสลายตัวเห็นเป็นส่วนๆ แล้วการเข้าทำลายก็หยุดลงในที่สุด (ไพโรจน์ จ้วงพานิช 2525)

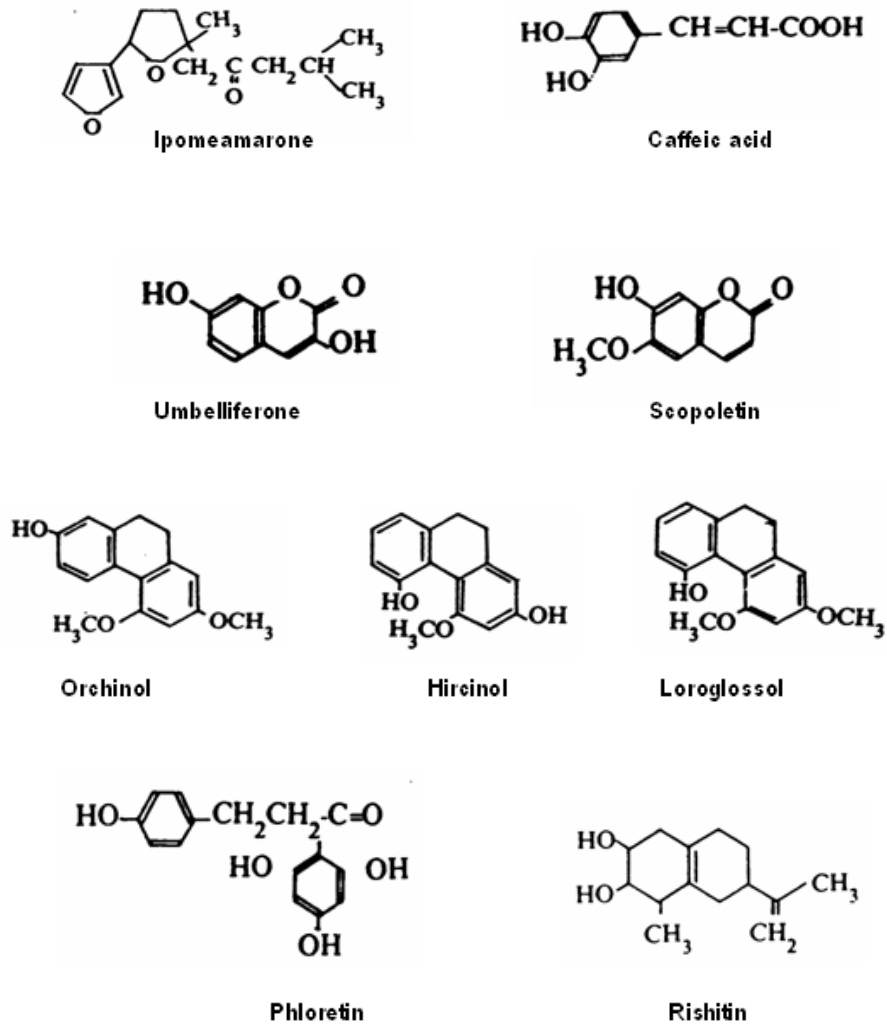
#### 1.5.5 การสร้างสารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin)

พืชบางชนิดมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์พืช เพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อ โดยการผลิตสารประเภทไฟโตอเล็กซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้นหลังจากเชื้อเข้าทำลายแล้ว และมีพืชต่อเชื้อโรค จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ มีมวลโมเลกุลต่ำ มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ พบในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้นจากอิทธิพลต่างๆ ทั้ง biotic และ abiotic ไฟโตอเล็กซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช แต่ไม่เจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง ปฏิกิริยานี้เกิดในเนื้อเยื่อที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อโรค และเนื้อเยื่อของเซลล์ข้างเคียง อัตราการเกิดไฟโตอเล็กซินขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และเกิดในเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น (ไพโรจน์ จ้วงพานิช 2525) วิธีการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (biosynthesis pathway) ในพืชทุกชนิดอาศัยวิถีของ shikimate, acetate-malonate และ acetate-mevalonate ซึ่งเป็นวิถีเมแทบอลิซึมแบบทุติยภูมิ บางชนิดต้องใช้วิถีในการสังเคราะห์ร่วมกันสองถึงสามวิถี (Kuc', 1995) แต่ในรูปแบบที่ 1.8 แสดงไฟโตอเล็กซินบางชนิดซึ่งสังเคราะห์โดยใช้เพียงวิถีเดียว คือวิถี acetate-malonate



รูปที่ 1.8 วิธีการสังเคราะห์สารประกอบไฟโตเอเล็กซินในทานตะวัน  
(ที่มา: Gutierrez *et al.*, 1994)

ไฟโตเอเล็กซินมีหลายชนิด (รูปที่ 1.9) บางชนิดอาจมีผลทำให้พืชเกิดปฏิกิริยา hypersensitive และบางชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช สารเหล่านี้โดยปกติจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยในเซลล์พืช แต่เมื่อเชื้อเข้าทำลายพืชจะมีการผลิตสารเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น



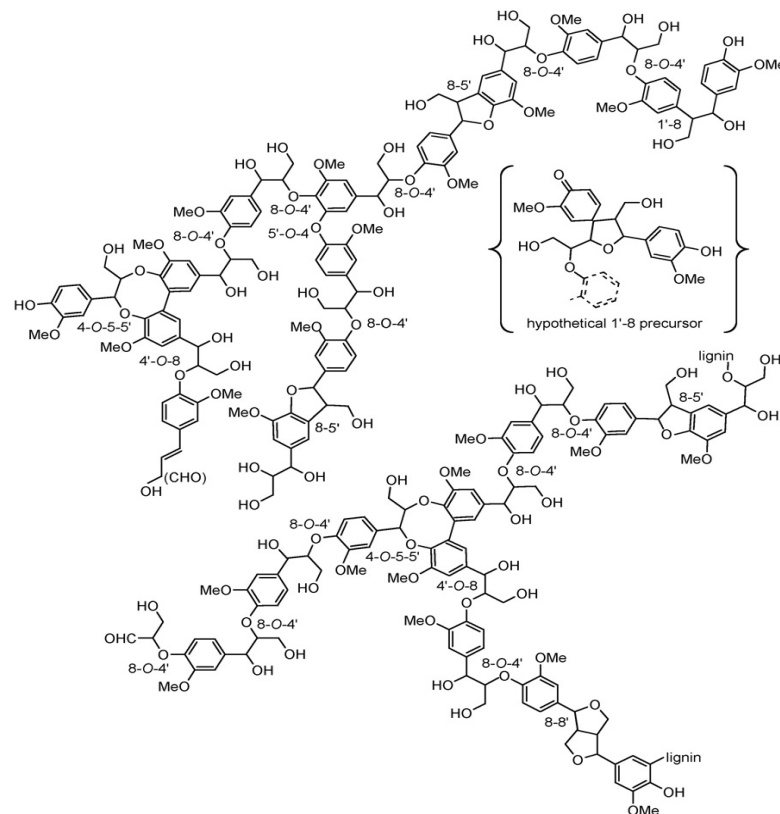
รูปที่ 1.9 โครงสร้างของไฟโตเลกซินชนิดต่างๆ

### 1.5.6 การสังเคราะห์ลิกนิน

ผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป มี 2 ชนิด คือ ผนังเซลล์ปฐมภูมิ เกิดขึ้นครั้งแรก ขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต เช่น พาราเนไคมา และคอลเลเนไคมาประกอบด้วยสารเคมีพวก เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพกติน และโปรตีน ชนิดที่สองคือผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary wall) เกิดขึ้นภายหลังผนังเซลล์ปฐมภูมิหลังจากที่เซลล์หยุดการเจริญแล้ว โดยจะพอกทับผนังเซลล์ปฐมภูมิให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น ประกอบด้วยสารเคมีพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (วันเพ็ญ ภูติจันทร์ 2540)

ลิกนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนฟีนอลิกเฮเทอโรโพลีเมอร์ที่เชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์กระจายอยู่ในโพลีแซคคาไรซ์ (รูปที่ 1.8) และเป็นองค์ประกอบของเพกตินที่ผนัง

เซลล์ของพืช ลิกนินเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงที่คอยค้ำจุนให้กับท่อลำเลียงน้ำของพืช รวมทั้งช่วยค้ำจุนเนื้อเยื่ออื่นๆ เป็นโครงสร้างที่ยึดหดได้ขณะลำเลียงน้ำไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ลิกนินเกิดจากกระบวนการออกซิเดทีบโพลีเมอไรซ์ชันของโมโนลิกนอล (cinnamyl alcohol) 3 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaryl, coniferyl และ sinapyl (แสดงในรูปที่ 1.10) เร่งปฏิกิริยาโดย xylem oxidase ทั้งที่เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และที่ไม่ใช่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ปล่อยสารออกมาคือ เฮทเทอร์โรโพลีเมอร์ (แสดงในรูปที่ 1.10) (Ros-Barcelo *et al.*, 2002) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *P. infestans* ได้ (Friend *et al.*, 1973) และในยางพารากักบริเวณไม่ให้เชื้อ *Microcyclus ulei* ลูกกลมไปยังเซลล์ข้างเคียงโดยลิกนินเป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งในการต้านเชื้อรา (Garcia *et al.*, 1995) นอกจากนี้ในธรรมชาติพืชก็มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อใช้ในการโพลีเมอไรซ์โมโนลิกนอลไปเป็นลิกนิน

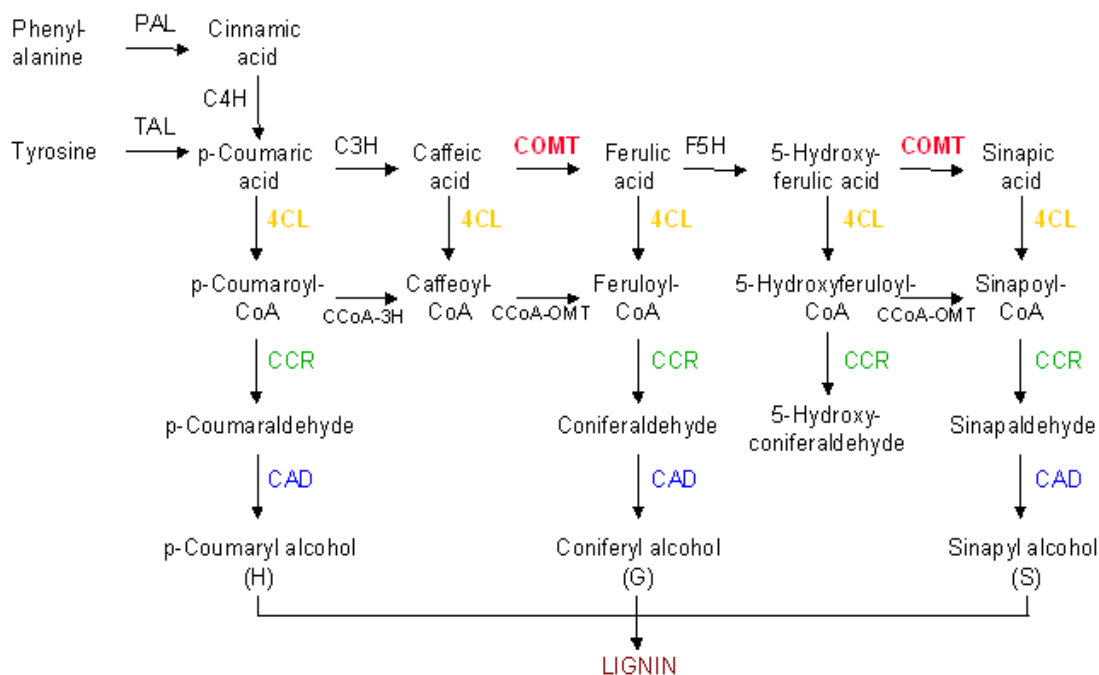


รูปที่ 1.10 โครงสร้างของลิกนิน

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

ลิกนินเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ เกิดจากการรวมตัวกันของสารประกอบเชิงซ้อนเริ่มต้นจากการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก คือ กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ถูกเปลี่ยนเป็น *trans*-cinnamic acid โดยเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia

lyase : PAL) หรือจากการดอะมิโนไทโรซีน ด้วยเอนไซม์ไทโรซีน แอมโมเนียไลเอส (tyrosine ammonia lyase : TAL) ต่อจากนั้นก็จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบแอลกอฮอล์ 3 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaryl alcohol coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol แล้วจึงเกิดกระบวนการโพลีเมอร์ไรซ์โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปเป็นลิกนิน ที่มีองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ ได้แก่ coumaryl guaiacyl และ syringyl ตามลำดับ (รูปที่ 1.11) (Ramos *et al.*, 2001)



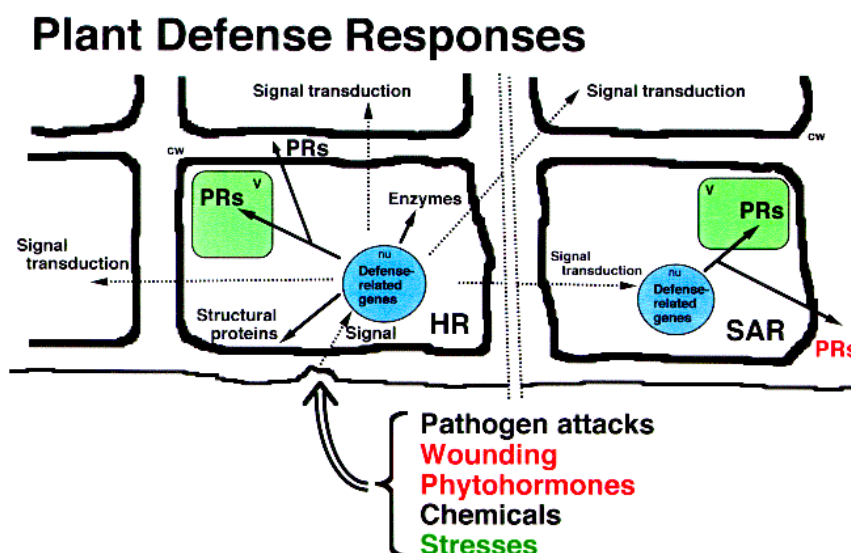
หมายเหตุ : PAL phenylalanine ammonia-lyase; TAL tyrosine ammonia-lyase; C4H cinnamate 4-hydroxylase; C3H 4-hydroxycinnamate 3-hydroxylase; COMT caffeic acid 3-O-methyltransferase; F5H ferulate 5-hydroxylase; 4CL 4-coumarate: CoA ligase; CCoA-3H coumaroyl-coenzyme A 3-hydroxylase; CCoA-OMT caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase; CCR cinnamoyl-CoA reductase; and CAD cinnamyl alcohol dehydrogenase

รูปที่ 1.11 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลิกนินโดยสังเขป (ที่มา : Ramos *et al.*, 2001)

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

PR-proteins เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายให้กับตนเองจากการรุกรานของเชื้อโรคหรือจากการกดดัน (stress condition) ด้วยสารเคมี (chemical treatments) และฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมถึงการถูกกดดันจากการเกิดบาดแผลและอิทธิฤทธิ์

ต่างๆ โดยทั่วไปในพืชชั้นสูงมีการสะสม PR- proteins เพื่อทำหน้าที่ต่อต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคหรือไวรัส (Kitajima and Sato, 1999) รูปที่ 1.12



รูปที่ 1.12 การตอบสนองของพืชโดยการสังเคราะห์ PR-proteins

(ที่มา : <http://dmd.nihs.go.jp/latex/defense-e.html>)

PR-proteins ที่พืชสร้างขึ้นส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ โดยการสร้างเอนไซม์สำหรับทำหน้าที่เป็น PR-proteins นั้นเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจงแต่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อหรือถูกกดดันเท่านั้นไม่ใช่มาจากการควบคุมปกติของยีน ส่วนใหญ่ป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์ปานกลางถึงต่ำและมักไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคใด (Legrand *et al.*, 1987) PR-proteins ได้แก่ ไคตินเนส (chitinase), เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ( $\beta$ -1,3-Glucanase), โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์ (Proteinase inhibitor, PIs) โดยกลุ่มของ PR-proteins สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังแสดงในรูป 1.13



Families	Type member	Properties	Gene symbol	Reference
PR-1	Tobacco PR-1a	antifungal	<i>Ypr1</i>	Antoniw et al., 1980
PR-2	Tobacco PR-2	b-1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [ <i>Gns2</i> (' <i>GlB</i> ')]	Antoniw et al., 1980
PR-3	Tobacco P, Q	chitinase type I,II, IV,V,VI,VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>	Van Loon, 1982
PR-4	Tobacco 'R'	chitinase type I,II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>	Van Loon, 1982
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like	<i>Ypr5</i>	Van Loon, 1982
PR-6	Tomato Inhibitor I	proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pir</i> ')	Green and Ryan, 1972
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	endoproteinase	<i>Ypr7</i>	Vera and Conejero, 1988
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>	Milneaux et al., 1988
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>	Lagrimini et al., 1987
PR-10	Parsley 'PR1'	'ribonuclease-like'	<i>Ypr10</i>	Somssich et al., 1986
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>	Melchers et al., 1994
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin	<i>Ypr12</i>	Terras et al., 1992
PR-13	Arabidopsis THI2.1	thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>	Epple et al., 1995
PR-14	Barley LTP4	lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>	Garc Olmedo et al., 1995
PR-15	Barley OxOa (germin)	oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>	Zhang et al., 1995
PR-16	Barley OxOLP	'oxalate oxidase-like'	<i>Ypr16</i>	Wei et al., 1998
PR-17	Tobacco PRp27	unknown	<i>Ypr17</i>	Okushima et al., 2000

รูปที่ 1.13 PR-proteins กลุ่มต่างๆ

(ที่มา : <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm>)

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส เป็น PR-proteins ที่มีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคในพืช สามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อราต่างๆ โดยการย่อยสลายผนังเซลล์ในส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนและไคตินตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีการติดเชื้อเช่น ใบยาสูบ, ข้าวบาร์เลย์และมันฝรั่ง เป็นต้น เอนไซม์ไคติเนส ซึ่งเตรียมได้จากข้าวบาร์เลย์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma reesei*, *Alternaria alternaria*, *Phycomyces blakesleesanus* และ *Neurospora crassa* (Robert and Selitrennikoff, 1986)

อาภรณ์ สันตะโร และคณะ (2537) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1, 3- กลูคาเนสจากยีส่พาราพันธุ์ RRIM 600 พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสตรวจพบในเกือบทุกส่วนของต้นยางไต้แก่ ใบ, เปลือก, ราก, ซี-ซีรัมและบี-ซีรัม แต่มีปริมาณไม่เท่ากันและพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีปริมาณสูงมากเนื่องจากภาวะกดดันจากการกรีดให้เกิดบาดแผลของเปลือกบริเวณลำต้นเพื่อเก็บผลผลิตน้ำยางสด หรือถูกกระทำด้วยสารเคมีแรงน้ำยางอิเทรล ซึ่งชาวสวนใช้ สำหรับเพิ่มผลผลิต โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และแบบจำเพาะ เจาะจงกับ Con A agarose ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่าทั้งสองไอโซไซม์เป็นโปรตีนสายเดี่ยวและ เป็นโปรตีนชนิด

เบสิก โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29.5 และ 33.1 kDa เมื่อศึกษาโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน และเท่ากับ 31.6 และ 34.7 kDa เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE

Mohammadi และ Karr (2002) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนสจากปมรากถั่ว พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.3 และที่อุณหภูมิ 37 °C และจากการตรวจสอบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสประกอบด้วยหน่วยย่อยอย่างต่ำ 7 หน่วยย่อย และจากผลของ Western immunoblot พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเกิด cross-reacting กับ virus-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) protein PR-1 (17 kDa), tobacco basic protein PR-2 (21 kDa), lima bean (*Phaseolus vulgaris* L.) acidic protein PL1 (18 kDa), pinto bean basic protein PR-4d (21 kDa) รวมทั้ง tobacco (36 kDa) และ cowpea (*Vigna unguiculata* L.) (36 kDa) PR-proteins ส่วนเอนไซม์ไคติเนสไม่ทนต่ออุณหภูมิและมีความไวต่อเมอร์คิวรี (mercury) แต่มีคุณสมบัติทนต่อการย่อยของเอนไซม์โปรตีเอส ผลจากการทดสอบด้วยวิธี Western immunoblot พบว่าเกิด cross-reacting กับ anti-vacuolar bean leaf chitinase

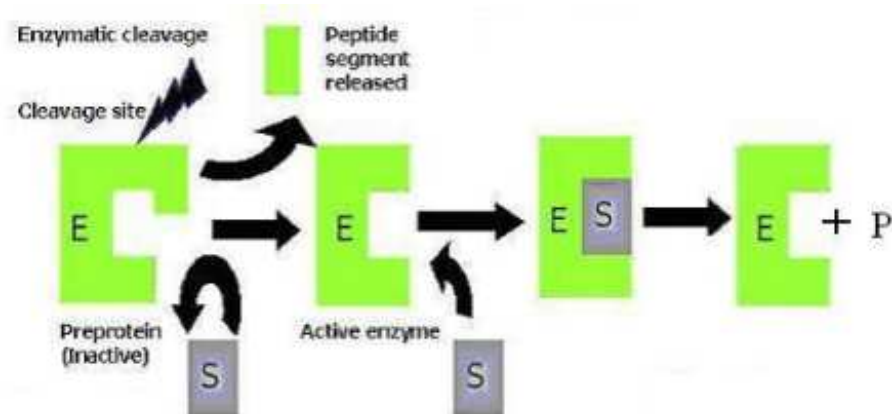
PR-proteins นอกจากถูกกระตุ้นให้พืชสร้างมากขึ้นเมื่อเชื้อโรคบุกรุกแล้ว PR-proteins ยังถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในสภาวะกดดันบางอย่าง เช่น ต้นพืชเกิดบาดแผล หรือถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีบางชนิด ได้แก่ เอทิลีน (Mauch, 1992) , salicylic acid, polyacrylic acid และ mercuric chloride (Hen *et al.*, 1991) PR-proteins อีกชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยพืชชนิดหนึ่งๆ จะมีการสร้างเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาหลายไอโซไซม์เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ บางไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและการขยายตัวของเซลล์ เมแทบอลิซึมของออกซิน เมแทบอลิซึมของอัลคาลอยด์ Pomar และคณะ (1997) พบว่าอะซิติคและเบสิกเปอร์ออกซิเดส มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสีผิวของผลไม้ เนื้อเยื่อพืชจะเหนียวสำหรับการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้แก่ การได้รับเชื้อโรคต่างๆ เช่น เชื้อรา เชื้อไวรัส แบคทีเรีย การเกิดบาดแผล การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่รุนแรง ความเค็มและรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของไอโซเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืช

Proteinase inhibitor (PIs) เป็น PR- proteins หรือ polypeptide ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิดโดยกลุ่มของ PIs ที่มีการศึกษากันอย่างมากในพืช จะเป็นกลุ่มที่ยับยั้งเซอรีนโปรตีเอส (serine protease) ซึ่งเตรียมได้จากสัตว์ เช่น ทริปซิน (trypsin) หรือ ไคโมทริปซิน

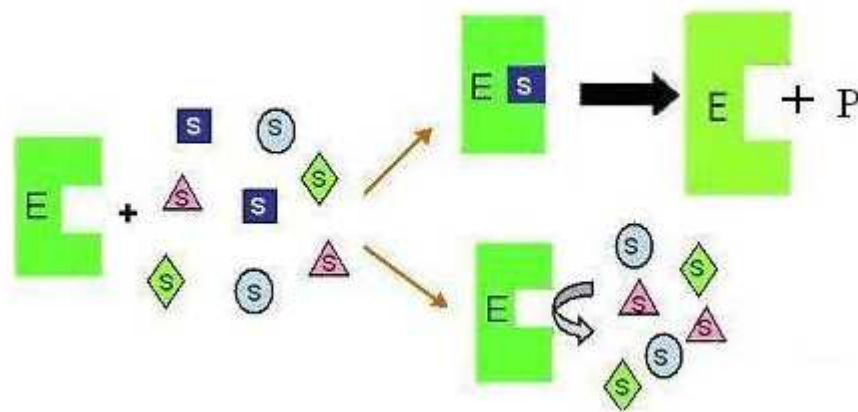
(chymotrypsin) พบว่า PIs มีคุณสมบัติในการทนความร้อนได้ดีในระดับหนึ่ง และมีบทบาทหลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เก็บสะสมโปรตีน ควบคุม mechanism ของ endogenous proteinases ป้องกันการบุกรุกโดยแมลง และยังทำหน้าที่เป็น anti-microbial pathogen อีกด้วย (Rickauer, *et al.*, 1989)

### 1.5.8 Protease inhibitor (PIs) ในพืชกับระบบป้องกันตนเองของพืช

Proteolytic enzyme หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเอนไซม์โปรตีเอส (protease enzyme) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะเปปไทด์ (hydrolytic cleavage) ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย เอนไซม์โปรตีเอสพบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ พบว่าในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงประมาณ 2 % จากรหัสยีนทั้งหมดที่ถูกแปลรหัสออกไปจะแปลรหัสมาเป็นเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งมีความสำคัญต่อการยังชีพและการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน และเอนไซม์โปรตีเอสยังมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีววิทยาอีกหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการ proteolytic ที่เกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์โปรตีเอสเป็นตัวกลางในการส่งสัญญาณเริ่มต้น (initiation) ขั้นตอนการส่งผ่านสัญญาณ (transmission) และขั้นหยุดปฏิกิริยา (termination) ในหลายๆเหตุการณ์เกี่ยวกับเซลล์ เช่น การอักเสบ (inflammation) การตายของเซลล์ (apoptosis) การแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การสังเคราะห์ฮอร์โมน (hormone processing pathways) อย่างไรก็ตามเอนไซม์นี้สามารถส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์และอวัยวะของสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน เมื่อเอนไซม์โปรตีเอสผลิตออกมามากเกินไป (overexpressed) หรือในสภาวะที่มีความเข้มข้นสูงมากๆ จึงเป็นเหตุผลที่เอนไซม์โปรตีเอสจำเป็นต้องถูกควบคุมระดับการผลิต เอนไซม์โปรตีเอสจะถูกสังเคราะห์ออกมาในรูป inactive pre-protein (รูปที่ 1.14) และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท (รูปที่ 1.15) โดยเป็นตัวควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ไม่มีผลต่อการควบคุมระดับการผลิตเอนไซม์

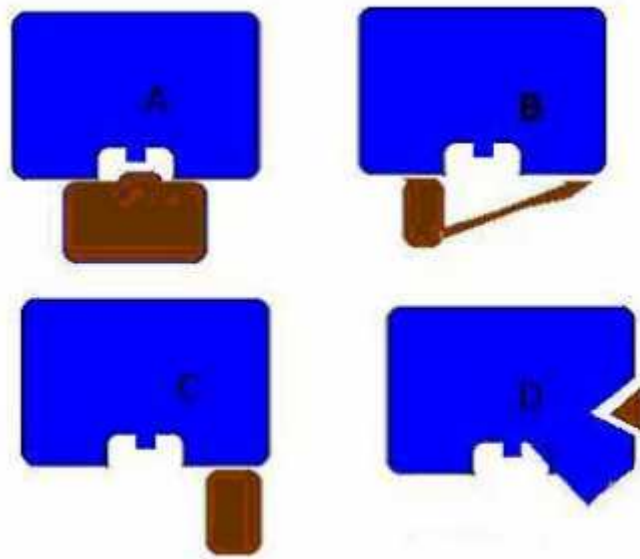


รูปที่ 1.14 การควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับการสร้าง โดยเอนไซม์อาจถูกสร้างอยู่ในรูป inactive pre-proteins แล้วจึงผ่านกระบวนการต่อไปเพื่อให้อยู่ในรูปที่พร้อมที่จะทำงาน เมื่อ E : enzyme, S : substrate และ P : products.



รูปที่ 1.15 บริเวณควบคุมการเร่ง การเข้าจับของสับสเตรตต่อเอนไซม์

กลไกการควบคุมที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่าง เอนไซม์โปรตีเอสกับโปรตีนที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (รูปที่ 1.16) ซึ่งตัวยับยั้งเหล่านี้จะเข้าไปจับกับเอนไซม์แล้วทำให้มีกิจกรรมทางเอนไซม์น้อยลง หรือทำให้ไม่เกิดกิจกรรมทางเอนไซม์เลย ตัวยับยั้งเหล่านี้เรียกว่า Protease inhibitor



รูปที่ 1.16 ฟังก์ชันการทำงานแบบต่างๆของ protease inhibition (A) การยับยั้งโดยตรง ณ บริเวณ active site (B) การยับยั้งแบบทางอ้อม (C) การเข้าจับแบบ Adjacent (D) เป็น allosteric interaction.

จากการสกัด และศึกษาคุณสมบัติของ PIs ในอ็อกไกนิซึมต่างๆทั้ง พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้ว PIs จะผลิตขึ้นเพื่อตอบสนองต่อเอนไซม์โปรตีเอส อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมี ซึ่ง PIs บางชนิดมีฟังก์ชันการทำงานมากกว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส แต่เป็นปัจจัยในการควบคุมการเจริญเติบโต โยกย้ายการรับ-ส่งสัญญาณ PIs ในพืชเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดเล็ก พบมากในเนื้อเยื่อสะสม เช่น ส่วนของหัวใต้ดินและเมล็ด และยังพบในส่วนอื่นๆของพืชได้อีกด้วย PIs ในพืชถูกกระตุ้นเพื่อตอบสนองต่อการเกิดบาดแผลของพืช การโจมตีด้วยแมลง หรือจากเชื้อก่อโรคต่างๆ โดย PIs ที่พืชผลิตขึ้นจะมีลักษณะเป็น anti-metabolic protein ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการย่อยของแมลงซึ่งบทบาทของ PIs ในระบบการป้องกันของพืชที่สำคัญ คือต่อต้านการบุกรุกของแมลงและเชื้อก่อโรคต่างๆ (De Leo, *et al.*, 2002) กลุ่มของ PIs ที่มีการศึกษากันอย่างมากในพืช จะเป็นกลุ่มที่ยับยั้งเซอรินโปรตีเอสที่ได้จากสัตว์ ซึ่งได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน และซับติลิสิน (subtilisin) PIs ในกลุ่มนี้นอกจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา (antifungal activity) แล้วยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งแอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) ที่ผลิตโดยแมลงได้อีกด้วย (Selitrennikoff, C., 2001) PIs ที่พบในธรรมชาติโดยทั่วไปจะผลิตขึ้นเพื่อตอบโต้เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตมาจากเชื้อก่อโรคต่างๆ (Ryan, 1990)

PIs สามารถจำแนกได้ 3 ประเภท ตามลักษณะของบริเวณที่เข้าทำปฏิกิริยาบนโมเลกุลต่อการยับยั้งเอนไซม์

### 1) The single-headed inhibitor

PIs ชนิดนี้สามารถเกิดได้เพียง 1 ปฏิกริยา และยับยั้งเอนไซม์ได้ 1 ชนิด เท่านั้น ซึ่ง trypsin inhibitor ก็จัดว่าเป็นสมาชิกที่สำคัญในประเภทนี้ ตัวอย่างเช่น trypsin inhibitor จากเมล็ดถั่วเหลือง (soybean trypsin inhibitor or Kunitz inhibitor) ซึ่งมีกรดอะมิโนที่สำคัญในบริเวณเร่ง ได้แก่ Arg-63 และ Ile-64 โดยมีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของทริปซิน (Kunitz, 1947) PIs จากเมล็ดธัญพืช เช่นบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าวไรย์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของทริปซินจากวัว (bovine trypsin) ได้เพียงตัวเดียว โดยไม่สามารถยับยั้งโปรตีเอสอื่นๆที่นอกเหนือจากนี้ได้ (Maki *et al.*, 1980 ; Mitsunaga, 1979; swartz *et al.*, 1977; Tashiro & Maki, 1978) นอกจากนี้ยังพบ trypsin inhibitor จากแหล่งอื่นๆอีก ได้แก่ มะเขือม่วง (eggplant) มันฝรั่ง (sweet potato) เมล็ดหัวไชเท้าญี่ปุ่น (Japanese radish seeds) และ squash seeds ซึ่ง trypsin inhibitor จากแหล่งดังกล่าวล้วนเป็น single-headed inhibitor ทั้งสิ้น (Ibuki *et al.*, 1980; Nowak, 1981; Odani *et al.*, 1979; Sugiuru *et al.*, 1973)

### 2) The double-headed inhibitor

PIs ประเภท double-headed จะประกอบด้วย 2 domains โดยแต่ละ domain จะมีบริเวณเข้าทำปฏิกริยาเป็นของตัวเอง และแต่ละบริเวณสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ต่างชนิดกัน PIs ประเภทนี้พบว่ากระจายอยู่ทั่วไปในพืชตระกูลฝักทั้งหลาย เช่น lima bean, mung bean และ garden bean ซึ่ง PIs ประเภทนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Bowman-Birk inhibitors (Odani and Ikenaka, 1978) นั่นคือมีบริเวณหนึ่งที่สามารถยับยั้งทริปซิน และอีกบริเวณจะยับยั้งโคโมทริปซิน

### 3) The multiple reactive sites

Multiple reactive sites เป็น PIs ที่มีบริเวณเข้าทำปฏิกริยากับเอนไซม์ได้มากกว่า 2 แห่ง ซึ่งในแต่ละแห่งอาจยับยั้งเอนไซม์ชนิดเดียวกันได้ บริเวณที่เข้าทำปฏิกริยากับเอนไซม์อาจเป็นไปในลักษณะแข่งขันกัน หรือเป็นอิสระต่อกันก็ได้ กรณีที่เป็นแบบแข่งขันพบว่าบริเวณที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะเกิดได้เพียงปฏิกริยาเดียวเท่านั้น จะไม่เกิดทั้งสองบริเวณพร้อมกัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าทั้งสองบริเวณนั้นมีบางส่วนที่เหลื่อมกันอยู่ (overlapping) ทำให้เมื่อปฏิกริยาหนึ่งเกิด อีกปฏิกริยาจะไม่เกิดเพราะโมเลกุลเอนไซม์ที่เข้ามาภายหลังจะถูกบดบังอันเนื่องมาจากความเกะกะของเอนไซม์โมเลกุลแรกนั่นเอง (Laskowski, 1980)

จากการศึกษา PIs ในพืชพบว่าพืชประมาณ 351 ชนิดที่มี PIs และโดยส่วนใหญ่ PIs จะผลิตขึ้นเพื่อต่อต้านโปรตีเอสเอนไซม์ในสี่กลุ่มหลัก ได้แก่ serine, cysteine, metallocoxy และ aspartic proteases ซึ่ง PIs ในสามกลุ่มแรกจะพบได้เกือบทุกส่วนของพืช ขณะที่กลุ่มหลังสุดไม่ผลิตในเมล็ด การแบ่งกลุ่มของ PIs จะจัดแบ่งตามลักษณะการเข้าจับ, การยับยั้ง, การเปลี่ยนแปลงบริเวณ active site เช่นทำให้เกิดการผิดรูปของเอนไซม์โปรตีเอส ตารางที่ 1.2 เป็นการจัดเรียงตามความสัมพันธ์จากการจับกันระหว่างโปรตีนกับตัวยับยั้ง (De Leo *et al.*, 2002)

ตารางที่ 1.2 แสดงกลุ่มของ PIs ในพืชตามความสัมพันธ์จากการจับกันระหว่างโปรตีนกับตัวยับยั้ง

Plant protease inhibitor family	PLANT-PIs code	InterPro accession no.
Bowman-Birk serine proteinase inhibitors	BBI	IPR000877
Cereal trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitors	BRI	IPR001768
Cysteine proteinase inhibitors	CYS	IPR000010
Metallocoxy-peptidase inhibitors	MCI	Not available
Mustard trypsin inhibitors	MSI	Not available
Potato type I inhibitors	PI1	IPR000864
Potato type II proteinase inhibitors	PI2	IPR003465
Serpin	SPI	IPR000215
Soybean trypsin inhibitors (Kunitz)	KNI	IPR002160
Squash inhibitors	SQI	IPR000737

และการจัดแบ่งกลุ่มของ PIs จากพื้นฐานลำดับกรดอะมิโนของ PIs พบว่า PIs แบ่งออกเป็น 48 กลุ่ม ดังตารางที่ 1.3 (Rawlings *et al.*, 2004) สำหรับโปรตีน PIs ที่ประกอบด้วยหนึ่งหน่วยย่อย (single inhibitor unit) จัดอยู่ในกลุ่ม simple inhibitors และโปรตีน PIs ที่มีหน่วยย่อยหลายๆหน่วยประกอบกันจัดอยู่ในกลุ่ม complex inhibitors

ตารางที่ 1.3 แสดงกลุ่มของ Pis ในพืชตามพื้นฐานลำดับกรดอะมิโน

Common name	MEROPS Family/subfamily	Type example	Source	Target Protease	Referencces
Kunitz (plant)	I3A	soybean Kunitz trypsin inhibitor barley subtilisin inhibitor winged-bean chymotrypsin inhibitor Kunitz cysteine peptidase inhibitor 1	Glycine max <i>Hordeum vulgare</i> <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> <i>Solanum tuberosum</i>	Trypsin, Chymotrypsin Subtilisin, Alpha-amylase Alpha-chymotrypsin Cysteine proteases	Laskowski and Kato (1980) Vallee et al. (1998) Habu et al. (1992) Gruden et al. (1997)
Kunitz (plant)	I3B	proteinase inhibitor A inhibitor unit Kunitz subtilisin inhibitor  cathepsin D inhibitor trypsin inhibitor	<i>Sagittaria sagittifolia</i> <i>Canavalia lineata</i>  <i>Solanum tuberosum</i> <i>Acacia confusa</i>	Trypsin, Chymotrypsin, Kallikerin Subtilisin-type microbial serine proteases Cathepsin D, Trypsin Trypsin and alpha-chymotrypsin	Laskowski and Kato (1980) Terada et al. (1994)  Strukelj et al. (1992) Lin et al. (1991)
cereal	I6	ragi seed trypsin/alpha-amylase inhibitor barley trypsin/factor XIIa inhibitor wheat trypsin/alpha-amylase inhibitor maize trypsin/factor XIIa inhibitor	<i>Eleusine coracana</i>  <i>Hordeum vulgare</i>  <i>Triticum aestivum</i>  <i>Zea mays</i>	Alpha amylase  Alpha-amylase, Trypsin  Alpha-amylase, Trypsin  Mammalian trypsin, activated hageman factor	Hojima et al. (1980)  Lazaro et al. (1988)  Shewry et al. (1984)  Mahoney et al. (1984)
squash	I7	trypsin inhibitor MCTI-1 trypsin inhibitor MCTI-II macrocyclic squash trypsin inhibitor trypsin inhibitor CSTI-IV	<i>Momordica charantia</i> <i>Momordica charantia</i> <i>Momordica cochinchinensis</i> <i>Cucumis sativus</i>	Pancreatic elastase Trypsin Trypsin  Trypsin	Wieczorek et al. (1985) Huang et al. (1992) Hernandez et al. (2000)  Wieczorek et al. (1985)
Potato type I	I13	chymotrypsin inhibitor I glutamyl peptidase II inhibitor subtilisin-chymotrypsin inhibitor CI-1A wheat subtilisin/chymotrypsin inhibitor	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Momordica charantia</i>  <i>Hordeum vulgare</i>  <i>Triticum aestivum</i>	Chymotrypsin, Trypsin Glu S.griseus protease , Subtilisin  Subtilisin , Chymotrypsin  B.licheniformis subtilisin, Alpha-chymotrypsin	Richardson (1974) Ogata et al. (1991)  Greagg et al. (1994)  Poerio et al. (2003)



ตารางที่ 1.3 แสดงกลุ่มของ Pis ในพืชตามพื้นฐานลำดับกรดอะมิโน (ต่อ)

mustard	I18	mustard trypsin inhibitor mustard trypsin inhibitor-2  rape trypsin inhibitor	<i>Sinapis alba</i> <i>Brassica hirta</i>  <i>Brassica napus</i>	Beta-trypsin Bovine beta-trypsin, Alpha-chymotrypsin Trypsin, Chymotrypsin.	Menegatti et al. (1992) Ceci et al. (1995)  Ceciliani et al. (1994)
cystatin	I25B	onchocystatin ovocystatin oryzacystatin II	<i>Onchocerca volvulus</i> <i>Gallus gallus</i> <i>Oryza sativa</i>	Cysteine proteinase Thiol proteases Cysteine proteinases	Lustigman et al. (1992) Laber et al. (1989) Ohtsubo et al. (2005)
Kininogen	I25C	metalloprotease inhibitor sarcocystatin	<i>Bothrops jararaca</i> <i>Sarcophaga peregrina</i>	Atrolysin C, Jararhagin. Cysteine proteinase	Cornwall et al. (2003) Saito et al. (1989)
Bowman-Birk	I12	Bowman–Birk plant trypsin inhibitor unit 1 Bowman-Birk trypsin/chymotrypsin inhibitor sunflower cyclic trypsin inhibitor	<i>Glycine max</i>  <i>Arachis hypogaea</i>  <i>Helianthus annuus</i>	Trypsin, Chymotrypsin  Trypsin, Chymotrypsin  Trypsin, Cathepsin G, Elastase, Chymotrypsin and thrombin	Odani and Ikenaka (1976) Suzuki et al. (1987)  Mulvenna et al. (2005)
Potato type II	I20	proteinase inhibitor II potato peptidase inhibitor II inhibitor unit 1 tomato peptidase inhibitor II inhibitor unit 1 tomato peptidase inhibitor II inhibitor unit 2	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Solanum tuberosum</i>  <i>Solanum lycopersicum</i>  <i>Solanum lycopersicum</i>	Trypsin, Chymotrypsin. Trypsin, Chymotrypsin.  Trypsin, Chymotrypsin  Trypsin, Chymotrypsin	Greenblatt et al. (1989) Keil et al. (1986)  Graham et al. (1985)  Barrette-Ng et al. (2003)

### Serpin (serine PIs) family

ตัวยับยั้งในกลุ่ม serpin เป็นตัวยับยั้งกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ที่สุด พบได้ทั่วไปในไวรัส แบคทีเรียสัตว์ และพืชเกือบทุกชนิด PIs ในพืชกลุ่ม serpins จะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 39 - 43 kDa และเป็นตัวยับยั้งที่ทำให้เอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมายสูญเสียสภาพอย่างถาวรหรือเป็น 'suicide' inhibitors ซึ่งตัวยับยั้งจะเข้าไปจับบริเวณ reactive center loop แล้วทำให้โครงสร้างบริเวณนี้เปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถทำการย่อยได้อีกต่อไป (Huntington *et al.*, 2000)

### Bowman Birk inhibitors (BBIs) family

จากลำดับกรดอะมิโนของตัวยับยั้งกลุ่มนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนจัดอยู่ในกลุ่ม serine โดยชื่อ family นี้ตั้งขึ้นตาม Bowman และ Birk ผู้ซึ่งค้นพบและระบุสมบัติของตัวยับยั้งตัวแรกที่สกัดจากถั่วเหลือง (soybean, *Glycine max*) (Bowman 1946; Birk *et al.*, 1963) ตัวยับยั้งชนิดนี้พบได้ทั่วไปในเมล็ด และจากการเกิดบาดแผลของใบพืช (Eckelkamp, 1993) ตัวยับยั้งในพืชประเภทที่เมล็ดมีใบเลี้ยงคู่ (dicotyledonous plants) ประกอบด้วยสายเปปไทด์ชนิดสายเดี่ยวๆ (single polypeptide) มีขนาดโมเลกุล 8 kDa ส่วนตัวยับยั้งในพืชมีดอกที่มีใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plants) แบ่งออกเป็นสองชนิด ชนิดแรกเป็นโปรตีนที่มีสายเปปไทด์แบบสายเดี่ยวที่มีขนาดโมเลกุล 8 kDa และมี reactive site เพียงที่เดียว อีกชนิดเป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16 kDa และมีตำแหน่ง reactive site สองตำแหน่ง (Tashiro *et al.*, 1987, 1990; Prakash *et al.*, 1996) ตัวยับยั้งในกลุ่ม BBI มีการเชื่อมของพันธะไดซัลไฟด์ที่มีลักษณะเฉพาะ (unique disulfide-linked) และมี loop เก้าหน่วย เพื่อใช้เป็นตัวบอกลักษณะเฉพาะของตัวยับยั้งในกลุ่มนี้ (Bode and Huber, 1992) ซึ่ง loop ดังกล่าวเรียกว่า protease-binding loop (Lee and Lin, 1995).

### Kunitz family

ตัวยับยั้งชนิดนี้พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด ได้แก่ พืชที่มีฝัก (legumes), ธัญพืช (cereals) และพืชในกลุ่ม solanaceous (Ishikawa *et al.*, 1994; Laskowski and Kato, 1980) นอกจากนี้ PIs ในกลุ่ม Kunitz ที่พบในหัวมันฝรั่ง (potato tubers) ถูกผลิตขึ้นเมื่อพืชอยู่ในภาวะกดดัน (Park *et al.*, 2005; Ledoigt *et al.*, 2006; Plunkett *et al.*, 1982) ตัวยับยั้งในกลุ่มนี้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 18-22 kDa มีตำแหน่งเชื่อมของพันธะไดซัลไฟด์ 1 ตำแหน่งและมีตำแหน่ง reactive site 1 ตำแหน่ง ตัวยับยั้งในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ยับยั้งโปรตีเอสในกลุ่ม serine proteases ซึ่งยับยั้งได้ทั้งทริปซิน, โคโมทริปซิน และสับติลินซิน (Lainig and McManus,

2002; Park *et al.*, 2005) และยังสามารถยับยั้งโปรตีเอสชนิดอื่นๆได้อีกด้วย เช่น aspartic protease, cathepsin D และ cysteine proteinase โดยตัวยับยั้งชนิดนี้จะจับกับเอนไซม์โปรตีเอส เป้าหมายอย่างเหนียวแน่น และแตกออกจากกันได้ยาก (Ritonja *et al.*, 1990)

### **Squash inhibitors**

ตัวยับยั้งในกลุ่ม Squash-family inhibitors พบในพืชเพียงอย่างเดียว เป็นสายเปปไทด์สั้นๆ ซึ่งมีกรดอะมิโนประมาณ 28- 30 หน่วย น้ำหนักโมเลกุล 3.0 - 3.5 kDa (Heitz *et al.*, 2001; Le Nguyen *et al.*, 1990) ตัวยับยั้งกลุ่มนี้มีตำแหน่งเชื่อมของพันธะไดซัลไฟด์ 3 ตำแหน่งซึ่งมีวนตัวตามแบบลักษณะ novel knottin structure (Hara *et al.*, 1989)

### **Cysteine PIs (CYS), the cystatin superfamily**

ตัวยับยั้งในกลุ่ม cystatin superfamily เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยตัวยับยั้งจากหลายๆกลุ่ม รวมทั้งโปรตีนที่มีโครงสร้างและทำหน้าที่ยับยั้ง cysteine proteases ซึ่งอาจเรียกตัวยับยั้งในกลุ่มนี้ว่า cysteine PIs หรือ cystatins. cysteine PIs พบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Oliveira *et al.*, 2003).

### **Mustard (Sinapis) trypsin inhibitor (MSI)**

ตัวยับยั้งในกลุ่มนี้เป็นสายเปปไทด์สั้นๆขนาดเล็ก และมีขนาดโมเลกุลประมาณ 7 kDa (Lainig and McManus, 2002) ตัวยับยั้งในกลุ่มนี้จะผลิตขึ้นในขณะที่ยังกำลังเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นอ่อน และยังพบได้เมื่อพืชเกิดบาดแผล (Ceci *et al.*, 1995; De Leo *et al.*, 2001) โดย ตัวยับยั้งจะเข้าไปจับเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับทริปซิน ทำให้สูญเสียฟังก์ชันการทำงาน (Cecilian *et al.*, 1994).

### **Potato type I PIs (PI 1)**

ตัวยับยั้งในกลุ่มนี้พบทั่วไปในพืช ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาสามารถตรวจพบในพืชหลายๆสปีชีส์รวมทั้ง หัวมันฝรั่ง (Ryan and Balls, 1962), มะเขือเทศ (Margossian *et al.*, 1988, Wingate *et al.*, 1989), ท่อส่งอาหารฟักทอง (Murray and Christeller, 1995) และในใบมะเขือเทศที่ตอบสนองต่อการป้องกันตนเองของพืชเมื่อเกิดการแผล (Lee *et al.*, 1986) ตัวยับยั้งในกลุ่มนี้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 8 kDa และโดยทั่วไปมีเพียงโมโนเมอร์เดียว (monomeric)

### Potato type II PIs (PI 2)

จากการศึกษาตัวยับยั้งในกลุ่มนี้พบได้จากหัวมันฝรั่ง (Christeller and Liang, 2005) ในใบ ดอก ผล และท่อส่งอาหารของพืชตระกูล solanaceous (Iwasaki *et al.*, 1971; Pearce *et al.*, 1993) ตัวยับยั้งในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสต่างๆคือ ทริปซิน , ไคโมทริปซิน, อีลาสเตส (elastase), ออริซิน (oryzin), โพรเนสอี (pronase E) และสับติลินซิน (Antcheva *et al.*, 1996).

### Cereal trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitors

สมาชิกของตัวยับยั้งในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งทั้ง serine proteinase และ/หรือเป็น  $\alpha$ -amylase-inhibitor (Gourinath *et al.*, 2000) ตัวยับยั้ง trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitors ที่ได้จากรังพืช จะประกอบด้วยสายเปปไทด์เพียงสายเดียวซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์ 5 ตำแหน่ง และมีขนาดโมเลกุลประมาณ 13 kDa (Christeller and Liang, 2005)

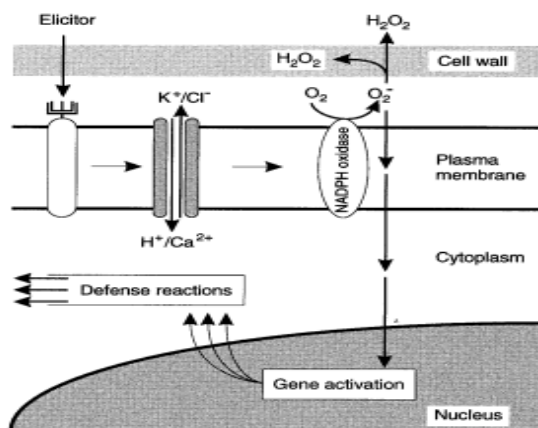
### 1.6 อีลิซิเตอร์ (elicitor)

อีลิซิเตอร์ (elicitor) คือ สารซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองในพืช ได้แก่ การสะสมไฟโตอิเล็กซิน การสังเคราะห์ PR-proteins และการตายของเซลล์หรือเนโครซิส เป็นต้น

อีลิซิเตอร์แบ่งเป็นสองชนิดคือ ไบโอดีทิกอีลิซิเตอร์ (biotic elicitor) และ อไบโอดีทิกอีลิซิเตอร์ (abiotic elicitor) สารที่มาจากเชื้อโรคหรือมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อก่อโรคจัดเป็นไบโอดีทิกอีลิซิเตอร์ ส่วนอไบโอดีทิกอีลิซิเตอร์ได้แก่ แสง รังสีอัลตราไวโอเล็ต และไอออนของโลหะหนัก เช่น คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ ) เมอคิวริกคลอไรด์ เป็นต้น ได้มีการสกัดไบโอดีทิกอีลิซิเตอร์จากเชื้อโรคต่างๆและจำแนกไบโอดีทิกอีลิซิเตอร์เหล่านั้นตามสูตรโครงสร้าง พบว่ามีทั้งที่เป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ไคโตแซน (chitosan) และกรดไขมัน (fatty acid) (Darvill and Albersheim, 1984)

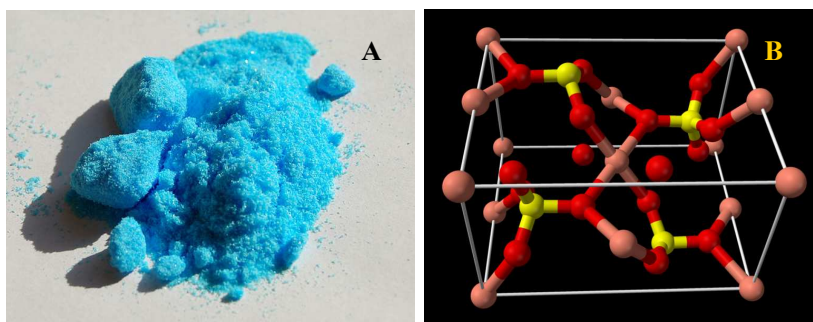
Jabs และคณะ (1997) ศึกษาผลของการกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชโดยใช้อีลิซิเตอร์พบว่าอีลิซิเตอร์เข้าไปจับตัวกลางรับส่งสัญญาณ (receptor-mediated) แล้วทำให้เกิดการไหลของไอออน (ion fluxes) ผ่านพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ส่งผลให้

เกิด reactive oxygen species (ROS) เหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค และสร้างไฟโตเล็กซินเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูป 1.14



รูปที่ 1.17 แสดงการเหนี่ยวนำสัญญาณในระบบการป้องกันตนเองของพืชด้วยอิลิซิเตอร์ (ที่มา : Jabs *et al.*,1997)

คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นไฮดรอกไซด์อิลิซิเตอร์ มีลักษณะเป็นผงของแข็งสีฟ้า มีชื่อทาง IUPAC เป็น Copper (II) sulfate pentahydrate และมีชื่อเรียกอื่นๆอีก เช่น copper(II)sulfate, cupric sulfate, blue vitriol, bluestone, chalcantite



รูปที่ 1.18 แสดงลักษณะของ A) ผงคอปเปอร์ซัลเฟต B) โครงสร้างคอปเปอร์ซัลเฟต

รากจากต้นกล้าทานตะวัน (sunflower seedling roots) อายุ 10 วันที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟต 50  $\mu$ M ภายใน 5 วัน จะสูญเสียน้ำหนัก ความยาวของรากสั้นลง ทำให้น้ำหนักลดลง หลังจาก 10 วัน พบว่าโปรตีนลดลง 53% เนื่องจาก Cu ทำให้เมแทบอลิซึมของโปรตีนผิดปกติโดยจะรบกวนการทำงานของสารกลุ่มไทออล ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress เกิดสารพวก active oxygen species และ  $H_2O_2$  พืชจึงตอบสนองด้วยการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม antioxidant ได้แก่เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase,

SOD) ค่ะตะเลส (catalase, CAT) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase, POD) รวมถึงฟีนิลอะลานีน แอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonialyase, PAL) เพื่อกำจัดสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ (Jouili and Ferjani, 2003)

Aziz และคณะ ศึกษาการเหนี่ยวนำระบบป้องกันตนเองในใบ grapevine เพื่อต่อต้านเชื้อ Gray mold และ Downy mildew เมื่อกระตุ้นด้วย chitosan oligomers คอปเปอร์ซัลเฟตพบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยไคโตซาน (chitosan, CHN) ความเข้มข้น 200 µg/ml (ขนาดโมเลกุล 1,500 Da และ DA 20% ,CHN1.5/20) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะส่งผลต่อระบบป้องกันตนเองของพืชโดยตรวจพบระดับการผลิตไฟโตอิเล็กซิน เอนไซม์ไคตินเนส และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น เมื่อกระตุ้นใบ grapevine ด้วย CHN 1.5/20 และคอปเปอร์ซัลเฟต ส่งผลให้ระดับการผลิตไฟโตอิเล็กซินเพิ่มขึ้นจากเดิมค่อนข้างสูง ขณะที่การกระตุ้นใบ grapevine ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่ำๆเพียงอย่างเดียวก็ส่งผลต่อการผลิตไฟโตอิเล็กซินที่เพิ่มขึ้น จากผลการศึกษายังพบว่าการกระตุ้นใบ grapevine ด้วย CHN1.5/20 ส่งผลให้ใบ grapevine เกิดการติดเชื้อ *Botrytis cinerea* และ *Plasmopara viticola* น้อยลง ขณะที่การกระตุ้นร่วมกันระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและ CHN1.5/20 สามารถป้องกันการติดเชื้อทั้งสองชนิดได้ (Aziz *et al.*, 2006)

## 1.7 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการแยกตามคุณลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของเอนไซม์ที่ต้องการแยก มีหลายวิธีดังนี้

1.7.1 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้านการละลาย เช่น การเปลี่ยนแปลงค่า pH (isoelectric precipitation), การเปลี่ยนแปลงค่าความแรงไอออน (change in ionic strength), การลดค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (decrease in dielectric constant)

1.7.2 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้านขนาดหรือมวล เช่น เจลฟิльтраชัน (gel filtration), อุลตราฟิльтраชัน (ultrafiltration), ไดอะไลซิส (dialysis)

1.7.3 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้านประจุ เช่น โครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography), ไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing)

1.7.4 การแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติด้านความจำเพาะ เช่น โครมาโตกราฟีจำเพาะ (affinity chromatography)

Sritanyarat และคณะ ศึกษาการสกัด แยก และทดสอบคุณสมบัติของ protease inhibitor ที่ได้จาก C-serum ของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบว่าสามารถสกัด แยก PIs ได้สามชนิดจาก C-serum ของน้ำยางพาราชื่อ HPI-1, HPI-2a และ HPI-2b ซึ่ง PIs ทั้งสามชนิดมีกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 69 หน่วย แต่ละชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล  $14,893 \pm 10,7757 \pm 5$  และ  $7565 \pm 5$  kDa ตามลำดับ. ลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความแตกต่างจาก cDNA ใน GenBank อยู่สองตำแหน่ง จากการหาลำดับของยีนพบว่า เป็น PIs ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยการทำให้เกิดบาดแผล ซึ่งเป็น protease inhibitors ในกลุ่ม potato inhibitor I family โดยผลของ PIs ต่อการยับยั้งโปรตีเอสพบว่าให้ผลการยับยั้งสัทธิขันธ์สูงสุด รองลงมาคือทริปซิน แต่ไม่ยับยั้งไคโมทริปซินตำแหน่ง reactive site ของ PIs ณ ตำแหน่งลำดับกรดอะมิโน 45 และ 46 คือ Gln และ Asp ตามลำดับ โดยพบว่า PIs จากน้ำยางมีบทบาทต่อการตอบสนองของพืชเพื่อต่อต้าน pathogens หรือ herbivores (Sritanyarat *et al.*, 2006)

Mallikarjuna Rao และคณะ (1983) ศึกษา protease inhibitor จากหัวของต้น arrowroot (*Maranta arundinaceae*) พบว่า PIs ที่แยกได้มีขนาดโมเลกุล 11,000-12,000 kDa และยับยั้งโปรตีเอส ทริปซิน, เอนเทอโรไคเนส, เอลฟาไคโมทริปซิน, และโปรตีเอสที่สกัดจากตับสัตว์และจากตับมนุษย์ จากการศึกษาคุณสมบัติรายงานว่า PIs สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 60 นาที และยังทน pH ได้เป็นช่วงกว้างนั่นคือทน pH ในช่วง pH 1.0-12.5 ได้นานถึง 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  โดยไม่สูญเสียแอกติวิตี

### 1.8 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ ที่สามารถนำชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่างๆ เนื้อเยื่อ เซลล์ หรือ โปรโตพลาสต์ มาเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ที่ปลอดเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงอาจอยู่ในรูปอาหารวุ้น หรืออาหารเหลว ซึ่งทำการเลี้ยงโดยการเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า อาหารที่ใช้เลี้ยงมีองค์ประกอบของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ธาตุเหล็ก วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงประกอบด้วยแสง อุณหภูมิ และความชื้นแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช หากเป็นพืชเมืองหนาวควรจะวางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าพืชเมืองร้อน โดยห้องที่วางเลี้ยงต้องควบคุมอุณหภูมิได้ มีความเข้มแสงในระดับที่พอเหมาะต่อการเจริญในระยะต่างๆ ตามที่พืชต้องการ การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถให้พืชต้นใหม่ได้จำนวนมากในระยะเวลานั้นๆ จึงได้นำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นมามากมาย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ตายอด ตาข้าง เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน

และสารควบคุมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังต้องทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และในสภาวะที่ควบคุมสิ่งแวดล้อมได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปในรูปแบบต่างๆ เช่น เกิดเป็นยอด เกิดเป็นราก เกิดเป็นเอ็มบริโอ หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า “แคลลัส” ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จำนวนมากได้

หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือต้องทำในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ กล่าวคือทุกขั้นตอนต้องปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยขั้นตอนในการทำงานจะเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ชิ้นส่วนพืช แล้วตัดเอาเฉพาะส่วนที่ต้องการนำมาวางเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองหรือขวดแก้วที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วเช่นกัน ขวดเพาะเลี้ยงนี้จะถูกนำมาวางเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ ให้เป็นไปตามที่ต้นพืชต้องการ ชิ้นส่วนของพืชจะได้รับแร่ธาตุและสารอาหารจากอาหารสังเคราะห์และเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชนี้สามารถควบคุมได้โดยการเลือกใช้สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เช่น ฮอร์โมนพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงว่าต้องการให้ชิ้นส่วนนั้นเจริญไปเป็นส่วนใด เช่น ถ้าต้องการให้เจริญไปเป็นส่วนลำต้นก็สามารถทำการชักนำโดยใช้ฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) หากต้องการให้เกิดรากอาจใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxin) หรืออาจจะใช้ฮอร์โมนหลายๆ ชนิดรวมกัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มมีการศึกษามานานแล้ว และใช้ขยายพันธุ์พืชชนิดต่างๆ มากมาย ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เป็นพืชยืนต้นที่มีรายงานประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Leconte and Carron, 1988 ; Chen, 1989 ; Carron *et al.*, 1989 ; Carron *et al.*, 1990) โดยทั่วไปเมื่อนำชิ้นส่วนพืชมาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนที่เลี้ยงโดย 2 กระบวนการ คือ กระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) และกระบวนการออแกนโนเจเนซิส (organogenesis) กระบวนการทั้งสองข้างต้นประกอบด้วย กระบวนการที่ชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยตรงเรียกว่า direct organogenesis/embryogenesis และกระบวนการเกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยผ่านการสร้างแคลลัสเรียกว่า indirect organogenesis /embryogenesis (สมปอง เตชะโต 2532) การชักนำพืชต้นใหม่โดยวิธีการหลังนี้ให้ต้นพืชที่มีความแปรปรวนสูงกว่าเนื่องจากการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์ผิดปกติในอัตราสูง ตัวอย่างพืชให้น้ำยางที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ โดยผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส คือ guayule (Finie *et al.*, 1989) ซึ่งเป็นพืชล้มลุกให้น้ำยางที่สำคัญในแถบอเมริกาใต้ น้ำยางที่ได้มีคุณภาพใกล้เคียงกับยางพารา จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดและส่วนลำต้นของ guayule



บนอาหารสังเคราะห์ในหลอดทดสอบพบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวจากแปลงปลูกมีปัญหาการปนเปื้อนมาก จึงได้เลือกชิ้นส่วนที่เตรียมในสภาพปลอดเชื้อโดยการเพาะเมล็ดในหลอดทดสอบทั้งนี้ เพราะสามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ง่าย โดยการจุ่มแช่เมล็ดในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% แล้วลนไฟก่อนนำมาวางเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐาน MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตเบนซิลอะดีนีน (benzyladenine, BA) ความเข้มข้น 1 mg/L จากวิธีการนี้พบว่าสามารถชักนำให้เมล็ดงอกในสภาพปลอดเชื้อได้ จากต้นที่ปลอดเชื้อนี้มีการพัฒนาจากเนื้อเยื่อให้เป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส เมื่อทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม สามารถชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoots) ได้ เนื่องจากการชักนำการเกิดพืชต้นใหม่ด้วยวิธีการดังกล่าวผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส จึงมีข้อเสียทำให้พืชต้นใหม่ที่ได้รับความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงดังได้กล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นในการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเพื่อชักนำพืชต้นใหม่โดยตรงไม่ผ่านกระบวนการสร้างแคลลัสทำให้ได้พืชที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ นับเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ดี การพัฒนาวิธีการดังกล่าวประกอบด้วย การเลือกชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม

### 1.8.1 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ อาหารเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยอาหารเพาะเลี้ยงนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงมีมากมายหลายสูตรให้เลือกใช้ เช่น สูตร Murashige and Skoog (MS) เป็นสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้กับพืชต่างๆ ไป สูตร Vacin and Went (VW) เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลต่างๆ สูตร Woody Plant Medium (WPM) เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชพวกไม้เนื้อแข็ง โดยทั่วไปสูตรอาหารเหล่านี้จะประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ธาตุอาหารรองที่พืชต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเช่น โบรอน (B) โมลิบดีนัม (Mo) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ไอโอดีน (I) และธาตุอาหารอื่นๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโนและน้ำตาล นอกจากนี้อาจมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรือที่เรียกว่าฮอร์โมนพืช หรือสารจากธรรมชาติอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กล้วยหอม สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งจะมีสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืชรวมอยู่ด้วย

### 1.8.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.8.2.1 การขยายพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นได้ยาก หรือขยายได้ช้า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่ม

จำนวนต้นได้จำนวนมากอย่างรวดเร็ว สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดปี ซึ่งต้นพันธุ์ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการและให้ผลผลิตคุณภาพดี พืชหลายชนิดที่มีปัญหาในการขยายพันธุ์แบบปกติแต่ปัจจุบันประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น กล้วยไม้ หน้าวัว และหน่อไม้ฝรั่ง

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

1.8.2.3 การผลิตสารสำคัญ พืชหลายชนิดสามารถผลิตสารสำคัญได้ ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้ เช่น สารตัวยารักษาโรค สีที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งการนำพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมได้จะสามารถชักนำให้เซลล์ของพืชผลิตสารในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

1.8.2.4 การอนุรักษ์พันธุกรรมและการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงไว้ในขวดและบังคับให้เติบโตอย่างช้าๆ ซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่และแรงงาน นอกจากนี้ยังสะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศเพราะอยู่ในขวดและปราศจากเชื้อโรค

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

### 1.8.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) แต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นกับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus

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

เนื้อเยื่ออื่นๆ ของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ก็คือ แคมเบียม คอร์เทคไล์ ท่อลำเลียงอาหาร และไซเลมพาราเรโนโคมา

### 1.8.3.1 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

ก) สารควบคุมการเจริญเติบโตโดยเฉพาะฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งการพัฒนาของพืชขึ้นอยู่กับสัดส่วนของฮอร์โมนสองกลุ่มนี้ คือ ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง พืชจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินต่ำจะพัฒนาเป็นต้น และหากอยู่ในสัดส่วนที่ปานกลางหรือสมดุล ก็จะพัฒนาไปเป็นแคลลัส จากการศึกษาในหลายๆ พืช พบว่าออกซินที่อยู่ในช่วง 0.01-10.0 mg/L และไคเนติน (ไซโตไคนินชนิดหนึ่ง) 0.1-10.0 mg/L เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัส

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

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

ง) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น แสง การเพาะเลี้ยงแคลลัสต้องการความเข้มแสงต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 °C นอกจากนี้ยังต้องการก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

### 1.8.3.2 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 และพันธุ์ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส เป็นต้น

ฉ) เพื่อผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด โดยการใช้สารเคมีโคลนินซิน ชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซม

ช) เพื่อเก็บรักษาพันธุ์พืช

#### 1.8.4 การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย หมายถึงการนำแคลลัสในรูปของ friable แคลลัสมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะสมแก่การนำมาเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ แคลลัส (friable callus) ซึ่งเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน นอกจากนี้อาจใช้ส่วนของใบก็ได้ แต่ต้องทำการย่อยเนื้อเยื่อเสียก่อน โดยใช้เอนไซม์เพคติเนส 0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้สารละลายโพแทสเซียมเดกเตรนซัลเฟต (potassium dextran sulfate) ความเข้มข้น 1 %

#### ประโยชน์ของการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

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

Wang และคณะ (2008) นำ oligochitosan มากระตุ้นเซลล์แขวนลอยของยาสูบ เพื่อศึกษาการป้องกันตัวเองของพืช ผลการทดลองพบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย oligochitosan ที่มีปริมาณสูงๆ ทำให้เซลล์แขวนลอยของยาสูบตาย oligochitosan ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยตายในชั่วโมงที่ 72 ถึง 40.6 % ของเซลล์แขวนลอย ลักษณะการตายของเซลล์แขวนลอยในพืชจะคล้ายกับการเกิด apoptosis ในเซลล์สัตว์ซึ่งนำไปสู่การหด

ตัวของไฮโดรพลาสซึมและเกิดการรวมตัวกันแน่นของโครมาติน oligochitosan กระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยสร้าง  $H_2O_2$  เป็นสัญญาณไปสู่การตายของเซลล์ เพื่อต้องการยับยั้งการตายของเซลล์แขวนลอยที่มีผลเนื่องมาจาก  $H_2O_2$  จึงทำการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยโดยใช้ตัวกระตุ้น 2 ชนิดร่วมกันคือ oligochitosan และตัวยับยั้งการสะสมของ  $H_2O_2$  พบว่าเซลล์แขวนลอยยังถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายเช่นเดิม จึงสันนิษฐานได้ว่าการตายของเซลล์แขวนลอยที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย oligochitosan ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งสัญญาณของ  $H_2O_2$

Simmons และ Ryan (1986) ศึกษาผลของการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยมะเขือเทศด้วยกรดยูโรนิก (uronic acid) ต่อการผลิต protease inhibitor I พบว่าเมื่อส่วนประกอบของอาหารมีกรดยูโรนิก (uronic acid-rich) เพิ่มขึ้นส่งผลให้เซลล์กระตุ้นการสร้าง protease inhibitor I เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเข้มข้น และเวลาที่เหมาะสมจากการใช้คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ ) เหนี่ยวนำการสร้าง PR-proteins ในเซลล์แขวนลอยของยาราก
2. ทดสอบหา PR-proteins ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต (เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ proteinase inhibitor)
3. ศึกษาแหล่งของ PIs จากส่วนต่างๆของยาราก ได้แก่ เมล็ดอ่อน, เซลล์แขวนลอย และใบที่ระดับอ่อนแก่แตกต่างกัน
4. ศึกษาความจำเพาะของ PIs จากสารสกัดยาราก ต่อการจับกับเอนไซม์โปรตีเอสต่างๆ ได้แก่ ทริปซิน, ไคโมทริปซิน และสับติลินเอ เมื่อใช้เอโซเคซีน (azocasein) เป็นสับสเตรท
5. สกัด และทำบริสุทธิ์ PIs จากสารสกัดเซลล์แขวนลอยของยารากที่ผ่านการกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต
6. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของ PIs ที่เตรียมได้และผลของ PIs ต่อการเติบโตของเชื้อ *P. palmivora*

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### วัสดุ

ตารางที่ 2.1 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิต

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.05	Merck
Acetone	58.08	J.T.Baker
Acrylamide	71.1	Merck
Agar	-	วิทยาสตรม
Ammonium sulfate	132.14	Merck
Ammonium persulfate	228.7	Merck
Azocasein	-	Sigma
6-Benzyladenine (BA)	225.3	Sigma
Bovine serum albumin	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Calcium carbonate	100.09	Fluka
$\alpha$ -Chymotrypsin, Type I-S	-	Sigma
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'-Dimetoxybenzidine dichloride (o-dianisidine)	317.2	Sigma
D-Glucose	180.16	Univar
Diethylaminoethyl cellulose	-	Whatman
Dithiothreitol (DTT)	98.15	Merck
Ethanol	46.07	Merck
Evans blue	960.82	Sigma

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Ethylenediaminetetracetic (EDTA)	249.68	Baker
Glycine	960.9	Sigma
Potassiumdihydrogenphosphate	136.09	Merck
L-Asparagine monohydrate	150.14	Merck
Laminarin	-	Sigma
MES hydrate	195.2	Sigma
Magnesium sulphate	246.48	Carlo Erba
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-tetramethylenediamine (TEMED)	116.2	Merck
N-p-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride	378.88	Sigma
Polyvinylpoly-pyrrolidone	-	Sigma
Potassium acetate	98.15	Merck
Potato dextrose agar	-	Difco
Phosphoric acid	98.0	Baker Analyzed
Phytigel	-	Sigma
Scopoletin	192.2	Sigma
Sephadex G-75	-	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
Subtilisin A, Type VIII	-	Sigma
Sucrose	342.30	Carlo erba
Thidiazuron (TDZ)	220.3	Sigma
Trichloroacetic acid	163.39	Carlo erba



ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Tricine	179.18	USB
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121.1	Merck
Thiamine hydrochloride	337.27	Sigma
Trypsin, Type II-S	-	Sigma
Trypsin inhibitor, Type I-S	-	Sigma
Urea (NH <sub>2</sub> .CO.NH <sub>2</sub> )	60.06	Unilab
V <sub>8</sub>	-	Campbell Soup
Yeast extract	-	

### 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 model 12909657 (Japan)
7. เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง
8. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5, 9 และ 11 เซนติเมตร
9. ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับบัตกสาร
10. ต้มมีดผ่าตัด
11. ตู้อบเชื้อ Ehret (Germany)
12. ไขมีดผ่าตัด เบอร์ 23
13. ปากคีบปลายแหลมความยาว 120 -150 มิลลิเมตร
14. บีกเกอร์ 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. หลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml
20. Cork border

### อุปกรณ์ (ต่อ)

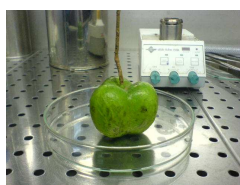
21. Electrophoresis appartatus, ATTA Cooperation (Japan)
22. Fraction collector, 2110 Bio-Rad (USA)
23. Freeze dryer และ Deep-freeze refrigerator, Sanyo (Japan)
24. Hot air oven, Memmert
25. Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
26. Microtube pump, Eyela (Tokyo)
27. Orbital shaker, Orabital incubator refrigerated ,Gallenkamp (UK)
28. Petroff Hausser counting chamber
29. pH meter Cyberscan 1000 (Singapore)
30. Power supply model 1000/500, Biorad (USA)
31. Preparative gel electrophoresis, Prep-cell 491 (U.S.)
32. Shimazu UV-Vis recording spectrophotometer model UV160A (Japan)
33. Spectrofluorophotometer RF-1501 Shimadzu (Japan)
34. Super speed centrifuge, Beckman, Coulter, Avanti J-30I (USA)
35. Syringe filter sterile-EO, non-pyrogenic Hydrophilic, Minisart (Germany)
36. UV box, Vilber Lourmat (France)

## วิธีการทดลอง

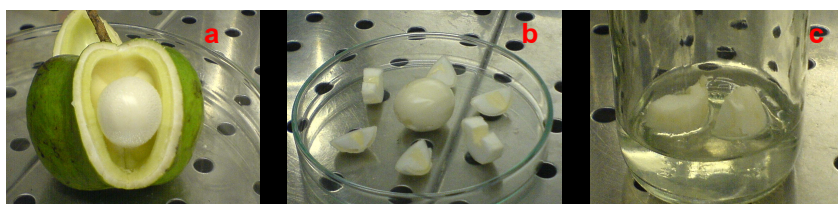
### 2.1 การชักนำเซลล์แขวนลอยจากเมล็ดอ่อนยางพารา

#### 2.1.1 การคัดเลือกผลและชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา

ใช้เมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทานต่อ *P. palmivora*) อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ หลังจากผสมเกสร (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) ล้างทำความสะอาดผลด้วยน้ำประปาและนำเข้าสู่ปลอดเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วลนไฟ ทำเช่นนี้ 1-2 ครั้งจนแน่ใจว่าผิวภายนอกสะอาดปราศจากเชื้อ จากนั้นกรีดพูของผลออกเป็นรอยขนานกัน 2 แนวในแนวตั้ง แล้วกรีดอีกแนวด้านบนซึ่งขวางกับรอยตัดเดิม เปิดเปลือกผลออกจะเห็นเมล็ดอ่อนรูปร่างกลมขนาดเล็กติดอยู่กับรก ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดแยกเมล็ดออกจากผล ผ่าครึ่งเมล็ดอ่อนตามยาวเพื่อแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วผ่าเมล็ดอีกครั้งตามขวางเพื่อแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 ส่วน ดังนั้น 1 เมล็ดสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ส่วน นำเมล็ดที่ตัดแบ่งเป็นส่วน ๆ ไปเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัส MS-1 (ตารางที่ 2.1) วางเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C (ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแสดงในรูปที่ 2.2) เปลือกหุ้มเมล็ดจะใช้เวลาพัฒนาเป็นแคลลัสภายใน 3-4 สัปดาห์ เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงทำการย้ายเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มปริมาณแคลลัส MS-2 (ตารางที่ 2.1) ทุก 4 สัปดาห์



รูปที่ 2.1 แสดงผลอ่อนยางพาราอายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ ภายหลังจากการผสมเกสร



รูปที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา เรียงตามลำดับคือ กรีดพูของผลออก (a), แบ่งเมล็ดอ่อนออกเป็น 6 ส่วน (b), วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-1 (c)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS ซึ่งดัดแปลงเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)	
	ชักนำแคลลัส (MS-1)	เพิ่มปริมาณแคลลัส (MS-2)
KNO <sub>3</sub>	1900	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	322.2	322.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	180.7	180.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9	16.9
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2
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 (%)	<b>5</b>	<b>3</b>
Phytigel agar (%)	0.23	0.23
pH	5.7	5.7

(ที่มา: ดัดแปลงจากประศาสตร์ เกื้อมณี 2538)

### 2.1.2 การชักนำเซลล์แขวนลอยจากแคลลัส

หลังจากทำการย้ายเลี้ยงจำนวน 3 ครั้ง ย้ายแคลลัสที่มีลักษณะร่วนไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเซลล์แขวนลอย วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $26 \pm 4$  °C เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 14 วัน ในการย้ายเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใช้เซลล์เริ่มต้นน้ำหนักประมาณ 0.3 g เลี้ยงในอาหารปริมาตร 30 ml ซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 125 ml (รูปที่ 2.3) หลังจากย้ายเลี้ยงครบ 14 วัน ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ (packed cell volume: PCV) วิธีการวัดทำได้โดยการปล่อยให้เซลล์ตกตะกอนในหลอดเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 2 นาที เมื่อเซลล์ตกตะกอนหมดแล้ว อ่านค่าปริมาตรตะกอนเซลล์จากมาตรวัดข้างหลอด บันทึกผลการเจริญเติบโตและลักษณะเซลล์แขวนลอย นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟรูปแบบการเจริญเติบโต



รูปที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการย้ายเลี้ยง คือเลือกแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ (a), ย้ายลงในอาหารสูตรชักนำเซลล์แขวนลอย (b) และเซลล์แขวนลอยหลังจากการย้ายเลี้ยงและเจริญเติบโตในอาหารใหม่เป็นเวลา 14 วัน (c)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)
	ชักนำเซลล์แขวนลอย
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	322.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	180.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)
	ชักนำเซลล์แขวนลอย
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.25
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85
Thiamine.HCl	0.02
Pyridoxine.HCl	0.10
Nicotinic acid	0.10
Glycine	0.4
Myo-inositol	100
2,4-D	1.0
TDZ	0.1
Sucrose (%)	3
pH	5.7

(ที่มา : ดัดแปลงจากเมฆา และสมปอง, 2536)

## 2.2 การศึกษา PR-proteins ในยางพารา

### 2.2.1 การตรวจหาแอกติวิตี้ของเอนไซม์ $\beta$ -1,3-glucanase

ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโดยใช้ปริมาตรตามความเหมาะสม ผสมกับสับสเตรทลามินารินความเข้มข้น 2.0 mg/ml จำนวน 0.2 ml คนให้เข้ากันนำลงแช่และเขย่าเบาๆในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) จำนวน 0.2 ml รวมกับ 0.1 M sodium acetate บัฟเฟอร์ pH 5.0 จำนวน 0.2 ml นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ตั้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1.5 ml อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm นำค่าที่ได้หาค่าความว่องไวเป็นค่ายูนิต (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส กำหนดให้แอกติวิตี้ของเอนไซม์ 1 ยูนิต เท่ากับหนึ่งไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคส ที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายลามินารินได้ในเวลา 1 นาที

## 2.2.2 ศึกษาความจำเพาะของ PIs ในการเลือกจับกับเอนไซม์ โปรตีเอสต่าง ๆ

ศึกษาโดยดูแอกติวิตีการยับยั้งของ PIs จากสารสกัดเซลล์แขวนลอย ยางพาราต่อโปรตีเอสต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์สับติลลินเอ, ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ ปิเปตสารสกัดที่มี PIs ปริมาตร 50  $\mu$ l ผสมลงในสารละลายเอนไซม์ต่างๆ คือสับติลลินเอ (30  $\mu$ g/ml , 20 mM Tris-HCl pH 8.3), ทริปซิน (10  $\mu$ g/ml , 1 mM HCl) และ ไคโมทริปซิน (10  $\mu$ g/ml , 1 mM HCl) ปริมาตร 30  $\mu$ l, 20  $\mu$ l และ 20  $\mu$ l ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 600  $\mu$ l วางทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลาย 1% เอโซเคซิน (w/v) ซึ่งเป็นสับสเตรทปริมาตร 100  $\mu$ l ปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 10% trichloroacetic acid (TCA) ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml เขย่าให้สารละลายเข้ากัน เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 400  $\mu$ l ผสมกับสารละลาย 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 600  $\mu$ l เขย่าให้สารละลายเข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เมื่อทำการทดลองโดยไม่เติมสารสกัด PIs (Hermosa, *et al.*, 2006)

## 2.2.3 การทดสอบแอกติวิตีของ PIs

ผสมสารสกัด PIs ปริมาตรที่เหมาะสม โดยใช้สับติลลินเอ (30  $\mu$ g/ml, 20 mM Tris-HCl pH 8.3) ปริมาตร 30  $\mu$ l เป็นเอนไซม์โปรตีเอส และใช้เอโซเคซินเป็นสับสเตรท ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.2.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยใช้สูตร

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

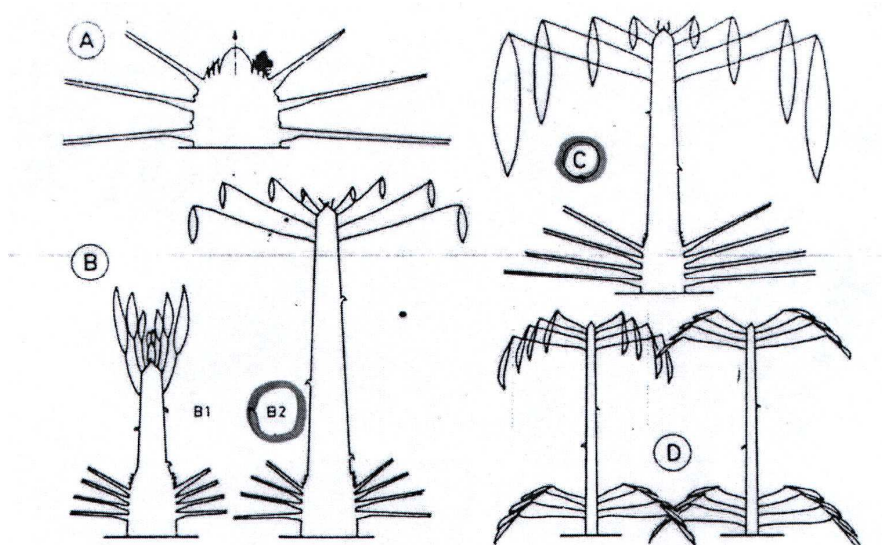
Ac = การย่อยสับสเตรทของสับติลลินเอโดยไม่มี PIs

Ai = การย่อยสับสเตรทของสับติลลินเอเมื่อเติม PIs

## 2.2.4 การศึกษา PIs จากส่วนต่างๆของยางพารา

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) (นารธิตา รอดโพธิ์ทอง 2546) โดยนำส่วนต่างๆของยางพารา (ดังรูปที่ 2.4) ได้แก่ ใบยางที่มีอายุอ่อนแก่แตกต่างกัน คือ ใบระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D เมล็ดอ่อน และเซลล์แขวนลอย ซึ่งและบดให้ละเอียดด้วย 0.5 M Tris-HCl pH 7.0, 0.5% Triton X-100 และ 3% PVPP โดยมี

อัตราส่วนสารตัวอย่าง : บัฟเฟอร์เป็น 1:2 ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง และนำไป เซนตริฟิวจ์ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ทั้งส่วนที่เป็นกาก นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 90 % และนำไปเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที ละลายตะกอนโปรตีนกลับด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งเพื่อกำจัดตะกอนต่างๆ เก็บสารละลายส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปทดสอบต่อไป



รูปที่ 2.4 แผนภาพแสดงใบยางพาราช่วงอายุต่างๆ A, B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C และ D

(ที่มา: Breton *et al.*, 1997)

## 2.3 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต (อไบโอติกอลิซิเตอร์)

กับเซลล์แขวนลอยยางพารา

### 2.3.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต

ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพารา

นำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วัน มากระตุ้นด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต โดยใช้เซลล์ 2.5 g ใน 5 ml ของ MES บัฟเฟอร์ (MES) ซึ่งประกอบด้วย MES 10 mM, MS 5 % และ น้ำตาลซูโครส 3 % มาบ่มด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ 0, 10, 20, 40 และ 80  $\mu$ M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเซลล์แขวนลอยมาเลี้ยงใน MES บัฟเฟอร์ซึ่งไม่มีคอปเปอร์ซัลเฟต วางบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บเซลล์แขวนลอย ณ เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สังเกตผลการเรืองแสงของสคอพอลิ



ดินด้วยตาเปล่า โดยการนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 366 nm) แยกเซลล์แขวนลอยออกจาก MES บัฟเฟอร์ โดยการกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วเก็บทั้งสองส่วนแยกกันคือ บัฟเฟอร์ และตะกอนเซลล์ตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการสกัดต่อไป คำนวณหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอปเปอร์ซัลเฟตที่สามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยมีการสังเคราะห์ PR-protein (PIs) เพิ่มมากขึ้น สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

### 2.3.2 การสกัดเนื้อเยื่อเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการบ่มในข้อ 2.3.1 มาสกัดตามวิธีในหัวข้อ

2.2.4 เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปทดสอบต่อไป

### 2.3.3 การกำจัดสารโมเลกุลเล็ก (เกลือ) ออกจากตัวอย่างด้วยคอลัมน์

#### PD-10

ล้างคอลัมน์ PD-10 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวด เชื้อโดยล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรห้าเท่าของปริมาตรคอลัมน์ (80-100 ml) ปรับสภาพคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ปริมาตรสามเท่าของปริมาตรคอลัมน์ (40-60 ml) ปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลออกจากคอลัมน์จนหน้าเจลแห้ง ปิดเปิดสารตัวอย่างที่มีเกลือปนอยู่ปริมาตร 1 ml ลงไป เซตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ครั้งละ 1 ml ทั้งหมดประมาณ 10 ml เก็บตัวอย่างจากการชะลงในหลอดทดลอง นำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด ตัวอย่างที่มีโปรตีนนำมา pool รวมกันเพื่อรอการทดสอบในขั้นต่อไป

### 2.3.4 การหาปริมาณโปรตีนรวมจากสารสกัด

สารละลาย Bradford : Coomassie Blue G-250 100 mg ใน ethanol 50 ml และ 85% Phosphoric acid 100 ml คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 L กรองก่อนนำไปใช้

โปรตีนมาตรฐาน : ละลาย Bovine serine albumin (BSA) จำนวน 1 mg ในน้ำกลั่น 1 ml จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายที่มีปริมาณ BSA เท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 µg/100 µl ตามลำดับ

วิธีวัดปริมาณโปรตีน : ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้นละ 100 µl และสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโดยใช้ปริมาตรตามความเหมาะสม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 500 µl ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย Bradford 1 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

### 2.3.5 การศึกษาการสังเคราะห์สโคพอลิติน

นำ MES บัฟเฟอร์ จากการทดสอบเซลล์แขวนลอยมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารดังกล่าวมาวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น ( $\lambda$  excitation) 340 nm และความยาวคลื่นปลดปล่อย ( $\lambda$  emission) 440 nm เปรียบเทียบปริมาณและเวลาในการสังเคราะห์สโคพอลิติน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one) ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5  $\mu$ M

### 2.3.6 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยอย่างพาราด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต

นำผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยอย่างพาราในหัวข้อ 2.3.1 มากระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต ณ เวลาต่างๆ โดยนำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วัน จำนวน 2.5 g ใน 5 ml ของ MES บัฟเฟอร์ (MES) มาบ่มด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเซลล์แขวนลอยออกมาไว้ใน MES บัฟเฟอร์ซึ่งไม่มีคอปเปอร์ซัลเฟต วางบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บเซลล์แขวนลอย ณ เวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 และ 96 ชั่วโมง โดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บตัวอย่างทั้งสองส่วนแยกกันคือ บัฟเฟอร์ และตะกอนเซลล์ตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อรอการสกัดต่อไป

### 2.3.7 ศึกษาการตายของเซลล์แขวนลอยหลังถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต

ศึกษาการตายของเซลล์แขวนลอยเมื่อทดสอบการกระตุ้นเซลล์ด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตโดยซังเซลล์แขวนลอยน้ำหนัก 1 g ใส่ลงใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วบีบเปิดสารละลาย 0.05% Evan blue ลงใน Petri dish จนท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ 20 นาที นำเซลล์แขวนลอยที่มีสารละลาย 0.05% Evan blue มาล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำที่ล้างใส บดเซลล์ที่ได้ 0.1 g ในหลอด eppendorf ให้ละเอียดด้วย micro pestil จากนั้นเติมสารละลาย 1% (w/v) SDS ปริมาตร 500  $\mu$ l นำไปบ่มพร้อมกับเขย่าเป็น

เวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500  $\mu$ l หลังจากเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายส่วนใสที่ความยาวคลื่น 600 nm

## 2.4 การทำบริสุทธิ์ Pls

### 2.4.1 การทำ Pls ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

นำสารสกัดส่วนของน้ำ (MES buffer) ที่ได้จากการกรองแยกส่วนที่เป็นเนื้อเซลล์แขวนลอยออกไป ซึ่งผ่านการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากหัวข้อ 2.3.1) ณ เวลาที่ศึกษาจากหัวข้อ 2.3.4 ปริมาตร 400 ml นำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B (anion exchange) ปริมาตรคอลัมน์ 25 ml ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.1 M ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM tris-HCl pH 7.0 โดยมีอัตราการไหล 0.5 ml/min เก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml ที่อุณหภูมิ  $-4^{\circ}\text{C}$  เพื่อรอการทดสอบต่อไป

### 2.4.2 การวัดปริมาณโปรตีนหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose

หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose นำสารละลายที่ได้ทุกๆ 2 หลอดมาวัดปริมาณโปรตีน โดยนำสารตัวอย่าง 100  $\mu$ l ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 500  $\mu$ l ทำปฏิกิริยากับสารละลายเบรดฟอร์ด 1 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

### 2.4.3 การทดสอบหาแถบโปรตีนด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด 7x8 เซนติเมตรหนา 0.75 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 5.5 เซนติเมตร ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 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 และสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วย Phosphorylase b 97.0 kDa, Albumin 66.0 kDa, Ovalbumin 45.0 kDa, Carbonic anhydrase 30.0 kDa, Trypsin inhibitor 21.0 kDa,  $\alpha$ -Lactalbumin 14.4 kDa) load ตัวอย่างลงในแต่ละช่องเจล ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.1 M, Tricine 0.1 M และ SDS 0.1 %, pH 8.25 เปิดกระแสไฟคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ทั้งไว้จนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล จนกระทั่งสีเคลื่อนที่ออกมาจากแผ่นเจลจนหมด ปิดกระแสไฟและนำเจลมาย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

## 2.4.4 การทำริสซูธึ Pls โดยวิธี Preparative gel electrophoresis

### 2.4.4.1) การทำริสซูธึโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-Preparative gel electrophoresis)

โพลีอะครีลาไมล์เจลที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (12%)
30% Acrylamide-bisacrylamide	2.68 ml	20 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	12.5 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	5 ml	-
10% Ammonium persulfate	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Deionized water	12.2 ml	17.225 ml
Total volume	20 ml	50 ml

นำสารละลายตัวอย่าง load ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.025 M, Glycine 0.2 M , pH 8.3 เป็น running buffer และใช้ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับชะตัวอย่าง เปิดกระแสไฟคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์จนหมดแล้วจึงเริ่มเก็บตัวอย่าง โดยมีอัตราการไหล 1 ml/min และเก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml

#### 2.4.4.2) การทำบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-preparative gel electrophoresis

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2.5 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ส่วนประกอบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (12%)
30% Acrylamide-bisacrylamide	2.68 ml	20 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	12.5 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	5 ml	-
10% Ammonium persulfate	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l
10% SDS	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Deionized water	12.1 ml	17.125 ml
Total volume	20 ml	50 ml

นำสารละลายตัวอย่าง load ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.025 M, Glycine 0.2 M, pH 8.3, 1% SDS เป็น running buffer และใช้ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับชะตัวอย่าง เปิดกระแสไฟคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์จนหมดแล้วจึงเริ่มเก็บตัวอย่าง โดยใช้อัตราการไหล 1 ml/min และเก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml

#### 2.4.5 การกำจัด SDS และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น

ตัวอย่างที่ได้จากการผ่าน SDS-preparative gel electrophoresis และมีแถบโปรตีนนำมา pool รวมกัน เติมน้ำตาลซูโครส 4% แล้วนำไปตกตะกอนโปรตีนกับอะซีโตน ด้วยปริมาตรสี่เท่าของปริมาตรสารตัวอย่าง นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 25 นาที จากนั้นวางในตู้ที่มีการไหลของอากาศ 30 นาที เพื่อระเหยอะซีโตนที่เหลือออก ละลายตะกอนโปรตีนกลับด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง เพื่อกำจัดตะกอนต่างๆ เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปทดสอบต่อไป

### 2.5 การศึกษาคุณสมบัติของ PIs

#### 2.5.1 ศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของ PIs

นำ PIs ที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คืออุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปรับอุณหภูมิโดยการแช่ในกระบอกน้ำแข็งก่อนนำไปวัดแอกติวิตี PIs โดยใช้เอโซเคซินเป็นสับสเตรท

## 2.5.2 ศึกษาความคงตัวของ pH ต่าง ๆ

ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม โดยนำ Pls ที่บริสุทธิ์แล้วปรับที่ pH 2-10 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วจึงนำ Pls มาวัดแอกติวิตีโดยใช้เอโซเคซินเป็นสับสเตรท

## 2.5.3 การศึกษาผลของสารสกัด Pls ต่อการงอกของซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora*

นำสารสกัด Pls ซึ่งเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น  $5 \times 10^4$  spore/ml โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่น ปิเปตสารละลายผสม 10  $\mu$ l ลง Petroff Hausser counting chamber เพื่อนับจำนวนซุโอสปอร์ และสังเกตการงอกของ mycelium ได้กล้องจุลทรรศน์ ในเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนผสมอีกส่วนปริมาตร 20  $\mu$ l spread ลงบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ประมาณสองวันสังเกตการเติบโตของเชื้อ

## 2.6 การเตรียมเชื้อ *Phytophthora palmivora* (*P. palmivora*)

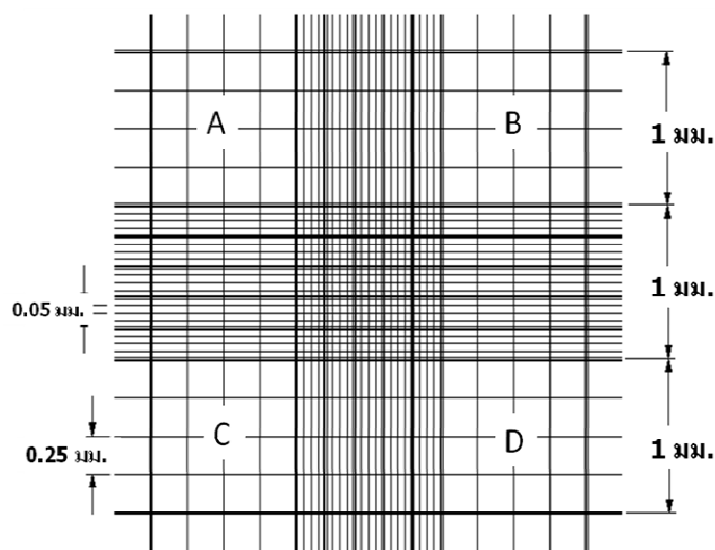
### 2.6.1 การเตรียมเชื้อ *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์

เชื้อ *P. palmivora* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางสงขลาทางศูนย์วิจัยยางสงขลาได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วง จากนั้นผู้วิจัยได้นำเชื้อ *P. palmivora* ดังกล่าวมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ (isolate) อีกครั้ง โดยการกระตุ้นการสร้างซุโอสปอร์ออกมา เพื่อให้ได้สปอร์เดี่ยว (monospore) แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) ซึ่งมีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) สามชนิด คือ mycostatin (50 units/ml), vancomycin (0.04 mg) และ ampicilin (10  $\mu$ M) ย้ายโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงบนอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของยา antibiotic อีกสองครั้ง หลังจากนั้นย้ายลงอาหาร PDA สูตรปกติ และเลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C จึงจะสามารถนำไปใช้งานได้

### 2.6.2 การเตรียมซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora*

จากการเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.5.1 (บนอาหาร PDA) เมื่อต้องการซุโอสปอร์สามารถกระตุ้นได้โดยการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V<sub>8</sub> เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นสามารถเตรียมซุโอสปอร์ได้โดยเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 ml ลงบนสายรา แล้วนำไปบ่ม

ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที สปอร์แรง-เจียมของเชื้อ *P. palmivora* จะแตกออก และปล่อยให้ซุโอสปอร์ซึ่งอยู่ข้างในหลุดออกมาได้ จากนั้นนำซุโอสปอร์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและคำนวณหาความเข้มข้นของซุโอสปอร์ วิธีการหาความเข้มข้นของซุโอสปอร์ทำได้โดยการหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซุโอสปอร์ผสมอยู่บน Petroff Hausser counting chamber และนับจำนวนซุโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 แสดงตารางบนผิว Petroff Hausser counting chamber โดยที่ ช่อง A, B, C และ D มีความกว้าง ความยาวช่องละ 1 มิลลิเมตร และมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร

#### วิธีการนับซุโอสปอร์

ช่อง A, B, C และ D มีความกว้าง ความยาวช่องละ 1 มิลลิเมตรและมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ปริมาตรของช่อง A, B, C และ D ช่องใดช่องหนึ่งมีค่าเท่ากับ ความกว้าง x ความยาว x ความลึก ซึ่งจะ เท่ากับ 1 มม. x 1 มม. x 0.1 มม. หรือ  $10^{-4}$  มิลลิลิตร

ดังนั้น หากนับซุโอสปอร์ช่อง A, B, C และ D จะมีความเข้มข้นของซุโอสปอร์เท่ากับ

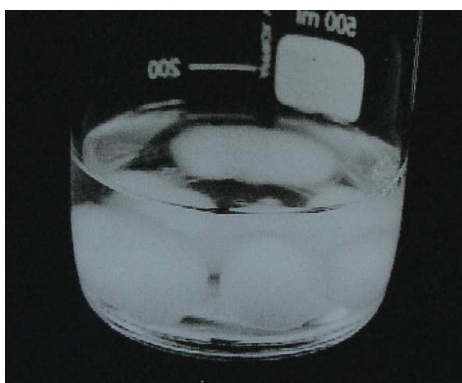
$$\text{จำนวนซุโอสปอร์} \times \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของช่อง A, B, C และ D}}{\text{ปริมาตรบน Petroff Hausser counting chamber}}$$

(ปริมาตร Petroff Hausser counting chamber คือ  $1 \times 10^{-4}$  มิลลิลิตร)



### 2.6.3 การเตรียมโปรตีนเอนไซม์จาก filtrate ของ *P. palmivora*

ตัดชิ้นอาหารที่มี *P. palmivora* ( $\varnothing = 0.6$  เซนติเมตร) จำนวน 1 ชิ้น ต่อ 10 ml ลงในอาหารสูตร Henninger ซึ่งประกอบไปด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 %, Asparagine 0.1 %, Thiamine 0.0001 %, Yeast extract 0.05 % และ D-Glucose 2.5 % จากนั้นนำไปเขย่าในที่มืดที่ 100 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 วัน *P. palmivora* จะค่อยๆ ผลิตอิทธิฤทธิ์และโปรตีนต่าง ๆ ออกมาใน filtrate (รูปที่ 2.7) เมื่อครบกำหนดนำมากรองเส้นใยออกด้วย vacuum นำ filtrate ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 90 % หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการศึกษาการย่อยเอโซเคซินซึ่งเป็นสับสเตรทของโปรตีนเอนไซม์ต่อไป



รูปที่ 2.6 แสดง *P. palmivora* เจริญในอาหารสูตร Henninger ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 วัน

### 2.6.4 การเตรียมโปรตีนเอนไซม์จากเส้นใยของ *P. palmivora*

ส่วนของเส้นใยที่ผ่านการกรองแยก filtrate ออก นำมาสกัดโปรตีนเอนไซม์ดังนี้ นำส่วนของเส้นใยเติมไนโตรเจนเหลวลงไปและบดให้ละเอียดในครกบด เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 M Tris-HCl, pH 7.0 กรองผ่านผ้าขาวบาง นำไปเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ทั้งส่วนที่เป็นกาก นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และนำไปเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาทีละลายตะกอนโปรตีนกลับด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งเพื่อกำจัดตะกอนต่างๆ เก็บสารละลายส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปทดสอบการย่อยเอโซเคซินต่อไป

### 2.6.5 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนใน filtrate

นำ filtrate ปริมาตร 100  $\mu$ l ทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมแบรดฟอร์ด 1 ml เติมน้ำกลั่น 400  $\mu$ l เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

### 2.6.6 ศึกษาการย่อยของโปรตีนเอสเอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อ *P. palmivora*

ปิเปตสารสกัดโปรตีนเอสจากเชื้อปริมาณ 200  $\mu$ l ผสมลงในสารละลาย 1% เอโซเคซีน (w/v) ซึ่งเป็นสับสเตรทปริมาณ 100  $\mu$ l ปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  ให้มีปริมาตร 700  $\mu$ l วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 10% trichloroacetic acid (TCA) ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml เขย่าให้สารละลายเข้ากัน เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาณ 400  $\mu$ l ผสมกับสารละลาย 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 600  $\mu$ l เขย่าให้สารละลายเข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

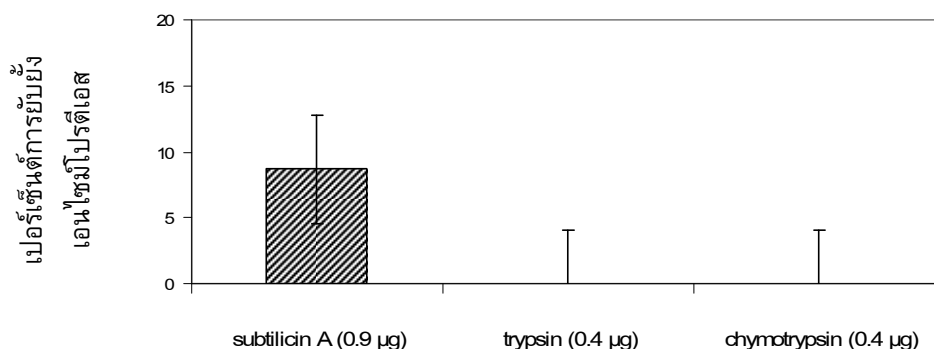
### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

##### 3.1 ผลการศึกษา PIs ในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา

##### 3.1.1 ศึกษาความจำเพาะของ PIs ในการเลือกจับกับเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมาย

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยอย่างพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) ศึกษาผลของความจำเพาะในการเลือกจับกับเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ คือซับติลิซินเอ (0.9  $\mu\text{g}$ ), ทริปซิน (0.4  $\mu\text{g}$ ) และไคโมทริปซิน (0.4  $\mu\text{g}$ ) ซึ่งความเข้มข้นของแต่ละเอนไซม์มีความสามารถในการย่อยสับสเตรท 1% เอโซเคซีน (w/v) ได้ใกล้เคียงกัน และให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง O.D. กราฟมาตรฐาน ผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซับติลิซินเอ แต่ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินเมื่อใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรท (รูปที่ 3.1) แสดงว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอย มีความจำเพาะต่อเอนไซม์โปรตีเอสชนิดซับติลิซินเอมากที่สุด



รูปที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัด PIs จากเซลล์แขวนลอยอย่างพาราพันธุ์ BPM-24 ต่อเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

ขณะที่จุลินทรีย์ หรือเชื้อก่อโรคต่างๆผลิตเอนไซม์โปรตีเอส หรือเอนไซม์ชนิดอื่นๆออกมาเพื่อโจมตีเป้าหมาย ซึ่งเอนไซม์โปรตีเอสกลุ่มเซอรินที่เชื้อผลิตขึ้นแบ่งออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ คือ trypsin-like, chymotrypsin-like และ subtilisin-like ในส่วนของพืชก็ผลิต PIs ออกมาเพื่อต่อต้านการโจมตีต่อเอนไซม์กลุ่มดังกล่าว โดยเข้าไปจับกับเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมายและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ ซึ่งชนิดของ PIs ที่ผลิตก็ขึ้นอยู่กับเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมายที่จะเข้าไปจับ (Valueva and Mosolov, 2004) และจากผล

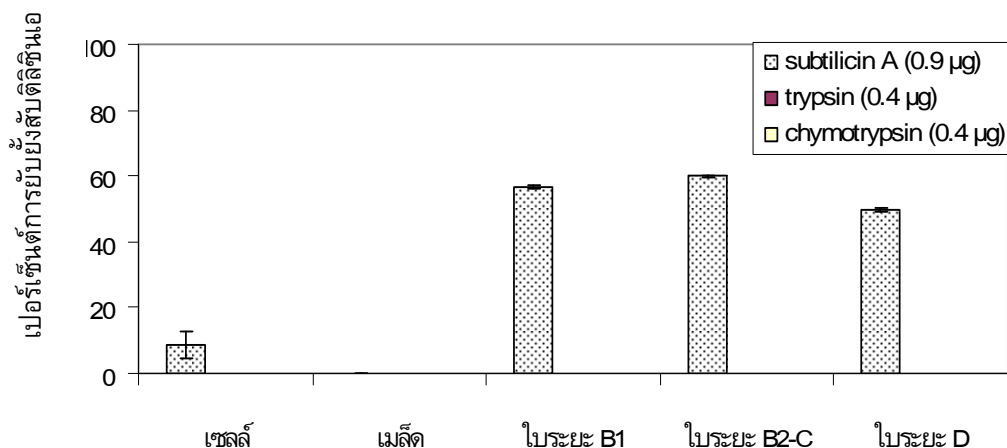
การทดสอบของผู้วิจัยพบว่าเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมายที่สารสกัด PIs จากเซลล์แขวนลอย ยางพาราเข้าไปจับคือสับติลินิน แสดงว่า PIs ดังกล่าวมีเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมายชนิด subtilisin-like

Hermosa และคณะ (2006) ศึกษาผลของสารสกัด PIs จากหัวมันฝรั่ง ต่อการเลือกจับกับเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมาย พบว่าสารสกัด PIs มีความจำเพาะกับเอนไซม์ ทริปซินและโคโมทริปซิน เมื่อใช้เอโซเคซินเป็นสับสเตรท Sritanyarat และคณะ (2006) ศึกษาผลของ PIs จากน้ำยางพาราต่อการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสพบว่าให้ผลการยับยั้งสับติลินินเอสูงที่สุด รองลงมาคือทริปซิน แต่ไม่ยับยั้งโคโมทริปซิน ซึ่ง PIs ดังกล่าวอาจมีบทบาทต่อการตอบสนองของยางพาราเพื่อต่อต้าน pathogens และ herbivores เพราะ PIs ดังกล่าวมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อยางพาราถูกกรีดมากขึ้นขณะที่ Mónica และคณะ (1999) สกัดแยก cystatin (cystein proteases inhibitor) จากเมล็ดเกาลัด (chestnut) พบว่าสารสกัดดังกล่าวให้ผลการยับยั้ง cystein proteases และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งโปรตีเอสที่มาจากเชื้อ *B. cinerea* ก่อนข้างสูง

### 3.1.2 ผลการศึกษา PIs จากส่วนต่างๆของยางพาราต่อการเลือกจับกับเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมาย

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสโดย PIs จากส่วนต่างๆของยางพาราได้แก่เซลล์แขวนลอย, เมล็ดอ่อน และใบที่ระดับอ่อนแก่ต่างกัน (ใบระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D) ของยางพาราพันธุ์ BPM-24 พบว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอย และสารสกัดจากใบอ่อนให้ผลการยับยั้งเอนไซม์สับติลินินเอเพียงอย่างเดียว โดยสารสกัดจากใบอ่อนให้ผลการยับยั้งสูงกว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอย และใบที่มีอายุอ่อนกว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าใบที่มีอายุเพิ่มมากขึ้น ส่วนสารสกัดจากเมล็ดอ่อนไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (รูปที่ 3.2) สรุปได้ว่า PIs จากเซลล์แขวนลอย ใบระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D มีความจำเพาะต่อเอนไซม์สับติลินินเอ การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยซึ่งมีการเขย่าอยู่ตลอดเวลา จะส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างสารต่างๆรวมทั้ง PIs ออกมาในระดับหนึ่ง สำหรับในใบซึ่งให้ผลการยับยั้งค่อนข้างสูงเนื่องจากในธรรมชาติใบยางพารามีการติดเชื้อเป็นระยะๆ ส่งผลให้เกิดระบบการป้องกันตนเอง และผลิต PIs ออกมาในปริมาณค่อนข้างสูง และใบที่มีอายุอ่อนต้องป้องกันตนเองจากการบุกรุกมากกว่าใบที่มีอายุค่อนข้างแก่ เนื่องจากมีความหนาของคิวตินน้อยกว่าจึงผลิตสารต่างๆรวมทั้ง PIs ออกมาในปริมาณที่สูงกว่า ส่วนในเมล็ดอ่อนพบว่าไม่มีผลการยับยั้ง ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดอ่อนของยางพารามีเปลือกหุ้มที่ค่อนข้างหนาและแข็ง ไม่ถูกรุกรานจากสิ่งต่างๆจึงไม่จำเป็นต้องสร้างสารต่างๆรวมทั้ง PIs ออกมาปริมาณมากแต่มีการสร้างขึ้นมา

ระดับหนึ่งเพื่อใช้ในกระบวนการต่างๆทางชีวเคมีเท่านั้น และเป็นไปได้ว่า PIs ในเมล็ดอาจยับยั้งโปรตีเอสชนิดอื่นๆ ที่นอกเหนือจากเอนไซม์โปรตีเอสที่ผู้วิจัยศึกษา



รูปที่ 3.2 เปอร์เซนต์การยับยั้งของสารสกัด PIs จากส่วนต่างๆของยางพาราพันธุ์ BPM-24 : เซลล์แขวนลอย, เมล็ดอ่อน, ใบระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2-C</sub> และ D ต่อเอนไซม์โปรตีเอส (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

นิสาพร มุหะมัด (2551) ศึกษาเปรียบเทียบแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากใบ, เมล็ด และเซลล์แขวนลอยของยางพาราพันธุ์ BPM-24 โดยการทำอิมมูโนโพรบิซิสแบบสภาพธรรมชาติ พบว่าเมื่อตัวอย่างดังกล่าวถูกกระตุ้นส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าแถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นคือ แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันของยางพารา และจากการศึกษาของ จีระภา ชัยวงศ์ (2551) ที่ศึกษาการชักนำเซลล์แขวนลอยจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์ BPM-24 พบว่าสามารถชักนำเซลล์แขวนลอยจากเปลือกหุ้มเมล็ดยางพาราได้เซลล์สีเหลืองอ่อน กระจายตัวและแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตเป็น 3 ระยะ คือ ระยะ lag phase, log phase และ stationary phase (ระยะที่ 1 lag phase อยู่ในช่วง 1-2 วัน หลังการย้ายเลี้ยง ระยะที่ 2 log phase อยู่ในช่วง 2-10 วัน และระยะที่ 3 stationary phase อยู่ในช่วงวันที่ 10-14 หลังการย้ายเลี้ยง) ซึ่งเซลล์แขวนลอยที่ได้มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ เมื่อศึกษาการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยที่ได้ด้วย filtrate จากเชื้อ *P. palmivora* พบว่า filtrate ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ความเข้มข้น 0.300 µg โปรตีนต่อ 1 g เซลล์แขวนลอย) สามารถกระตุ้นการเกิดสคอพอลิทินได้สูงและเร็ว นั่นคือเซลล์แขวนลอยดังกล่าวสามารถตอบสนองต่ออิทธิฤทธิ์ได้ดี และจากการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางด้วยวิธี native PAGE และย้อมแอกติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สคอพอลิทินและ guaiacol เป็นสับสเตรท นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของแถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกิดจากการติดเชื้อในธรรมชาติของใบยาง ทำให้

การทดลองมีความแปรปรวนของข้อมูลสูง ทั้งนี้เนื่องจากบางช่วงไบบางอยู่ในสถานะ SAR คือ ผ่านการกระตุ้นมาแล้ว ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับของ PR-proteins

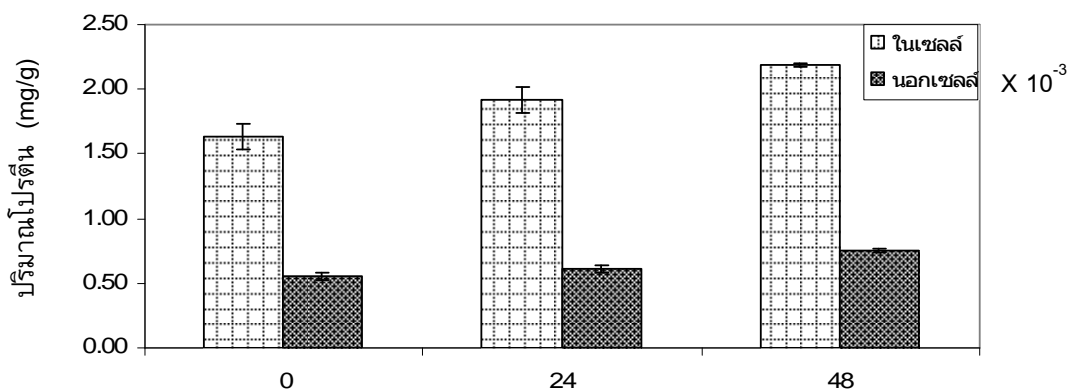
เนื่องจากไบบางพาราซึ่งเติบโตในธรรมชาติไม่สามารถควบคุมปัจจัยแวดล้อมต่างๆได้ เพื่อลดความแปรปรวนของตัวอย่างจึงใช้เซลล์แขวนลอยเป็นตัวอย่างในการศึกษาดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปผู้วิจัยจะใช้เซลล์แขวนลอยยางพาราพันธุ์ BPM-24 เป็นตัวอย่างในการศึกษาและในการทดสอบการยับยั้งของ PIs จะใช้สับติลิตินเอเป็นเอนไซม์โปรตีเอสโดยมีเอโซเคซินเป็นสับสเตรท

### 3.2 ผลการศึกษา PR-proteins ที่ผลิตโดยเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ส่งออกนอกเซลล์ (ส่วนของ MES บัฟเฟอร์)

#### 3.2.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนที่เซลล์แขวนลอยยางพาราสร้างขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้น

จีระภา ชัยวงศ์ (2551) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพันธุ์ BPM-24 ในอาหาร MS สูตรชักนำการเกิดเซลล์แขวนลอย พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นค่อนข้างมากในช่วง 2 วันแรก และปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง 3 ไอโซไซม์ คือ S-POD, O-POD และ Z-POD มีความเปลี่ยนแปลงค่อนข้างมากเมื่อเขย่าในอาหารสูตร MS แต่ G-POD มีการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (เมื่อ O-POD, G-POD, S-POD และ Z-POD เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อย้อมด้วยสับสเตรท o-dianisidine, guaiacol, สคอพอลิติน และ syringaldazine) ขณะที่การเขย่าเซลล์แขวนลอยใน MES บัฟเฟอร์ มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพียงเล็กน้อย

เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการย้ายเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจาก MS media มาปรับสภาพใน MES บัฟเฟอร์ ก่อนทดสอบการกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต จึงได้ศึกษาผลของการเขย่าเซลล์แขวนลอยใน MES บัฟเฟอร์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งในส่วนของสารสกัดเซลล์แขวนลอย และที่เซลล์แขวนลอยส่งออกนอกเซลล์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนจากทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3.3) แสดงว่าวิธีการเขย่าเซลล์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์หรือโปรตีนในเซลล์แขวนลอยเพียงเล็กน้อยดังนั้นจึงสามารถใช้ MES เป็นบัฟเฟอร์ในชุดควบคุมได้

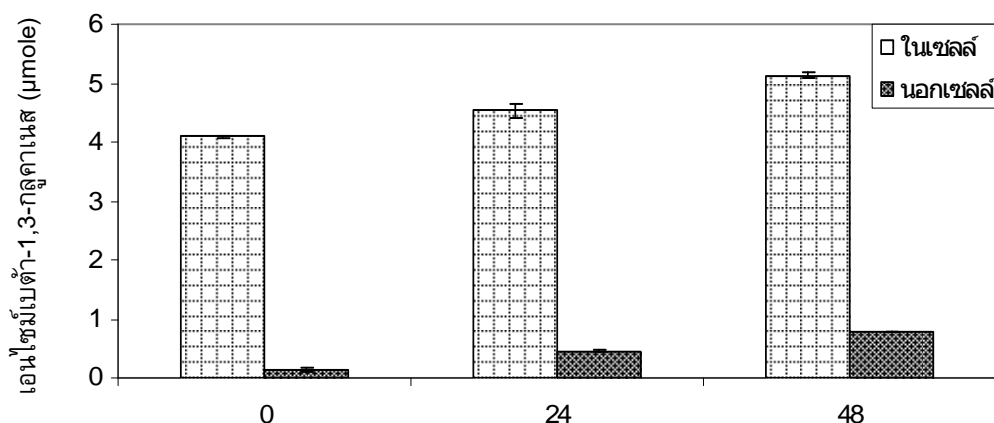


รูปที่ 3.3 ปริมาณโปรตีนในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และปริมาณโปรตีนที่เซลล์แขวนลอยปลดปล่อยออกมา ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อย้ายเลี้ยงใน MES บัฟเฟอร์ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

นิตาพร มุหะมัด (2551) ซึ่งตรวจสอบปริมาณโปรตีนในเซลล์แขวนลอยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเขย่าใน MES บัฟเฟอร์เป็นเวลาสามวัน พบว่าปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

### 3.2.2 ผลการศึกษาแอกติวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากสารสกัดเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่เซลล์แขวนลอยปลดปล่อยออกนอกเซลล์ โดยการเขย่าเซลล์แขวนลอยใน MES บัฟเฟอร์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยอย่างพารามีปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นจากเวลาเริ่มต้นประมาณสอง และสี่เท่า ขณะที่ปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่เซลล์แขวนลอยปลดปล่อยออกนอกเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองช่วงเวลา (รูปที่ 3.4) แสดงว่าการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยวิธีเขย่าส่งผลต่อระบบการป้องกันตนเองโดยการผลิตโปรตีนและเอนไซม์บางชนิดเพิ่มขึ้นรวมทั้งเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะผลิตอยู่ภายในเซลล์แขวนลอยมากกว่าการส่งออกมานอกเซลล์



รูปที่ 3.4 ปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่เซลล์แขวนลอยปลดปล่อยออกมา ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

จากการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยอย่างพาราพันธุ์ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นด้วยการเขย่าใน MES บัฟเฟอร์เวลาต่างๆกัน พบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น และลดลงเมื่อใช้เวลาในการกระตุ้นนานขึ้น (จีระภา ชัยวงศ์ 2551) เช่นเดียวกับการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลลาซีนแอมโมเนียไลเอส และการสังเคราะห์เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเซลล์แขวนลอยอย่างพาราซึ่งถูกกระตุ้นด้วยการเขย่าใน MES บัฟเฟอร์ ณ เวลาต่างๆ พบว่าปริมาณการสังเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากเวลาเริ่มต้นและจะลดลงเมื่อใช้เวลาในการกระตุ้นนานมากขึ้น (นิสาพร มุหะมัด 2551)

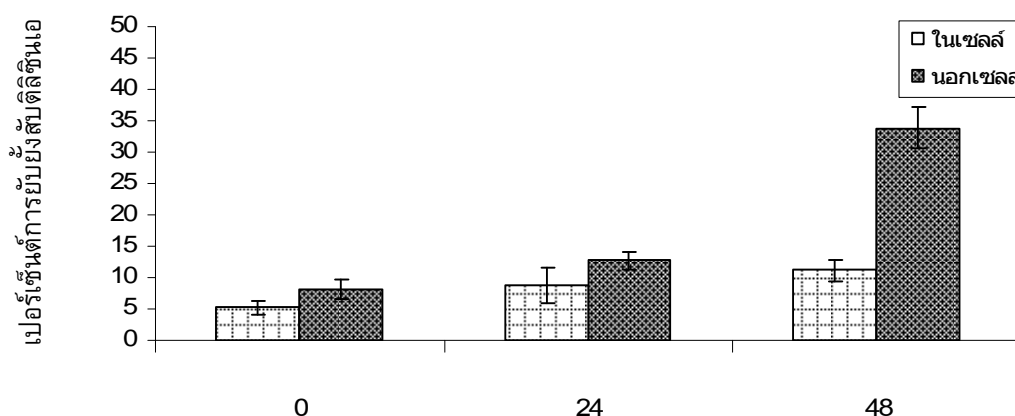
Eugenia และคณะ (2002) ศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในใบมะนาวพันธุ์ต้านทาน (PMR-6) และพันธุ์อ่อนแอ (Rochet) ที่ตอบสนองต่อเชื้อ *Sphaerotheca fusca* พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพันธุ์ต้านทานเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังกระตุ้นด้วยเชื้อ และมีปริมาณสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ การศึกษาด้วยวิธี Western blot แสดงให้เห็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีขนาด 33 kDa และผลจากการวิเคราะห์แบบ two-dimensional พบแถบโปรตีนชนิด acidic สองแถบในมะนาวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งแถบโปรตีนแถบแรกเป็นแถบโปรตีนที่พบทั่วไปในธรรมชาติ ขณะที่อีกแถบโปรตีนเป็นแถบที่บ่งบอกลักษณะสายพันธุ์ ส่วนผลจากการทดสอบด้วยวิธี Northern blot พบว่าในสายพันธุ์ต้านทานการแสดงออกของยีนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจะถูกกระตุ้นให้แสดงออกก่อนสายพันธุ์อ่อนแอ

Felipe และคณะ (2006) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ปลดปล่อยจากบริเวณปลายยอดอ่อนของต้น White Cheeswood (*Simira glaziovii*, Rubiaceae) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีขนาด 35 kDa และทำงานได้ดีที่ pH 5.2



### 3.2.3 ผลการศึกษาแอกติวิตี้ของ PIs จากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา

ผลของ PIs จากสารสกัดเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมาจากเซลล์ ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (สับติลซินเอ) เมื่อใช้เอโซเคซินเป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อใช้เวลาในการเขย่าเซลล์แขวนลอยเพิ่มขึ้นส่งผลให้แอกติวิตี้ของ PIs เพิ่มขึ้น ทั้งในส่วนของเซลล์แขวนลอย และที่ส่งออกมาจากเซลล์ โดยแอกติวิตี้ของ PIs จากส่วนที่ส่งออกมาจากเซลล์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอย (รูปที่ 3.5) นั่นคือ PIs เป็นหนึ่งในโปรตีนที่ผลิตเพิ่มขึ้นในระบบป้องกันตนเองของพืชเมื่อถูกกระตุ้นด้วยการเขย่า และในกรณีของเซลล์แขวนลอยอย่างพาราพบว่า PIs มีบทบาทในการผลิตเพื่อส่งออกมาภายนอกเซลล์มากกว่าที่จะเก็บสะสมภายในเซลล์



รูปที่ 3.5 เปอร์เซนต์การยับยั้งของ PIs จากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมาจากเซลล์ ณ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

Rickauer และคณะ (1989) ศึกษาการเหนี่ยวนำ PIs ในเซลล์แขวนลอยยาสูบโดยใช้เชื้อ *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* เป็นตัวกระตุ้น พบว่าเมื่อบ่มเซลล์แขวนลอยด้วยเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นทั้ง PIs และการสังเคราะห์ ethylene ซึ่งจากการทำบริสุทธิ์ PIs พบว่ามีขนาด 10,500 Da และสามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสชนิดทริปซินแต่ไม่ยับยั้งโคโมทริปซิน ไอนิง มูซอ และคณะ (2551) ได้พบยีนเส้นเติมของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (*Hb-PI*) ซึ่งมีขนาด 210 เบส จากน้ำยางพารา และตัวยับยั้งดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน โดยตัวยับยั้งปริมาณ 0.25 mg สามารถยับยั้งเอนไซม์ ทริปซินความเข้มข้น 0.2 mg/ml ได้ 9.5 %

Kim และคณะ (2004) ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแอนติออกซิแดน ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) และ guaiacol-type peroxidase (G-POD) ในเซลล์แขวนลอยของมันเทศใน

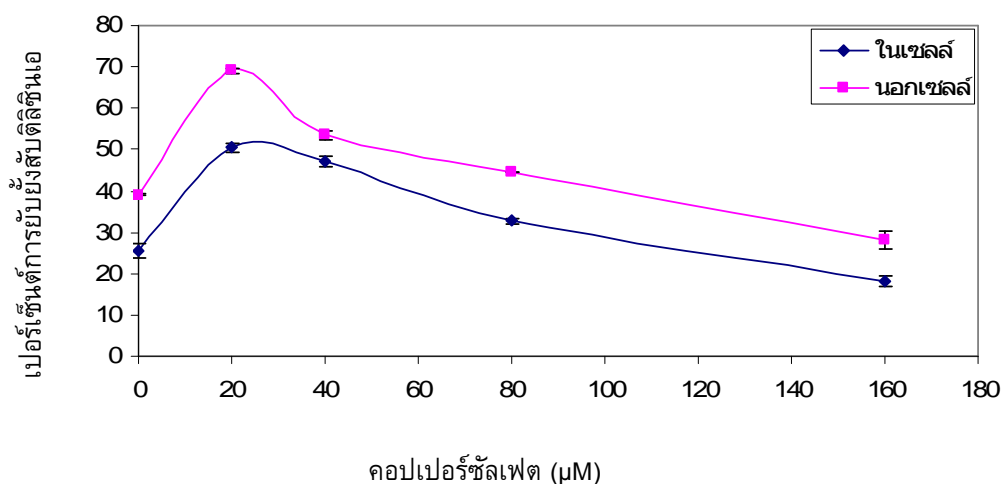
ระหว่างการเจริญเติบโตภายใต้ความเครียดจากกระบวนการออกซิเดทีฟพบว่า SOD, GPX และ G-POD ภายในเซลล์แขวนลอยเพิ่มขึ้นหลังจากทำการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวในน้ำเลี้ยงเซลล์ (นอกเซลล์) มากกว่าภายในเซลล์

เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสพบได้มากในส่วนของเซลล์แขวนลอย และผลิตเพื่อส่งออกมาน้อยมาก ขณะที่ PIs จะถูกส่งออกมาภายนอกเซลล์มากกว่ากักเก็บภายในเซลล์ และมีโปรตีนรวมที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ในปริมาณต่ำ PIs จึงเป็น PR-proteins ที่ผู้วิจัยเลือกไปศึกษาการทำบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาคุณลักษณะต่อไป

### 3.3 ผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต (อไบโอติกอิลิซิเตอร์) กับเซลล์แขวนลอยของพาราต่อ PIs

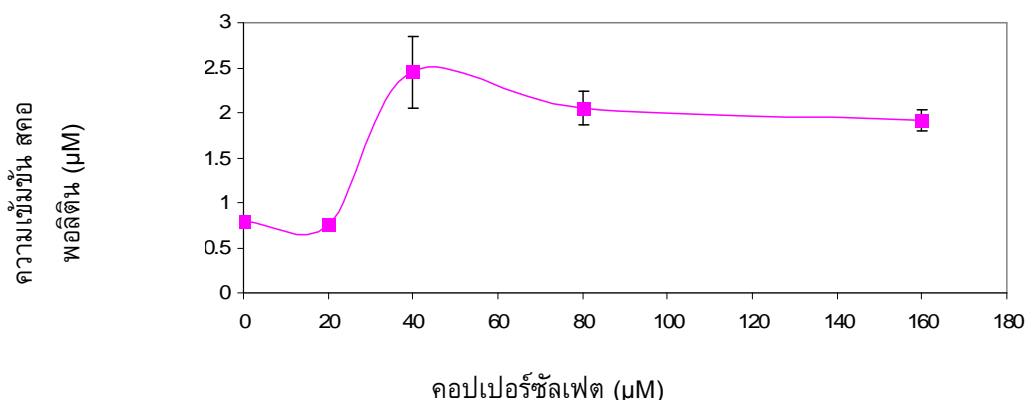
#### 3.3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยของพารา

เมื่อทดสอบกระตุ้นเซลล์แขวนลอยของพาราด้วยอไบโอติกอิลิซิเตอร์ (คอปเปอร์ซัลเฟต) ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่เวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนเนื้อเซลล์แขวนลอยออกจากส่วนของ MES บัฟเฟอร์ เพื่อนำตัวอย่างจากทั้งสองส่วนไปสกัดและตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 90 % แล้วนำสารสกัดโปรตีนที่ผ่านการกำจัดเกลือแล้วมาทดสอบหาแอกติวิตีของ PIs พบว่าคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ทั้งตัวอย่างจากเซลล์แขวนลอยของพารา และที่ส่งออกมานอกเซลล์ ให้ผลการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ (รูปที่ 3.6) โดย PIs จากตัวอย่างที่ส่งออกมานอกเซลล์ ให้ผลการยับยั้งสูงกว่า PIs จากส่วนเนื้อของเซลล์แขวนลอย แสดงว่าคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยให้ผลิต PIs เพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 3.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ PIs จากสารสกัดเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมา นอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

เมื่อพิจารณาสคอพอลิติน, ปริมาณโปรตีน และผลของเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์แขวนลอยในแต่ละความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟต พบว่าปริมาณสคอพอลิตินที่ส่งออกมานอกเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นสูงขึ้น โดยปริมาณสคอพอลิตินมีค่าสูงสุดที่คอปเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 40  $\mu$ M (รูปที่ 3.7) ขณะที่การกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20  $\mu$ M ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดและเมื่อความเข้มข้นของคอปเปอร์ซัลเฟตเพิ่มสูงขึ้นปริมาณโปรตีนที่ได้กลับลดลง (รูปที่ 3.8) ส่วนการตายของเซลล์กลับเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นคอปเปอร์ซัลเฟตเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 3.9) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นสูงๆส่งผลต่อการรั่วที่ผนังของเซลล์แขวนลอย ทำให้การผ่านเข้าออกของสารมีความผิดปกติ ขณะที่ความเข้มข้น 20  $\mu$ M เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เวลา 0 ชั่วโมง แต่ไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ส่งผลให้เซลล์แขวนลอยสร้างโปรตีนบางชนิดออกมาเพิ่มขึ้นซึ่งรวมถึง PIs ทั้งนี้เพื่อใช้กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในเซลล์

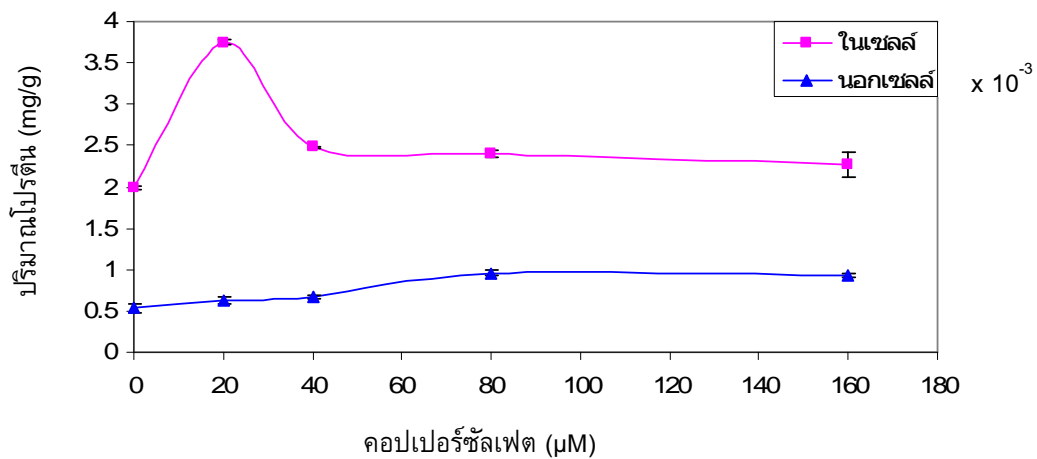


รูปที่ 3.7 ปริมาณความเข้มข้นสคอพอลิตินที่ส่งออกมาจากเซลล์แขวนลอย ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

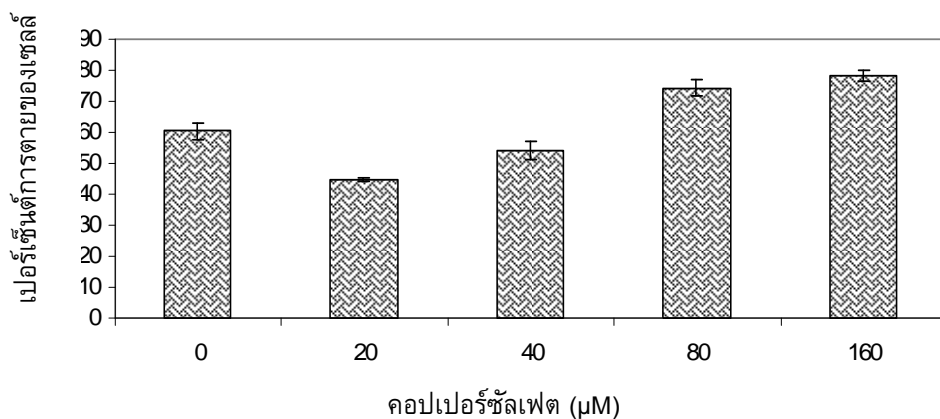
จากรายงานของ Li และคณะ (1997) ได้รายงานว่ามีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิทธิฤทธิ์ไฟโตเล็กซินจะผลิตและเก็บสะสมใน vascular parenchyma cell ซึ่งพร้อมจะปล่อยออกมาไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ดังนั้นเมื่อพืชถูกกระตุ้นด้วยอิทธิฤทธิ์หรือเชื้อโรคต่างๆ จึงมีการเหนี่ยวนำให้สารตั้งต้น คือ coumarin จากวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid pathway) เปลี่ยนเป็นไฟโตเล็กซินได้แก่ สคอพอลิติน และอะยาพินเป็นต้น แล้วปล่อยออกมาจากเซลล์ ทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Vasquez และคณะ (2004) เมื่อทดสอบใบและเซลล์แขวนลอยของมันสำปะหลังด้วยผนังเซลล์ของยีสต์ (cell wall glucan elicitor) พบว่ามีการสังเคราะห์สคอพอลิตินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นทั้งในและนอกเซลล์ เพ็ญมาศ นาคอุดม (2548) รายงานว่าการนำอิทธิฤทธิ์ซึ่งเป็นอิทธิฤทธิ์จากน้ำเลี้ยง *P. palmivora* ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน มาทดสอบกับเมล็ดอ่อนและแคลลัสยางพารา พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในเซลล์และปล่อยสคอพอลิตินออกมาจากเซลล์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณโปรตีนจากสารสกัดเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ส่งออกมาจากเซลล์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ

CuSO <sub>4</sub> (µM)	ปริมาณโปรตีนในน้ำ (mg/g) $\times 10^{-3}$	ปริมาณโปรตีนในเนื้อเซลล์แขวนลอย (mg/g)
0	0.532 $\pm$ 0.047	1.979 $\pm$ 0.021
20	0.625 $\pm$ 0.042	3.745 $\pm$ 0.035
40	0.677 $\pm$ 0.021	2.480 $\pm$ 0.014
80	0.956 $\pm$ 0.037	2.396 $\pm$ 0.049
160	0.923 $\pm$ 0.021	2.267 $\pm$ 0.147



รูปที่ 3.8 ปริมาณโปรตีนจากสารสกัดเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมาออกเซลล์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)



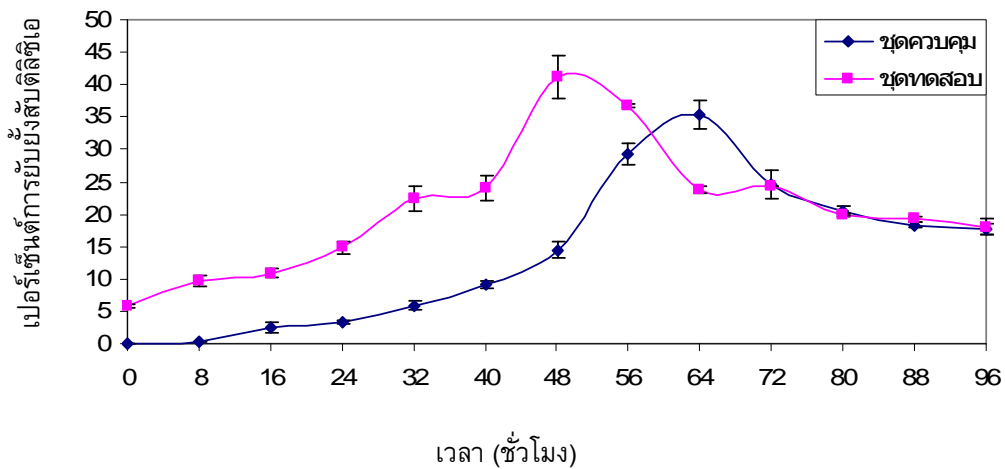
รูปที่ 3.9 เปอร์เซนต์การตายของเซลล์แขวนลอยอย่างพารา ณ เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

จิระภา ชัยวงศ์ (2551) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ filtrate จาก *P. palmivora* ต่อการสังเคราะห์สคอพอลิตินในเซลล์แขวนลอยอย่างพารา โดยใช้ filtrate ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.033, 0.075, 0.150 และ 0.300  $\mu\text{g}$  โปรตีนต่อ 1 g เซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าทั้งอัตราเร็วและปริมาณในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของเซลล์แขวนลอย เมื่อถูกกระตุ้นด้วย filtrate ที่ความเข้มข้น 0.300  $\mu\text{g}$  โปรตีนต่อ 1 g เซลล์แขวนลอย มีค่าสูงสุดคือ 9.13 nmole/g เซลล์แขวนลอย ที่ 72 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงที่ 96 ชั่วโมง ในขณะที่ filtrate ความเข้มข้น 0.150  $\mu\text{g}$  ต่อ 1 g เซลล์แขวนลอย กระตุ้นการสร้างสคอพอลิตินได้สูงสุดเท่ากับ 8.55 nmole/g เซลล์แขวนลอย ในชั่วโมงที่ 96 ดังนั้นทั้ง

ปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ filtrate ที่ทดสอบ โดยความเข้มข้นของ filtrate ที่สูงขึ้น จะมีการสังเคราะห์สคอพอลิตินเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ filtrate ที่สูงเกินไปทำให้การสังเคราะห์สคอพอลิตินลดลงอย่างรวดเร็ว การกระตุ้นเซลล์ของพืชด้วยอิลิซิเตอร์ที่ความเข้มข้นสูงมาก จะส่งผลให้เซลล์ตายไม่มีการตอบสนองต่อการป้องกันตัวเองของพืช เช่นการสร้างสารไฟโตแอลีกซิน, สารกลุ่ม ROS และ PR-proteins เป็นต้น สอดคล้องกับ นุรอามาลี ดีนามอ (2547) ซึ่งรายงานว่เมื่อบ่มใบยางพาราด้วยซุโอสปอร์ของ *P. palmivora* ที่ความเข้มข้นของซุโอสปอร์สูงเกินไปจะทำให้เห็นการลุกลามชัดเจนทำให้ใบยางพาราไม่สามารถสังเคราะห์สคอพอลิตินมายัง *P. palmivora* ได้ แต่หากใช้ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ที่เหมาะสมสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสคอพอลิตินในปริมาณสูง นอกจากนี้ เพ็ญมาศ นาคอุดม (2549) นำอิลิซิตินจากเชื้อรา *P. palmivola* ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน มาทดสอบในแคลล์ยางพารา พบว่าเมื่อใช้อิลิซิตินที่ความเข้มข้นสูงเกินไปมีผลให้การสังเคราะห์สคอพอลิตินลดลงอย่างรวดเร็ว Gutierrez และคณะ (1994) นำใบทานตะวัน มากระตุ้นด้วย  $CuCl_2$  เพื่อศึกษาสคอพอลิติน พบว่าหลังจากกระตุ้นใบทานตะวันด้วย  $CuCl_2$  สามารถเหนี่ยวนำการสร้างสคอพอลิตินได้ และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เร่งการสลายสคอพอลิตินให้เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ สคอพอลิตินสามารถถูกออกซิไดส์ได้ด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและเรียกเอนไซม์ชนิดนี้ว่าสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส (S-POD) ทั้งนี้เนื่องจากสคอพอลิตินที่มีการสังเคราะห์ขึ้นในปริมาณสูงเกินไปก็จะเป็นพิษต่อเซลล์พืชด้วย (Cooper and William, 2004) ดังนั้นในการศึกษา PIs ครั้งต่อไปผู้วิจัยจึงใช้คอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 20  $\mu M$  สำหรับการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย และทำการบ่มที่เวลาต่างๆ

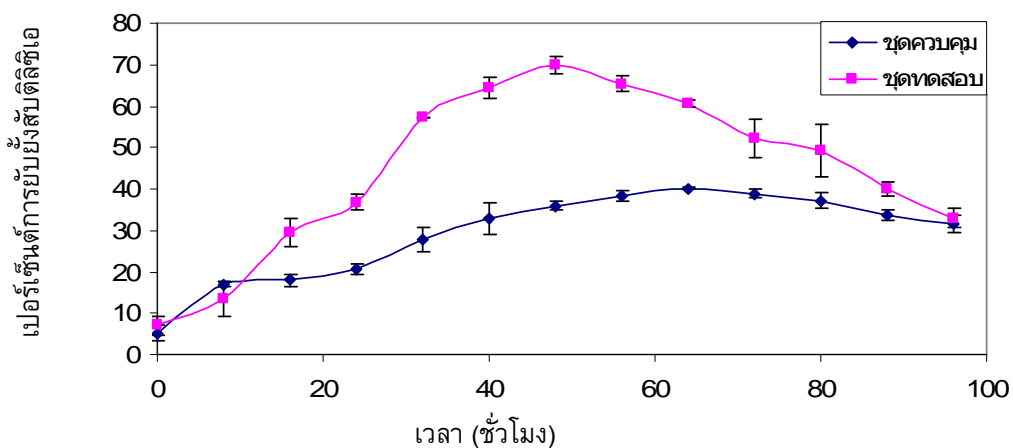
### 3.3.2 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต

จากผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอย นำความเข้มข้นที่ได้คือ 20  $\mu M$  มาศึกษาผลของเวลาด้วยการกระตุ้นที่เวลาต่างๆกัน คือ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 และ 96 ชั่วโมงแล้วเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม (0  $\mu M$ ) และชุดทดสอบ (20  $\mu M$ ) เมื่อพิจารณาผลของเวลาต่อการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราภายในเนื้อเซลล์แขวนลอย พบว่าในชุดทดสอบให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเวลาเดียวกันนี้ให้ผลการยับยั้งสูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 3 เท่า ขณะที่ชุดควบคุมให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 64 ชั่วโมง (รูปที่ 3.10)



รูปที่ 3.10 เปอร์เซนต์การยับยั้งของ PIIs จากส่วนเนื้อของเซลล์แขวนลอยอย่างพารา ณ เวลาต่าง ๆ กัน ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

เมื่อพิจารณาปริมาณการส่ง PIIs ออกมานอกเซลล์ ต่อผลของการกระตุ้นที่เวลาต่าง ๆ กัน พบว่าในชุดทดสอบให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเวลาเดียวกันนี้ให้ผลการยับยั้งสูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 2.5 เท่า ขณะที่ชุดควบคุมให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 64 ชั่วโมง (รูปที่ 3.11) อธิบายได้ว่าการเขย่าเซลล์แขวนลอยส่งผลต่อการป้องกันตนเองของพีซีเช่นเดียวกัน แต่ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการส่งสัญญาณและไม่รุนแรง แต่การกระตุ้นโดยคอปเปอร์ซัลเฟตส่งผลต่อระบบให้ส่งสัญญาณกระตุ้นการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ออกมารวดเร็วและปริมาณมาก



รูปที่ 3.11 เปอร์เซนต์การยับยั้งของ PIIs จากส่วนที่ถูกส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลาต่าง ๆ กัน ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

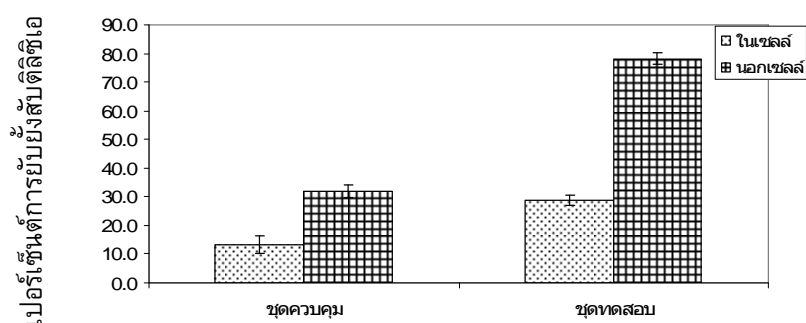
จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัทธิลักษณ์จากตัวอย่างทั้งสอง ส่วนคือส่วนที่ส่งออกนอกเซลล์ และส่วนที่มาจากเนื้อเซลล์ พบว่าตัวอย่างจากทั้งสองแหล่ง ให้ผลการยับยั้ง ณ ช่วงเวลาเดียวกัน คือชุดทดสอบให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 64 ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปได้ว่าเวลาที่ตรวจพบ Pls สูงที่สุด เป็นช่วงเวลาที่ระบบการส่งผ่านข้อมูลของยีน Pls ถูกส่งผ่านข้อมูลเข้าไปยังภายในเซลล์และแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนชนิดนี้ออกมาได้มากที่สุด จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้น Pls และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของ Pls ภายนอกและภายในเซลล์ พบว่าในชุดควบคุม Pls จากทั้งสองตัวอย่างแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ขณะที่ในชุดทดลองตัวอย่างส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ให้ผลการยับยั้งสูงกว่าตัวอย่างจากเนื้อเซลล์แขนงลอยประมาณ 2 เท่า อธิบายได้ว่าธรรมชาติของเซลล์แขวนลอยซึ่งถูกเขย่าอยู่ตลอดเวลาส่งผลให้เซลล์ถูกกระตุ้นได้ส่วนหนึ่งจึงทำให้ในชุดควบคุมแอกติวิตีของ Pls ตรวจพบได้ในระดับหนึ่ง และใช้เวลาค่อนข้างนานในการกระตุ้นจึงจะได้จุดสูงสุดของการยับยั้ง ขณะที่การกระตุ้นคอปเปอร์ซัลเฟตทำให้เวลาที่ใช้ในการกระตุ้นลดลงและยังให้ผลการยับยั้งที่สูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคอปเปอร์ซัลเฟตไป กระตุ้นการทำงานของเซลล์แขวนลอยโดยไปจับกับตัวกลางรับส่งสัญญาณ ทำให้เกิดการไหลของไอออนผ่านพลาสมาเมมเบรน ส่งผลให้เกิด reactive oxygen species (ROS) เหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (Jabs *et al.*, 1997) รวมทั้ง Pls ซึ่งอาจถูกกระตุ้นโดยผ่านกระบวนการเดียวกันนี้

นิตาพร มุหะมัด (2551) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลลานีนแอมโมเนียไลเอส ที่ผ่านการบ่มด้วย filtrate ของ *P. palmivora* ทุกๆ 8 ชั่วโมง พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนอลลานีนแอมโมเนียไลเอสมีปริมาณมากขึ้นจากชุดควบคุมและจะสังเคราะห์สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 16 ซึ่งเป็นชั่วโมงแรกๆของการทดลอง คิดเป็น 102.41 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่จีระภา ชัยวงศ์ (2551) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งเกิดจากการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วย filtrate ของ *P. palmivora* ความเข้มข้น 0.300 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมของเซลล์แขวนลอยทุกๆ 8 ชั่วโมง พบว่า filtrate สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงที่สองช่วงเวลาคือ 56 และ 80 ชั่วโมง โดยในช่วงเวลา 56 ชั่วโมง ที่ S-POD สูงขึ้น อาจสร้างขึ้นมาเพื่อลดความรุนแรงของ  $H_2O_2$  ที่เกิดจากกระบวนการ oxidative burst ส่วนในช่วงเวลาที่ S-POD สูงขึ้น ณ เวลา 80 ชั่วโมงเป็นช่วงเวลาที่สอดคล้องกับการปล่อยสคอพอลิดีนออกมานอกเซลล์แขวนลอย ณ เวลาเดียวกันนี้ จึงเป็นไปได้ที่เซลล์แขวนลอยบางพาราสังเคราะห์ S-POD ออกมาเพื่อใช้ในการสลายสคอพอลิดีน



### 3.3.3 ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วย 20 $\mu\text{M}$ คอปเปอร์ซัลเฟต และชุดควบคุม จากเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาในหัวข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 เมื่อศึกษาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม (คอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  โดยใช้เวลาในการกระตุ้น 48 ชั่วโมง) ในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยแล้ว นำสภาวะดังกล่าวมาศึกษาต่อ โดยนำสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยยางพาราและจากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ หลังกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0 และ 20  $\mu\text{M}$  และเก็บตัวอย่างหลังกระตุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบผลการยับยั้งระหว่างชุดทดสอบที่ถูกกระตุ้นด้วย 20  $\mu\text{M}$  คอปเปอร์ซัลเฟต และชุดควบคุมซึ่งไม่มีคอปเปอร์ซัลเฟต พบว่าสารสกัดจากเซลล์ชุดทดสอบมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สับติลิสินเอนสูงกว่าสารสกัดจากเซลล์ชุดควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบผลของการยับยั้งระหว่างสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยยางพาราและจากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่า PIs จากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ให้ผลการยับยั้งสูงกว่าจากสารสกัดเซลล์แขวนลอย (รูปที่ 3.12) แสดงว่า PIs มีบทบาทในการผลิตเพื่อส่งออกนอกเซลล์ มากกว่าที่จะเก็บไว้ภายในเซลล์แขวนลอย และสารสกัดจากชุดทดสอบได้รับการกระตุ้นจากไปโอติกอิลิซิเตอร์ ส่งผลให้เซลล์เกิดกระบวนการสร้างสารต่างๆรวมทั้ง PIs เพื่อใช้กำจัดสิ่งรบกวนในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเกิดจากผลของการเขย่าเซลล์ นั่นคือคอปเปอร์ซัลเฟตเป็นไปโอติกอิลิซิเตอร์ที่ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราให้สร้างสารต่างๆรวมทั้ง PIs ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการเตรียมสารสกัดเพื่อเตรียม PIs ให้บริสุทธิ์ผู้วิจัยจะใช้วิธีกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

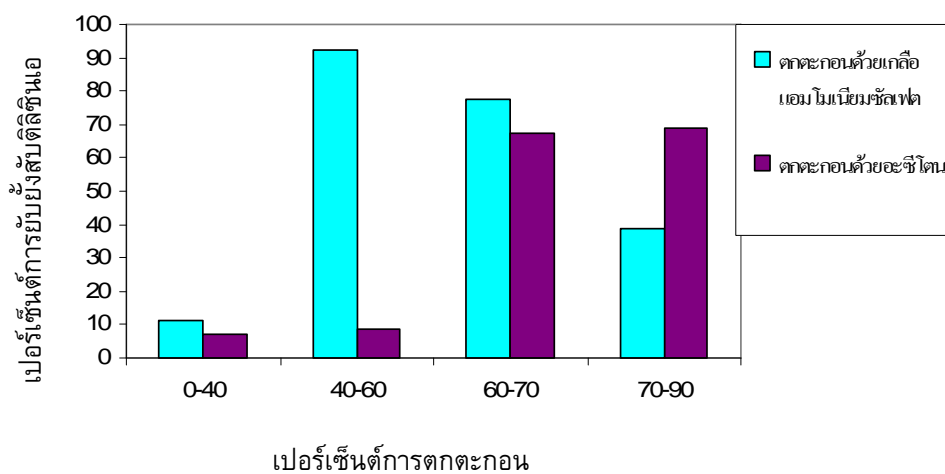


รูปที่ 3.12 เปอร์เซนต์การยับยั้งสับติลิสินเอนของ PIs ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากตัวอย่างในเซลล์แขวนลอย และจากส่วนที่ส่งออกนอกเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ที่เวลา 48 ชม. (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง  $\pm$  SD แต่ละการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

Thomas และคณะ (1982) สกัดและทำบริสุทธิ์ Pis จากใบมันฝรั่ง (*Lycopersicon esculentum* Mill) ที่กระตุ้นด้วยการทำให้เกิดบาดแผล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography และวิธี isoelectric focusing พบว่า Pis ให้ผลการยับยั้งทริปซิน และโคโมทริปซิน แต่ให้ผลการยับยั้งทริปซินสูงกว่า และเมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งของ Pis ระหว่างชุดทดลอง (ใบที่ถูกกระตุ้นให้เกิดบาดแผล) และชุดควบคุม (ใบที่ไม่ถูกกระตุ้น) พบว่า Pis จากชุดทดลองให้ผลการยับยั้งสูงกว่าชุดควบคุม นั่นคือเมื่อพืชได้รับการกระตุ้นโดยการทำให้เกิดบาดแผลส่งผลให้พืชผลิตโปรตีนต่างๆ รวมทั้ง Pis เพิ่มขึ้นเพื่อใช้กำจัดสิ่งแปลกปลอม Jouilli และ Ferjani (2003) ศึกษาผลของการกระตุ้นต้นทานตะวันด้วย 50  $\mu$ M คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นเวลา 5 วัน พบว่าคอปเปอร์ซัลเฟตส่งผลให้ระดับเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) และปริมาณโปรตีนลดลง ซึ่งการลดลงของโปรตีนนั้นอาจเนื่องมาจากคอปเปอร์ไอออนเข้าไปรบกวนหมู่ไทออลของเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งส่งผลต่อระบบการผลิตโปรตีน (protein metabolism) มากกว่านั้น cupric ion ยังส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อ oxygen species ซึ่งส่งผลให้โปรตีนเกิดการสลายตัว (protein degradation) และพบว่าเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสมีปริมาณเพิ่มขึ้น เพราะเป็นเอนไซม์ตัวแรกของ phenylpropanoid pathway นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสยังสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ต่อไปนี้ด้วยคือ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คอะเตเลส ซินนามิล โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (cinnamyl CoA dehydrogenase; CAD) โพลีฟีนอลออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส

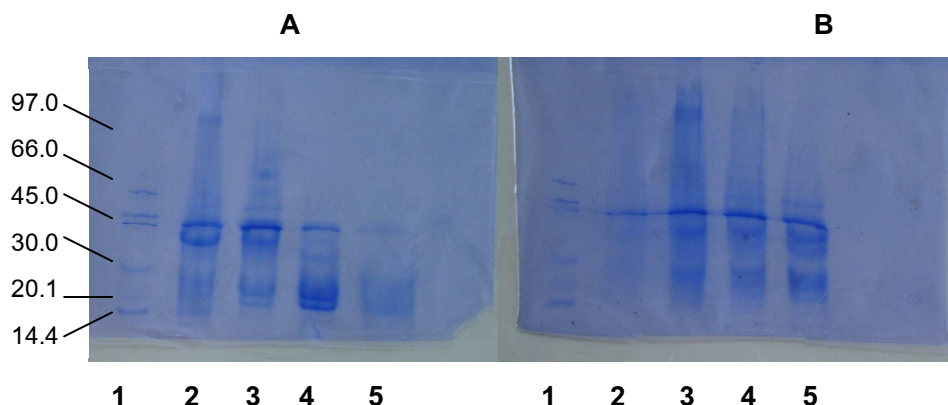
### 3.3.4 ผลการแยก Pis จากเซลล์แขวนลอยเพื่อให้มีความบริสุทธิ์ในระดับหนึ่ง

หลังบ่มเซลล์แขวนลอยพันธุ์ BPM-24 ด้วย 20  $\mu$ M คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสกัดเซลล์แขวนลอยด้วย 0.5 M Tris-HCl, pH 7.0 ที่มี 0.5% Triton X-100 และ 3% PVPP ในอัตราส่วนเซลล์แขวนลอย : บัฟเฟอร์ ; 1 : 2 แล้วเปรียบเทียบการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และอะซีโตน ในช่วงความเข้มข้นต่างๆ คือ 0-40%, 40-60%, 60-70% และ 70-90% และนำไปทดสอบผลการยับยั้งของ Pis พบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน จะให้ผลยับยั้งการทำงานของสับติลซินเอสสูงที่สุดในช่วงความเข้มข้น 60-70% และ 70-90% ขณะที่การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40-60% ให้ผลยับยั้งการทำงานของสับติลซินเอสสูงที่สุด (ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าที่ความเข้มข้น 60-70%) ดังแสดงในรูปที่ 3.13 เมื่อนำโปรตีนจากแต่ละช่วงความเข้มข้นมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R จะให้แถบโปรตีนดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.13 เปอร์เซนต์การยับยั้งสับติลลินเอเมื่อใช้สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยอย่างพาราที่กระตุ้นด้วย  $20 \mu\text{M}$  คอปเปอร์ซัลเฟต แล้วตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และอะซีโตน เมื่อ 0-40 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 0-40%, 40-60 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 40-60%, 60-70 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 60-70% และ 70-90 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 70-90%

จากรูปที่ 3.14 (A) พบว่าช่องที่ 4 และช่องที่ 5 ซึ่งตกตะกอนด้วยอะซีโตนในช่วงความเข้มข้น 60-70% และ 70-90% ตามลำดับ ให้ผลยับยั้งการทำงานของสับติลลินเอสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาแถบโปรตีนแล้วพบว่าไม่มีแถบโปรตีนลดลง เมื่อเทียบกับช่วงความเข้มข้นอื่นๆ นั่นคือมีการหายไปของโปรตีนบางชนิด ขณะที่ PIs มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และ รูปที่ 3.14 (B) พบว่าช่องที่ 4 และช่องที่ 5 ซึ่งตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 40-60% และ 60-70% ให้ผลยับยั้งสูงกว่าช่วงความเข้มข้นอื่น แต่พบว่ายังมีแถบโปรตีนอีกมากจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้แยก PIs แสดงว่าวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแยก PIs ออกมาได้ในระดับหนึ่ง คือการตกตะกอนด้วยอะซีโตนในช่วงความเข้มข้น 60-90%



รูปที่ 3.14 แถบโปรตีนที่ทดสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) และย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R (A) ตกตะกอนด้วยอะซีโตน (B) ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

Lane 1 = low molecular weight marker ของบริษัท Amersham (14.4 - 97 KDa)

Lane 2 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 0-40%

Lane 3 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 40-60%

Lane 4 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 60-70%

Lane 5 = ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้น 70-90%

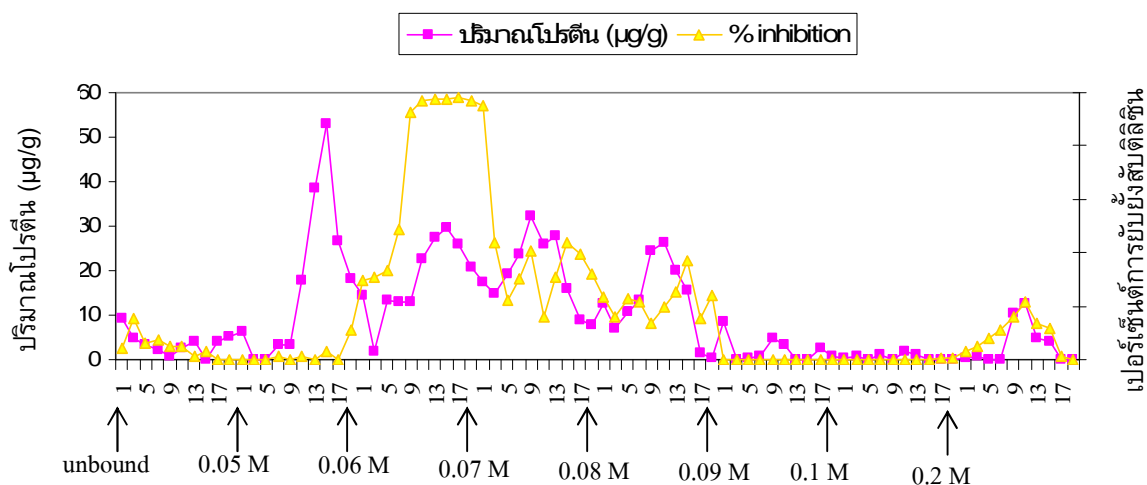
Sritanyarat และคณะ (2006) สกัดแยก Pis จากน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM-600 พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน 80-95% และผ่านการแยกโดยวิธีทางโครมาโตกราฟีแบบแยกขนาด (size-exclusion chromatography, Sephadex G-75) ให้ผลการยับยั้งสับติลซินเอ และทริปซิน จากการศึกษาคูณสมบัติและผ่านการทำบริสุทธิ์พบ Pis สามฟอร์ม คือ HPI-1, HPI-2a และ HPI-2b ซึ่ง HPI-1 มีสองโมโนเมอร์ต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน โดยผลของการแยกด้วยโครมาโตกราฟีแสดงขนาดของ HPI-1 เป็น 14 kDa ซึ่งมีขนาดเป็นสองเท่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE ภายใต้สภาวะของโมเลกุลที่เกิดการรีดิวซ์ (reducing) แสดงให้เห็นว่า HPI-1 มีโมเลกุลหน่วยย่อยขนาด 7 kDa ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และจากผลจากการทดสอบด้วยวิธี mass spectrum พบว่า HPI-1 มีขนาดโมเลกุล  $14,893 \pm 10$  ส่วน HPI-2a และ HPI-2b มีขนาดโมเลกุล  $7757 \pm 5$  และ  $7565 \pm 5$  ตามลำดับ โดยโมเลกุล HPI-2a จะเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างซิสเทอีน และกลูตาไทโอน (glutathione) หรือ unknown ที่มีขนาดเล็ก ( $116 \pm 1$ ) ขณะที่ HPI-2b ใช้การจับระหว่างโมเลกุลกับกลูตาไทโอนหรือ unknown ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ซึ่งไม่เกิดการแตกออกของพันธะในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์

ผู้วิจัยเลือกที่จะใช้ตัวอย่างจากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์มาใช้ในการทำบริสุทธิ์ PIs ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างในส่วนเนื้อของเซลล์แขวนลอยยังมีโปรตีนอีกหลากหลายชนิดปนกันอยู่ และการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนยังส่งผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพค่อนข้างมาก ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงใช้ตัวอย่างจากส่วนที่ออกนอกเซลล์เพราะมีปริมาณโปรตีนรวมต่ำ แต่มีแอกติวิตีของ PIs ค่อนข้างสูง จึงเหมาะที่จะนำมาทำบริสุทธิ์ต่อไป โดยไม่ต้องผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตน

### 3.4 การทำบริสุทธิ์ PIs

#### 3.4.1 ผลจากการผ่านคอลัมน์ ion exchange แบบ anionic

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่ถูกกระตุ้นด้วย 20  $\mu$ M คอปเปอร์ซัลเฟต เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มากรองเพื่อนำเอาส่วนที่ส่งออกนอกเซลล์ไปใช้ในกระบวนการทำบริสุทธิ์ โดยนำตัวอย่างที่กรองแล้วปริมาตร 400 ml ผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B ปริมาตรคอลัมน์ 25 ml ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือ NaCl 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 และ 0.2 M ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl pH 7.0 อัตราการไหล 0.5 ml/min เก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml แล้วนำไปทดสอบหาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตี PIs พบว่าที่ความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.06, 0.07, 0.08 และ 0.2 M ตรวจพบปริมาณโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นเกลือ 0.05 M มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด นั่นคือที่ความเข้มข้นเกลือนี้มีโปรตีนหลายชนิดที่มีประจุใกล้เคียงกัน และเมื่อทดสอบแอกติวิตีของ PIs พบว่าตัวอย่างที่ชะด้วยความเข้มข้นเกลือ 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ 45-60) ให้ผลของการยับยั้งสูง (รูปที่ 3.15) แสดงว่าที่ความเข้มข้นเกลือนี้เป็นความเข้มข้นที่ชะ PIs ออกมาได้ และเหมาะสมในการนำมาใช้ทำบริสุทธิ์ต่อไป เนื่องจากสามารถแยกโปรตีนชนิดอื่นๆออกไปได้ส่วนหนึ่ง

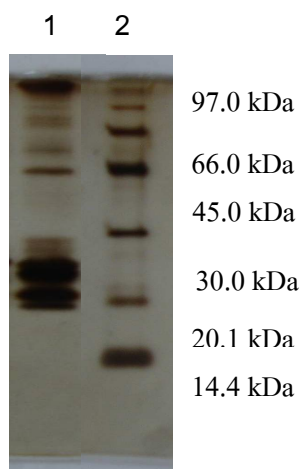


รูปที่ 3.15 ปริมาณโปรตีนและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลลิสินของ PIs หลังผ่านคอลัมน์ ion-exchange จากตัวอย่างส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์

เมื่อนำโปรตีนตัวอย่างที่ชะด้วยความเข้มข้นเกลือ 0.06 M ซึ่งให้ผลต่อการยับยั้งสับติลลิสินเอมาทำอิเลคโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (Tricine-SDS-PAGE) และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท จะให้แถบโปรตีนดังรูปที่ 3.16

Bhat และ Pattabiraman (1989) ศึกษา PIs จากเมล็ดขนุน (jackfruit seed, *Artocarpus integrifolia*) พบว่าผลจากการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (DEAE-cellulose) สามารถแยก PIs ได้ 5 ชนิด ชนิดแรกเป็น minor PIs ซึ่งไม่จับกับคอลัมน์และให้ผลการยับยั้งต่อเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเตส (elastase) ชนิดที่สองจับกับคอลัมน์ด้วยแรงอย่างอ่อน ชะออกมาได้ด้วย ความเข้มข้นเกลือ 0.05 M NaCl และให้ผลการยับยั้งต่อเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเตส ชนิดที่สามและสี่ชะออกด้วยเกลือ 0.1 M และ 0.15 M NaCl ให้ผลการยับยั้งต่อเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเตส ส่วน PIs ชนิดสุดท้ายจับกับคอลัมน์อย่างแข็งแรงซึ่งชะออกด้วยความเข้มข้นเกลือ 0.3 M NaCl และให้ผลการยับยั้งเฉพาะทริปซินและไคโมทริปซิน

Seidl และคณะ (1978) ศึกษาการทำบริสุทธิ์ Subtilisin inhibitor (SI) จากเมล็ดถั่วดำ พบว่าสามารถแยก SI ได้บริสุทธิ์ขึ้นประมาณ 800 เท่า โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน 92 % นำโปรตีนที่ได้มาผ่านการแยกด้วย DEAE-Sephadex chromatography และชะด้วยความเข้มข้นเกลือ 0.13 M NaCl จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแยกขนาด (Sephadex G-75) เพื่อหาขนาดของ SI ซึ่ง SI ที่แยกได้มีขนาดโมเลกุล 10 kDa และทำงานได้ดีในช่วง pH 7-11

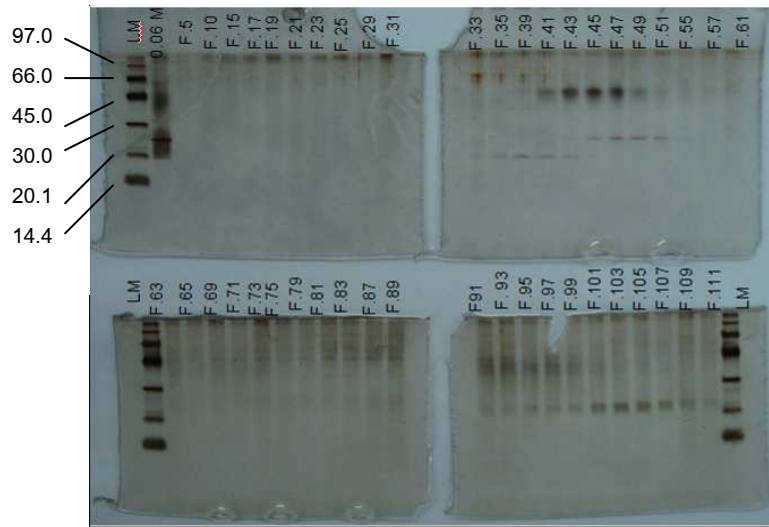


รูปที่ 3.16 แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ ion-exchange และชะด้วยเกลือ 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ 45-60) หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท lane 1: แถบโปรตีนจากการชะด้วยเกลือ 0.06 M lane 2: แถบโปรตีนมาตรฐานของบริษัท Amersham (14.4 - 97 kDa)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ ion-exchange และชะด้วยเกลือ 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ 45-60) ไปใช้ในการนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

### 3.4.2 การทำบริสุทธิ์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

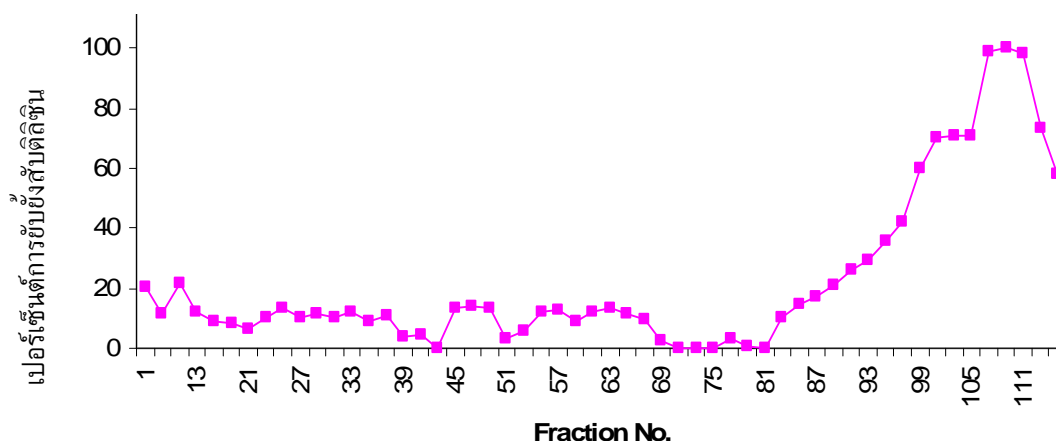
นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยวิธี ion-exchange และให้ผลการยับยั้งสับติลลินเอ ซึ่งชะด้วยเกลือ 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ 45-60) มา pool รวมกันและผ่านคอลัมน์ preparative gel electrophoresis แบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งมีความสูงของเจลส่วนบน (stacking gel) ประมาณ 2.5 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) ประมาณ 6 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างโดยใช้อัตราการไหล 1 ml/min และเก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml จากนั้นนำตัวอย่างจากแต่ละหลอดๆละ 30  $\mu$ l ผสมกับ dye 10  $\mu$ l แล้ว load ลงเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (Tricine-SDS-PAGE) และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบว่าให้แถบโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 3.17 ซึ่งโปรตีนต่างๆแยกออกมาที่ปริมาตรหลากหลายแตกต่างกัน ทั้งนี้รวมถึง PIs ที่แยกออกจากโปรตีนชนิดอื่นๆ



รูปที่ 3.17 แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธี Preparative gel electrophoresis แบบไม่แปลงสภาพ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟริซิสแบบแปลงสภาพ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท เมื่อ LM : low molecular weight ของบริษัท Amersham (14.4 - 97 KDa), F. : fraction number, 0.06 M : ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ ion-exchange และชะด้วยเกลือ 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ 45-60)

เมื่อทดสอบผลของการยับยั้งสับตลิซินเอกจากตัวอย่างในแต่ละหลอดพบว่าตั้งแต่หลอดที่ 91 ถึงหลอด 111 ให้ผลการยับยั้งสับตลิซินเ (รูปที่ 3.18) ขณะที่แถบโปรตีนตำแหน่งก่อนหน้าไม่มีผลการยับยั้ง ดังนั้นหลอดที่ 91 - 111 จึงเป็นตัวอย่างที่มี PIs ประกอบอยู่ ซึ่งเมื่อพิจารณาแถบโปรตีนในช่วงดังกล่าวแล้วพบว่ายังมีแถบโปรตีนอื่นๆรวมอยู่ด้วย ซึ่งหมายถึง PIs ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์และยังต้องนำไปผ่านกระบวนการเพื่อทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

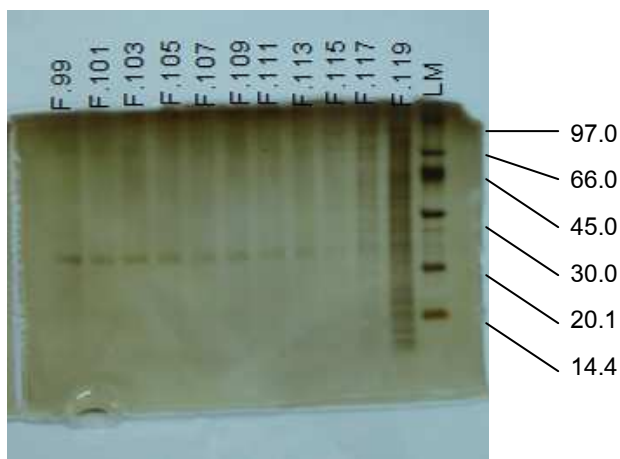




รูปที่ 3.18 เปอร์เซนต์ยับยั้งสับติลิซินเอจากตัวอย่างในแต่ละหลอดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แบบ Preparative gel electrophoresis

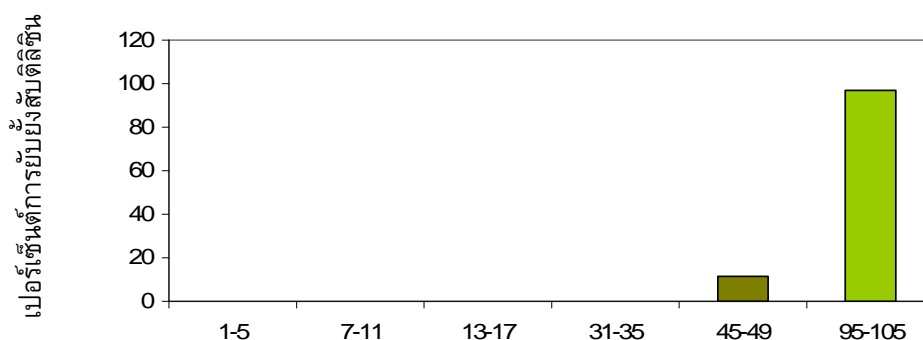
### 3.4.3 การทำบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-preparative gel electrophoresis

จากตัวอย่างที่ศึกษาก่อนหน้านำตัวอย่างหลอดที่ 95 – 111 ซึ่งให้ผลต่อการยับยั้งสับติลิซินเอสูงมา pool รวมกัน แล้วนำมาผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ขั้นต่อไปโดยวิธี SDS-preparative gel electrophoresis เนื่องจากเมื่อพิจารณาแถบโปรตีนในช่วงตัวอย่างที่นำมา pool รวมกันยังมีแถบโปรตีนที่ปนกันอยู่อีกประมาณ 2 แถบ และมีระยะห่างกันพอประมาณ ซึ่งควรแยกออกจากกันได้ในระบบที่มี SDS ซึ่งในระบบนี้จะเป็นการแยกโปรตีนตามขนาด โปรตีนตัวอย่างที่ pool รวมกันแล้วนำมาผ่านคอลัมน์ preparative gel electrophoresis แบบแปลงสภาพ ซึ่งมีความสูงของเจลส่วนบน (stacking gel) ประมาณ 2.5 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) ประมาณ 6 เซนติเมตร และเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกันกับวิธีการข้างต้น นำตัวอย่างจากแต่ละหลอดๆละ 30  $\mu$ l ผสมกับ dye 10  $\mu$ l แล้ว load ลงเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (Tricine-SDS-PAGE) และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบว่าให้แถบโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธี preparative gel electrophoresis แบบแปลงสภาพ หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท เมื่อ LM : low molecular weight ของบริษัท Amersham (14.4 - 97 KDa) F. : fraction number

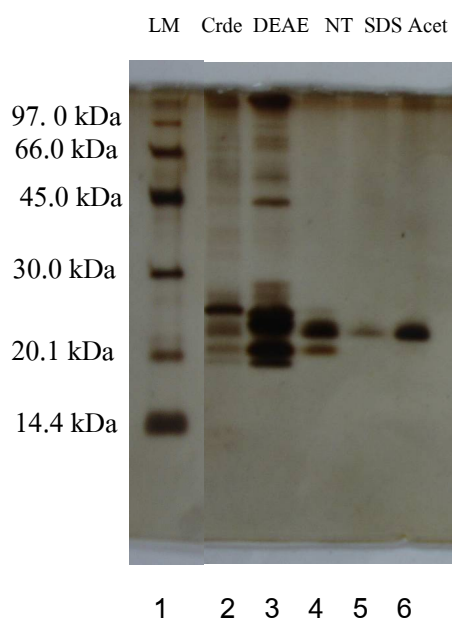
ตัวอย่างที่ได้ี้จะมี SDS เป็นส่วนผสมอยู่จึงไม่สามารถทดสอบแอกติวิตี้ของ PIs ได้ จึงต้องกำจัด SDS ออกไปก่อนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ซึ่งต้อง pool รวมตัวอย่างจากแต่ละแถบโปรตีน คือหลอดที่ 1-5, 7-11, 13-17, 31-35, 45-49 และ 95-105 นำตัวอย่างที่ pool รวมกันจากแต่ละหลอดมาเติมซูโครส 4% แล้วจึงนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน หลังจากระเหยอะซีโตนให้แห้งจึงนำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายกลับด้วยน้ำกลั่นและทดสอบการยับยั้งต่อสับติลินซินเอ พบว่าตัวอย่างที่ pool รวมกันจากหลอดที่ 95-105 ให้ผลการยับยั้งค่อนข้างสูง (รูปที่ 3.20) นั่นคือตัวอย่างที่ pool รวมกัน ในช่วงดังกล่าวเป็นแถบโปรตีนของ PIs



รูปที่ 3.20 เปอร์เซนต์การยับยั้งสับติลิตินเอจากตัวอย่างที่ pool รวมกัน เมื่อ 1-5 : ตัวอย่างหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 5, 7-11 : ตัวอย่างหลอดที่ 7 ถึงหลอดที่ 11, 13-17 : ตัวอย่างหลอดที่ 13 ถึงหลอดที่ 17, 31-35 : ตัวอย่างหลอดที่ 31 ถึงหลอดที่ 35, 45-49 : ตัวอย่างหลอดที่ 45 ถึงหลอดที่ 49 และ 95-105 : ตัวอย่างหลอดที่ 95 ถึงหลอดที่ 105

เมื่อนำโปรตีนจากแต่ละชั้นการทำบริสุทธิ์มาทดสอบแบบแผนโปรตีนจากแต่ละชั้น พบว่าให้ผลการทดสอบดังรูปที่ 3.21 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแถบโปรตีนลดลงไปในแต่ละชั้นการทำบริสุทธิ์ จนเหลือแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวมีขนาดโมเลกุล 25.12 kDa คิดเป็นปริมาณโปรตีน  $3.14 \times 10^{-3}$  mg/g ซึ่งเป็นแถบโปรตีนของ PIs ที่มาจากเซลล์แขวนลอย ยางพาราพันธุ์ BPM-24 และมีคุณสมบัติในการยับยั้งสับติลิตินเอ แต่ไม่ยับยั้งทริปซินและโคโมทริปซิน

Kanokwiroon และคณะ (2007) สกัดแยกโปรตีนจาก B-serum ของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM-600 พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาดเล็ก 4.7 kDa และเป็นโปรตีนชนิด hevein ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดซิสเตอีนสูง (cysteine-rich protein) ขณะที่ Sritanyarat และคณะ (2006) สกัดแยก PIs จาก C-serum ของน้ำยางพันธุ์เดียวกันได้สามไอโซฟอร์ม คือ HPI-1, HPI-2a และ HPI-2b โดยมีขนาดโมเลกุล  $14,893 \pm 10$ ,  $7757 \pm 5$ , และ  $7565 \pm 5$  Da ตามลำดับ ซึ่ง HPI-1 ที่มีขนาด  $14,893 \pm 10$  Da เมื่อทดสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยระบบ Tricine-SDS-PAGE ในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์จะมีหน่วยย่อยที่มีขนาด 7 kDa ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โดย PIs ที่แยกได้มีคุณสมบัติในการยับยั้งทั้งเอนไซม์ทริปซิน และสับติลิติน แต่ให้ผลการยับยั้งสับติลิตินสูงกว่า แต่ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์โคโมทริปซิน

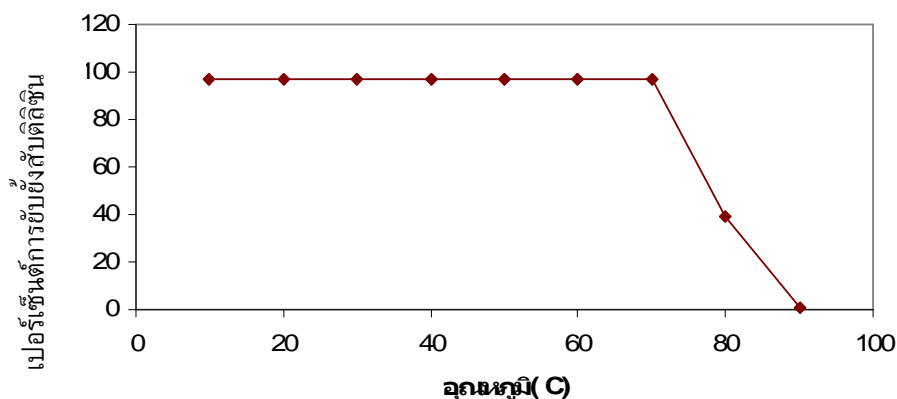


รูปที่ 3.21 แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างแต่ละขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ หลังจากทำอิลโคโตรโฟริซิสแบบแปลงสภาพและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรทเมื่อ lane 1 : Low molecular weight ของบริษัท Amersham (14.4 - 97 kDa), lane 2 : crude, lane 3 : ตัวอย่างจากคอลัมน์ ion-exchange ที่ชะด้วยเกลือ 0.06 M, lane 4 : ตัวอย่างผ่านคอลัมน์ Native-preparative gel electrophoresis (ตัวอย่างจากหลอด 91 – 111), lane 5 : ตัวอย่างซึ่งผ่าน SDS-preparative gel electrophoresis (ตัวอย่างจากหลอด 95-105) และ lane 6 : ตัวอย่างจากหลอด 95-105 ซึ่ง pool รวมและตกตะกอนด้วยอะซีโตน

### 3.5 การศึกษาคุณสมบัติของ PIs

#### 3.5.1 ศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของ PIs

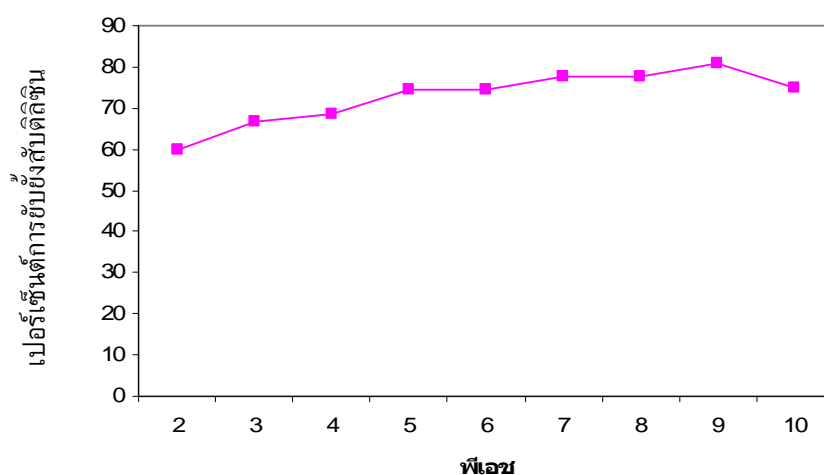
นำ PIs ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จนเหลือแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว มาทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C โดยนำ PIs ที่แยกได้ปริมาณ 0.314 µg มาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปรับอุณหภูมิโดยการแช่ในกระบอกน้ำแข็งก่อนนำไปวัดแอกติวิตี PIs พบว่า PIs ที่ได้จากส่วนที่ส่งออกมาจากเซลล์ของเซลล์แขวนลอยอย่างพาราสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 80 °C (รูปที่ 3.22) ซึ่ง ณ อุณหภูมิจุดนี้ PIs ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ประมาณ 50 % นั้นแสดงว่า PIs ที่ได้จากส่วนที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ของเซลล์แขวนลอยอย่างพารามีความทนอุณหภูมิค่อนข้างสูง



รูปที่ 3.22 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลลินของ PIs ที่บริสุทธิ์แล้ว ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C

### 3.5.2 ศึกษาความคงตัวที่ pH ต่าง ๆ

เมื่อศึกษาความคงตัวของ PIs ที่บริสุทธิ์แล้วที่พีเอชดังต่อไปนี้ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยใช้ PIs ปริมาณ 0.314  $\mu\text{g}$  ทดสอบผลการยับยั้งสับติลลินเอ พบว่า PIs ค่อนข้างเสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นเบส (คงทนต่อ pH 2-10) แต่จะทำงานได้ดีกว่าในสภาวะที่เป็นเบส และทำงานได้สูงสุดที่ pH 9 (รูปที่ 3.23) แสดงว่า PIs ที่ได้จากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ของเซลล์แขวนลอยอย่างพารามีความคงทนต่อ pH และจะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส

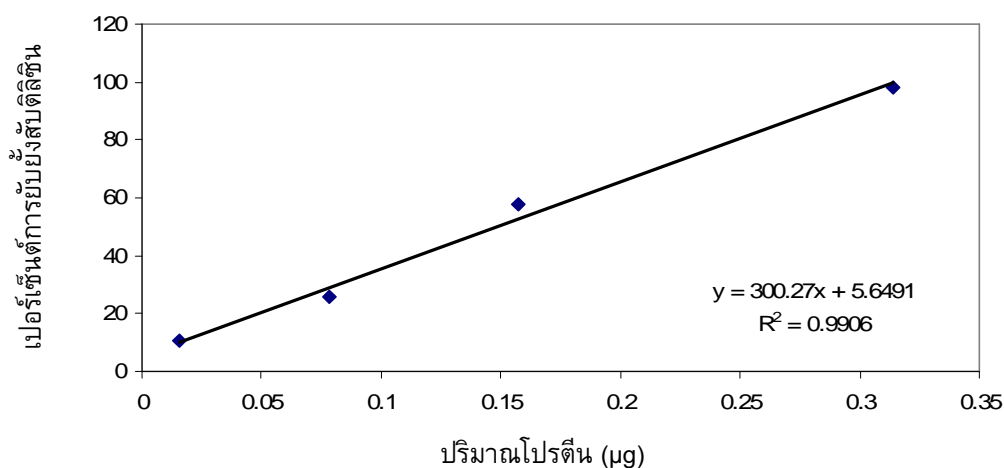


รูปที่ 3.23 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลลินของ PIs ที่บริสุทธิ์แล้ว ที่ pH 2-10

Seidl และคณะ (1978) ศึกษาความคงตัวของ Subtilisin inhibitor (SI) ที่ทำบริสุทธิ์แล้วจากเมล็ดถั่วดำ พบว่า SI ที่ได้มีขนาดโมเลกุล 10 kDa ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 90 °C และทำงานได้ดีในช่วง pH 7-11 เช่นเดียวกับ Mallokarjuna Rao. และคณะ (1983) สกัดแยก PIs จากหัว arrow root (*Maranta arundinaceae*) พบว่า PIs ที่แยกได้มีขนาด 12,000 Da และมีคุณสมบัติในการยับยั้งทริปซิน, ไคโมทริปซิน, เอนเทอโรไคเนส (enterokinase) และ เอนไซม์โปรตีเอสที่เตรียมจากตับอ่อน ซึ่งผลจากการศึกษาความคงทนต่ออุณหภูมิของ PIs พบว่าสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 100 °C เป็นเวลา 60 นาที และคงทนต่อ pH ในช่วงกว้าง (pH 1.0-12.5) โดยไม่สูญเสียแอกติวิตี

### 3.5.3 การศึกษา PIs ที่บริสุทธิ์แล้วจากเซลล์แขวนลอยของพาราที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสับติลินเอเป็นครึ่งหนึ่งของการยับยั้งทั้งหมด ( $IC_{50}$ )

ผลของการศึกษาหาค่า PIs ที่ผ่านการแยกจนบริสุทธิ์แล้ว นำมาทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่ให้ผลการยับยั้งสับติลินเอเป็นครึ่งหนึ่งของการยับยั้งทั้งหมด ( $IC_{50}$ ) โดยใช้ PIs ปริมาณต่างๆ คือ 0.0157, 0.0785, 0.157 และ 0.314  $\mu\text{g}$  ต่อการยับยั้งสับติลินเอ พบว่าค่า  $IC_{50}$  คือ 0.167  $\mu\text{g}$  คิดเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลยับยั้งสับติลินเอครึ่งหนึ่ง คือ 6.6 pmole (รูปที่ 3.24)

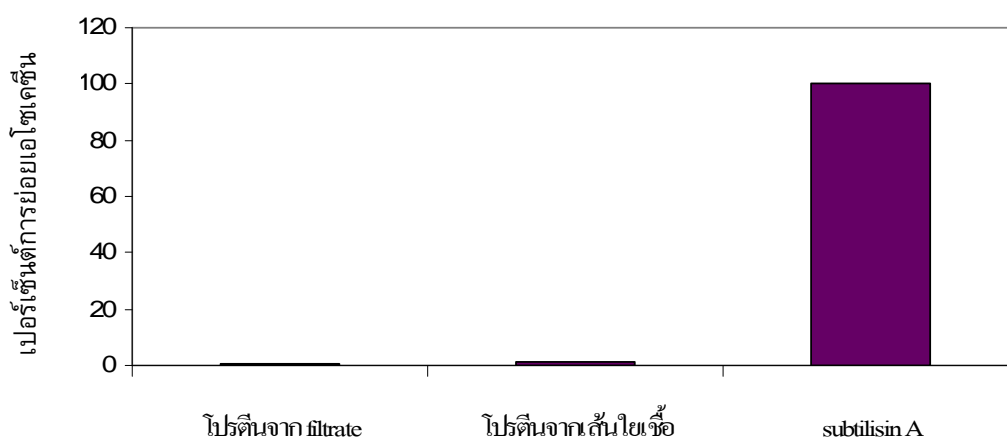


รูปที่ 3.24 ปริมาณ PIs ต่อการยับยั้งสับติลินเอ

### 3.5.4 ผลการยับยั้งโปรตีนเอสจากเชื้อ *P. palmivora* โดย Pls จาก

#### ยางพารา

จากการนำสารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (filtrate) และเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* ที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 90 % และผ่านการกำจัดเกลือด้วยคอลัมน์ PD-10 ทดสอบการย่อยเอโซเคซีน โดยเปรียบเทียบกับกรย่อยด้วยสับติลิสินเอ พบว่าสารสกัดโปรตีนจากเชื้อทั้งในส่วนของ filtrate และ เส้นใยไม่ย่อยสับสเตรทที่เป็นเอโซเคซีน (รูปที่ 3.25) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดโปรตีนยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอื่น ๆ อีกหลายชนิด และโปรตีนบางชนิดสามารถจับกับเอนไซม์โปรตีนเอสได้ ส่งผลให้โปรตีนเอสจากเชื้อไม่ย่อยสับสเตรทดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่สามารถศึกษาผลการยับยั้งของ Pls ต่อโปรตีนเอสจากเชื้อ *P. palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในยางพารา



รูปที่ 3.25 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยเอโซเคซีนของสารสกัดโปรตีนจากฟิลเตรท เส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และสับติลิสินเอ

Hermosa และคณะ (2006) ได้ศึกษาเอนไซม์เป้าหมายของ pathogen ที่ Pls จะเข้าไปยับยั้ง โดยศึกษาผลการย่อยสับสเตรทต่างๆของ filtrate จากเชื้อ *B. cinerea* เพื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรตีนเอสมาตรฐานคือ ทริปซินและ โคโมทริปซิน สับสเตรทที่ใช้ได้แก่ เอโซเคซีน, TEE (L-Tyrosine ethyl ester), BTEE (N-a-Benzoyl-L-Arg ethyl ester), TAME (N-a-p-Tosyl-L-Arg-methyl ester), p-NGB (p-Nitrophenyl-p0-guanidine benzoate) หรือ pNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide) พบว่าโปรตีนเอสจากเชื้อย่อย azocasein และ pNA ซึ่งให้ผลการย่อยเช่นเดียวกับโคโมทริปซิน ดังนั้น filtrate จากเชื้อจึงมีคุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีนเอสแบบโคโมทริปซิน

สำหรับผลการศึกษาของผู้วิจัยนั้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าสารสกัดโปรตีนจากเชื้อเป็นเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดใด เนื่องจากโปรตีนที่นำมาทดสอบเป็น crude โปรตีน

ซึ่งยังไม่พบแอกติวิตี้ของโปรตีนเอส อีกทั้งสับสเตรทที่ใช้ในการศึกษาก็มีเพียงชนิดเดียวคือ เอโซเคซิน จึงไม่สามารถศึกษา ระบุลักษณะเฉพาะของโปรตีนเอสจากเชื้อที่สนใจได้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงควรทำบริสุทธิ์โปรตีนเอสจากเชื้อบางส่วนก่อนนำมาศึกษา และควรใช้สับสเตรทอื่นๆในการศึกษาเพิ่มขึ้นด้วย

### 3.5.5 การศึกษาผลของสารสกัด PIs ต่อการงอกของซุโอสปอร์ของ

#### เชื้อ *P. palmivora*

การศึกษาผลของสารสกัด PIs ต่อการงอกของซุโอสปอร์ หรือการงอกของเส้นใย (mycelium) ของเชื้อ *P. palmivora* โดยนำสารสกัด PIs ที่บริสุทธิ์แล้วคิดเป็นปริมาณโปรตีน 250 ng ผสมกับซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น  $5 \times 10^4$  spore/ml ในอัตราส่วน 4:1 คำนวณเป็นความเข้มข้นของสารสกัด PIs 100 nM แล้วบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตการงอกของซุโอสปอร์ ที่เวลาต่างๆ กัน นับจำนวนเชื้อลักษณะต่างๆเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่น พบว่าในชุดทดสอบซึ่งมีสารสกัด PIs ให้ผลยับยั้งการงอกของซุโอสปอร์ ซึ่งซุโอสปอร์ส่วนใหญ่ในชุดทดสอบไม่เกิดการงอกของซุโอสปอร์ (66%) และมีจำนวนซุโอสปอร์เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่การงอกของซุโอสปอร์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (3%) ขณะที่ในชุดควบคุมให้ผลการงอกของซุโอสปอร์ค่อนข้างสูง (73%) ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 เปรียบเทียบลักษณะการงอกของซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มด้วย PIs เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ลักษณะของ mycelium	ปริมาณเชื้อ (ความเข้มข้นเชื้อ $5 \times 10^4$ spore/ml)	
	%การงอกชุดควบคุม	%การงอกชุดทดสอบ
ไม่มีการงอกของ mycelium	27%	66%
Mycelium งอกเล็กน้อย	19%	19%
Mycelium งอกปานกลาง	37%	12%
มีการเติบโต mycelium เต็มที่	17%	3%

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง คิดจากจำนวนซุโอสปอร์ทั้งหมด 76 ซุโอสปอร์)

ลักษณะการงอกของ mycelium ของซุโอสปอร์ที่เวลาต่างๆกัน ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบแสดงดังตารางที่ 3.3 ซึ่งพบว่าในชุดควบคุม ซุโอสปอร์มีการงอก



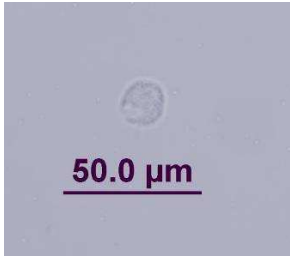
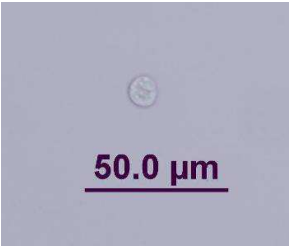



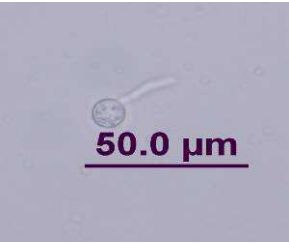


ของซุโอสปอร์ค่อนข้างสมบูรณ์ โดยลักษณะของซุโอสปอร์ที่งอกค่อนข้างยาวกว่าชุดทดสอบซึ่งมี Pls ผสมอยู่ และจำนวนเชื้อที่งอกได้ในชุดควบคุมสูงกว่าชุดทดสอบค่อนข้างมาก เมื่อสังเกตลักษณะของซุโอสปอร์หลังจากบ่ม Pls ผ่านไป 2 ชั่วโมงจะพบเศษเซลล์ที่เกิดจากการแตกของซุโอสปอร์ค่อนข้างมาก (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Pls เข้าไปจับกับผนังเซลล์ของซุโอสปอร์แล้วส่งผลให้การทำงาน หรือการผ่านเข้าออกของสารถูกรบกวน เมื่อตำแหน่งที่เข้าไปจับกับผนังเซลล์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ซุโอสปอร์สูญเสียหน้าที่การทำงานต่างๆ ส่งผลให้เกิดการรื้อของผนังเซลล์ เกิดเซลล์แตกได้ และสำหรับซุโอสปอร์ที่ยังไม่สูญเสียฟังก์ชันการทำงานเต็มรูปแบบก็ส่งผลให้เกิดการงอกของซุโอสปอร์ได้ แต่เป็นการงอกที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์แบบ

Wang, S. และคณะ (2006) ศึกษา Pls ที่สกัดจากถั่วงอก พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านทั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ถึง 6 ชนิดได้แก่ *Physalospora piricola*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Botrytis cinerea*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotium rolfsii* และ *Fusarium oxysporum* ขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่สารสกัด Pls ยับยั้งคือ *Staphylococcus aureus* โดยมีปริมาณโปรตีนของสารสกัด Pls จากถั่วงอกที่ให้ผลยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. rolfsii* เป็นครึ่งหนึ่ง ( $IC_{50}$ ) คือ  $6.2 \mu M$  ส่วนความเข้มข้นของ Pls ที่ให้ผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* คือ  $0.23 \mu M$  และจากการศึกษาเพิ่มเติมยังพบว่าสารสกัด Pls ที่ได้ สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย ผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโครงสร้างของเชื้อราด้วยวิธี Light microscopic โดยเปรียบเทียบระหว่างชุดทดสอบ (ผสม Pls ลงในเชื้อ) กับชุดควบคุม (การเติบโตของเชื้อโดยปกติ) พบว่าในชุดทดสอบภายใต้การส่องด้วยกล้องแสดงให้เห็นถึงการรื้อของผนังเซลล์ของเชื้อราที่ทดสอบ ส่งผลให้เกิดการไหลของไซโตพลาสซึม Wang, S. และคณะ (2006)

Kanokwiroon, K. และคณะ (2007) ศึกษาสารสกัดโปรตีนจากน้ำยางพารา ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดโปรตีนจาก B-serum ของน้ำยาง คือ hevein มีขนาดโมเลกุล  $4.7 \text{ kDa}$  และเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนภายในโมเลกุลอยู่สูง (cysteine-rich protein) โปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ *Candida albicans*, *Candida tropicalis* และ *Candida krusei* โดยมีค่า MIC (microbial inhibition concentration) ของ hevein สำหรับการยับยั้งเชื้อ *C. tropicalis* สายพันธุ์ ATCC 750, *C. albicans* สายพันธุ์ ATCC 10231 และ *C. krusei* สายพันธุ์ ATCC 6258 เท่ากับ  $12 \mu g \text{ ml}^{-1}$ ,  $95 \mu g \text{ ml}^{-1}$  และ  $190 \mu g \text{ ml}^{-1}$  และยังพบว่า hevein ความเข้มข้น  $30 \mu g \text{ ml}^{-1}$  ส่งผลให้  $Ca^{2+}$  ไหลมารวมกัน ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อประกอบด้วย chitin,  $(1, 3)\beta\text{-D-glucan}$ ,  $(1,6)\beta\text{-D-glucans}$ , lipids และ peptides ขณะที่ hevein เป็นโปรตีนขนาดเล็กซึ่งจับกับไคติน (chitin-binding protein) จึงมีเป้าหมายในการจับกับไคตินที่ผนังเซลล์เชื้อ และผนังเซลล์ของเชื้อเองพบว่าโปรตีนใด ๆ ก็ตามที่มี pore size ขนาดใหญ่กว่า  $15\text{--}20 \text{ kDa}$  ไม่

สามารถผ่านเข้าออกได้ แต่ hevein ซึ่งมีขนาด 4.7 kDa สามารถผ่านเข้าออกได้ ซึ่งสังเกตได้จากการไหลมารวมกันของ  $\text{Ca}^{2+}$

ตารางที่ 3.3 ภาพแสดงการงอกของซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* เปรียบเทียบระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุมที่เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
0		
0.5		
1		
2		

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

#### 1. การศึกษา PIs ในเซลล์แขวนลอยของยาราก (*H. brasiliensis*)

- สารสกัด PIs จากเซลล์แขวนลอยของยารากพันธุ์ BPM-24 ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สับติลินเอ แต่ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและ ไคโมทริปซินเมื่อใช้เอโซเคซินเป็นสับสเตรท แสดงว่า PIs มีความจำเพาะต่อเอนไซม์สับติลินเอ และมีเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมายชนิด subtilisin-like

- เมื่อศึกษา PIs จากส่วนต่างๆของยารากคือ เซลล์แขวนลอย, เมล็ดอ่อน และใบที่ระดับอ่อนแก่ต่างกัน (ใบระยะ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-C และ D) ของยารากพันธุ์ BPM-24 ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเซลล์แขวนลอย และสารสกัดจากใบอ่อนให้ผลการยับยั้งเฉพาะเอนไซม์สับติลินเอ โดยไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน หรือไคโมทริปซิน และตัวอย่างจากใบยารากมีการสะสมของ PIs สูงที่สุด โดยปริมาณ PIs ในใบจะค่อยๆลดลงเมื่อใบมีอายุเพิ่มมากขึ้นหรือมีความหนาของคิวตินมากขึ้น ส่วนเซลล์แขวนลอยของยารากมีการสะสมของ PIs รองลงมา และในเมล็ดอ่อนไม่พบการสะสมของ PIs

#### 2. การศึกษา PR-proteins ที่ผลิตโดยเซลล์แขวนลอยของยาราก และที่ส่งออกมานอกเซลล์ (ส่วนของ MES บัฟเฟอร์)

- เมื่อศึกษาผลของการเขย่าเซลล์แขวนลอยใน MES บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกับเวลาเริ่มต้น พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งในส่วนของสารสกัดเซลล์แขวนลอย และที่เซลล์แขวนลอยส่งออกมานอกเซลล์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนจากทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าวิธีการเขย่าเซลล์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์หรือโปรตีนในเซลล์แขวนลอยเพียงเล็กน้อยดังนั้นจึงสามารถใช้ MES เป็นบัฟเฟอร์ในชุดควบคุมได้

- ปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยของยารากที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากผลของการเขย่าใน MES บัฟเฟอร์ เพิ่มสูงขึ้นจากเวลาเริ่มต้นประมาณสอง และสี่เท่าตามลำดับ ขณะที่และปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ส่งออกมานอกเซลล์ในทั้งสองช่วงเวลา มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แสดงว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมีบทบาทการทำงานอยู่ภายในเซลล์มากกว่าส่งออกมานอกเซลล์

- เมื่อเขย่าเซลล์แขวนลอยใน MES บัฟเฟอร์ทิ้งไว้นานขึ้น ส่งผลให้แอกติวิตี้ของ PIs เพิ่มขึ้น ทั้งในส่วนของเซลล์แขวนลอย และที่ส่งออกมาจากเซลล์ โดยแอกติวิตี้ของ PIs จากส่วนที่ส่งออกมาจากเซลล์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าจากเนื้อเซลล์แขวนลอย แสดงว่า PIs ผลิตเพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในระบบป้องกันตนเองของพืชเมื่อถูกกระตุ้นจากการเขย่า

### 3. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต (อไบโอติกอลิซิเตอร์) กับเซลล์แขวนลอยอย่างพาราต่อ PIs

- การกระตุ้นเซลล์แขวนลอยอย่างพาราด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 20, 40, 80 และ 160  $\mu\text{M}$  พบว่าคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ทั้งตัวอย่างจากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมาจากเซลล์ ให้ผลการยับยั้งเอนไซม์สับติลลิตินเอนสูงที่สุด โดยไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ ดังนั้นคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยเพื่อใช้ในการศึกษา PIs จากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา

- เมื่อนำความเข้มข้นที่ได้คือ 20  $\mu\text{M}$  มาศึกษาผลของเวลา โดยการกระตุ้นที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 และ 96 ชั่วโมงแล้วเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุม (0  $\mu\text{M}$ ) และชุดทดสอบ (20  $\mu\text{M}$ ) พบว่าในชุดทดสอบให้ผลการยับยั้งสูงสุดเมื่อบ่มทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ขณะที่ชุดควบคุมให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่เวลา 64 ชั่วโมง ซึ่งตัวอย่างจากทั้งสองแหล่งคือจากเซลล์แขวนลอยอย่างพารา และที่ส่งออกมาจากเซลล์ทั้งสอง ชุดการทดลองให้ผลการยับยั้ง ณ ช่วงเวลาเดียวกัน คือ ชุดทดสอบที่ 48 ชั่วโมง และชุดควบคุมที่เวลา 64 ชั่วโมง ดังนั้นการกระตุ้นเซลล์แขวนลอยด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเป็นสภาวะที่ใช้ในการศึกษา PIs

- ผลการทดสอบเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์แขวนลอยอย่างพารา เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสับติลลิตินเอนได้ดีขึ้น โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และอะซีโตน ในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0-40%, 40-60%, 60-70% และ 70-90% พบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน จะให้ผลยับยั้งการทำงานของสับติลลิตินเอนสูงที่สุดในช่วงความเข้มข้น 60-70% และ 70-90% ขณะที่การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40-60% ให้ผลยับยั้งการทำงานของสับติลลิตินเอนสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาแถบโปรตีนแล้วพบว่าการตกตะกอนด้วยอะซีโตนให้แถบโปรตีนลดลงจากเดิมค่อนข้างมาก ขณะที่การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตยังมีแถบโปรตีนอีกมาก แต่การตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตนยังส่งผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพค่อนข้างมาก เพื่อหลีกเลี่ยง

ปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงใช้ตัวอย่างจากส่วนที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์เพราะมีปริมาณโปรตีนรวมต่ำ แต่มีแอกติวิตีของ PIs ค่อนข้างสูง มาศึกษาการทำบริสุทธิ์ต่อไป

#### 4. การทำบริสุทธิ์ PIs

- ตัวอย่างส่วนที่ส่งออกมาจากเซลล์หลังกระตุ้นด้วย 20  $\mu$ M คอปเปอร์ซัลเฟตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B ซึ่งใช้อัตราการไหล 0.5 ml/min เก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml และชะคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือ NaCl 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 และ 0.2 M ใน 20 mM Tris-HCl pH 7.0 ตรวจพบปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นเกลือ 0.05, 0.06, 0.07, 0.08 และ 0.2 M แต่ตรวจพบแอกติวิตีของ PIs เมื่อชะด้วยความเข้มข้นเกลือ 0.06 M (ตัวอย่างจากหลอดที่ 45-60)

- หลังจากนำตัวอย่างที่ pool รวมจากหลอดที่ 45-60 มาผ่านการแยกต่อโดยผ่านวิธี preparative gel electrophoresis แบบไม่แปลงสภาพ พบว่าตัวอย่างตั้งแต่หลอดที่ 91 ถึงหลอด 111 ให้ผลการยับยั้งสับติลลินเอ และเมื่อพิจารณาแถบโปรตีนในช่วงดังกล่าวแล้ว พบว่ายังมีแถบโปรตีนอีกสองแถบ ซึ่งมีระยะห่างกันพอสมควร

- เมื่อนำตัวอย่างจากหลอดที่ 91 – 111 มาผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ขั้นต่อไปโดยวิธี Preparative gel electrophoresis แบบแปลงสภาพ พบว่าตัวอย่างที่ได้จากการผ่านทำบริสุทธิ์ดังกล่าวจะมี SDS เป็นส่วนผสมอยู่จึงไม่สามารถทดสอบแอกติวิตีของ PIs ได้ จึงต้องกำจัด SDS ออกไปก่อนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยอะซีโตน และกำจัดอะซีโตนออกด้วยการระเหย ซึ่งต้อง pool รวมตัวอย่างจากแต่ละแถบโปรตีน คือหลอดที่ 1-5, 7-11, 13-17, 31-35, 45-49 และ 95-105 แล้วจึงตกตะกอน และทดสอบการยับยั้งต่อสับติลลินเอพบว่าตัวอย่างที่ pool รวมกันจากหลอดที่ 95-105 ให้ผลการยับยั้งค่อนข้างสูง เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งมีขนาดโมเลกุล 25.12 kDa คิดเป็นปริมาณโปรตีน  $3.14 \times 10^{-3}$  mg/g กรัมเซลล์แขวนลอย

#### 5. การศึกษาคุณสมบัติของ PIs

- หลังการทดสอบความคงตัวของ PIs ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C พบว่า PIs ที่ได้จากส่วนที่ส่งออกมาจากเซลล์ของเซลล์แขวนลอย ย่างพาราสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 80 °C

- เมื่อศึกษาความคงตัวของ PIs ที่บริสุทธิ์แล้วที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 พบว่า PIs ค่อนข้างเสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นเบส (คงทนต่อ pH 2-10) แต่จะทำงานได้ดีกว่าในสภาวะที่เป็นเบส และทำงานได้สูงสุดที่ pH 9

- ผลการทดสอบหาปริมาณโปรตีนของ PIs ที่ให้ผลการยับยั้งสับติลินเอนเป็นครั้งหนึ่งของการยับยั้งทั้งหมด (IC<sub>50</sub>) โดยใช้ PIs ปริมาณต่างๆ คือ 15.7, 78.5, 157 และ 314 ng ต่อการยับยั้งสับติลินเอน พบว่าค่า IC<sub>50</sub> คือ 0.167 µg หรือคำนวณเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลยับยั้งสับติลินเอนครั้งหนึ่ง คือ 6.6 pmole

- ผลของสารสกัด PIs ต่อการงอกของซุโอสปอร์ หรือการงอกของเส้นใย (mycelium) ของเชื้อ *P. palmivora* โดยนำสารสกัด PIs ที่บริสุทธิ์แล้วคิดเป็นปริมาณโปรตีน 250 ng ผสมกับซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น  $5 \times 10^4$  spore/ml ในอัตราส่วน 4 : 1 คิดเป็นความเข้มข้น 100 nM เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่น พบว่าในชุดทดสอบซึ่งมีสารสกัด PIs ให้ผลยับยั้งการงอกของซุโอสปอร์ ซึ่งซุโอสปอร์ส่วนใหญ่ในชุดทดสอบไม่เกิดการงอกของซุโอสปอร์ (66%) และมีจำนวนซุโอสปอร์เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่การงอกของซุโอสปอร์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (3%) ขณะที่ในชุดควบคุมให้ผลการงอกของซุโอสปอร์ค่อนข้างสูง (73%)

- จากคุณสมบัติของ PIs ที่เลือกจับเอนไซม์โปรตีเอสเป้าหมายชนิด subtilisin-like มีขนาดโมเลกุล 25.12 kDa และมีความคงทนต่อ pH และอุณหภูมิ รวมทั้งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* จากลักษณะดังกล่าวซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับ PIs ในกลุ่ม Kunitz และ Potato type I จึงมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูงที่ PIs จะจัดอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งในสองกลุ่มนี้ ทั้งนี้เพื่อการระบุผลที่แน่นอน ควรนำ PIs ที่ได้ไปทดสอบหาลำดับกรดอะมิโนแล้วเทียบกับฐานข้อมูล เพื่อการระบุชนิดที่แน่นอนต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- จีระภา ชัยวงศ์. 2551. เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและการสลายสคอพอลิตินในใบและเซลล์แขวนลอยของยางพาราที่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อ *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ชวนพิศ นิยะกิจ. 2544. การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพาราและการปลูกถ่ายยีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นันทา เชิงเขาว์, เมธิณี รัตสาร และนิลุล บุญหวังช่วย. 2544. ปฏิกริยาตอบสนองของยางพาราต่อสปอร์และท็อกซินจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นารธิดา รอดโพธิ์ทอง. 2546. การคัดเลือกยีนพันธุ์ต้านทานจากเชื้อพันธุ์ (germplasm) โดยใช้ชูโอสปอร์และ ท็อกซินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิลุล บุญหวังช่วย. 2545. ผลของอิซิดินและชูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ต่อใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นिसافر มุหะมัด. 2551. การสะสมของเอนไซม์ฟีนอลอะลาซีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราหลังติดเชื้อรา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นุรอมาลี ดีนามอ. 2547. ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประสาทพร สมิตะมาน. 1991. โรคพืชวิทยา. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. กรุงเทพฯ. 337 หน้า.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 1995. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, 158 หน้า. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- พันธ์วศี แสงสุวรรณ. 2547. ปฏิกริยาตอบสนองของแคลลัสยางพาราต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เพ็ญมาศ นาคอุดม. 2006. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเมล็ดอ่อน แคลลัส และเซลล์แขวนลอยยางพารา กับซุโอสปอร์และอิลิซิดินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 2525. หลักวิชาโรคพืช, 386 หน้า. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2540. พฤษศาสตร์, 264 หน้า. อุบลราชธานี : ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.
- สมปอง เตชะโต. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำสายพันธุ์แท้ในยางพารา . ว. สงขลานครินทร์ 10 : 1-6 .
- สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ .พิมพ์ครั้งที่ 3 : 1-81 .
- อาภรณ์ สันตะโร. 2538. การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อารมณั์ โรจน์สุจิตร์, สุเมธ พฤษวรุณ , วันเพ็ญ พฤษวิวัฒน์ , ชูชาติ สวนกุล , สุเทพ บุญสิงห์ , ธนกร โทมณี และ ชีรชาติ วิชิตชลชัย. 2546. อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อการระบาดของโรคยางพารา. รายงานการวิจัยศูนย์วิจัยยางสงขลา.
- ไอนิง มุซอ, วิไลวรรณ โชติเกียรติ, อมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2551. การโคลนและศึกษาสมบัติของยีน protease inhibitor จากน้ำยางพารา (*Hevea brasiliensis*). ว.วิจัย มข (บศ) 8(2), เม.ย.-มิ.ย..12-17.



- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., and Vernet, G. 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce Grapevine defense reactions and resistance to Gray Mold and Downy Mildew. *Phytopathology* 96 : 1188-1194.
- Bhat, A.V. and Pattabiraman, T.N. 1989. Protease inhibitors from jackfruit seed (*Artocarpus integrifolia*). *J. Biosci* 14 (4) : 351–365.
- Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S. 1963. A pure trypsin inhibitor from soybean. *J. Biochem* 87 : 281-284.
- Bode, W. and Hubr, R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem* 204 : 433-451.
- 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.
- Chee, K.H. 1968. *Phytophthora* leaf disease in Malaysia. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 21 : 79-87.
- Christopher, 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.
- Churngchow, N. and Rattarasarn, M. 2000. The elicitor secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochem* 54 : 33-38.
- Churngchow, 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.
- Cleveland, T.E. and Black, L.L. 1982. Partial Purification of Proteinase Inhibitors from Wounded Tomato Plants. *Plant Physiol* 69 : 537-542.
- Cooper, R.M. and Williams, J.S. 2004. Elemental sulphur as an induced antifungal substance in plant defence. *J. Exp. Bot* 55: 1947-1953.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II: method and application to human serum protein. *Ann. NY. Acad. Sci* 121 : 404-427.
- Darvill, G. A. and Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 243-275
- 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.
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Luini, S., Gallerani, R. and Ceci, L.R. 2002. Plant-PIs : a database for plant protease inhibitors and there genes. *Nucleic Acid Research*, 30 (1) : 347-348.
- 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. and 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.
- 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*. Minnesota : APS Press 243-244.
- 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.
- 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. 1995. 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. 1995. 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 Gröppin, 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.

Sivakumar, S.G. 2000. Defense Signaling in Plants. *General/Article*. 43-53.

Guest, D. and Brown, J. 1997. Infection processes, epidemiology and crop loss assessment. *Plant Pathogens and Plant Diseases* : 246-286.

Gutierrez, M.C., Parry, A., Tena, M., Jorrián, J. and Edwards, R. 1994. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexin in sunflower. *Phytochem.* 38, 1185-1191  
 Hermosa, M.R., Turra, D., Fogliano, V., Monte, E. and Lorito, M. 2006. Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68 : 138-148.

Hen, K.S., Kauffmann, S., Alversheim, P. and Darvill, A.G. 1991. A soybean pathogenesis related protein with beta-1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragment from fungal wall. *J. Molecular Plant Microbe Interaction* 4: 545-552.

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

<http://www.gebhardt.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)

<http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm> (สืบค้นวันที่ 9/12/2551)

<http://www.rubberthai.com/information/Wichakan50/09.pdf> (สืบค้นวันที่ 24/11/2551)

<http://www.reothai.co.th/Para1.htm> (สืบค้นวันที่ 3/10/2551)

<http://th.wikipedia.org/wiki/ยางพารา> (สืบค้นวันที่ 21/6/2551)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora> (สืบค้นวันที่ 13/7/2551)

<http://dmd.nihs.go.jp/latex/defense-e.html> (สืบค้นวันที่ 15/11/2551)

Habib, H. and Fazili, K.M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 2 (3) : 68-85.

Ibuki, F., Kotaru, M. and Katsurada, A. 1980. An improved method for the purification of eggplant trypsin inhibitor. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 23 : 133-143.

Jouilli, H. and El Ferjani, E. 2003. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus L.*) stressed with copper excess. *C. R. Biologies.* 326 : 639–644.

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.

Kanyanatt, K., Teanpaisan, R., Wititsuwannakul, D., Hooper, A.B. and Wititsuwannakul, R. 2007. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. *Mycoses.* 51 : 301–307.

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.
- Laskowski, M. and Kato, I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.*, 49 : 593-626.
- Lee CF, Lin JY 1995. Amino acid sequences of trypsin inhibitors from the melon *Cucumis melo*. *J. Biochem.* 118 (1) : 18-22.
- Legrand, M., Kuaffmann, S., Geoffroy, P. and Fritic, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis related-proteins and chitinases. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA.* 84 : 6750-6754.
- 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.
- Maki, Z., Tashiro, M. and Sugihara, N. 1980. Double-headed nature of a trypsin inhibitor from rice bran. *Agric. Biol. Chem.*, 44 : 953-955.
- Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Purification and characterization of two chitinases and two  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiol* 87 : 325-333.
- Mayer, A.M., Staples, R.C. and Gil-ada N.L. 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58 : 33-41.
- Mitsunaga, T. 1979. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from wheat germ. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 25 : 43-52.
- 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.

- Mallikarjuna Rao, N., Nayana Rao, H. and Pattabiraman, T. N. 1983. Enzyme inhibitors from plants. Isolation and characterization of a protease inhibitor from arrow root (*Maranta arundinaceae*) tuber. J. Biosci., 5 : 21—33.
- Nowak, K. 1981. Trypsin inhibitor III from squash seeds (*Cucurbita maxima*), its reactive site and propose amino acid sequence. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362 : 1017-1019.
- Odani, S., Ono, T. and Ikenaka, T. 1979. Proteinase inhibitors from a Mimosoidae, *Albizia julibrissin* homologues of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). J. Biochem. (Tokyo), 86 : 1795-1805.
- Pomar, F., Bernal, M.A., Diaz, J. and Merino, F. 1997. Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. Phytochemistry 46 : 1313-1317.
- Selitrennikoff , P.C. 2001. Antifungal Proteins. Applied and environmental microbiology. 67 (7) : 2883–2894.
- Ramos, R.L. B., Tovar, F. J., Junqueira, R. M. and Fabiane, B. 2001. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. Genetics Mol Biol. 24 : 235-241.
- Rattarasarn, M. 2003. Defense response of *Hevea brasiliensis* leaves against zoospores and elicitor from *phytophthora palmivora*. Ph. D. of Science Thesis. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J. 2004. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acid Res, 32 Database issue: D : 160-164.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors, J. Biochem. 378 : 705-716.
- Robert, W. K. and Selitrennikoff, C. P. 1986. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. J. Cell Biochem. Suppl.10 : 26.

- 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.
- Ryan, C.A. 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 28 : 425-449
- Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Ravishankar, G.A. 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41 : 50–60.
- Seidl, D.S., Hugo, A. and Jaffe, W.G. 1978. Purification of a subtilisin inhibitor from black bean seeds. *Febs Letters*. 92 (2) : 245-250.
- Shu-Guo FAN and Guo-Jiang WU. 2005. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46 : 273-292.
- Sritanyarat, W., Pearce, G., Siems, W.F., Ryan, C.A., Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. 2006. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 67 : 1644–1650.
- Sugiuru, M., Ogiso, T., Takenti, K., Tamura, S. and Akira, I. 1973. Studies on trypsin inhibitors in sweet potato I. Purification and some properties. *Biochem. Biophys. Acta.*, 328 : 407-417.
- Swartz, M.J., Mitchell, H.L., Cox, D.J. and Reeck, G.R. 1977. Isolation and characterization of trypsin inhibitor from Opaque2-conr seed. *J. Biol. Chem.*, 252 : 8105-8107.
- Tan, A. M. and Low, F. C. 1975. Phytoalexin production by *Hevea brasiliensis* in response to infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on other



- fungi. In : Proceeding International Rubber Conference. Kuala Lumpur, Malaysia: 217-227.
- Tashiro, M. and Maki, Z. 1978. Partial purification and some properties of a trypsin inhibitor from rice bran. *Agric. Biol. Chem.*, 42 : 1119-1124.
- Valueva, T.A. and Mosolov, V.V. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against Phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 69 (11) : 1305-1309.
- Simmons, W.M., Ryan, C.A. 1977. Immunological identification of proteinase inhibitor I and II in isolated tomatoes leaf vacuoles. *PlantPhysiol.* 60 : 61-63.
- Wang, S., Lin, J., Ye, M., Bun, N.T., Rao, P., Ye, X. 2006. Isolation and characterization of a novel mung bean protease inhibitor with antipathogenic and anti-proliferative activities. *Peptides.* 27 : 3129 – 3136.
- 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.

ภาคผนวก

### 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

นำ PDA ปริมาณ 39 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 °C และเทใส่จานแก้วปราศจากเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 ml

### 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ V<sub>8</sub>

นำ V<sub>8</sub> ปริมาตร 200 ml ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 3 g เติมผงวุ้น 20 g ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลานาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 °C และเทใส่จานปราศจากเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 ml

### 3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวสูตร Henninger

นำส่วนประกอบดังต่อไปนี้ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 %, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025 %, Asparagine 0.1 %, Thiamine 0.0001 %, Yeast extract 0.05 % และ D-Glucose 2.5 % ผสมกันละลายให้เข้ากันดี แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลานาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำเชื้อมาลง

### 4. การเตรียมบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ Tris-Tricine (Tris-Tricine sample buffer)

เตรียมบัฟเฟอร์ตัวอย่างโดยการใช้ Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 ผสม Glycerol 2.4 ml, 10% SDS 1 ml, 2-mercaptoethanol 0.2 ml และ Coomassie brilliant blue G-250 0.5 % ปริมาตร 0.4 ml สุดท้ายปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml โดยการใช้ น้ำกลั่นปลอดไอออน (deionized water) 4 ml

### 5. การเตรียมสารตัวอย่าง Tricine-SDS-PAGE

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

### 6. การเตรียมโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (low molecular weight)

นำโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำมาเจือจางกับ Tris-Tricine sample buffer ในอัตราส่วน 1 : 20 ต่อมานำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปใช้ครั้งละ 10 µl ต่อ 1 ช่องเจล

## 7. การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด

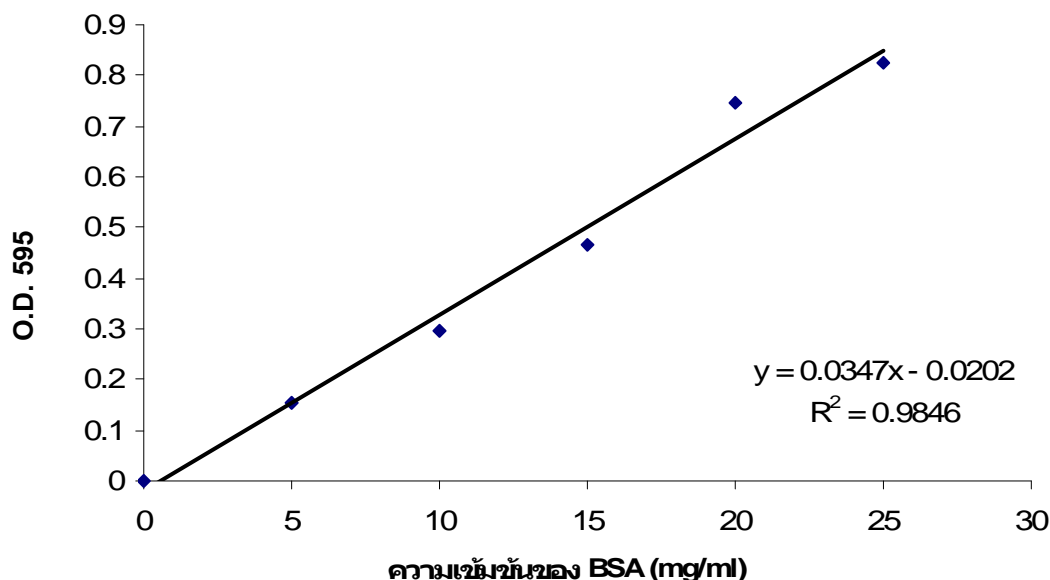
ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 mg ในเอทานอล 95 % ปริมาตร 50 ml จากนั้นเติม phosphoric acid 85 % ปริมาตร 100 ml คนให้เข้ากันแล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

## 8. การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน

ละลาย BSA จำนวน 1 mg ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25  $\mu\text{g}$  ต่อ 100  $\mu\text{l}$

## 9. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

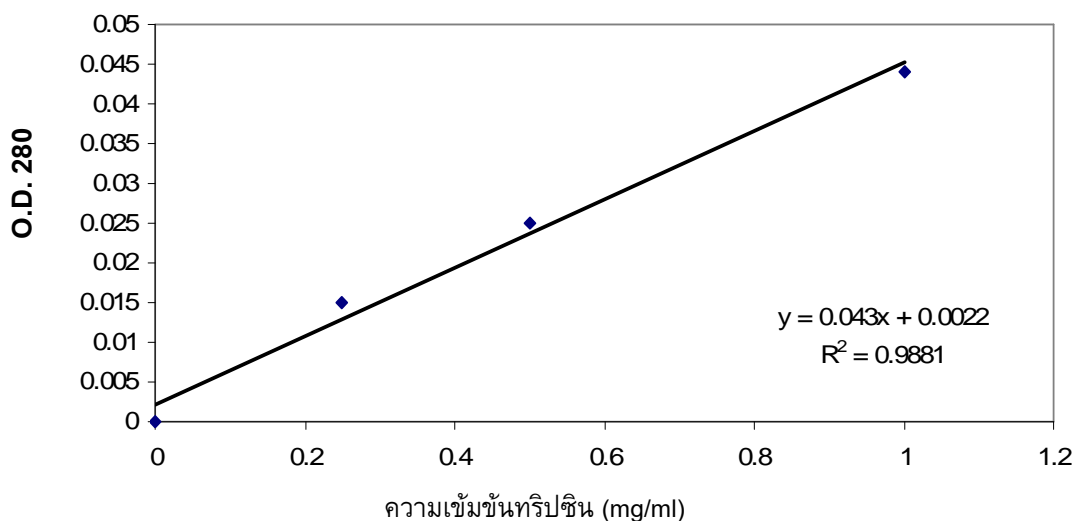


กราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA) โดยใช้ปริมาณของโปรตีน BSA เป็น 5, 10, 15, 20 และ 25  $\mu\text{g}$  อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรเมื่อ  $R^2$  คือสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination) หรือสัดส่วนหรือร้อยละที่ตัวแปรอิสระ (X) สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม (Y) ได้ ในการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย (simple regression) ใช้สัญลักษณ์  $R^2$  ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้าค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่า X สามารถอธิบายการ

เปลี่ยนแปลงของ Y ได้มาก ถ้าค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่า X สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของ Y ได้น้อย

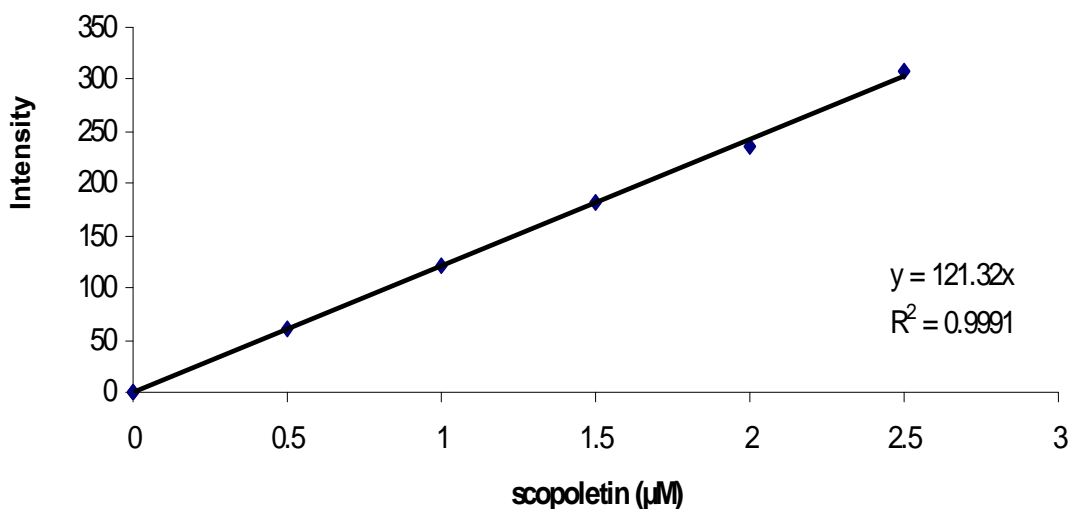
#### 10. การเตรียมกราฟมาตรฐานทริปซินเพื่อหาปริมาณโปรตีนที่ O.D. 280

เตรียมทริปซินความเข้มข้น 0.25, 0.50, 0.1 และ 1.5 mg/ml โดยละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟมาตรฐาน



#### 11. การเตรียมสคอพอลิตินมาตรฐาน

ละลายสคอพอลิติน จำนวน 96.1 mg ใน เอทานอล 95 % 10 ml จะได้สคอพอลิตินที่มีความเข้มข้น 50 mM จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย สคอพอลิตินแบบ serial dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสคอพอลิตินเท่ากับ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05  $\mu$ M ตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น ( $\lambda$  excitation) 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย ( $\lambda$  emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของ สคอพอลิติน กราฟมาตรฐานสคอพอลิติน โดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินเป็น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05  $\mu$ M 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

## 12. การเตรียมลามินาริน

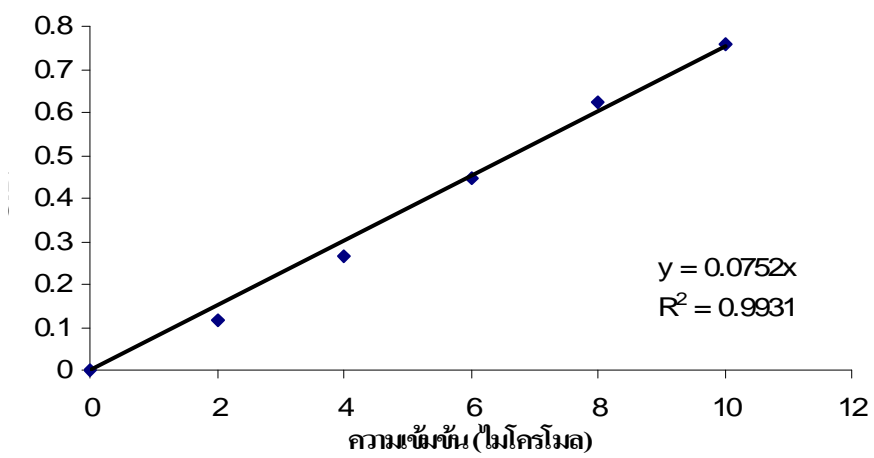
ละลายลามินารินจำนวน 0.1 g ใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 25 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จะได้สารซบสเตอร์ที่มีความเข้มข้น 4 mg/ml

## 13. การเตรียมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย DNS 5 g ใน 2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 ml ที่อุณหภูมิ 80-90 °C แล้วเติมสารละลายโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เตรต (จำนวน 150 g ซึ่งละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 250 ml) ลงไปในขณะที่ยังร้อนอยู่คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำให้ครบ 500 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง (Burner, R. L. 1964 )

## 14. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ละลายน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1.94 g ใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 100 ml จะได้ 0.1 M ของน้ำตาลกลูโคส หลังจากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{mole}$  ตามลำดับ นำ 100  $\mu\text{l}$  ของแต่ละความเข้มข้นไปเติมสารละลาย DNS 0.2 ml และ 0.1 M โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 ปริมาตร 0.2 ml แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำกลั่นอีก 1 ml ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10  $\mu\text{mole}$  อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวอรรวรรณ บุญยะแต่ง	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4910220096	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตรเคมี)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2548

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประเภททุนอุดหนุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2549

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อรรวรรณ บุญยะแต่ง และ นันทา เชิงเขาวี. 2551. การสะสม Pls ในเซลล์แขวนลอยอย่างพาราหลังถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช.