3. ผลและวิจารณ์การทดลอง

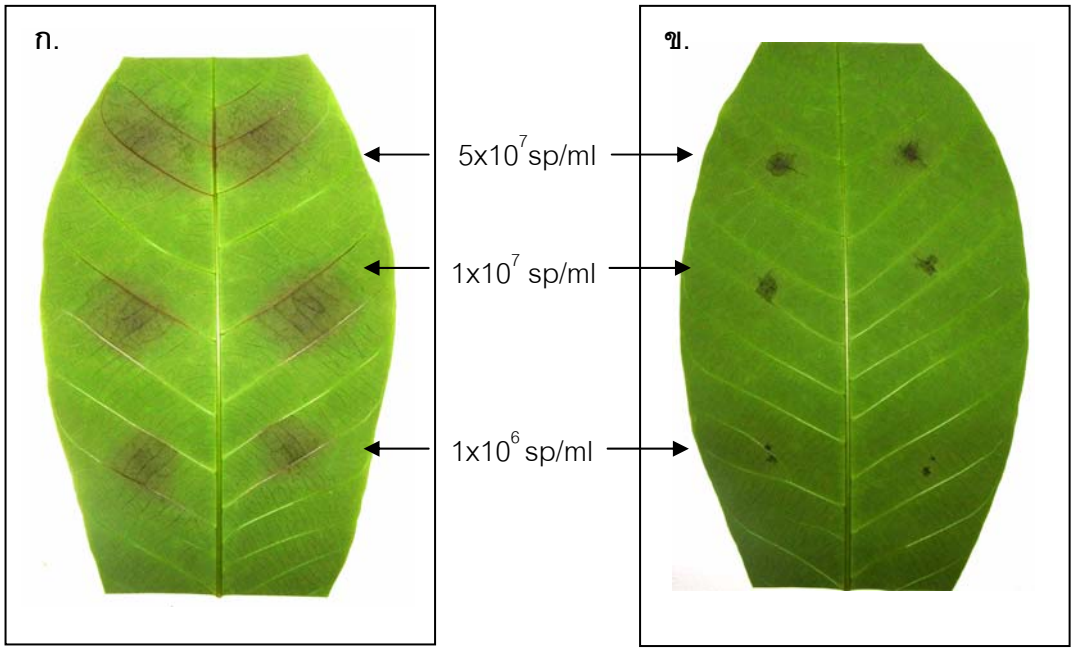
3.1 ผลการศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้ (necrosis) หลังจากกระตุ้นใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

นำซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร หยดบนหลังใบของใบยางพันธุ์ RRIM600 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมงเห็นรอยไหม้ได้ชัดเจนและขนาดของรอยไหม้มีความแตกต่างกันตามความเข้มข้นของซูโอสปอร์ของ เชื้อรา *P. palmivora* มากที่สุด เมื่อเรียงขนาดรอยไหม้ตามลำดับความเข้มข้นของซูโอสปอร์จากน้อยไปมาก เท่ากับ 1.25 $\pm$ 0.17, 1.78 $\pm$ 0.26 และ 2.44 $\pm$ 0.22 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และรูปที่ 19ก, 20) เนื่องจากใบยางพันธุ์ RRIM600 เป็นพันธุ์อ่อนแอ เมื่อดูผลหลังจาก 96 ชั่วโมงจะเห็นรอยไหม้ลามทั้งใบจึงไม่สามารถวัดขนาดของรอยไหม้ได้ ลักษณะรอยไหม้ที่มีขนาดใหญ่และแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ เช่นนี้แสดงถึงการเกิดโรค ซึ่งปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อนแอคือ ปฏิกิริยา compatible แต่ถ้าเป็นใบยางพันธุ์ต้านทานสามารถกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ทำให้เห็นขนาดรอยไหม้เล็กและมีขอบเขตที่ชัดเจน เรียกปฏิกิริยาที่เกิดในพันธุ์ต้านทานนี้ว่าปฏิกิริยา incompatible

ในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อหยดซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เห็นขนาดรอยไหม้เล็กมาก (รูปที่ 19 ข) จึงสังเกตที่เวลา 72 ชั่วโมงเห็นขนาดรอยไหม้ได้ เท่ากับ 0.57 $\pm$ 0.19 เซนติเมตร ซึ่งเล็กกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 4.3 เท่า ทำนองเดียวกับใบยางพาราพันธุ์เดียวกัน เมื่อหยดซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. botryosa* ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่ 72 ชั่วโมง จะเห็นขนาดรอยไหม้เล็กกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 2 เท่า (นิลุบล บุญหวังช่วย, 2545) แต่จากการทดลองของนารถธิดา รอดโพธิ์ทอง (2546) ที่ใช้ซูโอสปอร์ความเข้มข้นเดียวกันกับใบยางพันธุ์นี้ วัดขนาดรอยไหม้ได้เพียง 0.34 $\pm$ 0.21 เซนติเมตร ที่ 72 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าในการทดลองของนารถธิดาใบยางเกิดรอยไหม้ขนาดเล็กกว่ารอยไหม้ที่วัดได้ในการทดลองนี้มาก เนื่องจากใบยางที่ใช้ในช่วงนั้นผู้วิจัยได้ปลูกและควบคุมดูแลเอง แต่การทดลองนี้ใบยางเก็บจากศูนย์วิจัยยางซึ่งปลูกรวมกับแปลงอื่นๆ อาจมีการติดเชื้อในธรรมชาติ การเกิดรอยไหม้จึงเริ่มเปลี่ยนจาก incompatible เป็น compatible จากผลการทดลองข้างต้นเมื่อใบยางพันธุ์ต้านทานถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นเท่ากันก็สามารถกักบริเวณแผลที่เกิดจากเชื้อไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ดีกว่าพันธุ์อ่อนแอ แสดงให้เห็นถึงความสามารถของใบยางพันธุ์ต้านทาน ที่สามารถกักบริเวณเชื้อโรค ทำให้เกิดรอยไหม้แบบ

incompatible หรือ เกิด hypersensitive cell death เช่นเดียวกับการหยดสปอร์ของเชื้อรา *Corynespora cassiicola* บนใบยาง 2 พันธุ์ คือ PB260 ตัวแทนพันธุ์อ่อนแอ กับ GT1 ตัวแทนพันธุ์ต้านทาน พบว่า พันธุ์ GT1 มีลักษณะรอยไหม้เป็นจุดไม่มีการลุกลามของสปอร์ซึ่งตรงกันข้ามกับ PB260 ที่เห็นรอยไหม้สีน้ำตาลแผ่กระจายเป็นบริเวณกว้าง (Breton *et al*., 1997)

ในการทดลองทุกครั้งต้องพยายามใช้ใบที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน ไม่มีรอยขีดข่วน รอยแมลงกัดหรือติดเชื้อใดๆ มาก่อน สิ่งสำคัญคือ ต้องใช้ใบที่มีอายุเท่ากัน เพราะใบที่อ่อนกว่าจะมีปริมาณ cutin น้อยกว่า มีความอ่อนแอกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับใบที่มีอายุแก่กว่า ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ใบยางที่อยู่ในช่วงอายุ B_2-C เท่านั้น (Breton *et al*., 1997)



รูปที่ 19 รอยไหม้บนใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ที่เกิดจากซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เมื่อสังเกตรอยไหม้ที่เวลา 72 ชั่วโมง

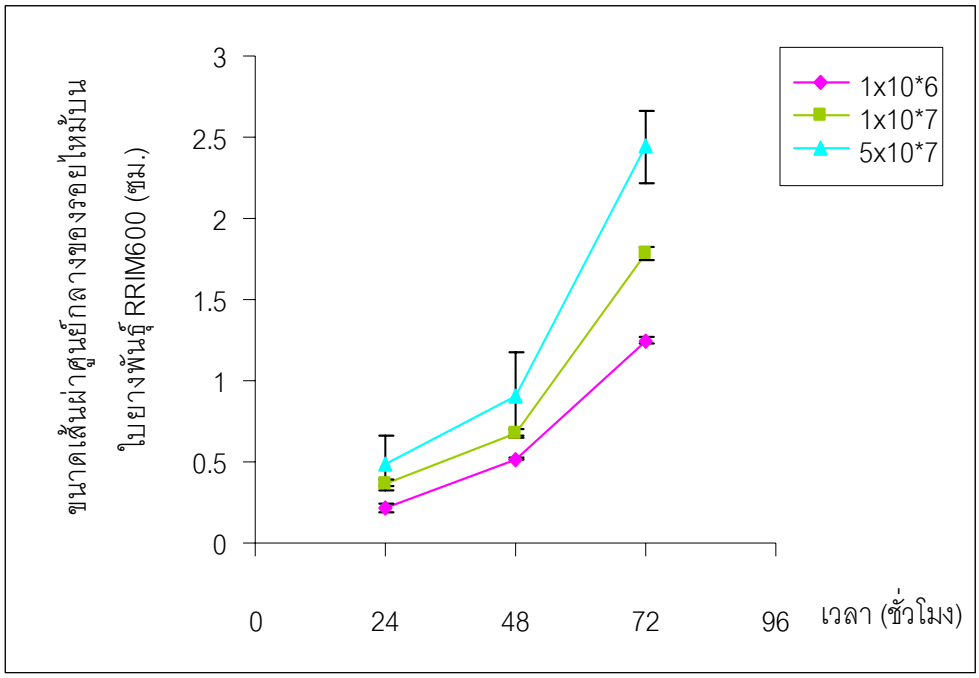
ก. ใบยางพันธุ์ RRIM600

ข. ใบยางพันธุ์ BPM-24

ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ (ซม.) บนใบยางพันธุ์ RRIM600 หลังกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ (sp/ml)		
	$1x10^6$ sp/ml	$1x10^7$ sp/ml	$5x10^7$ sp/ml
24	0.22±0.03	0.37±0.01	0.49±0.02
48	0.52±0.02	0.68±0.02	0.91±0.04
72	1.25±0.17	1.78±0.26	2.44±0.22

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD



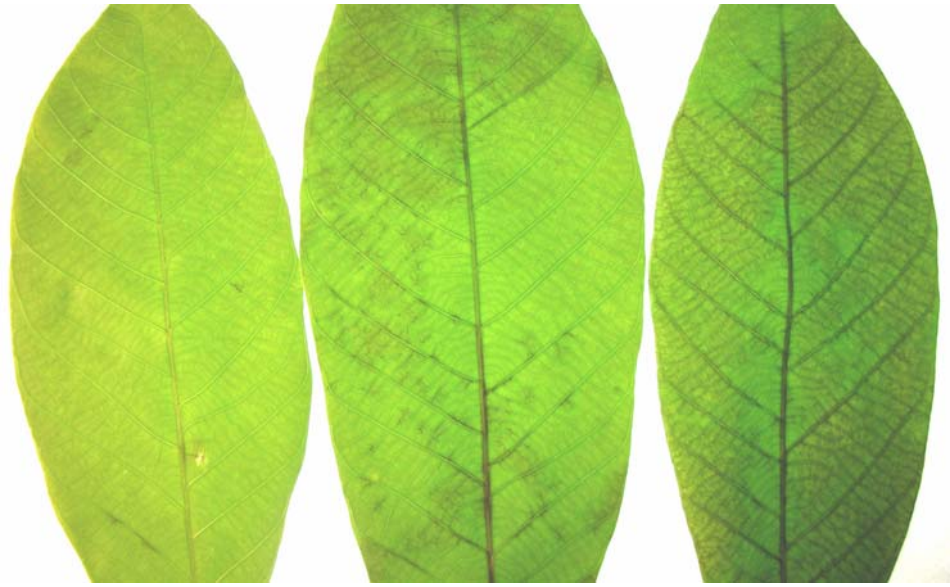
รูปที่ 20 ขนาดรอยไหม้บนใบยางพันธุ์ RRIM600 ที่เกิดจากซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

3.2.1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600

นำใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอมา 4 ก้าน ก้านที่ 1 ใช้เป็นชุดควบคุม ส่วนก้านที่ 2, 3 และ 4 เป็นชุดทดลอง แต่ละก้านประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ โดยใบที่ 1, 2 และ 3 ของชุดทดลอง ทำการแช่ในซูโอสปอร์ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยวางปากใบ (หลังใบ) ให้สัมผัสกับซูโอสปอร์ 1 ชั่วโมง แล้วล้างใบยางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง ซับให้แห้ง หยิบมาวางในถาดพลาสติกที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะที่ให้แสงตลอดเวลา นำสารตัวอย่างชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาวิเคราะห์หาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกสร้างขึ้น พบว่าใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ในช่วงที่ทำการทดลองนี้เป็นใบที่ปลอดเชื้อราพอสมควร เนื่องจากปริมาณโปรตีนรวมที่พบมีค่าต่ำ (ปริมาณโปรตีนรวมที่ 48 ชั่วโมงหลังบ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.24, 0.64 และ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เวลาเดียวกันมีปริมาณ เท่ากับ 0.098 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง) ดังนั้นจึงสามารถใช้ต่างก้านหรือต่างใบในการเปรียบเทียบผลได้ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ทดลองตัดใบยางพันธุ์นี้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมให้เกิดบาดแผลจากรอยกรีดทั้ง 4 ด้าน เพื่อเพิ่มสภาวะเครียดในการกระตุ้นให้ใบยางสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงขึ้น แต่พบว่าการกรีดใบให้เป็นแผลจะกระตุ้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสน้อยกว่าบาดแผลที่ถูกเจาะและลามโดยซูโอสปอร์ เนื่องจากใบยางพันธุ์ RRIM600 เป็นพันธุ์อ่อนแอ มีลักษณะทางกายภาพของใบที่อ่อนและบาง ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายจากเชื้อและเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ส่งผลให้การทดลองด้วยวิธีการตัดใบแล้วแช่ในซูโอสปอร์ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันมากนักกับวิธีการแช่ในซูโอสปอร์ทั้งใบโดยไม่ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ซึ่งผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงสุด ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้ ($5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร) ก็จะทำให้ความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสเริ่มลดลง (ตารางที่ 7 และรูปที่ 21, 22) แสดงว่าที่สภาวะนี้รุนแรงเกินไปไม่เหมาะสมสำหรับใบยางพันธุ์ RRIM600 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ เพราะทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดโรคหรือ compatible ได้อย่างรวดเร็วจนทำให้เกิดการแตกของเซลล์จำนวน

มากและมีการปล่อยสารต่างๆ ออกมาย่อยสลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำให้ปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างรวดเร็ว



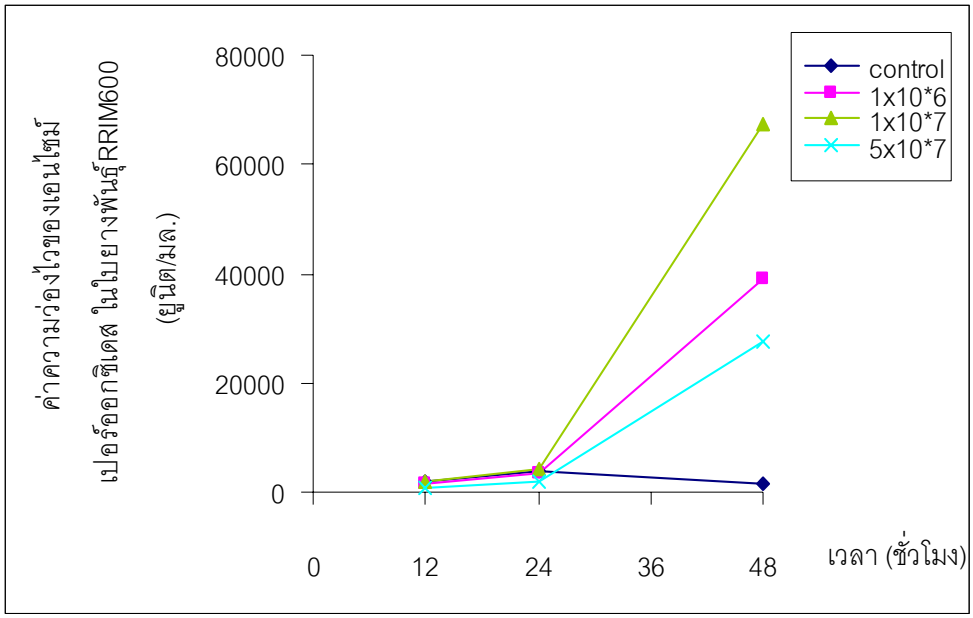
ก. ข. ค.

รูปที่ 21 รอยไหม้ของใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่แช่ในซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ ก=$1x10^6$, ข=$1x10^7$ และ ค=$5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) ในสารสกัดจากใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง		
	control	$1x\ 10^6$ sp/ml	$1x10^7$sp/ml	$5x10^7$sp/ml
12	1,964.60	1,433.60	1,805.31	743.40
24	3,716.81	3,504.42	4,300.90	1,911.50
48	1,380.53	38,867.3	67,433.60	27,610.60

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)



รูปที่ 22 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

3.2.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิ - เดสด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ในพันธุ์ BPM-24

เนื่องจากใบยางพันธุ์ BPM-24 สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่าพันธุ์ RRIM600 สังเกตได้จากขนาดของรอยไหม้ที่เกิดจากซูโอสปอร์ที่มีความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าใบยางพันธุ์ BPM-24 สามารถกักเชื้อได้ ทำให้ใบยางเกิดปฏิกิริยา incompatible ส่งผลให้การทดลองด้วยวิธีการแช่ใบในซูโอสปอร์อย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้หรือเหนี่ยวนำได้น้อยมาก เพราะใบยางพันธุ์นี้มีลักษณะผิวใบหนา ทำให้ซูโอสปอร์เจาะใบยางยาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้วิธีการตัดใบเพื่อให้ซูโอสปอร์เจาะใบยางง่ายขึ้น โดยตัดใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 แต่ละใบออกเป็น 4 ชิ้น (ตามขวาง) ส่วนปลายใบเป็นชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง ซึ่งไม่ได้บ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา ส่วนอีก 3 ชิ้นที่เหลือจะแบ่งเป็น 2 ซีก ซีกซ้ายที่ได้ 3 ชิ้นเป็นชุดควบคุม นำไปคว่ำบนถาดพลาสติกที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น ซีกขวาที่ได้ 3 ชิ้นใช้เป็นชุดทดลอง นำแต่ละชิ้นไปแช่ในซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$, $5x10^7$ และ $1x10^8$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยคว่ำด้านปากใบ (หลังใบ) ให้สัมผัสซูโอสปอร์ 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง ซับให้แห้ง หยิบมาวางบนถาดลักษณะเดียวกับชุดควบคุม วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บผลที่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ดังนั้นการตัดใบยางจากใบเดียวกันแล้วแบ่งเป็น time point ต่างๆ จะช่วยให้การเปรียบเทียบถูกต้องมากกว่าการใช้ใบยางทั้งใบ เพราะในช่วงที่กำลังติดเชื้อใบยาง 3 ใบในก้านเดียวกันอาจติดเชื้อไม่เท่ากัน (ดูจากปริมาณโปรตีนรวม) การ sampling วิธีนี้จึงสามารถลดความแปรปรวนของผลการทดลองได้ และผู้วิจัยสามารถเพิ่มจำนวนใบให้มากน้อยเพียงใดก็ได้ เพราะถือว่าทุก time point มีสภาพใบที่เหมือนกันหมด พบว่าที่ 48 ชั่วโมง หลังบ่มด้วยเชื้อราความเข้มข้น $1x10^8$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงที่สุด (ตารางที่ 8 และรูปที่ 23) แต่มีข้อจำกัด คือ ความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้มักจะไม่ถึง $1x10^8$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการทดลองครั้งต่อไป เนื่องจากความเข้มข้นนี้เตรียมได้สะดวกและให้ผลการทดลองในทางเดียวกับการใช้ซูโอสปอร์ความเข้มข้นที่สูงกว่า ($1x10^8$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร)

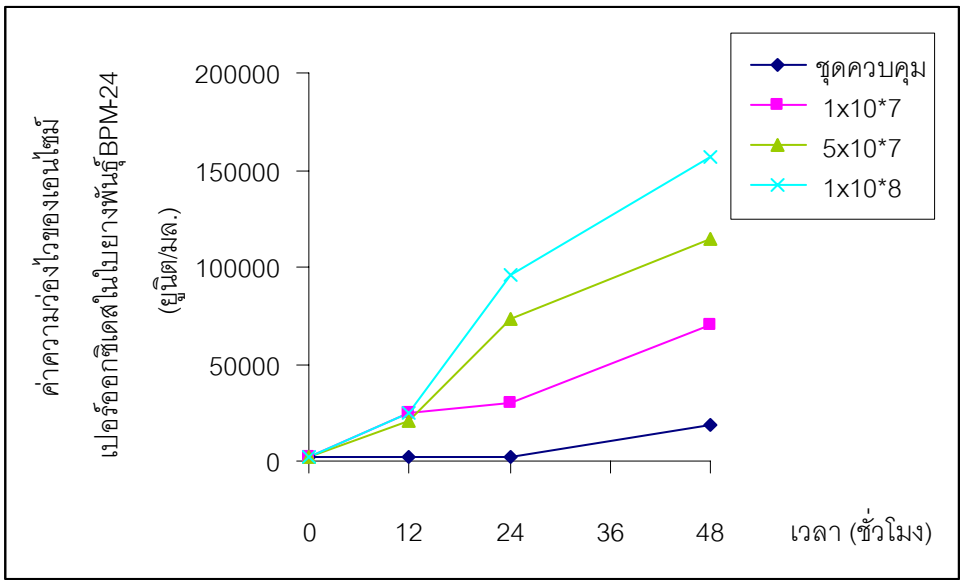
จากใบซีกซ้าย 3 ชิ้นที่เป็นชุดควบคุม เพื่อเก็บที่ 3 time point ชิ้นใบเหล่านี้เกิดบาดแผลจากการตัดทั้งสี่ด้าน พบว่าที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการตัดใบยาง จะเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น นอกจากบาดแผลจากการกรีดใบจะสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแล้ว เชื้อต่างๆ ที่ติดมากับใบหรืออยู่ในอากาศอาจสามารถเจาะผ่านทางรอยกรีดนี้ และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย

จากการทดลองในขั้นตอนที่ 3.2.1 และ 3.2.2 สรุปได้ว่าในการทดลองต่อไปจะใช้วิธีการตัดใบยางร่วมกับการแช่ชิ้นใบในซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร กับใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ตามลำดับ เพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 8 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.)ในสารสกัดใบยางพันธุ์ BPM-24 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$, $5x10^7$ และ $1x10^8$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง		
		$1x10^7$ sp/ml	$5x10^7$ sp/ml	$1x10^8$ sp/ml
0	1,752.2	-	-	-
12	1,752.2	21,504.4	20,176.9	25,221.2
24	1,964.6	29,734.5	73,274.3	95,575.2
48	18,584.1	70,088.5	114,690.3	156,637.2

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)



รูปที่ 23 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดใบยางพันธุ์ BPM-24 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$, $5x10^7$ และ $1x10^8$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

3.3 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินหลังจากกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์โดยวิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ (leaf disc) ขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร

3.3.1 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินหลังจากกระตุ้นใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แบบสร้างใหม่ (newly synthesis)

จากการทดลองของนารถธิดา รอดโพธิ์ทอง (2546) ที่ศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินหลังจากกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* โดยตัดชิ้นใบขนาด 1x1 ตร.ซม. ปรากฏว่าใบเกิดโรคได้เร็วและเห็นพีค 2 ที่ 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์เดียวกัน ($5x10^7$ sp/ml) ฉะนั้นในการทดลองนี้พยายามให้ใบเกิดโรคอย่างช้าๆ โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ใบมากขึ้น จึงใช้ชิ้นใบขนาด 2x2 ตร.ซม. เป็นชิ้นใบที่มีขนาดใหญ่พอสมควร

ใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 เป็นตัวแทนในกลุ่มพันธุ์อ่อนแอ หลังจากถูกบ่มด้วยเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายตัวอย่างแบบสร้างใหม่หรือ newly synthesis พบว่าปริมาณการสะสมสคอพอลิตินเกิดขึ้น 2 ครั้ง (ตารางที่ 9 และรูปที่ 24) สังเกตได้จากพีคที่ปรากฏ โดยพีคแรกที่ 8 ชั่วโมง ใบยางถูกเจาะด้วยซูโอสปอร์ตรง

รอยกรีด จึงผลิตสคอพอลิตินแล้วปล่อยออกมาในสารละลายตัวอย่าง ส่วนการสะสมสคอพอลิตินครั้งที่ 2 ปรากฏที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นพีคที่กว้างและสูงกว่าพีคแรก เนื่องจากพันธุ์อ่อนแอมีการผลิตสคอพอลิตินในครั้งแรกต่ำ ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของสายราได้น้อย ส่งผลให้มีการสร้างสปอร์แรงเจียมและปล่อยซูโอสปอร์ออกมาเรื่อยๆ เกิดการกระตุ้นครั้งที่ 2 (reinfection) ทำให้ใบยางถูกเจาะและลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงที่ยังเหลืออยู่จำนวนมาก จึงสร้างและปล่อยสคอพอลิตินออกมาได้มากกว่าครั้งแรก

ส่วนในพันธุ์ BPM-24 ตัวแทนพันธุ์ต้านทาน ความสามารถของเชื้อในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้องใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์สูงกว่า คือ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับพันธุ์ RRIM600 กระตุ้นได้ใกล้เคียงระดับสูงสุดที่ใบจะสร้างได้ ส่วนพันธุ์ BPM-24 ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ไม่เพียงพอต่อการเหนี่ยวนำและความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินได้ระดับใกล้เคียงสูงสุด คือ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร) มีการสะสมสคอพอลิตินเช่นเดียวกับพันธุ์ RRIM600 แต่ความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ผลิตออกมาสูงกว่า และพบว่าพีคแรกสูงกว่าพีคหลัง (ตารางที่ 10 และรูปที่ 25) เนื่องจากพันธุ์ BPM-24 เป็นใบยางพันธุ์ต้านทาน ฉะนั้นเมื่อเซลล์ใบถูกเจาะด้วยซูโอสปอร์ผ่านรอยกรีดก็จะเกิดปฏิกิริยาไฮเปอร์เซนซิติฟ ผลิตสคอพอลิตินออกมาปริมาณสูง ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายราได้ระดับหนึ่ง จำนวนเซลล์ข้างเคียงที่ถูกลุกลามมีน้อย ส่งผลให้มีการสร้างสคอพอลิตินในพีคหลังน้อยลงด้วย

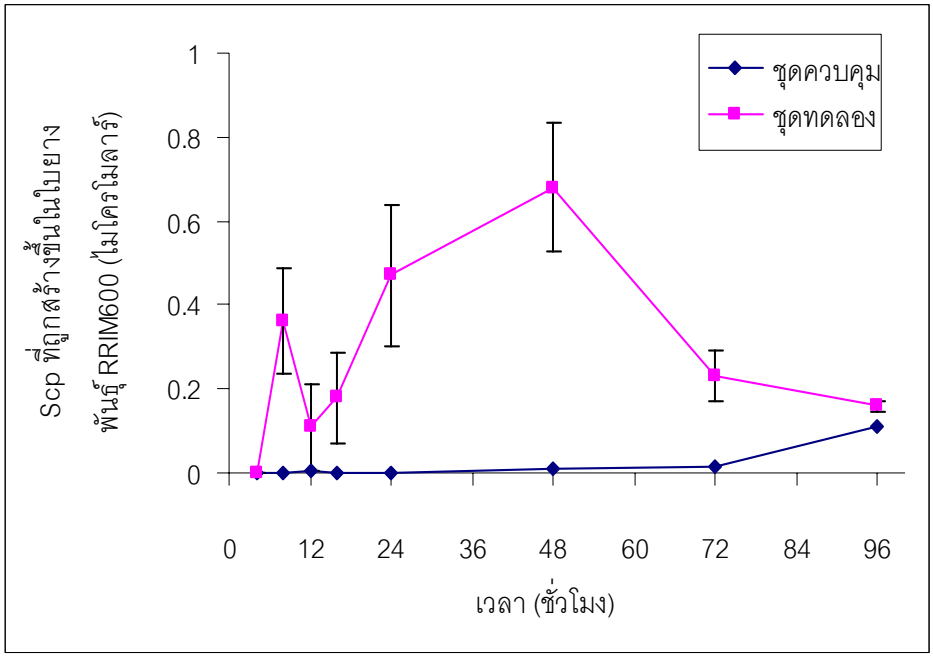
ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับใบยาง ที่ถูกกระตุ้นด้วยการหยดซูโอสปอร์ของเชื้อรา *M. ulei* บนใบยาง ที่มีการสะสมสคอพอลิติน 2 ช่วง คือ ช่วงแรก (0-24 ชั่วโมง) เป็นลักษณะที่เกิดในพันธุ์ต้านทาน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เริ่มมีการเจาะเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอร์มัล (epidermal) ดังนั้นใบยางจึงสร้างสคอพอลิตินขึ้นเพื่อหยุดการเจริญเติบโตของสายรา โดยตรวจพบว่าสคอพอลิตินมีการสะสมเพียงเล็กน้อยในพันธุ์อ่อนแอ ส่วนช่วงที่สอง (24-72 ชั่วโมง) จะมีอัตราการสะสมสคอพอลิตินสูงสุด สังเกตได้ชัดเจนจากปริมาณที่เพิ่มขึ้นในพันธุ์ต้านทาน (Garcia *et al*., 1995b) อย่างไรก็ตาม ปริมาณการสะสมสคอพอลิตินในพันธุ์ต้านทานจะสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ ในขณะ Breton และคณะใช้เชื้อรา *Corynespora cassiicola* ให้ผลการทดลองตรงข้ามกัน คือ ความเข้มข้นของสคอพอลิติน ในใบยางพันธุ์อ่อนแอ มีปริมาณสูงกว่าในพันธุ์ต้านทาน โดยเริ่มมีการสะสมที่ 24 ชั่วโมง หลังจากติดเชื้อ และสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงจากนั้นค่อยๆ ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากใช้ความเข้มข้นของเชื้อราน้อยเกินไป ($2.3x10^4$ sp/ml) จนไม่สามารถกระตุ้นระบบการป้องกันโรคของพันธุ์ต้านทานได้

การสร้างสคอพอลิตินในใบยางนอกจากจะใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อราแล้วยังเป็นพิษต่อเซลล์ใบยางเอง ฉะนั้นใบยางจึงมีกลไกการป้องกันอันตรายจากสคอพอลิติน โดยจะเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดที่ทำหน้าที่กำจัดสคอพอลิติน เรียกว่า สคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส คาดว่าน่าจะมีการสร้างในเนื้อใบแล้วปล่อยออกมาในสารละลายที่แช่ใบ ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานนี้ จึงควรตรวจวัดสคอพอลิตินและสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดสทั้งในเนื้อใบและน้ำแช่ใบ แต่ด้วยวิธีการทดลองแบบสร้างใหม่ สามารถตรวจวัดเฉพาะในน้ำแช่ใบเท่านั้น ไม่สามารถเก็บชิ้นใบยางตามเวลาที่กำหนด ทำให้ขาดข้อมูลในส่วนของใบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วางแผนและเปลี่ยนแปลงการทดลองใหม่เป็นแบบสะสม ซึ่งจะดำเนินการในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 9 ปริมาณของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 (ไมโครโมลาร์) แบบสร้างใหม่ ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
4	0	0
8	0	0.36±0.13
12	0	0.11±0.10
16	0	0.18±0.11
24	0	0.47±0.17
48	0.01±0.01	0.68±0.15
72	0.02±0.02	0.23±0.06
96	0.11±0.06	0.16±0.01

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

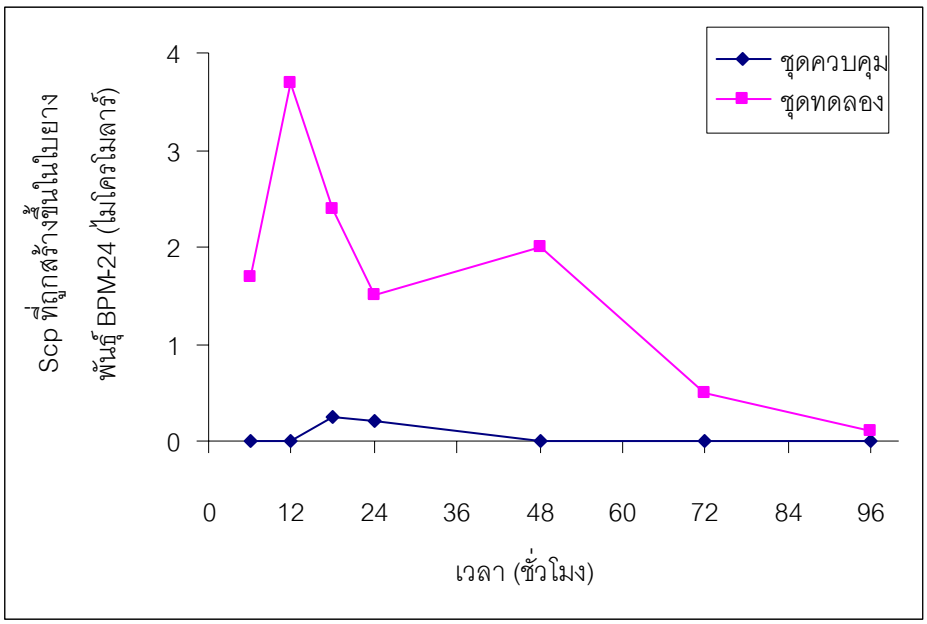


รูปที่ 24 ปริมาณของสคอพอลิติน (Scp) ที่ถูกสร้างขึ้นในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 แบบสร้างใหม่ ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 10 ปริมาณของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ BPM-24 (ไมโครโมลาร์) แบบสร้างใหม่ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (ที่มา : จากการทดลองของนิอร จิรพงศธรกุล)

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
6	0	1.71
12	0	3.70
18	0.25	2.45
24	0.20	1.53
48	0	2.17
72	0	0.58
96	0	0.11

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)



รูปที่ 25 ปริมาณของสคอพอลิติน (Scp) ที่ถูกสร้างขึ้นในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ BPM-24 (ไมโครโมลาร์) แบบสร้างใหม่ ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.3.2 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน (Scp) หลังจากกระตุ้นใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แบบเก็บสะสม (accumulation)

เพื่อผลการทดลองที่สมบูรณ์และแก้ปัญหาการเก็บตัวอย่างแบบ newly synthesis จึงตัดใบยางขนาด 2x2 ซม. เท่ากัน แต่เก็บสารละลายสคอพอลิตินเมื่อครบเวลาที่กำหนด โดยไม่มีการแทนที่ด้วยน้ำกลั่น ปริมาณการสะสมสคอพอลิตินด้วยวิธีนี้จึงมีความเข้มข้นสูงกว่าวิธีสร้างใหม่ ผลการทดลองด้วยวิธีเก็บสะสมในพันธุ์ RRIM600 ใช้ใบเดียวกับวิธีสร้างใหม่ ปรากฏเพียงพีคเดียวที่ 48 ชั่วโมง เนื่องจากพีคแรกมีการสร้างสคอพอลิตินน้อยมากจึงกักเชื้อไม่อยู่ มีการลุกลามอย่างรวดเร็ว แสดงว่าวิธีการเก็บสะสมทำให้เกิดโรครุนแรงกว่าวิธีสร้างใหม่ พีคที่สองจึงซ้อนทับกับพีคแรก (ไม่เหมือนกับพันธุ์ BPM-24 ที่ยังเห็นเป็น 2 พีค) วัดความเข้มข้นได้ 2.23±0.55 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 11 และรูปที่ 26ก) ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของสคอพอลิตินจากวิธีสร้างใหม่ประมาณ 3 เท่า แต่มีปริมาณไม่มากพอ เชื้อจึงเข้ามาทำลายเซลล์ใบ ทำให้มีการสะสมของเชื้อราและสภาพใบเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากมีการสะสมของสารประกอบฟีนอลิก ในที่สุดใบก็ตายและเซลล์แตกปล่อยเอนไซม์ต่างๆ ออกมาในน้ำ ในขณะที่วิธีสร้างใหม่มีการเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 4 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 16 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนถึง 96

ชั่วโมง ทำให้ดูเหมือนว่ามีการสร้างสคอพอลิตินน้อยกว่า และเกิด reinfection น้อย เพราะเชื้อราถูกแทนที่ด้วยน้ำกลั่นตลอดเวลา ทำให้ใบยังเหลือเซลล์ที่ปกติคือ มีสีเขียวกว่าวิธีเก็บสะสม

ส่วนพันธุ์ BPM-24 ยังปรากฏ 2 พีคสูงเท่าๆ กัน คือ พีคแรกปรากฏที่ 12 ชั่วโมง ซึ่งคาดว่าเกิดจากเซลล์ชุดแรกที่อยู่รอบๆ รอยตัด จากนั้นการสร้างสคอพอลิตินจะลดลงอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นพีคสองคาดว่าเกิดจากเซลล์ที่ถูกลุกลามแบบเก็บสะสม แม้แต่พันธุ์ BPM-24 ก็มีพีคหลังสูงมาก (แสดงว่าลุกลามมาก) เพราะเกิด reinfection มากกว่าวิธีสร้างใหม่ (รูปที่ 26ข) โดยทั้งสองพีคมีปริมาณการสร้างที่ไม่ต่างกันมากนัก ซึ่งผลการทดลองของพันธุ์ BPM-24 แบบเก็บสะสมคล้ายกับแบบสร้างใหม่ คือ มีการสร้างสคอพอลิตินสูงสุด 2 พีค (ตารางที่ 11 และรูปที่ 26ข) แต่ปริมาณสคอพอลิตินจากวิธีเก็บสะสมสูงกว่า เนื่องจากมีการสะสมตามเวลาที่เก็บตัวอย่าง ดังนั้นในการเก็บสารละลาย สคอพอลิตินก็จะเก็บใบด้วย เพื่อใช้วัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเปรียบเทียบกันในการทดลองต่อไป

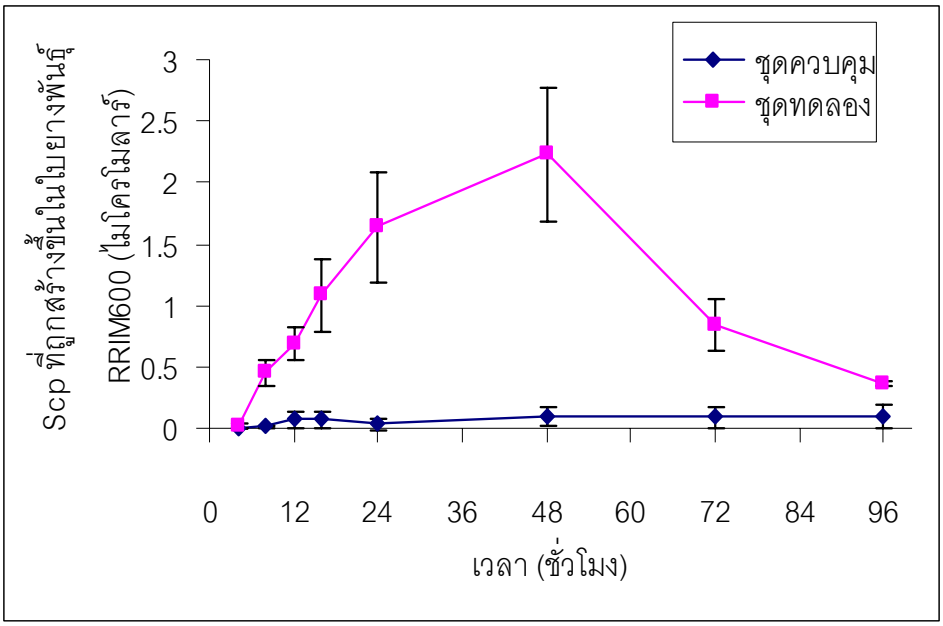
การสร้างสคอพอลิติน ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินในใบยางพารา จะพบตรงบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย (infection) และก่อให้เกิดผลกับเชื้อโรค จากการที่สารนี้จะถูกสร้างขึ้นภายหลังจากที่เชื้อเข้าทำลายพืชแล้ว ผลของสารพิษจึงเกี่ยวข้องกับการทำงานของเชื้อโรคมากกว่าที่จะมีผลต่อกระบวนการทำลายพืชของเชื้อโรค ไฟโตอเล็กซินจะสร้างขึ้นทั้งในพืชที่เป็น host และ non-host พืชที่อ่อนแอหรือต้านทานต่อเชื้อโรคโดยสะสมและสร้างอยู่ในพืชจนถึงระดับความเข้มข้นที่จะก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ในพืชแต่ละชนิดก็จะมีการผลิตไฟโตอเล็กซินที่แตกต่างกันไป เช่น Perrone และคณะ (2003) ได้ศึกษาการสร้างไฟโตอเล็กซินในใบยาสูบ ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อรา *P. nicotianae* และ non-host ของเชื้อรา *P. palmivora* พบว่าหลังจากบ่มเซลล์แขวนลอยของยาสูบด้วยเชื้อรา *P. nicotianae* จะกระตุ้นปฏิกิริยา incompatible และเริ่มมีการสะสมของ capsidiol ที่ชั่วโมงที่ 9 และเซลล์จะตายอย่างรวดเร็ว (hypersensitive cell death) เพื่อกักเชื้อราไม่ให้ลามไปยังเซลล์ข้างเคียง ส่วนเซลล์ที่กระตุ้นด้วยเชื้อรา *P. palmivora* จะสร้าง capsidiol เร็วกว่า คือ ที่ 3 ชั่วโมงหลังติดเชื้อ นอกจากนี้ Commun และคณะ (2003) พบไฟโตอเล็กซินจากเซลล์ปกติด้วย ในขั้นตอนการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ขององุ่น (*Vitis* sp.) ช่วงสัปดาห์แรกมีการสร้าง *trans*-resveratrol ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซิน และปริมาณการสะสมจะลดลงในสัปดาห์ที่ 2

ตารางที่ 11 ปริมาณของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 (ไมโครโมลาร์) แบบเก็บสะสมหลังจากกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

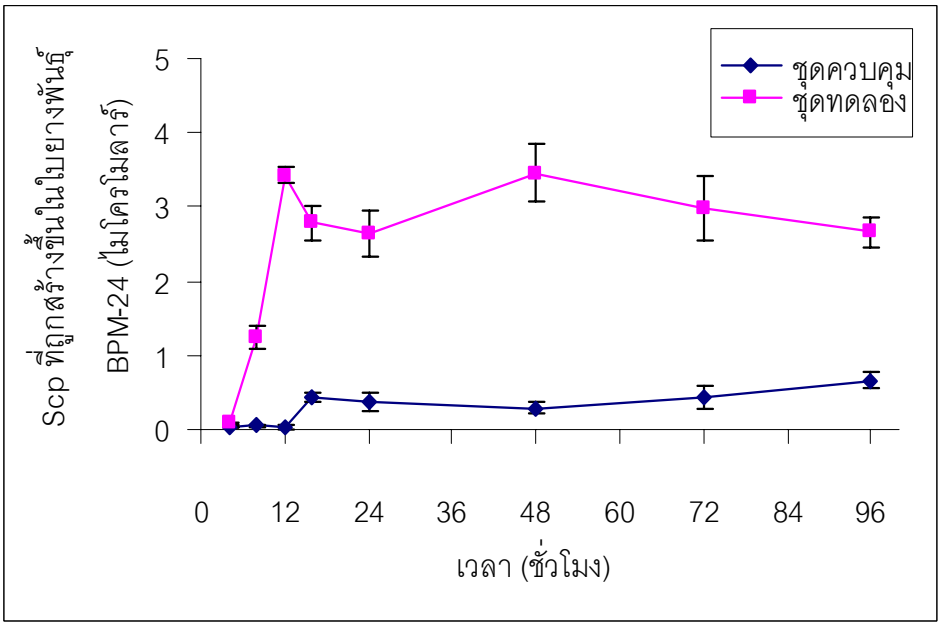
พันธุ์ยาง	RRIM600		BPM-24	
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
4	0	0.02±0.02	0.02±0.01	0.08±0.02
8	0.01±0.02	0.45±0.11	0.05±0.02	1.25±0.16
12	0.07±0.06	0.69±0.14	0.04±0.03	3.43±0.11
16	0.07±0.06	1.08±0.29	0.43±0.07	2.78±0.23
24	0.03±0.04	1.64±0.45	0.37±0.13	2.64±0.31
48	0.09±0.08	2.23±0.55	0.29±0.08	3.46±0.39
72	0.09±0.09	0.84±0.22	0.43±0.16	2.97±0.44
96	0.09±0.09	0.36±0.02	0.66±0.11	2.66±0.19

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

ก.



ข.



รูปที่ 26 ปริมาณของสคอพอลิติน (Scp) ที่ถูกสร้างขึ้นในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 แบบเก็บสะสม ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ก. พันธุ์ RRIM600

ข. พันธุ์ BPM-24

3.4 ผลการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยาง ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์โดยวิธีตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ (leaf disc) ขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร

3.4.1 ผลการวิเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในน้ำแช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แบบเก็บสะสม

ในน้ำแช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 ชั่วโมงที่ 96 หลังจากถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เริ่มมีสีน้ำตาลและมีตะกอน ซึ่งเกิดจากใบยางเป็นโรคและตายทำให้เซลล์แตก มีการปล่อยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมา สามารถวัดค่าความว่องไวได้สูงขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยตั้งแต่ 4-16 ชั่วโมง มีปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกปล่อยออกมาในปริมาณต่ำ เท่ากับ 26-425 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อนานขึ้นจนถึง 96 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกปล่อยออกมามากขึ้นถึง 6,769.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เวลาเดียวกัน (ตารางที่ 12 รูปที่ 27ก)

ส่วนในน้ำแช่ใบยางพันธุ์ BPM-24 มีการปล่อยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองในปริมาณที่สูงกว่าในน้ำแช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 คือ ในช่วงแรกมีพีคที่ 48 ชั่วโมง และพีคที่สองที่ 96 ชั่วโมง มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ในชุดทดลอง) เท่ากับ 11,615.04 และ 15,265.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 3 และ 2.2 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 12 รูปที่ 27ข) พันธุ์อ่อนแอเมื่อเกิดโรคจนนำไปสู่ภาวะที่ทำให้เซลล์แตกและปล่อยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมา สันนิษฐานว่ามีการปล่อยโปรติเอสออกมาย่อยสลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และยังปล่อยสารฟีนอลิกสีน้ำตาลที่รบกวนการดูดกลืนแสงขณะวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย นอกจากนี้ฟีนอลิกบางตัวก็อาจเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรซ์ได้เป็นสารประกอบฟีนอลิกขนาดใหญ่ น่าจะมีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรทแล้วไปจับกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอย่างชั่วคราว ทำให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจึงลดลงอย่างรวดเร็ว

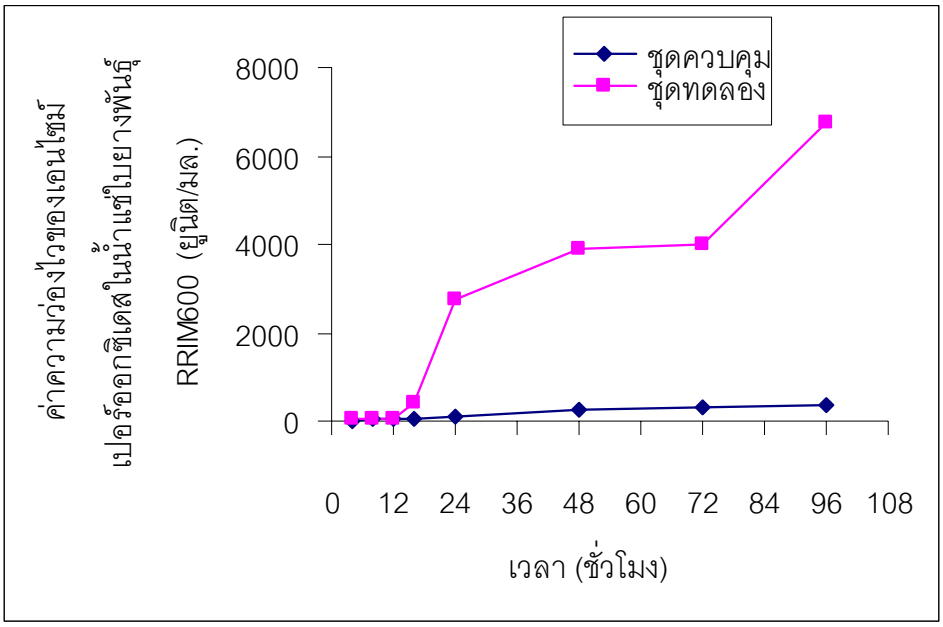
ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางทั้งสองพันธุ์ สร้างขึ้นอย่างรวดเร็วหลังกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ 24 ชั่วโมง ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากการสร้างสคอพอลิติน ดังนั้นบางไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการกำจัดสคอพอลิติน ทั้งสคอพอลิตินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ใบยางเริ่มสร้างขึ้นตั้งแต่ที่เซลล์ติดเชื้อ พอเซลล์เริ่มแตกจะถูกปล่อยออกมาในน้ำที่แช่ใบยาง เพื่อให้เห็นขั้นตอนการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางและปลดปล่อยลงในน้ำแช่ใบ ผู้วิจัยจึงทำการตรวจหาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบต่อไป (ดูผลการทดลองที่ 3.4.2)

ตารางที่ 12 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) ในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 แบบเก็บสะสม ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

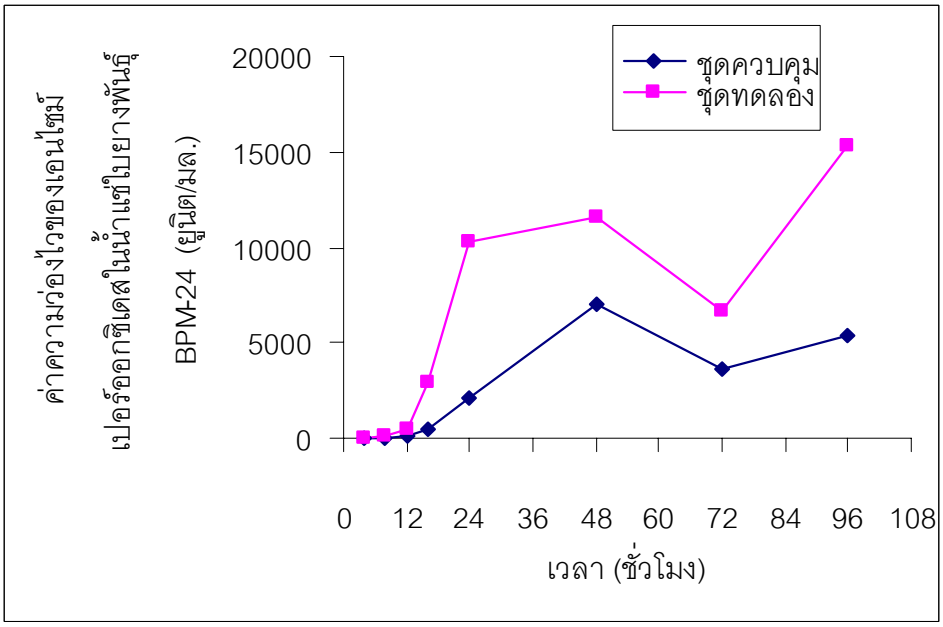
พันธุ์ยาง	RRIM600		BPM-24	
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
4	18.54	26.55	26.58	0
8	31.93	26.55	45.13	92.92
12	66.37	53.10	84.96	464.60
16	66.37	424.78	504.42	2,867.26
24	111.50	2,737.96	2,070.80	10,287.61
48	238.94	3,902.66	6,969.03	11,615.04
72	292.04	3,982.30	3,584.07	6,637.17
96	345.13	6,769.91	5,376.11	15,265.49

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)

ก.



ข.



รูปที่ 27 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในน้ำที่แช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 แบบเก็บสะสม ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

ก. พันธุ์ RRIM600

ข. พันธุ์ BPM-24

3.4.2 ผลการวิเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แบบเก็บสะสม

ส่วนของใบยางพันธุ์ RRIM600 ที่เก็บจากการทดลองในข้อที่ 3.4.1 พบว่า ที่ 8 ชั่วโมงใบเริ่มช้ำ เห็นรอยเจาะของซูโอสปอร์ของเชื้อราที่ 12 ชั่วโมง เมื่อถึง 24 ชั่วโมง ใบสีเขียวเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเข้มขึ้นจนเป็นสีน้ำตาลในชั่วโมงหลังจากนี้ อาการที่เกิดบ่งบอกถึงความรุนแรงของโรค เมื่อพิจารณาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดควบคุม ค่าความว่องไวจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลาที่นานขึ้นและลดลงที่ 96 ชั่วโมง เนื่องจากใบยางแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จึงไม่ถูกทำลายโดยซูโอสปอร์ ทำให้ใบยางได้รับการกระตุ้นจากบาดแผลที่ถูกกรีดและแรงสั่นของน้ำจากการเขย่าตลอดเวลา จึงเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบเพิ่มขึ้น เซลล์เกือบทั้งหมดแข็งแรงเซลล์ใบไม่แตก ดังนั้นจึงไม่พบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในน้ำ ส่วนชุดทดลองที่ถูกบ่มด้วยเชื้อราความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มเรื่อยๆ และสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นก็จะลดลง (ตารางที่ 13 รูปที่ 28) ซึ่งก็สอดคล้องกับปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกปล่อยออกมาในน้ำแช่ใบยางพันธุ์ RRIM600 แบบเก็บสะสมที่ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นหลังจาก 16 ชั่วโมงที่บ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์ เพราะที่ 12 ชั่วโมง เซลล์ใบยางเริ่มแตก จึงปล่อยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมาในน้ำประมาณชั่วโมงที่ 16 ทำให้สามารถวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 96 ชั่วโมง

ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพันธุ์ BPM-24 ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับพันธุ์ RRIM600 แต่ในชุดทดลองของพันธุ์ BPM-24 จะมีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอีกครั้งที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งก็สอดคล้องกับค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในน้ำแช่ใบยาง ที่ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเห็นพีค 2 ครั้งเช่นกัน คือ ที่ 24 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง ในขณะที่ในเนื้อใบ สามารถวัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ 16 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง พีคของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ปรากฏ 2 พีค ทั้งในน้ำแช่ใบและในเนื้อใบยางพันธุ์ BPM-24 (ตารางที่ 14 รูปที่ 29) คาดว่าพีคแรกเป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อกำจัด oxygen species ในปฏิกิริยา oxidative burst และเพื่อกำจัดสคอพอลิตินที่เป็นพิษต่อเซลล์พืชด้วย ส่วนพีคที่ 2 เมื่อทดสอบหาความว่องไวด้วย *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท ปรากฏว่าให้ค่าความว่องไวไม่สูงขึ้นมากนัก แต่เมื่อเปลี่ยนสับสเตรทเป็น guaiacol ปรากฏว่าให้พีคสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพันธุ์ BPM-24 ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นจาก 48 ชั่วโมง ชัดเจนกว่าเมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท คือ เพิ่มขึ้น 5 เท่า ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าพีคของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน เพื่อรักษาและสร้าง

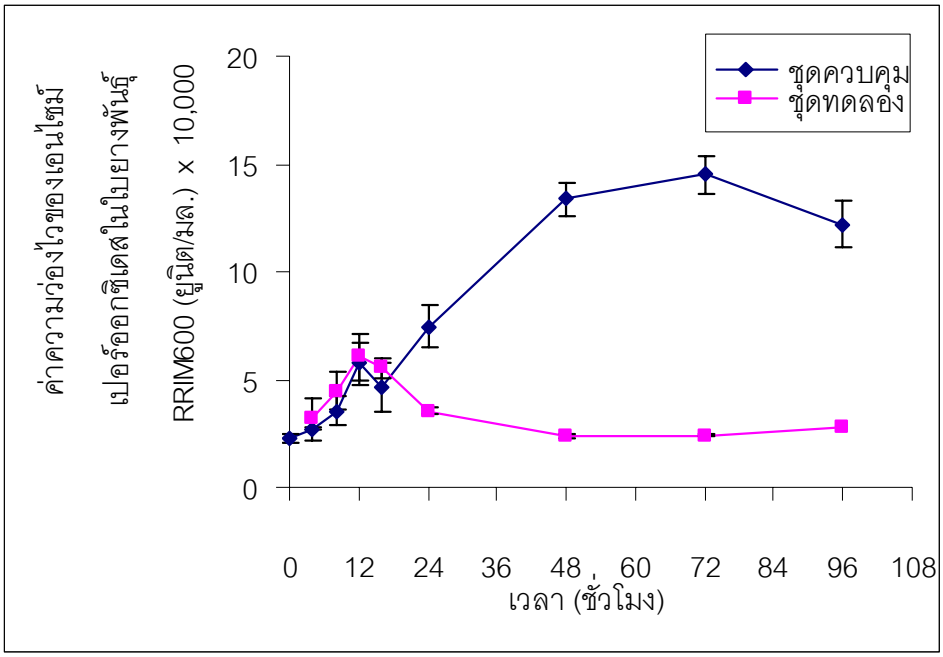
ความแข็งแรงให้กับเซลล์ใบ เนื่องจาก guaiacol เป็นสับสเตรทที่จำเพาะกับขบวนการสร้างลิกนิน

ตารางที่ 13 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) ในเนื้อใบพันธุ์ RRIM600 แบบเก็บสะสม ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท

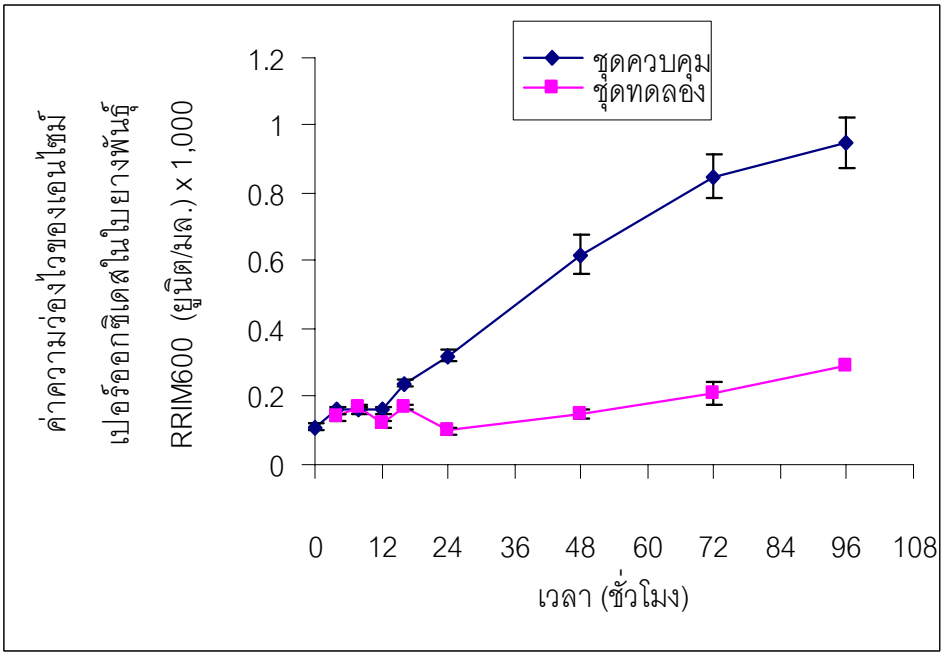
พันธุ์ยาง	o-dianisidine $x10^4$		guaiacol $x10^3$	
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
4	2.72±0.06	3.15±0.59	0.16±0.01	0.14±0.04
8	3.53±0.66	4.45±1.01	0.16±0.01	0.17±0.01
12	5.73±1.00	6.04±0.89	0.16±0.01	0.12±0.01
16	4.61±1.12	5.53±1.05	0.24±0.01	0.17±0.01
24	7.45±0.97	3.54±0.48	0.32±0.02	0.10±0.01
48	13.37±0.79	2.39±0.16	0.62±0.06	0.15±0.01
72	14.49±0.85	2.41±0.08	0.85±0.06	0.21±0.01
96	12.19±1.07	2.76±0.06	0.95±0.08	0.29±0.04

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

ก.



ข.



รูปที่ 28 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบพันธุ์ RRIM600 แบบเก็บสะสมที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

ก. เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

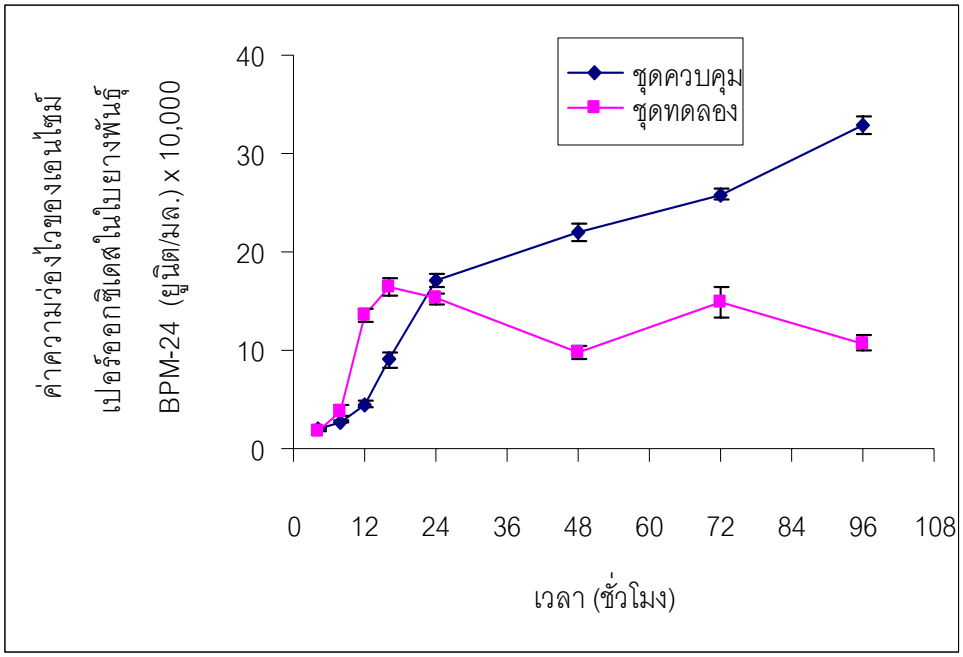
ข. เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท

ตารางที่ 14 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) ในเนื้อใบพันธุ์ BPM-24 แบบเก็บสะสม ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท

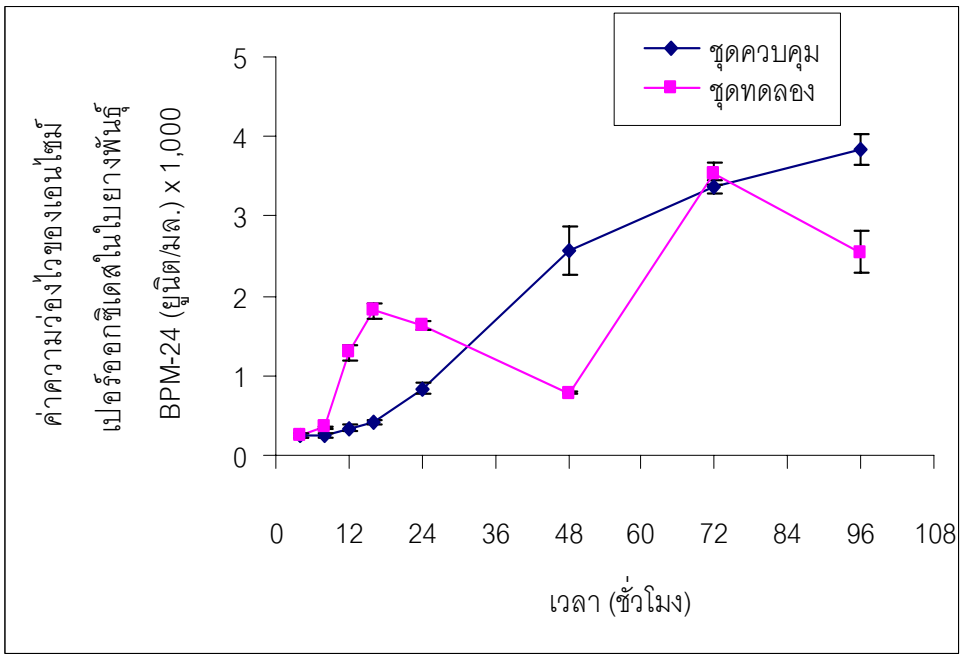
พันธุ์ยาง	o-dianisidine $x10^4$		guaiacol $x10^3$	
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
4	2.05±0.07	1.88±0.06	0.25±0.02	0.25±0.02
8	2.75±0.13	3.83±0.59	0.25±0.02	0.35±0.52
12	4.53±0.26	13.56+0.76	0.34±0.03	1.29±0.10
16	9.02±0.75	16.45±0.90	0.41±0.02	1.81±0.09
24	17.13±0.59	15.24±0.60	0.84±0.07	1.64±0.05
48	21.99±0.97	9.87±0.68	2.57±0.31	0.78±0.02
72	25.87±0.60	14.82±1.57	3.38±0.08	3.54±0.13
96	32.87±0.91	10.75±0.79	3.83±0.19	2.55±0.26

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

ก.



ข.



รูปที่ 29 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบพันธุ์ BPM-24 แบบเก็บสะสม ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

ก. เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

ข. เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท

3.5 ผลการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 เมื่อกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* โดยวิธีการตัดชิ้นใบขนาด 1x1 นิ้ว

3.5.1 ผลการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 เมื่อกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากการกระตุ้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc) แล้วแช่ในน้ำพร้อมเขย่าตลอดเวลา ทำให้ใบช้ำเร็ว และเป็นสภาวะที่รุนแรงเกินไปจนทำให้ใบไม้ตาย การทดลองต่อไปจึงพยายามหาวิธีการที่สามารถลดสิ่งกีดขวางทางกายภาพและแก้ปัญหาความแตกต่างระหว่างใบยางพาราที่จะใช้ในการทดลองด้วย จึงยังคงเลือกวิธีการตัดใบ แต่ตัดให้มีขนาดชิ้นใหญ่กว่าเดิม คือ เปลี่ยนจากขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร เป็น 1x1 ตารางนิ้ว เพื่อให้ได้สารสกัดมากพอสมควรจึงใช้วิธีการแจกใบ แล้วบ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่ใช้วิธีวางบนกระดาษกรองชื้น แทนการแช่ใบในน้ำ แล้ววิเคราะห์ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ระยะเวลาการบ่มด้วยเชื้อราต่างๆ กัน คือ 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง การวางบนกระดาษกรองแทนการแช่น้ำไม่ทำให้ใบช้ำ และยังเพิ่มความต้านทานแก่ใบยางด้วย นอกจากนี้ชิ้นใบที่โตกว่า (1x1 ตร.นิ้ว) จะมีจำนวนเซลล์ที่มากกว่า เมื่อการลามของเชื้อเกิดได้ช้าก็จะเหลือจำนวนเซลล์ที่ปกติมากกว่า ทำให้เห็นผลการเหนี่ยวนำค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสค่อยๆ เพิ่มอย่างต่อเนื่อง โดยในชุดทดลองจะเห็นอัตราการเพิ่มของค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ชัดเจนกว่าในชุดควบคุม ทั้งที่ใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรทซึ่งตรงกันข้ามกับวิธีแช่ใบในน้ำ แสดงว่าวิธีการวางใบบนกระดาษกรองไม่ทำให้เซลล์ใบแตก จึงสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้งหมดจากเนื้อใบ ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์เมื่อใช้สับสเตรททั้งสองตัวให้ผลคล้ายกัน เพียงแต่มีพีคสูงสุดที่เวลาต่างกัน ในกรณีที่ใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท สามารถวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ $(12.94 \pm 0.65) x10^4$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วน guaiacol สามารถวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ $(1.84 \pm 0.49) x10^3$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 15 และรูปที่ 30) ดังนั้น *o*-dianisidine น่าจะเป็นสับสเตรทที่จำเพาะกับสคอพอลิตินมากกว่าลิกนิน เพราะสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นก่อนลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งพีคสูงสุดนี้น่าจะเทียบได้กับพีคแรกของค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบชุดแช่น้ำ เพราะการทดลองนี้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสค่อยๆ เพิ่มขึ้นแบบ incompatible เมื่อพิจารณาถึงปริมาณโปรตีนของการทดลองนี้ พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งในชุดควบคุมและชุดทดลองลดลงเรื่อยๆ ตามเวลาที่ทำการทดลอง คือ ที่ 0 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีน

ประมาณ 5.15 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ลดลงเหลือประมาณ 5 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ที่ 120 ชั่วโมง มีโปรตีนเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง จนสุดท้ายที่ 144 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือครึ่งหนึ่งจากค่าเริ่มต้น ซึ่งก็แสดงว่าหลังบ่มด้วยซูโอสปอร์ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะแปรผกผันกับปริมาณโปรตีนรวม คือ ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะค่อยๆ เพิ่มตามเวลา ในขณะที่ปริมาณโปรตีนลดลงเรื่อยๆ แสดงว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็น PR-proteins เช่นเดียวกับการทดลองของสมปอง เตชะโตและคณะ (1995) ที่จำแนกแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *Phytophthora* spp. โดยนำแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดมาบ่มด้วยเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในอาหารเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นนำไปสกัดและศึกษาโปรตีนกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อตรวจสอบกลไกการต้านทานต่อสารจากเชื้อข้างต้น พบว่าแคลลัสชุดควบคุมที่ไม่บ่มด้วยเชื้อจะปรากฏแถบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 2 แถบ ส่วนในชุดทดลองที่บ่มด้วยเชื้อจะปรากฏ 4-6 แถบ แต่เมื่อย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie blue พบว่าทั้งก่อนและหลังบ่มด้วยเชื้อจะเห็นเพียงแถบเดียวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 ดาลตัน ดังนั้นปริมาณโปรตีนรวมไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างแคลลัสที่ต้านทานและไม่ต้านทาน ในขณะที่ไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความเหมาะสมต่อการจำแนกดังกล่าว เช่นเดียวกับผลการทดลองของพันธ์วศรี แสงสุวรรณ (2547) พบว่าแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราสองพันธุ์ มีจำนวนไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแตกต่างกัน โดยแคลลัสพันธุ์ GT1 เมื่อกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์มีจำนวน 1 ไอโซไซม์ ส่วนแคลลัสพันธุ์ RRIM600 มี 2 ไอโซไซม์ และไม่พบการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดควบคุม

ซึ่งเมื่อเทียบกับใบที่แช่น้ำจะเริ่มเห็นรอยเจาะเป็นจุดสีดำที่ 12 ชม. แล้วลามไปยังเซลล์ข้างเคียงทั่วทั้งใบ แล้วเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองที่ 24 ชม. ซึ่งจะเห็นปฏิกิริยาต่างๆ เกิดขึ้นภายในเวลา 96 ชม. เมื่อวิเคราะห์จากพีคที่ปรากฏในชุดทดลองของพันธุ์ RRIM600 จะปรากฏเพียงพีคเดียว ซึ่งน่าจะเป็นพีคที่เกิดจากการลาม ส่วนในพันธุ์ BPM-24 มี 2 พีค โดยพีคแรกเกิดจากการเจาะและพีคที่ 2 เกิดจากการลาม ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์ จากผลการทดลองของ 2 การทดลองข้างต้น ชี้ให้เห็นว่าวิธีการแช่ใบในน้ำเป็นวิธีการที่รุนแรงกว่าการวางใบบนกระดาษกรองชื้น ที่การเพิ่มขึ้นของค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *P. palmivora* เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มใบยาง 48 ชม. โดยลักษณะการเจาะของซูโอสปอร์จะเริ่มเจาะจากเซลล์รอบนอกตรงรอยกรีดของชิ้นใบ และเริ่มเห็นบาดแผลเป็นจุดสีดำที่ 24 ชม. แล้วลามไปยังเซลล์ข้างเคียงเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาลขึ้นในชั่วโมงหลังๆ ซึ่งปฏิกิริยา

การตอบสนองต่อโรคเกิดล่าช้ากว่า คือ เริ่มต้นพีคแรกที่ 96 ชม. (ใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท) และที่ 120 ชม. (ใช้ guaiacol เป็นสับสเตรทแสดงว่ามีการสร้างลิกนิน) ในขณะที่วิธีแช่ใบในน้ำจะเห็นพีคแรกอยู่ที่ 16 ชั่วโมง และพีคสองอยู่ที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งพีคแรกของวิธีการแช่ใบในน้ำเกิดขึ้นเร็วมากไม่เห็นความแตกต่างของ 2 สับสเตรท หรืออาจเป็นเพราะว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็วไม่มีการสร้างลิกนินหรือสร้างน้อย

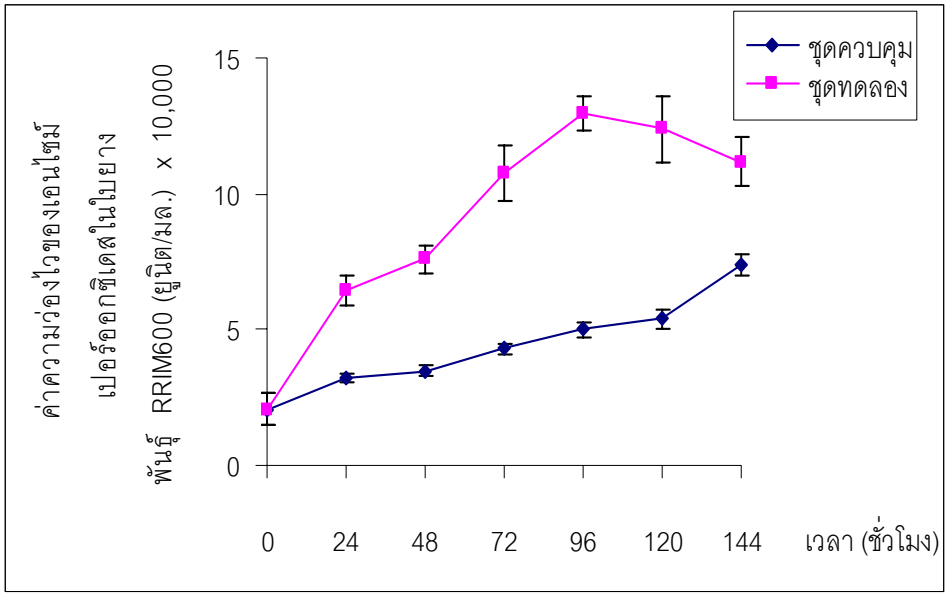
จากการทดลองนี้ก็คาดว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงอาการของโรคได้ คือ เมื่อพืชติดเชื้อจะทำให้เกิดโรคอย่างช้าๆ และเหนี่ยวนำความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น จนถึงขั้นที่เกิดโรครุนแรงแล้วเซลล์ใบตาย ส่งผลให้การสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคงที่หรือลดลง เช่น การทดลองในพริกไทย ซึ่งรากจะตายอย่างรวดเร็วหลังจากถูกบ่มด้วยเชื้อรา *P. capsici* ในขณะที่ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสก็จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และปรากฏแถบไอโซไซม์ใหม่ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน ในการทดลองเดียวกันนี้เมื่อบ่มรากพริกไทยด้วยเชื้อรา *P. capsici* ร่วมกับ *P. illinoisensis* KJA-424 ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อกัน พบว่ารากพริกไทยมีโอกาสรอดตายสูง สามารถวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงสุดหลังจากบ่ม 5 วัน หลังจากนั้นค่าความว่องไวนี้ก็จะลดลง (Jung *et al*., 2004)

ตารางที่ 15 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) ในสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบขนาด 1x1 ตร.นิ้ว และซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท

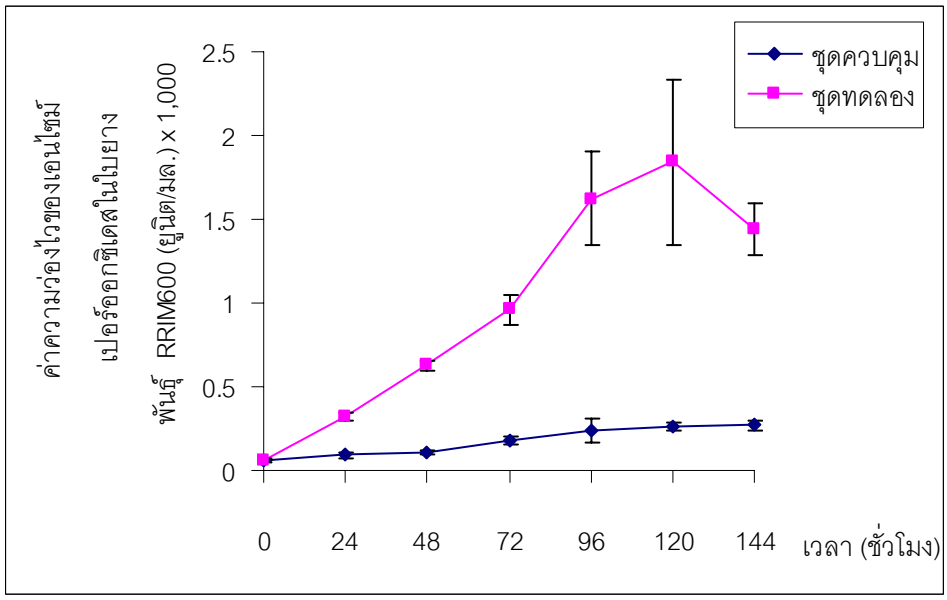
ชนิดสับสเตรท	*o*-dianisidine $x10^4$		guaiacol $x10^3$	
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	2.07±0.59	-	0.06±0.00	-
24	3.24±0.15	6.44±0.58	0.09±0.02	0.32±0.02
48	3.49±0.23	7.58±0.53	0.11±0.01	0.63±0.03
72	4.30±0.20	10.77±1.03	0.18±0.02	0.96±0.09
96	4.99±0.28	12.94±0.65	0.24±0.07	1.62±0.28
120	5.41±0.35	12.40±1.22	0.26±0.02	1.84±0.49
144	7.37±0.39	11.19±0.88	0.27±0.03	1.44±0.16

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

ก.



ข.



รูปที่ 30 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง

ก. เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

ข. เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท

3.5.2 ผลการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เมื่อกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น 5x10^{7} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองในข้อ 3.5.1 บ่มใบยางด้วยเชื้อรา *P. palmivora* ตั้งแต่ 0 จนถึง 144 ชั่วโมง พบว่า ที่ 144 ชั่วโมง ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเริ่มลดลงแล้ว ฉะนั้นในการทดลองนี้จึงลดระยะเวลาให้เร็วขึ้น เหลือ 120 ชั่วโมง โดยเลือกการตัดใบขนาด 1x1 ตร.นิ้ว และวางชิ้นใบยางบนกระดาษกรองชื้นเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่ใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์สูงกว่า เท่ากับ 5x10^{7} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพันธุ์ BPM-24 กระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงสุดโดยไม่ทำให้เซลล์ใบตาย วัดปริมาณโปรตีนรวมตั้งแต่ 0 จนถึง 120 ชั่วโมง พบว่ามีค่าลดลงเรื่อยๆ โดยในชุดควบคุมเริ่มต้นวัดได้ 8 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง แล้วลดลงจนเหลือ 3.3 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ส่วนในชุดทดลองก็มีค่าโปรตีนใกล้เคียงกัน คือ ที่ 24 ชั่วโมงวัดได้ 6.2 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ที่ 48 ชั่วโมงโปรตีน เท่ากับ 4.7 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง และชั่วโมงสุดท้าย (120 ชั่วโมง) วัดได้ เท่ากับ 3.5 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง (ค่าโปรตีนใกล้เคียงกับพันธุ์ RRIM600 ดูได้ในผลการทดลอง 3.5.2) และสามารถวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ปริมาณสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ในชุดทดลองค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้ผลเช่นเดียวกับพันธุ์ RRIM600 คือ วัดได้สูงสุดที่ 96 และ 120 ชั่วโมง เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และรูปที่ 31) โดยในพันธุ์ BPM-24 มีความว่องไวสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 2 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Breton และคณะ (1997) พบว่า ใบยางพาราที่บ่มด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น โดยตรวจพบในใบยางพันธุ์ต้านทาน (GT1) มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (PB260) ประมาณ 4 เท่า

จากการทดลองก่อนหน้านี้ของพันธ์วศรี แสงสุวรรณ (2547) ได้ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสเมื่อกระตุ้นด้วยอิลิซิตินและซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* พบว่าอิลิซิตินกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้มากกว่าซูโอสปอร์ เนื่องจากอิลิซิตินเป็นสารที่มาจากเชื้อรามีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงแทรกเข้าสู่เซลล์แคลลัสได้ง่ายกว่าการเจาะของซูโอสปอร์ และการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อต้านทานการบุกรุกจากเชื้อโรคก็เป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันโรค และสามารถใช้ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบอกระดับความต้านทานโรคได้ด้วย โดยพบว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 (พันธุ์ต้านทาน) สร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้มากกว่าพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) ประมาณ 6 เท่า เมื่อพิจารณาไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเฉพาะในพันธุ์

RRIM600 พบว่าไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสและใบยางปรากฏแถบความว่องไวที่เหมือนกัน

นอกจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถแยกระดับความต้านทานโรคในยาง พาราได้แล้ว ในพืชชนิดอื่นก็ทำได้เช่นกัน เช่น เมล็ดข้าวสาลีพันธุ์ต้านทาน (*Sumai#3* และ *wang shui-bai*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Fusarium graminearum* มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงในระยะที่มีการสร้างน้ำนม ระยะออกรวง ระยะสร้างแป้ง และระยะเก็บเกี่ยว ตามลำดับ และมีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Mohamammadi and Kazemi, 2002)

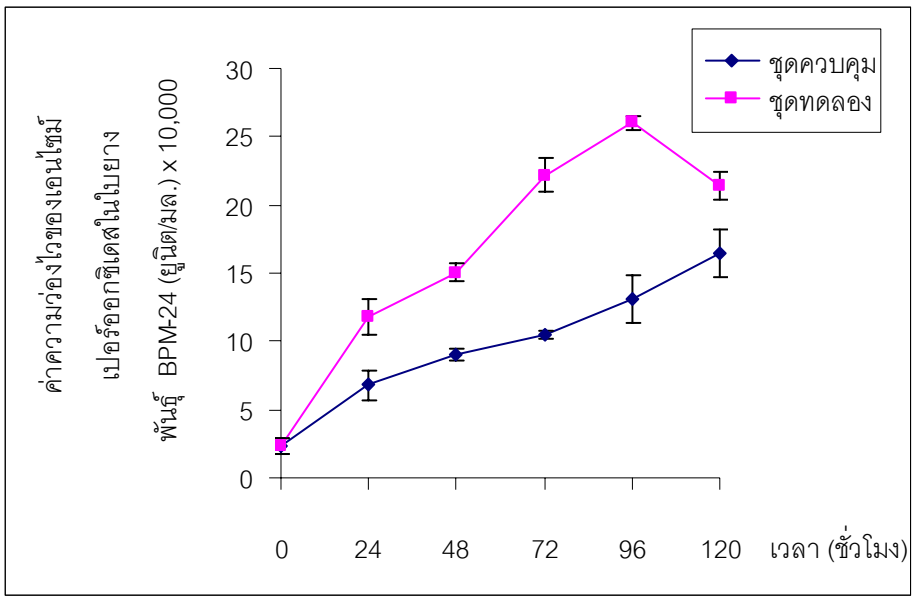
เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ยางกับความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ปริมาณการสะสมสคอพอลิติน และขนาดของรอยไหม้จากเชื้อรา *P. palmivora* พบว่า ใบยางพันธุ์ต้านทานมีลักษณะการลามของเชื้อราช้ากว่าพันธุ์อ่อนแอ เนื่องจากมีการตายของเซลล์รอบบาดแผลที่ถูกเจาะเป็นบริเวณที่มีขอบเขตแน่นอน เกิดเป็นจุดดำเท่านั้น เหลือเซลล์ปกติจำนวนมาก จึงสร้างสคอพอลิตินปริมาณสูงกว่าจึงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีกว่า (Churngchow and Rattarasarn, 2001) และเหนี่ยวนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น เพื่อสร้างผนังเซลล์ โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่โพลิเมอร์ไรซ์ซินนามิลแอลกอฮอล์ในขบวนการสังเคราะห์ลิกนิน (Quiroga *et al*., 2000)

ตารางที่ 16 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) ในสารสกัดใบยางพันธุ์ BPM-24 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบขนาด 1x1 ตร.นิ้ว และซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท

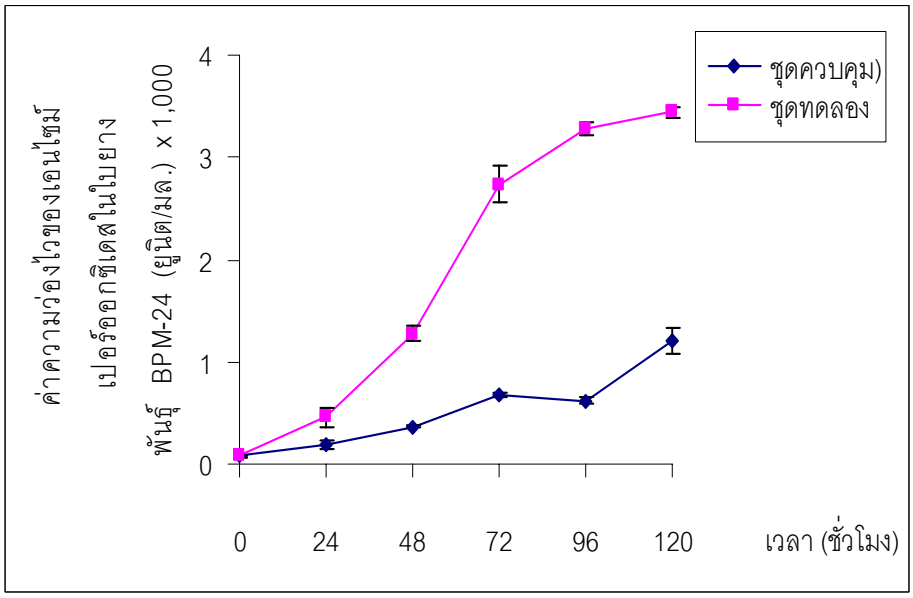
ชนิดสับสเตรท	*o*-dianisidine $x10^4$		guaiacol $x10^3$	
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	2.35±0.55	-	0.08±0.01	-
24	6.80±1.10	11.76±1.32	0.19±0.05	0.46±0.09
48	9.05±0.44	15.07±0.68	0.37±0.02	1.28±0.07
72	10.48±0.24	22.16±1.22	0.68±0.01	2.74±0.19
96	13.12±1.78	26.00±0.51	0.62±0.03	3.28±0.07
120	16.42±1.78	21.35±1.03	1.20±0.12	3.44±0.05

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

ก.



ข.



รูปที่ 31 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดใบยางพันธุ์ BPM-24 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

ก. เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

ข. เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท

3.6 ผลการศึกษาความแตกต่างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกิดบาดแผลจากสภาวะต่าง ๆ

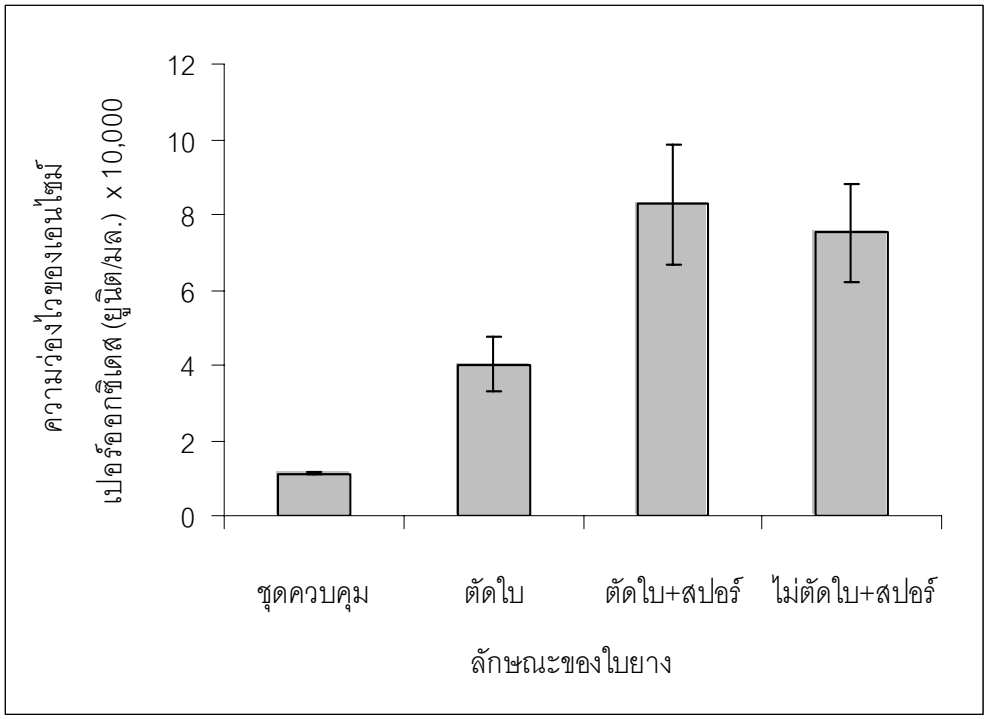
3.6.1 ผลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่กระตุ้นด้วยบาดแผลจากสภาวะต่าง ๆ

เนื่องจากใบยางที่เกิดบาดแผลก็ทำให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นได้ เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ผู้วิจัยจึงอยากทราบว่าเป็นไอโซไซม์ที่ต่างกันหรือไม่ เพราะเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีหลายไอโซไซม์และทำหน้าที่ทางชีวภาพต่างๆ กัน ใบยางแต่ละพันธุ์ก็มีจำนวนไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสต่างกัน เพื่อให้ได้ไอโซไซม์เดียวกันและเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค จึงต้องหาวิธีการกระตุ้นใบยางให้สังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์นี้ โดยในชุดทดลองมีด้วยกัน 3 วิธี คือ ทำให้เกิดบาดแผลจากการตัดใบเป็นชิ้นเล็กขนาด 1x1 ตร.นิ้ว ทำให้เกิดบาดแผลจากการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1x1 ตร.นิ้ว ร่วมกับการบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา และจากการบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อราเพียงอย่างเดียว โดยใช้ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ทั้งสามวิธีใช้วิธีการวางชิ้นใบบนกระดาษกรองชื้น เป็นเวลา 48 ชม. แล้วเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับชุดควบคุมที่ 0 ชม. ซึ่งตัดเก็บใบที่ -20°C ทันที โดยใบยางที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดมาจากก้านเดียวกัน เพื่อลดความแตกต่างระหว่างใบ เมื่อพิจารณาจากค่าโปรตีน พบว่า มีค่าใกล้เคียงกันทั้งในชุดควบคุมและชุดทดลอง โดยชุดควบคุมที่ 0 ชม. เท่ากับ 5.23 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง ส่วนในใบยางชุดทดลองที่เกิดบาดแผลจากการตัดใบร่วมกับการบ่มด้วยซูโอสปอร์ มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้ *o*-dianisidine เท่ากับ $(8.27\pm1.61) \times 10^4$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าใบที่ถูกตัดหรือบ่มด้วยซูโอสปอร์เพียงอย่างเดียว ประมาณ 2 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 17 และรูปที่ 32) แสดงว่าการตัดใบหรือการบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น จึงนำสารสกัดใบยางเหล่านี้ไปศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสตามวิธีในขั้นตอนที่ 3.6.2 และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นน่าจะทำหน้าที่ซ่อมแซมบาดแผลโดยนำไปใช้ในการสร้างลิกนิน ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้วิธีการตัดใบร่วมกับการบ่มด้วยเชื้อรา *P. palmivora* เพราะจะได้เป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาลิกนินต่อไป

ตารางที่ 17 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) x10^4 ที่กระตุ้นใบยางพันธุ์ RRIM600 ด้วยบาดแผลจากสภาวะต่างๆ (ซูโอสปอร์ความเข้มข้น 1x10^7 sp/ml) เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

ลักษณะใบยาง	ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส
ชุดควบคุม	1.13±0.02
ตัดใบ	4.01±0.72
ตัดใบ + ซูโอสปอร์	8.27±1.61
ไม่ตัดใบ + ซูโอสปอร์	7.52±1.29

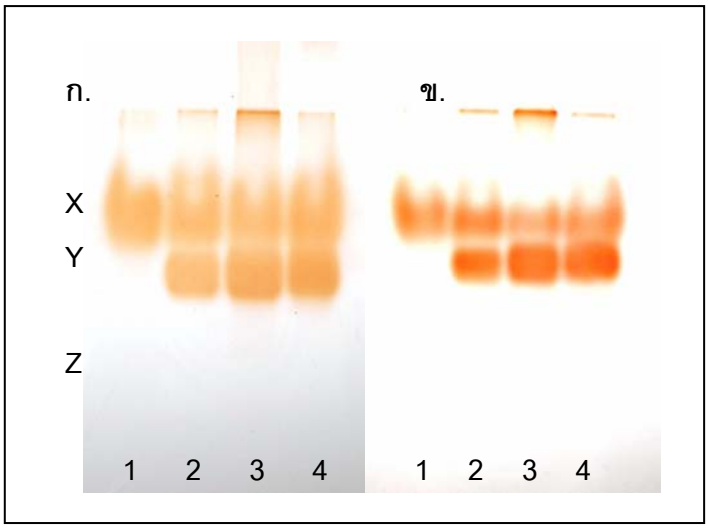
(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 32 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่กระตุ้นใบยางพันธุ์ RRIM600 ด้วยบาดแผลจากสภาวะต่างๆ (ซูโอสปอร์ความเข้มข้น 1x10^7 sp/ml)

3.6.2 ผลการศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกกระตุ้นด้วยบาดแผลจากสภาวะต่าง ๆ

จากค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในข้อ 3.6.1 เมื่อนำสารสกัดของตัวอย่างทั้ง 4 มาทำอิเล็คโตรโฟริซีสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) แล้วย้อมด้วย *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท พบว่าในชุดทดลองที่กระตุ้นการสร้างเปอร์ออกซิเดสด้วยการทำให้เกิดบาดแผลด้วยสภาวะต่างๆ จะปรากฏแถบความว่องไว 3 แถบ (X, Y และ Z) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งปรากฏเพียง 2 แถบ (X และ Z) โดยแถบความว่องไวที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้เป็นแถบที่ 2 (Y) ซึ่งเป็นไอโซไซม์เดียวกันจากทั้ง 3 ชุดการทดลอง เห็นได้จากตำแหน่งที่ย้อมความว่องไวติดและความเข้มของแถบค่าความว่องไวก็เป็นไปตามผลค่าความว่องไวในข้อ 3.6.1 คือ สารสกัดจากใบที่ถูกตัดร่วมกับการบ่มด้วยซูโอสปอร์ มีสีน้ำตาลเข้มที่สุด รองลงมาเป็นใบที่บ่มด้วยซูโอสปอร์และตัดอย่างเดียว ตามลำดับ (รูปที่ 33) นอกจากเชื้อรา *P. palmivora* ก็ยังมีการใช้เชื้อราอื่นในการกระตุ้นให้สร้างไอโซไซม์ใหม่ ๆ เช่น ในใบพริกไทยที่บ่มด้วยเชื้อ *P. capsici* เมื่อย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จะปรากฏ ไอโซไซม์ 3 แถบ โดยมี 1 แถบหลัก ขนาดโมเลกุล 53 kDa และ 2 แถบรอง ขนาดโมเลกุล 45 และ 114 kDa ในขณะที่เมื่อนำใบพริกไทยมาบ่มด้วยเชื้อ *P. capsici* ร่วมกับเชื้อปฏิปักษ์ คือ *Paenibacillus illnoisensis* จะปรากฏเพียง 2 แถบ ที่มีขนาดโมเลกุล 53 และ 114 kDa จึงสรุปว่าไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสขนาดโมเลกุล 45 kDa ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อพริกไทยติดเชื้อ แสดงว่าแถบความว่องไวนี้เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรค (Jung *et al*.,2004)



รูปที่ 33 Native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่กระตุ้นด้วยบาดแผลจากสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 0, 48 ชม. ด้วยวิธีวางบนกระดาษกรองชื้น โดยที่ ก. ย้อมด้วย *o*-dianisidine และ ข. ย้อมด้วย guaiacol เป็นสับสเตรท ได้แก่ ช่องที่ 1 = สารสกัดจากใบยางที่ 0 ชม.

ช่องที่ 2 = สารสกัดจากใบยางที่ถูกตัดเป็นชิ้นขนาด 1x1 นิ้ว เป็นเวลา 48 ชม.

ช่องที่ 3 = สารสกัดจากใบยางที่ถูกตัดเป็นชิ้นขนาด 1x1 นิ้ว ร่วมกับการบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชม.

ช่องที่ 4 = สารสกัดจากใบยางที่บ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชม.

3.7 ผลการศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากสารสกัดจากใบยางพาราเพียงบางส่วน (partially purify)

3.7.1 การกำจัดสีในสารสกัดด้วย polyvinylpyrrolidone (PVP)

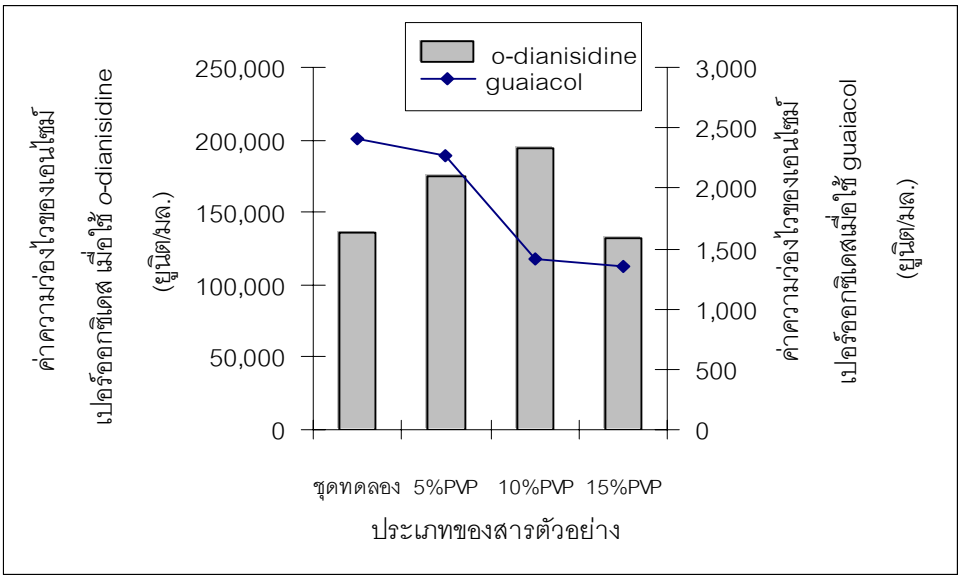
เนื่องจากสารสกัดใบยางทั้งชุดควบคุมและชุดทดลอง มีปัญหาเรื่องสีของสารฟีนอลิกที่บดบังการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 280 nm ทำให้ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริงได้ ทางผู้วิจัยจึงได้แก้ปัญหาด้วยการเติมสาร PVP เพื่อป้องกันการเกิดสารฟีนอลิก โดยใช้ใบยางชุดทดลองที่ 48 ชั่วโมง และใช้ PVP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในบัฟเฟอร์สกัด ได้แก่ 5% 10% และ 15% พบว่า สามารถป้องกันการเกิดสีได้เพียงบางส่วนเท่านั้น และเมื่อวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท พบว่า ค่าความว่องไวเพิ่มขึ้นตาม

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ PVP ที่ผสมในบัฟเฟอร์สกัด คือ มีค่าความว่องไวสูงสุดที่ 10% เท่ากับ 193,805.3 ยูนิต/มล. (ตารางที่ 18 และรูปที่ 34) เนื่องจาก PVP ใช้กำจัดสารฟีนอลิก เมื่อเติมลงไปแล้วทำให้ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น ดังนั้นตัวยับยั้งน่าจะเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก แต่เมื่อเพิ่ม PVP 15% กลับทำให้ค่าความว่องไวลดลงเหลือ 132,743.4 ยูนิต/มล. เนื่องจากไม่ได้เอา PVP ออกจากสารสกัดก่อนวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ดังนั้น PVP ที่ 15% อาจมากเกินไปจนไปจับกับ *o*-dianisidine (ทำให้ความว่องไวลดลง) แต่สำหรับ guaiacol มีความจำเพาะกับ PVP มากกว่า *o*-dianisidine เพราะฉะนั้น PVP เพียง 5% ก็เริ่มทำให้ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลดลง สรุปว่าการใช้ PVP ในสารสกัดใบยางเพื่อกำจัดสีไม่เหมาะสมในการทดลอง จึงควรหาวิธีการใหม่ นั้นคือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและใช้คอลัมน์ PD-10 ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 18 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) จากใบยางพันธุ์ RRIM600 ชุดทดลองที่ 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ PVP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในบัฟเฟอร์สกัด ได้แก่ 5% 10% และ 15% เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท

ชนิดสับสเตรท	ชุดทดลองที่ 48 ชม.	5% PVP	10% PVP	15% PVP
o-dianisidine	135,398.2	175,221.3	193,805.3	132,743.4
guaiacol	2,402.3	2,266.9	1,421.1	1,353.4

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง)



รูปที่ 34 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพันธุ์ RRIM600 ชุดทดลองที่ 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ PVP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในบัฟเฟอร์สกัด ได้แก่ 5% 10% และ 15% เมื่อใช้ *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นสับสเตรท

3.7.2 ผลการศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากสารสกัดใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 เพียงบางส่วน (partially purify)

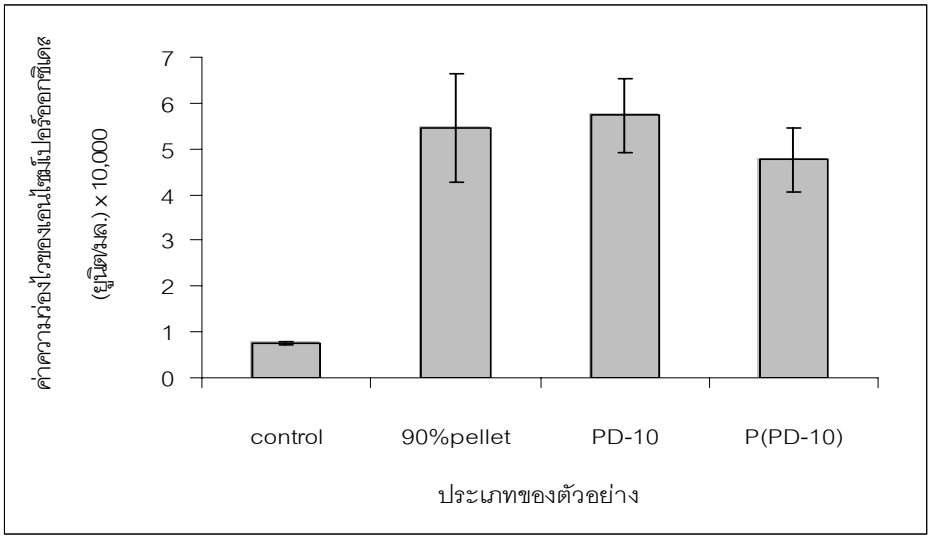
เนื่องจากสับสเตรทบางตัว ได้แก่ ascorbate และ coniferyl alcohol ต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี และสคอพอลิตินต้องวัดต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใกล้ช่วงยูวี ซึ่งสีของสารสกัดอาจจะบดบังค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจึงต้องกำจัดสีก่อนหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เช่นเดียวกับสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 ชุดควบคุมที่เวลา 0 ชั่วโมง มีค่าต่ำมาก ผู้วิจัยคาดว่าสีเขียวของคลอโรฟิลล์ในสารสกัดอาจรบกวนการวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จึงต้องกำจัดสีด้วยวิธีการต่างๆ กัน 3 วิธี ได้แก่ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การใช้คอลัมน์ PD-10 และการตกตะกอนด้วยเกลือแล้วผ่านคอลัมน์ PD-10 พบว่า หลังผ่านคอลัมน์ PD-10 สามารถกำจัดสีได้ดีกว่าการตกตะกอนโปรตีนอย่างเดียว แต่กำจัดสีได้น้อยกว่าการตกตะกอนโปรตีนแล้วผ่านคอลัมน์ PD-10 เมื่อวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกลับให้ผลตรงกันข้ามกัน คือ สารสกัดใบยางที่ตกตะกอนโปรตีนมีค่าใกล้เคียงกับการผ่านคอลัมน์ PD-10 เพียงอย่างเดียวซึ่งมีค่าเท่ากับ $(5.45\pm1.19) \times 10^4$ กับ $(5.73\pm0.80) \times 10^4$ ยูนิต/มล. ตามลำดับ แต่ให้ค่ามากกว่าการตกตะกอนแล้วผ่านคอลัมน์ PD-10 ซึ่งมีค่าเท่ากับ $(4.76\pm0.69) \times 10^4$ ยูนิต/มล. (ตารางที่ 19 และรูปที่ 35) เนื่องจากสารสกัดใบยางที่ผ่านการทำบริสุทธิ์หลายขั้นตอนจะทำให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

แต่สูญเสียโปรตีนไปบางส่วน ส่งผลให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลดลงด้วย เพื่อลดขั้นตอนที่ยุ่งยาก จึงเลือกใช้การผ่านคอลัมน์ PD-10 อย่างเดียว แต่เมื่อทำการทดลองไปสักระยะก็มีปัญหาอีกคือคอลัมน์ PD-10 ที่ผ่านการใช้งาน 2-3 ครั้ง ให้ค่าโปรตีนและความว่องไวที่ไม่สอดคล้องกับสารสกัดเริ่มต้น ดังนั้นในการทดลองที่ต้องการเปรียบเทียบหลายตัวอย่างก็จะใช้วิธีการตกตะกอนเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 19 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) x 10^4 จากสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 ที่ 0 ชั่วโมง ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เพียงบางส่วน (partially purify)

ประเภทของตัวอย่าง	ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส
ชุดควบคุม	0.76±0.04
ตกตะกอนด้วยเกลือความอิ่มตัว 90 %	5.45±1.19
PD-10	5.73±0.80
ตกตะกอนด้วยเกลือความอิ่มตัว 90 %+ PD-10	4.76±0.69

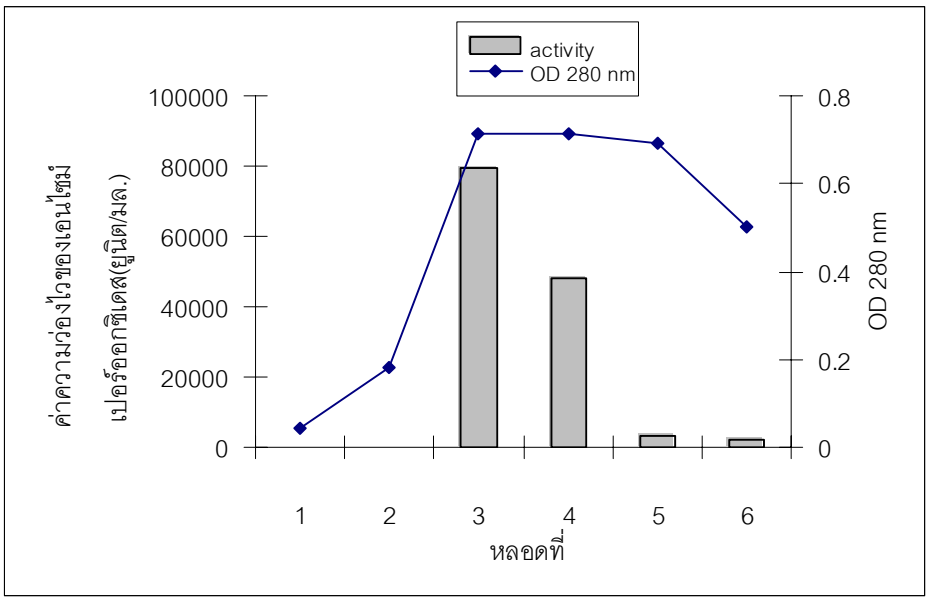
(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



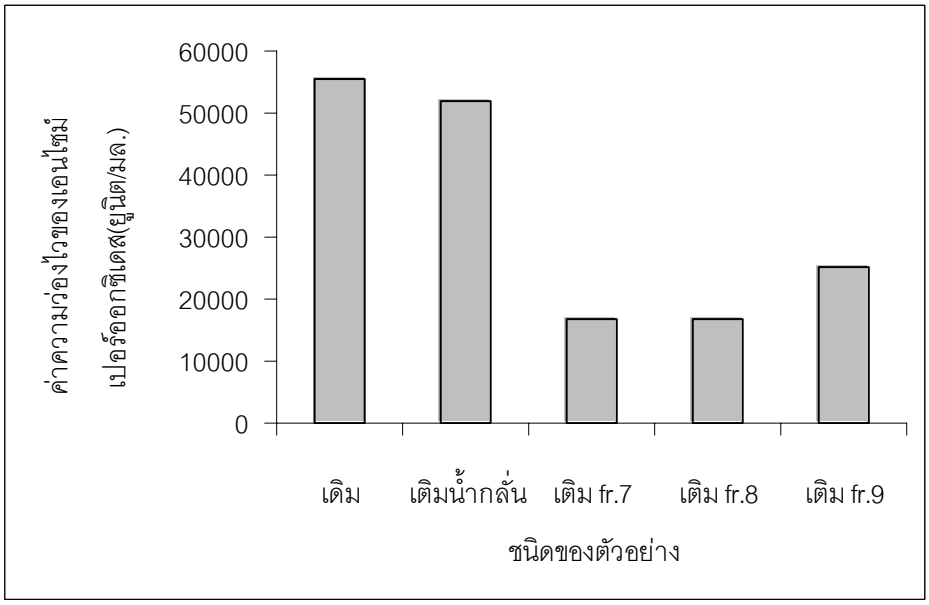
รูปที่ 35 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 ที่ 0 ชั่วโมง ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เพียงบางส่วน (partially purify)

3.7.3 การศึกษาตัวยับยั้งในสารสกัดใบยางเมื่อผ่านคอลัมน์ PD-10

โดยปกติแล้วในสารสกัดใบยางที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยเชื้อรา (ชุดควบคุม) จะวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้น้อย ไม่สามารถวัดอัตราเร็วเริ่มต้นใน 1 นาทีแรกของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ต้องคำนวณค่าความว่องไวจากช่วงนาทีหลัง ซึ่งตรงกันข้ามกับปฏิกิริยาในสารสกัดใบยางที่ถูกบ่มด้วยเชื้อราและจากการทดลองในข้อ 3.7.2 พบว่าการกำจัดสีทำให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นประมาณ 8 เท่า จึงสันนิษฐานว่าในชุดควบคุมน่าจะมีตัวยับยั้งขนาดโมเลกุลเล็กๆ จึงนำสารสกัดนี้มาผ่านคอลัมน์ PD-10 แล้วเก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จนถึง หลอดที่ 9 รวมสารละลายที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงเข้าด้วยกัน (fraction 3 และ 4) (รูปที่ 36) แล้ววัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอีกครั้ง เมื่อเติม 25 ไมโครลิตรของสารละลายหลอดที่ 7, 8 และ 9 ผสมอยู่ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีค่าลดลงเหลือประมาณ 32.4 32.6 และ 48.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 37) เมื่อเทียบกับชุดที่เติมน้ำกลั่น ซึ่งโดยหลักการของคอลัมน์ PD-10 จะบรรจุ sephadex G-25 สามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 1,000 – 5,000 ดาลตัน ทำให้ทราบว่าตัวยับยั้งนี้เป็นสารโมเลกุลเล็กและจากสีเหลืองปนน้ำตาลที่ปรากฏในสารละลายทั้ง 3 หลอด (หลอดที่ 7, 8 และ 9) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้ดี ดังนั้นตัวยับยั้งที่ปะปนในสารสกัดอาจเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 5,000 ดาลตัน



รูปที่ 36 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากสารสกัดใบยางปริมาตร 1 มล. ที่ผ่านคอลัมน์ PD-10 แล้วเก็บสารละลายหลอดละ 1 มล. (โดยที่ กราฟแท่ง : ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท และกราฟเส้น : ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร)



รูปที่ 37 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของสารละลายหลอดที่ 3+4 ที่ถูกยับยั้งด้วยสารละลายหลอดที่ 7, 8 และ 9 จากการผ่านคอลัมน์ PD-10

3.7.4 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน และค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับตัวยับยั้ง

จากวิธีการกำจัดสีของสารสกัดใบยางด้วยคอลัมน์ PD-10 ทำให้ทราบว่าคอลัมน์นี้สามารถใช้แยกตัวยับยั้งที่เป็นสารฟีนอลิก ทำให้วัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แท้จริงได้ เนื่องจากใบยางที่ใช้ในการทดลองมีทั้งชุดที่ปลอดเชื้อและติดเชื้อ ซึ่งต้องอาศัยความพิถีพิถันในการเลือกใบยางมาใช้ เพื่อป้องกันความแปรปรวนของข้อมูล ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้จึงคัดเลือกใบยางให้มีลักษณะทางกายภาพและชีวภาพที่ใกล้เคียงกันทุกการทดลอง ทางผู้วิจัยจึงพิจารณาปริมาณโปรตีนรวมและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของสารสกัดใบยางชุดควบคุมที่ 0 (C_0) และที่ 48 (C_{48}) ชั่วโมง ทั้งก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ PD-10 เมื่อรวบรวมข้อมูลจำนวนมาก พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีความสัมพันธ์กับปริมาณตัวยับยั้งซึ่งเป็นสารฟีนอลิก และบ่งบอกได้ว่าใบยางที่ใช้ทดลองอยู่ในช่วงติดเชื้อมากหรือน้อย ซึ่งสามารถแบ่งใบยางตามสภาพการติดเชื้อได้ 3 แบบ คือ ช่วงใบยางปลอดเชื้อ ช่วงกำลังติดเชื้อ และช่วงติดเชื้อเต็มที่ โดยในช่วงที่ใบยางปลอดเชื้อพบว่า มีปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสต่ำ ไม่ว่องไวต่อการถูกกระตุ้น (ถูกกรีด) เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์ PD-10 แล้วค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้ไม่แตกต่างจากค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดเริ่มต้น (crude extract) แสดงว่าในช่วงนี้ไม่มีการสร้างสารฟีนอลิกขึ้น ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจึงไม่ถูกยับยั้ง ในการวิจัยครั้งนี้พบใบยางที่ปลอดเชื้อน้อยมาก เนื่องจากใช้ใบยางจากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยยางสงขลา ซึ่งปลูกรวมกับแปลงอื่นๆ และสภาพอากาศที่แปรปรวน ทำให้มีการติดเชื้อ ดังนั้นใบยางส่วนใหญ่ที่ใช้จึงติดเชื้อจากธรรมชาติอยู่แล้ว แต่ก่อนทดลองต้องเลือกใช้ใบที่อยู่ในสภาพปกติ ไม่มีบาดแผลหรือรอยกัดจากแมลง เมื่อพิจารณาใบยางที่อยู่ในช่วงที่กำลังติดเชื้อพบว่า ปริมาณโปรตีนรวมมีค่าปานกลาง (ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อกรัมใบยาง) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความว่องไวมาก ซึ่งสามารถวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นหรือผ่านคอลัมน์ PD-10 เช่น ในสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 ชุด C_0 วัดปริมาณโปรตีนได้ 7.69 มก./กรัมใบยาง ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 0.14×10^4 ยูนิต/มล. และที่ C_{48}เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เท่ากับ 5.52×10^4 ยูนิต/มล. คิดเป็น 40 เท่าจากสารสกัดเริ่มต้น หลังผ่านคอลัมน์ PD-10 พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมลดลง แต่ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกลับเพิ่มขึ้น โดยชุด C_0 และ C_{48} เพิ่มขึ้น 38 และ 1.9 เท่าจากสารสกัดเริ่มต้น ตามลำดับ จะเห็นว่าหลังผ่านคอลัมน์ PD-10 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุด C_0 เพิ่มสูงกว่าชุด C_{48} แสดงว่า C_0 ที่เก็บมาก็มีตัวยับยั้ง เมื่อกระตุ้นโดยการกรีด (C_{48}) ก็มี

ตัวยับยั้งเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับตัวยับยั้งในธรรมชาติ ซึ่งก็ชี้ให้เห็นว่าใบยางในช่วงที่กำลังติดเชื้อ มีการสะสมสารฟีนอลิก(ตัวยับยั้ง) และสามารถวัดปริมาณตัวยับยั้งได้จากปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่หายไปดังสมการต่อไปนี้

ปริมาณ POD ที่หายไป = ปริมาณ POD ที่ถูกจับด้วยตัวยับยั้ง

= POD (หลังผ่านคอลัมน์ PD-10) – POD (crude extract)

โดยที่ POD คือ ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ในชุด C_0 และ C_{48} พบว่า ค่า POD ที่ถูกจับด้วยตัวยับยั้ง มีค่าเท่ากับ 5.17×10^4 และ 5.10×10^4 ยูนิต/มล. ตามลำดับ ซึ่งเป็นการแสดงปริมาณตัวยับยั้งที่มีในสารสกัดใบยางได้ด้วย

ในกรณีที่ใบยางติดเชื้อเต็มที่จนสามารถปรับตัวได้แล้ว มีปริมาณโปรตีนสูงมาก (มากกว่า 10 มก./กรัมใบยาง) ส่วนค่า POD ก่อนและหลังผ่าน PD-10 มีค่าไม่ต่างกันมาก เนื่องจากในช่วงนี้มีตัวยับยั้งน้อยลง เพราะสารฟีนอลิกถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบ (form) อื่น โดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจะออกซิไดซ์สารฟีนอลิก (เป็นพิษต่อเซลล์พืชด้วย) เป็นสารโพลีฟีนอล ซึ่งไม่ใช่ตัวยับยั้งของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอีกต่อไป ดังนั้นจะสังเกตได้ว่าใบยางที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในสภาพติดเชื้อจึงมีตัวยับยั้งลดลง เช่น ในสารสกัดใบยางชุด C_0 วัดโปรตีนได้ 17.8 มก./กรัมใบยาง มีค่า POD เท่ากับ 11.55×10^4 ยูนิต/มล. เมื่อนำมากระตุ้นด้วยการตัดใบที่ 48 ชั่วโมง (C_{48}) สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น เท่ากับ 21.08×10^4 ยูนิต/มล. หลังผ่านคอลัมน์ PD-10 พบว่า ชุด C_0 มีค่า POD ลดลงเหลือ 8.26×10^4 ยูนิต/มล. และชุด C_{48} มีค่า POD เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เท่ากับ 21.77×10^4 ยูนิต/มล. ซึ่งค่า POD ก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ PD-10 มีค่าใกล้เคียงกันมาก ถือว่าใบยางในช่วงติดเชื้อเต็มที่มีตัวยับยั้งน้อยมาก (ข้อมูลแสดงในตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับตัวยับยั้งในสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 ชุดควบคุมที่ 0 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรทในการวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

สภาพใบยาง	ก่อนผ่านคอลัมน์ PD-10				หลังผ่านคอลัมน์ PD-10				POD ที่ถูกจับด้วยตัวยับยั้ง (ยูนิต/มล.) x 10^4	
	ปริมาณโปรตีน (มก./กรัมใบยาง)		POD (ยูนิต/มล.) x10^4		ปริมาณโปรตีน (มก./กรัมใบยาง)		POD (ยูนิต/มล.) x10^4			
ชั่วโมง	0	48	0	48	0	48	0	48	0	48
กำลังติดเชื้อ	7.69	6.23	0.14	5.52	4.88	3.23	5.31	10.62	5.17	5.10
ติดเชื้อเต็มที่	17.8	8.99	11.55	21.08	4.59	4.57	8.26	21.77	-	0.69

3.7.5 ผลเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ กัน ได้แก่ *o*-dianisidine guaiacol coniferyl alcohol และ ascorbate ในสารสกัดที่ผ่านคอลัมน์

การวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สับสเตรทที่ต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาในช่วงยูวี คือความยาวคลื่นระหว่าง 100-380 นาโนเมตร เช่น coniferyl alcohol ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงลดลงที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร ต้องใช้สารตัวอย่างที่ไม่มีสี เพราะสีอาจรบกวนค่าการดูดกลืนแสงที่แท้จริง จึงต้องกำจัดสีโดยผ่านคอลัมน์ PD-10 ซึ่งคอลัมน์นี้สามารถกำจัดทั้งสีและตัวยับยั้งพวกฟีนอลิก (ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm) ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กออกได้ (ดังผลการทดลองข้อ 3.7.1 และ 3.7.2) ทำให้สารตัวอย่างที่ได้ใสปราศจากสี สามารถเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ ได้แก่ *o*-dianisidine guaiacol coniferyl alcohol และ ascorbate ในชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง และชุดทดลองที่กระตุ้นใบยางพันธุ์ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น 1x10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 21) มีอัตราการเพิ่มค่าความ

ว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังจากผ่านคอลัมน์ PD-10 ไม่คงที่ขึ้นอยู่กับว่ามีปริมาณตัวยับยั้งในใบยางมากหรือน้อยเพียงใด จากการทดลองที่ผ่านมาก็พอสรุปได้ว่า ถ้าค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังผ่านคอลัมน์ PD-10 สูงขึ้น แสดงว่าใบยางเริ่มติดเชื้อในธรรมชาติ มีการสะสมสารฟีนอลิก ซึ่งทำหน้าที่ต้านทานการบุกรุกของเชื้อโรค แต่จะยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์ PD-10 ก็สามารถกำจัดออกได้ แต่ถ้าค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังผ่านคอลัมน์ PD-10 ลดลง ก็แสดงว่าใบยางสะอาดไม่มีตัวยับยั้งสะสมอยู่ เพราะเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะสูญเสียไปบางส่วนเมื่อผ่านคอลัมน์ PD-10 นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆ ด้วย เช่น ปริมาณโปรตีนรวม ต้องมีค่าต่ำ รวมถึงลักษณะใบยางต้องอยู่ในสภาพปกติและมีตัวยับยั้งค่อนข้างสูง ใบยางส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดลองอยู่ในกรณีแรก คือ ปริมาณโปรตีนรวมค่อนข้างสูง แต่สภาพใบปกติ ในการเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยสับสเตรทชนิดต่างๆ กัน ผู้วิจัยเลือกสารสกัดที่ผ่านคอลัมน์ PD-10 มาใช้ พบว่า *o*-dianisidine สามารถวัดความว่องไวได้สูงสุด เพราะสับสเตรทนี้วัดปริมาณความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ทำหน้าที่ทั่วไปทั้งหมด รองลงมาคือ coniferyl alcohol ตามลำดับ ที่สามารถวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเฉพาะหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับสร้างลิกนิน ส่วน guaiacol ก็เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินเช่นกัน แต่ต้องศึกษาประกอบกับเอนไซม์อื่นๆ ด้วย จากรายงานของ Geiger และคณะ (1989) ที่กระตุ้นใบยางด้วยเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ที่ทำให้โรครากเน่าในยางพารา เหนี่ยวนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท โดยปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นนี้ แสดงว่าเนื้อเยื่อของยางพารามีการตอบสนองต่อเชื้อรา ส่วนการทดลอง Grisebach และคณะ (1977) กับ Gross และคณะ (1977) กล่าวว่า guaiacol และ coniferyl alcohol) ที่เซลล์พืชใช้เป็นสับสเตรทในปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรซ์ไปเป็นลิกนิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืชอาศัย ดังนั้น coniferyl alcohol และ guaiacol จึงทำหน้าที่ในการสร้างลิกนิน ส่วน ascorbate ไม่ถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จึงไม่สามารถหาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองไม่สามารถใช้ ascorbate เป็นสับสเตรทได้ เพราะวิธีการสกัดอาจไม่เหมาะสมทำให้ไม่สามารถสกัด ascorbate เปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์ได้ แต่การทดลองของ Papadakis และคณะ (2001) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบองุ่นสามารถใช้ ascorbate เป็นสับสเตรทในการจำกัด H_2O_2 ออกจากเซลล์ได้ เพราะในการสังเคราะห์แสงของพืชจะเกิดการสะสม active oxygen species รวมถึง H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์พืช ดังนั้นจึงกำจัด H_2O_2 โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารประกอบ

ฟีนอล เพื่อเปลี่ยน H_2O_2 เป็นน้ำ และเกิดอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอล ที่พร้อมจะทำปฏิกิริยากับ ascorbate เกิดเป็นอนุมูลอิสระของ monodehydroascorbate แล้วเกิดการโพลิเมอร์ไรซ์กัน จนได้ dehydroascorbic acid และ ascorbate ซึ่งพร้อมจะเกิดปฏิกิริยากำจัด H_2O_2 ต่อไป (Perez *et al*., 2002)

ตารางที่ 21 ผลการเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) x 10^4 เมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ กัน ได้แก่ *o*-dianisidine guaiacol และ coniferyl alcohol ในสารสกัดที่ผ่านคอลัมน์ PD-10

ชนิดของสับสเตรท	*o*-dianisidine	guaiacol	coniferyl alcohol
ชุดควบคุมที่ 0 ชม.	6.05	0.17	0.71
ชุดทดลองที่ 48 ชม.	16.14	0.23	1.63

3.8 ผลการเปรียบเทียบการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยาง 5 พันธุ์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบ

3.8.1 ผลการเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบ

ในการเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในใบยางพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 จะใช้วิธีการกระตุ้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยการตัดเท่านั้น (ขนาด 1x1 ตร.นิ้ว วางชิ้นใบบนกระดาษกรองชื้น แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง) เนื่องจากการบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์จะต้องใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละพันธุ์อย่างละเอียดจึงจะสามารถบอกระดับความต้านทานในการป้องกันโรคได้ ดังนั้นเพื่อลดปัญหาความแตกต่างของสิ่งขีดขวางทางกายภาพ (physical barrier) ระหว่างพันธุ์จึงเลือกใช้วิธีการตัดใบอย่างเดียว ผลการทดลองพบว่าในสารสกัดใบยางเริ่มต้น (crude extract) มีระดับความเข้มของสี (สีเขียว) ไม่เท่ากัน จึงทำให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่วัดได้มีค่าคลาดเคลื่อนจากค่าจริง ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลกันได้ จึงตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 90% เพื่อกำจัดตัวยับยั้งออกไปก่อน สามารถสรุปผลการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์ BPM-24 และ PB235 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์ RRIT251 และ RRIM600 โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มพันธุ์ต้านทาน สังเกตได้จากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่

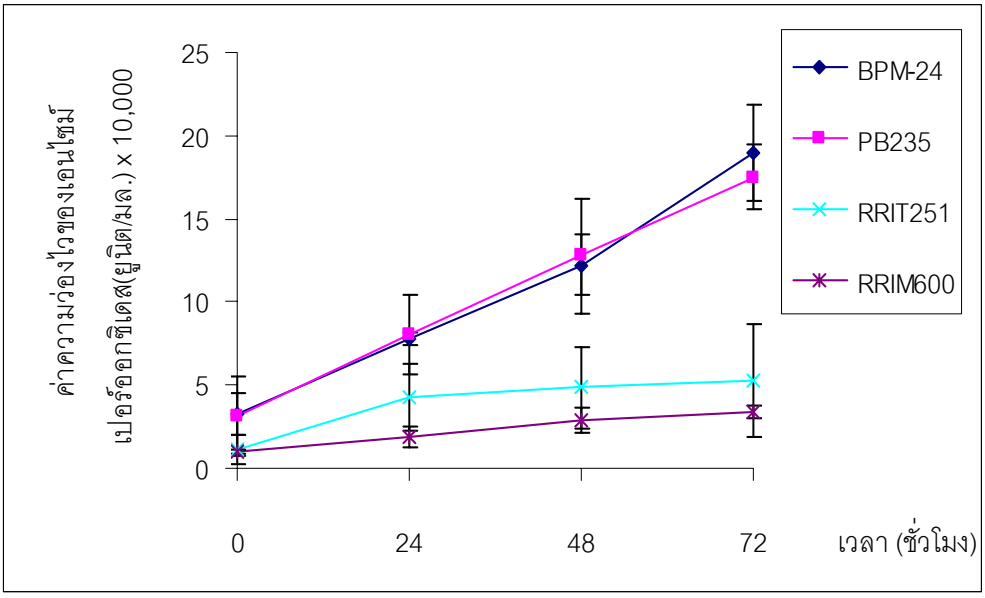
กระตุ้นได้มีค่าความว่องไวสูงกว่ากลุ่มที่ 2 ประมาณสามเท่า (ตารางที่ 22 รูปที่ 38) ซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองของ Breton และคณะ (1997) แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ต้านทานมีอัตราการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ

แต่ผลการทดลองภายในกลุ่มเดียวกันไม่สามารถนำมาใช้ในการจัดเรียงลำดับ เพื่อแยกระดับความต้านทานได้ เนื่องจากพันธุ์ PB235 มีการติดเชื้อในสภาพธรรมชาติ (ใบยางเป็นจุดสีเหลือง) จึงเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูง เมื่อใบยางถูกตัดซ้ำอีกครั้งก็ทำให้เกิดบาดแผลก็ยิ่งเพิ่มสิ่งกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงขึ้น ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงไม่สามารถแยกระดับความแตกต่างภายในกลุ่มได้ ซึ่งโดยหลักการพันธุ์ BPM-24 (ต้านทานมาก) น่าจะสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าพันธุ์ PB235 ซึ่งเป็นพันธุ์ค่อนข้างต้านทาน และความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพันธุ์ RRIT251 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานปานกลาง มีค่าสูงกว่าพันธุ์ RRIM 600 ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอ

ตารางที่ 22 ผลการเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) x 10^4 ในใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความอิ่มตัว 90%

พันธุ์ยาง / เวลา (ชม.)	0	24	48	72
BPM-24	3.29±1.23	7.79±0.43	12.24±1.86	18.94±2.92
PB235	3.17±2.37	8.04±2.39	12.76±3.46	17.52±1.91
RRIT251	1.12±0.83	4.30±2.04	4.84±2.44	5.28±3.39
RRIM600	1.05±0.12	1.91±0.61	2.91±0.72	3.39±0.37

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 38 ผลการเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบ ที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความอิ่มตัว 90%

3.8.2 ผลความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT 251 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยการตัดใบ

เมื่อพิจารณาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากใบยางพาราทั้งสี่พันธุ์ที่กระตุ้นด้วยการตัดใบเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 ตารางนิ้ว แล้ววางใบบนกระดาษกรองชื้นดังเช่นในข้อที่ 3.5.1 สามารถแบ่งความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ต้านทาน ได้แก่ พันธุ์ BPM-24 กับ PB235 วัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ในปริมาณสูงกว่ากลุ่มที่สอง ซึ่งเป็นกลุ่มพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ RRIT251 กับ RRIM600 ประมาณ 2-3 เท่า เมื่อนำมาตรวจความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) แล้วย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย *o*-dianisidine และ guaiacol พบ 2 ไอโซไซม์ (ไอโซไซม์ X และ Y) ในชุดควบคุม และ 3 ไอโซไซม์ (ไอโซไซม์ X, Y และ Z) ในชุดทดลองมีไอโซไซม์ X เท่านั้น ที่แตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม กล่าวคือไอโซไซม์ X ในกลุ่มพันธุ์ต้านทานจะปรากฏแถบความว่องไวในตำแหน่งที่สูงกว่ากลุ่มพันธุ์อ่อนแอ (รูปที่ 39) เพื่อแยกความแตกต่างของไอโซไซม์นี้จึงเรียกไอโซไซม์ X ของพันธุ์ต้านทานว่า ไอโซไซม์ X_1 และพันธุ์อ่อนแอ เรียกว่า ไอโซไซม์ X_2 เช่นเดียวกับผลการทดลองของพันธ์วศรี แสงสุวรรณ (2547) พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพารา ปรากฏทั้งไอโซไซม์ X และ Y ในแคลลัส

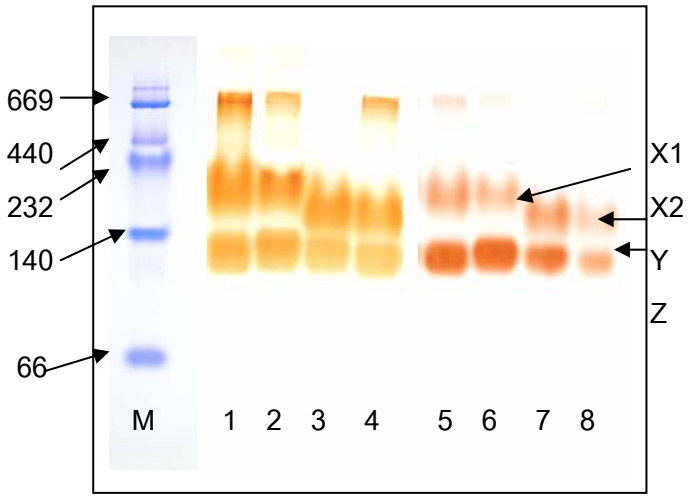
พันธุ์ RRIM600 แต่ไม่สามารถอธิบายได้ว่าไอโซไซม์ X จากแคลลัสตรงกับไอโซไซม์ X_1 หรือ X_2 ในใบยางหรือไม่

ส่วนวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ให้ผลการทดลองเหมือน กับวิธี native PAGE ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับพัชรากร รัตนภูมิ (2543) แต่ไม่ปรากฏไอโซไซม์ Z เนื่องจากก่อนย้อมเจลต้องชะ SDS ออกก่อน จึงทำให้ไอโซไซม์ Z ซึ่งมีความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสน้อย จึงเห็นแถบจางมากและเกือบมองไม่เห็น จากทั้งสองวิธีข้างต้นจะพบไอโซไซม์ที่เหมือนกันทั้ง 4 พันธุ์ แต่ไม่พบไอโซไซม์ Y ในชุดควบคุม แสดงว่าไอโซไซม์ Y เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค ดังนั้นน่าจะใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในพืชชนิดอื่นด้วย เช่น ในต้นอ่อนของ pearl millet ที่แยกความต้านทานต่อโรคราแป้ง (downy mildew) ด้วยวิธี isoelectric focusing (IEF) พบ 22 ไอโซไซม์ ในพันธุ์ต้านทาน และ 12 ไอโซไซม์ ในพันธุ์อ่อนแอ (Shivakumar *et al*., 2003) ส่วนต้น fox-tail millet ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นในสภาวะกดดันของโซเดียมคลอไรด์ โดยพันธุ์ Prasad ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน และพันธุ์ Lepalshi ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อเกลือ พบ 5 และ 4 ไอโซไซม์ ตามลำดับ จากการศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส ได้มีการนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการประเมินความแตกต่างของสายพันธุ์พืชด้วย เช่น การจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. คือ ลองกอง ลางสาด และลูกู จากสารสกัดใบ พบว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดีที่สุด (วันทนา นวรังสรรค์, 2538)

จากการเลือกใช้วิธีการสกัดใบยางด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 สามารถสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไซโทซอล ชนิดแอนไอออนิก ซึ่งยืนยันผลได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟริซีสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) ในอิเล็กโตรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของพัชรากร รัตนภูมี (2543) ที่ใช้วิธีการสกัดแบบเดียวกัน ทำ native PAGE และ SDS-PAGE ที่สภาวะเดียวกัน โดยก่อนทำให้บริสุทธิ์มีเปอร์ออกซิเดส 5 ไอโซไซม์ และหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนของ DEAE-Sephacel จะเหลือ 2 หรือ 3 ไอโซไซม์ ซึ่งสามารถย้อมโปรตีนและค่าความว่องไวได้ 3 แถบ ใน native PAGE มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 125,000 และ 140,000 ดาลตัน ซึ่งจำนวนไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสก็สอดคล้องกับการทดลองนี้ ที่ได้ 2 ไอโซไซม์และจากชุดควบคุมและ 3 ไอโซไซม์จากชุดทดลอง รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลก็มีค่าใกล้เคียงกัน โดยความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสในการทดลองแต่ละครั้ง อาจจะเป็นเพราะสิ่งแวดล้อมของสถานที่ปลูกยาง ช่วงเวลา สภาพอากาศ และฤดูกาลที่ต่างกัน (Baier *et al*.,1993)

ก็อาจจะมีผลต่อสมบัติทางชีวภาพของใบยางพาราได้

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ตกตะกอนระหว่างรอยต่อของเจลส่วน stacking และ separating ซึ่งย้อมติดสีด้วย อาจจะเป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดเบสิก ทั้งนี้เนื่องจากเจลส่วน stacking มี pH 6.8 จึงส่งผลทำให้โปรตีนและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในกลุ่มเบสิกไม่สามารถเคลื่อนที่ลงมาใน separating (pH 8.8) ได้ จึงค้างที่รอยต่อระหว่างเจลทั้งสอง



รูปที่ 39 Native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 ที่กระตุ้นด้วยการตัดใบ แล้ววางบนกระดาษกรองชื้น 48 ชม. โดยที่

ช่องที่ 1 = สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด HMW ได้แก่ thyroglobulin (MW 669 กิโลดาลตัน), ferritin (MW 440 กิโลดาลตัน), catalase (MW 232 กิโลดาลตัน), lactase dehydrogenase (140 กิโลดาลตัน) และ albumin (66 กิโลดาลตัน)

ช่องที่ 2-4 = สารสกัดจากใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 ตามลำดับ ย้อมเจลด้วย *o*-dianisidine

ช่องที่ 5-8 = สารสกัดจากใบยางพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251 และ RRIM600 ตามลำดับ ย้อมเจลด้วย guaiacol

3.9 ผลการทำบริสุทธิ์เฉพาะไอโซไซม์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคยางพาราพันธุ์ RRIM600

3.9.1 ผลการวัดปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเฉพาะไอโซไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพาราพันธุ์ RRIM600

หลังจากบดแผ่นเจลส่วนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในบัฟเฟอร์แล้ว นำส่วนใสที่ได้ไปตรวจวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสก่อนนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส โดยใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท พบว่าในชุดทดลองที่ 48 ชั่วโมง ก่อนทำอิเล็กโตรโฟริซีสมีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 249,557.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังบดเจล มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสรวม เท่ากับ 27,876.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยแยกเป็นค่าความว่องไวของไอโซไซม์แถบบน (ไอโซไซม์ X) เท่ากับ 11,469.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าความว่องไวของไอโซไซม์แถบล่าง (ไอโซไซม์ Y) เท่ากับ 16,407.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ผลการทดลองในตารางที่ 23) จะเห็นได้ว่าหลังบดเจลค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหายไปประมาณ 89 เปอร์เซนต์ ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่า วิธีการทำบริสุทธิ์แบบนี้ยังไม่เหมาะสมในการทำการทดลองต่อไป ในขณะนี้เพื่อความสะดวกและรวดเร็ว จึงใช้วิธีการศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์

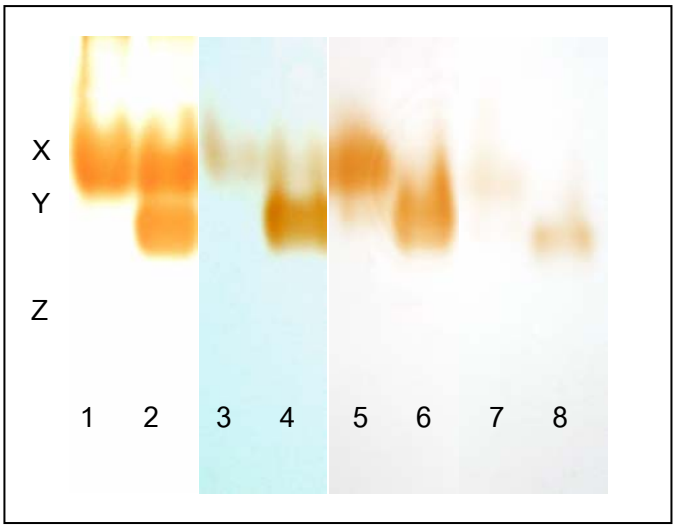
ตารางที่ 23 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิต/มล.) จากสารสกัดใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากแผ่นเจล เมื่อใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท

ก่อนทำบริสุทธิ์		หลังทำบริสุทธิ์		
ชุดควบคุม 0 ชม.	ชุดทดลอง 48 ชม.	ชุดควบคุม 0 ชม. (ไอโซไซม์ X)	ชุดทดลอง ที่ 48 ชม. (ไอโซไซม์ X)	ชุดทดลอง ที่ 48 ชม. (ไอโซไซม์ Y)
64,778.46	249,557.52	8,920.35	11,469.03	16,407.08

3.9.2 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสแบบ native PAGE และ SDS-PAGE

เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในสารสกัดใบยางพันธุ์ RRIM600 โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีสกัดจากแผ่นเจลในข้อ 2.10.5 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสแบบ native PAGE และแบบ SDS-PAGE พบว่า ไอโซไซม์ X (แถบบน) และไอโซไซม์ Y (แถบล่าง) สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน เมื่อย้อมไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย *o*-dianisidine โดยลักษณะของแถบที่ปรากฏในวิธี native PAGE และ SDS-PAGE มีความเหมือนกัน เพียงแต่ความเข้มของแถบในวิธี SDS-PAGE จะจางกว่า เนื่องจากขั้นตอนการย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสต้องผ่านการล้างเจลเพื่อชะล้าง SDS ออก ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบางส่วนหลุดออกไป ในช่องที่ 1 และ 2 เป็นสารสกัดของชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง และชุดทดลองที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 40) ซึ่งในช่องที่ 1 จะปรากฏเพียงไอโซไซม์ X เท่านั้น เมื่อใบยางถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ก็จะปรากฏไอโซไซม์ Y อีกหนึ่งแถบ ส่วนในช่องที่ 5-8 เป็นไอโซไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว จะเห็นไอโซไซม์ X ในช่อง 1, 3, 5 และ 7 ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่ใบยางพารามีอยู่แล้วในธรรมชาติ และจะปรากฏไอโซไซม์ Y ในช่องที่ 2, 4, 6 และ 8 ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่ถูกกระตุ้นด้วยบาดแผลจากการตัดและด้วยการบ่มด้วยซูโอสปอร์ ไอโซไซม์นี้เป็นไอโซไซม์เดียวกันทั้งในพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 (ไม่แสดงผลของใบยางพันธุ์ BPM-24) เพราะปรากฏแถบค่าความว่องไวดังกล่าวที่ตำแหน่งเดียวกัน

นอกจากเชื้อรา *P. palmivora* แล้ว ก็ยังมีเชื้อราอื่นด้วยที่สามารถกระตุ้นให้สร้างไอโซไซม์ใหม่ๆ เช่น ในพริกไทยที่บ่มด้วยเชื้อรา *P. capsici* เมื่อย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย guaiacol จะปรากฏ 3 ไอโซไซม์ โดยมีไอโซไซม์หลักเพียงแถบเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 53 กิโลดาลตัน และ 2 ไอโซไซม์รองที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45 และ 114 กิโลดาลตัน ในขณะที่ชุดควบคุมจะปรากฏเพียง 2 ไอโซไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุล 53, 114 กิโลดาลตัน จึงสรุปได้ว่าไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ขนาดโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อพริกไทยติดเชื้อ แสดงว่าไอโซไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการป้องโรค (Jung *et al*., 2004)



รูปที่ 40 Native PAGE และ SDS-PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่กระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีวางบนกระดาษกรองชื้น ย้อมด้วย *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท โดยที่

ช่องที่ 1-4 สารตัวอย่างก่อนทำบริสุทธิ์ ช่องที่ 5-8 สารตัวอย่างหลังทำให้บริสุทธิ์

ช่องที่ 1, 2 = native PAGE ของสารสกัดจากใบยางชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง และใบยางชุดทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

ช่องที่ 3, 4 = สารสกัดเดียวกับช่อง 1, 2 แต่เป็น SDS-PAGE

ช่องที่ 5, 6 = native PAGE ของไอโซไซม์ X และ Y จากใบยางที่ถูกที่กระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

ช่องที่ 7, 8 = สารสกัดเดียวกับช่อง 5, 6 แต่เป็น SDS-PAGE

3.10 การศึกษาปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน

3.10.1 การศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL)

จากงานวิจัยที่เคยรายงานผลความว่องไวของเอนไซม์ PAL ว่าเป็นเอนไซม์ตัวแรกในขบวนการสังเคราะห์ phenylpropanoid ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการสังเคราะห์ลิกนิน ถือว่าเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชจากสภาวะเครียดต่างๆ ด้วย เนื่องจาก PAL เป็นเอนไซม์เริ่มต้นและเกิดก่อนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ดังนั้นในการศึกษาเพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์จึงตัดใบยางพันธุ์ RRIM600 เป็นชิ้นขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร บ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แล้ววางใบบนกระดาษกรองชื้น เก็บผลทุก

ชั่วโมงในช่วง 4 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเก็บผลทุก 4 ชั่วโมงจนถึง 16 ชั่วโมง นำสารสกัดที่บดใหม่ๆ ไปวัดความว่องไวของเอนไซม์ PAL โดยวิเคราะห์ผลจากปริมาณของ *trans*-cinnamic acid ที่ถูกออกซิไดซ์ต่อชั่วโมง ซึ่ง *trans*-cinnamic acid เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา ดังนี้

$$\text{L-phenylalanine} \xrightarrow{\text{PAL}} \textit{trans}\text{-cinnamic acid}$$

การเปลี่ยนแปลงใน 4 ชั่วโมงแรกที่บ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์ คือความว่องไวของเอนไซม์ PAL เท่ากับ 0.017 ไมโครโมลของกรดซินนามิกต่อชั่วโมง จะลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 4 เท่ากับ 0.013 ไมโครโมลของกรดซินนามิกต่อชั่วโมง (ตารางที่ 24 และรูปที่ 41) หลังจากนั้นก็จะสูงขึ้นแล้วค่อนข้างคงที่ แสดงว่า การทำงานของ PAL ในใบยางเกิดเร็วมาก สังเกตได้ยาก โดยในช่วงแรกของการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษา PAL ทุก 12 ชั่วโมง จนถึง 96 ชั่วโมง แต่ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น จึงเปลี่ยนเป็นทุก 4 ชั่วโมง ก็พบว่ายังไม่ชัดเจนจึงย่อยเวลาเก็บผลทุก 1 ชั่วโมงใน 4 ชั่วโมงจึงเห็นการเปลี่ยนแปลงของ PAL แต่ในการทดลองอื่นๆ ที่เคยรายงานมามีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เวลานานหลายสัปดาห์ แต่ก็เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนในช่วงแรกของการทดลองเช่นกัน เพราะการทำงานของ PAL เกิดขึ้นในช่วงแรกและเกิดก่อนเอนไซม์อื่นๆ ด้วย จากรายงานของ Whetten และ Sederoff (1995) พบว่าเอนไซม์ PAL ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์สารฟีนอลิกในขบวนการ phenylpropanoid รวมถึงลิกนินด้วย เพื่อจะได้เข้าใจปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นว่า PAL มีบทบาทอย่างไรกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และมีความสำคัญกับการสร้างลิกนิน ซึ่งก็เป็นแนวทางในการป้องกันโรคของยางพาราต่อไป

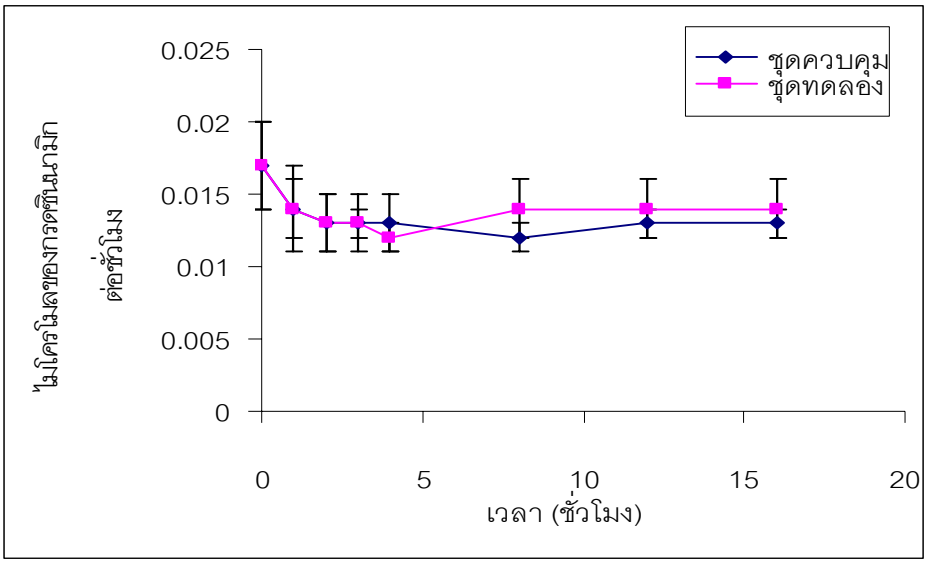
นอกจากการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสต่อสับสเตรทแล้ว ควรจะยืนยันผลด้วยความว่องไวของเอนไซม์อื่นด้วย เช่น เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL) ซุปเปอร์ออกไซดิสมิวเทส (SOD) แคตทาเลส (CAT) แลคเคส (Laccase) และโพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เหล่านี้ก็เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันโรคของพืช เช่น PAL เป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่ควบคุมการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกเพื่อนำไปสู่ขบวนการสร้างลิกนินต่อไป (Jung *et al*., 2004) เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากซุปเปอร์ออกไซด์ไอออน (Fridovich, 1997) แล้วเอนไซม์ CAT จะช่วยควบคุมปริมาณของ H_2O_2 ร่วมกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เอนไซม์ CAT จะเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ โดยไม่จำเป็นต้องมีสับสเตรทอื่น ส่วนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสต้องออกซิไดซ์สารที่เป็นสับสเตรทพร้อมๆ ทั้งเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ เอนไซม์แลคเคสสามารถรวมสารอนุมูลอิสระเพื่อเปลี่ยนเป็น

สารโพลิฟีนอล และจะถูกออกซิไดซ์เป็นควินีน (quinine ซึ่งเป็นสารยับยั้งเชื้อรา) โดยเอนไซม์โพลิฟีนิลออกซิเดส ดังนั้นการศึกษาระบบการป้องกันโรคของพืช จึงควรจะทราบบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ก็จะทำให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุม เข้าใจปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น และสามารถนำไปปรับปรุงและประยุกต์เทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ศึกษาในพืชชนิดอื่นต่อไป

ตารางที่ 24 ค่าความว่องไวความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL) (ไมโครโมลของกรดซินนามิกที่เกิดขึ้นต่อชั่วโมง) ในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่กระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	0.017±0.003	-
1	0.014±0.003	0.014±0.002
2	0.013±0.002	0.013±0.002
3	0.013±0.002	0.013±0.001
4	0.013±0.002	0.012±0.001
8	0.012±0.001	0.014±0.002
12	0.013±0.001	0.014±0.002
16	0.013±0.001	0.014±0.002

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

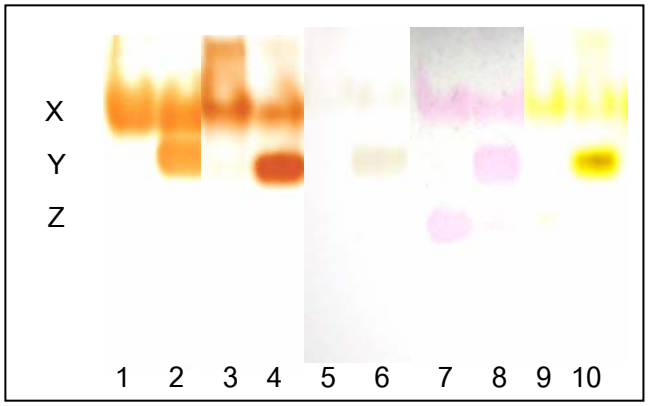


รูปที่ 41 ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL) ในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ตัดใบเป็นชิ้นขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร และบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* แล้ววางใบบนกระดาษกรองชื้น เก็บที่เวลา 1, 2, 3, 4, 8, 12 และ 16 ชั่วโมง เมื่อใช้ L-phenylalanine เป็นสับสเตรท

3.10.2 การศึกษา substrate specificity ของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้ guaiacol coniferyl alcohol scopoletin และ syringaldazine

เนื่องจากไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค สามารถทำบริสุทธิ์ได้แล้ว แต่สูญเสียค่าความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสไปมาก ทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับสับสเตรทบางตัวได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดเริ่มต้นที่ผ่านการแยกแถบ X และ Y ด้วย native PAGE แต่ไม่ต้องชะแถบ Y ออกมา เพื่อลดการสูญเสียความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส สับเตรทที่ใช้ในการศึกษา substrate specificity ได้แก่ guaiacol coniferyl alcohol scopoletin และ syringaldazine แล้วดูว่าไอโซไซม์ Y ย้อมติดกับสับสเตรทใดบ้าง พบว่า ไอโซไซม์ Y ย้อมติดสับสเตรททั้ง 4 ชนิด แต่ความเข้มของแถบไอโซไซม์ไม่เท่ากัน คือ guaiacol ย้อมติดสีน้ำตาล-แดงเข้มที่สุด รองลงมาเป็น scopoletin coniferyl alcohol และสุดท้าย syringaldazine ซึ่งแถบนี้ติดเข้มกว่า coniferyl alcohol (รูปที่ 42) จากการทดลองสามารถระบุว่าไอโซไซม์ Y จำเพาะกับสับสเตรทใดมากที่สุด เนื่องจากยังไม่ได้วัดค่า K_m ของสับสเตรทแต่ละชนิด เพราะมีข้อจำกัดเกี่ยวกับไอโซไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้ (เตรียมได้น้อยมาก) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทราบเพียงว่าไอโซไซม์ Y เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในลักษณะใด ซึ่งหน้าที่ของสับสเตรทแต่ละตัวก็จะเป็นตัว

บอกขบวนการป้องกันโรคที่เกี่ยวข้อง กล่าวคือ guaiacol coniferyl alcohol และ syringaldazine ทำหน้าที่เกี่ยวกับขบวนการสังเคราะห์ลิกนินเพื่อสร้างความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ โดย guaiacol มีโครงสร้างคล้ายกับ coniferyl alcohol ซึ่งเป็นสับสเตรทตัวจริงในการสร้าง guaiacyl lignin และ syringaldazine มีโครงสร้างคล้ายกับ sinapyl alcohol ในการสร้าง syringyl lignin ส่วน scopoletin เกี่ยวข้องกับ scopoletin เปอร์ออกซิเดส ซึ่งทำหน้าที่กำจัดสคอพอลิติน โดยไอโซไซม์ Y ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *P. palmivora* ในใบยางพาราสามารถย้อมติดทั้งสับสเตรทที่เกี่ยวข้องกับลิกนินและสคอพอลิติน แสดงว่าไอโซไซม์ Y อาจจะเกิดจากการทับกันของแถบลิกนินกับสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งสามารถป้องกันโรคได้ ส่วนไอโซไซม์ Z สามารถย้อมติด syringaldazine ได้ชัดที่สุด ซึ่งไอโซไซม์นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับลิกนินที่มีอยู่เดิมในใบยางพาราตามธรรมชาติ เพราะไอโซไซม์นี้ย้อมติดสีเข้มที่สุดที่ 0 ชั่วโมง จากนั้นสีจะจางหายไปเรื่อยๆ แสดงว่า syringaldazine เป็นสับสเตรทที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินในใบยางมากที่สุด โดยในพันธุ์ BPM-24 และ PB235 สามารถย้อมติดสีเข้มกว่าพันธุ์ RRIM600 ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการต้านทานโรคของใบยางแต่ละพันธุ์ ส่วนสับสเตรทชนิดอื่นที่ได้กล่าวไปข้างต้น สามารถตรวจวัดเฉพาะลิกนินที่ถูกสร้างขึ้นใหม่หลังจากกระตุ้นด้วยบาดแผลและซูโอสปอร์ (ไอโซไซม์ Y) ซึ่งสังเกตได้จากรูปที่ 42



รูปที่ 42 Native PAGE ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 ช่องที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 คือ สารสกัดจากใบยางพันธุ์ BPM-24 ชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง ช่องที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 คือ สารสกัดจากใบยางพันธุ์ BPM-24 ชุดทดลองที่กระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีวางบนกระดาษกรองชื้น ย้อมด้วย *o*-dianisidine (ช่องที่ 1, 2), guaiacol (ช่องที่ 3, 4), coniferyl alcohol (ช่องที่ 5, 6), syringaldazine (ช่องที่ 7, 8), และ scopoletin (ช่องที่ 9, 10) ตามลำดับ

3.10.3 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนิน ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ตามวิธีการของ Bruce และ West

ในการศึกษาปฏิกิริยา lignification ของการทดลองนี้จะเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของลิกนินในใบยางพาราสองพันธุ์ คือ พันธุ์ BPM-24 ซึ่งเป็นตัวแทนใบยางในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน และ RRIM600 เป็นตัวแทนของใบยางในกลุ่มพันธุ์อ่อนแอ จากรายงานวิจัยในปี 2546 ของนารถธิดา รอดโพธิ์ทอง และนันทา เชิงเชาว์ (2543) ที่ตรวจหาลิกนินรอบๆ รอยไหม้ด้วยวิธีการนำชิ้นใบยางขนาด 1x1 เซนติเมตร มาวางบนกระดาษกรอง หลังจากบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $5x10^7$ sp/ml เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 36 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นใบยางในแต่ละช่วงเวลาทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองมาทำปฏิกิริยากับ 2% Phloroglucinol เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำมาทำให้เป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ถ้าเกิดการสร้างลิกนินขึ้นลิกนินจะทำปฏิกิริยากับกรดเห็นเป็นสีแดง เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าพันธุ์ BPM-24 มีการสร้างลิกนินได้ชัดเจนกว่าพันธุ์ RRIM600 โดยจะเห็นในเส้นใบชัดเจนที่สุดที่ 24 ชั่วโมง หลังการบ่มด้วยเชื้อรา *P. palmivora* แต่ถ้าใช้อิลิซิตินในการบ่มใบยางแทน ก็จะเห็นสีแดงในเส้นใบชัดเจนที่สุดที่ 6 ชั่วโมง ซึ่งจะมีอัตราการสร้างลิกนินเร็วกว่าการบ่มด้วยซูโอสปอร์ เพราะอิลิซิตินสามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้เร็วอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งใบ ในขณะที่ ซูโอสปอร์ต้องใช้เวลาในการปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการงอกของสายรา และแทงผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อใบ เพื่อกระตุ้นการตอบสนองในการป้องกันตัวเองของพืชรวมทั้งการสร้างลิกนินด้วย (Kombrink *et al*., 1986)

จากรายงานดังกล่าวข้างต้นไม่สามารถแสดงผลในรูปตัวเลข ดังนั้นในการทดลองนี้ก็จะใช้วิธีการสกัดลิกนินจากใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ เพื่อให้เห็นความแตกต่างของลิกนินที่ถูกสร้างได้อย่างชัดเจนมากขึ้น ซึ่งใช้วิธีการสกัดลิกนินจากวิธีของ Bruce และ West (Bruce and West, 1989) แล้ววิเคราะห์ปริมาณลิกนิน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ซึ่งวิธีการทดลองนี้จะใช้ชิ้นใบขนาด 1x1 นิ้ว บ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ sp/ml กับใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ตามลำดับ โดยเก็บผลทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นในเมทานอลเพื่อสกัดสีออก นำกากใบมาอบให้แห้ง แล้วทำปฏิกิริยากับกรดไธโอไกลคอลิก ปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ สุดท้ายสกัดลิกนินไธโอไกลคอเลทโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จะได้ผลิตภัณฑ์ของลิกนินเป็นตะกอนสีน้ำตาลแดง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร พบว่าการสร้างลิกนินจะเห็นผลชัดเจนในชุดทดลองหลังบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์

ของเชื้อรา *P. palmivora* ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป และมีการสร้างลิกนินเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 120 ชั่วโมง หลังการบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าพันธุ์ BPM-24 มีปริมาณลิกนินสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 1.5 เท่า ในพันธุ์ RRIM600 การสร้างลิกนินจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งทั้งพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 มีการสร้างลิกนินเพิ่มจากชุดควบคุม 2.2 และ 1.6 เท่า คิดเป็น 115 และ 63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการเพิ่มขึ้นของลิกนินก็มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดที่วางชิ้นใบบนกระดาษกรองชื้น คือค่อยๆ สร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มอย่างต่อเนื่องพร้อมๆ กับสะสมลิกนินสูงขึ้นเรื่อยๆ (รูปที่ 31) โดยในชุดควบคุมของทั้งสองพันธุ์ไม่มีการสร้างลิกนินเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 25 และรูปที่ 43) แต่ก็สามารถวัดลิกนินที่มีอยู่เดิมในธรรมชาติ โดยปกติใบยางทั้งสองพันธุ์จะมีการสะสมลิกนินอยู่แล้ว เพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อรา ในพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอมีการสะสมลิกนินไม่แตกต่างกัน จากผลการทดลองนี้ พบว่าชุดควบคุมของพันธุ์ RRIM600 มีค่าลิกนินใกล้เคียงกับพันธุ์ BPM-24 (ดูค่าโปรตีนรวมของทั้งสองพันธุ์ในผลการทดลองข้อ 3.5) จึงเหนี่ยวนำให้สร้างลิกนินเพิ่มขึ้นอีก ส่งผลให้ค่าลิกนินสูงกว่าปกติ คือไม่ต่างจากพันธุ์ BPM-24 มากนัก

การเกิดปฏิกิริยา lignification สอดคล้องกับค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนี้จะทำหน้าที่โพลิเมอร์ไรซ์โมโนลิกนอล ได้แก่ พาราคูมาริลแอลกอฮอล์ (*para*-coumaryl alcohol) โคนิเฟริลแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และซินนาปิลแอลกอฮอล์ sinapyl alcohol) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นลิกนินต่อไป (Campbell and Sederoff, 1996 และ Whetten and Sederoff, 1995) ดังนั้นการหาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยสับสเตรทที่เกี่ยวข้องกับลิกนินที่สร้างขึ้นในผนังเซลล์ อย่างเช่นการใช้ coniferyl alcohol วัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในการทดลองนี้ พบว่ามีความว่องไวน้อย และเมื่อย้อมความว่องไวในเจลก็ต้องใช้ coniferyl alcohol ความเข้มข้นสูง จึงจะปรากฏแถบความว่องไว ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเกิดจากวิธีการสกัดหรือสับสเตรทนี้ไม่จำเพาะเจาะจงกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางก็ได้ โดยในการทดลองของ Barcelo และ Pomar (2001) สามารถวัดความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสจากยอดบานชื่น (*Zinnia elegans*) เมื่อใช้ coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol เป็นสับสเตรทได้ เนื่องจากใช้บัฟเฟอร์ที่เป็นกรดสำหรับวัดปฏิกิริยาความว่องไวของแคทไอออนเปอร์ออกซิเดส แต่ในการทดลองนี้ใช้บัฟเฟอร์ pH 7.5 สกัดแทน ทำให้ได้สารสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในส่วนของไซโทซอล จึงวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวกับลิกนินได้น้อย จากรายงานของ Shivakuma และคณะ (2003) ได้แบ่งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากพืชตามบทบาทหน้าที่ 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผนัง

เซลล์ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาออกซิเดทีฟเบิร์ท ซึ่งนำไปสู่การเกิด hypersensive cell death แบบที่ 2 เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไซโทซอล (cytosol) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเชื่อมต่อขององค์ประกอบของผนังเซลล์ในขบวนการสังเคราะห์ลิกนิน พบว่าในต้นอ่อน pearl millet ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Sclerospora graminicola* มีการสะสมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มาจากไซโทซอล จึงเกี่ยวข้องในขบวนการสังเคราะห์ลิกนินทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง จากหลายรายงานที่ยืนยันแหล่งที่มาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ใช้สร้างลิกนินยังไม่แน่นอน บางรายงานก็กล่าวว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ใช้สร้างลิกนินอาจจะสกัดมาจากไซโทซอล ผนังเซลล์หรือทั้งสองส่วน ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีการสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไซโตซอล เนื่องจากวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากเหมือนกับการสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผนังเซลล์ เพราะผนังเซลล์ติดอยู่กับเซลล์เมมเบรน ซึ่งมีโครงสร้างแบบฟลูอิดโมเซอิก (fluid mosaic model) ประกอบด้วยโมเลกุลของลิปิดเรียงตัวเป็น 2 ชั้น หันด้านที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เข้าหากัน ส่วนด้านที่ชอบน้ำ (hydrophilic) หันออกไปด้านนอก มีโมเลกุลโปรตีนแทรกอยู่ในชั้นของลิปิดหรือทางด้านข้างของเมมเบรน ดังนั้นในการแยกเมมเบรนออกต้องใช้ดีเทอร์เจนท์ เพื่อทำให้ลิปิดกระจายตัว เมื่ออยู่ในน้ำก็จะรวมตัวเป็นไมเซลล์ดึงเอาลิปิดที่เป็นกลางเข้ามาไว้ด้านในซึ่งไม่โพลาร์ ทำให้ลิปิดเหล่านี้กระจายตัวได้ในน้ำ ซึ่งเมื่อนำสารสกัดจากไซโตซอลมาวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทที่เกี่ยวข้องกับลิกนิน ปรากฏว่าวัดค่าความว่องไวได้น้อย เช่น guaiacol ฉะนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเปอร์ออกซิเดสในพืชแต่ละชนิดหรือในแต่ละส่วนของพืชจำเพาะกับสับสเตรทต่างกัน ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับลิกนิน จึงแก้ปัญหาด้วยการวัดปริมาณลิกนินที่สะสมในเซลล์ด้วยวิธีของ Bruce และ West (1989) โดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของลิกนินไธโอไกลคอลิก ซึ่งมีสีน้ำตาล-ส้ม ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ซึ่งจะได้ข้อมูลในรูปของตัวเลขที่แน่นอน ทำความเข้าใจง่าย พบว่าปริมาณการสะสมของลิกนินจะเพิ่มขึ้น หลังจากบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* 24 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในพันธุ์ BPM-24 สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ก็แสดงว่าพันธุ์ต้านทานมีการสร้างลิกนินได้มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ ทำให้สามารถป้องกันการบุกรุกของเชื้อได้ดีกว่า

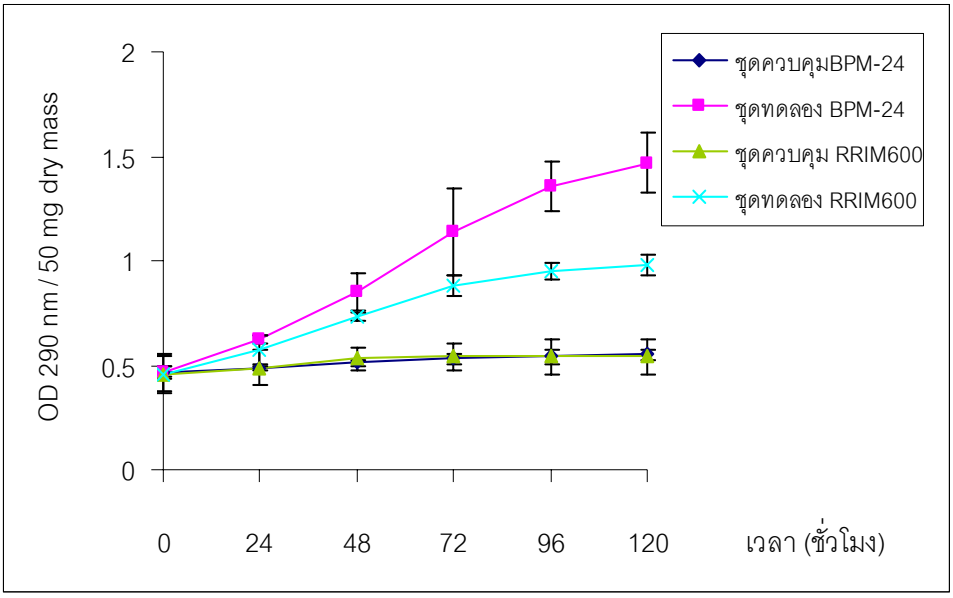
โดยทั่วไปเมื่อพืชเกิดบาดแผล ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเพิ่มขึ้นพร้อมกับมีการสังเคราะห์ลิกนินบริเวณนั้น (Vance *et al*., 1980) ทำให้กักเชื้อโรคได้ เช่นเดียวกับการวิจัยของ Garcia และคณะ (1995a) ที่เกิดปฏิกิริยา hypersensitive ในยางพันธุ์ต้านทาน ซึ่งพบว่ามีการสร้างลิกนินในพันธุ์ต้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ ดังนั้นการสะสมปริมาณลิกนินในใบ

ยางก็สามารถบอกระดับความต้านทานได้

ตารางที่ 25 ค่าการดูดกลืนแสงของลิกนิน ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร (OD 290 nm ต่อใบยางแห้ง 50 มิลลิกรัม) ในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 หลังกระตุ้นด้วย ซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ sp/ml ตามลำดับ ที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

พันธุ์ยาง	RRIM600		BPM-24	
เวลา (ชั่วโมง)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	0.46±0.09	-	0.47±0.03	-
24	0.49±0.08	0.57±0.07	0.49±0.01	0.62±0.02
48	0.53±0.06	0.73±0.02	0.51±0.02	0.85±0.09
72	0.54±0.07	0.88±0.05	0.53±0.03	1.14±0.21
96	0.54±0.09	0.95±0.04	0.54±0.03	1.36±0.12
120	0.54±0.08	0.98±0.05	0.55±0.03	1.47±0.14

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 43 ค่าการดูดกลืนแสงของลิกนิน ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 หลังกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ sp/ml ตามลำดับ ที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง