ผลของสารสกัดจากสาหร่ายทุ่นต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกในยางพารา และการประยุกต์ใช้เพื่อสร้างความต้านทานต่อเชื้อไฟทอปธอร่า

Effect of Seaweed (*Sargassum polycystum*) Extract on the Levels of Phenolic Compounds in Rubber Tree and Its Application to Induce Resistance Against *Phytophthora*

เขมมิการ์ โขมพัตร[1], นุรอามาลี ดีนามอ[2], นันทา เชิงเชาว์[1]
Khemmikar Khompatara[1], Nuramalee Deenamo[2], Nunta Churngchow[1]

บทคัดย่อ

หลังจากฉีดพ่นใบยางพาราอ่อนด้วยสารสกัดจากสาหร่ายทุ่น (*Sargassum polycystum*) ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 1,3 และ 5 วัน พบการสะสมของสคอพอเลตินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทุกช่วงเวลาเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น ส่วนกรดซาลิซิลิกมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และ 5 สำหรับกรดพาราคูมาริกพบการเพิ่มขึ้นเฉพาะในวันที่ 1 ขณะที่ปริมาณของกรดวานิลลิกและคาเทชินไม่พบการเปลี่ยนแปลง เมื่อนำสารสกัดมาประยุกต์ใช้ฉีดพ่นต้นยางพาราอ่อนเพื่อชักนำความต้านทานเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วตามด้วยการฉีดพ่นเชื้อไฟทอปธอร่า พบว่าต้นยางติดเชื้อลดลงมากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าต้นที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อไฟทอปธอร่าเป็นเวลา 5 วัน มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิดสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญรวมทั้งตรวจพบการสะสมของลิกนินและฟอร์มใหม่ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในขณะที่การฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายพบการเพิ่มขึ้นเฉพาะสคอพอลิตินและกรดซาลิซิลิกโดยไม่พบลิกนินและฟอร์มใหม่ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จึงชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายในการทดลองนี้มีคุณสมบัติชักนำให้ต้นยางพาราทนต่อการรุกรานของเชื้อไฟทอปธอร่าผ่านการเพิ่มขึ้นของสคอพอเลตินซึ่งเป็นสารไฟโตอเล็กซินและกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ systemic acquired resistance (SAR) แต่ไม่ผ่านวิถีการสังเคราะห์ลิกนิน

คำสำคัญ: สารประกอบฟีนอลิก ยางพารา สาหร่ายทุ่น เชื้อไฟทอปธอร่า การต้านทานโรคในพืช

Abstract

After foliar spray of rubber tree young seedlings with 0.25 mg/ml of seaweed extract from *Sargassum polycystum* for 1, 3 and 5 days, the scopoletin was significantly increased for every time point comparing to the control which was sprayed with distilled water. For salicylic acid (SA), it was raised at 1 and 5 days after treatment. The p-coumaric acid was increased only at the 1 day after spraying while the vanillic acid and catechin were not induced by the seaweed extract. After application of seaweed extract to induce resistance in rubber tree seedlings before inoculating with $2x10^5$ zoospores/ml of *P. palmivora*, it was found that the seedlings with symptom were less than 50% comparing to the positive control. Furthermore, 5 days after *Phytophthora* infection, levels of the five phenolic compounds and lignin were enhanced including a new isozyme of peroxidase.

[1] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลังสงขลานครินทร์
[1] Faculty of Science, Prince of Songkla University
[2] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
[2] Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University

Differently, the seaweed extract caused the increases of only scopoletin and SA did not induce the accumulation of lignin including the new peroxidase isozyme. The results suggested that the seaweed extract could induce the resistance in rubber tree seedling through the scopoletin, a phytoalexin and the SA signaling of systemic acquired resistance (SAR), but not through the lignin formation.

Keywords: Phenolic Compounds, *Hevea brasiliensis*, *Sargassum polycystum*, *Phytophthora*, Plant Resistance

บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย การปลูกยางพาราโดยทั่วไปจะนำยางพันธุ์ดีที่ให้ปริมาณน้ำยางสูงมาติดตาบนต้นตอที่มีความแข็งแรง ปัญหาของการปลูกยางพารา คือ ในช่วงที่มีฝนตกและมีความชื้นสูงต่อเนื่องกันหลายวัน ต้นยางพาราจะเกิดโรคใบร่วงจากเชื้อไฟทอปธอร่าโดยเฉพาะในยางชำถุงซึ่งยังเป็นต้นอ่อนและมีความอ่อนแอ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง ตลอดจนการเจริญเติบโตลดลง (Thanseem, Venkatachalam & Thulaseedharan, 2003) การจัดการในแปลงมักใช้วิธีฉีดพ่นด้วยสารเคมี ส่งผลกระทบต่อค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งวิธีการนี้ยังทำให้เชื้อดื้อยาในระยะยาว วิธีการหนึ่งที่เป็นทางเลือกของเกษตรกรคือการเลือกปลูกยางพันธุ์ต้านทาน ซึ่งในปัจจุบันพันธุ์ยางพาราที่ต้านทานต่อเชื้อไฟทอปธอร่ามีจำนวนจำกัด ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถช่วยให้ต้นยางมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อจากจุดที่เข้าทำลายไม่ให้ลุกลามไปยังส่วนอื่นๆ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับนักวิจัยและเกษตรกร

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อใช้สร้างรงควัตถุ ควบคุมการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ รวมทั้งการต้านทานต่อเชื้อก่อโรค สารในกลุ่มนี้มีจำนวนหลายพันชนิดที่ได้มีการศึกษาโครงสร้างแล้ว (Lattanzio, Lattanzio & Cardinali, 2006) สารประกอบฟีนอลิกต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้เพราะโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ทำให้หยุดวงจรการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาใหม่ (Pereira, Valentão, Pereira & Andrade, 2009) สารประกอบฟีนอลิกอาจจำแนกเป็นกลุ่มย่อย คือ กลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acid) เช่น กรดซาลิซิลิก (salicylic acid, SA) กรดวานิลลิก (vanillic acid) และกรดพาราคูมาริก (p-coumaric acid) (Martins et al., 2011) กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เช่น คาเทชิน (catechin) (Khoddami, Wilkes & Roberts, 2013) กลุ่มไฮดรอกซีคูมาริน (hydroxycoumarin) เช่น สคอพอเลติน (scopoletin) โดยสคอพอเลตินยังจัดเป็นสารกลุ่มไฟโตอเล็กซินด้วย (Churngchow & Rattarasarn, 2001)

จากการศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิกในกระบวนการต้านทานโรคภายในพืช พบว่าการใช้กรดฟีนอลิกปริมาณน้อยสามารถยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์จากเชื้อไฟทอปธอร่าในยางพาราได้ และการต้านทานดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับกระบวนการสร้างลิกนินเพื่อยับยั้งการขยายพื้นที่ของเส้นใยราไปยังบริเวณอื่น (Jayasuriya, Wijesundera & Deraniyagala, 2003) และเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในพืชถูกชักนำให้สร้างเพิ่มขึ้นโดยเชื้อก่อโรค การเข้าทำลายของสัตว์และแมลง รวมทั้งสภาวะต่างๆ ที่ก่อให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันขึ้นภายในพืช จึงได้มีการศึกษาถึงสารประกอบฟีนอลิกต่างๆ ว่ามีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอย่างไรเพื่อนำไปสู่การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อได้ (Cirak et al., 2014)

สาหร่ายทุน (*Sargassum polycystum* C. Agardh) เป็นสาหร่ายสีน้ำตาล จัดอยู่ในคลาส *Phaeophyceae* พบกระจายไปทั่วโลก (Kumar, Sahoo & Levine, 2015) ในประเทศไทยพบสาหร่ายชนิดนี้ทั้งฝั่งอันดามันและอ่าวไทย (Noiraksar & Ajisaka, 2008) เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้มีสารเคมีที่สำคัญหลายชนิด เช่น ฟูคอยแดน ไซโลส คาร์โบไฮเดรต และซัลเฟต (Sugiono & Soehono, 2014) จึงได้มีการศึกษาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านอาหาร ด้านเครื่องสำอาง รวมไปถึงด้านการเกษตร เช่น นำมาใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์เพื่อเพิ่มการเจริญของต้นข้าว (Win & Saing, 2008) หรือเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นถั่วแระ (Erulan et al., 2009) และใช้เป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพเพื่อลดความรุนแรงจากการเข้าทำลายของเชื้อรา รานำค้าง ราสีเทา และราแป้ง ในมะเขือเทศ (Sbaihat, Takeyama, Koga, Takemoto & Kawakita, 2015)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสาหร่ายทุ่นซึ่งพบได้ง่ายและจัดเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร โดยศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันในพืช ได้แก่ สคอพอเลตินซึ่งเป็นสารไฟโตอเล็กซิน กรดซาลิซิลิก ซึ่งเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบภูมิคุ้มกันของพืช กรดพาราคูมาริกซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ หลายชนิดรวมทั้งลิกนิน กรดวานิลลิก และคาเทชิน ซึ่งเคยมีการรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อไฟทอปธอร่าและเชื้อซูโดโมแนสในพืชชนิดอื่นๆ ตามลำดับ (Lattanzio, Lattanzio & Cardinali, 2006; Prithiviraj, Perry, Badri & Vivanco, 2007) รวมทั้งประยุกต์ใช้สารสกัดที่ได้เพื่อลดความรุนแรงของโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อไฟทอปธอร่า

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากสาหร่ายต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิก และประยุกต์ใช้สารสกัดดังกล่าวเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันให้ต้นยางพารามีความต้านทานต่อเชื้อไฟทอปธอร่า

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การศึกษาผลของสารสกัดสาหร่ายต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกในต้นยางชำถุง

1.1 การเก็บตัวอย่างและเตรียมสารสกัดสาหร่าย

นำสาหร่ายทุ่น (*Sargassum polycystum* C. Agardh) จาก จังหวัดชุมพร มาทำความสะอาดและอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช ก่อนสกัดด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Rioux, Turgeon & Beaulieu (2009) โดยใช้สาหร่าย 100 กรัม ผสมกับแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 400 มิลลิลิตร กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้ววัดปริมาตรที่ได้ เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2% ปริมาตรหนึ่งเท่า และเอทานอล ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้จากการกรอง กวนสารละลายที่ได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวางให้ตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนของสารละลายใสไปแยกเอธานอลออกด้วยเครื่อง evaporator จากนั้นนำสารที่ได้ไปไดอะไลซ์ผ่านเซลลูโลสเมมเบรน (MW cut-off 2 kDa) แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-dry นำสารสกัดที่ได้ไปละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งมีชีวิตที่ปนเปื้อน จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในขั้นตอนการทดสอบ ทั้งนี้จากการทดสอบด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ ชี้ว่าสารสกัดที่ได้มีองค์ประกอบเหมือนสารฟูคอยแดนซึ่งมีฟูโคสและซัลเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถชักนำแอคติวิตี้ของเอนไซม์หลายชนิดในระบบ SARในต้นยางได้ จึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการทดลอง

1.2 การเตรียมและทรีตสารสกัดบนต้นยางชำถุง

คัดเลือกต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 อายุใบประมาณ 2 สัปดาห์ และมีขนาดของต้นใกล้เคียงกันมาวางเลี้ยงในห้องทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความชื้น 70-80% ได้รับแสงฟลูออเรสเซนส์ ในช่วง 350-400 ลักซ์เหนือทรงพุ่ม เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 วัน แบ่งต้นยางออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำ โดย กลุ่มที่ 1 ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อต้น (จำนวน 15 ต้นต่อซ้ำ) และกลุ่มที่ 2 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยใช้ปริมาตรในการฉีดและจำนวนต้นต่อซ้ำเท่ากับกลุ่มแรก เก็บใบย่อยจากทุกต้นๆ ละ 1 ใบ (รวม 15 ใบ/time point) ในวันที่ 1, 3 และ 5 มาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.3.1 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินกับกรดซาลิซิลิกด้วย HPLC-FLD

นำตัวอย่างใบยาง 0.5 กรัม มาสกัดตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Ederli et al. (2011) โดยบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา เติม 90% เมทานอล ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บดให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้พักไว้ จากนั้นนำส่วนตะกอนผสมกับ 100% เมทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที รวมสารละลายส่วนใสที่ได้กับสารละลายส่วนใสเดิมที่พักไว้ แล้ววัดปริมาตรที่ได้ก่อนเติม 50% กรดไตรคลอโรอะซิติก ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดในสารละลายตัวอย่างเป็น 5% นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปกรองผ่านเมมเบรน ขนาดรูพรุน 0.25 ไมครอน เก็บในขวดสีชาสำหรับใช้ในการฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์แบบ reverse-phase (ZORBAX Eclipse XDB-c18, 4.6x150mm, 5 micron) ฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบที่มีเฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด คือ 1) อะซิโตไนไตรล์ และ 2) 0.1% กรดฟอร์มิก ตั้งโปรแกรมควบคุมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ตามระยะเวลา (นาที) ต่อ เปอร์เซ็นต์ของอะซิโตไนไตรล์ ดังนี้ นาทีที่ 0-2/80, นาทีที่ 8.5-10/60, นาทีที่ 12/55, นาทีที่ 13/40 และนาทีที่ 15/50 โดยควบคุมอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส ตรวจสอบสัญญาณของสารที่แยกได้ด้วย fluorescence detector (FLD) โดยที่เวลา 0-8 นาทีแรกตั้งค่าช่วงแสง excitation และ emission สำหรับสคอพอเลตินเป็น 337 นาโนเมตร และ 425 นาโมเมตร ตามลำดับ และหลังจาก 8 นาที ตั้งค่าเป็น 294 นาโนเมตร และ 426 นาโนเมตร สำหรับตรวจสอบสัญญาณของกรดซาลิซิลิก วิเคราะห์ผลจากพื้นที่ใต้พีคด้วยโปรแกรม Chemstation Software (Agilent Technologies) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสคอพอเลตินและกรดซาลิซิลิก

1.3.2 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกด้วย HPLC-DAD

นำตัวอย่างใบยาง 0.4 กรัม มาสกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Vagiri, Ekholm, Andersson, Johansson & Rumpunen (2012) โดยบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา จากนั้นนำไปผสมกับ 50% เอทานอลที่มีกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 14 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง สกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.25 ไมครอน บรรจุตัวอย่างในขวดสีชาสำหรับนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แยกกรดพาราคูมาริก กรดวานิลลิก และคาเทชิน โดยตรวจจับสัญญาณด้วย diode array detector (DAD) โดยใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกับที่ใช้วิเคราะห์สคอพอเลตินและกรดซาลิซิลิก ใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดคือ 1) กรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 8% (V/V) และ 2) สารละลายผสมระหว่างอะซีโตไนไตรล์ เมธานอล และน้ำในอัตราส่วน 90:5:5 (V/V) ตั้งโปรแกรมควบคุมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ตามระยะเวลา (นาที) ต่อเปอร์เซ็นต์ของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 ดังนี้ นาทีที่ 0-2/92, นาทีที่ 21.5/84 และนาทีที่ 51/77 โดยควบคุมอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจจับสัญญาณสำหรับกรดพาราคูมาริก และกรดวานิลลิก ที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร และคาเทชิน ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลจากพื้นที่ใต้พีคด้วยโปรแกรม Chemstation Software (Agilent Technologies) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดพาราคูมาริก กรดวานิลลิก และคาเทชิน

2. การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อควบคุมเชื้อไฟทอปธอร่าและการประเมินการติดเชื้อ

2.1 การเตรียมซูโอสปอร์ของเชื้อไฟทอปธอร่า

นำเชื้อไฟทอปธอร่า พาลมิโวร่า (*P. palmivora*) ที่แยกมาจากต้นยางพาราที่เกิดโรคมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ชักนำให้เชื้อผลิตซูโอสปอร์โดยย้ายไมซีเลียมไปวางเลี้ยงบนอาหาร V8 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง เทน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรส่งไปในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

การชักนำให้เชื้อปลดปล่อยซูโอสปอร์ทำได้โดยการกระตุ้นด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปเขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที สุ่มดูดซูโอสปอร์ไปนับจำนวนบน hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อให้ได้ซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้น $2x10^5$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ในการทดสอบ

2.2 การทรีตสารสกัดและเชื้อไฟทอปธอร่าบนต้นยางชำถุง

คัดเลือกต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 มาวางเลี้ยงในห้องทดลองเหมือนในข้อ 1.2 ยกเว้นความชื้นในอากาศที่สูงกว่า 80% เนื่องจากเป็นฤดูฝน แบ่งต้นยางออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำ (1 ซ้ำประกอบด้วยต้นยางชำถุง 10 ต้น) โดยกำหนดการนับเวลาที่ 0 ชั่วโมงพร้อมกัน ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อต้น เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม (negative control) กลุ่มที่ 2 ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อต้น กลุ่มที่ 3 ฉีดพนสารสกัดจากสาหร่ายที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันล่วงหน้า 24 ชั่วโมง จากนั้นพ่นด้วยเชื้อที่ความเข้มข้น $2x10^5$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จึงเริ่มนับเป็น 0 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 4 ฉีดพ่นด้วยเชื้อที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันกับในกลุ่มที่ 3 (positive control) วางเลี้ยงไว้เป็นเวลา 5 วันโดยรดน้ำวันละครั้งๆ ละ 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการประเมินอัตราการติดเชื้อในแต่ละกลุ่มทดสอบ เก็บใบย่อยตำแหน่งล่างสุดจากทุกต้นมาแบ่งเป็น 3 ชุด ดังนี้ 1) ย้อมใบเพื่อดูการตายของเซลล์จากการย้อมด้วยสีทริปแพนบลู (Trypan blue) และดูการสะสมของลิกนินโดยการย้อมด้วยสารละลายพลอโรกลูซินอล (Phloroglucinol) ในกรดไฮโดรคลอริก 2) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC และ 3) สกัดใบยางเพื่อย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

2.3 การย้อมใบยางพารา

2.3.1 การย้อมสีทริปแพนบลูเพื่อดูการตายของเซลล์

นำใบยางพารามาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วซับน้ำออก จากนั้นจุ่มอย่างรวดเร็วลงในสารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.1% ประมาณ 2 วินาที นำไปล้างในน้ำกลั่น ซับใบให้แห้งแล้วย้ายไปแช่ในสีทริปแพนบลู ความเข้มข้น 0.5% นาน 30 นาที ล้างและซับใบ แล้วนำใบไปแช่ใน 90% เอทานอล เขย่าข้ามคืนเพื่อกำจัดสีเขียวของคลอโรฟิลล์ บริเวณที่มีการตายของเซลล์จะย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม

2.3.2 การย้อมด้วยสารละลายพลอโรกลูซินอลเพื่อดูการสะสมของลิกนิน

ย้อมลิกนินบนใบยางพาราตามวิธีของ Gurav & Gurav (2013) นำชิ้นส่วนใบยางพารามาแช่ในสารละลายพลอโรกลูซินอลในกรดไฮโดรคลอริกเป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นนำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า จะปรากฏสีแดงบริเวณที่มีลิกนิน

2.4 การย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เตรียมสารสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างใบยางตามวิธีของ Chanwun, Muhamad, Chirapongsatonkul & Churngchow (2013) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำใบยาง 0.5 กรัมมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา และเติมสารโพลีไวนิลโพลีไพโรลิโดน (polyvinylpolypyrrolidone, PVPP) 30 มิลลิกรัม ลงไป จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มี Triton X-100 ความเข้มข้น 0.25% (V/V) ผสมอยู่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปแยกด้วยไฟฟ้าบนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ แบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีของ Ali, Yu, Hahn & Paek (2005) โดยโหลดครั้งละ 20 ไมโครลิตร ซึ่งเทียบเท่า 14 มิลลิกรัมของน้ำหนักสดของใบยาง นำตัวอย่างที่แยกอยู่บนเจลไปย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยบ่มเจลในสารละลายโปแทสเซียมบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ นาน 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ลงในสารละลายผสมระหว่างโปแทสเซียมบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ผสมอยู่ และไกวเอคอล (guaiacol) ความเข้มข้น 18 มิลลิโมลาร์ รอกระทั่งปรากฏแถบสีเหลืองของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

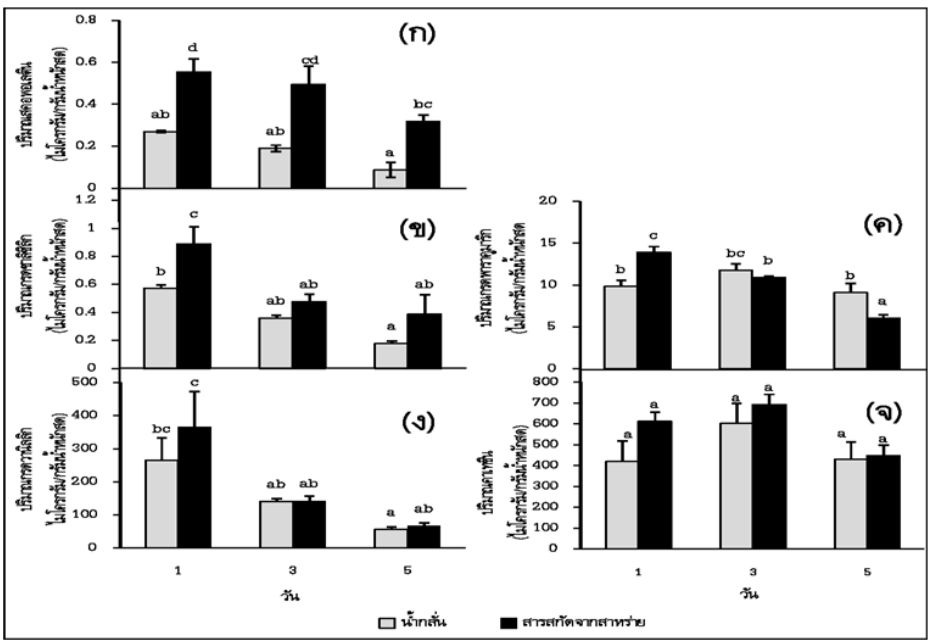
3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ One-Way-ANOVA (Tukey comparison) ด้วยโปรแกรม SPSS โดยรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ความแปรปรวน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. ผลของสารสกัดสาหร่ายต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกในต้นยางชำถุง

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบยางที่เวลา 1, 3 และ 5 วัน หลังการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย พบว่าสคอพอเลตินในใบยางที่ฉีดพ่นด้วยสารสกัดมีระดับปริมาณสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 3 ช่วงเวลา (ภาพที่ 1ก) ส่วนกรดซาลิซิลิกพบว่ามีปริมาณสูงขึ้นในวันที่ 1 และ 5 และกรดพาราคูมาริกพบว่ามีปริมาณสูงขึ้นเฉพาะในวันที่ 1 (ภาพที่ 1ข และ 1ค) สำหรับปริมาณของกรดวานิลลิก และคาเทชินพบว่าในช่วงแรกของการฉีดพ่นด้วยสารสกัดมีแนวโน้มสูงกว่าชุดควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 1ง และ 1จ) ดังนั้น กลุ่มที่มีการตอบสนองต่อสารสกัด ได้แก่ สคอพอลิติน, กรดซาลิซิลิก และกรดพาราคูมาริก ส่วนกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อสารสกัด ได้แก่ กรดวานิลลิก และคาเทชิน



ภาพที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบยางพาราหลังการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายเป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม; ก) สคอพอเลติน, ข) กรดซาลิซิลิก, ค) กรดพาราคูมาริก, ง) กรดวานิลลิก และ จ) คาเทชิน

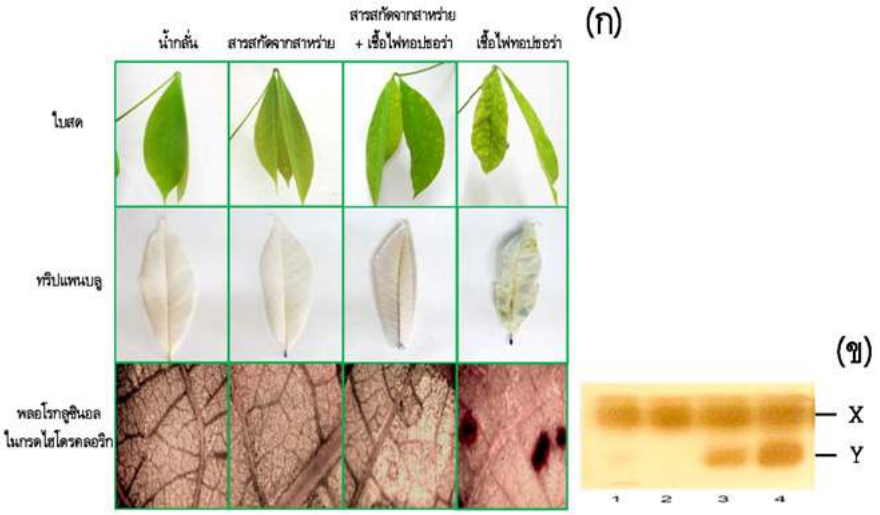
2. ผลการใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อควบคุมเชื้อไฟทอปธอร่าและการประเมินการติดเชื้อ

เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายมาทดสอบประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อไฟทอปธอร่า พบว่าสามารถลดจำนวนต้นยางพาราที่ติดเชื้อได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราการติดเชื้อของต้นยางพาราหลังการฉีดพ่นด้วยเชื้อไฟทอปธอร่าเป็นเวลา 5 วัน; 1) ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น, 2) ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย, 3) ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย 24 ชั่วโมงก่อนฉีดพ่นด้วยเชื้อ และ 4) ฉีดพ่นด้วยเชื้อ

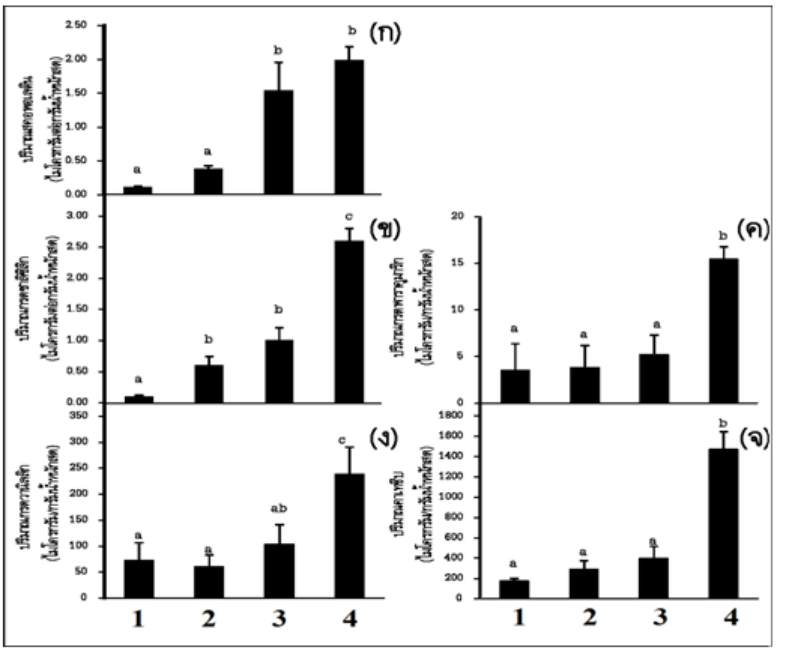
ทรีทเม้นท์	จำนวนต้นที่ติดเชื้อ/จำนวนทั้งหมด			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1. น้ำกลั่น	0/10	0/10	0/10	0/10
2. สารสกัดจากสาหร่าย	0/10	0/10	0/10	0/10
3. สารสกัดจากสาหร่าย + เชื้อไฟทอปธอร่า	2/10	4/10	4/10	3.3/10
4. เชื้อไฟทอปธอร่า	10/10	6/10	8/10	8/10

นำใบยางพาราในแต่ละกลุ่มทดสอบไปย้อมดูการตายของเซลล์ (บาดแผล) และการสะสมของลิกนิน จากภาพที่ 2 ก ปรากฏว่าชุดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นและสารสกัดจากสาหร่ายไม่พบบาดแผลบนใบรวมทั้งการสะสมของลิกนิน



ภาพที่ 2 ผลการชักนำภูมิคุ้มกันในใบยางพาราโดยสังเกตและวิเคราะห์ผลหลังจากครบ 5 วัน; ก) ลักษณะปรากฏ ของใบยางพารา และ ข) แถบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อ 1 = ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น, 2 = ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย, 3 = ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย 24 ชั่วโมงก่อนฉีดพ่นด้วยเชื้อ และ 4 = ฉีดพ่นด้วยเชื้อ

ผลการตรวจสอบปริมาณสคอพอเลติน กรดซาลิซิลิก กรดพาราคูมาริก กรดวานิลลิก และคาเทชิน ในใบยางพาราทั้ง 4 กลุ่มหลังจากเวลาผ่านไป 5 วัน พบว่าชุดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น และชุดที่ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายให้ผลสอดคล้องกับการทดลองแรก คือสคอพอเลตินและกรดซาลิซิลิกในชุดที่ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 3ก และ 3ข) ขณะที่สารประกอบฟีนอลิกอีก 3 ชนิดที่เหลือ มีแนวโน้มไม่ต่างกัน (ภาพที่ 3ค, 3ง และ 3จ)



ภาพที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบยางพาราหลังจากการฉีดพ่นด้วยเชื้อหรือสารสกัดจากสาหร่ายเป็นเวลา 5 วัน; ก) สคอพอเลติน, ข) กรดซาลิซิลิก, ค) กรดพาราคูมาริก, ง) กรดวานิลลิก และ จ) คาเทชิน เมื่อ 1 = ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น, 2 = ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย, 3 = ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย 24 ชั่วโมงก่อนฉีดพ่นด้วยเชื้อ และ 4 = ฉีดพ่นด้วยเชื้อ

ส่วนชุดที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อเพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณสคอพอเลติน กรดซาลิซิลิก กรดพาราคูมาริก กรดวานิลลิก และคาเทชินเพิ่มขึ้น 16.58, 15.29, 4.39, 3.30 และ 8.44 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น ตามลำดับ ส่วนชุดที่กระตุ้นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายก่อนการฉีดพ่นด้วยเชื้อ พบว่าปริมาณของสคอพอเลตินและกรดซาลิซิลิกเพิ่มสูงขึ้นถึง 12.91 และ 5.94 เท่า เมื่อเทียบกับชุดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกอีก 3 ชนิดที่เหลือมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ประมาณ 1.47 ถึง 2.27 เท่า) ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับลักษณะของใบยางและการย้อมลิกนินในภาพที่ 2ก คือการกระตุ้นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายช่วยลดความรุนแรงของโรคโดยพบการสะสมของสารประกอบฟีนอลิกที่นำไปสู่การสร้างลิกนินในปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการสะสมของสคอพอเลตินและกรดซาลิซิลิก

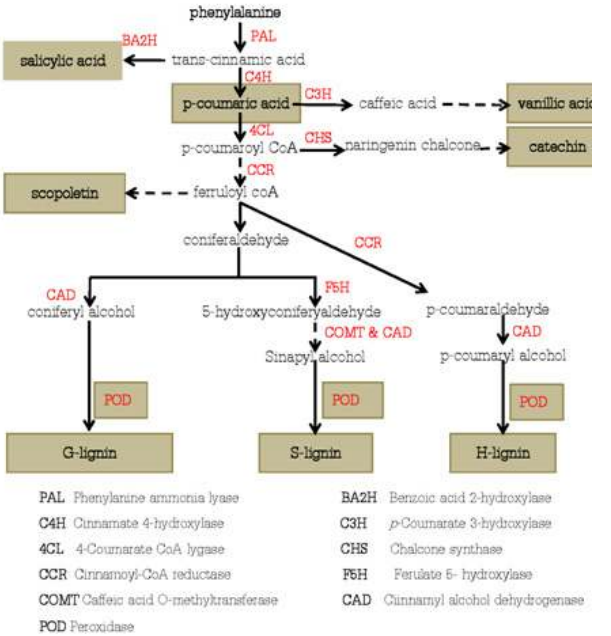
อภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายสามารถกระตุ้นให้มีการสะสมของสคอพอเลติน กรดซาลิซิลิก และกรดพาราคูมาริก โดยพบว่าสคอพอเลตินในใบยางพาราที่ฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทุกช่วงเวลาที่วิเคราะห์ (ภาพที่ 1ก) สคอพอเลตินเป็นสารที่เคยมีการรายงานว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคโดยยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์รวมทั้งการเจริญของไมซีเลียมได้ (Churngchow & Rattarasarn, 2001) และยังสามารถชักนำให้มีการสร้างได้โดยการกระตุ้นด้วย biotic และ abiotic stress (Jeandet et al., 2014) สำหรับปริมาณกรดซาลิซิลิก จากการทดลองนี้พบว่ามีการสะสมเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกของการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย (ภาพที่ 1ข) ทั้งนี้กรดซาลิซิลิกเป็นที่รู้จักกันในนามของสารส่งสัญญาณในพืชเพื่อให้เกิดการตอบสนองชนิด SAR (Kawano & Bouteau, 2013) ซึ่งระบบนี้จะมีการส่งสัญญาณจากบริเวณที่พืชถูกกระตุ้นไปยังบริเวณอื่นภายในลำต้นเพื่อเตรียมความพร้อมในการป้องกันตนเอง

จากการถูกรุกราน สำหรับปริมาณของกรดพาราคูมาริก ซึ่งเป็นสารตัวกลางในลำดับต้นๆ ของวิถี phenylpropanoid พบว่าภายหลังฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย กรดพาราคูมาริกในใบยางมีปริมาณสูงกว่าในชุดควบคุมภายใน 1 วันหลังการทดสอบ (ภาพที่ 1ค) หลังจากนั้นจะมีปริมาณลดลง ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองอย่างรวดเร็วในช่วงแรกก่อนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นๆ สำหรับปริมาณของกรดวานิลลิก และคาเทชินพบว่าไม่ตอบสนองต่อการชักนำโดยสารสกัดจากสาหร่าย

เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายมาประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไฟทอปธอร่า พบว่า ต้นยางพาราที่มีการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายก่อนที่จะฉีดพ่นด้วยเชื้อ มีระดับความรุนแรงของโรคน้อยกว่าต้นยางพาราที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อเพียงอย่างเดียว พร้อมทั้งพบการตายของเซลล์หรือการสะสมของลิกนินบนแผ่นใบน้อยมาก ในขณะที่ต้นยางพาราที่ได้รับเฉพาะเชื้อพบว่ามีการตายของเซลล์มากและสามารถย้อมติดลิกนินบนแผ่นใบ ซึ่งผลดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับแถบ Y ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีปริมาณลดลงในใบที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายมาก่อน (ภาพที่ 2ก และ 2ข) ทั้งนี้ จะเห็นว่าใบยางพาราที่ถูกฉีดพ่นด้วยสารสกัดก่อนพ่นด้วยเชื้อมีลักษณะของแผลที่ไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับใบที่ถูกพ่นด้วยเชื้อเพียงอย่างเดียว (positive control) ซึ่งมีสภาพใบเหี่ยวช้ำและพบการตายของเซลล์

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในใบยางพาราที่กลุ่มที่มีการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายมีระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของกรดซาลิซิลิก และนำไปสู่การชักนำให้เกิดระบบ SAR ส่งผลให้มีการสร้าง pathogenesis related protein (PR-protein) ออกมาต่อต้านการรุกราน ทั้งนี้ Klarzynski et al. (2003) ได้รายงานผลการนำสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Pelvetia canaliculata*) มาใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันในต้นยาสูบเพื่อต้านเชื้อไวรัส (tobacco mosaic virus; TMV) พบว่าสามารถกระตุ้นเอนไซม์ในกลุ่ม PR-protein ได้หลายชนิด เช่น กลูคาเนส และไคติเนส รวมทั้งกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอเลตินด้วย ซึ่งจากการทดลองนี้ภายหลังการฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายสามารถตรวจพบปริมาณสคอพอเลตินเพิ่มขึ้นมากตั้งแต่วันแรกต่อเนื่องถึงวันที่ 5 (ภาพที่ 1 ก) จึงอาจมีผลช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรค ทำให้เกิดบาดแผลที่ไม่รุนแรง



ภาพที่ 4 วิถีการสังเคราะห์สคอพอเลติน กรดซาลิซิลิก กรดพาราคูมาริก กรดวานิลลิก คาเทชิน และลิกนิน ใน phenylpropanoid pathway (Ramos et al., 2001; Deluc et al., 2006; Vanholme et al., 2010)

ในการเกิดบาดแผลบนใบยางพารา พบว่าการกระตุ้นเฉพาะสารสกัดจากสาหร่ายปรากฏแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพียงแถบเดียว (แถบ X) เหมือนในชุดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น ขณะที่ต้นยางพาราที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะมีแถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 2 แถบ โดยแถบของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นใหม่นี้ (แถบ Y) (ภาพที่ 2 ข) อาจเป็น isoform ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินดังวิถีการสังเคราะห์ในภาพที่ 4 รวมทั้งเคยมีการรายงานว่า เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบาง isoform เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนิน (Passardi, Cosio, Penel & Dunand, 2005; Devi & Marimuthu, 2011) เช่นเดียวกับการทดลองของ Lehner & Cardemil (2003) ซึ่งได้รายงานการปรากฏแถบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบใหม่เมื่อต้นอ่อนของ *Prosopis chilensis* เกิดบาดแผล อย่างไรก็ตามพบว่าต้นยางพาราที่ถูกชักนำด้วยสารสกัดก่อนที่จะถูกฉีดพ่นด้วยเชื้อมีแถบแอคติวิตี้ทั้ง 2 แถบเช่นกัน โดยพบมีความเข้มของแถบ Y ลดลงเหลือ 59.33 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับแถบแอคติวิตี้ในชุดที่ถูกพ่นเฉพาะเชื้อ เมื่อพิจารณาร่วมกับสภาพใบในภาพที่ 2ก บ่งชี้ว่ายางพาราในชุดนี้ถูกเชื้อเจาะเข้าทำลายได้น้อย ทำให้เกิดรอยแผลได้ลดลง ดังนั้นการตอบสนองต่อเชื้อโดยการผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (แถบ Y) จึงมีปริมาณลดลงด้วย นอกจากนี้พบว่าใบยางพาราชุดที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อไฟทอปธอร่าเป็นเวลา 5 วัน (ภาพที่ 3ก-3จ) มีการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิด รวมทั้งลิกนิน ในขณะที่การฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากสาหร่ายในช่วงเวลาเดียวกันนี้กลับไม่พบการเพิ่มขึ้นของกรดพาราคูมาริก ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสร้างลิกนิน จึงสรุปได้ว่าการต้านทานเชื้อในการทดลองนี้น่าจะสืบเนื่องจากการยับยั้งเชื้อด้วยสคอพอเลตินร่วมกับการเกิด SAR โดยการส่งสัญญาณของกรดซาลิซิลิก แต่ไม่ผ่านการสังเคราะห์ลิกนิน

สรุป

สารสกัดจากสาหร่ายทุ่นมีผลชักนำการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิก 3 ชนิดได้แก่ สคอพอเลติน กรดซาลิซิลิก และกรดพาราคูมาริก โดยปริมาณสคอพอเลตินเพิ่มขึ้นตลอดช่วงเวลาที่ศึกษา ขณะที่กรดซาลิซิลิกมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และ 5 สำหรับกรดพาราคูมาริกพบการเพิ่มขึ้นเพียง 1 วันหลังการฉีดพ่น นอกจากนี้พบว่ากรดวานิลลิกและสารคาเทชินไม่ตอบสนองต่อการชักนำด้วยสารสกัดจากสาหร่าย เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ลดระดับความรุนแรงจากการเข้าทำลายของเชื้อไฟทอปธอร่าในต้นยางพาราชำถุง พบว่าสามารถลดจำนวนต้นที่ป่วยได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ภูมิคุ้มกันที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นนี้อาจมีการแสดงผลผ่านการเพิ่มปริมาณของสคอพอเลติน ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านทานเชื้อ รวมทั้งการเกิดระบบ SAR ผ่านการเพิ่มขึ้นของกรดซาลิซิลิก ซึ่งนำไปสู่การสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆมาต่อต้านเชื้อรวมทั้งลดความเสียหายของเซลล์ที่ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ชี้ชัดว่าภูมิคุ้มกันที่ชักนำโดยสารสกัดจากสาหร่ายไม่ได้ผ่านการกระตุ้นให้พืชสร้างลิกนิน

ข้อเสนอแนะ

แนวทางในการศึกษาเพื่อต่อยอดงานวิจัยชิ้นนี้อาจดำเนินการศึกษาในเชิงลึกเพิ่มขึ้น เช่น ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันภายหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัดจากสาหร่าย หรือในเชิงการประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร เช่น ศึกษาผลของสารสกัดในระดับแปลง หรือศึกษาการนำไปใช้เพิ่มภูมิคุ้มกันในพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนางานด้านการเกษตรที่เน้นความยั่งยืนและลดการใช้สารเคมี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนโครงการความเป็นเลิศสาขาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 กรมวิชาการเกษตรที่สนับสนุนเครื่องมือ HPLC สำหรับใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

รายการอ้างอิง (Reference)

Ali, M.B., Yu, K.-W., Hahn, E.-J. & Paek, K.-Y. (2005). Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax* ginseng CA Mayer and *Panax quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. *Plant Science, 169*, 83-92.

Chanwun, T., Muhamad, N., Chirapongsatonkul, N. & Churngchow, N. (2013). *Hevea brasiliensis* cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express, 3*, 14.

Churngchow, N. & Rattarasarn, M. (2001). Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Physiology, 158*, 875-882.

Cirak, C., Radusiene, J., AKSOY, H.M., Mackinaite, R., Stanius, Z., Camas, N. & Odabas, M.S. (2014). Differential Phenolic Accumulation in Two *Hypericum* Species in Response to Inoculation with *Diploceras hypericinum* and *Pseudomonas putida*. *Plant Protection Science, 50*(3), 199-128.

Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.-P., Mérillon, J.-M. & Hamdi, S. (2006). Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant physiology, 140*, 499-511.

Devi, R.P. & Marimuthu, P. (2011). Effect of Botanical Formulation of *Polygonum Minus* (P-40) on Control of *Alternaria Solani*. *Journal of Plant Pathololology & Microbiology, 2*, 104.

Ederli, L., Madeo, L., Calderini, O., Gehring, C., Moretti, C., Buonaurio, R., Paolocci, F. & Pasqualini, S. (2011). The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. *Journal of Plant Physiology, 168*, 1784-1794.

Erulan, V., Soundarapandian, P., Thirumaran, G. & Ananthan, G. (2009). Studies on the effect of *Sargassum polycystum* (C. Agardh, 1824) extract on the growth and biochemical composition of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 6*, 392-399.

Gurav, S.S. & Gurav, N.S. (2013). *Indian Herbal Drug Microscopy*. Springer Science & Business Media.

Jayasuriya, K.E., Wijesundera, R.L.C. & Deraniyagala, S.A. (2003). Isolation of anti-fungal phenolic com pounds from petioles of two *Hevea brasiliensis* (rubber) genotypes and their effect on *Phytophthora meadii*. *Annals of applied biology, 142,* 63-69.

Jeandet, P., Hébrard, C., Deville, M.-A., Cordelier, S., Dorey, S., Aziz, A. & Crouzet, J. (2014). Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. *Molecules, 19*, 18033-18056.

Kawano, T. & Bouteau, F. (2013). Salicylic acid-induced local and long-distance signaling models in plants, in: Long-Distance Systemic Signaling and Communication in Plants. *Springer,* 23-52.

Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.-C., Kloareg, B. & Fritig, B. (2003). Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 16*, 115-122.

Khoddami, A., Wilkes, M.A. & Roberts, T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules, 18,* 2328-2375.

Kumar, S., Sahoo, D. & Levine, I. (2015). Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. *Algal Research, 9*, 117-125.

Lattanzio, V., Lattanzio, V.M. & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research, 661*, 23-67.

Lehner, G., & Cardemil, L. (2003). Differences in wound-induced changes in cell-wall peroxidase activities and isoform patterns between seedlings of Prosopis tamarugo and Prosopis chilensis. *Tree Physiology, 23*(7), 443-452.

Martins, S., Mussatto, S.I., Martinez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N.& Teixeira, J.A. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances, 29*, 365-373.

Noiraksar, T. & Ajisaka, T. (2008). Taxonomy and distribution of *Sargassum* (Phaeophyceae) in the Gulf of Thailand. *Journal of Applied Phycology, 20*, 963.

Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A. & Andrade, P.B. (2009). Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules, 14*(6), 2202-2211.

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports, 24*, 255-265.

Prithiviraj, B., Perry, L. G., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2007). Chemical facilitation and induced pathogen resistance mediated by a root-secreted phytotoxin. *New Phytologist, 173*(4), 852-860.

Ramos, R.L.B., Tovar, F.J., Junqueira, R.M., Lino, F.B. & Sachetto-Martins, G. (2001). Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. *Genetics and Molecular Biology, 24*, 235-241.

Rioux, L.-E., Turgeon, S.L. & Beaulieu, M. (2009). Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicruris*. *Phytochemistry, 70*, 1069-1075.

Sbaihat, L., Takeyama, K., Koga, T., Takemoto, D. & Kawakita, K. (2015). Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*. *The Scientific World Journal, 2015*, 9.

Sugiono, W.S.B. & Soehono, L.A. (2014). Extraction optimization by response surface methodology and characterization of fucoidan from brown seaweed *Sargassum polycystum*. *International Journal of ChemTech Research, 6*, 195-205.

Thanseem, I., Venkatachalam, P. & Thulaseedharan, A. (2003). Sequence characterization of β-1, 3-glucanase gene from *Hevea brasiliensis* through genomic and cDNA cloning. *Indian Journal of Natural Rubber Research, 16*, 106-114.

Vagiri, M., Ekholm, A., Andersson, S.C., Johansson, E. & Rumpunen, K. (2012). An optimized method for analysis of phenolic compounds in buds, leaves, and fruits of black currant (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*, 10501-10510.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant physiology, 153*, 895-905.

Win, L.L. & Saing, K.M. (2008). Effectiveness of Myanmar brown seaweed (*Sargassum* spp.) extract as organic fertilizer in pot trial of rice. *GMSARN International Conference on Sustainable Development: Issues and Prospects for the GMS,* 1-4.