

ผลกระทบบของสารเมแทบอลิซึมจากชีวสังเคราะห์ฟีโนลโพรพานอยด์
ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

THE EFFECTS OF METABOLIC COMPOUNDS FROM
PHENYLPROPANOIC BIOSYNTHESIS ON PLANT PATHOGENS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

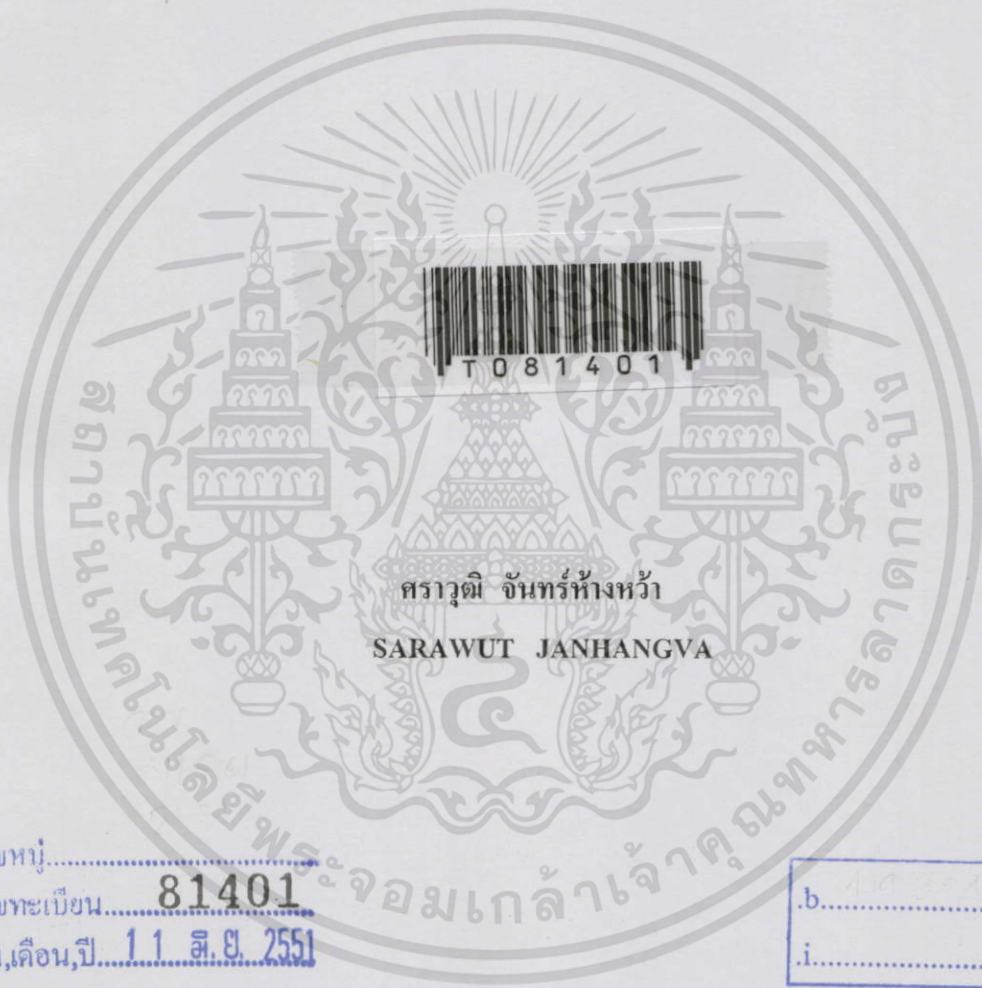
พ.ศ. 2551

KWITL-2008-SC-M-020-626

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

**ผลกระทบของสารเมแทบอลิซึมจากชีวสังเคราะห์ฟีนิลพรพานอยด์
ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช**

**THE EFFECTS OF METABOLIC COMPOUNDS FROM
PHENYLPROPANOID BIOSYNTHESIS ON PLANT PATHOGENS**



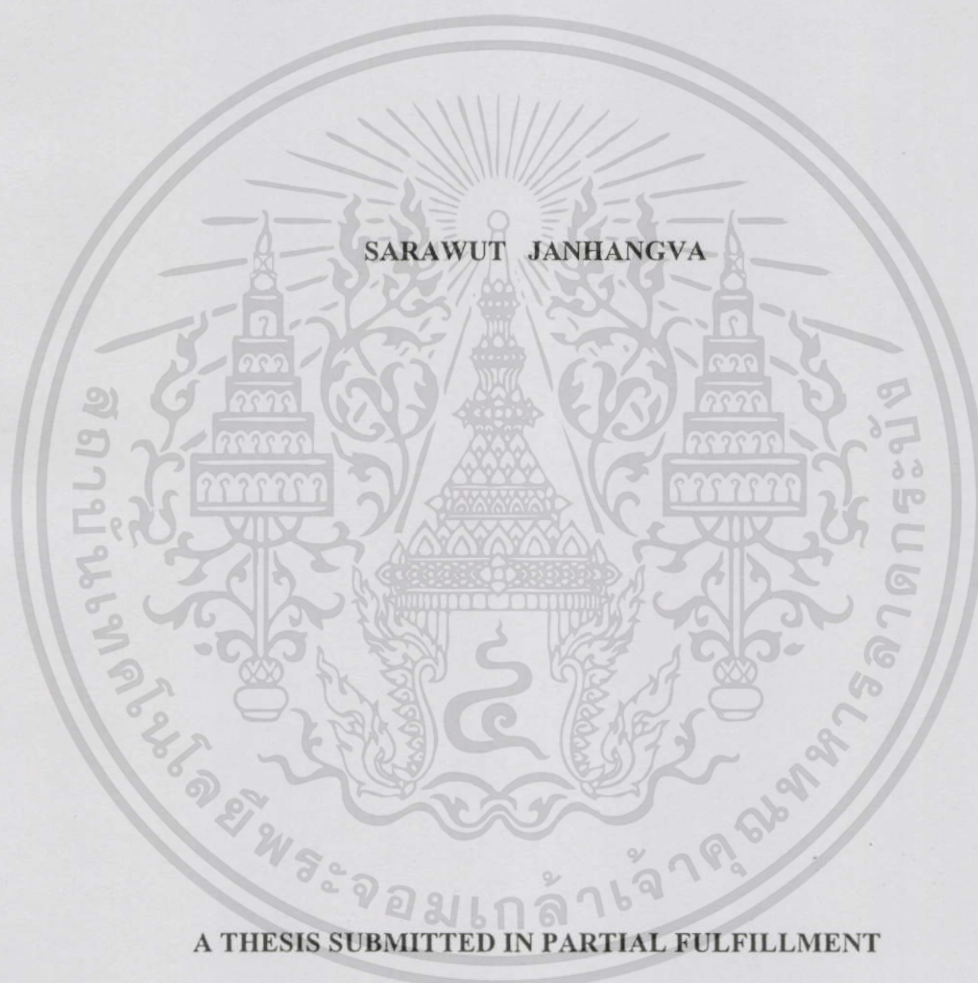
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... **81401**
วัน,เดือน,ปี **11 ส.ย. 2551**

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2551
KMITL-2008-SC-M-020-326

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**THE EFFECTS OF METABOLIC COMPOUNDS FROM
PHENYLPROPANOID BIOSYNTHESIS ON PLANT PATHOGENS**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2008

KMITL-2008-SC-M-020-326

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลกระทบของสารเมแทบอลิซึมจากชีวสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

The Effects of Metabolic Compounds from Phenylpropanoid Biosynthesis on Plant Pathogens


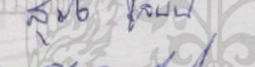

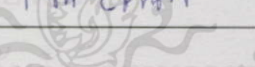
ชื่อนักศึกษา นายศรารุณี จันทร์ห้างหว่า

รหัสประจำตัว 46068904

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพฑิณ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.มาลินี	ต้นตยาภรณ์	
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
รศ.ดร.พรรณี	จิตาภิชิต	
ผศ.ดร.กนกพร	สมพรไพฑิณ	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 26 พฤษภาคม 2551 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.รวีวรรณ ชินะตระกูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 20 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของสารเมแทบอลิซึมจากชีวสังเคราะห์ฟีนิล โพรพานอยด์ ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช
นักศึกษา	นาย ศราวุฒิ จันทรหังหว่า
รหัสประจำตัว	46068904
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2551
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. กนกพร สมพร ไพลิน

บทคัดย่อ

วิถีฟีนิล โพรพานอยด์สามารถสังเคราะห์สารเมแทบอลิซึมไลด์ฟีนิลได้หลายชนิด สารเหล่านี้มักจะถูกชักนำโดยสภาวะเครียดและทำหน้าที่ในการปกป้องพืช ในการวิจัยนี้ได้ใช้อบเชย (*Cinnamomum zelanicum*) ซึ่งมีสารกลุ่มฟีนิล โพรพานอยด์ในปริมาณสูง เป็นพืชทดลองในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคพืชด้วยวิธี agar disc diffusion ผงแห้งและสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกของคันทันอบเชยที่ความเข้มข้น 0-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ถูกนำมาตรวจสอบการต้านทานเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช ผงอบเชยมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบไม่มากนัก ในขณะที่สารสกัดอบเชยที่สกัดด้วยเอทานอล จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ สารสกัดจากอบเชยจะยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้น้อยกว่าแบคทีเรีย ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการสร้างต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน *PAL2* ซึ่งเป็นยีนที่ให้เอนไซม์เริ่มต้นของชีวสังเคราะห์ฟีนิล โพรพานอยด์ การศึกษาทำโดยใช้ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมในการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อรา 2 ชนิด (*Alternaria alternata* และ *Fusarium moniliforme*) และเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด (*Pseudomonas syringae* pv. *sesami* และ *Xanthomonas campestris* pv. *glycinae*) โดยเปรียบเทียบกับต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *CHS*, *DFR*, *PAP2* และต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบทุกสายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียจะมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์เอ, คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม สารทุติยภูมิที่ได้จากชีวสังเคราะห์ฟีนิล โพรพานอยด์จะเพิ่มขึ้นในต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อโรค ในปริมาณที่แตกต่างกัน ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2* และ *CHS* ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียจะมีการสะสมสารในกลุ่มฟีนิล โพรพานอยด์หลายชนิดสูงชันกว่าต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR* และ *PAP2* เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม ในขณะที่

ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* หลังจากได้รับเชื้อ *A. alternata* และ *F. moniliforme* จะให้
สารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์สูงที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	The effects of metabolic compounds from phenylpropanoid biosynthesis on plant pathogens.
Student	Mr. Sarawut Janhangva
Student ID	46068904
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2008
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpilin

ABSTRACT

The phenylpropanoid pathway synthesizes a diverse array of phenolic metabolites. These compounds are often induced by stress and serve specific roles in plant protection. In this research, Cinnamon plants (*Cinnamomum zelanicum*) that have high concentration of phenylpropanoid substances, were used to test the growth inhibition activity of pathogenic fungi and pathogenic bacteria using agar disc diffusion method. The dry powder and ethanol extraction of cinnamon bark in the range of 0-800 µg/ml were investigated for much the activity against plant pathogenic fungi and bacteria. Dry cinnamon powder did not affect on the growth inhibition of tested organisms, while ethanol extraction of cinnamon bark had inhibited the activity at all concentrations (200-800 µg/ml) of extraction especially in tested bacteria. This cinnamon extraction showed less inhibition of fungal growth than that of bacteria. Tobacco over-expressing L-phenylalanine ammonia-lyase (*PAL2*), the entry point enzyme into the phenylpropanoid pathways, was constructed. This transgenic tobacco was used to infect each 2 species of fungi (*Alternaria alternata* and *Fusarium moniliforme*) and bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *sesami* and *Xanthomonas campestris* pv. *glycinae*) in comparing with tobacco over-expressing *CHS*, *DFR*, *PAP2* and also the wild type plant. All tobacco plants infected with bacteria and fungi had decrease photosynthetic contents (chlorophyll A, chlorophyll B and carotenoid) in comparing with the control. Secondary metabolites derived from phenylpropanoid pathways increased differently in transgenic tobacco infected pathogens. *PAL2* and *CHS* transgenic tobacco infected bacteria significantly had higher accumulation of several phenylpropanoid metabolites than those

of the wild type, *DFR* and *PAP2* transgenic tobacco when compared with the control. Among the tobacco treated with each fungi, *CHS* transgenic tobacco treated with *A. alternata* and *F. moniliforme* gave the highest phenylpropanoid metabolites.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต่อ **IV** ข้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพลิน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้ และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. พรรณี จิตาพิชิต, รศ. มาลินี ดันตยาภรณ์ และรศ. สุขใจ ชูจันทร์ กรรมการสอบหัวข้อและโครงร่างวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติ พี่น้อง ที่ได้สนับสนุนการศึกษา ห่วงใยและให้กำลังใจมาตลอด

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้แก่บิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพเพียง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

ศราวดี จันทร์ห้างหว้า

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะของต้นอบเชย.....	4
2.2 คุณลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	5
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์.....	7
2.4 กลไกป้องกันโรคของพืช.....	9
2.5 ฟินิลโพรพานอยด์.....	11
2.6 เฟลโวนอยด์.....	15
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	29
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	29
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.3 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง.....	31
3.4 พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้ในการทดลอง.....	31
3.5 อิทธิพลของผอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช.....	31
3.6 การทดสอบอิทธิพลของสารสกัดจากอบเชยด้วยเอทานอลต่อเชื้อก่อโรคพืช.....	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 การโคลนยีน <i>PAL2</i> จาก <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.8 การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียสำหรับการถ่ายโอนเข้าสู่ต้นพืช.....	36
3.9 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้ <i>Agrobacterium</i>	37
3.10 การวิเคราะห์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน.....	37
3.11 การทดสอบการตอบสนองของต้นยาสูบแปลงพันธุ้ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรครากพืช	38
3.12 การตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์.....	39
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	40
4.1 ผลของสารสกัดจากฝองเบชต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรครากพืช.....	40
4.1.1 ผลของฝองเบช.....	40
4.1.2 ผลของฝองเบชที่สกัดด้วยเอทานอล.....	53
4.2 ผลการโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ	67
4.3 ผลของการทดสอบต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่อเชื้อ จุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช.....	73
4.3.1 ผลการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นยาสูบในอาหาร MS หลังจากได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช.....	73
4.3.2 ผลของการทดสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงต่อเชื้อ จุลินทรีย์ก่อโรคในพืช.....	78
4.3.3 ผลของการทดสอบสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ในพืช.....	81
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	87
บรรณานุกรม.....	90
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	98
ประวัติผู้เขียน.....	100

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	สรุปลักษณะสำคัญของสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์.....16
4.1	ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ <i>A. alternata</i>79
4.2	ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ <i>F. moniliforme</i>80
4.3	ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ <i>P. syringae</i> pv. <i>Sesami</i>80
4.4	ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ <i>X. campestris</i> pv. <i>glycinae</i>81
4.5	ปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบชนิดต่างๆ ที่ได้เชื้อรา <i>A. alternata</i>82
4.6	ปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบชนิดต่างๆที่ได้รับเชื้อรา <i>F. moniliforme</i>83
4.7	ปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบชนิดต่างๆ ที่ได้รับเชื้อ <i>P. syringae</i> pv. <i>sesami</i>84
4.8	ปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบชนิดต่างๆ ที่ได้รับเชื้อ <i>X. campestris</i> pv. <i>glycinae</i>85

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะของด้นอบเชย.....	4
2.2 โครงสร้างแบบไม้อาศัยเพศของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ...	6
2.3 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์.....	13
2.3 วิธีชีวสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์.....	14
2.4 โครงสร้างหลักของสารเฟลโวนอยด์.....	15
2.5 โครงสร้างของสารชนิดต่างๆ ในกลุ่มเฟลโวนอยด์.....	19
4.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. flavus</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	41
4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. paraciticus</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	42
4.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. niger</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	43
4.4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. alternata</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	44
4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>Fusarium moniliforme</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ..	45
4.6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	46
4.7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>Sclerotium rofisii</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	47
4.8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>Tricoderma</i> spp. ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	49
4.9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>Agrobacterium tumefacian</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตรและ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	50
4.10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>Corynebacterium aqauticum</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตรและ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	51

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>sesami</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิเมตรและ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผองอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	52
4.12 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>glycinae</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิเมตรและ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผองอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	53
4.13 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. flavus</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	55
4.14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. parviticus</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	56
4.15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. niger</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	57
4.16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. alternata</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	58
4.17 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>F. moniliforme</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ....	59
4.18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	60
4.19 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>S. roftsii</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	61
4.20 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา <i>Tricoderma</i> sp ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตรและ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ...	62
4.21 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. tumefacian</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิเมตรและ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	63
4.22 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>C. aquaticum</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิเมตรและ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิเมตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	64

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.23 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>P. syringe</i> pv. <i>sesami</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคลโลนีต่อมิลลิลิตรและ 10^7 โคลโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ.....	65
4.24 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย <i>X. campestris</i> pv. <i>glycinae</i> ที่ความเข้มข้น 10^6 โคลโลนีต่อมิลลิลิตร และ 10^7 โคลโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ	66
4.25 แสดงขนาดของดีเอ็นเอของยีน <i>PAL2</i> ที่ได้จากการทำพีซีอาร์เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	67
4.26 แสดงโคลโลนีของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีน <i>PAL2</i> เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal.....	68
4.27 แสดงขนาดพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลโลนีสีขาวเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	68
4.28 แสดงผลการตัดพลาสมิดที่คัดเลือกได้ด้วยเอ็นไซม์ <i>XbaI</i>	69
4.29 แสดงผลของขนาดพลาสมิดที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีนกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	70
4.30 แสดงผลของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>PAL2</i> ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ <i>XbaI</i> เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	71
4.31 แสดงผลของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>PAL2</i> ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ <i>HindIII</i> เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	71
4.32 เวกเตอร์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>PAL2</i> แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของ promoter (sense) และ ทิศทางกลับกับการแสดงออกของ promoter (antisense).....	72
4.33 ดันยาสูบที่ได้จากการศึกษาการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBI121...73	
4.34 แสดงการตอบสนองของดันยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ <i>A. alternata</i>	74
4.35 แสดงการตอบสนองของดันยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ <i>F. moniliforme</i>	75
4.36 แสดงการตอบสนองของดันยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ <i>P. syringe</i> pv. <i>sesami</i>	76
4.37 แสดงการตอบสนองของดันยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ <i>X. campestris</i> pv. <i>glycinae</i>	77

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายทางชีวภาพของทรัพยากรธรรมชาติ สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีในประเทศเป็นจำนวนมาก และนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสมุนไพรประกอบด้วยสารหลายชนิด ทั้งอินทรีย์สาร วิตามิน แร่ธาตุ เอนไซม์ และเกลือแร่ต่างๆ ซึ่งจะแสดงปฏิกิริยาต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อโรคและจุลินทรีย์ต่างๆ ให้หยุดการเจริญเติบโต Shelet. (1983) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา โดยพืชหลายชนิดซึ่งได้แก่ กระเทียม หัวหอมใหญ่ อบเชย กานพลู ไทม์ (thyme) เซจ (sage) และเครื่องเทศอื่นๆ ในอาหารหมักดอง ขนมน้บั้ง ข้าวและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่าองค์ประกอบของไขมัน โปรตีน น้ำและเกลือแร่ที่มีอยู่ในอาหารเหล่านี้ เมื่อผสมเครื่องเทศลงไปสามารถต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้ และพบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของเครื่องเทศ มีผลอย่างยิ่งต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในอาหารมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์

จากการที่ประเทศไทย เป็นประเทศกสิกรรมที่มีรายได้ส่วนใหญ่ในรูปของผลผลิตทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็นพืช ผักและผลไม้ ในขณะที่ปัจจุบันการเพาะปลูกพืช ผักและผลไม้เหล่านี้มักประสบปัญหาของโรคพืชต่างๆ ที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตที่ได้มีจำนวนที่ลดลงหรือให้ผลผลิตที่มีคุณภาพที่ต่ำลง ดังนั้นเกษตรกรจึงหาทางป้องกันและกำจัดโรคพืชเหล่านี้โดยใช้สารเคมี ซึ่งผลคั่งกล่าวนอกจากจะมีผลเสียต่อผู้บริโภคในเรื่องความปลอดภัยแล้ว ยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย เนื่องจากสารพิษตกค้างในดินหรือสารพิษที่ปนเปื้อนลงสู่แม่น้ำลำคลอง

ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) กลุ่มใหญ่ที่พืชสร้างขึ้น เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดที่เกี่ยวข้องทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต เช่น การติดเชื้อโรค การเกิดบาดแผล รังสียูวี การได้รับโอโซน การกำจัดของเสีย และสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่เป็นปรปักษ์ต่อพืช (Korkina. 2007) โดยทั่วไปพืชจะสร้างสารประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ เพื่อใช้เป็นแหล่งสะสมสารในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ฟลาวอนอยด์ (flavonoid) ไอโซฟลาวอนอยด์ (isoflavonoid) สติลบิน (stilbenes) โมโนลิกนอล (monolignol) และลิกแนน (lignan) ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารไฟโตอะเล็กซิน (phytoalexin) หรือสารไฟโตแอนติซิพิน (phytoanticipin) ในพืช (Dixon. 2001) และจากการศึกษาพบว่าสารในกลุ่มฟลาวอนอยด์ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไปที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Konczak และ Zhang. 2004) โดยพืชที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ จะมีการกระตุ้นให้ผลิตสารฟลาวอนอยด์ออกมาในปริมาณที่มากกว่าปกติโดยเฉพาะบริเวณบาดแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ (Gandikota และคณะ. 2001) และมีรายงานว่าข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟางสายพันธุ์ที่มีสาร flavan4-ol สูงจะสามารถต้านทานเชื้อราได้มากขึ้น (Jambunathan และคณะ. 1999) นอกจากนี้ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ยังมีหน้าที่ทางชีวภาพอีกหลากหลาย เช่น เป็นสารให้สีแก่พืช ช่วยลดแมลงในการผสมเกสร ป้องกันพืชจากแมลง รวมถึงสภาวะเครียด โดยมีผลทำให้พืชมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต (Scott และคณะ. 1999)

การวิจัยนี้ เน้นการศึกษาการเพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ในยาสูบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านทานต่อโรคพืช โดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมร่วมกับการถ่ายโอนยีนจากชีวสังเคราะห์ดังกล่าวเข้าสู่พืช

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาผลของผงและสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช
- 1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการถ่ายโอนยีน *PAL2* เข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*
- 1.2.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงในพืชทดสอบ หลังจากรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช
- 1.2.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS*, *DFR* และ *PAP2*

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของผงและสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ศึกษาการเพิ่มจำนวนของยีนและประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* จากสารชีวสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ คือ ยีน *PAL2* เข้าสู่ต้นยาสูบและทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS*, *DFR* และ *PAP2* หลังจากที่ดินยาสูบได้รับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบระดับความเข้มข้นของผงและสารสกัดหยาบจากเปลือกอบเชยที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช
- 1.4.2 ทราบลักษณะอาการที่แสดงออกภายนอกของพืชทดสอบต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช
- 1.4.3 ทราบการแสดงออกของยีนในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช

1.4.4 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลในการป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

หลักการและทฤษฎี

2.1 ลักษณะของต้นอบเชย



รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นอบเชย

ที่มา ; สุทัศน์ รุ่งพงศ์ (2540)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinnamomum zelanicum*

ชื่อวงศ์ LAURACEAE

ลักษณะทั่วไป

อบเชยเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูง 15-20 เมตร ไม้ผลัดใบ เปลือกเรียบสีเทาแก่หรือเทาปนน้ำตาล ต้นเป็นรูปทรงพุ่มกลมเรียวยอดหรือรูปเจดีย์ต่ำทึบ ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม ใบรูปขอบขนาน เนื้อใบหนาแข็งและกรอบ มีเส้นแขนงออกจากโคนใบ 3 เส้น เมื่อขยี้ใบมีกลิ่นฉุน ดอกมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อโตตามปลายกิ่ง สีเหลืองอ่อน ออกดอกระหว่างเดือนมิถุนายน- ตุลาคม ผลขนาดเล็ก รูปไข่มีเมล็ด 1 เมล็ด (สุทัศน์, 2540)

2.2 คุณลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 เชื้อแบคทีเรีย (สวัสด์, 2507)

Agrobacterium spp. มีลักษณะของเซลล์เป็นท่อนขนาด 0.8 x 1.5 - 3 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) ที่อยู่รอบเซลล์ โคโลนีใสไม่มีสีและมักสร้างเมือกจำนวนมาก อาศัยอยู่ในดินรอบ ๆ รากพืช ตัวอย่าง เช่น *A. tumefaciens* เป็นสาเหตุของโรค crown gall ของพืชหลายชนิด

Corynebacterium spp. มีลักษณะของเซลล์เป็นท่อนตรงถึงโค้งเล็กน้อย ขนาด 0.5-0.9 x 1.5-4.0 ไมโครเมตร เซลล์ไปงเป็นรูปคล้ายกระบอง ไม่เคลื่อนที่แต่บางชนิดเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา 1 หรือ 2 เส้นที่ปลายของเซลล์ ทำให้เกิดโรคอาการเหี่ยว ท่อลำเลียงน้ำและอาหารเป็นสีน้ำตาล ที่เป็นสาเหตุโรคพืชมีประมาณ 11 ชนิด

Pseudomonas spp. มีลักษณะของเซลล์เป็นท่อนขนาด 0.5-1 x 1.5-4 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา 1 เส้นหรือมากกว่า 1 เส้น (polar flagella) แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างสีเรืองแสงละลายน้ำได้ ตัวอย่าง เช่น *P. syringae* pv. *glycinea* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง และกลุ่มที่ไม่สร้างสารเรืองแสง ตัวอย่างเช่น *P. corrugata* สาเหตุโรคไส้ดำ (pith necrosis) ของมะเขือเทศ

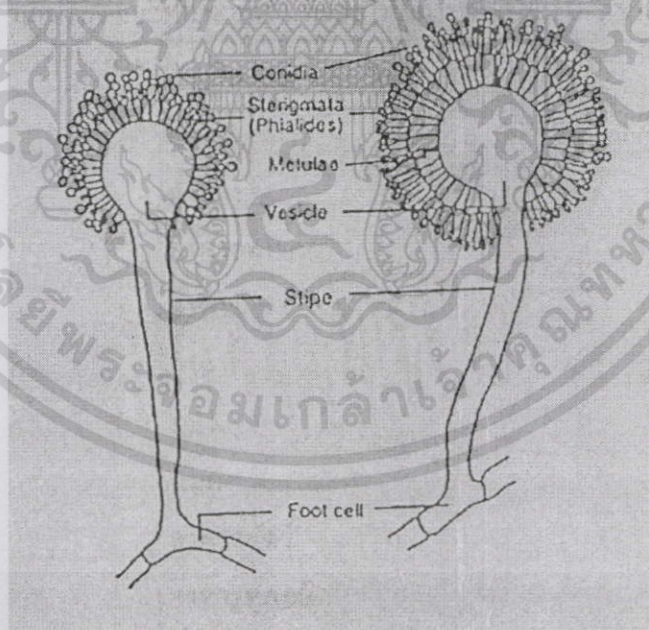
Xanthomonas spp. มีลักษณะของเซลล์คล้ายกับ *Pseudomonas* spp. แต่มีแฟลกเจลลาเพียงเส้นเดียว ลักษณะสำคัญ คือ โคโลนีมีสีเหลืองเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเป็นเม็ดสีไม่ละลายน้ำทุกสปีชีส์ (species) สามารถทำให้เกิดโรคกับพืชได้ ยกตัวอย่าง เช่น *X. campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศและพริก

2.2.2 เชื้อรา

เชื้อรา *Aspergillus* spp. มี foot cell ทำให้สามารถแยกออกจากเชื้อราชนิดอื่นได้ง่าย นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Czapek's solution agar และ malt extract agar การจำแนกเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* spp. สามารถดูจากสัณฐานวิทยาได้โดยคุณลักษณะของเชื้อที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ คอนิดิโอพอร์ (conidiophore) ซึ่งเป็นชนิดที่ไม่แตกกิ่งก้านและเส้นใยไม่มีผนังกัน แยกออกมาจาก vegetative mycelium ตรงปลายของคอนิดิโอพอร์จะขยายใหญ่ขึ้นและพองออกซึ่งเรียกว่า เวซิเคิล (vesicle) ตรงบริเวณเวซิเคิลจะมีสเตอริกมาตา (sterigmata) รูปร่างเหมือนฟลอสก์งอกออกมาจนเต็มเวซิเคิลและจะมีคอนิเดีย (conidia) งอกออกมาที่ปลายของสเตอริกมาตาแต่ละอันโดยไม่มีการแตกแขนง ดังรูปที่ 2.2 (อรวรรณ นวีภาพ. 2531; Gourama และ Bullerman. 1995b) เชื้อรา *Aspergillus* spp. พบทั่วไปในดินและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร บางชนิดจะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง (Gourama และ Bullerman. 1995a)

เชื้อรา *A. flavus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกับเชื้อรา *A. parviticus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีการปนเปื้อนในสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตมากที่สุด ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *A. flavus* คือ คอนิไดโอฟอร์หนาและขรุขระ ไม่แตกแขนง บนคอนิไดโอฟอร์มีเวซิเคิลเป็นกระเปาะบวมกลมๆ ยึดหยุ่นได้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10- 65 ไมโครเมตร รูปร่างของเวซิเคิลจะเปลี่ยนไปตามองค์ประกอบของอาหาร บนเวซิเคิลจะมีสเตอริกมาตา 1 หรือ 2 อัน ซึ่งมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ชั้นแรกเรียกว่า metulides ชั้นที่ 2 เรียกว่า phialides ส่วนปลายของสเตอริกมาตามีคอนิเดียมรูปร่างกลมรี มีหน้าที่สำหรับการสืบพันธุ์ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยจะสร้างสปอร์สี่เหลี่ยมถึงสี่น้ำตาล สปอร์ที่สร้างขึ้นมีความสำคัญมากในการจำแนกเชื้อรา *Aspergillus* spp. แต่ละชนิด (Gourama และ Bullerman, 1995b)

เชื้อรา *A. flavus* โดยทั่วไปมี 2 สายพันธุ์ คือ S และ L การแยกเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ออกจากกันจะดูลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ สายพันธุ์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ S ซึ่งสามารถสร้างอะฟลาทอกซินและปรับตัวในเมล็ดฝ้ายได้ดีกว่าสายพันธุ์ L จากการทดลองเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ร่วมกันในเมล็ดฝ้าย พบว่าเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ S จะสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อยลง เพราะว่าสายพันธุ์ S และ L มีการเจริญแบบแข่งขันกัน และความเป็นพิษจากอะฟลาทอกซินจากสายพันธุ์ S จะลดลงเนื่องจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสเคลอโรเทีย (Garber และ Coity, 1997)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างแบบไม่ใช้เพศของเชื้อรา *Aspergillus* spp.

ที่มา : Gourama และ Bullerman, 1995b.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *Fusarium moniliforme* Sheldon โคเรื้อบนอาหาร PDA สายใยรา (mycelium) มีสีขาว อาจมีสีม่วงอ่อนเนื่องจากเป็นสีของสปอร์ที่เส้นใยสร้างขึ้นมา อาจมีหรือไม่มีสปอร์โรโดเชีย (sporodochia) ถ้ามีจะมีสีแทนจนถึงสีส้ม อยู่โดดๆหรือรวมตัวกันคล้ายๆ กับกลุ่มสปอร์ที่อยู่รวมกัน โดยมีสารเมือกเป็นตัวประสานรวมตัวกันไว้ อาจพบสเคลอโรเทีย (sclerotia) ซึ่งมักมีสีน้ำตาลดำและบางครั้งมีมากจนทำให้มีสีน้ำตาลดำทั้งโคโลนี สีเส้นใยจะเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ไม่มีสีจนเป็นสีน้ำตาลดำ มีไมโครคอนิเดีย (microconidia) มาก อายุอ่อนๆ จะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างรีหรือรูปกระบอก บางแห่งจะเรียงตัวเป็นสายยาวมีไมโครคอนิเดียมากแต่บางสายพันธุ์มีน้อย รูปร่างมีหลายแบบตั้งแต่เป็นรูปพระจันทร์เสี้ยวจนถึงเกือบตรง ด้านทั้งสองเกือบขนานกันตลอด สปอร์มีผนังเซลล์ ก้านชูสปอร์ อาจมีกึ่งหรือไม่มีก็ได้ เป็นแบบ monophialides ไม่มีคลาไมโดสปอร์ (chlamydospores) ภาวะมีเพศ ชื่อ *Gibberella fujikuroi* (Nelson และคณะ. 1983)

สปอร์ของ *Fusarium* spp. เป็นเอ็นโดคอนิเดีย (endoconidia) สร้างบน monophialides หรือ polyphialides ก็ได้ โดยทั่วไปมีรูปร่างเป็นแบบไพริฟอร์ม (pyriform) ฟุซอยด์ (fusoid) หรือรี มีผนังกัน 0-3 ชั้น ส่วนมาโครคอนิเดีย (macroconidia) จะมีผนังกัน 3-10 ชั้นหรือมากกว่า ส่วนใหญ่มีลักษณะโค้งเป็นรูปเคียวหรืออาจตรงก็ได้ การจำแนกและการวินิจฉัยเชื้อขึ้นอยู่กัปลักษณะของมาโครคอนิเดีย การสร้างมาโครคอนิเดีย การสร้างคลาไมโดสปอร์ การสร้างสีและการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อราในกลุ่มนี้มีกระจายอยู่ทั่วไปมีทั้งเป็นซาโปรไฟต์ (saprophyte) และพาราไอซ์ต์ (parasite) โดยเฉพาะเป็นเชื้อก่อโรคของพืช ซึ่งทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตของประเทศชาติเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังสร้างสารพิษอีกหลายชนิด เช่น trichothecenes (Marassa และคณะ. 1983)

Agrios (1969) รายงานว่า รา *Sclerotium rolfsii* อยู่ใน Genus *Sclerotium* ไม่มีสปอร์แบบใช้เพศและไม่ใช้เพศ อยู่ใน Class Deuteromycetes เพราะไม่มีการขยายพันธุ์แบบใช้เพศ สาเหตุโรครากและลำต้นเน่าดำของพืชใน Oder Mycelia Sterilia และพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น งาม ข้าวโพด พืชผัก ถั่วลิสงและข้าวสาลี (กองโรคและจุลชีววิทยา. 2528) สาเหตุของโรคกล้าใบแห้งของข้าว (Seeding blight) โรคเน่าโคนดิน (Damping-off) และโรคกล้าต้นเน่า (stem rot) ของต้นอ่อนของกาแฟด้วย (สวัสดี วีระเดช. 2507) และยังสามารถเข้าทำลายไม้ดอกได้ทุกตระกูล (Cooke. 1980)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ สารอาหาร ความชื้น อุณหภูมิ ระยะเวลา ความเป็นกรดด่าง อากาศและการแข่งขันกับจุลินทรีย์เจ้าถิ่น (Gourama and Bullerman. 1995b)

2.3.1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่ต่างสปีชีร์ักันสามารถเจริญได้แตกต่างกัน

2.3.2 สารอาหาร

เชื้อราเจริญได้มากน้อยแตกต่างกันในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ หรือแม้แต่ผลผลิตชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ ซึ่งอาจเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตแต่ละชนิดและพันธุ์ของพืช รวมทั้งคุณสมบัติในการสร้างหรือส่งเสริมการสร้างสารพิษของธาตุอาหารแต่ละชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และธาตุอาหารเสริมที่สำคัญ ได้แก่ เหล็ก สังกะสี เป็นต้น (อรุณศรี วงศ์อุไร. 2540)

เชื้อรา *Aspergillus* spp. สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Czapek's solution agar และ malt extract agar (อรุณศรี วงศ์อุไร. 2531 ; Gourama and Bullerman. 1995b)

Awuah และ Kpodo (1996) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ด้วยสมุนไพร *Xylopi aethiopia*, *Monodera myristica* ออบเชยและพริกไทย โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA พบว่าสมุนไพรเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญในอาหาร PDA ได้ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหาร yeast extract sucrose พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้

อดิสา บุญทอง (2528) รายงานว่า ลักษณะของเชื้อ *S. rolfii* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยของเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว เส้นใยนี้จะพุ่มมากในระยะแรกของการเจริญเติบโต เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตเต็มที่จะสร้างสเกลอโรเทีย (sclerotia) และเส้นใยจะเริ่มแผ่ราบจางลง สเกลอโรเทียที่อายุน้อยจะมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่ออายุมาก

2.3.3 ความชื้นและความชื้นสัมพัทธ์

ความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการเจริญของเชื้อรา ผลผลิตทางการเกษตรที่มีความชื้นสูงมักจะพบเชื้อราปนเปื้อนเสมอ

Mahmoud และคณะ (1992) พบว่าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุดที่เชื้อราสามารถเจริญได้ในสมุนไพรแอนิส (anise) และชะเอมเทศ คือ 90 เปอร์เซ็นต์

2.3.4 อุณหภูมิ

Kurtzman และคณะ (1987) พบว่าเชื้อราสกุล *Aspergillus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างมาก อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อรา *A. pseudotamarii* และ *A. tamarii* สามารถเจริญได้ คือ 37 องศาเซลเซียส เชื้อรา *A. flavus*, *A. paraciticus* และ *A. nomius* อยู่ที่ 32 องศาเซลเซียส และมีรายงานว่าเชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิมระหว่าง 11-37 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25- 30 องศาเซลเซียส (ปริศนา เหมสุจิ. 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 ปัจจัยอื่น ๆ

นอกจากปัจจัยต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ความเสียหายของเมล็ดธัญพืช สายพันธุ์ของพืช ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

Epstein และคณะ (1970) พบว่าการควบคุมองค์ประกอบของก๊าซต่างๆ ในชั้นบรรยากาศ (atmosphere) ให้มีคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 1.8 เปอร์เซ็นต์และไนโตรเจน 88.2 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเหลว โดยเชื้อรายังสามารถเจริญได้ในสภาวะบรรยากาศที่อุณหภูมิห้อง แต่เชื้อราจะหยุดการเจริญที่อุณหภูมิ 84 องศาฟาเรนไฮต์ และพบว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะเกิดขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิต่ำ

Northolt และ Bullerman. (1982) พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา การเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์และลดปริมาณออกซิเจนในอากาศเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์จะช่วยยับยั้งการเจริญได้ แต่ถ้าระดับออกซิเจนเหลือน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์

Line และคณะ (1994) พบว่าถ้ามีการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ลงในอาหารเหลว เป็นเวลานาน ๆ จะมีผลทำให้สปอร์ของเชื้อราที่แขวนลอยในอาหารเหลว ไม่สามารถเจริญได้หรือไม่เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม

2.4 กลไกในการป้องกันโรคของพืช

โดยทั่วไปพืชจะมีกลไกในการป้องกันการเกิดโรคทำให้ได้รับความเสียหายจากโรคน้อยลง การป้องกันโรคของพืชอาจเกิดจากลักษณะ โครงสร้างของพืชเอง ทำให้เกิดการขาดวางและยับยั้งการเข้าสู่เซลล์พืชหรือการเจริญลุกลามของเชื้อในต้นพืช ซึ่งเป็นกรป้องกันที่เกิดขึ้นทางกายภาพหรือปฏิกิริยาทางชีวเคมีในเซลล์พืช โดยการสร้างสารที่เป็นพิษต่อเชื้อโรค เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

2.4.1 การป้องกันของพืชทางโครงสร้าง (structural defense)

พืชจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อขัดขวางการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำให้เชื้อที่เข้าสู่พืชแล้วไม่สามารถเจริญลุกลามต่อไป เช่น การเกิดเซลล์ที่อัดกันเป็นชั้นหนา เป็นต้น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเชื้อโรค โดยโครงสร้างที่พืชสร้างขึ้นเพื่อเป็นการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ มีดังนี้

2.4.1.1 การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อพืชที่ติดเชื้อจุลินทรีย์ จะสร้างเซลล์หลายๆ ชั้นเรียงซ้อนกัน เนื่องจากการกระตุ้นจากสารที่เชื้อจุลินทรีย์หลั่งออกมา โดยชั้นของเซลล์ที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อและสารพิษที่เชื้อหลั่งออกมาเกิดการขยายวงกว้าง และยังระงับการไหลเวียนของน้ำและอาหารในพืช เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเนื้อเยื่อปกติไปยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ทำให้เชื้อและเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วอยู่ในขอบเขตของแผล ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นจุดหรือเป็นแผลนูนออกมาจากเนื้อเยื่อปกติ

2.4.1.2 การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเซลล์

โครงสร้างของเซลล์ที่ใช้ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์เป็นการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของผนังเซลล์ในระหว่างที่เซลล์ถูกเชื้อเข้าทำลาย กลไกที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคนี้นี้มีขอบเขตจำกัด ซึ่งเท่าที่พบ พบว่าโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา 2 แบบ คือ เกิดจากการไปงอกของเซลล์เอพิเดอร์มิส (epidermis) และเซลล์ที่อยู่ใต้เอพิเดอร์มิสในระหว่างที่เชื้อแทงผ่านพืชโดยตรง ซึ่งอาจยับยั้งการแทงผ่านของเชื้อได้และเกิดเป็นปลอกหุ้มเส้นใยของเชื้อที่เริ่มแทงผ่านเซลล์ ปลอกที่ห่อหุ้มดังกล่าวเกิดจากการขยายตัวของผนังเซลล์

2.4.1.3 เกิดไฮเปอร์เซนซิวิตี (hypersensitivity)

เป็นปฏิกิริยาแสดงถึงความต้านทานโรคของพืช โดยเซลล์พืชจะตายอย่างรวดเร็วหลังจากเชื้อเข้าสู่เซลล์ พบมากกับโรคที่เกิดจากเชื้อราปรสิตและไส้เดือนฝอย ทำให้เชื้อโรคในบริเวณแผลของเนื้อเยื่อที่ตายแล้วนั้น ไม่ได้รับสารอาหารจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

2.4.2 การป้องกันที่เกิดจากการกระตุ้นของเชื้อโรค

2.4.2.1 พืชสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ

เซลล์และเนื้อเยื่อของพืชจะมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อบาดแผลที่เกิดขึ้น ปฏิกิริยาดังกล่าวที่เกิดขึ้นเพื่อขัดขวางเชื้อที่เข้าไปในพืชไม่ให้ขยายวงกว้างและสมานบาดแผลที่เกิดขึ้น สารส่วนมากเป็นสารประกอบฟีนอลในรูปต่างๆ สารเหล่านี้อาจมีความเข้มข้นสูงพอในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย พืชที่มีการสะสมสารฟีนอลปริมาณสูงจะมีความต้านทานโรคได้ดีกว่าในพันธุ์พืชที่มีปริมาณสารฟีนอลต่ำ สารประกอบฟีนอลที่พบดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. สารประกอบฟีนอลสามัญ (common phenolics) เป็นสารประกอบที่พบได้ในพืช โดยพืชที่ไม่ต้านทานต่อโรคจะมีอัตราการสะสมสารในเนื้อเยื่อสูงกว่าพืชพันธุ์ที่ต้านทานโรคและมีการสะสมของสารได้เร็วกว่า ได้แก่ กรดคลอโรโรจินิก กรดคาเฟอิก และสารสโคโปเลทิน เป็นต้น

2. ไฟโตอะเล็กซิน (phytoalexin) เป็นสารประกอบที่พบในพืช ที่ได้รับการกระตุ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคหรือพืชที่มีบาดแผล ไฟโตอะเล็กซินเป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้นและมีพิษต่อเชื้อรา ซึ่งจะพบเฉพาะในพืชที่ถูกเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เข้าทำลาย หรือมีบาดแผลทางกล สารดังกล่าว ได้แก่ ipomeamarone, orcinol, pisatin, phaseolin และ rhitin เป็นต้น

2.4.2.2 พืชสร้างสารที่ทนต่อเอนไซม์ของเชื้อโรค

พืชสามารถต้านทานต่อโรคโดยการสร้างสารประกอบบางชนิดซึ่งเป็นสารที่เอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยได้ โดยสารเหล่านี้จะสะสมอยู่ใกล้ๆ บริเวณที่ติดเชื้อ เพื่อ

ป้องกันเนื้อเยื่อพืชบริเวณรอบๆ บาดแผลไม่ให้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่เชื้อปล่อยออกมา ส่งผลให้เชื้อ อยู่เฉพาะในแผลพืชและไม่สามารถลุกลามต่อไปได้สารดังกล่าวได้แก่ เกลือของเพคติน เป็นต้น

2.4.2.3 พืชมีปฏิกิริยาทำให้สารพิษของเชื้อสลายตัว

พืชพันธุ์ต้านทาน โรคมีความต้านทานต่อสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น กลไกที่เกี่ยวข้อง กับความต้านทานนี้ยังไม่ทราบชัดเจน สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในพืชเช่น กรดฟูซาริก สารไพริคูลาริน (piricularin) เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบที่ไม่มีพิษ โดยทำปฏิกิริยารวมตัวกับสารอื่นๆ และจำนวนสารประกอบที่เกิดขึ้นนี้จะมีสัดส่วนกับการต้านทานโรคของพันธุ์พืชอีกด้วย

2.4.3 การป้องกันของพืชทางชีวเคมี (biochemical defense)

เนื่องจากการที่มีสารต่างๆ เกิดขึ้นในเซลล์ก่อนแล้วหรือพืชสร้างขึ้นจากการกระตุ้นของเชื้อ ที่เข้าทำลายพืช ดังจะเห็นได้ว่าเชื้อบางชนิดไม่สามารถเข้าทำลายพืชบางพันธุ์ได้ ทั้งนี้ ที่พืชนั้นไม่มี ลักษณะโครงสร้างที่สามารถขัดขวางการเข้าทำลายของเชื้อ ซึ่งเป็นเหตุผลสนับสนุนว่ากลไกทางชีวเคมีมีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค กลไกที่เกิดทางชีวเคมีมีดังนี้

1. พืชปล่อยสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ (inhibitors) ออกมาทางผิวพืช รากและใบ สารดังกล่าวอาจมีคุณสมบัติออกฤทธิ์กับเชื้อใดเชื้อหนึ่ง
2. พืชมีสารยับยั้งการเจริญอยู่ในเซลล์ เช่น กรดคลอโรจีนิก สารประกอบฟีนอลต่างๆ ที่มี พิษต่อเชื้อและสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้
3. พืชมีอัตราการหายใจเปลี่ยนไป (altered respiration) พืชพันธุ์ต้านทานโรคหลังติดเชื้อ แล้วจะมีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากการหายใจที่เพิ่มขึ้นนั้นเพื่อกระบวนการเมแทบอลิซึม ต่างๆ ของพืชที่จำเป็นในปฏิกิริยาการป้องกันของพืชคือโรค
4. พืชมีการเปลี่ยนแปลงวิถีการสังเคราะห์ต่างๆ การที่พืชเป็นแผลหรือเป็นโรค พืชจะมีการหายใจเพิ่มขึ้น เกิดกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดและมีการสังเคราะห์ สะสมสารประกอบที่มีพิษ ต่อเชื้อจุลินทรีย์ จนมีปริมาณความเข้มข้นที่มากพอที่จะสามารถยับยั้งการทำลายของเชื้อได้ (Prakasam และคณะ. 1998 ; Chattopadhyay. 1998)

2.5 ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid)

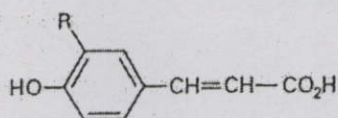
ฟีนิลโพรพานอยด์เป็นสารประกอบอินทรีย์ของพืชที่ได้จากชีวสังเคราะห์กรดอะมิโนฟีนิล อะลานีน (phenylalanine) ได้เป็นสารประกอบหลายชนิด ได้แก่ เฟลโวนอยด์ ลิกนิน คูมาริน (cumarin) และสารฟีนอลิกโมเลกุลเล็กๆ อีกมากมาย ฟีนิลโพรพานอยด์ทำหน้าที่หลากหลาย เช่น ป้องกันหนอนแมลงศัตรูพืช ป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณบาดแผล เป็นองค์ ประกอบของผนังเซลล์ป้องกันรังสียูวี ช่วยในการสร้างสารสีในพืชและยังทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณ โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

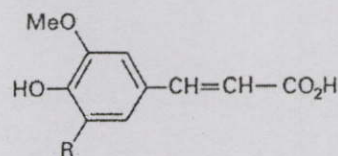
ฟีนิลโพรพานอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งมีวงอะโรมาติกที่เชื่อมกับสายคาร์บอน 3 สาย สารส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นในพืชสังเคราะห์นี้ คือ กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) ซึ่งมีความสำคัญไม่เพียงแต่การจัดเตรียมเพื่อสร้างลิกนินเท่านั้น แต่ยังมี ความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตและการต้านทานต่อโรคด้วย ในจำนวนของสารกลุ่ม ฟีนิลโพรพานอยด์ยังรวมถึงไฮดรอกซีคูมาริน ฟีนิลโพรเพนและลิกแนน ตัวอย่างโครงสร้างสารใน กลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ของพืชบางชนิด ดังรูปที่ 2.3

ฟีนิลอะลานีนเป็นสารตัวแรกที่เปลี่ยนเป็นกรดซินนามิกโดยการกระตุ้นของเอนไซม์ฟีนิล อะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia-lyase : PAL) การเกิดอนุพันธ์จะเกิดปฏิกิริยา การเติมหมู่เมทิล (methylation) และการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) โดยหมู่อะมิโนของฟีนิล อะลานีนถูกดึงออกไป เปลี่ยนกรดซินนามิกเป็นกรดคูมาลิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์ูลิก กรด 5-ไฮดรอกซีเฟอร์ูลิกและกรดซินแนพิค การเปลี่ยนแปลงของกรดเหล่านี้ เพื่อให้สอดคล้องกับการ ผลิตสารบางชนิดที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอม ระเหยของสมุนไพร และทำให้ดอกไม้มีกลิ่นหอม ซึ่งยังทำหน้าที่อื่นๆ อีกมากมาย เช่น ล่อแมลงใน การผสมเกสร ยกตัวอย่าง เช่น สารเอทิลซินนามेट ซึ่งกรดซินนามิกจะเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ ไฮดรอกซีเลส (hydroxylase) และ โอ-เมทิลทรานสเฟอเรส (O-Methyltransferase) และได้สาร ประกอบฟีนิลโพรพานอยด์ เช่น กรดไฮดรอกซีซินนามิก และเอนไซม์ 4-คูมาเรต : โคเอไลเกส (4-Cumarate : CoA lygase : 4CL) ทำปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยน โคเอของกรดซินนามิกและมีการกระตุ้น ชีวิตสังเคราะห์ของสารประกอบที่ได้ผ่านวิถีย่อยของวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ เช่น วิถีชีวิตสังเคราะห์ เฟลโวนอยด์และลิกนิน (Zabala และคณะ. 2006)

Hydroxycinnamic acids

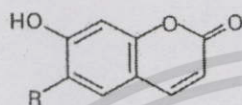


R=H, *p*-coumaric acid
R=OH, caffeic acid

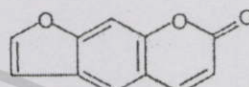


R=H, ferulic acid
R=OMe, sinapic acid

Coumarins

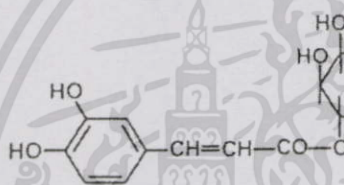


R=H, umbelliferone
R=OH, aesculetin
R=OMe, scopoletin

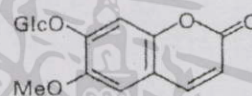


Psoralen

Bound Forms

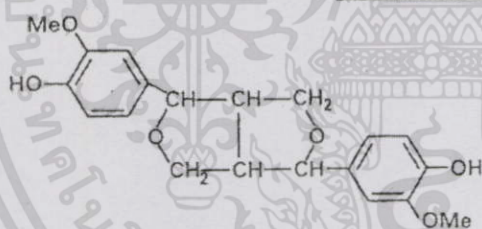


Chlorogenic acid

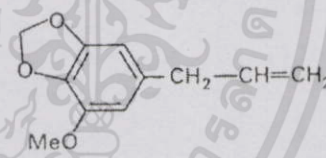


Scopolin

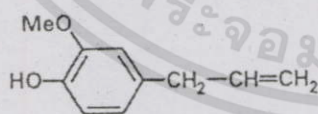
Lignans and Phenylpropenes



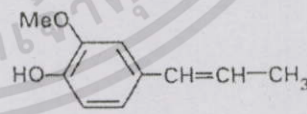
Pinoresinol



Myristicin



Eugenol



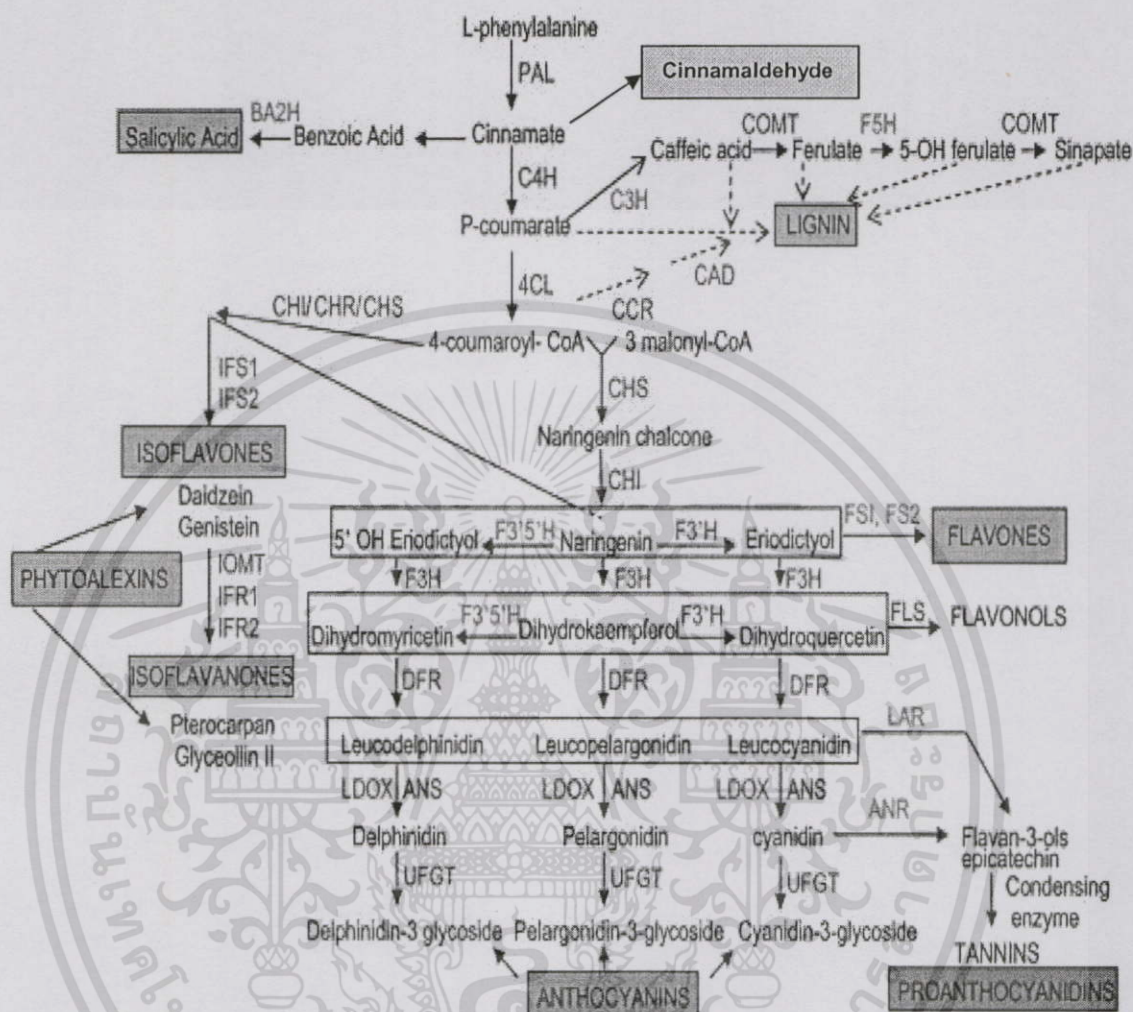
Isoeugenol

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์

ที่มา : Harbrone. 1989.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phenylpropanoid Metabolic Pathway



รูปที่ 2.4 วิถีชีวสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ *PAL* : phenylalanine ammonia-lyase; C4H : cinnamate 4-hydroxylase; 4CL : 4-coumarateCoA ligase; CHS : chalcone synthase; CHI : chalcone isomerase; IFS : isoflavone synthase; F3'H : flavonoid 3'-hydroxylase; FS : flavone synthase; F3', 5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylase; F3H: flavanone 3-Hydroxylase; DFR : dihydroflavonol-4-reductase; ANS : anthocyanidin synthase also called LDOX, (leucoanthocyanidin dioxygenase); UFGT : UDP-flavonoid glucosyl transferase; BA2H : benzoic acid 2-hydroxylase; C3H : *p*-coumarate 3 hydroxylase; COMT : caffeic O-methyl transferase; F5H : ferulic acid 5-hydroxylase; CCR : cinnamoyl CoA reductase; CAD : cinnamyl alcohol dehydrogenase; IOMT : isoflavanone *O*-methyltransferase; IFR : isoflavone reductase

ที่มา; Zabalá และคณะ. 2006.

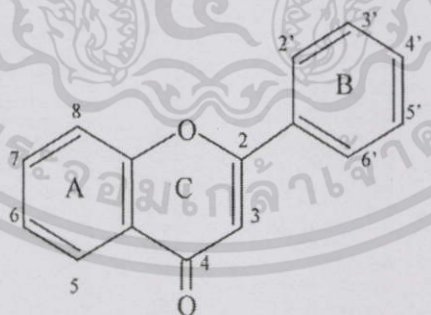
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 เฟลโวนอยด์ (flavonoid)

เฟลโวนอยด์เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) ที่พืชสร้างขึ้น พบได้ตามส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ราก ใบ และลำต้น โดยจะพบในรูปอิสระและจับกับน้ำตาลเป็นไกลโคไซด์ (glycosides) สารเฟลโวนอยด์มีหน้าที่หลากหลายในพืช เช่น เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีในพืช ป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค ช่วยต่อเมลงในการผสมเกสร เป็นตัวส่งสัญญาณ (signal) ให้เกิดปฏิกริยาระหว่างพืชและเชื้อโรค รวมทั้งช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ปัจจุบันมีการค้นพบสารกลุ่มเฟลโวนอยด์มากกว่า 7,000 ชนิด Harborne และ Williams. (2000) ได้ศึกษาในด้านพันธุศาสตร์ เคมี ชีวเคมี และความสัมพันธ์ต่างๆ ของสารเฟลโวนอยด์ในพืช เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการผลิต การสะสมสารที่เกิดขึ้นในพืช ตลอดจนถึงแนวทางการนำพืชมาใช้ประโยชน์ มนุษย์มีการนำสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์มาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน แต่ที่ได้รับความสนใจ คือ การนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ โดยเฟลโวนอยด์มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อไวรัส ต่อต้านการจับตัวเป็นก้อนของเลือด ลดอาการอักเสบ มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

เฟลโวนอยด์ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม มีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนต่อกัน 3 วง คือ วง A (A-ring) มีคาร์บอน 6 อะตอม วง B (B-ring) มีคาร์บอน 6 อะตอม และวง C (C-ring) มีคาร์บอน 3 อะตอม เฟลโวนอยด์ที่พบในธรรมชาติแบ่งออกเป็น 12 กลุ่ม โดยทั้งหมดมีชีวสังเคราะห์เหมือนกัน คือ โครงสร้างของวง B มาจากสารฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) และส่วนของวง A มาจากอะซิเตท (acetate) 3 โมเลกุล



รูปที่ 2.5 โครงสร้างหลักของสารเฟลโวนอยด์

ที่มา : Cushnie และ Lamb. 2005.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สรุปสูตรเคมีของสารแต่ละตัวในกลุ่มฟลาโวนอยด์

Compound	Substituents at carbon position:											
	2	3	4	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Flavones and their glycosides												
Acacetin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OCH ₃	-	-
Apigenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Baicalin	-	-	-	OH	OH	OR1	-	-	-	-	-	-
Baicalein	-	-	-	OH	OH	OH	-	-	-	-	-	-
Chrysin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Gardenin A (demethylated)	-	-	-	OH	OH	OH	OH	-	OH	OH	OH	-
Genkwanin	-	-	-	OH	-	OCH ₃	-	-	-	OH	-	-
Luteolin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Luteolin 7-glycoside	-	-	-	OH	-	OR2	-	-	OH	OH	-	-
7,8-Dihydroxyflavone	-	-	-	-	-	OH	OH	-	-	-	-	-
5,5'-Dihydroxy-8,2',4'-trimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	-	OCH ₃	OCH ₃	-	OCH ₃	OH	-
5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	OCH ₃	-	-	-	OCH ₃	-	-
5,7,4'-Trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	OH	-	-	CH ₃	OH	CH ₃	-
6,7,4'-Trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone	-	-	-	-	OH	OH	-	-	CH ₃	OH	CH ₃	-
Isoflavones												
6,8-Diprenylgenistein	-	-	-	OH	R3	OH	R3	-	-	OH	-	-
Sophoraisoflavone A	-	-	-	OH	-	OH	-	*	*	OH	-	-
Flavonols and their glycosides												
Galangin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Kaempferol	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
3-O-methylquercetin	-	OCH ₃	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Morin	-	OH	-	-	-	OH	-	OH	-	OH	OH	-
Myricetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Quercetagenin	-	OH	-	OH	OH	OH	-	-	OH	OH	-	-
Quercetagenin-7-arabinosyl-galactoside	-	OH	-	OH	OH	OR4	-	-	OH	OH	-	-
Quercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Quercetin-3-O-(2''-galloyl)-α-L-arabinopyranoside	-	OR5	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Quercetrin	-	OR6	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Robinetin	-	OH	-	-	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Rutin	-	OR7	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
3,2'-Dihydroxyflavone	-	OH	-	-	-	-	-	OH	-	-	-	-
3,6,7,3',4'-Pentahydroxyflavone	-	OH	-	-	OH	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavan-3-ols												
Catechin	-	OH	OH	-	-	OH	-	-	OH	-	OH	-
Epicatechin gallate	-	R8	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Epigallocatechin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Epigallocatechin gallate	-	R8	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
3-O-octanoyl-(+)-catechin	-	R9	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
3-O-octanoyl-(+)-epicatechin	-	R9	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanon-3-ols												
Dihydrofisetin	-	OH	-	-	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Dihydroquercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanones and their glycosides												
Lonchocarpol A	-	-	-	OH	R3	OH	R3	-	-	OH	-	-
Naringenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Naringin	-	-	-	OH	-	OR7	-	-	-	OH	-	-
Pinocembrin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Ponciretin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OCH ₃	-	-
Sophoraflavanone G	-	-	-	OH	-	OH	R10	OH	-	OH	-	-
3-Methyleflavanone	-	CH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,7,4'-Trihydroxy-8-methyl-6-(3-methyl-[2-butanyl])-(2S)-flavanone	-	-	-	OH	R3	OH	CH ₃	-	-	OH	-	-
Chalcones												
Licochalcone A	-	R11	OH	-	OCH ₃	-	-	-	-	OH	-	-
Licochalcone C	-	-	OH	R3	OCH ₃	-	-	-	-	OH	-	-
2,4,2'-Trihydroxychalcone	OH	-	OH	OH	-	-	-	OH	-	-	-	-
2,4,2'-Trihydroxy-5'-methylchalcone	OH	-	OH	OH	CH ₃	-	-	OH	-	-	-	-
Compound												
Substituents at carbon position:												
	2	3	4	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Flavan-3,4-diols and anthocyanidins												
Leucocyanidin	-	OH	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Pelargonidin chloride	-	Cl	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Flavans												
6,4'-Dichloroflavan	-	-	-	-	-	Cl	-	-	-	Cl	-	-
7-Hydroxy-3',4'-(methylenedioxy)flavan	-	-	-	-	-	-	OH	-	#	#	-	-

ที่มา : Cushnie และ Lamb, 2005.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

2.6.1.1. แชลโคน (chalcone)

แชลโคนเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ต่างจากสารชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน คือ มีวงอะโรมาติกเพียง 2 วง เชื่อมต่อกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งเรียงตัวแบบ α, β -unsaturated carbonyl system เมื่อแชลโคนเกิดปฏิกิริยาการรีดักชันที่ตำแหน่ง α, β -double bond จะให้สารชนิดใหม่ที่เรียกว่า ไดไฮโดรแชลโคน (dihydrochalcone) แชลโคนให้สารที่มีสีเหลืองเข้มสามารถพบได้หลายส่วนของพืช โดยเฉพาะดอกไม้สีเหลือง

2.6.1.2 ออโรน (aurone)

มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างจากฟลาโวนอยด์ชนิดอื่น คือเป็น 2-benzylidene-coumaranone การเกิดอนุพันธ์จะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ตำแหน่ง 4, 6 หรือ 7 ในวง A แล้วเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) หรือปฏิกิริยาไกลโคไซด์ (glycosides) ที่วง B ฟลาโวนอยด์ทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติเหมือนกัน คือ เมื่ออยู่ในสารละลายต่างจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีแดง

2.6.1.3 ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid)

ไอโซฟลาโวนอยด์ต่างจากฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆ ตรงส่วนของคาร์บอนที่เชื่อมระหว่างวง A และวง B จะมีแขนงที่ต่างกัน กระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารชนิดนี้แยกจากกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สารต้นตอของแชลโคน (chalcone precursor) คือ เมื่อแชลโคนเปลี่ยนแปลงเป็นสารฟลาวานอน แล้วเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่วง B และได้สารตัวแรกในกลุ่มที่เรียกว่า ไอโซฟลาโวน (isoflavone)

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มสารที่พืชสร้างขึ้น เพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นเดียวกับสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ สามารถพบได้ในพืชตระกูลถั่ว มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สารที่สำคัญ ได้แก่ ไอโซฟลาโวนและคูเมสแทน (coumestans)

2.6.1.4 ฟลาวานอน (flavanone) และ ไดไฮโดรฟลาโวนอล (dihydroflavonol)

ฟลาวานอนมีโครงสร้างเป็น 2-phenylbenzopyran-4-one ส่วนไดไฮโดรฟลาโวนอลมีโครงสร้างเป็น 2-phenyl-3-hydroxybenzopyran-4-one เรียกว่า 3-hydroxyflavanone หรือฟลาวานอน ซึ่งอาจเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation) ได้ ฟลาโวน (flavone) หรือเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 3 ได้เป็นไดไฮโดรฟลาโวนอล ซึ่งเปลี่ยนเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ

สารทั้ง 2 ตัวมีความสำคัญเพราะเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์ของฟลาโวนอยด์ สามารถพบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ ทั้งฟลาวานอนและไดไฮโดรฟลาโวนอลมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราจึงใช้ในการเก็บรักษาไม้

2.6.1.5. เฟลโวนอล (flavonol)

โครงสร้างของสารเฟลโวนอลเป็นโครงสร้างหลัก ที่จะเปลี่ยนไปเป็นเฟลโวนอลชนิดอื่นๆ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเจนเนชัน (oxygenation) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) และปฏิกิริยาดีไฮดรอกซีเลชัน (dehydroxylation)

2.6.1.6. เฟลโวน (flavone)

เฟลโวนมักพบในรูปของอะไกลโคนและไกลโคไซด์ ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 3' 4' และ 5' พบในบริเวณเปลือกไม้ แก่นไม้ ผลและรากของพืช เฟลโวนที่พบมากที่สุด คือ อะพิจินิน (apigenin) และลูทีโอลิน (luteolin)

2.6.1.7. แคลทีชิน (catechin)

มีโครงสร้างเป็น polyhydroxyflavan-3-ol พบครั้งแรกจากเชื้อ *Acacia catechu* มีการพิสูจน์ได้ว่าเป็น (-) epicatechin ต่อมาจึงพบ (+) catechin จากใบ *Uncaria gambier* และยังพบสารที่มีโครงสร้างแบบเดียวกันนี้อีกมาก จึงเรียกรวมกันว่า แคลทีชิน

แคลทีชินเป็นสารตั้งต้นของ condensed tannin และมีคุณสมบัติพิเศษ คือ เมื่อได้รับความร้อน กรด จะเปลี่ยนจากสารที่ไม่มีสีเป็นสารสีแดง (tannin-red) ซึ่งไม่ละลายน้ำ

2.6.1.8. ลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanin)

เป็นกลุ่มของเฟลโวนอยด์ที่ไม่มีสีไปจนถึงมีสีแดงและม่วง เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรดจะได้สารแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) จึงเรียกรวมกันว่า ลิวโคแอนโทไซยานิน ต่อมาพบว่าสารนี้มีอยู่อย่างแพร่หลาย พบมากในพืชที่มีเปลือกไม้ ในสภาพที่เป็นกรดมักจะได้สารไซยานิดิน และในบางกรณีให้สารเดลฟินิดิน (delphinidin)

ลิวโคแอนโทไซยานินที่พบในธรรมชาติมีโครงสร้างเป็น flavan-3,4-diols เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรดและได้รับความร้อน พบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของลิวโคแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนเป็นสารแอนโทไซยานิดินเริ่มจากการเกิดปฏิกิริยาดีไฮดรอกซีชันได้เป็น fl-a-3-ene ตามด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดเป็นแอนโทไซยานิดิน

2.6.1.9. แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

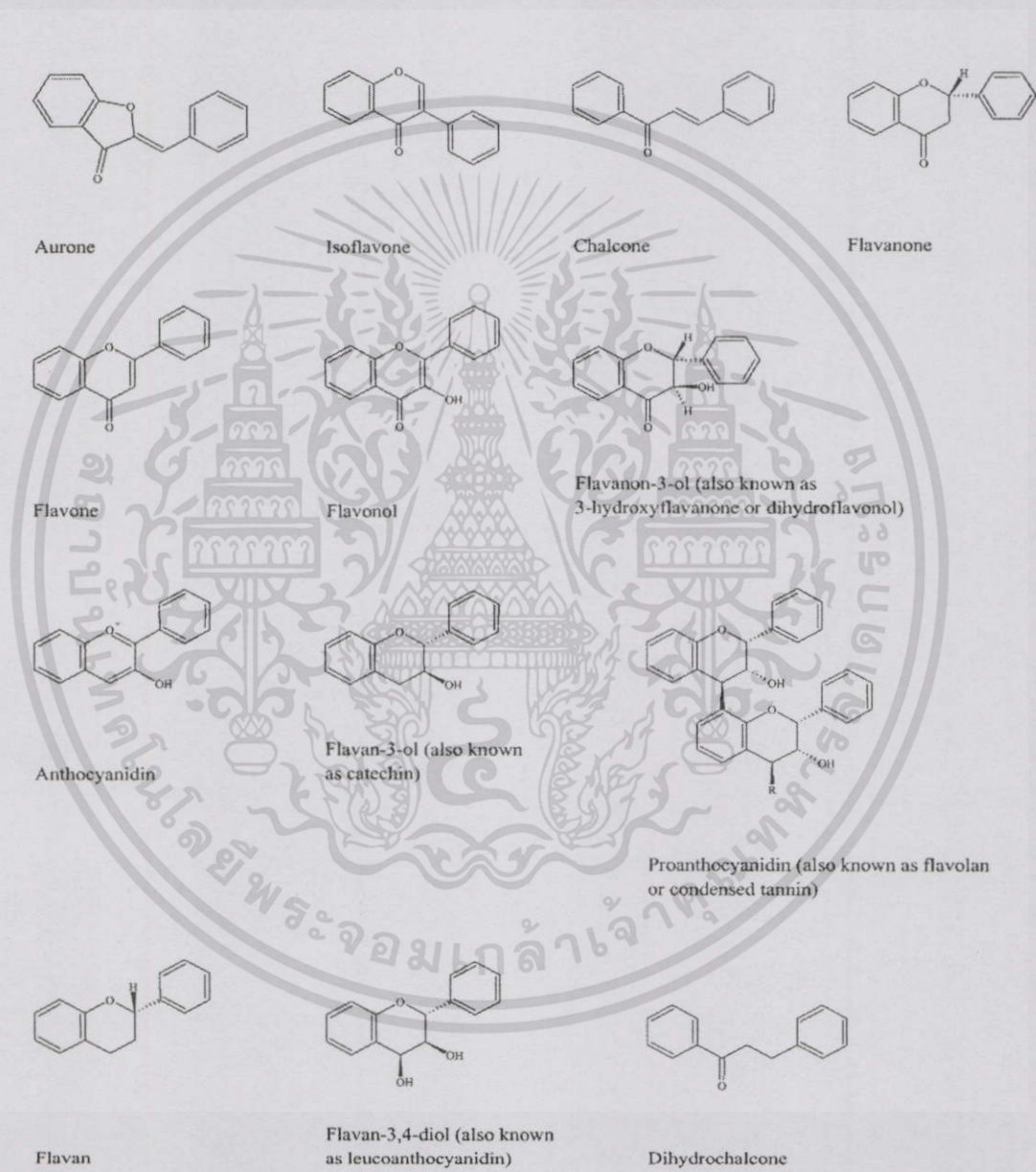
โครงสร้างของสารแอนโทไซยานินประกอบด้วยโมเลกุลที่มีน้ำตาลและโมเลกุลที่ไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ เรียกว่าแอนโทไซยานิดิน ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2 วง เชื่อมกับวงแหวนที่มีคาร์บอน 5 อะตอมกับออกซิเจน 1 อะตอม แอนโทไซยานินแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปดังนี้ ประการแรก คือ จำนวนและชนิดของกลุ่มสารที่ติดกับวงแหวนของแอนโทไซยานินทั้งที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลหรือหมู่เมทอกซี (-OCH₃) ประการที่สอง คือ น้ำตาลที่จัดเรียงตัวเป็นพันธะไกลโคไซด์ (glycoside linkage)

แอนโทไซยานินที่อยู่ในรูปของเม็ดสีที่ละลายน้ำได้ จะให้สีแดง สีม่วงและสีฟ้า พบในใบ ดอก ผลไม้ของต้นไม้รวมทั้งในเหล่าองุ่น มีความคงตัวจึงมีความสำคัญในด้านธุรกิจ นอกจากนี้ยังมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้สารกลุ่มนี้ในทางเภสัชเวช และเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ลดปริมาณคอเลสเตอรอลและต่อต้านการเกิดมะเร็ง

2.6.1.10. ไบฟลาโวนอยด์ (biflavonoids)

ไบฟลาโวนอยด์เป็นไดเมอร์ (dimer) ของสารอะฟิจีนิน โดยมีชีวสังเคราะห์เริ่มจากแซลโคน สามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม ตามแบบการจับกันของโมนอเมอร์ (monomer) โดยสามารถพบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของสารชนิดต่างๆ ในกลุ่มฟลาโวนอยด์

ที่มา : Cushnie และ Lamb. 2005.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 วิธีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (flavonoid biosynthetic pathway)

สำหรับวิถีการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เริ่มจากการรวมตัวของสารมาโลนิลโคเอ (malonyl CoA) 3 โมเลกุล และสารพาราโคมาอิลโคเอ (*p*-coumaroyl CoA) 1 โมเลกุล ด้วยเอนไซม์ แชลโคนซินเทส (chalcone synthase : CHS) ให้ผลผลิตเป็นสาร 4, 2', 4', 6'-Tetrahydroxychalcone เอนไซม์ CHS ประกอบด้วย 2 ส่วนของ polyketide synthase ซึ่งแต่ละส่วนมีน้ำหนักประมาณ 42 KDa ส่วนอีกปฏิกิริยาที่เกิดควบคู่กันของเอนไซม์ CHS โดยมีโคแฟกเตอร์เป็น NADPH จะได้สารในกลุ่มแชลโคน คือ ไอโซลิกวิริทิจินิน (Isoliquiritigenin) แชลโคนทั้ง 2 ชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นออโรน ในขั้นตอนต่อมาเป็นการเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของแชลโคน โดยเอนไซม์แชลโคนไอโซเมอเรส (chalcone isomerase : CHI) ได้สารกลุ่มฟลาวาโนน คือ เนรินจินิน (naringenin) และลิกวิริทิจินิน (liquiritigenin) ต่อมาฟลาวาโนนจะเปลี่ยนเป็น 2-Hydroxy isoflavanone โดยเอนไซม์ไอโซฟลาวอนซินเทส (isoflavone synthase : IFS) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดชัน โดยเอนไซม์ 2-ไฮดรอกซีไอโซฟลาวาโนนดีไฮเดรเทส (2-hydroxy isoflavanone dehydratase : IFD) ได้สารกลุ่มไอโซฟลาวอนอยด์ คือ เจนิสทีอิน (genistein) และไดเซอิน (daidzein) โดยสารกลุ่มนี้จะถูกนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตโรทีนอยด์ (rotenoid) ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นยาฆ่าแมลง นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น เช่น ยาฆ่าหนู ใช้เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor)

จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดชันของเนรินจินินที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 หรือ 3 ได้สารกลุ่มฟลาวอน คือ อะพิจินิน (apigenin) โดยเอนไซม์ฟลาวอนซินเทส (flavone synthase : FNS) ซึ่งเอนไซม์นี้ก็จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น สารฟลาวอนในparsley จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ α -ketoglutarate dependent dioxygenase (FNS I) นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุลเนรินจินินโดยเอนไซม์ flavanone 3-hydroxylase (FHT) เกิดเป็นสารในกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอล คือ ไดไฮโดรเคเอ็มพีรอล (dihydrokaempferol) ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์โดยจะเกิดปฏิกิริยาได้หลายทิศทาง ปฏิกิริยาแรกเป็นการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่ง 3' โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase ได้สารไดไฮโดรเคอร์เซทิน (dihydroquercetin) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารในกลุ่มฟลาวอนอล คือ เคอร์เซทิน (Quercetin) โดยเอนไซม์ flavonol synthase (FLS) นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารฟลาวอน 3,4 ไดออล (flavan-3,4-diols) โดยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) ปฏิกิริยาที่สองเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 โดยเอนไซม์ DFR เกิดสารในกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิน คือ ลิวโคเพลาโกนิน (leucolargonidin) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรดีคเทส เกิดเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน คือ เพลาโกนิน (pelargonidin) โดยเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่น้ำตาลกลูโคสเกิดเป็นสาร pelargonidin 3-glucoside โดยเอนไซม์ UDP-glucose : flavonoid 3-O-glucosyltransferase (FGT) (Cushnie and Lamb, 2005.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 หน้าที่และประโยชน์ของสารฟลาโวนอยด์ในพืช

2.6.3.1 ช่วยในการผสมเกสร

การผสมเกสรเป็นพัฒนาเพื่อดำรงพันธุ์ให้คงอยู่ต่อไป โดยการพัฒนาในส่วนของใบ ดอกมีสีอันสวยงามเพื่อช่วยดึงดูดแมลง ซึ่งสีที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากสารสีที่มีในสารฟลาโวนอยด์

2.6.3.2 ช่วยป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต

รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นรังสีที่มีพลังงานสูง เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต โดยจะขัดขวางการจำลองตัวของดีเอ็นเอ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนหรืออาจถึงขั้นกลายพันธุ์ในธรรมชาติ สารแอนโทไซยานินที่อยู่ภายในเซลล์บริเวณรอบนอกของส่วนต่างๆ ของพืชจะคอยดูดซับหรือกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ตไว้ ทำให้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ไม่ได้รับอันตราย

2.6.3.3 ใช้ในการจัดหมวดหมู่และจำแนกพันธุ์พืช

เนื่องจากสารฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติมีมากมาย นักอนุกรมวิธานจึงได้ใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของสารนี้มาช่วยจำแนกพันธุ์พืช โดยพืชในกลุ่มเดียวกันจะมีสารฟลาโวนอยด์ชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

2.6.3.4. ช่วยดูดซับอนุมูลอิสระ

ทำหน้าที่เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต

2.6.3.5 ต่อด้านเชื้อจุลินทรีย์

ได้มีการศึกษาทดลองสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิด พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ เช่นต่อต้านแบคทีเรีย (Tereschuk และคณะ. 1980) ต่อด้านเชื้อรา (Harborne และ Williams. 1992) และไวรัส (Li และคณะ. 2000) โดยพบการสะสมของสาร 3-deoxyanthocyanidins ในข้าวฟ่างซึ่งแสดงลักษณะเป็นพืชต่อเชื้อก่อโรคพืช (Lo และคณะ. 1998) ข้าวฟ่างสายพันธุ์ที่มี flavan-4-ol สูงสามารถต้านทานเชื้อราได้เพิ่มมากขึ้น (Jambunathan และคณะ. 1990) รูปแบบการสะสมของสารแอนโธไซยานินในพืชมีผลทำให้เชื้อก่อโรคใหม่เข้าทำลายพืชได้แตกต่างกันโดยจะมีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากสารมีคุณสมบัติเป็นไลโปฟิลิก (lipophilic) นอกจากนี้ยังพบว่าสารแอนโทไซยานินจากข้าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas* ได้ (Padmavati และคณะ. 1997)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เครื่องเทศและสมุนไพรประกอบด้วยสารหลายชนิดทั้งอินทรีย์สารวิตามิน แร่ธาตุ เอนไซม์ และเกลือแร่ต่าง ๆ ที่แปรสภาพไปเป็นพลังงาน เพื่อกระตุ้นและแสดงปฏิกิริยาต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อโรคต่าง ๆ ให้หยุดการเจริญเติบโต ตลอดจนส่งเสริมระบบต่าง ๆ ของร่างกายให้มีพลังกำลังสามารถทำงานต่อไปได้เป็นปกติ สมุนไพรบางชนิดเป็นยารักษาโรคเพราะมีประสิทธิภาพใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ บางชนิดใช้ปรุงแต่งกลิ่น รส สีของอาหารและเครื่องดื่มน บางชนิดใช้ถนอมอาหารและบางชนิดใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและน้ำหอมได้

บัญญัติ (2518) ศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องเทศ 27 ชนิด ในการยับยั้งจุลินทรีย์ 33 ชนิด ปรากฏว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนมากที่สกัดจากเครื่องเทศ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้ดีกว่าเครื่องเทศที่ไม่สกัดน้ำมันและน้ำที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน ซึ่งพบว่ากานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* spp. ได้ดีที่สุด กระชายสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizopus* spp. ข่ายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* spp. และ *Rhizopus* spp. ขมิ้นขาวและขมิ้นเหลืองยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ดอกจันทร์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Alternaria* spp. ตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizopus* spp. และ *Penicilium* spp. ใบกะเพราและใบมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cunninghamella* spp. และ *Aspergillus* spp. นอกจากนี้ยังมีใบโหระพา ผิวมะกรูด พริกขี้หนูผลยาว พริกขี้ฟ้า โป๊ยะ ลูกกระวาน ลูกจันทน์ ลูกผักชี ใบสาระแหน่ พริกไทย หัวหอมแดง หัวกระเทียม อบเชย ยี่ห่วย และลูกพริกขี้หนูผลสั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* spp., *Penicilium* spp., *Cunninghamella* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp. และ *Mucor* spp. ได้ เป็นต้น

Morozumi (1978) ศึกษาผลของสาร *O*-Methoxycinnamaldehyde ที่แยกและทำให้บริสุทธิ์ จากอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญ และการผลิตสารพิษ (mycotoxin) ของเชื้อราที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสาร *O*-Methoxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parviticus* และเชื้อ *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. ochraceus* และ *A. vesicolor* ได้ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ยับยั้งการผลิตสารพิษ Aflatoxin B1 ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ยับยั้งการสร้างสารพิษ Ochratoxin ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมและยับยั้งการสร้างสารพิษ Sterigmatocytin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมและสาร *O*-Methoxycinnamaldehyde และยังแสดงผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา dermatophytes 5 ชนิดได้อย่างแรง ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง คือ 3.12 ถึง 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมด้วย

Soliman และ Badeaa (2002) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่มีคุณสมบัติทางยา 12 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการต้านทานต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. parviticus*, *A. ochraceus* และ *Fusarium moniliforme* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากไทม์ (thyme) และอบเชย ที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 500 พีพีเอ็ม ดาวเรือง (marigold) ที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 2000 พีพีเอ็ม สะระแหน่ กะเพราและกายซัม (guyssum) ที่ความเข้มข้น 3000 พีพีเอ็มสามารถยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบได้อย่างสมบูรณ์ คาราเวย์ (caraway) ยับยั้งเชื้อ *A. flavus*, *A. parviticus* ได้ที่ความเข้มข้น 2000 พีพีเอ็ม และยับยั้ง *A. ochraceus* และ *F. moniliforme* ได้ที่ความเข้มข้น 3000 พีพีเอ็ม ยี่ห่วยยับยั้งเชื้อราได้ทุกเชื้อที่ทดสอบที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 500 พีพีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Velluti และคณะ (2003) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย กานพลู ออริกาโน (oregano) พันมาโรส (palmarose) และตะไคร้ ที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อกรัมต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา *Fusarium proliferatum* ในเมล็ดข้าวโพดที่ค่า water activity 0.995 และ 0.950 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. proliferatum* ได้ที่ค่า water activity 0.995 ทั้ง 2 อุณหภูมิ ขณะที่ค่า water activity 0.950 ของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย กานพลูและพันมาโรส เท่านั้นที่มีผลต่อยับยั้งการเจริญของ *F. proliferatum* ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย ออริกาโนและพันมาโรส มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษ FB1 จาก *F. proliferatum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ค่า water activity 0.995 ทั้ง 2 อุณหภูมิ ขณะที่อบเชยและออริกาโน มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษได้อย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Souza และคณะ (2004) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียม (*Allium sativum* L.) อบเชย (*Cinnamomum burnanil* Meissn) กานพลู (*Caryophyllus aromaticus* L.) และไทม์ (thyme) (*Thymus vulgaris* L.) ต่อการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus sp.*, *Penicillium spp.*, *Eurotium repens* และ *Aspergillus niger* ที่แยกได้จากขนมปังบนอาหาร PDA และ CYA 20S โดยพบว่ากระเทียม อบเชย และไทม์ที่ความเข้มข้น 500, 1000, 1500 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ และกานพลูที่ความเข้มข้น 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ไทม์และกระเทียมอาจจะยับยั้งเชื้อราได้ที่ความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่ทดสอบ และน้ำมันหอมระเหยจากการปลูกที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมขึ้นไปยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A.niger*, *Rhizopus spp.* และ *Eurotium repens* และที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium spp.* ได้

Wang และคณะ (2005) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหย จากใบของอบเชย (*Cinnamomum osmophoeum*) 3 โคลน คือ A, B และ C ต่อเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค white rot (5 สายพันธุ์) และ brown rot (4 สายพันธุ์) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบอบเชยโคลน B และ C ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม มีผลยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ทั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค white rot 5 สายพันธุ์และ brown rot 4 สายพันธุ์และโคลน A ยับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค white rot ได้ 71.45 เปอร์เซ็นต์ 1 สายพันธุ์ คือ เชื้อรา *Oligoporus lowei* และเมื่อทดสอบสารประกอบเชิงซ้อนที่จำแนกจากใบของอบเชย พบว่าซินนามอลดีไฮด์ (cinnamal dehyde) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในใบของอบเชยมีผลในการยับยั้งเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ทุกเชื้อที่ทำให้การทดลองทั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคชนิด white rot และ brown rot และยับยั้งเชื้อราได้รุนแรงกว่าเมื่อเทียบกับสารประกอบเชิงซ้อนอื่นๆ ที่จำแนกได้จากใบของอบเชย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Atando และคณะ (2007) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (*Ocimum basilicum*) อบเชย (*Cinnamomum cassia*) coriander (*Coriandrum sativum*) และ bay leaf (*Laurus nobilis*) ต่อการยับยั้งการเจริญ การสร้างเส้นใยและการสร้างสารพิษ aflatoxin ของเชื้อรา *A. paraciticus* CFR 223 โดยทำการผสมน้ำมันหอมระเหยของพืชที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหาร palm kernel broth แล้วทำการถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *A. paraciticus* CFR 223 ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราและอบเชยที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้และทำการแช่เมล็ดข้าวฟ่างในน้ำมันหอมระเหยของพืชทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อรา และยับยั้งการสร้างสารพิษอฟลาทอกซิน (aflatoxin) ได้ 95 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยและ bay leaf ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยได้ แต่สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอฟลาทอกซินได้ 97.92 และ 55.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจาก coriander ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา

Schmelzer และคณะ (1984) ศึกษาช่วงเวลาในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์สารไฟโตอะเล็กซินในถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์ 2 กลุ่มใน mRNA คือ เอนไซม์ในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ (ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส : PAL และ 4-คูมาเรต : โทเอไลเอส ; 4CL) และเอนไซม์ในวิถีเฟลโวนอยด์ (แซลโคชินเทส : CHS) ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อราก่อโรค *Phytophthora megasperma* pv. *glycinae* ในไฮโปคอติลของถั่วเหลืองหรือตอบสนองต่อ elicitor ที่เตรียมจากผนังเซลล์ของเชื้อ *P. Megasperma* pv. *glycinae* พบว่าเอนไซม์ในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ (PAL และ 4CL) และเอนไซม์ของวิถีเฟลโวนอยด์ (CHS) ใน mRNA เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงเวลาเดียวกันที่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากถ่ายเชื้อราเข้าไปในถั่วเหลือง ผลที่ได้แสดงว่าการสังเคราะห์สารไฟโตอะเล็กซิน เป็นกลไกหนึ่งในการชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อก่อโรคโดยการกระตุ้นด้วยยีน

Bell และคณะ (1986) ศึกษาการสะสมของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันต่อเชื้อก่อโรคพืชในปฏิกริยา compatible และ incompatible โดยทำการตรวจสอบการสะสมของฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสและแซลโคชินเทสที่ขาดแคลนของไฮโปคอติลของ dwarf France bean (*Phaseolus vulgaris* L.) และตรวจสอบปฏิกริยาเฉพาะระหว่าง *Phaseolus vulgaris* กับเชื้อรา *Collectotrichum lindemuthinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส พบว่าปฏิกริยา compatible (host resistant) มีการสะสมของฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสและแซลโคชินเทสตรงบริเวณเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ ซึ่งไม่ได้รวมถึงเนื้อเยื่อที่ติดกับบริเวณที่ติดเชื้อ และเริ่มมีการสะสมของสารไฟโตอะเล็กซินและเกิดปฏิกริยาไฮเปอร์เซนซิทิฟริซีสแทนขึ้นตรงบริเวณที่ติดเชื้อ ในขณะที่เดียวกันใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกริยา incompatible (host susceptible) ไม่มีการสะสมของสารฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และแซลโคซินเทส แทนที่จะมีการตอบสนองร่วมกับการสะสมสารไฟโตอะเล็กซินระหว่างจำกัด การเกิดบาดแผล ผลการทดลองแสดงได้ว่าการสะสมของยีนในการป้องกันพืช เป็นองค์ประกอบ สำคัญในการตอบสนองต่อการป้องกันเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผล เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อก่อโรค และการส่ง สัญญาณในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค

Dong และคณะ (1991) ศึกษาวิธีการส่งสัญญาณโมเลกุล เพื่อกระตุ้นยีนในการป้องกัน *Arabidopsis thaliana* ให้ต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยจำแนกคุณลักษณะใน การต้านทานโรค หรืออาการของโรคจากการติดเชื้อ *Pseudomonas syringae* สายพันธุ์ที่ก่อโรค รุนแรงและไม่รุนแรง โดยตรวจสอบการเจริญของเชื้อ และวัดการสะสมของยีนฟีนิลอะลานีน แอมโมเนียไลเอส (PAL) เบต้า-1,3 กลูแคน (BG) และแซลโคซินเทส (CHS) ในใบที่ติดเชื้อ พบว่า *A. thaliana* ที่ติดเชื้อ *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 สายพันธุ์ก่อโรครุนแรง จะมีปริมาณของ เชื้อเพิ่มขึ้น 10^7 เท่า และมีการสะสมของ BG1, BG2 และ BG3 สูงมาก แต่มีการสะสมของยีน PAL เพียงเล็กน้อย ในขณะที่เดียวกัน *A. thaliana* ที่ติดเชื้อ *P. syringae* pv. *tomato* MM 1065 สายพันธุ์ก่อ โรคไม่รุนแรง มีปริมาณของเชื้อที่ใบเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 10^6 เท่า และมีการสะสมของ BG1, BG2 และ BG3 เพียงเล็กน้อย แต่มีการสะสมของยีน PAL เพิ่มขึ้นและไม่มีการสะสมของยีน CHS จากเชื้อ ที่ใช้ทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ และทำการศึกษาคายโอนยีน *avr* จากเชื้อ *P. syringae* สายพันธุ์ MM1065 สายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรงเข้าไปในคั้น *A. thaliana* แล้วทดสอบด้วยเชื้อ *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 สายพันธุ์ก่อโรครุนแรง พบว่ามีการสะสมของยีน PAL มากขึ้น แต่ไม่มีการสะสมของ BG1 และ BG3 แสดงว่ายีน PAL และ BG อาจถูกกระตุ้นให้แสดงออกโดย วิธีการส่งสัญญาณที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

Jakobek และคณะ (1993) ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas syringae* ที่ก่อโรครุนแรงและ ไม่รุนแรงโดยการถ่ายโอนยีน PAL, CHS, CHI และไคตินเนส (CHT) เข้าไปในต้นถั่ว เพื่อให้ตอบ สอนต่อการป้องกันโรคของถั่ว พบว่าต้นถั่วที่ติดเชื้อ *P. syringae* pv. *phaseolicola* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อ โรคไม่รุนแรงจะมีการสะสมของยีน PAL, CHS และ CHI เพิ่มขึ้นถึงชั่วโมงที่ 120 หลังการติดเชื้อ แต่การสะสม CHT จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นถั่วที่ติดเชื้อ *P. syringae* สาย พันธุ์ก่อโรครุนแรงและเมื่อทำการทดสอบให้ต้นถั่วติดเชื้อ *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคไม่รุนแรงที่ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้ต้น ถั่วสุบติดเชื้อ *P. syringae* pv. *tabaci* Pt11528 ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรง พบว่ามีการสะสมของยีน PAL, CHS, CHI และ CHT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นถั่วที่ติดเชื้อ *P. syringae* pv. *tabaci* Pt11528 สายพันธุ์ก่อโรครุนแรงเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้เชื้อ *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 จะถูกยับยั้งด้วยการสะสมของยีน PAL, CHS, CHI และ CHT แล้ว ยังถูกยับยั้งจากสาร ไฟโตอะเล็กซินด้วย เมื่อมีการชักนำด้วยเชื้อ *Escherichia coli* DH5 α หรือ elicitor กลูตาไทโอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงได้ว่าเชื้อ *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 เป็นตัวกระตุ้นกลไกในการสะสมสารในการป้องกันและมีการสังเคราะห์สารไฟโตอะเล็กซินในต้นถั่ว

Maher และคณะ (1994) ศึกษาการเพิ่มความไวต่อโรค ด้วยการยับยั้งการผลิตสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ พบว่ายาสูบแปลงพันธุ์ที่ถูกยับยั้งเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสในชีวสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ ส่งผลให้ระดับของกรดคลอโรจีนิก ซึ่งเป็นสารหลักในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ในใบยาสูบลดลง ส่งผลให้บาดแผลปรากฏให้เห็นเร็วขึ้นและแพร่กระจายมากกว่าในต้นยาสูบปกติหลังจากติดเชื้อรา *Cercospora nicotianae* ที่ก่อโรครุนแรง ซึ่งจากการตรวจสอบโดยตรงแสดงให้เห็นว่าการผลิตสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ช่วยยับยั้งการเกิดโรค ดังนั้นการเพิ่มความไวต่อโรคไม่มีผลกระทบต่อการตอบสนองต่อการยับยั้งที่ถูกชักนำจากเชื้อก่อโรค แต่จะมีผลต่อการสะสมของกรดคลอโรจีนิก

Volko และคณะ (1998) จำแนกต้น *Arabidopsis* กลายพันธุ์ที่มีความไวต่อโรคสูงที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *Es4326* ด้วยวิธีการคัดเลือกโดยตรง โดยคัดเลือก *Arabidopsis* ที่มีความไวต่อโรคสูง ได้ 6 สายพันธุ์จาก 11 สายพันธุ์ คือ *npr1-4*, *eds5-2*, *eds10-1*, *eds11-1*, *eds12-1* และ *eds13-1* พบว่า *Arabidopsis* ทั้ง 6 สายพันธุ์มีการแสดงรูปแบบในการเพิ่มความไวต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืชและเชื้อราก่อโรคพืช *Erysiphe orontii* แตกต่างกัน แสดงว่า EDS ยีนมีบทบาทในการต้านทานเฉพาะกับเชื้อก่อโรคแต่ละชนิด และ *Arabidopsis* ทั้ง 6 สายพันธุ์ยังสามารถตอบสนองต่อปฏิกริยาไฮเปอร์เซนซิทีฟ (HR) และสามารถจำกัดการเจริญของเชื้อ *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326/avrRpt2 สายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรงได้ *Arabidopsis* สายพันธุ์ *npr1-4* สามารถตอบสนองต่อระบบต้านทาน (SAR) ได้ แม้ว่าเชื้อ *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 ยังคงเจริญบนใบของพืชที่มีการชักนำให้ระบบต้านทานทำงานได้ ผลการทดลองแสดงได้ว่ายีน *eds* มีผลต่อการจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และการคัดเลือกพืชกลายพันธุ์ที่ไวต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิถีการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคในพืช

Felton และคณะ (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระบบต้านทานของพืชต่อเชื้อจุลินทรีย์และหนอนแมลงศัตรูพืช พบว่าการลดชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบโดยการยับยั้งการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (*PAL*) ส่งผลให้ยาสูบแปลงพันธุ์มีความไวต่อเชื้อราก่อโรครุนแรงเพิ่มขึ้น และส่งผลให้ระบบต้านทานต่อเชื้อไวรัสยาสูบในต้นยาสูบแปลงพันธุ์ลดลง ขณะที่ต้นยาสูบที่มีการแสดงออกของยีน *PAL* สูงจะมีผลทำให้ระบบต้านทานเพิ่มมากขึ้นและพบว่าหนอนแมลงศัตรูพืช (*Heliothis virescens*) สามารถต้านทานยาสูบที่มีการแสดงออกของยีน *PAL* สูงได้ ซึ่งหนอนแมลงศัตรูพืชของต้นยาสูบที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *PAL* จะมีอัตราการตายที่สูงกว่าต้นยาสูบที่มีการแสดงออกของยีน *PAL*

Li และ Steffens (2002) ศึกษาการแสดงออกของสารโพลีฟีนอลออกซิเดสในมะเขือเทศแปลงพันธุ์เพื่อเพิ่มการต้านทานโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* โดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายโอนยีนโพลีฟีนอลออกซิเดสที่แสดงออกสูง จาก cDNA ของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) ภายใต้การควบคุมของ 35S โปรโมเตอร์เข้าสู่ต้นมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Monky Maker) พบว่ามีการแสดงออกของยีนโพลีฟีนอลออกซิเดสในต้นมะเขือเทศแปลงพันธุ์เพิ่มสูงขึ้น 30 เท่าและกิจกรรมของยีนโพลีฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้น 5 ถึง 10 เท่าและพบว่ามะเขือเทศที่มีการแสดงออกของยีนโพลีฟีนอลออกซิเดสสูงแสดงการต้านทานต่อเชื้อ *P. syringae* pv. tomato ได้ดีมาก ซึ่งเป็นการลดความรุนแรงของโรคโดยลดจำนวนบาดแผลลงกว่า 15 เท่า และยังยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีมาก ซึ่งปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในใบมะเขือเทศลดลงกว่า 100 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับพืชควบคุม

Mengiste และคณะ (2003) ศึกษาการจำแนกยีน *BOS1* (BOTRYTISUS CEPTIBLE1) ที่ถ่ายโอนเข้าไปใน T-DNA ต้น *Arabidopsis* เพื่อเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อ *Botrytis* ซึ่งยีน *BOS1* ยังมีผลต่อการจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคอื่นๆ ด้วย เช่น เชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยทั่วไปพืชจะใช้ยีนนี้ในการต่อต้านเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ยีน *bos1* ยังมีผลทำให้อาการของโรคแสดงออกเพิ่มขึ้น การเจริญของเชื้อราในพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *bos1* จะเหมือนกับพืชปกติที่ติดเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. tomato และ *Peronospora parasitica* แต่พืชจะทนต่อความแห้งแล้งได้น้อยลง ทำให้เกิดสภาวะดินเค็มและปฏิกิริยาออกซิเดทีฟเพิ่มขึ้น การติดเชื้อ *Botrytis* จะชักนำให้ยีน *BOS1* แสดงออก โดยยีน *BOS1* จะถอดรหัสร่วมกับ R2R3MYB เพื่อสร้างโปรตีนและส่งสัญญาณให้พืชตอบสนองต่อสภาวะเครียดทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต

Shadle และคณะ (2003) ศึกษาสารประกอบฟีนอลโพรพานอยด์ และการต้านทานโรคในยาสูบแปลงพันธุ์ด้วยการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส พบว่ายาสูบแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (*PAL*) สูง จะมีการสร้างกรดคลอโรจีนิกในระดับที่สูงด้วย และทำให้ความไวต่อการติดเชื้อราก่อโรค *Cercospora nicotianae* ลดลงอย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถต้านทานโรคจากเชื้อไวรัสยาสูบได้ ระดับการส่งสัญญาณโมเลกุลของกรดซาลิไซลิก (SA) ในยาสูบแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ *PAL* สูงและพืชควบคุมหลังจากติดเชื้อไวรัสไม่แตกต่างกัน ในทางตรงกันข้ามเมื่อถ่ายโอนยีน *PAL* ที่มีการแสดงออกสูงเข้าต้นยาสูบที่เคยได้รับการถ่ายโอนยีน *NahG* salicylic hydroxylase กลับทำให้สูญเสียการต้านทานเชื้อต่อเชื้อไวรัส แสดงว่า SA เป็นจุดเปลี่ยนในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสยาสูบ และการสร้างสารประกอบฟีนอลโพรพานอยด์เพิ่มขึ้น เช่น กรดคลอโรจีนิก ซึ่งไม่มีผลในการทำให้ SA ลดลง ในทางตรงกันข้ามยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *NahG* และยีน *PAL* ที่มีการแสดงออกสูงสามารถลดความไวต่อเชื้อรา *C. nicotianae* ได้อย่างแรงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *NahG* เพียงอย่างเดียว ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาบทบาทของยีน *PAL* ในชีวิตเกาะที่ SA ใน *Arabidopsis* และความสำคัญของสารประกอบฟีนอลโพรพานอยด์ เช่น กรดคลอโรจีนิกในการต้านทานโรคของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bednarek และคณะ (2005) ศึกษาาระดับสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของไอโดลิก และฟีนิลโพรพานอยด์โดยนำรากของต้น *Arabidopsis* ปกติและต้นแปลงพันธุ์ที่ติดเชื้อ *Pythium sylvaticum* มาวิเคราะห์เพื่อแยกโครงสร้างของสารเมแทบอลิต์ด้วยเครื่อง mass spectrometry และ nuclear magnetic resonance จากการสกัดสารจากรากของ *Arabidopsis* ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ สามารถแยกสารประกอบในกลุ่มไอโดลิกได้ 16 ชนิด เฮเตอโรไซคลิก 1 ชนิดและฟีนิลโพรพานอยด์ 3 ชนิด และพบว่าปริมาณของสารในกลุ่มไอโดลิกเกือบทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมากในพืชที่ติดเชื้อ ขณะที่ปริมาณของสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ทั้ง 3 ชนิดลดลง เมื่อตรวจสอบปริมาณของสารจาก mRNA ทั้งไอโดลิกและฟีนิลโพรพานอยด์พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้น แสดงว่าสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ทั้ง 3 ชนิดสลายไปในการสกัด

Kortekamp. 2006. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันในต้นองุ่น สายพันธุ์ที่ใช้ทำไวน์ (grapevine) หลังจากถ่ายเชื้อ *Plasmopara viticola* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในองุ่นและเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคราน้ำค้าง (downy mildew) ในแตงกวา โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัส PR protein และยีนในเมแทบอลิซึมของฟีนิลโพรพานอยด์ เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการป้องกันระหว่างองุ่นสายพันธุ์ที่ไวต่อเชื้อโรค (Riesling) และสายพันธุ์ต้านทานต่อโรค (Gloire) พบว่าองุ่นสายพันธุ์ Gloire หลังจากติดเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการป้องกันบางยีนเท่านั้น ในขณะที่เดียวกันองุ่นสายพันธุ์ Riesling หลังจากติดเชื้อก่อโรค *P. cubensis* มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการป้องกันจำนวนมากในเวลา 48 ชั่วโมงแรก ประกอบด้วยยีน PR-2, PR-3, PR-4 และ PGTP และยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์ในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (*DFR*, *F3H* และ *LDOX*) แต่ไม่มีการแสดงออกของยีนต่างๆ ในใบของต้นองุ่นที่ติดเชื้อ *P. viticola*

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. หลอดทดลอง (test tube) จากบริษัท Pyrex
2. เข็มเย็บ (needle)
3. ลูป (loop)
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar airflow) จากบริษัท Issco รุ่น BTV 123
5. ผ้าขาวบาง (gauze)
6. สำลี (cotton)
7. กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper no.1) จากบริษัท Whatman
8. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer) จากบริษัท Bosco
9. จานเพาะเชื้อ (petri dish) จากบริษัท Pyrex
10. เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Digital vernier caliper) จากบริษัท Shimazu
11. ปากคีบ (forceps)
12. บีกเกอร์ (bigger) จากบริษัท Pyrex
13. ปิเปตต์ (pipette) จากบริษัท Pyrex
14. กระจกบอควง (cylinder) จากบริษัท Pyrex
15. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) จากบริษัท Pyrex
16. ขวดเตรียมอาหาร (duran) จากบริษัท Pyrex
17. หม้ออ่างไอน้ำ (water bath) จากบริษัท Memmert
18. เครื่องชั่ง (balance) จากบริษัท Mettler
19. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) จากบริษัท Olympus
20. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) จากบริษัท TOMY
21. เครื่องกลั่นสุญญากาศ (rotary evaporation) จากบริษัท Buchi
22. ฟลาสก์ก้นกลม (evaporator flask) จากบริษัท Pyrex
23. ฟลาสก์รูปชมพู่ (erlenmeyer flask) จากบริษัท Pyrex
24. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) จากบริษัท GAST
25. แผ่นให้ความร้อน (hot plate) จากบริษัท GEM
26. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) จากบริษัท Hettich

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27. เครื่องทำพีซีอาร์ จากบริษัท มอนโคเทค ประเทศไทย จำกัด

28. เครื่องรันเจล

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เกรควิเคราะห์
2. คลอโรฟอร์ม เกรควิเคราะห์
3. อะซีโตน เกรควิเคราะห์
4. กรดไฮโดรคลอริก
5. แมกนีเซียมคลอไรด์
6. ฟีนอล
7. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. Potato Dextose Agar (PDA) จากบริษัท Scharlau
2. Potato Dextose Broth (PDB) จากบริษัท Scharlau
3. Nutrient Agar (NA) จากบริษัท Scharlau
4. Luria-Bertani (LB) จากบริษัท Scharlau
5. Murashige-Skoog medium (MS)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB
7. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC
8. อาหารชักนำให้เกิดแคลัสของยาสูบ
9. อาหารชักนำให้เกิดยอดของยาสูบ
10. อาหารชักนำให้เกิดรากของยาสูบ

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 *Aspergillus flavus* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.2 *Aspergillus paraciticus* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.3 *Aspergillus niger* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.4 *Alternaria alternata* TISTR826 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2.5 *Fusarium moniliforme* TISTR726 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศไทย (วว.)

3.2.6 *Rhizopus spp.* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.7 *Sclerotium roftsii* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.8 *Tricoderma spp.* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.9 *Agrobacterium tumefaciens* TISTR 503 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2.10 *Corynebacterium aquaticum* TISTR768 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2.11 *Pseudomonas syringae* pv. *sesami* TISTR909 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2.12 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* TISTR 823 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง คือ อบเชย (*Cinnamomum zelanicum* M.)

3.4 พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้ในการทดลอง

พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นต้นยาสูบ 4 สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* จากห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยาของพืช ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 อิทธิพลของผงอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

3.5.1 การเตรียมสปอร์เชื้อรา มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เชื้อเชื้อจากอาหาร PDA slant ที่มีการเจริญ 7 วัน ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหาร PDA ประมาณ 200 มิลลิลิตร ให้เชื้อมีการเจริญ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
2. ทำสารละลายสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วผสม tween 80 เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้รูปเชื้อให้หลุดออกจากอาหาร แล้วนำสารละลายสปอร์ที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำสารละลายสปอร์ที่กรองได้นับจำนวนสปอร์ด้วยสไลด์นับเซลล์ให้มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.2 การทดสอบผลของอบเชยโดยผสมผงอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

ใช้ผงอบเชยผสมกับอาหารสูตร PDA สำหรับเชื้อราหรืออาหารสูตร NA สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0, 200, 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร นำแผ่น paper disc วางบนอาหารและหยดเชื้อรา (10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร) และแบคทีเรีย (10^6 และ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิเมตร) ที่ก่อให้เกิดโรคพืชปริมาณ 10 ไมโครลิตร วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญเติบโตของเชื้อทุกวันเป็นเวลา 5 วัน

3.6 การทดสอบอิทธิพลของสารสกัดจากอบเชยด้วยเอทานอลต่อเชื้อก่อโรคพืช

3.6.1 วิธีสกัดสมุนไพร

วิธีการสกัดอบเชยเลือกการสกัดแบบ maceration โดยดัดแปลงจากวิธีของ พรทิพย์ ชมภูมิ่ง (2536) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. บดสมุนไพรด้วยเครื่องบด
2. ชั่งน้ำหนักให้ได้ 300 กรัม
3. สกัดสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ใส่ให้ท่วมสมุนไพร แช่เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
4. เมื่อครบกำหนดนำมากรองกากสมุนไพรออกด้วยผ้าขาวบาง และนำของเหลวที่กรองได้มากรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำของเหลวที่ผ่านกระดาษกรองมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50- 60 องศาเซลเซียส

3.6.2 การทดสอบสารสกัดอบเชยต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

นำแผ่น paper disc วางลงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคพืช หยดสารสกัดอบเชยที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 200, 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรและหยดเชื้อรา (10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร) และแบคทีเรีย (10^6 และ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิเมตร) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งในตู้เขี่ยเชื้อประมาณ 1 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญเติบโตของเชื้อทุกวันเป็นเวลา 5 วัน

3.7 การโคลนยีน *PAL2* จาก *Arabidopsis thaliana*

3.7.1 การโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

ทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PAL2* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ ดังนี้

cDNA จาก <i>Arabidopsis thaliana</i>	1.00	ไมโครลิตร
10X ExTaq buffer	5.00	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM)	5.00	ไมโครลิตร
dNTP	1.00	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1.00	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์	1.00	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Taq DNA polymerase)	0.25	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว	35.75	ไมโครลิตร

สำหรับสภาวะในการทำปฏิกิริยาของพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นให้ไพรเมอร์เข้าจับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย (annealing) ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และการเข้าเติมสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ โดยการทำงานของเอ็นไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีลำดับเบสดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5' -TTA GCA AAT CGG AAT CGG AGC TCC- 3'

รีเวิร์สไพรเมอร์ 5' -GGA GTC CCG ATT CCG ATT TGC TAA- 3'

นำส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปตรวจสอบขนาด โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลและทำให้บริสุทธิ์

3.7.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ (ligation)

ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยการทำพีซีอาร์ที่ทำการตรวจสอบขนาดแล้ว เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเวกเตอร์ที่ใช้คือ pGEM ที่มีปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อ ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์	3.25	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM	0.75	ไมโครลิตร
2x ligation buffer	5.00	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1.00	ไมโครลิตร

(3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์เข้าสู่ *E. coli* โดยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณของยีน *PAL2* และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) และ X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Galactopyranoside) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนและสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.7.3 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกอยู่

คัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการใช้นิวคลีโอไทด์จำเพาะ *XbaI* มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	2	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.3	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6.6	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.7.4 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้ว เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 โดยมีปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดังนี้

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	3.00	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pBI121	3.00	ไมโครลิตร
10X ligation buffer	7.50	ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกส ชนิด T4 (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.50	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณ โดยการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อเข้าสู่ *E. coli* ทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วจึงสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่คัดเลือกได้

3.7.5 การสกัดพลาสมิด

1. คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วสเปรดด้วย IPTG และ X-gal ถ่ายโคโลนีดังกล่าวลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหย้าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. นำสารแขวนลอยของเซลล์ใส่หลอดเอฟเฟนดรอพ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์
3. เทส่วนของอาหารทิ้งแล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางหลอดบนน้ำแข็ง
4. เติม solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที
5. เติม solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที
6. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ย้ายส่วนของเหลวด้านบนใส่ลงในหลอดเอฟเฟนดรอพหลอดใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ
8. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที
9. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลด้านบนทิ้ง
10. ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
11. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลด้านบนทิ้ง
12. ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยใช้เซซิเคเตอร์ ภายใต้แรงดันสูญญากาศ
13. ละลายดีเอ็นเอด้วย สารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่มี RNase ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
14. เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.7.6 การตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพลาสมิด

การตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด โดยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยมีสภาวะการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

10X buffer E	1.00	ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ชนิด <i>Hind</i> III (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.10	ไมโครลิตร
พลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก	3.00	ไมโครลิตร
BSA	0.10	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว	5.80	ไมโครลิตร

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แยกออกจากพลาสมิดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อทำการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับโปรโมเตอร์ คือ มีทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ (sense) และทิศทางตรงกันข้ามกับโปรโมเตอร์ (antisense) จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล แล้วทำให้บริสุทธิ์

3.8 การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียสำหรับการถ่ายโอนเข้าสู่ต้นพืช (กนกพร, 2546)

3.8.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิตรซึ่งมียาปฏิชีวนะคานามัยซิน เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.8.2 นำสารละลายเชื้อดังกล่าววางบนน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.8.3 เทส่วนใสที่นำตะกอนเซลล์ละลายในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง

3.8.4 นำเซลล์แขวนลอยในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และผสมพลาสมิด pBI 121 ที่มียีน *PAL2* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้ไปเปิดหลอดขึ้นลงเบาๆ บนน้ำแข็ง

3.8.5 นำสารละลายนี้แช่ในไนโตรเจนเหลวจนกระทั่งเป็นน้ำแข็ง นำหลอดดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

3.8.6 เดิมอาหารสูตร LB 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.8.7 นำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.8.8 นำตะกอนเซลล์แขวนลอยปริมาตร 200 ไมโครลิตร สเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน บ่มเป็นเวลา 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้ *Agrobacterium* (กนกพร, 2546)

ถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ที่มีส่วนของยีน *PAL2* แทรกอยู่ในบริเวณของ T-DNA เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 นำอะโกรแบคทีเรียที่ได้ถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบ

3.9.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน นานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3.9.2 นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าประมาณ 0.8

3.9.3 นำสารละลายเชื้อ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.9.4 นำตะกอนเซลล์แขวนลอยมาเติมสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์

3.9.5 ตัดใบยาสูบที่ปราศจากเชื้อขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร แช่ลงในเซลล์แขวนลอยประมาณ 30 ถึง 60 วินาที

3.9.6 นำใบยาสูบจากขั้นตอนที่ 3.15.5 วางบนเพลท ที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อ

3.9.7 นำใบยาสูบวางบนอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส บ่มใต้แสงไฟ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.9.8 ย้ายใบยาสูบลงอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนซิลิน และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน เพื่อฆ่าอะโกรแบคทีเรีย และคัดเลือกใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

3.9.9 เลี้ยงเนื้อเยื่อจนเกิดเป็นแคลลัส แล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดยอดที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนซิลิน และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน เลี้ยงจนแคลลัสเกิดเป็นยอด

3.9.10 คัดเลือกยอดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน ย้ายลงอาหารแข็ง MS สูตรปกติที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และคัดเลือกยอดที่เกิดราก ซึ่งคาดว่าจะเป็ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

3.10 การวิเคราะห์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน (กนกพร, 2546)

3.10.1 ใส่ใบยาสูบ 50- 100 มิลลิกรัมในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 150 ไมโครลิตร

3.10.2 ใช้แท่งแก้วบดให้ละเอียดจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน

3.10.3 เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 150 ไมโครลิตร และสารละลายผสม phenol/chloroform/ iso amylalcohol 450 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาและเขย่าประมาณ 1 นาที

3.10.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.10.5 นำสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา

3.10.6 วางไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที

3.10.7 เทของเหลวทิ้ง ล้างตะกอน (platelet) ข้างล่างหลอดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 500 ไมโครลิตร

3.10.8 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3.10.9 เทของเหลวทิ้ง และทำให้แห้ง (คว่ำบนกระดาษซับที่สะอาด)

3.10.10 ละลายตะกอนใน $\frac{1}{2}$ TE ซึ่งมี RNase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร

3.10.11 นำสารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร มาหยกใน 0.7 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล เพื่อดู ปริมาณดีเอ็นเอ

3.11 การทดสอบการตอบสนองของต้นยาสูบแปลงพันธุ้ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

3.11.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบหลังจากได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทรีทเมนต์ คือ ต้นยาสูบปกติและยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ ยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* ที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช เริ่มโดยการนำชิ้นส่วนของใบยาสูบจากต้นยาสูบปกติและยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรชักนำให้เกิดยอด แล้วนำยอดยาสูบชนิดต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ปกติในสภาวะห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการฉีดเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (วัดค่า OD 660 ให้ได้ 0.1 สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และนับจำนวนสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรสำหรับเชื้อรา) ที่โคนต้นยาสูบแต่ละชนิด ทำการทดลองชนิดละ 6 ซ้ำ ส่วนทรีทเมนต์ควบคุม คือ ต้นยาสูบปกติและยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ฉีดน้ำกลั่นที่สเตรอไรค์ 1 มิลลิลิตร นำต้นยาสูบทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน บันทึกผลการตอบสนองของต้นยาสูบต่อเชื้อจุลินทรีย์

3.11.2 ศึกษาปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

ทำการตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง โดยทำการชั่งน้ำหนักใบยาสูบ 0.05 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวในหลอดทดลอง เติมอะซีโตน 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ตามวิธีของ Shabala. (1999) และ Lichtenthaler. (1987) ทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

สูตรคำนวณ

$$\text{ChloA} = \frac{(9.784 \times \text{OD662}) - (0.99 \times \text{OD644})}{0.05} \quad (\text{A})$$

$$\text{ChloB} = \frac{(21.428 \times \text{OD644}) - (4.65 \times \text{OD662})}{0.05} \quad (\text{B})$$

$$\text{Caro} = \frac{(\text{OD470} \times 1000) - (1.9 \times \text{A}) - (63.14 \times \text{B})}{214} \quad (\text{C})$$

$$= \frac{\text{C}}{0.05}$$

Chlo A = Chlorophyll A

Chlo B = Chlorophyll B

Caro = Carotenoid

3.12 การตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์

เพื่อการตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณสารในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ของต้นยาสูบแปลงพันธุ์หลังจากได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช โดยการบดใบต้นยาสูบด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดด้วยสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกต่อเมทานอล ต่อน้ำ นำมาตรวจสอบปริมาณสารแต่ละตัวในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของสารแต่ละชนิดในกลุ่มเฟลโวนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วจึงเปรียบเทียบปริมาณสารของต้นยาสูบ โดยใช้ระดับความเข้มข้นสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ผลของสารสกัดจากผงอบเชยต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

4.1.1 ผลของผงอบเชยที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาผลของผงอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 200, 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร PDA (สำหรับเชื้อรา) และ NA (สำหรับเชื้อแบคทีเรีย) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จำนวน 12 ชนิดที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (สำหรับเชื้อรา) และ โคลิฟอร์มต่อมิลลิลิตร (สำหรับเชื้อแบคทีเรีย) โดยการวัดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญ ได้ผลดังต่อไปนี้

4.1.1.1 เชื้อ *Aspergillus flavus*

ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* (รูปที่ 4.1ก และ 4.1ข)

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ เจริญ อังนราฤทธิ์ และคณะ (2527) ซึ่งทดสอบสมุนไพรมะขาม 5 ชนิด ได้แก่ ข่า ขมิ้นชัน ทองพันชั่ง กระชาย และอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหนึ่งโดยวิธี agar disc diffusion พบว่าสารสกัดจากน้ำแทบจะไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แต่ก็ไม่ใช่ว่าสมุนไพรมานาทดลองจะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสาเหตุหลายประการ เช่น วิธีการที่ใช้ทดสอบ ระยะเวลาที่เก็บสมุนไพรมานาทดลอง การเก็บรักษาสมุนไพรมานาทดลองและความเข้มข้นที่ทดสอบ เป็นต้น Mahmoud (1999) ศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรมานาทดลองที่สกัดด้วยน้ำ ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสัดส่วนของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารสกัดโดยตรง

4.1.1.2 เชื้อ *Aspergillus paraciticus*

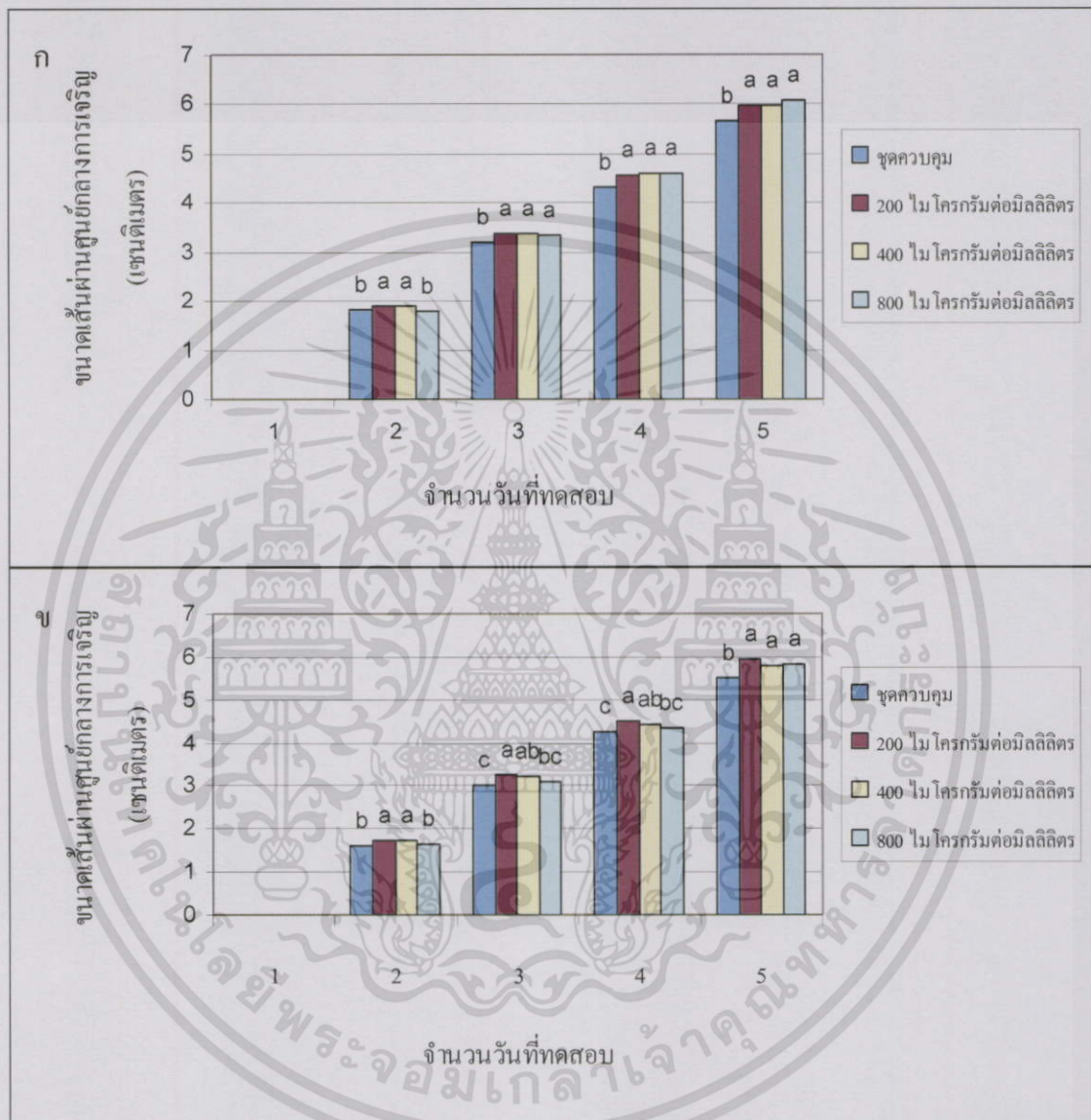
ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. paraciticus* (รูปที่ 4.2ก และ 4.2ข)

4.1.1.3 เชื้อ *Aspergillus niger*

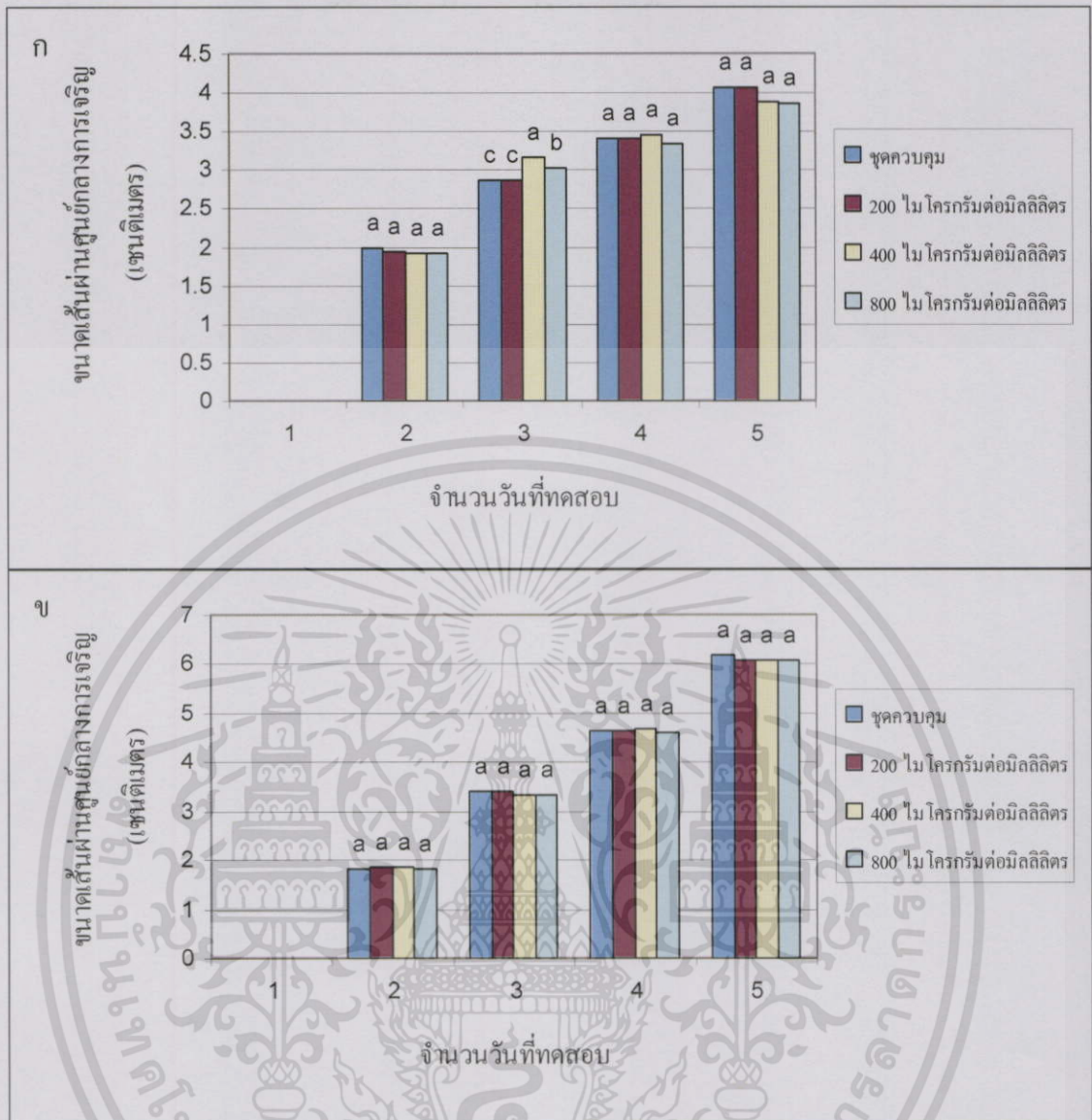
ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรได้ แต่ในวันที่ 3-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและในวันที่ 2 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

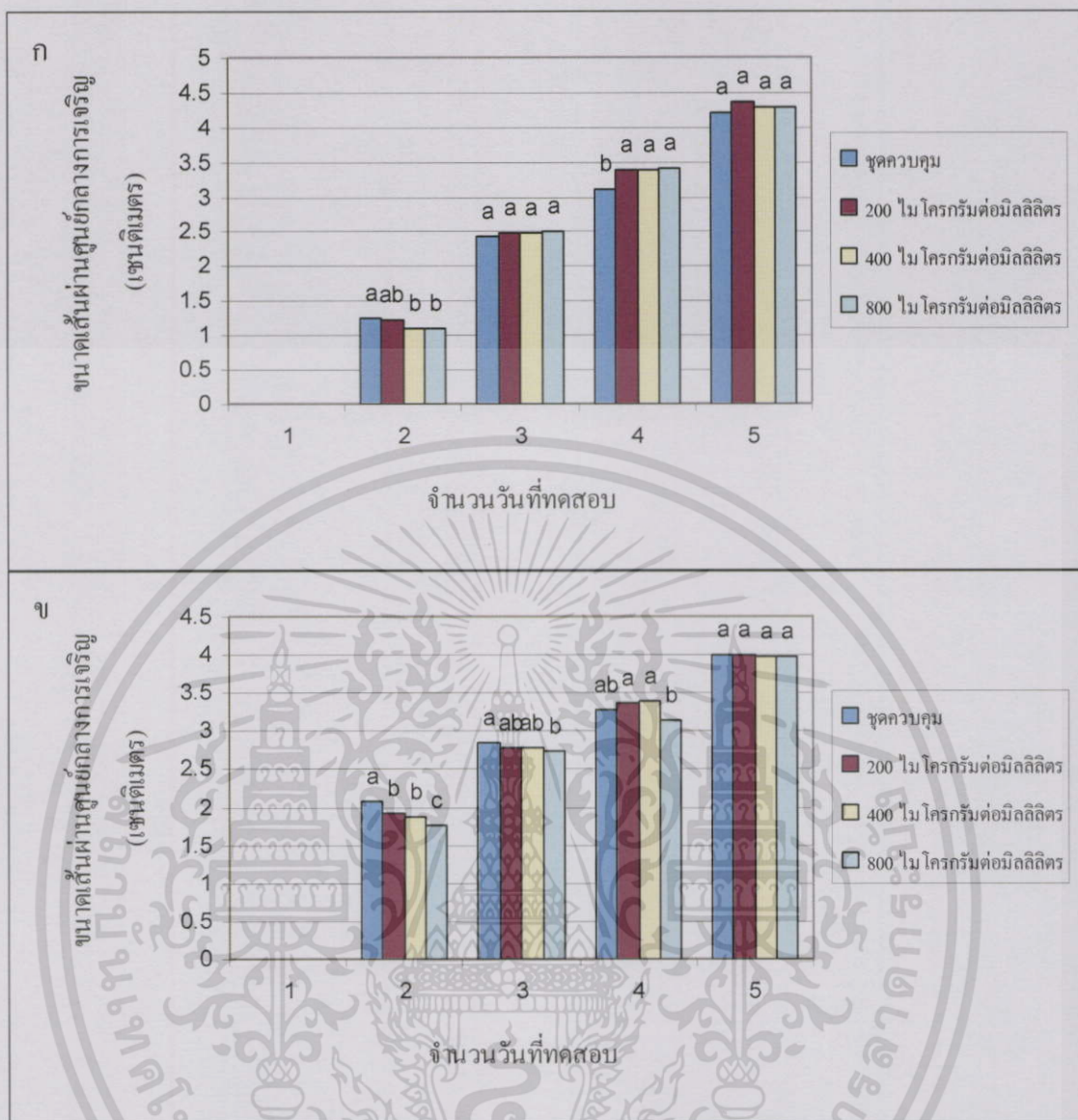
อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 3-4 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้นของอบเชยทุกระดับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (รูปที่ 4.3ก และ 4.3ข)



รูปที่ 4.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. flavus* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วันจำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน



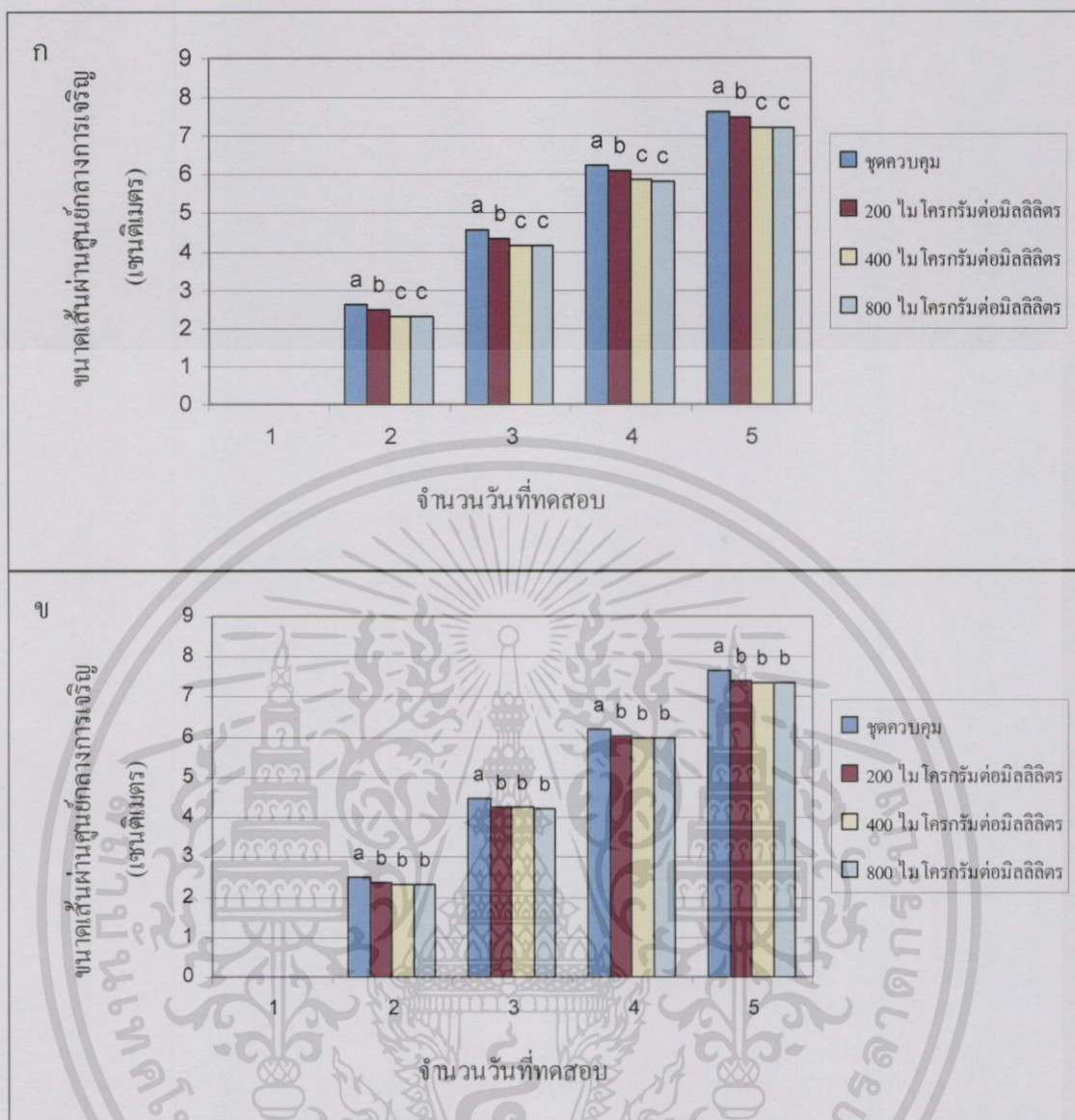
รูปที่ 4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. paraciticus* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน



รูปที่ 4.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. niger* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

4.1.1.3 เชื้อ *Alternaria alternata*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. alternata* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.4ก และ 4.4ข)

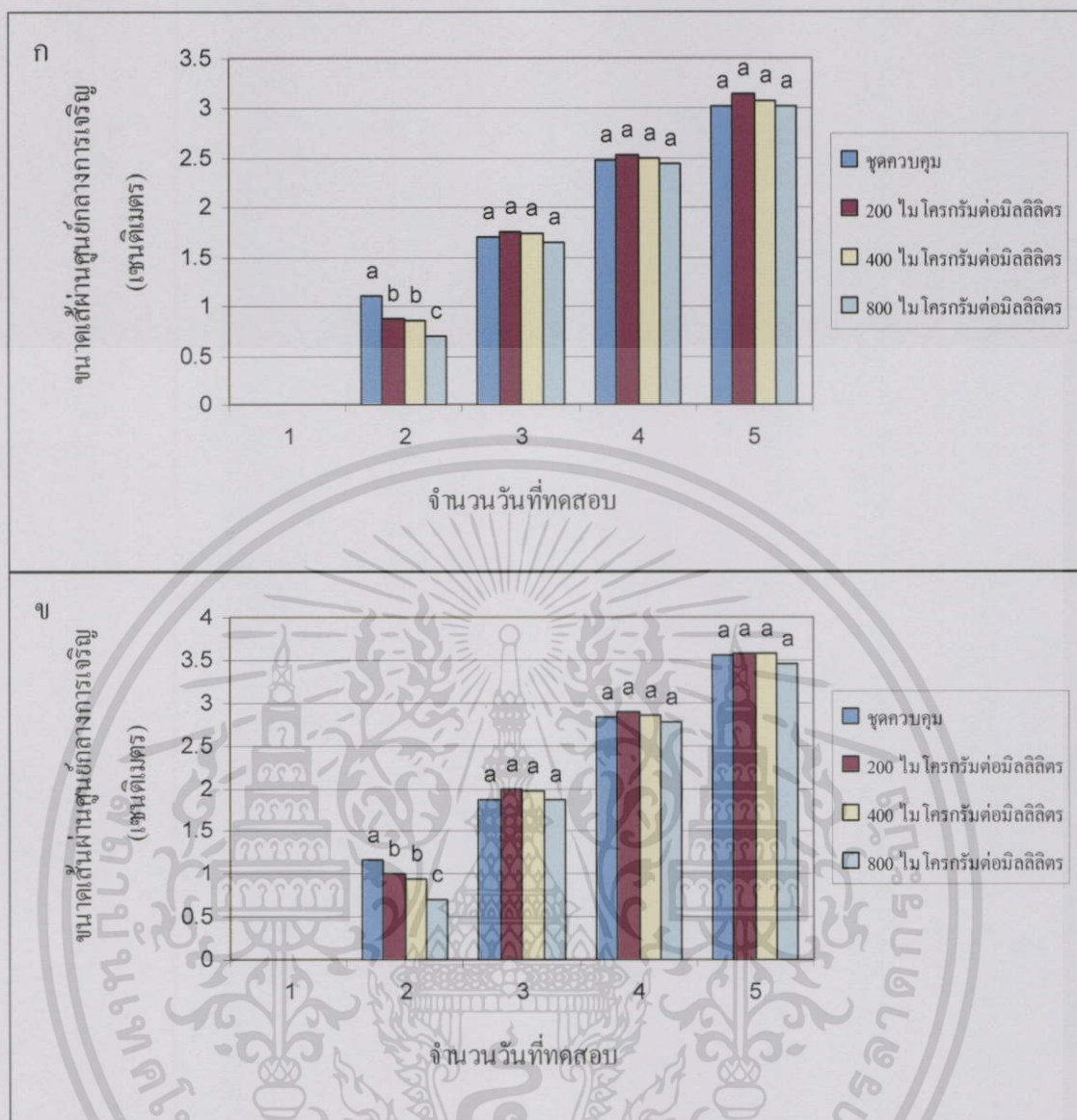


รูปที่ 4.4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. alternata* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

4.1.1.5 เชื้อ *Fusarium moniliforme*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. moniliforme* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 3-5 ที่ความเข้มข้นของอบเชยทุกระดับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (รูปที่ 4.5ก และ 4.5ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



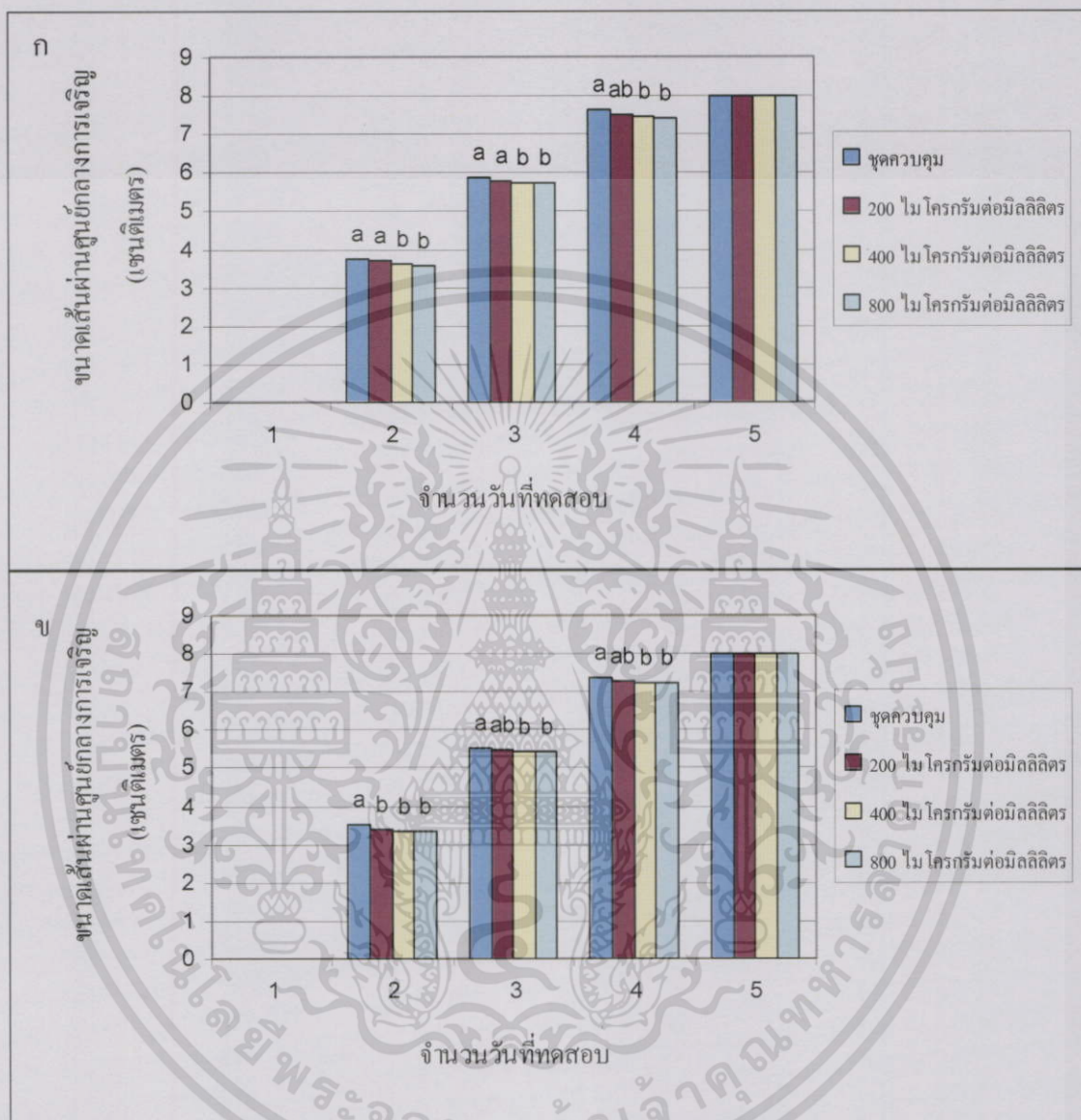
รูปที่ 4.5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *F. moniliforme* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

4.1.1.6 เชื้อ *Rhizopus* spp.

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-4 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizopus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรได้ และในวันที่ 2 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizopus* spp. ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรได้อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 3-4 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 400-800

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 5 เชื้อเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงไม่สามารถบอกความแตกต่างทางสถิติ (รูปที่ 4.6ก และ 4.6ข)

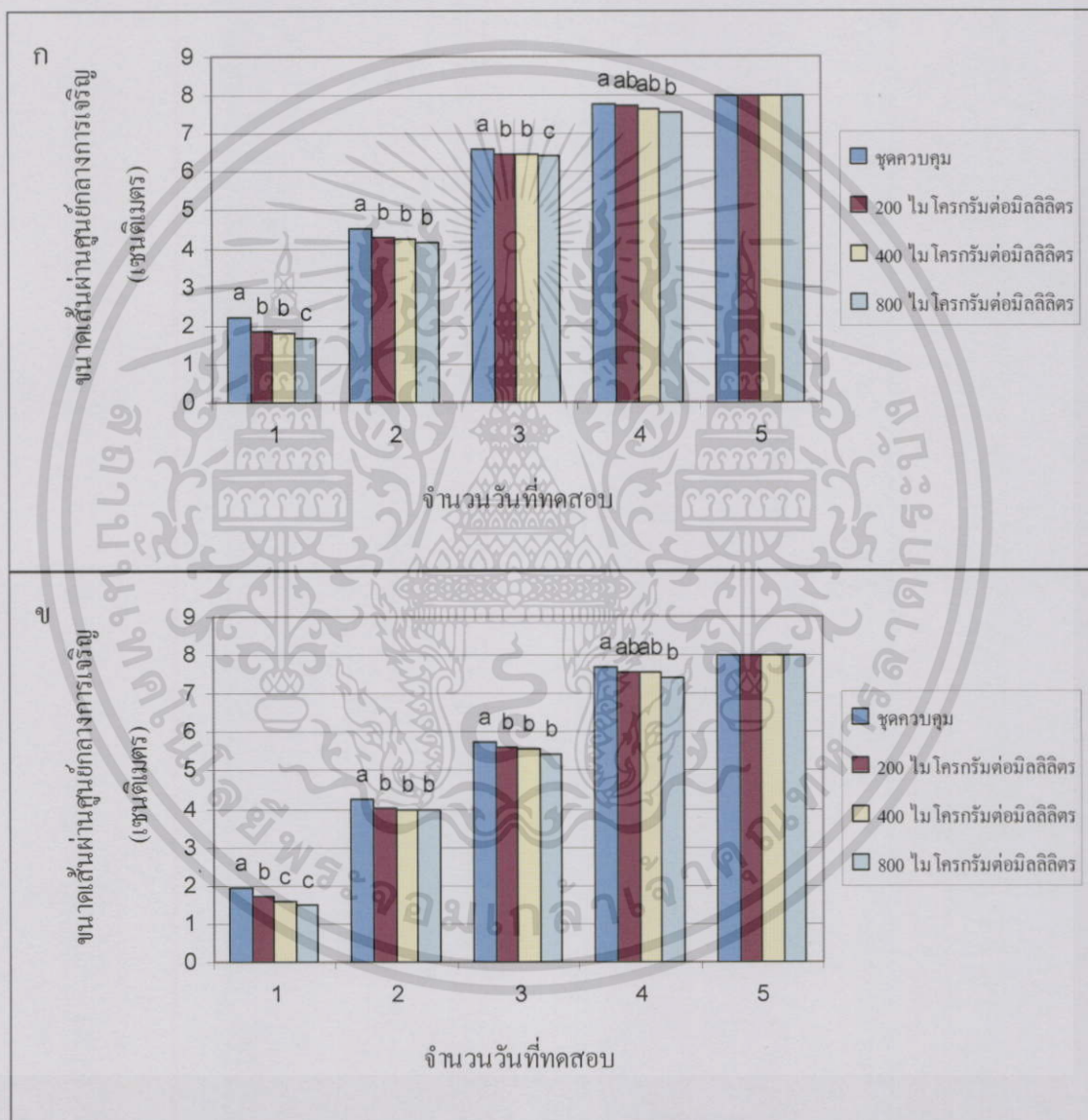


รูปที่ 4.6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผองอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) คำตัวอักษรบอถึงถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.7 เชื้อ *Sclerotium roftsii*

ผลการศึกษพบว่าในวันที่ 1-3 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. roftsii* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และในวันที่ 4 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 5 เชื้อเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงไม่สามารถบอกความแตกต่างทางสถิติ (รูปที่ 4.7ก และ 4.7ข)



รูปที่ 4.7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *S. roftsii* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.8 เชื้อ *Tricoderma* spp.

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 1-3 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Tricoderma* spp. ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 4-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ และในวันที่ 1-4 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Tricoderma* spp. ที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.8ก และ 4.8ข)

4.1.1.9 เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* ได้ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.9ก และ 4.9ข)

4.1.1.10 เชื้อ *Corynebacterium aquaticum*

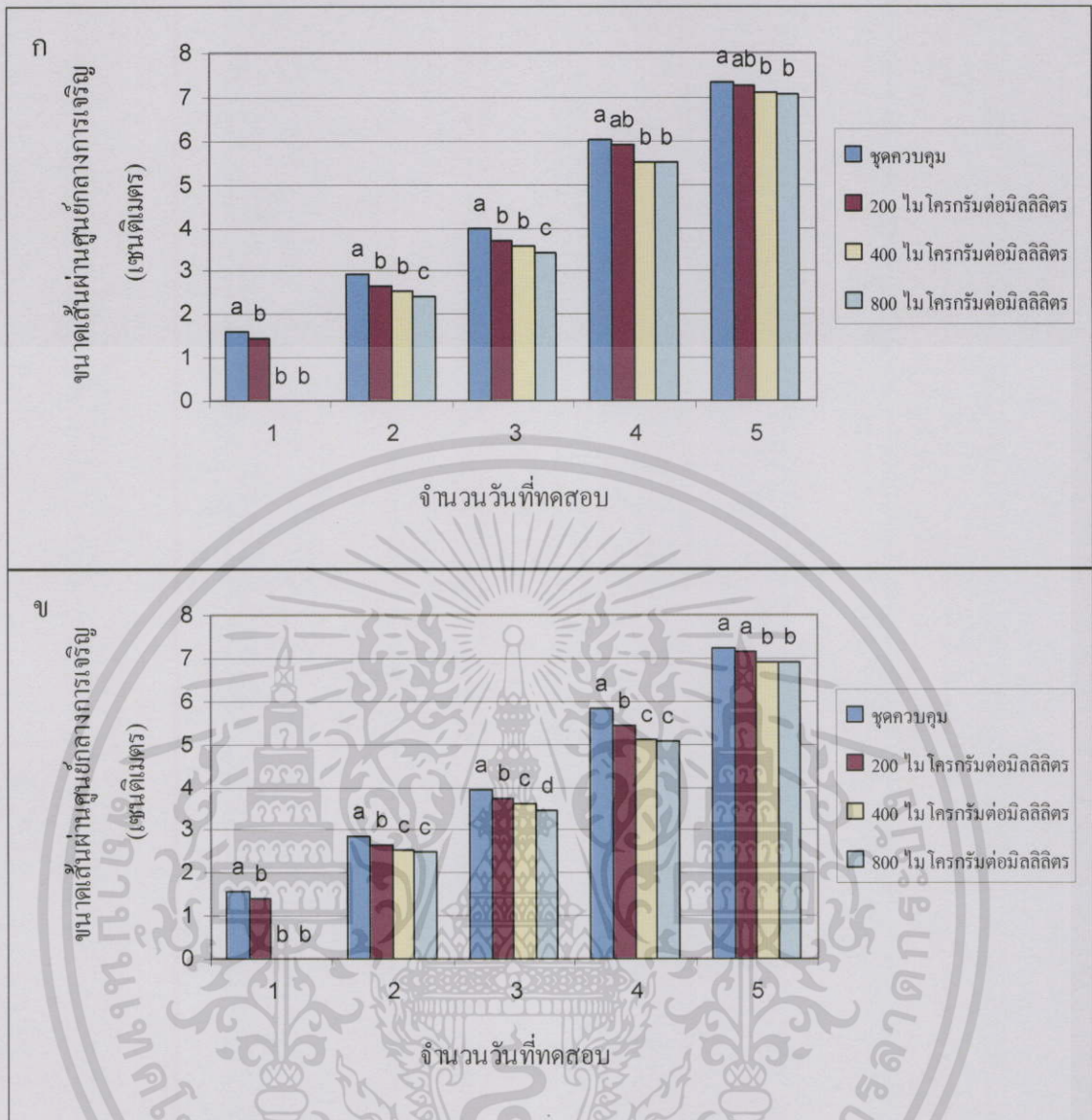
ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 4-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. aquaticum* ได้ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.10ก และ 4.10ข)

4.1.1.11 เชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *sesami*

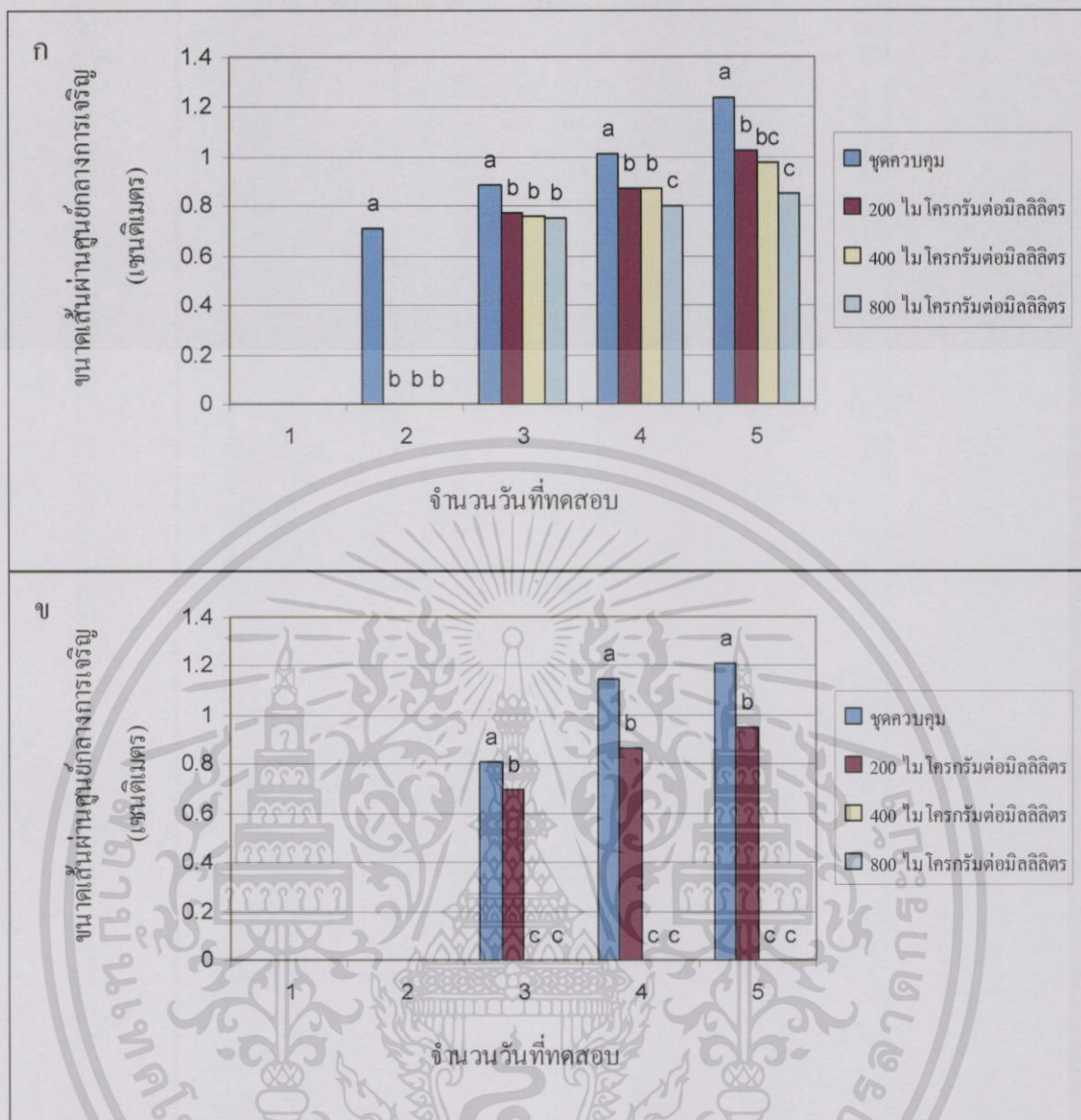
ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-4 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. syringae* pv. *sesami* ได้ได้อย่างมีนัยสำคัญ และในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้นของผงอบเชย 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.11ก และ 4.11ข)

4.1.1.12 เชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycinae*

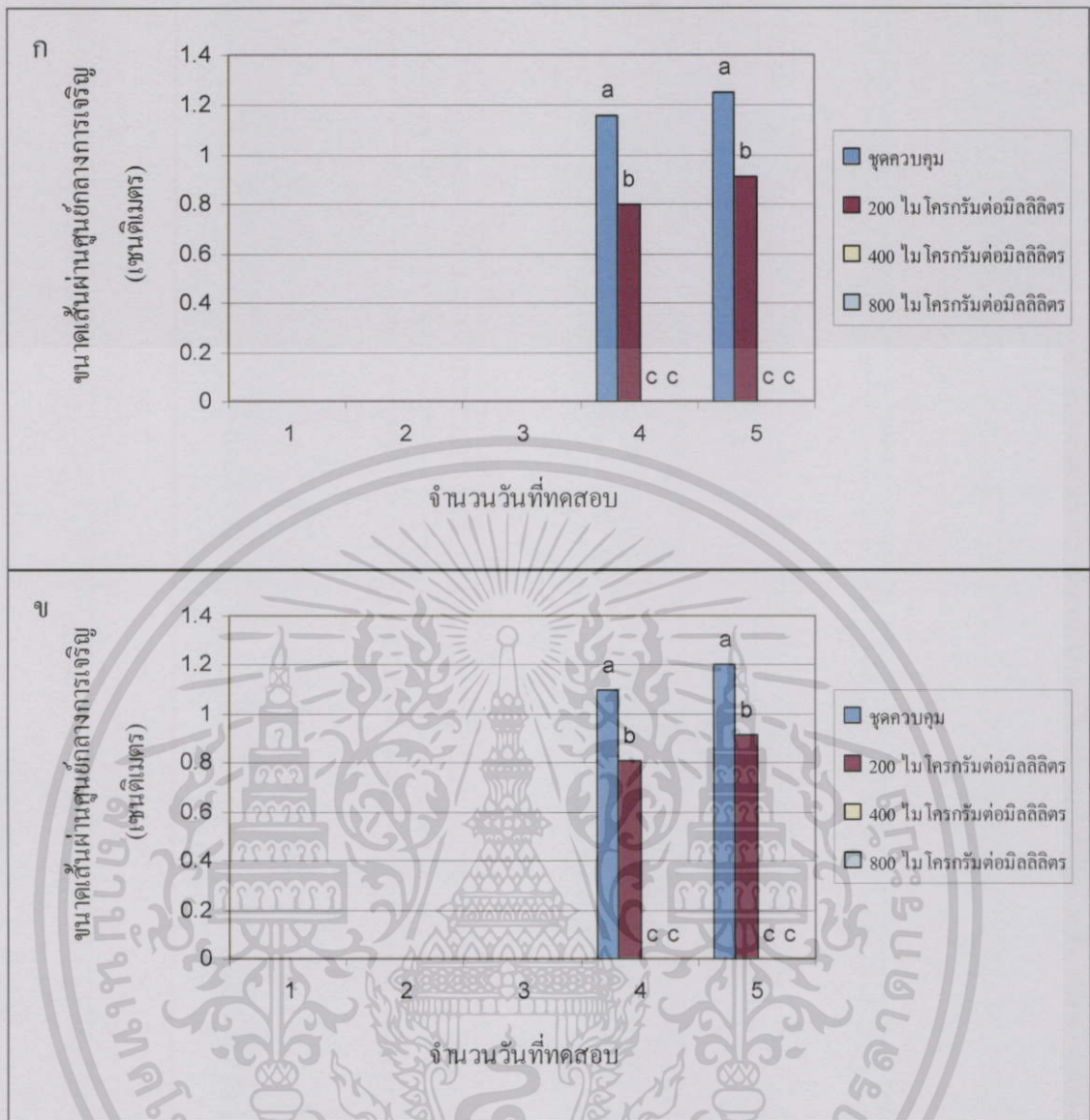
ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 4-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. campestris* pv. *glycinae* ได้ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.12ก และ 4.12ข)



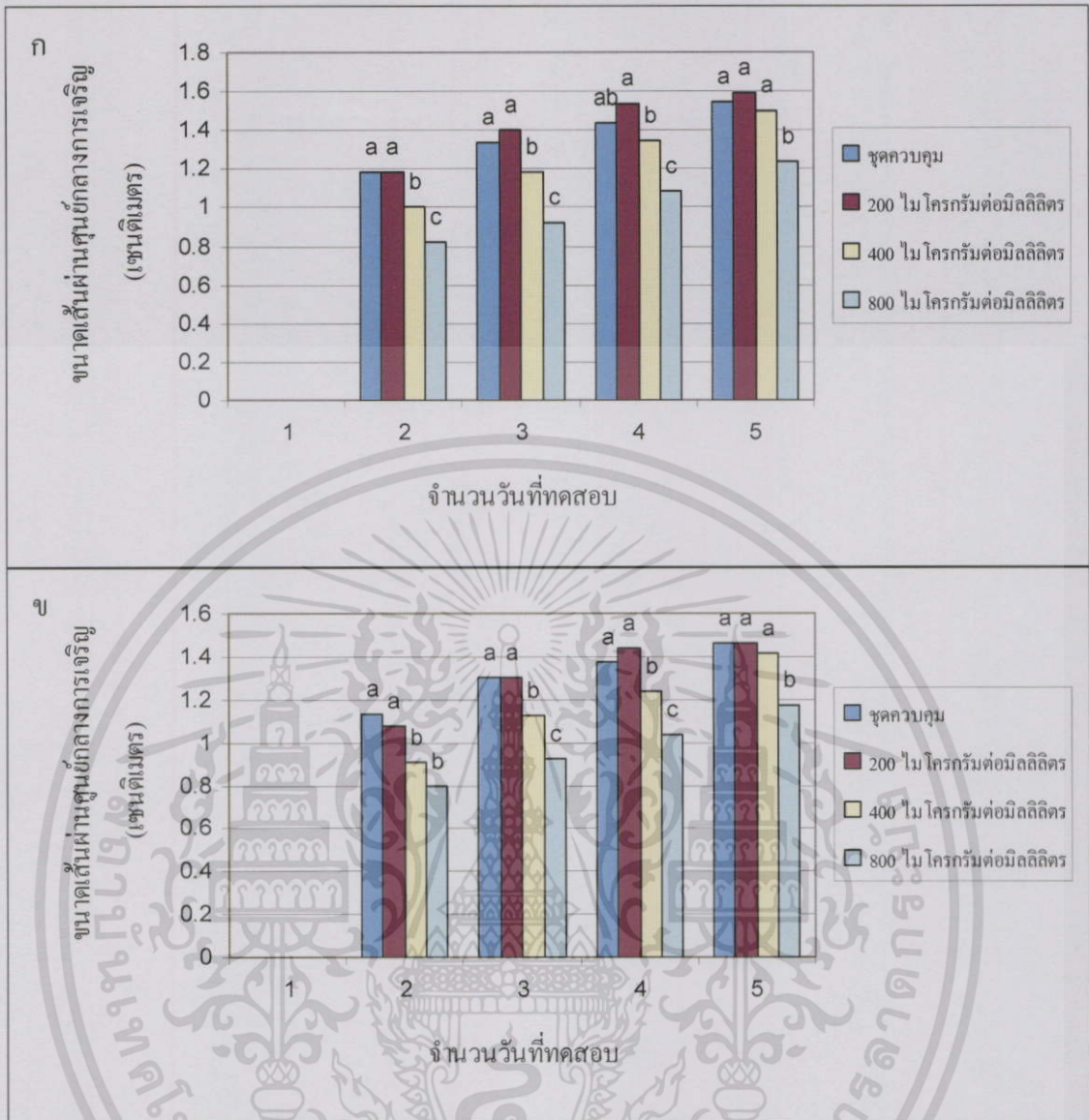
รูปที่ 4.8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *Tricoderma* spp. ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร(ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้น ต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่า ตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน



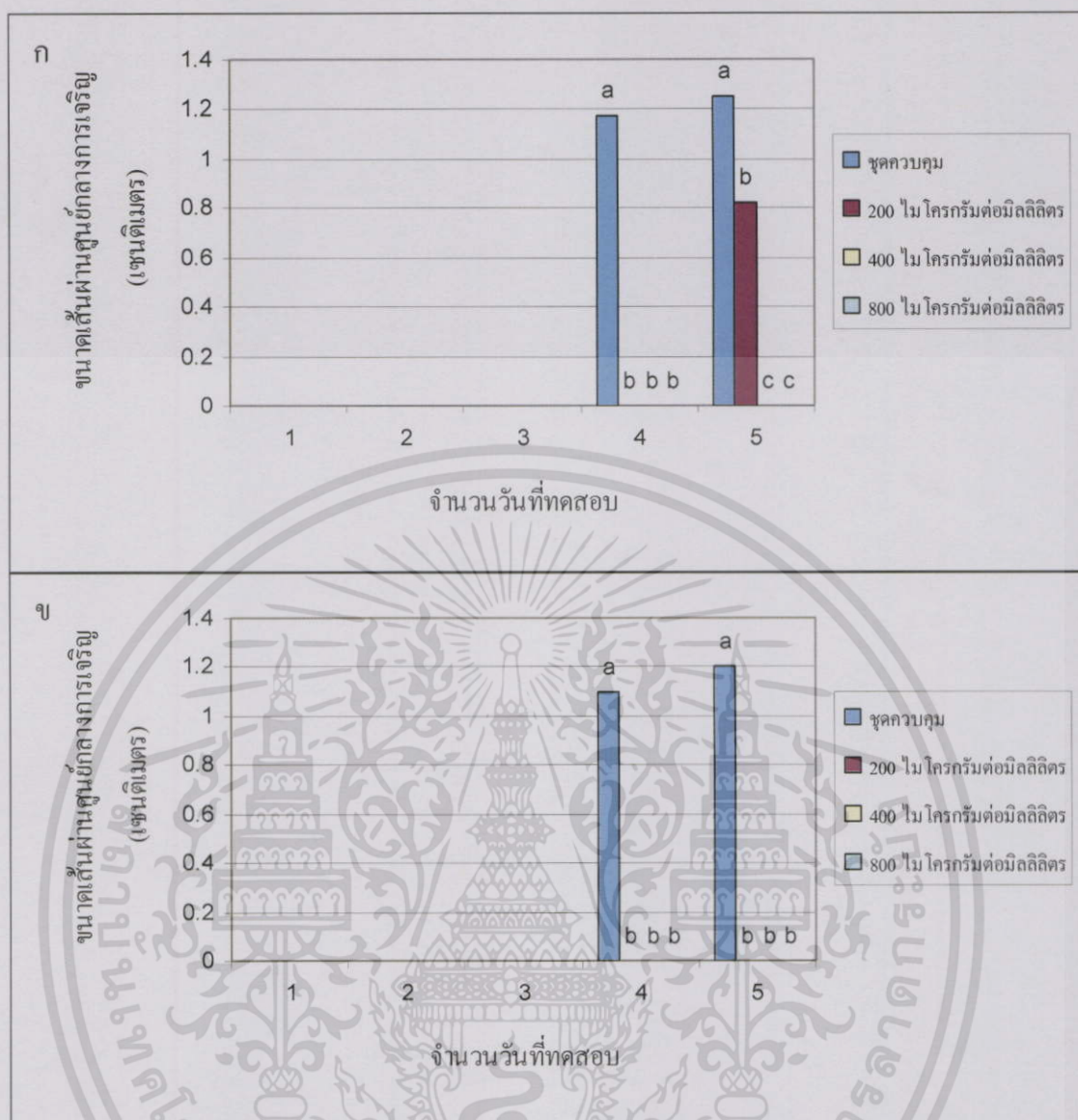
รูปที่ 4.9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน



รูปที่ 4.10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *C. aquaticum* ที่ความเข้มข้น 10⁶ โคโลนีต่อมิลลิตร (ก) 10⁷ โคโลนีต่อมิลลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน



รูปที่ 4.11 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringe* pv. *sesami* ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผงอบเชย ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน



รูปที่ 4.12 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *X. camprestis* pv. *glyciniae* ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีผงอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

4.1.2 ผลของผงอบเชยที่สกัดด้วยเอทานอล

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากผงอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 200, 400 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร PDA (สำหรับเชื้อรา) และ NA (สำหรับเชื้อแบคทีเรีย) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จำนวน 12 ชนิดที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (สำหรับเชื้อรา) และโคโลนีต่อมิลลิลิตร (สำหรับเชื้อแบคทีเรีย) โดยการวัดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญ ได้ผลดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.1 เชื้อ *Aspergillus flavus*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-3 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผองอบเซยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 4-5 ที่ความเข้มข้นของอบเซยทุกระดับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (รูปที่ 4.13ก และ 4.13ข)

Hasan และ Abdel (1994) พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร 7 ชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.8-4 มีอิทธิพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการยับยั้งจะมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร Montes และ Carvajai (1998) ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *A. flavus* ในเมล็ดธัญพืชโดยใช้น้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด โดยศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการป้องกันเมล็ดธัญพืชและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย พบว่า thymol และ *O*-methoxycinnamaldehyde สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดธัญพืชได้ ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 3-8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดเป็นส่วนประกอบที่มีในอบเซย

4.1.2.2 เชื้อ *Aspergillus paraciticus*

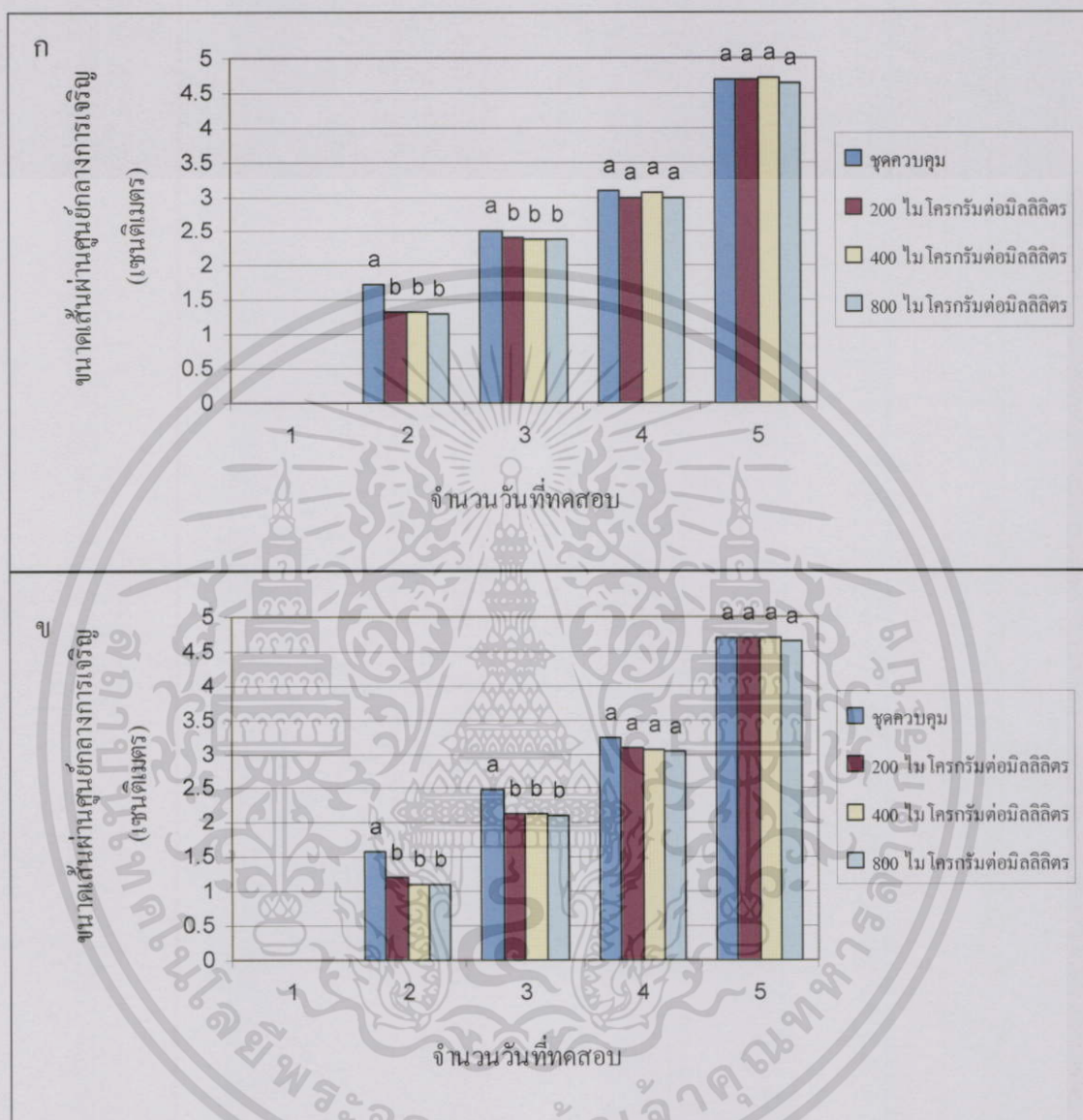
ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-3 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผองอบเซยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ และในวันที่ 4 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผองอบเซยทุกระดับสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้นของอบเซยทุกระดับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (รูปที่ 4.14ก และ 4.14ข)

Soliman และ Badaea (2002) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืช ที่มีคุณสมบัติทางยา 12 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการต้านทานต่อเชื้อรา *A. flavus*, *A. paraciticus*, *A. ochaceus* และ *F. moniliforme* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากไทม์ (thyme) และอบเซยที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 500 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบได้อย่างสมบูรณ์ Bulleman และคณะ (1977) พบว่าส่วนประกอบที่อยู่ในอบเซยและกานพลู มีอิทธิพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. paraciticus* คือ cinnamic aldehyde และ eugenol ตามลำดับ Atando และคณะ (2007) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา อบเซย coriander (*Coriandrum sativum*) และ bay leaf ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. paraciticus* CFR 223 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราและอบเซยที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

4.1.2.2 เชื้อ *Aspergillus niger*

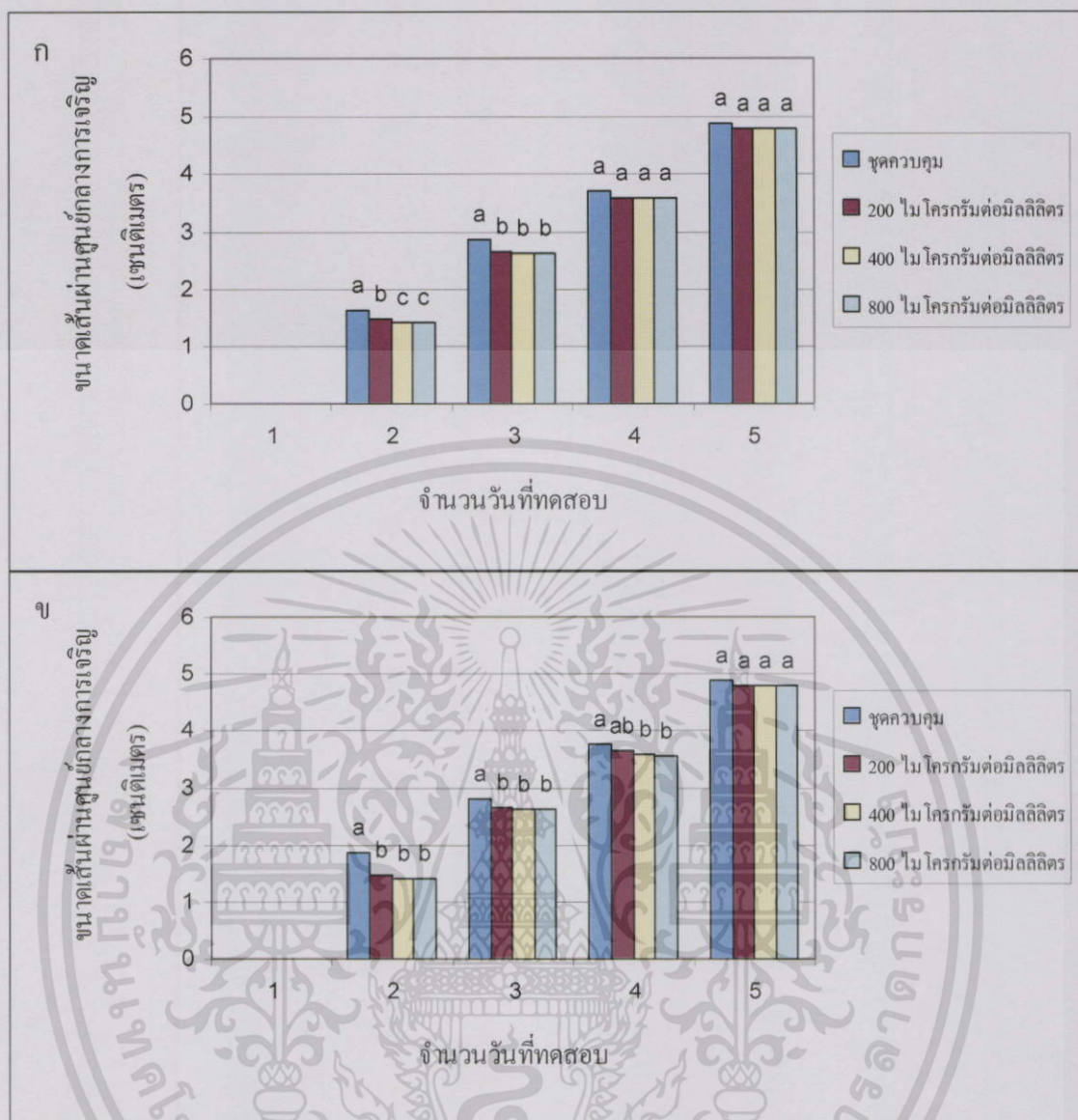
ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผองอบเซยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ได้อย่างมี

นัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 3-5 ที่ความเข้มข้นของอบเชยทุกระดับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (รูปที่ 4.15ก และ 4.15ข)

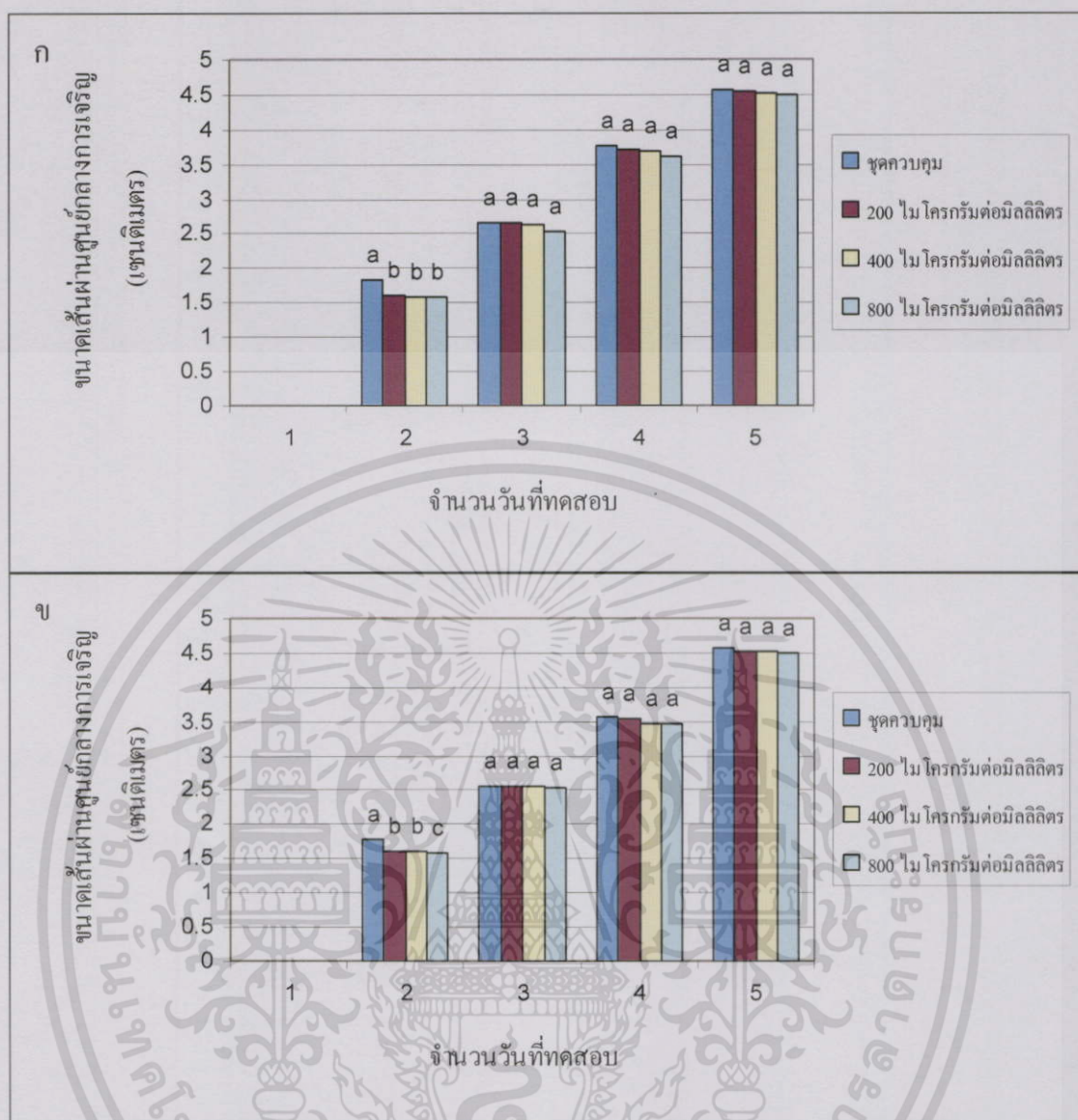


รูปที่ 4.13 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. flavus* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. paracitius* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน



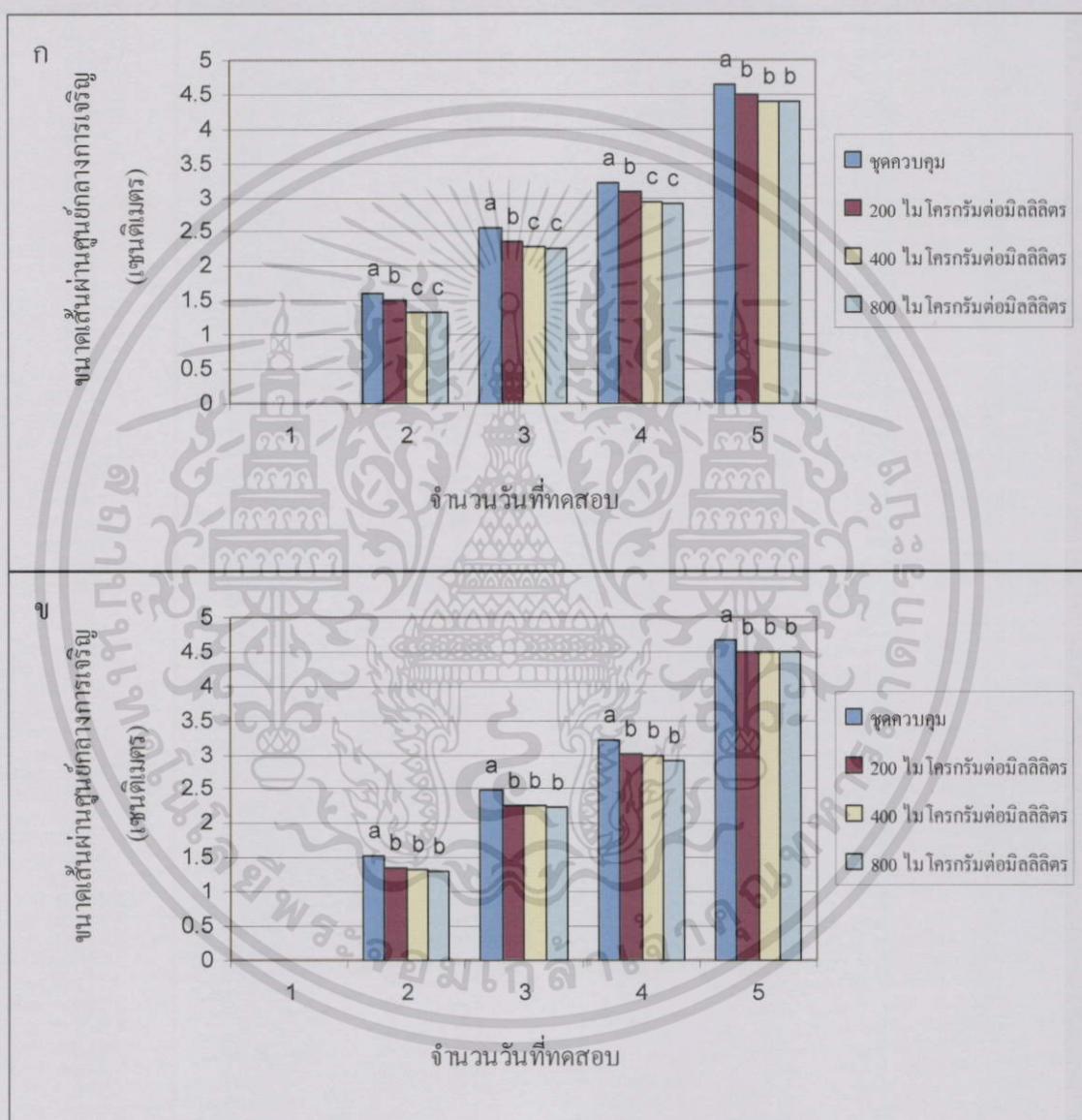
รูปที่ 4.15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. niger* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

4.1.2.4 เชื้อ *Alternaria alternata*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. alternata* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.16ก และ 4.16ข)

Hitokoto และคณะ (1980) กล่าวว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา บัญญัติ (2518) ศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องเทศ 27 ชนิดในการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งจุลินทรีย์ 33 ชนิด ปรากฏว่าน้ำมันหอมระเหยส่วนมากที่สกัดจากเครื่องเทศสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเครื่องเทศที่ไม่สกัดน้ำมัน และพบว่าไพล ลูกกระวาน ลูกจันทน์ ลูกผักชี ใบสาระแหน่ พริกไทย หัวหอมแดง หัวกระเทียม อบเชย ยี่ห่วย่าและพริกขี้หนู สามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus* sp., *Penicilium* sp., *Cunninghamella* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. และ *Mucor* sp. ได้ เป็นต้น

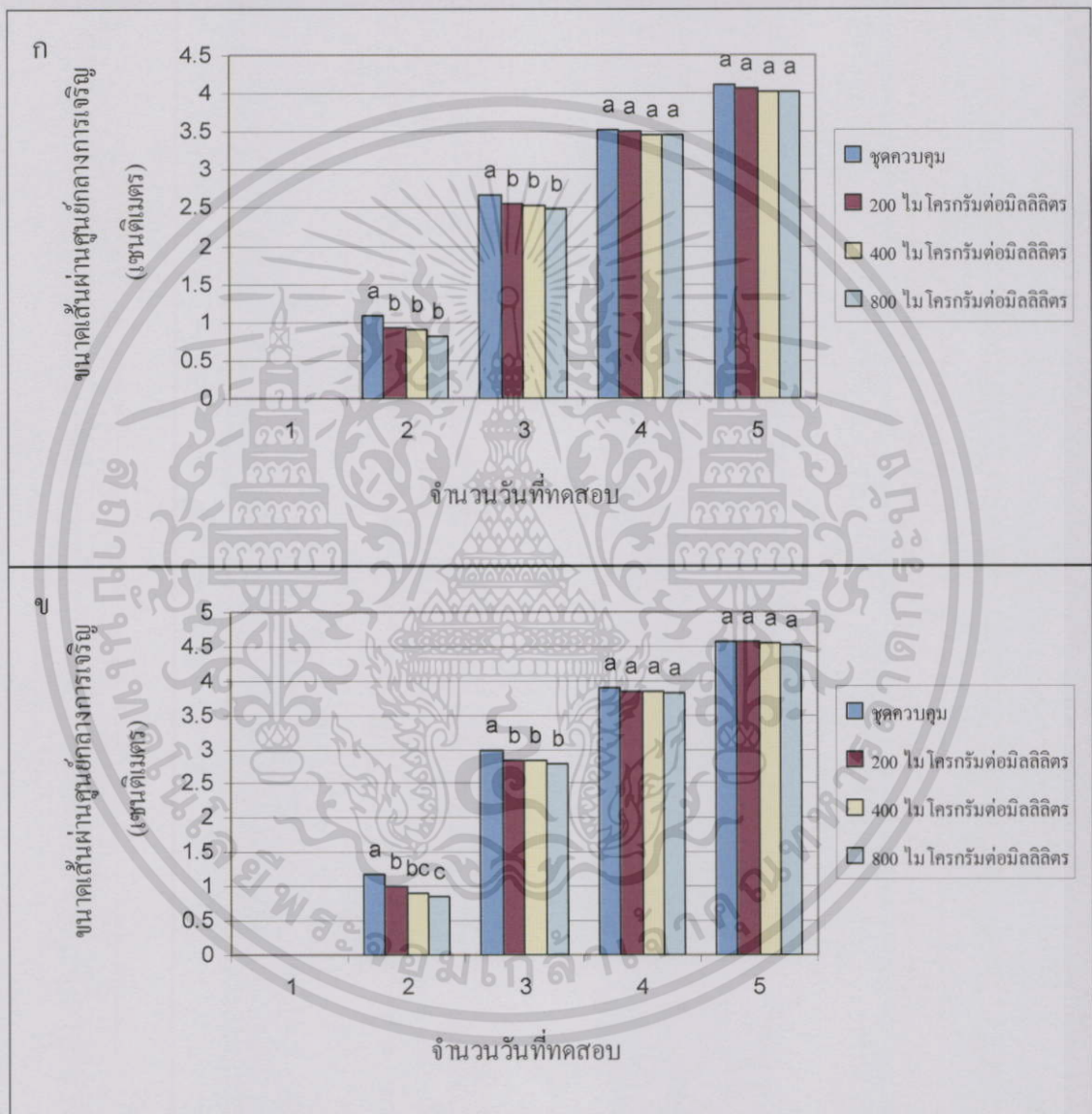


รูปที่ 4.16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *A. alternata* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วันจำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.5 เชื้อ *Fusarium moniliforme*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-3 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงบอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. moniliforme* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 4-5 ที่ความเข้มข้นของอบเชยทุกระดับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (รูปที่ 4.17ก และ 4.17ข)

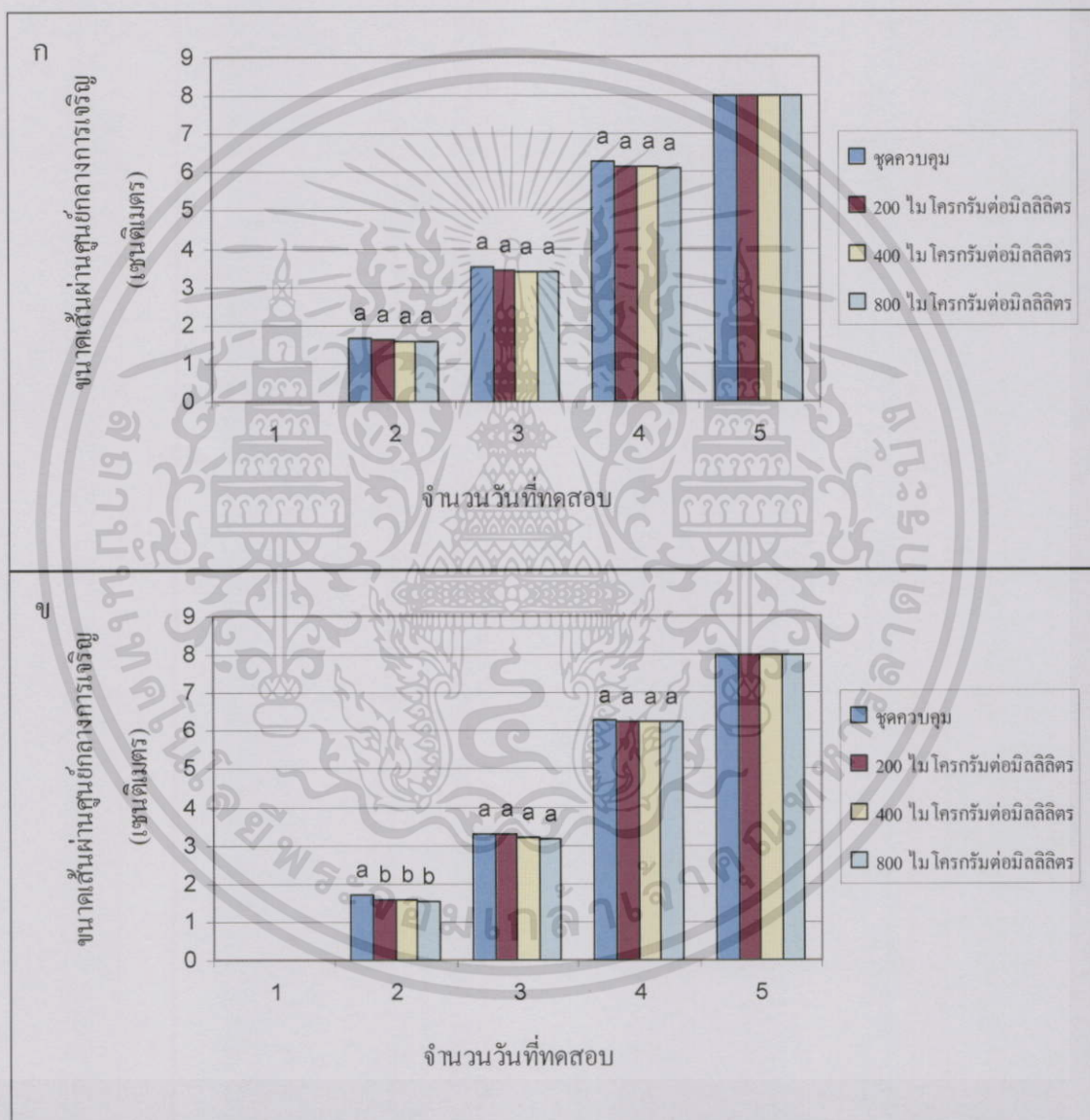


รูปที่ 4.17 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *F. moniliforme* ที่ความเข้มข้น 10⁶ สปอร์ต่อมิลลิตร (ก) 10⁷ สปอร์ต่อมิลลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (p < 0.05) ค่าตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.6 เชื้อ *Rhizopus* spp.

ผลการศึกษพบว่าที่ความเข้มข้นของผองอบเชยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizopus* spp. ยกเว้นในวันที่ 2 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผองอบเชยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในวันที่ 5 เชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อไม่สามารถบอกความแตกต่างทางสถิติได้ (รูปที่ 4.18ก และ 4.18ข)

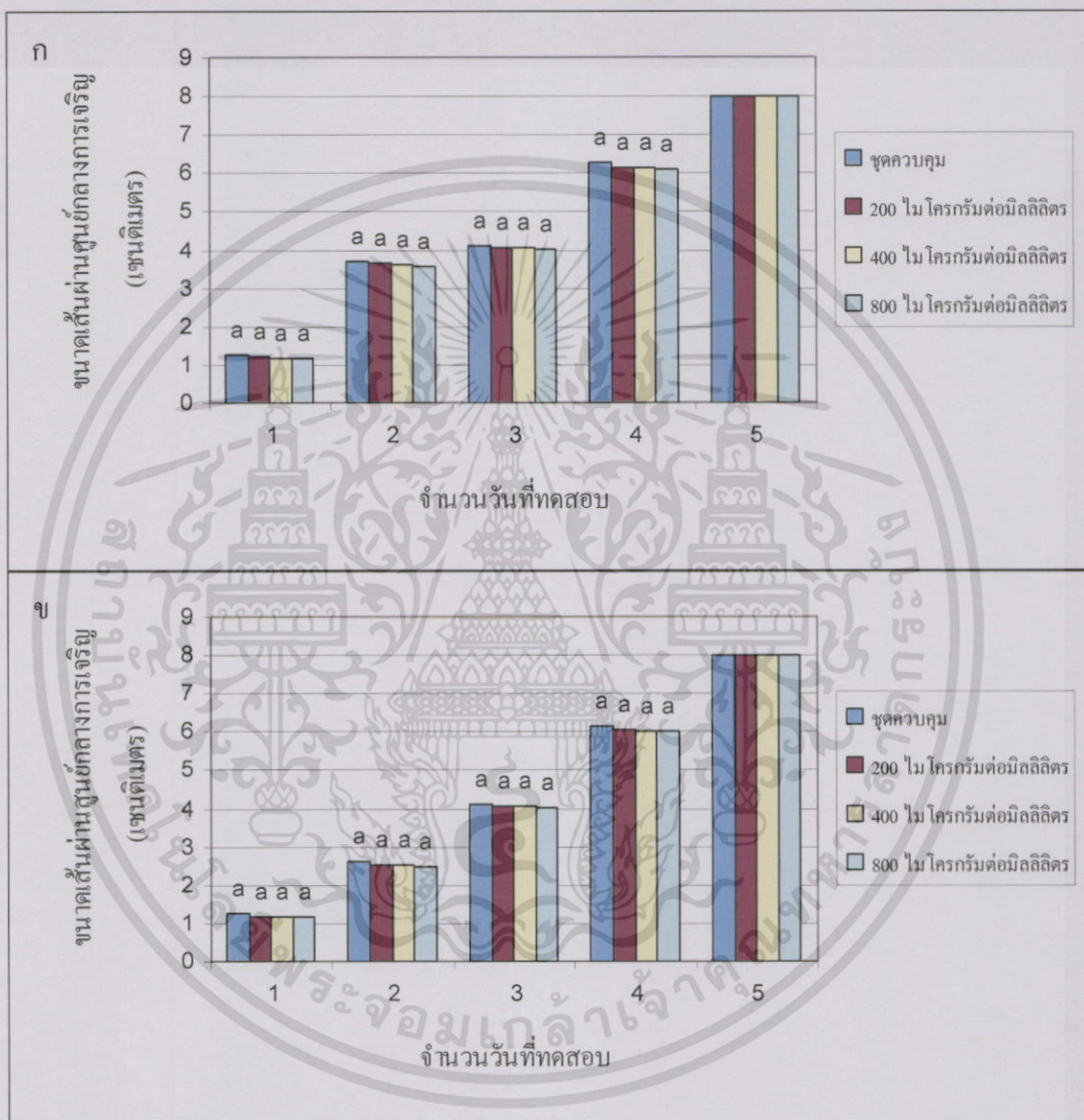


รูปที่ 4.18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่ความเข้มข้น 10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10⁷ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (p ≥ 0.05) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.7 เชื้อ *Sclerotium roftsii*

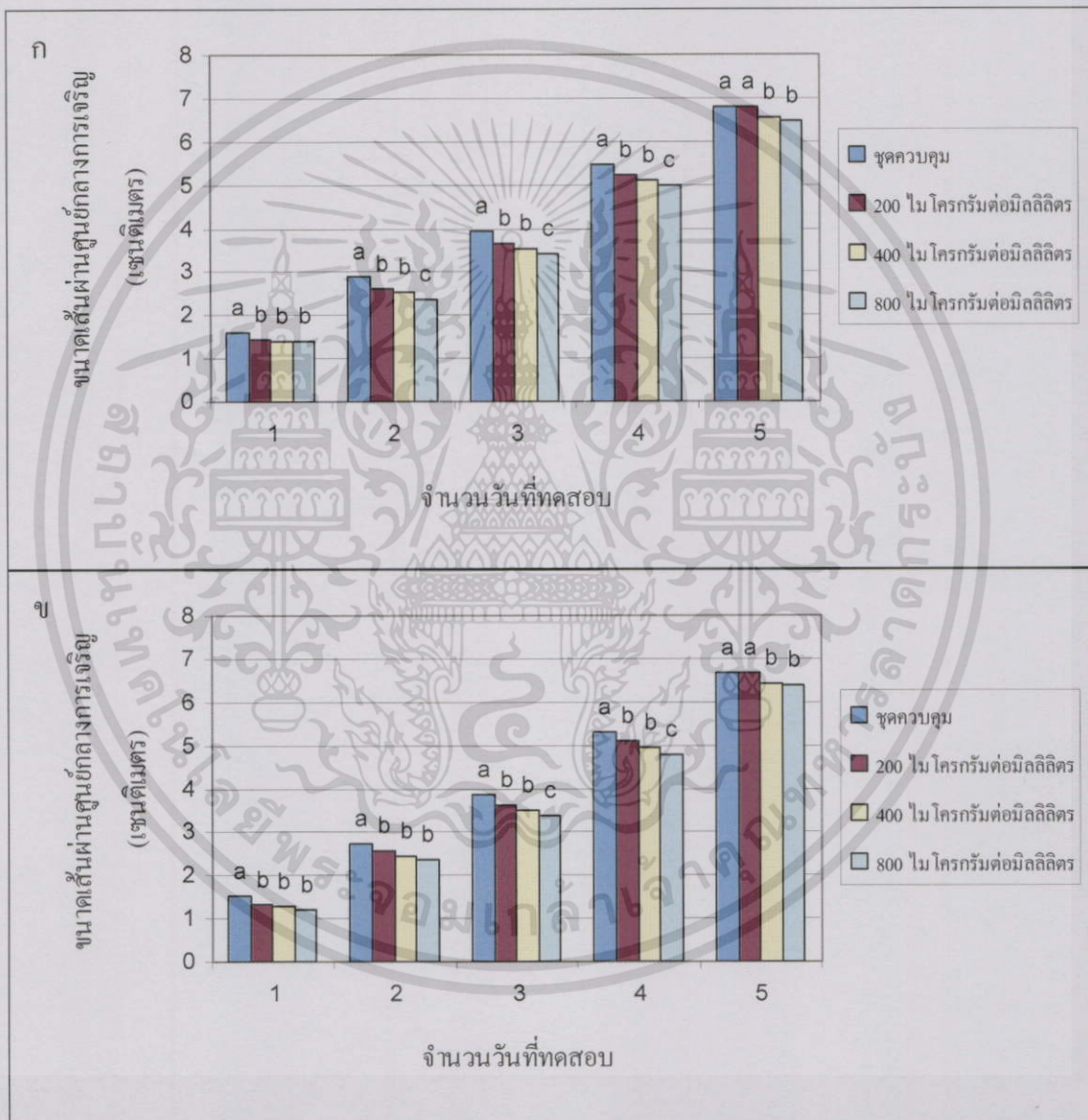
ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizopus* spp. ส่วนในวันที่ 5 เชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อไม่สามารถบอกความแตกต่างทางสถิติได้ (รูปที่ 4.19ก และ 4.19ข)



รูปที่ 4.19 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *S. roftsii* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

4.1.2.8 เชื้อ *Tricoderma* spp.

ผลการศึกษพบว่าในวันที่ 1-4 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผงอบเชย ทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Tricoderma* spp. ได้อย่างมีนัยสำคัญ และในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผงอบเชย 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Tricoderma* spp. ที่ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.20ก และ 4.20ข)

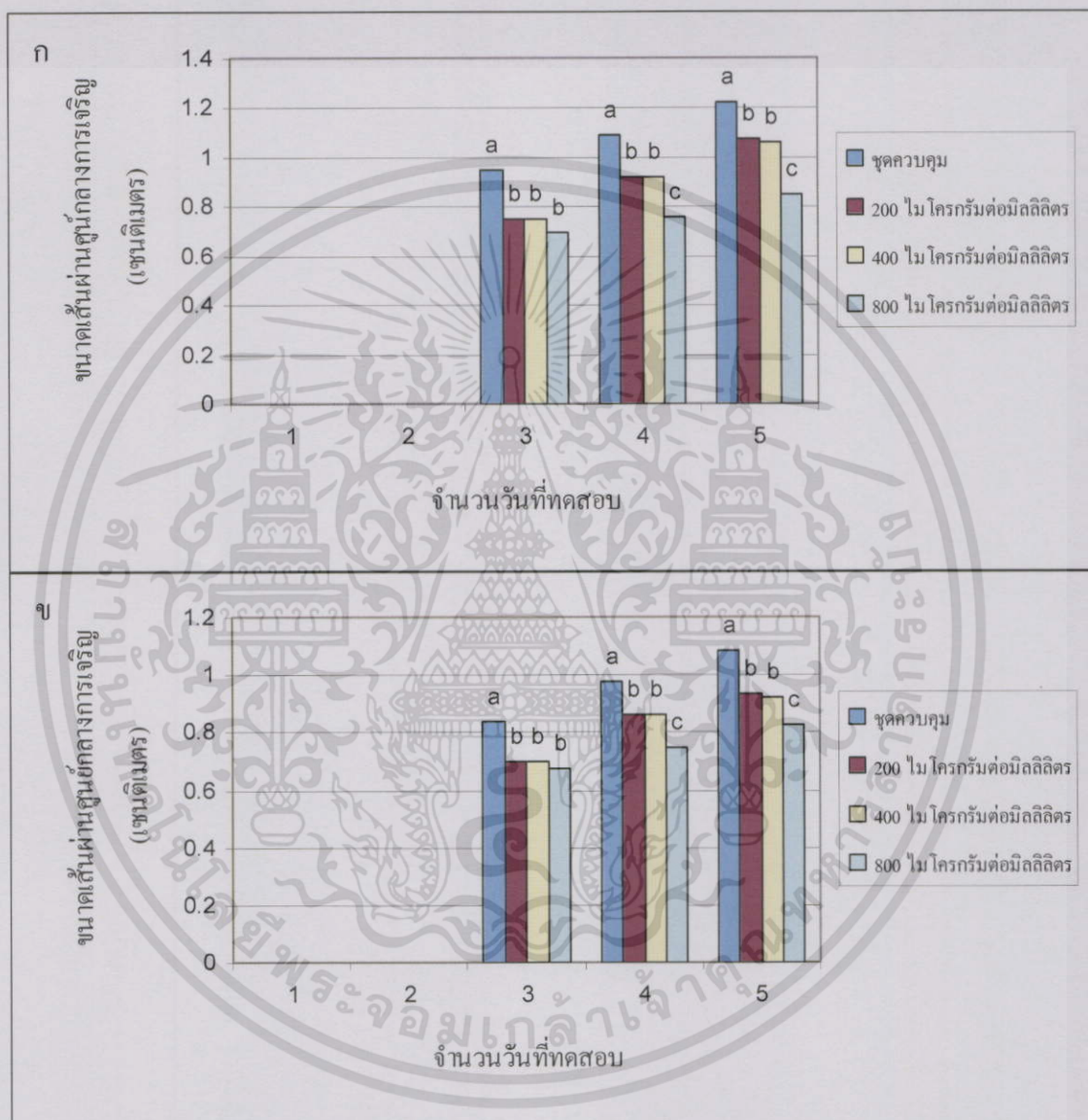


รูปที่ 4.20 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *Tricoderma* spp. ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1- 5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.9 เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

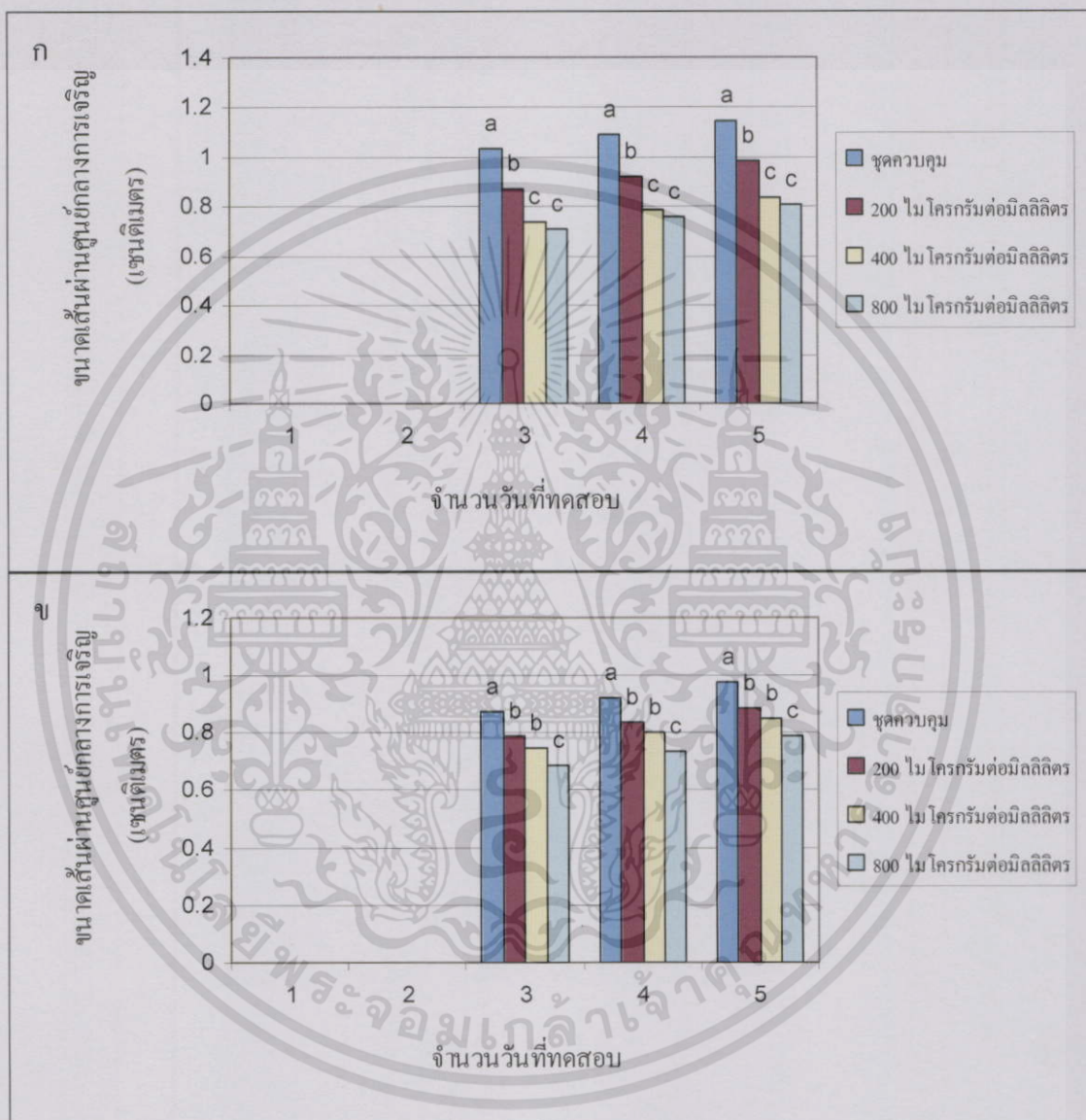
ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 3-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผงอบเชย ทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* ได้ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.21ก และ 4.21ข)



รูปที่ 4.21 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

4.1.2.10 เชื้อ *Corynebacterium aquaticum*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 3-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดผองเบชทุกระดับและที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. aquaticum* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.22ก และ 4.22ข)

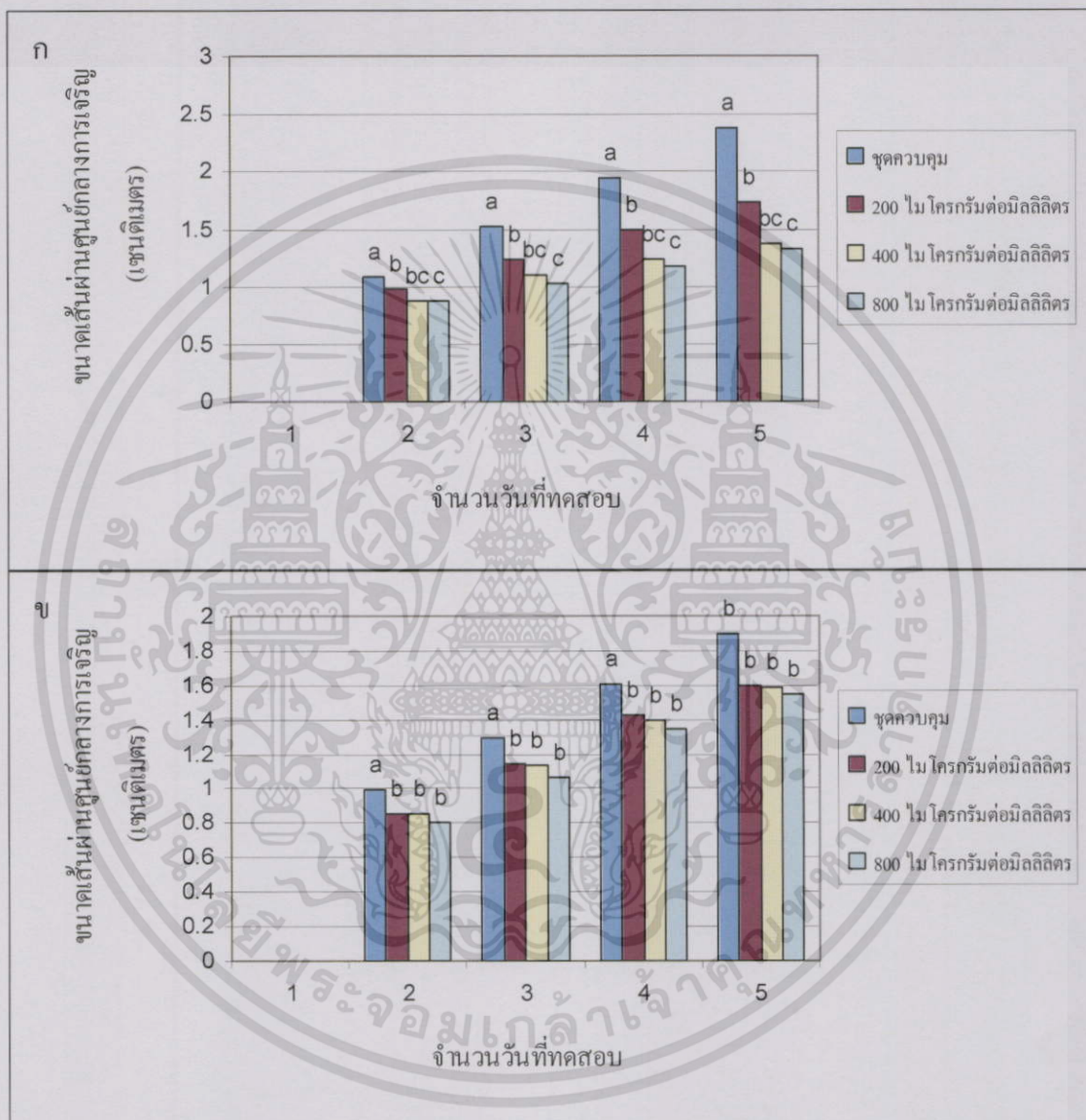


รูปที่ 4.22 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *C. aquaticum* ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิตร (ก) 10^7 โคโลนีต่อมิลลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดผองเบชความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.11 เชื้อ *Pseudomonas syringe* pv. *sesami*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 2-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. syringe* pv. *sesami* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.23ก และ 4.23ข)

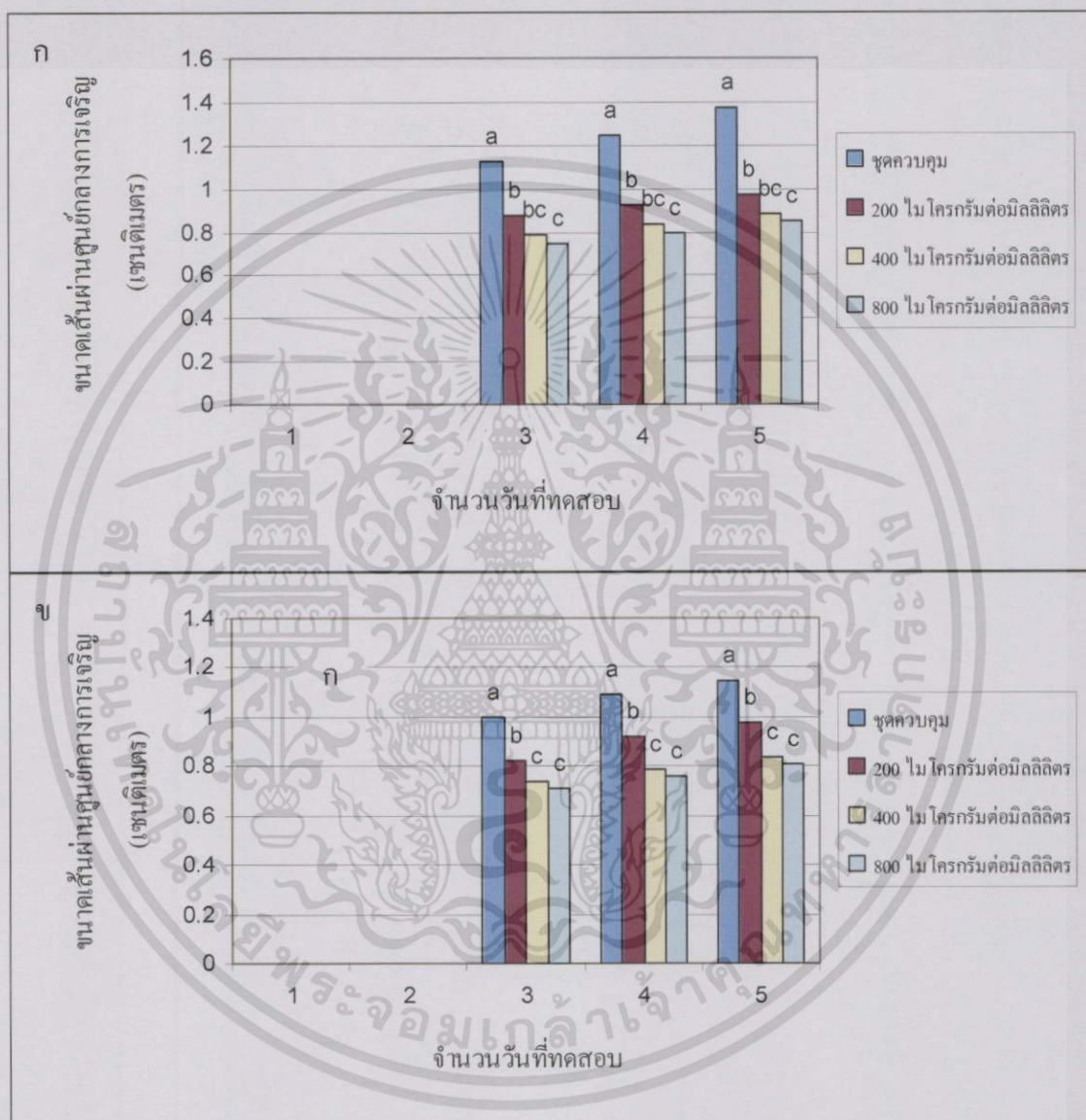


รูปที่ 4.23 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringe* pv. *sesami* ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิตร (ก) 10^7 โคโลนีต่อมิลลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.12 เชื้อ *Xanthomonas camprestis* pv. *glycinae*

ผลการศึกษาพบว่าในวันที่ 3-5 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้นของผงอบเชยทุกระดับ และที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. camprestis* pv. *glycinae* ได้ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.24ก และ 4.2ข)



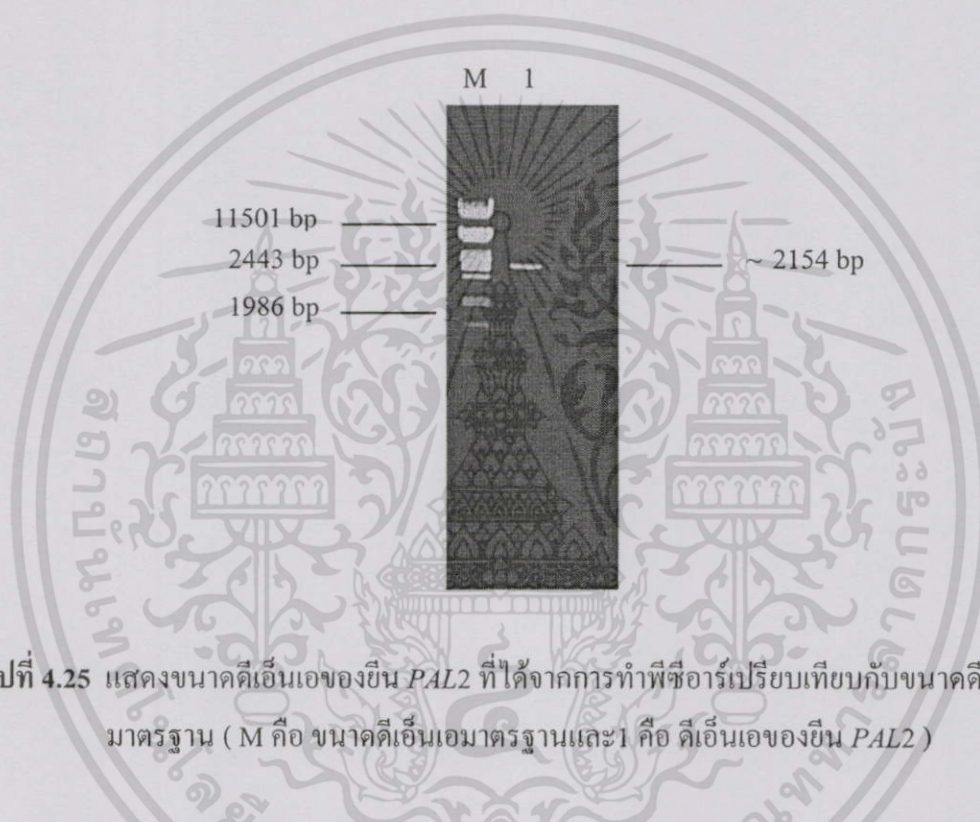
รูปที่ 4.24 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรีย *X. camprestis* pv. *glycinae* ที่ความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ก) 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ข) ที่เจริญบนอาหาร NA ที่มีสารสกัดอบเชยความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 1-5 วัน จำนวน 5 ซ้ำ การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

4.2.1 ผลการโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

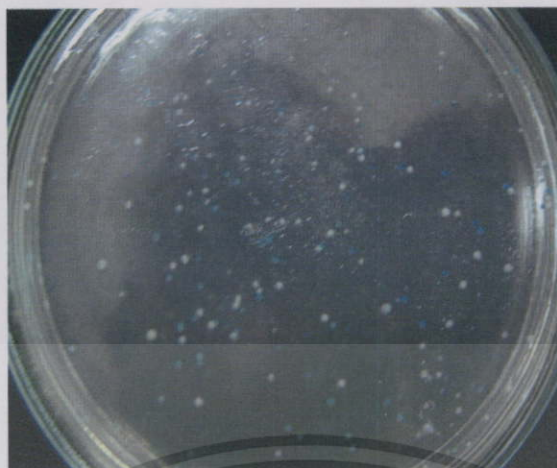
การทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนที่ควบคุม ได้แก่ *PAL2* ซึ่งตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 2,154 คู่เบส ดังรูปที่ 4.25 จึงคาดว่าชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวน่าจะเป็นส่วนของยีน *PAL2* ที่มีขนาด 2,154 กิโลเบส ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จาก GenBank



รูปที่ 4.25 แสดงขนาดดีเอ็นเอของยีน *PAL2* ที่ได้จากการทำพีซีอาร์เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (M คือ ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานและ 1 คือ ดีเอ็นเอของยีน *PAL2*)

4.2.2 ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pGEM เข้าสู่ *E. coli* และการคัดเลือกโคโลนี

ผลการนำชิ้นดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM ถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* และทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal พบว่าโคโลนีที่ได้จะมี 2 ลักษณะ คือ โคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าเซลล์ *E. coli* ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pGEM ที่มีชิ้นส่วนของยีน *PAL2* แทรกอยู่และโคโลนีสีฟ้าซึ่งคาดว่าไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ ผลดังรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.26 แสดงโคโลนีของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีน *PAL2* เข้าสู่เวกเตอร์

pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* ที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ มาทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ และตรวจผลการสกัดพลาสมิดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.27

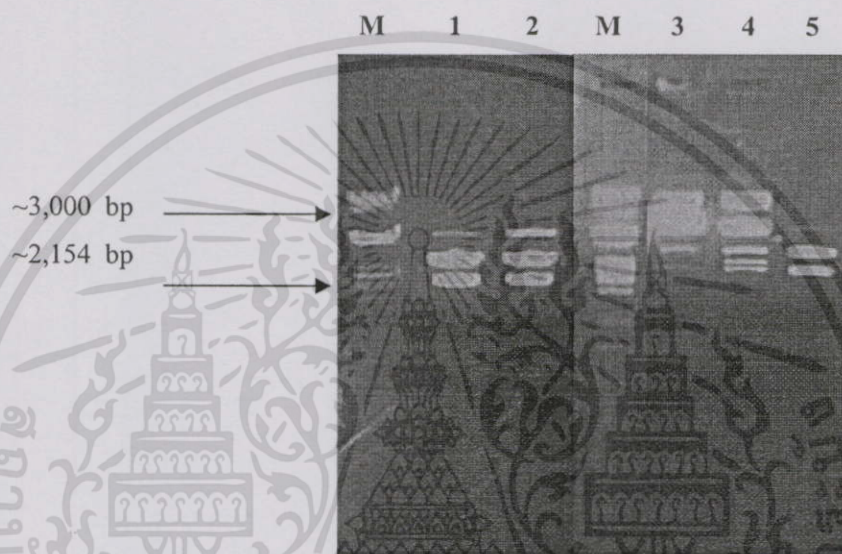


รูปที่ 4.27 แสดงขนาดพลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีสีขาว เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน

(M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานและ 1 - 9 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้)

4.2.3 ผลการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM

ทำการคัดเลือกพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน *PAL2* แทรกอยู่โดยการใช้นิวคลีโอไทด์จำเพาะ *XbaI* และตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งจะให้เห็นส่วนของดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาดประมาณ 2,154 และ 3,000 คู่เบส โดยเทียบกับขนาดดีเอ็นเอ มาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.28

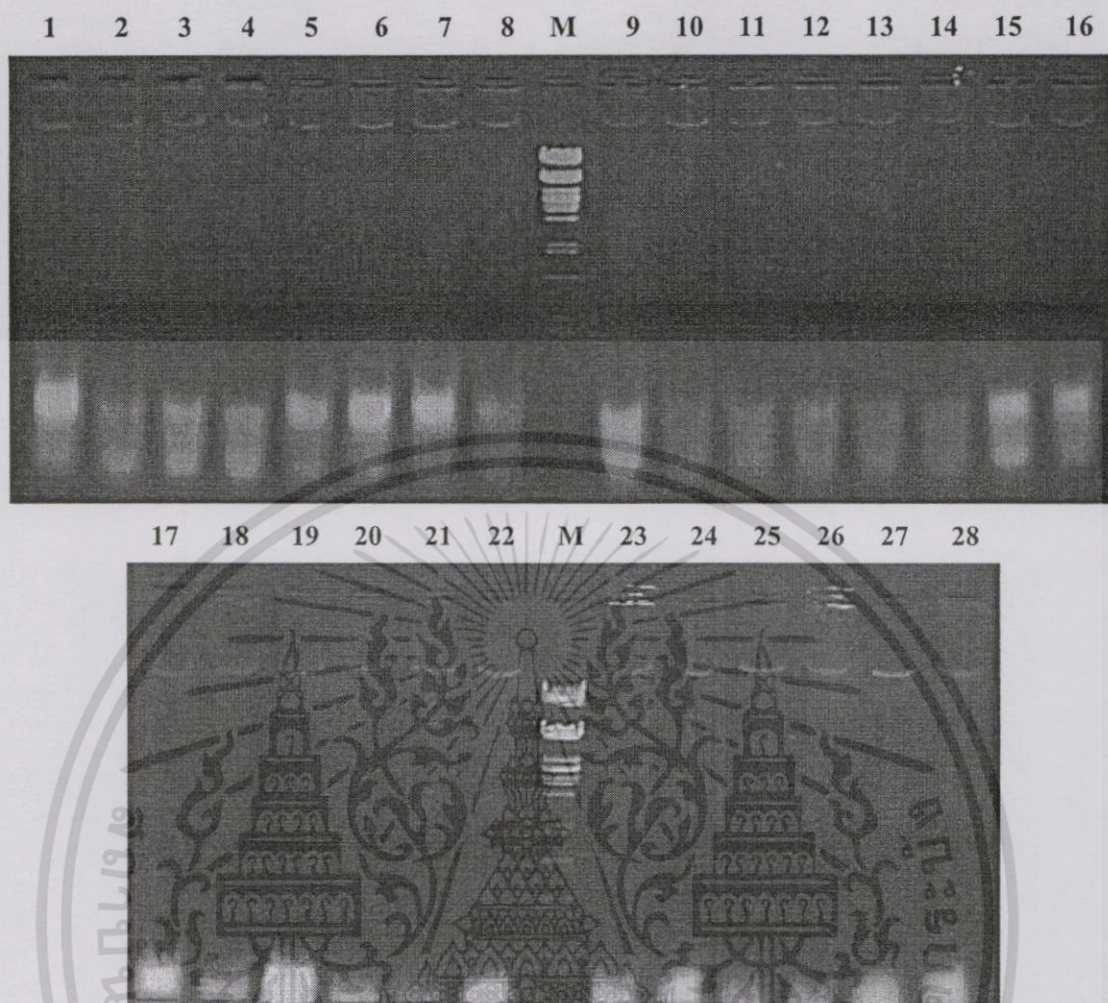


รูปที่ 4.28 แสดงผลการตัดพลาสมิดที่คัดเลือกได้ด้วยเอ็นไซม์ *XbaI* (หมายเลข 1 ถึง 5 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PAL2* ที่ต่ออยู่กับเวกเตอร์ pGEM และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.2.4 ผลการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

ทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล นำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับ *Agrobacterium* expression vector ได้แก่ เวกเตอร์ pBI121 ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอจากการเชื่อมต่อเข้าสู่เซลล์ *E. coli* และทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่ผสมยาปฏิชีวนะคานามัยซินมาทำการสกัดพลาสมิด และตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ได้ผลดังรูปที่ 4.29



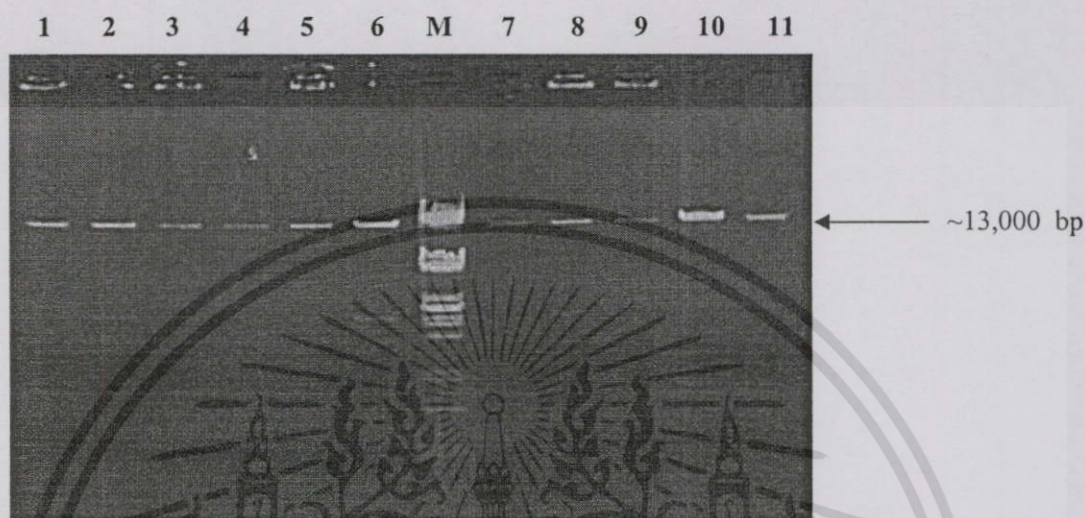
รูปที่ 4.29 แสดงขนาดของพลาสมิดที่ได้จากการเชื่อมต่อยีนส่วนที่ยีนกับ *Agrobacterium* expression vector เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (หมายเลข 1-28 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PAL2* ที่แทรกอยู่กับเวกเตอร์ pBI121 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.2.5 ผลการตรวจสอบพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีน *PAL2* และทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพลาสมิด

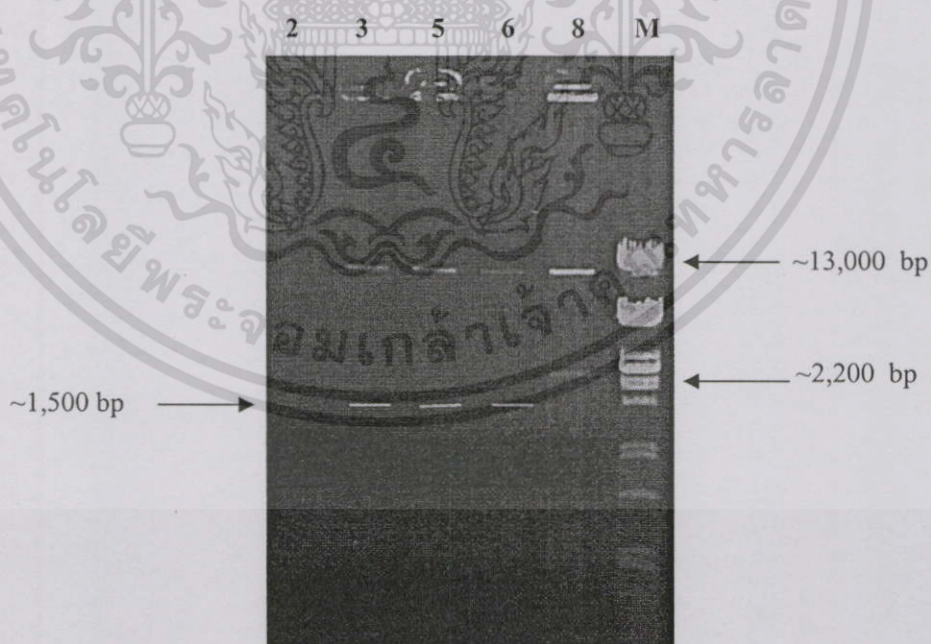
คัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *PAL2* แทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.30) นำสารละลายที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จะเห็นว่าโคลนที่ 2, 3, 5 และ 6 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,154 คู่เบส เป็นขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *PAL2* นำเวกเตอร์ที่มียีน *PAL2* แทรกอยู่ไปทดสอบทิศทางการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์โดยใช้เอนไซม์ *Hind* III จากการตรวจสอบจุดตัดของเอนไซม์ชนิดนี้ พบว่าในเวกเตอร์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *PAL2* แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของ promoter (sense) จะได้ดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอที่มีขนาดประมาณ 13,000 และ 15,00 คู่เบส ซึ่งได้แก่โคลนที่ 2, 3, 5 และ 6 ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *PAL2* ที่แทรกอยู่ในทิศทางกลับกับการแสดงออกของ promoter (antisense) จะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 13,000 และ 22,00 คู่เบส ซึ่งได้แก่โคลนที่ 8 (รูปที่ 4.31)

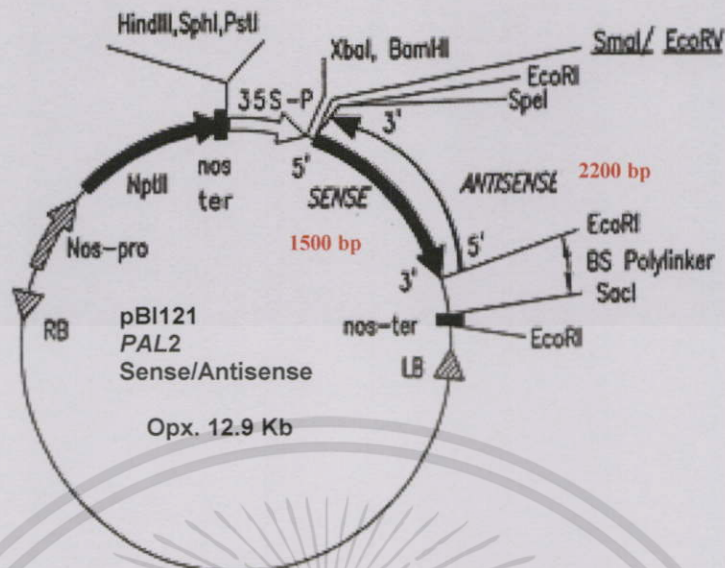


รูปที่ 4.30 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PAL2* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)



รูปที่ 4.31 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PAL2* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

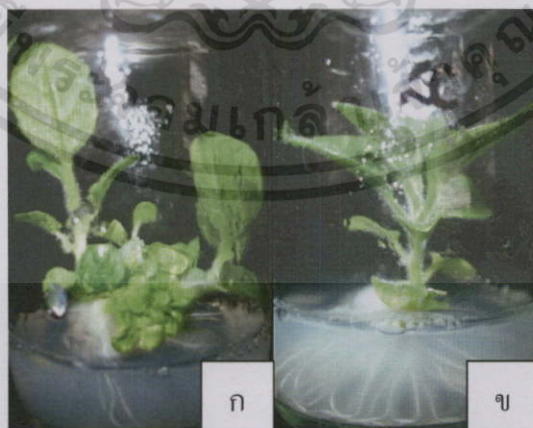
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 เวกเตอร์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *PAL2* แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกับการแสดงออกของ promoter (sense) และเวกเตอร์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *PAL2* แทรกอยู่ในทิศทางกลับกับการแสดงออกของ promoter (sense)

4.2.6 ผลการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้ *Agrobacterium*

ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้น *PAL2* แทรกอยู่ เข้าสู่ *Agrobacterium* และถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบ โดยทำการทดลองทั้งหมด 100 ชั่ว พบว่ามีใบยาสูบที่สามารถเจริญเป็นแคลลัสและเกิดยอดทั้งหมด 100 ชิ้นใบ จากนั้นทำการตัดยอดที่ได้เลี้ยงให้เกิดเป็นต้นสมบูรณ์ พบว่ามียอดของต้นยาสูบทั้งหมด 56 ต้นที่สามารถเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์



รูปที่ 4.33 ต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายโอนยีน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pBI121

(ก) คือ แคลลัสเจริญเป็นยอด (ข) คือ ต้นยาสูบที่เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของการทดสอบต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

4.3.1 ผลการทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบในอาหาร MS หลังได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

จากการทดสอบการตอบสนองของต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* หลังได้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ได้ผลดังต่อไปนี้

4.3.1.1 เชื้อ *A. alternata*

ผลการศึกษาพบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* แสดงอาการใบเหี่ยวเหลืองมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR*, *CHS*, ต้นยาสูบปกติและ *PAP2* ตามลำดับ (รูปที่ 4.34)

4.3.1.2 เชื้อ *F. moniforme*

ผลการศึกษาพบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* แสดงอาการใบเหี่ยวเหลืองมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR*, ต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* และ *CHS* ตามลำดับ (รูปที่ 4.35)

4.3.1.3 เชื้อ *P. syringae* pv. *sesami*

ผลการศึกษาพบว่าต้นยาสูบปกติ แสดงอาการใบเหี่ยวเหลืองมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR*, *PAL2*, *PAP2* และ *CHS* ตามลำดับ (รูปที่ 4.36)

4.3.1.4 เชื้อ *X. campestris* pv. *glycines*

ผลการศึกษาพบว่าต้นยาสูบ *DFR* แสดงอาการใบเหี่ยวเหลืองมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2*, *CHS*, ต้นยาสูบปกติ, ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* ตามลำดับ (รูปที่ 4.37)



รูปที่ 4.38 แสดงการตอบสนองของต้นยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ *A. alternata* (ก) ต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อ (ข) ต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* ที่ไม่ติดเชื้อ (ด) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* ที่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* ที่ไม่ติดเชื้อ (ฉ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* ที่ติดเชื้อ (ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR* ที่ไม่ติดเชื้อ (จ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR* ที่ติดเชื้อ (ฉ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* ที่ไม่ติดเชื้อ (ช) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* ที่ติดเชื้อ



รูปที่ 4.39 แสดงการตอบสนองของต้นยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ *F. moniliforme* (ก) ต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อ (ข) ต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน PAL2 ที่ไม่ติดเชื้อ (ด) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน PAL2 ที่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน CHS ที่ไม่ติดเชื้อ (ฅ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน CHS ที่ติดเชื้อ (ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน DFR ที่ไม่ติดเชื้อ (จ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน DFR ที่ติดเชื้อ (ฉ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน PAP2 ที่ไม่ติดเชื้อ (ช) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายไอออนอิน PAP2 ที่ติดเชื้อ



รูปที่ 4.40 แสดงการตอบสนองของต้นยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ *P. syringae* pv. *sesami* (ก) ต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อ (ข) ต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ (ข) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* ที่ไม่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* ที่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* ที่ไม่ติดเชื้อ (ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* ที่ติดเชื้อ (ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR* ที่ไม่ติดเชื้อ (จ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR* ที่ติดเชื้อ (จ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* ที่ไม่ติดเชื้อ (ซ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* ที่ติดเชื้อ



รูปที่ 4.41 แสดงการตอบสนองของต้นยาสูบแต่ละชนิดต่อเชื้อ *X. campestris* pv. *glycinae* (ก) ต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อ (ข) ต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* ที่ไม่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* ที่ติดเชื้อ (ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* ที่ไม่ติดเชื้อ (ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* ที่ติดเชื้อ (ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR* ที่ไม่ติดเชื้อ (จ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *DFR* ที่ติดเชื้อ (จ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* ที่ไม่ติดเชื้อ (ซ) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* ที่ติดเชื้อ

ผลการทดลองที่ได้ อาจเป็นเพราะว่ายีนที่ถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบมีการแสดงออกต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน Lund และคณะ (1998) พบว่ามะเขือเทศสายพันธุ์ Never ripe ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยเอทิลีน แสดงอาการของโรคคลดลงหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียก่อโรครุนแรงในพืช (*X. campestris* pv. *vesicatoria* และ *P. syringae* pv. *tomato*) และเชื้อราก่อโรคพืช (*F. oxysporum* sp. *lcopersici*) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติ หรืออาจเป็นเพราะว่ายีนที่เกี่ยวข้องในการต้านทานต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชมีการทำงานร่วมกันหลายยีน หรืออาจขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างอายุของพืชและการต้านทานต่อโรค Julianne และคณะ (2002) พบว่าต้นอะราบิโดรอปซิสที่มีใบแก่จำนวนมากสามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรครุนแรง *P. syringae* pv. *tomato* หรือ *maculicola* เพิ่มขึ้นหรือทำให้ไวต่อเชื่อน้อยลง Koch และ Mew (1991) ต้นข้าวที่มีอายุใบมากขึ้นจะมีความไวต่อเชื้อ *X. campestris* pv. *oryzae* และ *Pyricularia oryzae* ลดลง (Roumen และคณะ. 1992) ต้นข้าวสาลีที่มีทั้งใบอ่อนและใบแก่ใกล้เคียงกันจะแสดงการต้านทานต่อเชื้อ *Puccinia recondite* sp. *tritici* (Pretorius และคณะ. 1988) และต้นยาสูบจะแสดงการต้านทานต่อเชื้อ *Peronospora tabacina* (Reuveni และคณะ. 1986)

4.3.2 ผลการทดสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

จากการทดสอบเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุ 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* หลังจากได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ได้ผลดังต่อไปนี้

4.3.2.1 เชื้อ *A. alternata*

ผลการศึกษาพบว่าปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดลงในต้นยาสูบที่ทดสอบทุกชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2* มีรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดน้อยที่สุด (ตารางที่ 4.1)

4.3.2.2 เชื้อ *F. moniliforme*

ผลการศึกษาพบว่าปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดลงในต้นยาสูบที่ทดสอบทุกชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAP2* มีรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดน้อยที่สุด (ตารางที่ 4.2)

4.3.2.3 เชื้อ *P. syringae* pv. *sesame*

ผลการศึกษาพบว่าปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดลงในต้นยาสูบที่ทดสอบทุกชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ต้นยาสูบปกติมีรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดน้อยที่สุด (ตารางที่ 4.3)

4.3.2.4 เชื้อ *X. campestris* pv. *glycinae*

ผลการศึกษพบว่าปริมาณรงควัตถุทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดลงในต้นยาสูบที่ทดสอบทุกชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR* มีรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดน้อยที่สุด (ตารางที่ 4.4)

Barth และ Conklin (2003) ได้ศึกษาเนื้อเยื่อใบของอะราบิโดรอปซิสที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *lcd1-1* (lower cell density) เปรียบเทียบกับต้นปกติ หลังจากได้รับเชื้อ *P. syringae* พบว่าปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์ เอและบี) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในเนื้อเยื่ออะราบิโดรอปซิสลดลงต่ำกว่าต้นปกติที่ไม่ได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Sudhakar และคณะ (2007) ศึกษาการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อ Cucumber mosaic virus ในใบมะเขือเทศสายพันธุ์ PKM1 ที่ได้รับรังสีไอโซนและทำให้ติดเชื้อดังกล่าว พบว่าปริมาณของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์ เอ, บีและแคโรทีนอยด์) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลงต่ำกว่าต้นปกติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.1 ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ *A. alternata* เป็นเวลา 10 วัน

ต้นยาสูบ	Chlorophyll A (g/Fw)		Chlorophyll B(g/Fw)		Carotenoid (g/Fw)	
	C	T	C	T	C	T
WT	956.309 ^a	550.345 ^{bcd}	213.809 ^{ab}	218.183 ^a	359.323 ^a	244.914 ^{bcd}
PAL2	758.503 ^{abcd}	239.104 ^f	189.298 ^{ab}	92.365 ^b	284.925 ^{abc}	170.936 ^d
CHS	859.628 ^{ab}	468.571 ^{def}	227.614 ^a	220.735 ^a	332.687 ^{ab}	250.338 ^{bcd}
DFR	797.974 ^{abc}	373.990 ^{cf}	284.849 ^a	210.519 ^{ab}	279.120 ^{abc}	210.423 ^{cd}
PAP2	620.706 ^{bcd}	442.478 ^{cf}	276.222 ^a	177.969 ^{ab}	281.256 ^{abc}	196.521 ^{cd}

หมายเหตุ: WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS*), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR*), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAP2*), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

ตารางที่ 4.2 ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ *F. moniliforme* เป็นเวลา 10 วัน

สาร ต้นยาสูบ	Chlorophyll A (g/Fw)		Chlorophyll B(g/Fw)		Carotenoid (g/Fw)	
	C	T	C	T	C	T
WT	775.083 ^{bc}	323.266 ^e	253.558 ^{ab}	134.767 ^{cd}	308.983 ^{bc}	219.828 ^{cde}
PAL2	625.905 ^{cd}	220.138 ^e	191.350 ^{bc}	74.843 ^d	282.534 ^{bc}	143.408 ^{ef}
CHS	961.530 ^{ab}	446.394 ^{de}	265.775 ^{ab}	231.275 ^{ab}	321.614 ^b	247.270 ^{bcd}
DFR	829.585 ^{bc}	349.308 ^{de}	311.724 ^a	151.021 ^{cd}	300.661 ^{bc}	187.231 ^{def}
PAP2	1221.470 ^a	201.222 ^e	238.602 ^{ab}	83.883 ^d	460.189 ^a	111.329 ^f

หมายเหตุ: WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS*), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR*), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAP2*), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกระดับความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

ตารางที่ 4.3 ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ *P. syringae* pv. *sesame* เป็นเวลา 14 วัน

สาร ต้นยาสูบ	Chlorophyll A (g/Fw)		Chlorophyll B (g/Fw)		Carotenoid (g/Fw)	
	C	T	C	T	C	T
WT	970.710 ^{ab}	346.006 ^e	350.098 ^{ab}	167.255 ^{cd}	359.323 ^a	244.914 ^{bcd}
PAL2	673.074 ^{bcd}	417.154 ^{de}	268.093 ^{bcd}	159.977 ^d	284.925 ^{abc}	170.936 ^d
CHS	1053.358 ^a	868.067 ^{abc}	418.359 ^a	355.585 ^{ab}	332.687 ^{ab}	250.338 ^{bcd}
DFR	818.326 ^{abc}	407.508 ^{de}	389.700 ^a	209.952 ^{cd}	279.120 ^{abc}	210.423 ^{cd}
PAP2	945.970 ^{ab}	614.024 ^{cde}	278.058 ^{bc}	213.756 ^{cd}	281.526 ^{abc}	196.521 ^{cd}

หมายเหตุ: WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS*), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR*), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAP2*), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกระดับความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

ตารางที่ 4.4 ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ *X. campestris* pv. *glycinae* เป็นเวลา 14 วัน

สาร ต้นยาสูบ	Chlorophyll A (g/Fw)		Chlorophyll B(g/Fw)		Carotenoid (g/Fw)	
	C	T	C	T	C	T
WT	989.651 ^a	779.937 ^{ab}	237.047 ^a	178.199 ^a	365.510 ^a	278.348 ^{abc}
PAL2	744.004 ^{ab}	432.049 ^b	182.707 ^a	168.959 ^a	305.219 ^{ab}	239.148 ^{abc}
CHS	743.863 ^{ab}	431.980 ^b	261.684 ^a	177.372 ^a	240.641 ^{abc}	201.152 ^{bc}
DFR	733.689 ^{ab}	425.702 ^b	209.685 ^a	178.474 ^a	252.435 ^{abc}	171.736 ^c
PAP2	738.543 ^{ab}	595.297 ^b	211.140 ^a	177.266 ^a	320.710 ^{ab}	267.335 ^{abc}

หมายเหตุ; WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS*), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR*), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAP2*), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

4.3.3 ผลของการตรวจสอบสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรครในพืช

ทำการตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ เบนโซควิโนน (เบนโซควิโนน), เฟลวานอน (นารินจินิน), เฟลวาน (ลูทีโอลิน, อะพิจินิน), เฟลวานอล (ไมริเซดิน, กิวเซดิน และเคเอ็มพีรอล) แทนนิน (แกลโลแทนนิน) และแอนโทไซยานิน (เคลปนิคิน, ไชยานิน และเพลาโกนิคิน) จากต้นยาสูบปกติเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* หลังจากได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรครในพืช โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้ผลดังต่อไปนี้

4.3.3.1 เชื้อ *A. alternata*

ผลการศึกษาแสดงได้ว่าสารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกชนิดที่ตรวจสอบอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบ *CHS* ที่ใช้เป็นชุดควบคุมและให้ปริมาณสารสูงที่สุดในทุกวิธีการทดลอง ส่วนต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*, *DFR* และ *PAP2* ที่ได้รับเชื้อ *A. alternata* มีแนวโน้มการให้สารที่สูงกว่าชุดควบคุมมากกว่าต้นยาสูบปกติ (ตารางที่ 4.5)

4.3.3.2 เชื้อ *Fusarium moniliforme*

ผลการศึกษาแสดงได้ว่าสารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *CHS* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกชนิดที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชนิดอื่นๆและต้นยาสูบ *CHS* ที่ใช้เป็นชุดควบคุม ส่วนต้นยาสูบปกติ, *PAL2*, *DFR* และ *PAP2* มีสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์เพิ่มขึ้นบางชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชุดควบคุม (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ *A. alternata* เป็นเวลา 10 วัน

ต้นยาสูบ สาร(g/Fw)	WT		PAL2		CHS		DFR		PAP2	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Benzoquinone	0.358 ^d	0.537 ^{cd}	0.478 ^{cd}	0.716 ^{bc}	0.418 ^d	0.957 ^a	0.480 ^{cd}	0.710 ^{bc}	0.387 ^d	0.794 ^{ab}
Naringenin	3.777 ^d	4.796 ^{bcd}	4.361 ^{cd}	5.473 ^{bc}	5.963 ^b	7.481 ^a	5.016 ^{bcd}	6.048 ^b	3.959 ^{cd}	4.786 ^{bcd}
Luteolin	2.353 ^d	3.388 ^{bc}	2.503 ^{cd}	3.554 ^b	3.692 ^b	4.745 ^a	3.297 ^{bcd}	3.795 ^b	2.545 ^{cd}	3.118 ^{bcd}
Apigenin	3.434 ^c	3.815 ^{bc}	3.900 ^{bc}	5.076 ^b	5.145 ^b	6.436 ^a	4.272 ^{bc}	5.120 ^b	3.426 ^c	4.121 ^{bc}
Myricetin	0.632 ^d	0.879 ^{cd}	0.850 ^{cd}	1.188 ^b	0.760 ^d	1.520 ^a	0.838 ^{cd}	1.107 ^{bc}	0.732 ^d	1.203 ^b
Quercetin	0.723 ^d	0.999 ^{bcd}	0.937 ^{cd}	1.296 ^b	0.895 ^{cd}	1.681 ^a	0.964 ^{bcd}	1.232 ^{bc}	0.824 ^d	1.305 ^b
Kaempferal	0.897 ^c	1.231 ^{bc}	1.093 ^{bc}	1.482 ^b	1.162 ^{bc}	1.973 ^a	1.210 ^{bc}	1.465 ^b	0.985 ^c	1.484 ^b
Gallotannin	0.036 ^d	0.054 ^{bcd}	0.049 ^{cd}	0.086 ^b	0.038 ^d	0.128 ^a	0.043 ^d	0.079 ^{bc}	0.040 ^d	0.087 ^b
Delpinidin	0.039 ^d	0.058 ^{cd}	0.052 ^d	0.092 ^b	0.040 ^d	0.126 ^a	0.046 ^d	0.084 ^{bc}	0.043 ^d	0.092 ^b
Cyanidin	0.047 ^d	0.072 ^{cd}	0.060 ^d	0.114 ^{ab}	0.047 ^d	0.143 ^a	0.054 ^d	0.100 ^{bc}	0.049 ^d	0.111 ^{ab}
Pelagonidin	0.062 ^d	0.095 ^{cd}	0.077 ^d	0.150 ^{ab}	0.061 ^d	0.180 ^a	0.073 ^d	0.128 ^{bc}	0.062 ^d	0.143 ^{ab}

หมายเหตุ: WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน PAL2), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน CHS), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน DFR), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน PAP2), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ของต้นยาสูบที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ *F. moniliforme* เป็นเวลา 10 วัน

ต้นยาสูบ สาร(g/Fw)	WT		PAL2		CHS		DFR		PAP2	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Benzoquinone	0.419 ^{de}	0.768 ^b	0.512 ^{cd}	0.957 ^a	0.512 ^{cd}	0.937 ^a	0.486 ^{cd}	0.868 ^{ab}	0.318 ^e	0.604 ^c
Naringenin	2.776 ^d	5.224 ^{bc}	3.170 ^d	5.985 ^{bc}	4.832 ^c	9.011 ^a	3.349 ^d	6.380 ^b	2.548 ^d	4.779 ^c
Luteolin	1.662 ^e	3.212 ^{bcd}	1.905 ^e	3.771 ^b	2.627 ^{cd}	5.225 ^a	2.304 ^{de}	4.113 ^b	1.802 ^e	3.344 ^{bc}
Apigenin	2.240 ^c	4.491 ^{bc}	2.673 ^{de}	5.175 ^b	3.769 ^{cd}	7.344 ^a	2.949 ^{de}	5.587 ^b	2.541 ^{de}	4.764 ^{bc}
Myricetin	0.701 ^d	1.296 ^b	0.866 ^{cd}	1.647 ^a	0.875 ^{cd}	1.661 ^a	0.795 ^d	1.400 ^{ab}	0.614 ^d	1.145 ^{bc}
Quercetin	0.780 ^c	1.532 ^{bc}	0.943 ^c	1.822 ^{ab}	1.029 ^{de}	2.025 ^a	0.892 ^c	1.750 ^{ab}	0.675 ^e	1.330 ^{cd}
Kaempferal	0.927 ^c	1.711 ^{bc}	1.074 ^{de}	2.113 ^{ab}	1.175 ^{de}	2.314 ^a	1.075 ^{de}	1.853 ^{abc}	0.790 ^e	1.544 ^{cd}
Gallotannin	0.046 ^{cd}	0.087 ^b	0.051 ^{cd}	0.097 ^{ab}	0.055 ^c	0.109 ^a	0.051 ^{cd}	0.094 ^{ab}	0.034 ^d	0.064 ^c
Delpinidin	0.049 ^d	0.095 ^c	0.055 ^d	0.115 ^{ab}	0.065 ^d	0.126 ^a	0.055 ^d	0.107 ^{bc}	0.051 ^d	0.095 ^c
Cyanidin	0.061 ^{cd}	0.106 ^b	0.063 ^{cd}	0.115 ^{ab}	0.068 ^c	0.134 ^a	0.068 ^c	0.121 ^{ab}	0.042 ^d	0.080 ^c
Pelagonidin	0.081 ^{cd}	0.140 ^b	0.081 ^{cd}	0.153 ^{ab}	0.091 ^c	0.174 ^a	0.090 ^c	0.158 ^{ab}	0.051 ^d	0.099 ^c

หมายเหตุ; WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ PAL2), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ CHS), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ DFR), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ PAP2), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

4.3.3.3 เชื้อ *P. syringae* pv. *sesami*

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์เกือบทุกชนิดที่ตรวจสอบในต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ PAL2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อ PAL2 ที่ใช้เป็นชุดควบคุม ยกเว้นสารกลุ่มแอสโทไซยานิน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชนิดอื่นๆ พบว่ามีปริมาณสารในกลุ่มที่สูงที่สุดส่วนต้นยาสูบปกติ, CHS, DFR และ PAP2 มีสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์เพิ่มขึ้นบางชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชนิดอื่นๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ *P. syringae* pv. *sesami* เป็นเวลา 14 วัน

ต้นยาสูบ สาร(g/Fw)	WT		PAL2		CHS		DFR		PAP2	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Benzoquinone	0.364 ^c	0.537 ^{abc}	0.452 ^c	0.771 ^a	0.383 ^c	0.723 ^{ab}	0.482 ^{bc}	0.711 ^{ab}	0.499 ^{bc}	0.720 ^{ab}
Naringenin	3.215 ^c	4.193 ^{bc}	3.853 ^{bc}	6.840 ^a	3.248 ^c	5.796 ^{ab}	3.313 ^c	4.882 ^{bc}	4.293 ^{bc}	5.588 ^{ab}
Luteolin	1.865 ^d	2.896 ^{bc}	2.087 ^{cd}	4.032 ^a	1.865 ^d	3.641 ^{ab}	2.232 ^{cd}	2.951 ^{bc}	2.754 ^{bcd}	2.924 ^{bc}
Apigenin	2.902 ^{cd}	3.465 ^{bcd}	2.824 ^{cd}	5.447 ^a	2.899 ^{cd}	5.421 ^a	2.734 ^d	4.336 ^{ab}	2.572 ^d	3.986 ^{bc}
Myricetin	0.354 ^f	0.563 ^{cde}	0.829 ^b	1.383 ^a	0.372 ^{ef}	0.733 ^{bc}	0.410 ^{def}	0.565 ^{cde}	0.608 ^{cd}	0.712 ^{bc}
Quercetin	0.423 ^{de}	0.641 ^{cd}	0.910 ^b	1.599 ^a	0.368 ^e	0.734 ^{bc}	0.498 ^{cde}	0.670 ^{bcd}	0.632 ^{cd}	0.733 ^{bc}
Kaempferal	0.560 ^{ef}	0.874 ^{bcd}	1.048 ^b	1.893 ^a	0.511 ^f	0.996 ^{bc}	0.676 ^{def}	0.878 ^{bcd}	0.777 ^{cde}	0.979 ^{bc}
Gallotannin	0.016 ^d	0.025 ^d	0.048 ^c	0.075 ^a	0.015 ^d	0.030 ^d	0.017 ^d	0.027 ^d	0.059 ^{bc}	0.072 ^{ab}
Delpinidin	0.016 ^c	0.027 ^{de}	0.050 ^{bc}	0.078 ^a	0.019 ^{de}	0.038 ^{cd}	0.018 ^c	0.030 ^{de}	0.058 ^b	0.089 ^a
Cyanidin	0.017 ^b	0.032 ^{ab}	0.058 ^{ab}	0.257 ^a	0.021 ^b	0.044 ^{ab}	0.020 ^b	0.037 ^{ab}	0.070 ^{ab}	0.246 ^{ab}
Pelagonidin	0.024 ^c	0.041 ^c	0.074 ^b	0.138 ^a	0.024 ^c	0.046 ^c	0.025 ^c	0.047 ^c	0.084 ^b	0.131 ^a

หมายเหตุ: WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS*), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR*), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAP2*), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

4.3.3.4 เชื้อ *X. campestris* pv. *glycinae*

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *PAL2* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกชนิดที่ตรวจสอบอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชนิดอื่นๆ และต้นยาสูบ *PAL2* ที่ใช้เป็นชุดควบคุม ส่วนต้นยาสูบปกติ *CHS*, *DFR* และ *PAP2* มีสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์เพิ่มขึ้นบางชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชนิดอื่นๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ของต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ *X. campestris* pv. *glycinae* เป็นเวลา 14 วัน

ต้นยาสูบ สาร(g/Fw)	WT		PAL2		CHS		DFR		PAP2	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Benzoquinone	0.372 ^c	0.537 ^{cde}	0.623 ^{cd}	1.319 ^a	0.383 ^{de}	0.918 ^b	0.482 ^{de}	0.731 ^{bc}	0.440 ^{de}	0.535 ^{cde}
Naringenin	2.725 ^d	3.248 ^{cd}	4.218 ^{bc}	7.098 ^a	2.988 ^d	5.005 ^b	2.999 ^d	3.465 ^{cd}	2.906 ^d	3.262 ^{cd}
Luteolin	2.055 ^c	2.473 ^c	2.540 ^c	6.8489 ^a	2.048 ^c	3.952 ^b	2.054 ^c	2.519 ^c	1.754 ^c	2.110 ^c
Apigenin	2.851 ^{cd}	3.698 ^{bc}	3.606 ^{bcd}	6.188 ^a	2.612 ^{cd}	4.252 ^b	2.703 ^{cd}	3.728 ^{bc}	2.490 ^d	3.143 ^{bcd}
Myricetin	0.428 ^f	0.538 ^{ef}	1.007 ^b	1.884 ^a	0.513 ^{ef}	0.903 ^{bc}	0.520 ^{ef}	0.660 ^{def}	0.726 ^{cde}	0.851 ^{bcd}
Quercetin	0.504 ^c	0.609 ^{de}	1.108 ^b	2.041 ^a	0.596 ^{de}	0.894 ^{bc}	0.563 ^{de}	0.646 ^{cde}	0.796 ^{cd}	0.877 ^{bc}
Kaempferal	0.637 ^d	0.810 ^{cd}	1.281 ^b	2.278 ^a	0.751 ^{cd}	1.293 ^b	0.719 ^{cd}	0.885 ^{cd}	0.913 ^{cd}	1.022 ^{bc}
Gallotannin	0.021 ^f	0.033 ^{ef}	0.068 ^{bc}	0.129 ^a	0.024 ^f	0.044 ^{de}	0.021 ^f	0.035 ^{ef}	0.057 ^{cd}	0.079 ^b
Delpinidin	0.023 ^c	0.039 ^{de}	0.073 ^{bc}	0.153 ^a	0.022 ^c	0.050 ^d	0.022 ^c	0.040 ^{dc}	0.059 ^{cd}	0.086 ^b
Cyanidin	0.025 ^f	0.034 ^{ef}	0.087 ^{bc}	0.181 ^a	0.028 ^f	0.054 ^{de}	0.024 ^f	0.042 ^{ef}	0.067 ^{cd}	0.096 ^b
Pelagonidin	0.031 ^c	0.042 ^c	0.113 ^b	0.266 ^a	0.039 ^c	0.070 ^{bc}	0.034 ^c	0.045 ^c	0.085 ^{bc}	0.116 ^b

หมายเหตุ; WT (ต้นยาสูบปกติ), PAL2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2*), CHS (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS*), DFR (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DFR*), PAP2 (ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAP2*), C (ชุดควบคุม) และ T (ต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อ) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p \geq 0.05$) ค่าตัวอักษรบอกลถึงความแตกต่างทางสถิติในแต่ละสาร

จากผลการทดสอบที่ได้อาจเป็นเพราะว่ายีน *CHS* จะแสดงออกเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มในการป้องกันพืชจากโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราและยีน *PAL2* จะแสดงออกเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มในการป้องกันพืชจากโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย แต่ก็ไม่ใช่ว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนอื่นๆ ที่นำมาทดลองจะไม่มีผลต่อการปกป้องพืช ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสาเหตุหลายประการ เช่น ยีนแต่ละยีนมีผลต่อการผลิตสารในการป้องกันพืชที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชต่างสายพันธุ์กัน ระยะเวลาที่ได้รับเชื้อก่อโรค และยีนบางยีนต้องทำงานร่วมกับยีนอื่นๆ มากกว่า 1 ยีนในการป้องกันพืชต่อเชื้อก่อโรคพืช เป็นต้น Hammerschmidt (1999) ศึกษากิจกรรมของ *PAL* ในพืชชนิดต่างๆ พบว่า *PAL* เพิ่มขึ้นด้วยสภาวะเครียดทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต เช่นการได้รับเชื้อแบคทีเรีย Zheng และคณะ (2005) พบว่าต้นพริกไทยที่ได้รับเชื้อ *Phytophthora capsici* จะชักนำให้มีการสะสมสารโพลีฟีนอลออกซิเดส (*PPO*) และฟีนอลอะละนินแอมโมเนียไลเอส (*PAL*) ในรากของต้นพริกไทย เพิ่มขึ้นทีละน้อยระหว่าง 3 วันแรกหลังจากได้รับเชื้อ และเมื่อต้นพริกไทยได้รับเชื้อเป็นเวลานานๆ ระดับของ

PAL จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับทรินเทเมนต์อื่นๆ และชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลอง แสดงได้ว่าการชักนำ *PAL* ด้วยเชื้อ *P. capsici* อาจส่งผลให้มีการกระตุ้นในการป้องกันในช่วงแรก ซึ่งต่อมาเชื้อทำให้เซลล์พืชเกิดความเสียหายมากขึ้น และส่งผลในการยับยั้งการสร้าง *PAL* ในราก ของต้นพริกไทย Schmelzer และคณะ (1984) ศึกษาช่วงเวลาในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์สารไฟโตอะเล็กซินในถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยตรวจสอบ ปริมาณของเอนไซม์ในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ *PAL*, *4CL* และ *CHS* ในการตอบสนองต่อเชื้อรา *P. megasporina* pv. *glycinae* ในไฮโปคอติลของถั่วเหลือง พบว่าเอนไซม์ *PAL*, *4CL* และ *CHS* ใน mRNA เพิ่มขึ้นสูงสุด ในช่วงเวลาเดียวกันที่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากถ่ายเชื้อราเข้าไปในถั่วเหลือง Kortekamp (2006) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันในใบองุ่น หลังจากได้รับเชื้อ *Plasmopara viticola* และเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเมแทบอลิซึมของฟีนิลโพรพานอยด์พบว่าองุ่นสายพันธุ์ Riesling (ไวต์โรค) มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการป้องกันจำนวนมากใน 48 ชั่วโมงแรก หลังจากได้รับเชื้อก่อโรคพืช *P. cubensis* ได้แก่ ยีน *PR-2*, *PR-3*, *PR-4* และ *PGTP* และในใบองุ่นที่ติดเชื้อ *P. viticola* ไม่มีการแสดงออกของยีนต่างๆ ในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ *DFR*, *F3H* และ *LDOX*

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 ผลของสารสกัดจากอบเชยต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

5.1.1 ผลของสารสกัดจากอบเชยด้วยน้ำ

จากการศึกษาผลของผงอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในอาหาร PDA และเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA โดยการผสมผงอบเชยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนทำการฆ่าเชื้ออาหารด้วยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที สรุปได้ว่าอบเชยที่ความเข้มข้น 0-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช มี 2 สายพันธุ์ คือ เชื้อรา *A. flavus* และ *A. paraciticus* ทั้ง 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร อบเชยที่ความเข้มข้น 200-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช มี 9 สายพันธุ์ (เชื้อรา 7 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์) คือ เชื้อรา *A. alternata*, *F. moniliforme*, *S. roftsii*, *Tricoderma* spp. ทั้ง 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร *A.niger* และ *Rhizopus* spp. 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens*, *C. aquaticum* และ *X. campestris* pv. *glycinae* ทั้ง 10^6 และ 10^7 โคลนีต่อมิลลิลิตร อบเชยที่ความเข้มข้น 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช มี 4 สายพันธุ์ (เชื้อรา 3 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์) คือ *A.niger* 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร *Rhizopus* spp., *Tricoderma* spp. ทั้ง 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *sesami* ทั้ง 10^6 และ 10^7 โคลนีต่อมิลลิลิตร อบเชยที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช มี 3 สายพันธุ์ (เชื้อรา 2 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์) คือ เชื้อรา *A.niger* 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร *S. roftsii* ทั้ง 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *sesami* ทั้ง 10^6 และ 10^7 โคลนีต่อมิลลิลิตร

5.1.2 ผลของสารสกัดจากอบเชยด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากอบเชย ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA และเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NA โดยการสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่าสารสกัดจากอบเชยที่ความเข้มข้น 0-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ จุลินทรีย์ก่อโรคในพืช มี 2 สายพันธุ์ คือ เชื้อรา *Rhizopus* sp. ที่ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและ *S. roftsii* ทั้ง 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากอบเชยที่ความเข้มข้น 200-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช มี 11 สายพันธุ์ (เชื้อรา 7 สายพันธุ์และแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์) คือเชื้อ *A. flavus*, *A. paraciticus*, *A. niger*, *A. alternata*, *F. moniliform*, *Tricoderma* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้ง 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร, *Rhizopus* spp. 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แบคทีเรีย *A. tumefaciens*, *C. aquaticum*, *P. syringae* pv. *sesami* และ *X. campestris* pv. *glycinae* ทั้ง 10^6 และ 10^7 โคลนีต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากอบเชยที่ความเข้มข้น 400-800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช คือ เชื้อรา *Tricoderma* spp. ทั้ง 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

5.2 ผลของการโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

จากการโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์จาก cDNA ของอะราบิโดปซิสด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณที่ถอดและแปลรหัสให้กรดอะมิโน สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ครอบคลุมบริเวณ ORF ของ *PAL2* แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM เพื่อเพิ่มจำนวน พบว่าได้โคลนที่อาจจะเป็น *PAL2* จำนวนทั้งหมด 5 โคลน และนำโคลนทั้งหมดมาตรวจสอบโคลนที่คาดว่าจะ เป็น *PAL2* พบว่าได้โคลนที่เป็น *PAL2* จำนวน 2 โคลน นำมาทำให้บริสุทธิ์ เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pBI121 ตรวจสอบการเชื่อมต่อโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* พบว่าสามารถโคลนยีน *PAL2* ได้ 5 โคลน นำโคลนที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนมาตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* เพื่อยืนยันว่ามี *PAL2* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทาง ถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ที่มี *PAL2* แทรกอยู่โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA 4404 เข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบ เพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นแคลลัสและยอด นำยอดไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ผสมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ให้เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ พบว่าได้ต้นยาสูบที่เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ 56 ต้น

5.3 ผลของการทดสอบต้นยาสูบต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

5.3.1 ผลของการทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

จากการทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาต่อการตอบสนองของต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* หลังจากติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ได้แก่ เชื้อ *A. alternata*, *F. moniforme*, *P. syringae* pv. *sesami* และ *X. campestris* pv. *glycinae* สรุปได้ว่าต้นยาสูบที่ได้รับยีนที่ได้รับยีน *PAP2* และ *DFR* มีแนวโน้มในการต้านทานต่อโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *A. alternata* มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ต้นยาสูบ *DFR* ตามลำดับ ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS* มีแนวโน้มในการต้านทานต่อโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. moniforme* มากที่สุด ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CHS* มีแนวโน้มในการต้านทานต่อโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. syringae* pv. *sesami* มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ต้นยาสูบ *PAL2*, *PAP2* และ *DFR* ตามลำดับ และต้นยาสูบที่ได้รับยีน *PAL2* มี

แนวโน้มในการต้านทานต่อโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ *X. campestris* pv. *glycinae* มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ต้นยาสูบ *CHS* ตามลำดับ

5.3.2 สรุปผลของการทดสอบปริมาณรงควัตถุในต้นยาสูบต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

จากการทดสอบเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุ 3 ชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ในต้นยาสูบปกติ *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* หลังจากได้รับเชื้อ *A. alternata*, *F. moniliforme*, *P. syringae* pv. *sesami* และ *X. campestris* pv. *glycinae* พบว่าปริมาณรงควัตถุ ทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มลดลงในต้นยาสูบทุกชนิดที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5.3.3 ผลของการทดสอบปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบ ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

การทดสอบปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ ได้แก่ เบนโซควิโนน (เบนโซควิโนน), เฟลวานอน (นารินจินิน), เฟลโวน (ลูทีโอลิน, อะพิจินิน), เฟลโวนอล (ไมริเซติน, คิวเซตินและ เคเอ็มพีรอล), แทนนิน (แกลโลแทนนิน) และแอนโทไซยานิน (เคิลปีนิน, ไซยานินและเพลาโกนิน) จากต้นยาสูบปกติเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2*, *CHS*, *DFR* และ *PAP2* หลังจากได้รับเชื้อ *A. alternata*, *F. moniliforme*, *P. syringae* pv. *sesame* และ *X. campestris* pv. *glycinae* โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ผลการทดสอบสรุปได้ว่าสารกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *CHS* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของสารครบทุกชนิดที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชนิดอื่นๆ และต้นยาสูบ *CHS* ที่ใช้เป็นชุดควบคุม หลังจากได้รับเชื้อรา *A. alternata* และ *F. moniliforme* และสารกลุ่มฟีนอลโพรพานอยด์ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAL2* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของสารทุกชนิดที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบชนิดอื่นๆ และต้นยาสูบ *PAL2* ที่ใช้เป็นชุดควบคุม หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *sesame* และ *X. campestris* pv. *glycinae*

บรรณานุกรม

- กนกพร สมพรไพลิน. 2546. บทปฏิบัติการเทคโนโลยีทางพืช เรื่อง การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ของ
ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง.
- กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2528. คู่มือการป้องกันและกำจัดโรคพืชโดยใช้สารเคมี. กรมวิชาการ
เกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร. 102 น.
- เจริญ อัจฉราฤทธิ์, วรเทพ ปัญญา漾ค์ และเอกชัย รัชตโกมุท. 2527. โครงการพิเศษปริญญา
เกศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2518. “ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของ
จุลินทรีย์” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- ปริศนา เหมสุจิ. 2534. “โรคเน่าแห้งของกล้วยไม้ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii*” วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- พรทิพย์ ชมภูมิ่ง. 2536. “การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศควบคุม *Aspergillus
flavus* Link. และสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดภายใต้สภาพในโรงเก็บ”
วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากร มหาวิทยาลัย
มหิดล.
- สุทัศน์ จุงพงศ์. 2540. สมุนไพรพันธุ์ไม้มงคลพระราชทานประจำจังหวัด. ห.จ.ก. ขอนแก่นการพิมพ์.
สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.
- สวัสดิ์ วีระเดช. 2507. โรคของพืช. สำนักพิมพ์โชคชัยเทเวศน์. กรุงเทพมหานคร. 201 น.
- อรุณศรี วงศ์อุไร. 2540. อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. กรุงเทพฯ : กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรม
ส่งเสริมวิชาการเกษตร.
- อรรวรรณ นวีภาพ. 2531. เชื้อก่อโรคในสัตว์. หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทย์
ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ .
- อลิสา บุญทอง. 2528. “ การศึกษาโรคโคนเน่าขาวของถั่วลิสงที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ”
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- Agrios, G.N. 1969. **Plant pathology**. Academic Press, New York. 629 p.
- Atando O.O., Akpan J. and Oluwafemi F. 2007. The potential of some spice essential oils in the
control of *A. parviticus* CFR 223 and aflatoxin production. **Food Control**. 18 : 601-
607.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Awuah R.T. and Kpodo K.A. 1996. High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxin in store ground in Ghana and the use of the microbial assay to assess the inhibitory effect of plant extracts on aflatoxin synthesis. **Mycopathol.** 134(2) : 109-114.
- Barth C. and Conklin L.P. 2003. "The lower cell density of leaf parenchyma in the *Arabidopsis thaliana* mutant *lcd1-1* is associated with increase sensitivity to ozone and virulent *Pseudomonas syringae*." **The Plant Journal.** 35: 206-218.
- Bell A. A. and Wheeler M. H. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanins. **Annu. Rev. Phytopathol.** 24 : 411-451.
- Bednarek P., Schneider B., Svatos A., Oldham N. J. and Hahlbrock K. 2005. Structural complexity differential response to infection and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. **Plant Physiology.** 38 : 1058-1070.
- Bullerman L.B., Lieu Y. and Seier S.A. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oil, cinnamic aldehyde and eugenol. **J. Food Science.** 42 : 1107-1109.
- Chen C.Q., Belenger R.R., Benhamon N. and Pualitz T.C. 2000. Defense enzyme induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Phy Mol Plant Pathology.** 56 : 13-23.
- Cooke R.C. 1980. **Fungi, Man and His Environment.** Longman Group Limited, London. 144 p.
- Cushnie T.P. and Lamb A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 26 : 343-356.
- Dixon R.A. 2001. Natural products and disease resistance. **Nature** 411(2001) : 843-847.
- Dong X., Mindrinos M., Keith R. D. and Frederick M. A. 1991. Induction of *Arabidopsis* defense gene by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. **The Plant Cell.** 3 : 61-72.
- Epstein E., Steinberg M.P., Nelson A.I. and Wei L.S. 1970. Aflatoxin production as affected by environment condition. **J. Food Science.** 35 : 389-392.
- Felton G. W., Korth K. L., Bi J. L., Wesley S. V., Huhmant D. V., Mathews M. C., Murphy J. B., Lamb C. and Dixon R. A. 1999. Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. **Curent Biology.** 9 : 317-320.

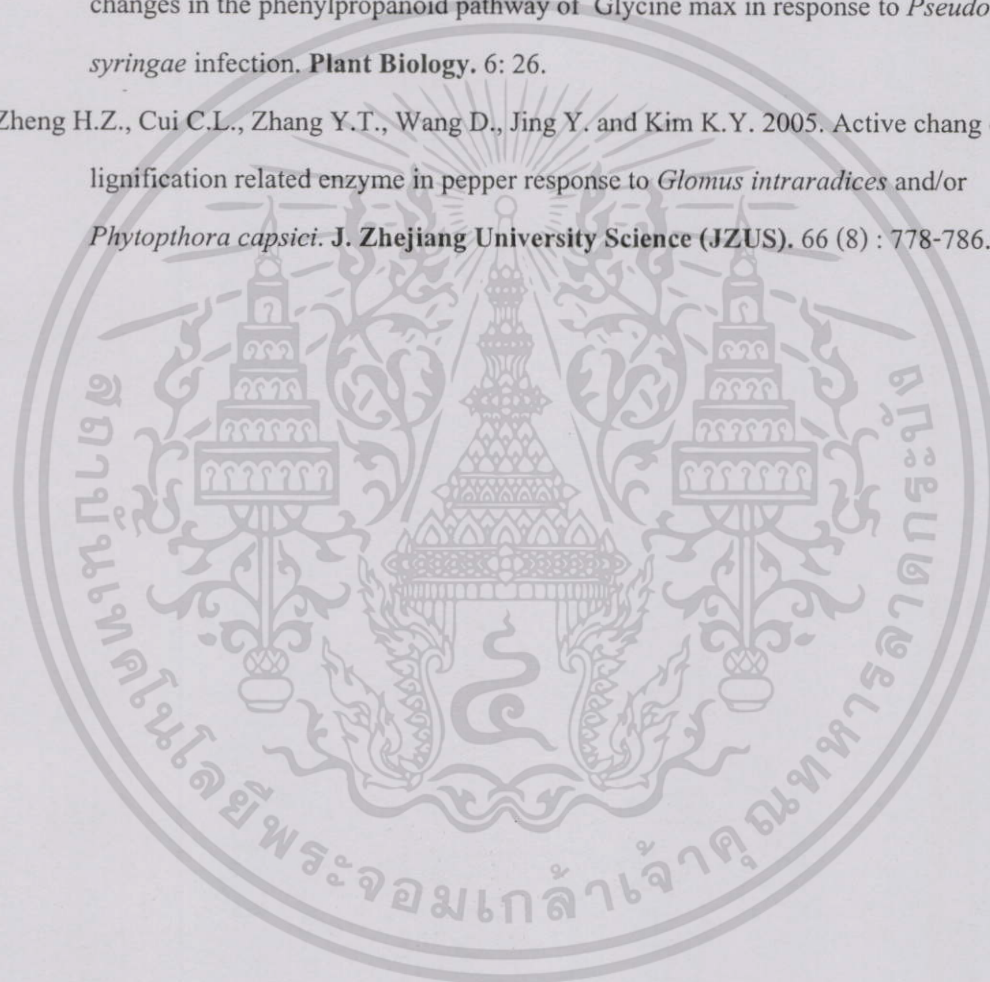
- Gandikota G., Rodney C., Toni M. and Norman G. 2001. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. American Society of Plant Physiologists.
- Gandikota M., Dekochko A., Chen L., Ithal N., Eauquet C. and Reddy A.R. 2001. Development of transgenic rice plants expressing maize anthocyanin gene and increased blast resistance. **Molecular Breeding**. 7: 73-83.
- Garber R.K. and Cotty P.J. 1997. Formation of sclerotia and aflatoxin in developing cotton bolls infected the S strain of *Aspergillus flavus* and potential for biocontrol with an atoxigenic strain. **Phytopathology**. 87 : 940-945.
- Gourama and Bullerman. 1995a. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. **J. Food Protection**. 58(11) : 1249-1256.
- Gourama and Bullerman. 1995b. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus paraciticus* : aflatoxigenic fungi of concern in food and feeds. A Review. **J. Food Protection**. 58(12) : 1395-1404.
- Hammerschmidt R. 1999. Induced disease resistant : How do induced plants stop pathogens. **Phy and Mol Plant Pathology**. 55 : 77-84.
- Harborne J.B. 1989. Methods in plant Biochemistry, Volume 1. **Plant Phenolic**. Academic Press. London.
- Harborne J.B. and Williams C.A. 2000. Advances in flavonoid research since. **Phytochemistry**. 55 : 481-504.
- Hasan H.A.H. and Abdel M.A.Y. 1994. **Inhibitory effect of aqueous leaf extracts of some plants on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus***. Dirasat-Series-B-Pure and Applied-Science. 21 (3) : 215-219.
- Hitokoto H., Morozomi S., Nauka T., Sakai S. and Ueno I. 1980. Inhibitory effect of species on growth and toxin production by toxigenic fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 39 : 818-822.
- Jakobek J. L., Smith J. A. and Lindgren P. B. 1993. Suppression of bean defence responses by *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**. 5 : 57-63.
- Jambunathan S., Banos B.S., Hernandez-Lopez M. and Bosquez M.E. 1999. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. **Mexican J. phytopathology**. 82 : 322-328.

- Julianne V.K., Zaton K., Sarker R. and Robin K.C. 2002. Age related resistance in Arabidopsis is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**. 14 : 479-490.
- Koch M.F. and Mew T.W. 1991. Effects of plant age and leaf maturity on the quantitative resistance of rice cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. **Plant Dis**. 75 : 901-904.
- Korkina L.G.2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to Human health. **Cell. Mol. Biol**. 15;53(1) : 15-25.
- Kortekamp A. 2006. Expression analysis of defence related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non host pathogen. **Plant Physiol Biochem**. 44 (1) : 58-67.
- Kurtzman C.P., Horn B.W. and Hesseltine C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 53 : 147-158.
- Li B.Q., Fu T., Dongyan Y., Mikovits J.A., Ruscetti F.W. and Wang J.M. 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. **Biochem Biophys Res Commun**. 276 : 534-548.
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids : Pigment of photosynthetic Biomembranes. **Method. Enzymol**. 148 : 350-380.
- Line J.E., Brackett R.E. and Wilkinson R.E.1994. Evidence for degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium auranticum*. **J. Food Protection**. 57 : 788-791.
- Lo S., Sugui J.A., Bonham C., Wood K. V. and Nicholson R.L. 1998. MALDI-TOF analysis of mixtures of 3-deoxyanthocyanidins and anthocyanins. **Phytochemistry**. 48 : 1063-1066.
- Lund S.T., Stall R.E. and Klee H.J. 1998. Ethylene regulate the susceptible response to pathogen infection in tomato. **The Plant Cell**. 10 : 371-382.
- Maher E.A., Bate N.J., Elkind W., Dixon R.A. and Lamb C.J. 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. **Plant Biology**. 91 : 7802-7806.
- Mahmoud A.L.E. 1999. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extract of some Egyptian plants. **Letters in Applied Microbiology**. 29 : 110-113.

- Mahmoud M.L., Eibazza Z.E. and Mohamed Z.G. 1992. Aflatoxin production at different relative on gamma irradiated herbs used Egyptian drinks. **Egyptian J. Phamaceutical Sciences**. 33(1-2) : 21-30.
- Marassa W.F.O., Nelson P.E. and Toussoun T.A. 1983. **Toxigenic Fusarium species : Identity and Mycotoxicology**. Pennsylvania State University Press . Univercity Park . London.
- Mengiste T., Chen X., Salmeron J. and Dietrich R. 2003. The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes on R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**. 15 ; 2551-2565.
- Mohammadi M. and Kasemi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenal activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**. 162 : 491-498.
- Montes B.R. and Carvajar M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oil and their components. **J. Food Protection**. 61 (5) : 616-619.
- Morozumi S. 1978. Isolation, Purification and Antibiotic activity of *o*-Methoxycinnamal dehyde from cinnamon. **Appl. Environ. Microbiol.** 36(4) : 577-583.
- Nelson P.E., Toussoun T.A. and Marassa W.F.O. 1983. **Fusarium species : An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania State University Press, Univercity Park and London .
- Northolt D.M. and Bullerman B.L. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environment conditions. **J. Food Protection**. 45(6) : 519-526.
- Padmavati P., Gutkind G., Rondina R.V., de Torres R. and Coussio J.D. 1997. Genus *Baccharis*. II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notoserghila*. **Planta Med.** 49 : 128.
- Pretorius Z.A., Rijkenberg F.H.J. and Wilcoxson R.D. 1988. Effects of growth stage, leaf position and temperature on adult plant resistance of wheat infected by *Puccinia recondita* f.sp. *tritini*. **Plant Pathol.** 37 : 36-44.
- Ray H., Douches D.S. and Hammerschmidt R. 1998. Transformation of potato with cucumber peroxidase : Expression and disease response. **Phy. Mol. Plant Pathol.** 55 : 77-84.
- Rueveni M., Tuzun S., Cole J.S., Seigel M.R. and Kuc J. 1986. The effects of plant age and leaf position on the susceptibility of tobacco to blue mold caused by *Peronospora tabacina*. **Phytopathology**. 76 : 455-458.

- Roumen E.C., Bonman J.M. and Parlevliet J.E. 1992. Leaf age related partial resistance to *Pyricularia oryzae* in tropical lowland rice cultivars as measured by number of sporulating lesions. **Phytopathology**. 82 : 1414-1417.
- Schmelzer E., Borner H., Grisebath H., Ebel J. and Hahlbrock K. 1984. Phytoalexin synthesis in soybean (*Glycine max*) similar time courses of mRNA induction in hypocotyls infected with a fungal pathogen and in cell cultures treated with fungal elicitor. **Elsevier Science Publisher**. 172 : 59-63.
- Shabala S.N., Shabala S.I., Martynenko A.I., Babourina O. and Newman I.A. 1999. Salinity effect on bioelectric activity, growth Na^+ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves : A comparative survey and prospect for screening. **Aust. J. Plant Physiol.** 25: 609-616.
- Shadle G.L., Wesley S.V., Korth K.L., Chen F., Lamb C. and Dixon R.A. 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**. 64 : 155-161.
- Shelet L.A. 1983. Antimicrobial effects of spices. **J. Food Safety**. 629-644.
- Soliman K.M. and Badeaa R.I. 2002. Effects of oil extracted from some medicinal plant on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**. 40 : 1669-1675.
- Souza S.M.C., Pereira M.C., Angelico C.L. and Pimenta C.J. 2004. Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread making products. **Cienc. Agrotec.** 685-690.
- Sudhakar N., Nagendra P.D., Mohan N. and Muragesan K. 2007. "Induction of system resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against Cucumber mosaic virus by using ozone." **Journal of Virological Methods**. 139: 71-77.
- Tereschuk M.L., Riera M.V., Castro G.R. and Abdala L.R. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. **J Ethnopharmacol.** 56 : 227-232.
- Velluti A., Sanchis V., Ramos A.J., Egido J. and Marin S. 2003. Inhibitory effects of cinnamon, clove, lemongras, oregano and palmarose oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International J. Food Microbiology**. 89 : 145-154.

- Volko S.M., Boller T. and Ausubel F.M. 1998. Isolation of new Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility to *Pseudomonas syringae* by direct screening. **Gentics**. 149 : 537-548.
- Wang S.Y. , Chen P.F. and Chang S.T. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**. 96 : 813-818.
- Zabala G., Zou J., Tuteja J., Gonzalez D.O., Clough S.J. and Vodkin L.O. 2006. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of Glycine max in response to *Pseudomonas syringae* infection. **Plant Biology**. 6: 26.
- Zheng H.Z., Cui C.L., Zhang Y.T., Wang D., Jing Y. and Kim K.Y. 2005. Active change of lignification related enzyme in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. **J. Zhejiang University Science (JZUS)**. 66 (8) : 778-786.





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA (Potato dextrose agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB	24	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 5.6 ด้วย NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB (Potato dextrose broth)

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB	24	กรัมต่อลิตร
--------------------------	----	-------------

ปรับพีเอชเป็น 5.6 ด้วย NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NA (Nutrient agar)

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2 ด้วย NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2 ด้วย NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

(หากเป็นอาหารแข็งให้เติม Agar 15 กรัมต่อลิตร)

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	0.5	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.0585	กรัมต่อลิตร
KCl	0.0186	กรัมต่อลิตร
MgCl ₂	10	มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MgSO ₄	10	มิลลิโมลาร์
-------------------	----	-------------

6. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคส เข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร

7. อาหารชักนำให้เกิดแคลัสของยาสูบ (กนกพร, 2546)

อาหารสูตร MS เต็ม	Adenine	40	มิลลิกรัมต่อลิตร
	MES	0.5	กรัมต่อลิตร
	ซูโครส	20	กรัมต่อลิตร
	BAP	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
	IAA	0.1	มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 5.7 ด้วย KOH เติมน้ำ 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8. อาหารชักนำให้เกิดยอดของยาสูบ (กนกพร, 2546)

อาหารสูตร MS เต็ม	Adenine	40	มิลลิกรัมต่อลิตร
	MES	0.5	กรัมต่อลิตร
	ซูโครส	20	กรัมต่อลิตร
	BAP	1	มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 5.7 ด้วย KOH เติมน้ำ 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

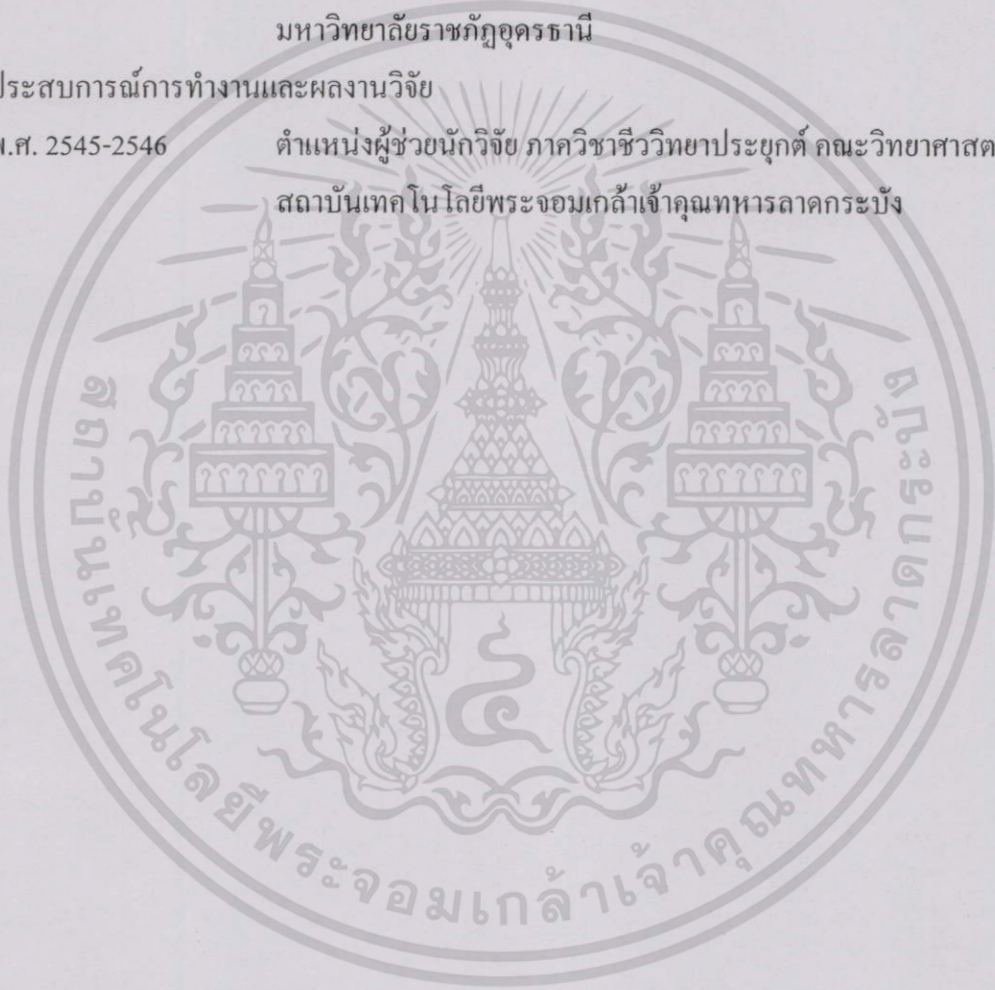
9. อาหารชักนำให้เกิดรากของยาสูบ (กนกพร, 2546)

อาหารสูตร MS เต็ม	Adenine	40	มิลลิกรัมต่อลิตร
	MES	0.5	กรัมต่อลิตร
	ซูโครส	20	กรัมต่อลิตร
	IAA	0.1	มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 5.7 ด้วย KOH เติมน้ำ 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นายศราวดี จันทร์ห้างหว้า
วัน เดือน ปีเกิด 29 พฤศจิกายน 2522 ที่ขอนแก่น
ที่อยู่ 98/3 ซ. หลังเมืองซอย 5 ถ. หลังเมือง ต. ในเมือง
อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40000 โทร 089-8438084
ประวัติการศึกษา 2545 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี
ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย
พ.ศ. 2545-2546 ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้