

บทที่ 4

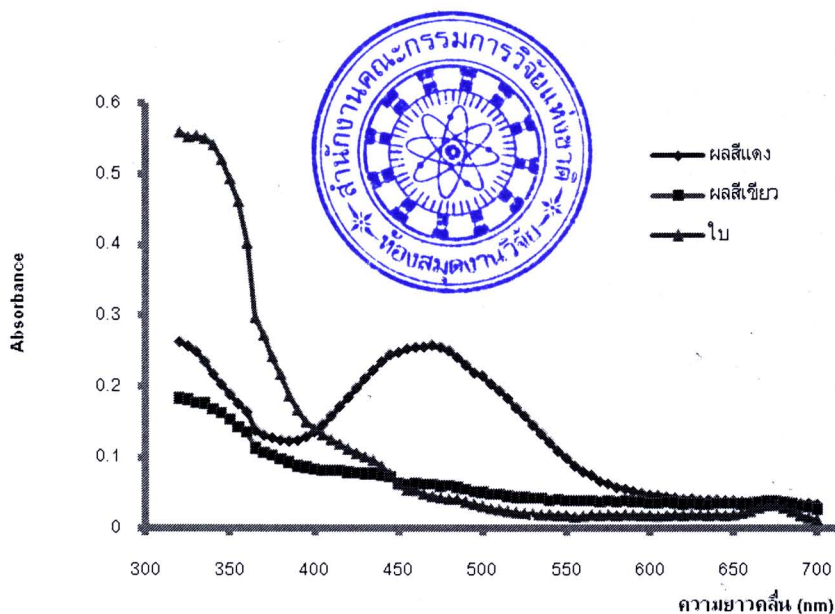
ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์จากพริก

ด้วยการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปฏิกิริยาแบบ in vitro ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการติดตามปฏิกิริยา ดังนี้ คือ ชนิดของเนื้อเยื่อ ปริมาณโปรตีน ปริมาณสับสเตรต และเวลาที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ

4.1.1 สเปกตรัมของสารสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อพริก (ผล และใบ)

เนื่องด้วยในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรีนั้น จำเป็นต้องให้สารละลายโปรตีนที่สกัดได้ไม่รบกวนการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการทำการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้ทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดจากเนื้อเยื่อพริก 0.1 g ด้วย extraction buffer (50 mM phosphate buffer pH 6.0) ปริมาตร 1 ml เจือจางให้มีความเข้มข้น 1: 10 เท่า แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 300 – 700 nm พบว่าโปรตีนที่ได้จากเนื้อเยื่อพริกสีแดงมีการดูดกลืนแสงสูงที่ 407, 470 และ 550 กว่าโปรตีนที่ได้จากเนื้อเยื่อผลพริกและใบพริกสีเขียว



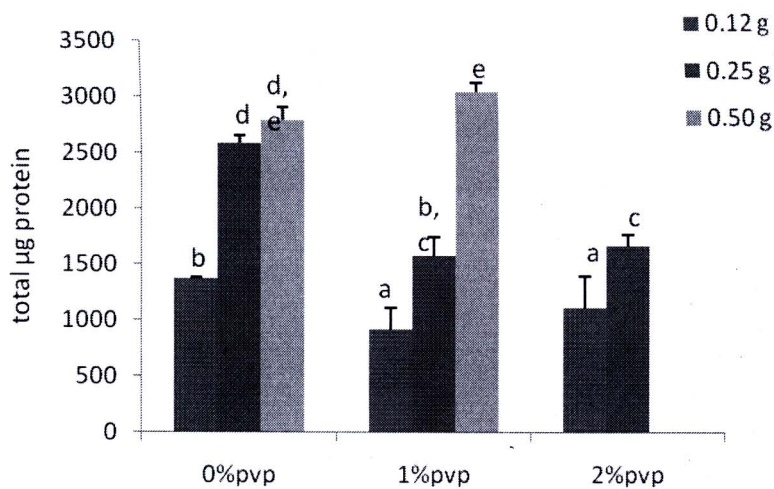
รูปที่ 4.1 สเปกตรัมของสารสกัดจากผลและใบพริก

พบว่าผลสีแดงมีการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 405, 550 และ 470 nm ได้สูงกว่าเนื้อเยื่อใบ ประกอบกับการสกัดโปรตีนในผลมีไขมันจากผลพริกบวมมาก ดังนั้นจึงเลือกใช้ใบในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในการทดลองลำดับต่อไป

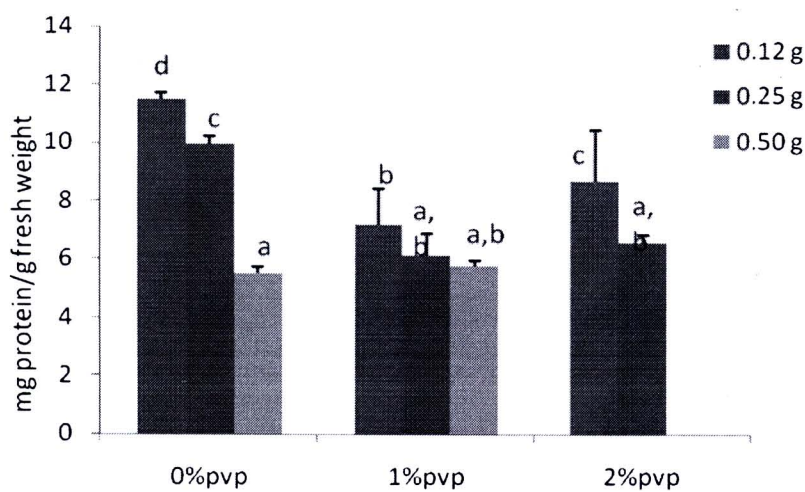
4.1.2 ผลของน้ำหนักใบพริกและ PVP ต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

การเปรียบเทียบน้ำหนักใบพริก 0.1, 0.2 และ 0.5 กรัม ต่อการสกัดโปรตีนพบว่าใบพริก 0.1 g ให้ปริมาณโปรตีนต่อหน่วยปริมาตรที่สกัดและต่อหน่วยน้ำหนักสูงสุดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford (1976) ดังรูปที่ 4.2 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้อาจเป็นผลเนื่องจากการรบกวนจากสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดจากการทำให้เซลล์แตก ดังนั้นจึงได้ทดสอบใช้โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) ในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิก

นอลักษณะสกัด พบว่าการใช้ 1% และ 2% PVP ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนต่อหน่วยปริมาตรสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ความเข้มข้นของ PVP ที่ใช้ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าที่โบพริก 0.5 กรัม จะให้ปริมาณโปรตีนต่อปริมาตรมากที่สุด แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนต่อน้ำหนักสด 1 กรัม พบว่าเมื่อใช้โบพริกปริมาณมากจะมีการละลายของโปรตีนได้ต่ำกว่าการใช้ปริมาณโปรตีนน้อย (รูปที่ 4.3) ดังนั้นจึงเลือกโบพริกหนัก 0.25 กรัม และ 1% PVP ใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ในการสกัดโปรตีนเพื่อใช้ติดตามกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ในลำดับถัดไป



รูปที่ 4.2 ผลของ PVP และน้ำหนักโบพริกที่มีต่อปริมาณโปรตีนต่อปริมาตรที่สกัดได้
($n=7, a, b, c, d, e, p<0.05$)



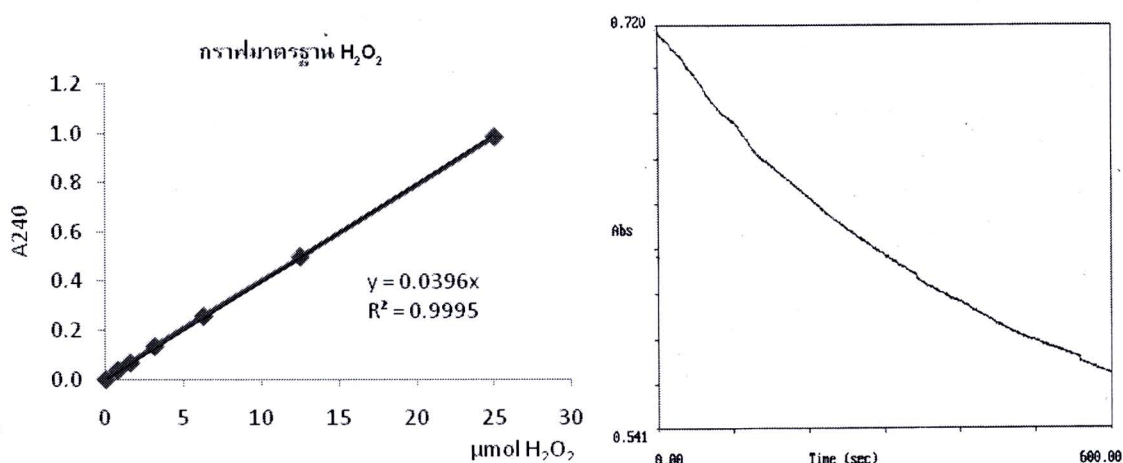
รูปที่ 4.3 การละลายของโปรตีนต่อน้ำหนักสด 1 กรัม
($n=7, a, b, c, d, e, p<0.05$)

4.1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะซีเตสจากใบพริก

ด้วยการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะซีเตส จากใบพริกในงานนี้ต้องการให้สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว โดยใช้ปริมาตรในการวิเคราะห์น้อย ดังนั้นจึงได้มีการเปรียบเทียบวิธีการมาตรฐานกับวิธีการดัดแปลงให้มีปริมาตรในการวิเคราะห์ลดลง พบว่าสารสกัดโปรตีนจากใบพริกมีกิจกรรมของเอนไซม์อะซีเตสในปริมาณที่ตรวจสอบได้ เมื่อใช้วิธีดั้งเดิมของ Chance and Maehly (1955) และ Góth (1991) เมื่อใช้ปริมาตรในการทดลอง 1 ml และสามารถดัดแปลงให้วิเคราะห์ได้ในปริมาตร 200 μ l

4.1.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมอะซีเตสตามวิธีของ Chance & Maehly (1955)

การทดสอบวัดปริมาณ H_2O_2 ปริมาณ 0 – 30 μ mol ในสารละลาย 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 ml ด้วยการดูดกลืนแสงที่ 240 nm พบว่าให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ($R^2 = 0.9995$) เมื่อติดตามปริมาณ H_2O_2 ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาการสลาย H_2O_2 โดยอะซีเตสจากใบพริกเป็นเวลา 600 วินาที พบว่าสามารถสลาย H_2O_2 ได้ 0.1 μ mol/วินาที/ 2.5 μ g protein ซึ่งแสดงว่าในใบพริกมีเอนไซม์อะซีเตสเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีของ Chance & Maehly (1955)



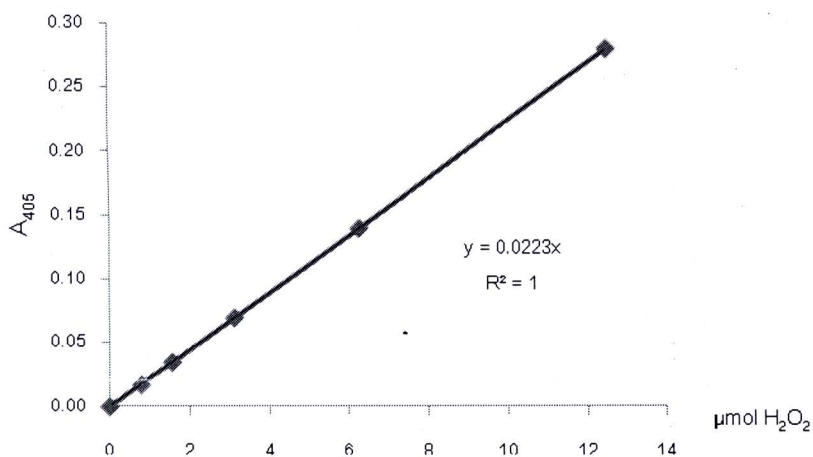
รูปที่ 4.4 การติดตามกิจกรรมเอนไซม์อะซีเตสจากใบพริกตามวิธีของ Chance and Maehly (1995)

4.1.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมอะซีเตสตามวิธีของ Góth (1991)

เป็นการติดตามอะซีเตสโดยวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เหลืออยู่ด้วยการทำปฏิกิริยากับ ammonium molybdate แล้วให้สารประกอบสีเหลืองที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 nm ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบการวิเคราะห์กิจกรรมเมื่อใช้ working volume ปริมาตร 1 ml และ 200 μ l

ความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 และ ammonium molybdate (ปริมาตร 1 ml)

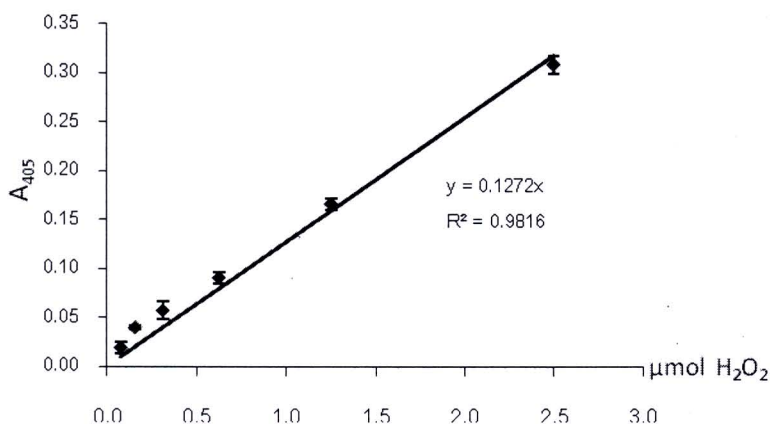
เพื่อให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 ที่เหลือกับ 32.4 mM ammonium molybdate จึงได้ใช้ H_2O_2 ที่มีความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 mM คิดเป็น 0.78125, 1.5625, 3.625, 6.25, 12.5 μ mol แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm พบว่า 32.4 mM ammonium molybdate ปริมาตร 0.5 ml สามารถทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้สมบูรณ์ในช่วง 0 – 100 mM ปริมาตร 0.5 ml และให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ($R^2 = 1$) ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 การทำปฏิกิริยาของ 32.4 mM ammonium molybdate กับ H₂O₂ ความเข้มข้นช่วง 0 – 100 mM ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 1 ml (n=3)

ความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่าง H₂O₂ และ ammonium molybdate (ปริมาตร 200 μl)

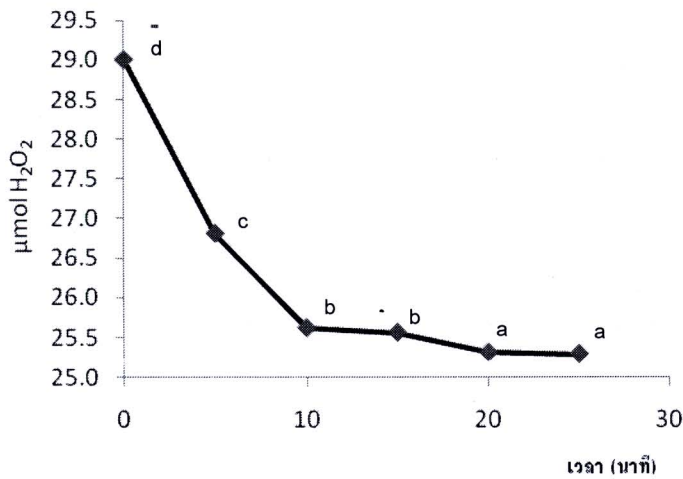
เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ 32.4 mM ammonium molybdate ปริมาณ 100 μl ทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ที่มีความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 mM ใน 50 mM phosphate buffer 100 μl คิดเป็น 0.078125, 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 μmol ตามลำดับ แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ H₂O₂ ช่วง 0.625 – 25 mM หรือ 0.15625, 0.3125, 0.625 μmol เป็นช่วงที่ให้ความสัมพันธ์ในการทำปฏิกิริยาเป็นเส้นตรงที่สุด ($R^2 = 1$)



รูปที่ 4.6 การการทำปฏิกิริยาของ 32.4 mM ammonium molybdate กับ H₂O₂ ความเข้มข้นช่วง 0 – 100 mM ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 200 μl (n=3)

เวลาที่เหมาะสมในการติดตามปฏิกิริยาอะตอมเลส (ปริมาตร 1 ml)

เมื่อติดตามปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายในเวลา 25 นาที พบว่าให้ปริมาณ H₂O₂ ที่เหลืออยู่คงที่ตั้งแต่เวลา 20 นาทีเป็นต้นไป และสามารถวัดความเร็วของปฏิกิริยาในช่วง 0 – 10 นาทีได้ คิดเป็น 0.35 หน่วยเอนไซม์ (รูปที่ 4.7)



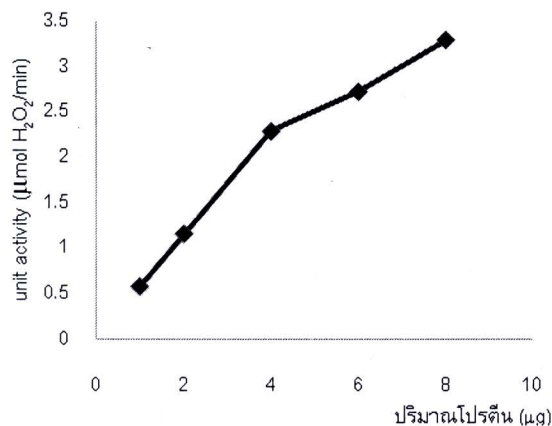
รูปที่ 4.7 การติดตามกิจกรรมคะตะเลสตามวิธีของ Góth (1991)

ปริมาณในการทำปฏิกิริยา 1 ml (n=3 และ a,b,c,d = p< 0.05)

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการใช้สารสกัดโปรตีนในการวิเคราะห์กิจกรรมคะตะเลสในปฏิกิริยาขนาด 1 ml นั้นต้องใช้ปริมาณมากกว่าปฏิกิริยาขนาด 200 μl ประมาณ 5 เท่าเพื่อให้ได้หน่วยเอนไซม์เท่ากัน ดังนั้นในการทดลองลำดับถัดไปเป็นการศึกษาปัจจัยในการวิเคราะห์กิจกรรมคะตะเลสสำหรับปฏิกิริยาขนาด 200 μl ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ปริมาณสับสเตรต และเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม

เมื่อให้ปริมาณสับสเตรตคงที่ ที่ 12.5 mM และติดตามปฏิกิริยาที่เวลา 4 นาที พบว่าปริมาณโปรตีนช่วง 1 – 8 μg สามารถให้ความสัมพันธ์กับกิจกรรมคะตะเลสสูงขึ้น หมายถึงในช่วงเวลา 4 นาทีนั้นมีการตั้งต้นที่เกินพอเพื่อใช้ในการติดตาม ดังรูปที่ 4.8



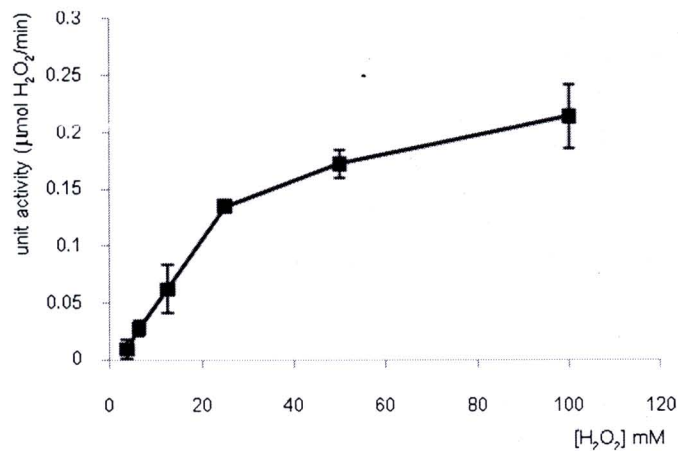
รูปที่ 4.8 ผลของปริมาณโปรตีนต่อกิจกรรมคะตะเลสปริมาณในการทำปฏิกิริยา 200 μl

(n=4)

ปริมาณสับสเตรตที่เหมาะสม

เมื่อให้ปริมาณโปรตีนคงที่ที่ 2 μg และติดตามปฏิกิริยาที่เวลา 4 นาที พบว่าปริมาณสับสเตรตช่วง 0 – 100 mM พบว่า H₂O₂ ช่วง 3.625-25 mM ให้อัตราการสลาย H₂O₂ ได้สูงและคงที่ในช่วง 50-100 mM H₂O₂ (รูปที่

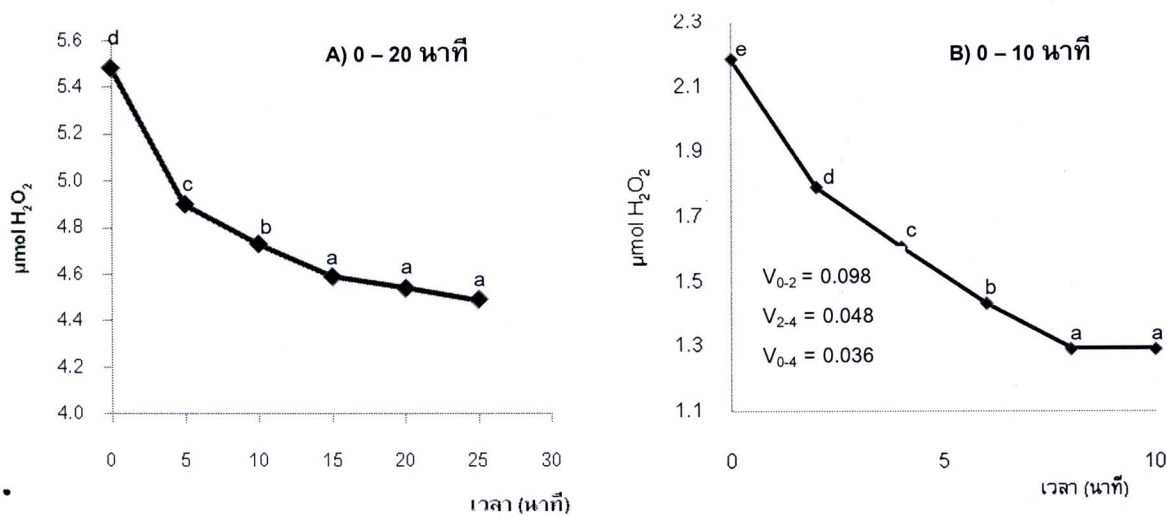
4.9) แสดงให้เห็นว่า 50 mM H₂O₂ ขึ้นไปเป็นปริมาณมากเกินไปสำหรับการติดตามกิจกรรมอะเลสเมื่อใช้โปรตีน 2 µg ตามทฤษฎีของ Michaelis-Menten แต่อย่างไรก็ตามการใช้ปริมาณ H₂O₂ มากเกินไปสำหรับปฏิกิริยานี้จะทำให้เกิดการติดตาม H₂O₂ ที่เหลือในปฏิกิริยามากเกินไป ดังนั้นจึงเลือกใช้ 50 mM H₂O₂ ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะเลส



รูปที่ 4.9 ผลของปริมาณสับสเตรตต่อกิจกรรมอะเลสปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 200 µl (n=3)

เวลาที่เหมาะสมในการติดตามปฏิกิริยาอะเลส (ปริมาตร 200 µl)

เมื่อติดตามปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายในเวลา 25 นาที พบว่าให้ปริมาณ H₂O₂ ที่เหลืออยู่คงที่ตั้งแต่เวลา 15 นาทีเป็นต้นไป และสามารถติดตามความเร็วของปฏิกิริยาได้สูงในช่วง 0 – 5 นาทีได้ (รูปที่ 4.10 A และ B) โดยในช่วง 0-2 นาทีมีอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยา 0.098 หน่วย/นาที ในช่วง 2-4 นาทีมีอัตราเร็ว 0.048 หน่วย/นาที และช่วง 0-4 นาทีมีอัตราเร็ว 0.036 หน่วย/นาที ดังนั้นในการติดตามปฏิกิริยาอะเลสในลำดับถัดไปได้ใช้เวลาในการจำปฏิกิริยาใน 2 นาที



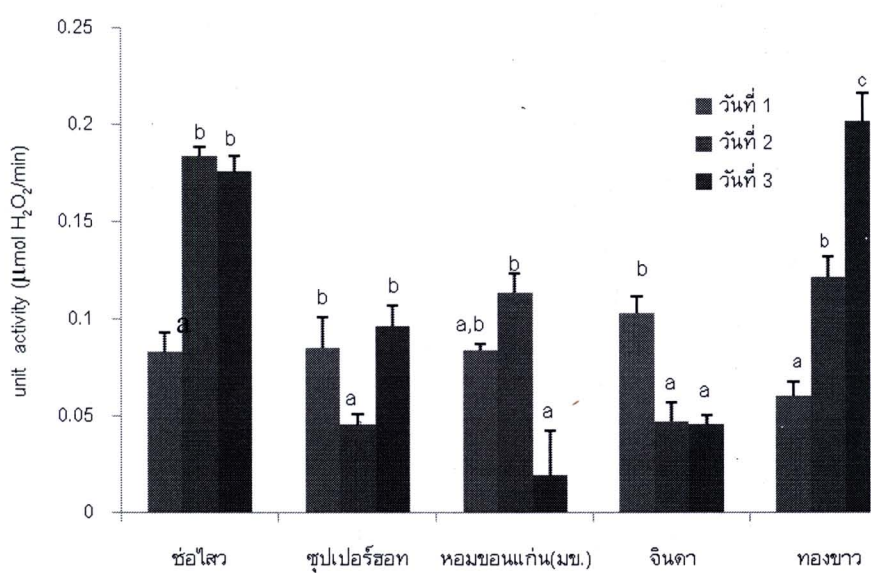
รูปที่ 4.10 การติดตามกิจกรรมอะเลสตามวิธีของ Góth (1991) ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 200 µl (n=4 a,b,c,d,e = p< 0.05)

ดังนั้นในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะซีเตสในการทดลองต่อไปได้ใช้วิธีการดัดแปลงของ Góth (1991) โดยกำหนดให้มีปริมาตรในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 200 μl โดยกำหนดให้ใน 100 μl มีปริมาณสับสเตรต H_2O_2 50 mM ปริมาณโปรตีน 2 μg ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 32.4 mM ammonium molybdate ปริมาตร 100 μl และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และรายงานกิจกรรมเอนไซม์โดย 1 หน่วย เท่ากับการสลาย H_2O_2 1 μmol /นาที

การทดสอบปฏิกิริยาอะซีเตสจากใบพริกสายพันธุ์ต่าง ๆ

เพื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการนำไปใช้ของวิธีที่พัฒนาแล้ว ได้นำใบพริก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ข้อไสว สายพันธุ์ซูปเปอร์ฮอท สายพันธุ์หอมขอนแก่น (มข.) สายพันธุ์จินดา และสายพันธุ์ทองขาว อายุ 3 เดือน มาสกัดโปรตีนเพื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาอะซีเตสตามวิธีดัดแปลงที่ได้ โดยทดสอบกิจกรรมอะซีเตสของใบพริกที่เก็บจากตำแหน่งที่แตกต่างกัน พบว่าความแตกต่างของอายุใบที่แตกต่างกันมีผลให้กิจกรรมเอนไซม์ต่างกันด้วย (รูปที่ 4.11) ทั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ต้นกล้าที่มีอายุ 28 และ 29 วัน มีกิจกรรมเอนไซม์อะซีเตสที่ใกล้เคียงกันได้แก่ 0.11 ± 0.002 และ $0.95 \pm 0.13 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ที่ถูกกำจัด/นาที

ดังนั้นเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบกิจกรรมอะซีเตสของพริกต่างสายพันธุ์ได้จึงต้องทำการควบคุมอายุของตัวอย่างพริกที่ใช้ในการทดสอบให้มีอายุเท่ากันใบลำดับถัดไป

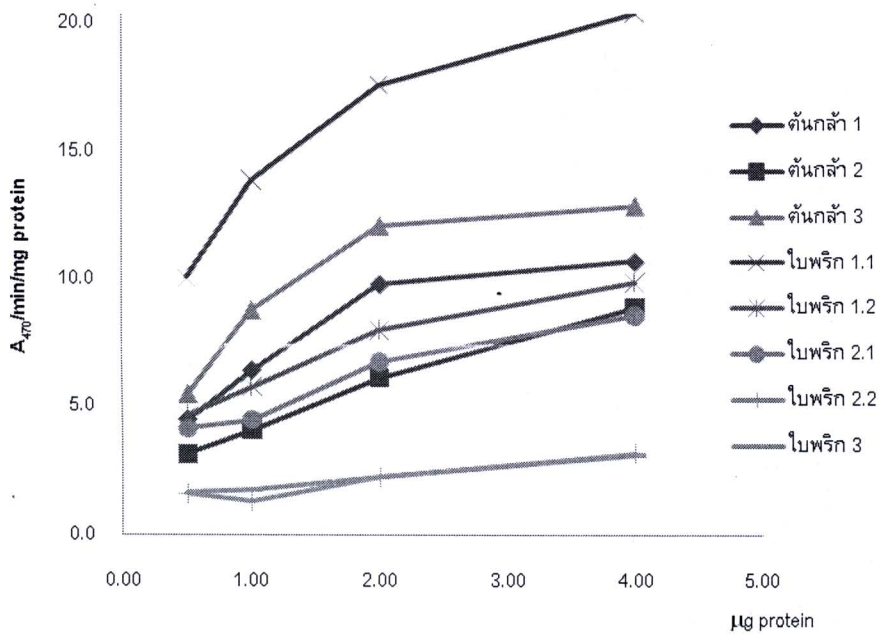


รูปที่ 4.11 กิจกรรมอะซีเตสของใบพริก 5 สายพันธุ์ที่มีอายุต่างกัน (n=4 a,b,c = p<0.05)

4.1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

4.1.3.1 ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโคปี (Chance and Maehly, 1955)

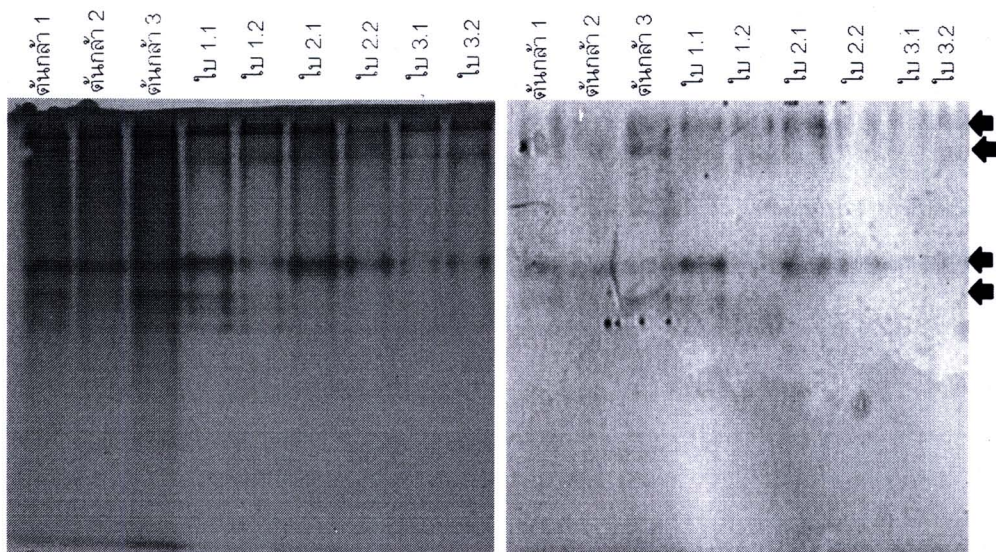
ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณโปรตีนที่มีต่อการดำเนินปฏิกิริยาเมื่อใช้ 30 mM Guaiacol และ 20 mM H_2O_2 เป็นสับสเตรต โดยใช้สารสกัดโปรตีนจากใบพริกต่างสายพันธุ์ 3 ชนิดและต้นกล้าพริกพันธุ์จินดา พบว่ามีกิจกรรมเปอร์ออกซิเดสในการเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดที่ 2 μg protein เมื่อให้สับสเตรตมีความเข้มข้นดังกล่าว ดังรูปที่ 4.12 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอายุของใบพริกและต้นกล้ามียผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว



รูปที่ 4.12 กิจกรรมเปอร์ออกซิเดสของใบพริกและตันกล้า

4.1.3.2 ด้วยวิธีทางอิเล็กโตรโฟเรซิส (Shimoni and Reuveni, 1988)

การแยกโปรตีน 20 µg โดย 12% ND-PAGE และย้อมด้วย Guaiacol เพื่อดูตำแหน่งของ peroxidase isoenzyme พบว่าเนื้อเยื่อใบพริกและตันกล้ามีจำนวน isoenzyme อย่างน้อย 4 ชนิด และมีความสอดคล้องกับกิจกรรมเอนไซม์ กล่าวคือ ในใบพริกชนิดที่ 1.1 มีปริมาณเปอร์ออกซิเดสสูงกว่าชนิดอื่นและตันกล้า ดังรูปที่ 4.13



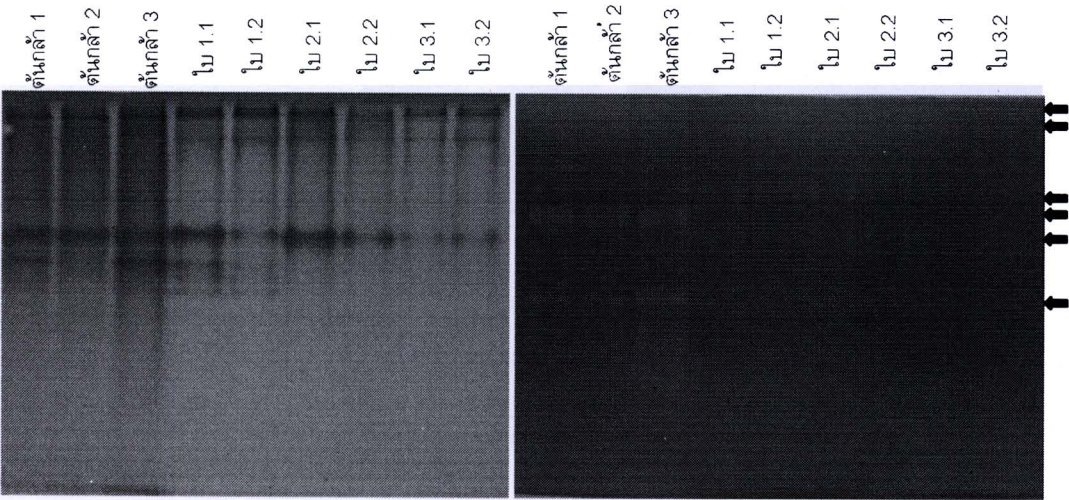
รูปที่ 4.13 Peroxidase isoenzyme ของใบพริกและตันกล้า



4.1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

4.1.4.1 ด้วยวิธีทางอิเล็กโตรโฟรีซิส (McCord and Frdovich, 1969)

การแยกโปรตีน 20 µg โดย 12% ND-PAGE และย้อมด้วย nitroblutetrazolium เพื่อดูตำแหน่งของ superoxide dismutase isoenzyme พบว่าเนื้อเยื่อใบพริกและต้นกล้ามีจำนวน isoenzyme แตกต่างกัน กล่าวคือ ต้นกล้า พบ 2 isoenzymes และใบพบอย่างน้อย 5 izoenzymes โดยพบใบพริกชนิดที่ 2 มี isoenzymes มากกว่า ใบชนิดที่ 1 และ 3 ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4. 14 Superoxide dismutase isoenzyme ของใบพริกและต้นกล้า

4.1.5 การเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อพริกให้เกิดโรค

เนื่องด้วยการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ในพริกที่ผ่านมาพบว่าอายุของใบพริกที่แตกต่างกันไม่สามารถใช้ในการเปรียบเทียบกันได้ ดังนั้นจึงได้หาแนวทางในการเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อพริกที่อายุเท่ากันให้เกิดโรค เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ได้ ดังนั้นจึงได้นำเชื้อราสเปรย์หรือหยดบนใบพริกเพื่อให้ได้เนื้อเยื่อพริกที่มีอายุเท่ากันดังนี้

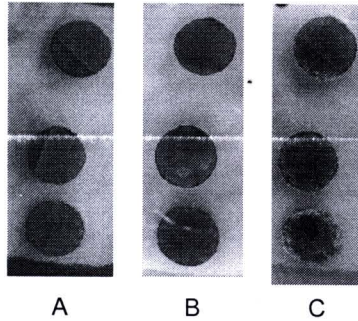
การทดลองเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อพริกให้เกิดโรคด้วยวิธีการสเปรย์บน leaf disc ขนาดประมาณ 0.96 cm² ใช้เชื้อราก่อโรคกุ่มแห้งสายพันธุ์ F8-5B ที่มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 1 x 10⁶ spore/ml ปริมาตรประมาณ 0.1 ml พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B มีความสามารถในการก่อโรคตั้งวันที่ 4 แต่ก่อโรคสูงที่สุดในวันที่ 7 จากการทดลองยังพบว่าที่หน้าใบและหลังใบให้เกิดการก่อโรคไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.15

ตารางที่ 4.1 การเกิดโรคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B โดยการสเปรย์บนใบพริก

วัน	F8-5B (1 x 10 ⁶ spore/ml, 0.1 ml)	
	หน้าใบ	หลังใบ
1	ND	ND
2	ND	ND
3	เริ่มมีแผลตามรอยขีดข่วนใบ	เริ่มมีแผลตามรอยขีดข่วนใบ
4	มีการช้ำน้ำเกือบทั้งใบ	มีการช้ำน้ำเกือบทั้งใบ
5	เนื้อเยื่อตายตามรอยช้ำน้ำ(สีน้ำตาล) บางใบมีการเจริญของเส้นใยรา	เนื้อเยื่อตายรอบจุดช้ำน้ำ(น้ำตาล) บางใบมีการเจริญของเส้นใยรา

6	เนื้อเยื่อตาย(สีน้ำตาล)ตามรอยซ้ำน้ำ มีการเจริญของเส้นใยราทั่วไป	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) มีการเจริญของเส้นใยราทั่วไป
7	เนื้อเยื่อตาย(สีน้ำตาล)ตามรอยซ้ำน้ำ มีการเจริญของเส้นใยราทั่วไป	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) มีการเจริญของเส้นใยราทั่วไป

ND = not detectable



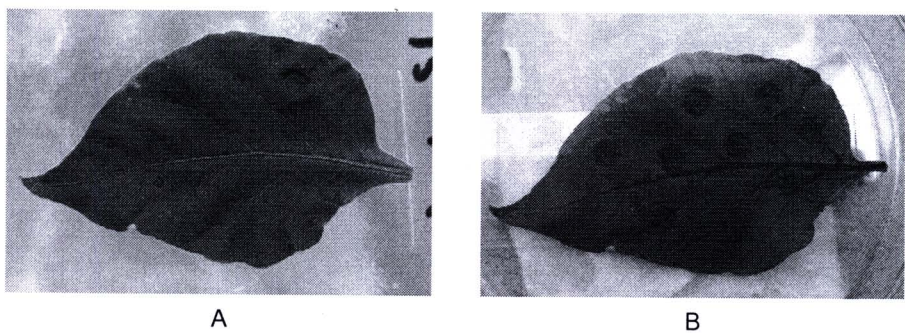
รูปที่ 4.15 การก่อโรคนบนใบโดยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B (1×10^6 spore/ml ปริมาตร 0.1 ml) ด้วยวิธีสปเรย์

A คือใบพริกที่สปเรย์ด้วยน้ำกลั่น วันแรก

B คือใบพริกที่สปเรย์ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B เป็นเวลา 4 วัน

C คือใบพริกที่สปเรย์ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B เป็นเวลา 7 วัน

พบว่าใบ 1 disc มีพื้นที่ 0.95 cm^2 และมีน้ำหนัก $.0158$ กรัม ซึ่งไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์หาเอ็นไซม์ต่าง ๆ ซึ่งต้องการอย่างน้อย 0.1 กรัม ดังนั้นจึงทดสอบวิธีการทดสอบการก่อโรคนบนใบพริกด้วยวิธีการหยด ซึ่งใช้เชื้อราก่อโรคทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ SKP16, F8-5B, CC.1.6, CC. 1.9, CC.1.12 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 1×10^5 spore/ml พบว่าวิธีการหยดนั้นเมื่อเชื้อมีการก่อโรคนบนใบพริกจะก่อโรคในบริเวณที่หยดเชื้อและบริเวณใกล้เคียงเท่านั้น แต่ในขณะที่การวิเคราะห์หาเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ต้องทำทั้งใบ ซึ่งให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 การก่อโรคนบนใบพริกของเชื้อราสายพันธุ์ CC. 1.9 (1×10^6 spore/ml) ด้วยวิธีหยดจุดละ 0.1 ml

A คือใบพริกที่สปเรย์ด้วยน้ำกลั่น

B คือใบพริกที่สปเรย์ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ CC. 1.9

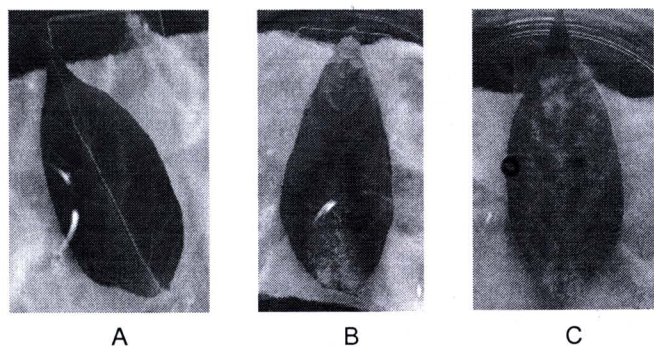
จากผลการทดลองการเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อพริกให้เกิดโรคด้วยวิธีการหยดบนใบพริกที่เจาะให้มีขนาดเท่ากัน จึงมีการพัฒนาวิธีการเป็นการสปเรย์บนใบพริก เพื่อให้ได้พื้นที่ที่เพียงพอและการเกิดการก่อโรคทั่วทั้งใบ โดยได้ทำการทดลองการสปเรย์ด้วยสีแล้วหาพื้นที่ใบ ก่อนที่ทำการสปเรย์ด้วยเชื้อก่อโรค ใบพริกมีพื้นที่ เท่ากับ 19.68 cm^2 เมื่อทำการสปเรย์ด้วยสีมีพื้นที่ที่ถูกสปเรย์ เท่ากับ 16.72 cm^2 โดยที่สปเรย์ 1 ครั้งมีปริมาตร 0.12 มิลลิลิตร เมื่อ

เปรียบเทียบการก่อโรคของเชื้อรา 5 สายพันธุ์ คือ SKP16, F8-5B, CC.1.6, CC. 1.9, CC.1.12 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น 1×10^6 , 1×10^7 spore/ml พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B มีความสามารถในการก่อโรที่สูงกว่าสายพันธุ์ SKP16 และที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 1×10^7 spore/ml มีความสามารถในการก่อโรที่สูงกว่าที่ความเข้มข้นของสปอร์เป็น 1×10^6 spore/ml และจากการทดลองยังพบว่าที่หน้าใบและหลังใบให้เกิดการก่อโรคไม่แตกต่างกัน ซึ่งให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 และแสดงในรูปที่ 4.17

ตารางที่ 4.2 การเกิดโรคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B และ SKP16 โดยการสเปรย์บนใบพริก

วัน	F8-5B		SKP16	
	1×10^6 spore/ml	1×10^7 spore/ml	1×10^6 spore/ml	1×10^7 spore/ml
1	ND	ND	ND	ND
2	ND	จุดสีดำ	ND	จุดสีดำ
3	ND	จุดสีดำ	จุดสีดำ	จุดสีดำกระจายทั่วไป
4	จุดแผลช้ำน้ำตามขอบใบ	จุดแผลช้ำน้ำ	จุดสีดำกระจายทั่วไป	จุดแผลช้ำน้ำ
5	จุดแผลช้ำน้ำ	เนื้อเยื่อตายรอบจุดช้ำน้ำ (น้ำตาล)	จุดแผลช้ำน้ำ	เนื้อเยื่อตายรอบจุดช้ำน้ำ (น้ำตาล)
6	เนื้อเยื่อตายรอบจุดช้ำน้ำ (น้ำตาล) มีการเจริญของเส้นใยรา	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) บริเวณกว้างขึ้นมีการเจริญของเส้นใยรา	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) มีแผลใหม่ที่ขอบใบ	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล)บริเวณกว้างขึ้น
7	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) มีการเจริญของเส้นใยรา	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) มีการเจริญของเส้นใยราทั่วไป	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) ใบเริ่มเหลือง	เนื้อเยื่อตาย(น้ำตาล) มีการเจริญของเส้นใยรา

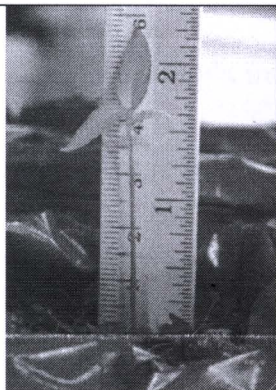
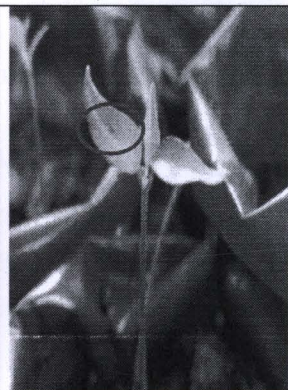
ND = not detectable



รูปที่ 4.17 การก่อโรคนใบพริกจากเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B ด้วยวิธีสเปรย์
A คือใบพริกที่สเปรย์ด้วยน้ำกลั่น
B คือใบพริกที่สเปรย์ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B เป็นเวลา 4 วัน
C คือใบพริกที่สเปรย์ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B เป็นเวลา 7 วัน

แต่อย่างไรก็ตามการเจริญของต้นพริกเป็นไปด้วยความล่าช้า จึงได้ทดลองทำการทดสอบกับต้นกล้าเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ของต้นที่ถูกเหี่ยวนาให้เกิดโรในวันที่ 7 และวันที่ 8 ทั้งนี้พื้นที่ต้นพริกทั้งต้นมีพื้นที่ เท่ากับ 2.805 cm² ซึ่งมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย เท่ากับ 0.1456 กรัม จากการการสเปรย์บนต้นพริกพบว่าเริ่มเห็นรอยช้ำน้ำในวันที่ 3 หลังจากการสเปรย์เชื้อก่อโรคแต่จะมองเห็นแผลและรอยช้ำน้ำที่ชัดเจนในวันที่ 7 และ 8 หลังจากการสเปรย์เชื้อก่อโรค ดังนั้นการการทดลองในขั้นต่อไปจะใช้ใบที่มีอายุเท่ากันในการทดสอบ

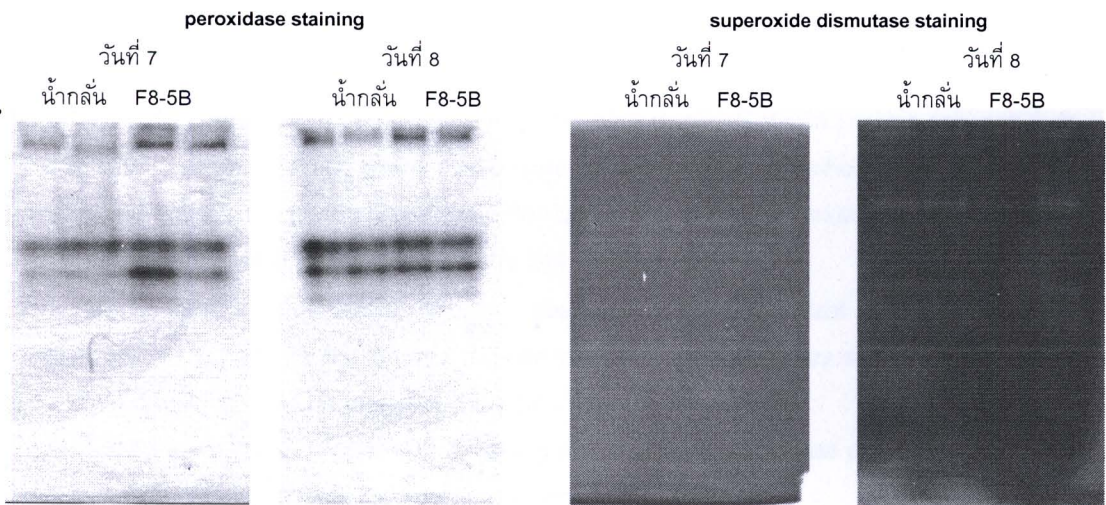
ตารางที่ 4.3 การเหี่ยวงาต้นอ่อนพริกให้เกิดโรคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B (1×10^7 spore/ml)

วัน	อายุ 28 วัน		
1	ND		
2	ND		
3	เริ่มมีจุดช้ำน้ำ		
4	จุดแผลช้ำน้ำ		
5	จุดแผลช้ำน้ำ		
6	จุดแผลช้ำน้ำ		
7	จุดแผลช้ำน้ำ		
8	จุดแผลช้ำน้ำ	A สเปรย์ด้วยน้ำกลั่น	B สเปรย์ด้วยเชื้อรา 6 วัน

นอกจากนั้นพบว่ามิกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นดังตารางที่ 4.4 และการย้อมแอคติวิตีของเปอร์ออกซิเดสและซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เป็นดังรูปที่ 4.18 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างวันที่ 7 และ 8 แต่ไม่พบว่า F8-5B เหี่ยวงาให้มีคะตะเลสสูงขึ้น แต่ต่างจากเปอร์ออกซิเดสที่ F8-5B เหี่ยวงาให้มิกิจกรรมได้สูงในวันที่ 7 แต่มีระดับที่ใกล้เคียงกับน้ำกลั่นในวันที่ 8 ผลที่ได้สอดคล้องกับการย้อมแอคติวิตี และพบซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสมิจำนวน isoenzyme ในวันที่ 8 ได้มากกว่าวันที่ 7 ทั้งนี้ในการทดลองลำดับถัดไปนั้นจะเป็นการทดสอบเอนไซม์ของต้นกล้าที่มีอายุเท่ากันในเวลาต่อไป

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส เปอร์ออกซิเดส

วันที่	catalase unit		peroxidase unit	
	H_2O_2 ที่สลาย/นาท./mg protein		A_{470} /นาท./mg protein	
	น้ำกลั่น	F8-5B	น้ำกลั่น	F8-5B
7	0.116 ± 0.003	0.123 ± 0.077	19.19 ± 3.35	27.63 ± 5.39
8	0.949 ± 0.131	0.615 ± 0.259	42.38 ± 6.36	47.87 ± 9.23



รูปที่ 4.18 การย้อมแอคติวิตีของเปอร์ออกซิเดสและซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสของต้นกล้าพริก