

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสารฟีนอลิกและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ
การแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระทบ

Characterization of Phenolics and Enzymes Involved
in the Increased Firmness of Damaged Pericarp
of Mangosteen Fruit after Impact

เสนอ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สายชล เกตุษา

R.E. Paull

อภิตา บุญศิริ

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสารฟีนอลิกและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ
การแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระทบ

Characterization of Phenolics and Enzymes Involved
in the Increased Firmness of Damaged Pericarp
of Mangosteen Fruit after Impact

เสนอ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สายชล เกตุษา

R.E. Paull

อภิตา บุญศิริ

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้อนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัยของโครงการ "การศึกษาสารพิษอลิกและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระเทบ" ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยของโครงการนี้จะทำให้ทราบกลไกของการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระเทบดีขึ้น และคณะผู้วิจัยหวังว่ารายงานผลการวิจัยเรื่องนี้คงจะเป็นประโยชน์กับผู้สนใจการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเปลือกผลมังคุดที่ตกกระเทบหลังการเก็บเกี่ยว

**การศึกษาสารฟีนอลิกและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัว
ของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระทบ**
**Characterization of Phenolics and Enzymes Involved in the Increased
Firmness of Damaged Mangosteen of Mangosteen Fruit after Impact**

บทคัดย่อ

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แม้ว่าผลมังคุดมีเปลือกหนาและแข็ง แต่เปลือกผลมังคุดจะเกิดอาการเปลือกแข็งอย่างรวดเร็วที่บริเวณตกกระทบหรือถูกบีบ ซึ่งจะทำให้ผลมังคุดมีคุณภาพลดลง วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้คือ 1) เพื่อให้ทราบการสะสมสารลิกนินในเนื้อเยื่อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ 2) เพื่อให้ทราบชนิดและการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนอลิกที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนิน 3) เพื่อให้ทราบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนิน และ 4) เพื่อให้ทราบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์สารลิกนิน

ผลการวิจัยพบว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีความแน่นเนื้อ (ความแข็ง) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 3 ชั่วโมงหลังการตกกระทบ ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดที่เพิ่มขึ้นนี้ขึ้นกับวัยของผลมังคุด ความสูงของการตกกระทบ และสภาพของบรรยากาศหลังการตกกระทบ กล่าวคือเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้ม (แก่มาก) บริเวณที่ตกกระทบมีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง (แก่น้อย) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบที่สูงกว่ามีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบที่สูงน้อยกว่าและเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน การย้อมสีชิ้นส่วนของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบและตกกระทบด้วย toluidine blue O, phloroglucinol และ KMnO_4 พบว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีการสะสมสารลิกนินเพิ่มขึ้นมาก เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงบริเวณที่ตกกระทบมีปริมาณสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ และเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีปริมาณสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นอีกด้วย

การเพิ่มความแน่นเนื้อและสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของปริมาณสารฟีนอลิก สารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบถูกแยกและจำแนกโดยการวัดค่าการดูดแสง และโดยวิธีการทาง thin layer chromatography และ high pressure liquid chromatography พบว่าสารฟีนอลิกตัวกลางในการสังเคราะห์สารลิกนินที่เพิ่มขึ้นในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ คือ กรดพาราควมาริก และกรดไซแนปิก ปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งสองลดลงมากในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ ปริมาณกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดทั้งบริเวณไม่ตกกระทบและตกกระทบของผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงมีมากกว่าของผลมังคุดวัยสีม่วงเข้ม และปริมาณกรดไซแนปิกมีมากกว่า 20-40 เท่า ของปริมาณกรดพาราควมาริก ปริมาณกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบภายใต้สภาพของบรรยากาศที่มีออกซิเจน ปกติมีการลดลงมากกว่าภายใต้สภาพของบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนินในเปลือกผลมังคุดที่ได้ศึกษาคือ phenylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) และ peroxidase (POD) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง PAL, CAD และ POD เพิ่มขึ้นมากและรวดเร็วในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบระหว่างนาที่ที่ 10-20 หลังการตกกระทบแล้วจึงมีกิจกรรมลดลงหลังจากนั้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุดที่เวลา 15 นาที หลังการตกกระทบ กิจกรรมของเอนไซม์ CAD เพิ่มขึ้นมากกว่าเอนไซม์ PAL และ POD การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ สารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบนั้นได้เลือกศึกษากับเอนไซม์ CAD โดยการสกัด RNA จากเปลือกผลมังคุดและสืบค้นข้อมูลของยีนที่ควบคุม CAD ในพืชชนิดต่างๆ จาก gene bank ของ National Center Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ขณะนี้งานส่วนนี้กำลังดำเนินการอยู่

คำหลัก : ตกกระทบ เปลือกผล ผลมังคุด ฟีนอลิก กรดพาราควมาริก กรดไซแนปิก ลิกนิน

ความแน่นเนื้อ ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เพอร์ออกซิเดส

Abstract

The mangosteen (*Garcinia mangostona* L.) is an important economic fruit of Thailand and grown commercially for domestic consumption and export. The fruit has a thick and hard pericarp but the pericarp hardens easily as a result of compression or impact resulting a lower quality of the fruit. The objectives of this study were as the following : 1) investigate lignin accumulation in damaged pericarp, 2) identify phenolics involved in lignin synthesis of damaged pericarp, 3) determine enzyme activity involved in lignin synthesis of damaged pericarp and 4) study gene expression of enzyme(s) involved in lignin synthesis of damaged pericarp.

Impact damaged mangosteen fruit pericarp showed a rapid increase in firmness. The degree of firmness increase depended upon fruit maturity, drop height and storage atmosphere after impact. Toluidine blue O, phloroglucinol and KMnO_4 reacted positively for lignin in both the cell wall and cytoplasm. The damaged pericarp showed thicker and darker staining indicative of cell lignification 3 hours after impact than undamaged pericarp. Lignin concentration was higher in the damaged pericarp of more mature fruit, following a greater drop height and in air. Carbohydrate and protein in lignin-carbohydrate complex increased after impact. The results suggested that the lignification in cells following impact injury response, may play a role in the firmness increase of damaged mangosteen pericarp after impact.

Firmness and lignin content increased while total phenolics decreased in damaged mangosteen pericarp after impact. The phenolic compounds associated with lignin synthesis in damaged pericarp of mangosteen fruit after impact were separated and identified by UV absorption spectra, TLC and HPLC analyses. The phenolic acids unique to damaged pericarp of mangosteen fruit were identified as *p*-coumaric acid and sinapic acid, and *p*-coumaric acid decreased more rapidly than sinapic acid after impact. *p*-Coumaric acid and sinapic acid contents in damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit were greater than of dark purple mangosteen fruit and sinapic acid content was 20 to 40 fold greater than that of *p*-coumaric acid. The decrease in both *p*-coumaric acid and sinapic acid in damaged pericarp occurred more rapidly under normal air than under nitrogen atmosphere.

Activities of PAL, CAD and POD involved in lignin synthesis of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact were determined. PAL, CAD and POD activities increased rapidly during the first 10-20 minutes after impact and declined thereafter. Their activities reached a maximum 15 minutes after impact, while CAD activity increased many fold greater than that of PAL and POD activities. RNA of damaged pericarp was isolated and consensus genes of CAD in many plants were searched from the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nih.gov) and the finding of consensus genes of CAD will be used to design a primer for PCR and northern blotting. The work of gene expression of CAD involved in lignin synthesis of damaged pericarp is in progress.

Key words : impact, pericarp, mangosteen fruit, phenolic, *p*-coumaric acid, sinapic acid, lignin, firmness, phenylalanine ammonia lyase, cinnamyl alcohol dehydrogenase, peroxidase

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อภาษาไทย	(2)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(4)
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	6
ผลการทดลอง	13
บทวิจารณ์	41
หนังสืออ้างอิง	47
Output	
การนำไปใช้ประโยชน์	

บทนำ

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจเขตร้อนชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคกันแพร่หลายทั้งภายในและนอกประเทศ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอินโดนีเซีย และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในแถบประเทศมาเลเซีย พม่า ไทย เขมร เวียดนาม และหมู่เกาะซุนดา (Almeyda and Martin, 1976) ผลมังคุดมีลักษณะค่อนข้างกลม เปลือกหนา 0.8-1.0 เซนติเมตร เมื่อสุกสีเปลือกผลจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู สีแดง และสีม่วงตามลำดับ (เกียรติเกษม และคณะ, 2530 ; กวิศร์ และสุรพงษ์, 2522 ; Chandler, 1950) ภายในเปลือกมีสารแทนนิน และแอนโธนอยู่มาก (Martin, 1980) และยังพบแอนโธไซยานินอีกด้วย (วรรณภา และคณะ, 2532)

แม้ว่าผลมังคุดจะมีเปลือกหนา และน่าจะทนทานต่อการกระทบกระเทือน แต่ความจริงแล้วมังคุดเป็นผลไม้ที่บอบบางมาก ถ้าถูกกระทบกระแทกจะทำให้เปลือกเกิดรอยขีด และเกิดเปลือกแข็ง Tongdee and Suwanakul (1989) รายงานว่า เปลือกชั้นนอกของผลเกิดความเสียหายเล็กน้อยเมื่อตกจากความสูง 10 เซนติเมตร ความเสียหายเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งถึงเนื้อในถ้าตกกระทบจากความสูง 20 เซนติเมตรหรือมากกว่า แรงกดบนผล 3-4 กิโลกรัม ทำให้เปลือกชั้นนอกเสียหายน้อยมากหรือไม่เสียหายเลย แต่แรงกด 5 กิโลกรัมหรือมากกว่า สามารถทำให้เปลือกชั้นนอกเสียหายได้ และเสียหายมากขึ้นในผลที่แก่จัด จำนวนชั้นที่บรรจุมังคุดไม่มีผลต่อการเกิดความเสียหายโดยตรง แต่มีผลทางอ้อมที่ช่วยเสริมให้เกิดความเสียหายมากขึ้น โดยก่อให้เกิดอาการเปลือกแข็ง และเนื้อผลในส่วนที่รับปะทะกันได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เช่นเดียวกับการศึกษาการแข็งตัวของเปลือกมังคุดของ Ketsa and Koolpluksee (1993) พบว่า มังคุดที่ตกจากที่สูงมีการแข็งตัวอย่างรวดเร็วกว่าผลที่ตกจากที่ต่ำกว่า และผลมังคุดที่มีความสมบูรณ์ของผลมากกว่า สามารถเกิดอาการเปลือกแข็งได้รวดเร็วกว่าผลมังคุดที่มีความสมบูรณ์น้อยกว่า เมื่อตกกระทบในระดับความสูงที่เท่ากัน ผลมังคุดเปลือกสีม่วงแดงเกิดอาการเปลือกแข็งได้อย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง ขณะที่ผลที่มีเปลือกสีเหลืองอ่อนอมเขียวเกิดอาการเปลือกแข็งภายใน 18 ชั่วโมง นอกจากนี้ Uthairatanakij and Ketsa (1996) ยังได้รายงานเพิ่มเติมไว้ว่า การเกิดอาการเปลือกแข็งยังสามารถเกิดได้กับผลมังคุดที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน โดยอาการเปลือกแข็งเกิดขึ้นที่ส่วนหนึ่งส่วนใดก่อนแล้วขยายพื้นที่เพิ่มขึ้น การเก็บรักษาผลมังคุดที่อุณหภูมิต่ำ เช่น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส นาน 2-4 วัน สามารถทำให้ผลมังคุดเกิดอาการเปลือกแข็งได้เช่นกัน Ketsa and Koolpluksee (1993) พบว่า บริเวณที่เกิดอาการเปลือกแข็งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดน้อยลง อาจเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณสารที่ทำให้เกิดความแข็งแรงของเนื้อเยื่อพืช เช่น ลิกนิน ซึ่งสมศักดิ์ (2538) ได้ศึกษาและยืนยันว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและมีอาการเปลือกแข็งเกิดขึ้นมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง ขณะที่

เดียวกันก็มีการสร้างลิกนินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นอาการเปลือกแข็งของผลมังคุดอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินในบริเวณด้านที่ตกกระทบได้

การสังเคราะห์ลิกนินในเนื้อเยื่อพืช (Figure 1) เริ่มจากการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีสารตั้งต้นคือ กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน จะเปลี่ยนเป็นกรดชินนามิกโดยเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase, PAL) จากนั้นเอนไซม์ชินนามิกแอซิด-4-ไฮดรอกซิเลส จะทำหน้าที่เปลี่ยนกรดชินนามิกไปเป็นกรดพาราควมาริก กรดพาราควมาริกสามารถเปลี่ยนเป็นชินนามิลโคเอเอสเทอร์ได้โดยตรงโดยเอนไซม์ชินนามัทแอซิดโคเอไลเกส หรือเปลี่ยนเป็นกรดแคเฟอิกก่อน โดยเอนไซม์พาราควมาริกไฮดรอกซิเลส จากนั้นกรดแคเฟอิกจะเปลี่ยนเป็นกรดเฟอร์ูลิกหรือกรดชินนาปิกโดยเอนไซม์ออริโธเมทิลทรานสเฟอเรส ทั้งกรดเฟอร์ูลิกและกรดชินนาปิกจะถูกเปลี่ยนเป็นชินนามิลโคเอเอสเทอร์โดยเอนไซม์ชินนามัทแอซิดโคเอไลเกส แล้วชินนามิลโคเอเอสเทอร์จะถูกเอนไซม์ชินนามิลโคเอออกซิโดรีดักเทสเปลี่ยนไปเป็นชินนามิลอัลดีไฮด์ จากนั้นชินนามิลอัลดีไฮด์จะเปลี่ยนไปเป็นชินนามิลแอลกอฮอล์โดยเอนไซม์ชินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) แล้วจึงเกิดกระบวนการโพลิเมอไรเซชันเป็นลิกนินโดยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Vance et al., 1980) Whetten and Sederoff (1995) รายงานว่ากรดพาราควมาริก กรดเฟอร์ูลิก และกรดชินนาปิกเปลี่ยนไปเป็นชินนามิลโคเอเอสเทอร์ในรูปของพาราควมาริลโคเอ เฟอร์ูลิลโคเอ และชินนาปิลโคเอ ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นชินนามิลอัลดีไฮด์ในรูปของพาราควมาริลอัลดีไฮด์ โคนิเฟอร์ิลอัลดีไฮด์ และชินนาปัลดีไฮด์ โดยและเปลี่ยนไปเป็นชินนามิลแอลกอฮอล์ในรูปของพาราควมาริลแอลกอฮอล์ โคนิเฟอร์ิลแอลกอฮอล์ และชินนาปิลแอลกอฮอล์ก่อนที่จะเกิดกระบวนการโพลิเมอไรเซชันเป็นลิกนินที่มีองค์ประกอบของพาราไฮดรอกซีเฟนิล กัวเอซิล และ/หรือไซริงกิลตามลำดับในที่สุด โดยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase, POD) ซึ่งความแตกต่างขององค์ประกอบของลิกนินนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เนื้อเยื่อ ชนิดของเซลล์ และรวมทั้งระยะของการพัฒนาการด้วย (Campbell and Sederoff, 1996) Lewis and Yamamoto (1990) รายงานว่าในพืชกลุ่มจิมโนสเปิร์มองค์ประกอบหลักของลิกนินจะเป็นกัวเอซิล ขณะที่กลุ่มแองจิโอสเปิร์มจะเป็นพวกกัวเอซิลร่วมกับไซริงกิล ซึ่งจะมีองค์ประกอบตัวใดมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ ในพืชพวกหญ้าและธัญพืชจะพบสารที่เป็นองค์ประกอบของลิกนินทั้ง 3 ชนิด อย่างไรก็ตามพบว่าพาราไฮดรอกซิลน้อยกว่ากัวเอซิลและไซริงกิลตามลำดับ

Whetten and Sederoff (1995) รายงานว่าจุดที่น่าจะเป็นจุดควบคุมการสังเคราะห์ลิกนิน (rate limiting steps) มี 3 จุดคือ เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์ชินนามัทแอซิดโคเอไลเกส และชินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส Mitchell et al. (1994) ศึกษาการชักนำกิจกรรมของชินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในใบข้าวสาลีที่มีการสร้างลิกนินพบว่าจากการให้ไคโตแซนไฮโดรไลเซส ที่ถูก

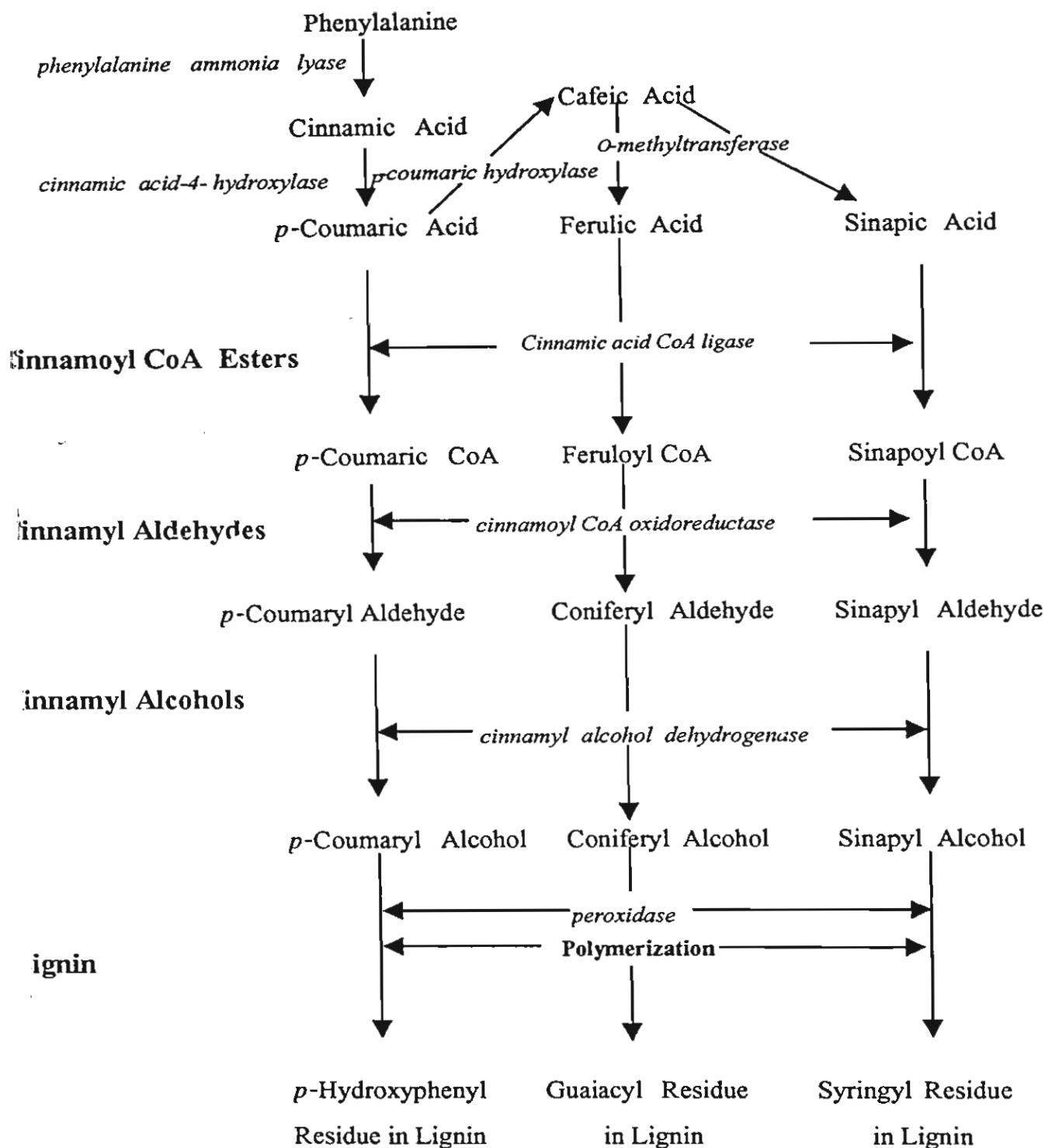


Figure 1 Lignin synthesis (modified from Cambell and Sederoff, 1996 ; Vance et al. 1980 ; Whetten and Sederoff, 1995).

อะเซทิลเลทไปบางส่วนหรือสเปิร์มของ *Botrytis cineria* กับใบข้าวสาลีที่ทำบาดแผล พบว่ามีการสังเคราะห์ลิคินินเพิ่มมากขึ้น และพบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และเปอร์ออกซิเดส ซึ่งจากการศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสพบว่า การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์โคนิเฟรลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสไม่แตกต่างจากใบพืชปกติ (control) แต่กลับพบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแนปิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเพิ่มมากขึ้นมากกว่าใบพืชปกติถึง 10 เท่า ในผักกาดหอมที่เกิดอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาที่เรียกว่า russet spot มีการเพิ่มปริมาณของลิคินินและสารประกอบฟีนอลิกในบริเวณแสดงอาการและบริเวณใกล้เคียง และมีการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดลิคินินเช่นกัน (Ke และ Saltveit, 1989) ตรงข้ามกับที่ Morrison et al. (1994) พบว่า การสังเคราะห์ลิคินินในผนังเซลล์ชั้นที่สองของปล้องข้าวโพด (internode) ไม่มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซึ่งจากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเปลือกมังคุดด้านที่ตกกระทบของสมศักดิ์ (2538) พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีกิจกรรมลดต่ำลง ทั้ง ๆ ที่มีการสังเคราะห์ปริมาณลิคินินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองอาจไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิคินินขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นไปได้ว่าจุดควบคุมการสังเคราะห์ลิคินินอาจไม่ได้เริ่มจากฟีนิลอะลานีน แต่อาจเริ่มหลังจากการสังเคราะห์กรดซินนามิกไปแล้ว และน่าจะก่อนการเกิดโพลีเมอร์ไรเซชันไปเป็นลิคินินโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

Kutsuki et al. (1982) รายงานว่า ในพืชส่วนมากกิจกรรมของเอนไซม์ซินนามิลเอซิดโคเอไลเอสในการเปลี่ยนซินนามิกแอซิดไปเป็นซินนามิลโคเอมีค่อนข้างต่ำ แต่จะมีประสิทธิภาพดีในการเปลี่ยน 5-ไฮดรอกซีเฟอร์ูเลท ไปเป็น 5-ไฮดรอกซีเฟอร์ูลิลโคเอกับพืชในกลุ่มแองจิโอสเปิร์มและจิมโนสเปิร์ม (Kutsuki et al. 1982 ; Luderitz et al. 1982 ; Grand et al. 1983) Walter et al. (1988) รายงานว่าเอนไซม์ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเป็นจุดที่สำคัญที่สุดในการควบคุมการสังเคราะห์ลิคินิน เนื่องจากเอนไซม์มีบทบาทในขั้นตอนสุดท้ายที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โมโนลิคนอล ซึ่งได้แก่ พาราควมาริลแอลกอฮอล์ โคนิเฟรลแอลกอฮอล์ และซินนาปิลแอลกอฮอล์ ก่อนที่จะถูกโพลีเมอร์ไรเซชันไปเป็นสารลิคินิน Morrison et al. (1994) รายงานว่าการสังเคราะห์ลิคินินบนผนังเซลล์ชั้นที่สองของข้าวโพดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับเอนไซม์ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จากการศึกษาของ Grand et al. (1983) พบว่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในลำต้นของ poplar ลงมาถึง 90 เปอร์เซ็นต์มีผลลดการสังเคราะห์ลิคินินลงเหลือ 45 เปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกับที่ Bucholtz et al. (1980) พบว่า การสังเคราะห์ลิคินินที่ลดลงไปในข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีก้านใบสีน้ำตาล (brown-midrib mutant) สัมพันธ์กับการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น ปริมาณแคลเซียม ปริมาณเพคตินที่ละลายน้ำ ปริมาณเพคตินที่สกัดด้วยออกซาเลท และปริมาณโปรโตเพคตินที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ของเปลือกมังคุดบริเวณที่ตกกระหอบและไม่ตกกระหอบใกล้เคียงกัน แสดงว่าความชื้น แคลเซียม และสารกลุ่มเพคตินไม่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเปลือกมังคุดบริเวณที่ตกกระหอบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทั้งในเปลือกผลมังคุดที่ตกกระหอบและไม่ตกกระหอบมีค่าช่วงคลื่นที่ให้ค่าการดูดแสงสูงสุดเหมือนกัน แต่ค่าการดูดแสงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระหอบมีค่าลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลิกที่ให้ค่าการดูดแสงสูงสุดที่ 207 นาโนเมตร เมื่อศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้วิธี thin layer chromatography (TLC) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0 0.03 0.06 0.3 และ 0.46 มีค่าการดูดแสงลดลง สอดคล้องกับการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดบริเวณด้านที่ตกกระหอบ ส่วนสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.63 0.77 และ 0.88 มีค่าการดูดแสงไม่สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จึงไม่น่าเกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระหอบ (สมศักดิ์, 2538)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า กลไกการแข็งตัวที่เกิดจากการตกกระหอบนั้นยังไม่มีเป็นที่ทราบอย่างแน่ชัดว่า ฟีนอลิกตัวใดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิคินิน และก่อให้เกิดอาการเปลือกแข็งของมังคุด และแม้ว่าสมศักดิ์ (2538) จะรายงานว่ เอนไซม์ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และเปอร์ออกซิเดสอาจไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิคินินในเปลือกผลมังคุดที่ตกกระหอบ แต่โดยทั่ว ๆ ไปในเนื้อเยื่อพืชที่เกิดบาดแผลกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และเปอร์ออกซิเดสจะเพิ่มขึ้นพร้อมกับมีการสังเคราะห์ลิคินินบริเวณบาดแผล โดยเอนไซม์ฟีนอลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างสารฟีนอลิกมากขึ้น และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันของซินนามิลแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนสไปเป็นลิคินิน (Camm and Towers, 1973 ; Vance et al., 1980) และจากรายงานของ Walter et al. (1988) ที่ว่าเอนไซม์ซินนามิลแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนสเป็นจุดสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์ลิคินิน เนื่องจากเอนไซม์มีบทบาทในขั้นตอนสุดท้ายที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โหโมโนลิคนอล ก่อนที่จะถูกโพลิเมอร์ไรเซชันไปเป็นสารลิคินินในที่สุด การทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงชนิดของสารฟีนอลิกและศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดลิคินินซึ่งก่อให้เกิดอาการแข็งตัวของเปลือกมังคุดหลังการตกกระหอบ เพื่อให้เข้าใจกระบวนการสังเคราะห์ลิคินินที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการเปลือกแข็งของมังคุดได้ชัดเจนขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในการหาแนวทางป้องกันการเกิดอาการดังกล่าวต่อไปในอนาคต

วิธีการทดลอง

ผลมังคุดที่ใช้ในการทดลองให้มาจากการซื้อจากสวนมังคุดในภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ผลที่ใช้ในการทดลองที่ 2 วัย คือ วัยสีผิวของเปลือกผลเป็นสีชมพูแดง (reddish brown) (Figure 2 upper) และวัยสีผิวของเปลือกผลเป็นสีม่วงเข้ม (dark purple) (Figure 2 lower) ทำการเก็บเกี่ยวผลมังคุดอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้เกิดการตกกระแทกและบรรจุผลมังคุดที่เก็บเกี่ยวได้ลงในภาชนะบรรจุกล่องกระดาษลูกฟูก ขนาด 10 กิโลกรัม และทำการขนส่งโดยรถยนต์ห้องเย็นมายังห้องปฏิบัติการวิจัยทันทีหลังจากเก็บเกี่ยว ทำการคัดเลือกผลมังคุดให้มีความสม่ำเสมอทั้งขนาดและสีผิวก่อนทำการทดลอง การทำให้ผลมังคุดตกกระแทกบนพื้นคอนกรีตทำโดยการจับขั้วผลมังคุดและแกนกลางอยู่ในแนวระนาบขนาดเท่ากับพื้นคอนกรีตสูงที่ระดับ 50 และ 100 เซนติเมตร ขณะเดียวกันบนพื้นคอนกรีตที่ผลมังคุดจะตกกระแทก โรยด้วยแป้งฝุ่น เมื่อปล่อยผลมังคุดตามระดับความสูงต่างๆ ผลมังคุดจะตกกระแทกบนพื้นคอนกรีตที่มีแป้งฝุ่นโดยและบริเวณตกกระแทกของผลมังคุดจะติดแป้งฝุ่น (Figure 3) หลังจากนั้นจึงใช้ปากกาเน้นข้อความเขียนวงกลมบริเวณตกกระแทกของเปลือกผลมังคุดโดยวิธีนี้จะทำให้ทราบบริเวณตกกระแทกของเปลือกผลมังคุดที่แน่นอน นำผลมังคุดที่ตกกระแทกไปไว้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (21 เปอร์เซ็นต์) และไม่มีออกซิเจนคือสภาพที่มีไนโตรเจน 100 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผลมังคุดอยู่ใน vacuum desiccator แล้วดูดอากาศภายในออกแล้วค่อยๆ แทนที่ด้วยไนโตรเจน หลังจากนั้นจึงนำผลมังคุดออกมาวัดความแน่นเนื้อและองค์ประกอบเคมีต่างๆ ทุกๆ 1 2 และ 3 ชั่วโมง หลังการตกกระแทก

การทดลองที่ 1 การสะสมสารลิกนินในเปลือกผลมังคุด

หลังจากที่ผลมังคุดมีการตกกระแทกคอนกรีตสูงจากพื้น 50 และ 100 เซนติเมตร และให้ผลมังคุดอยู่ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ทำการบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

1.1 ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุด ใช้ firmness tester (Effegi) ที่มีหัวกด (plunger) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วัดความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระแทกและตกกระแทก จึงเห็นแต่ละผลจะวัดความแน่นเนื้อ 2 จุด ซึ่งอยู่ตรงกันข้าม

1.2 ปริมาณของสารลิกนินโดยวิธีการย้อมสี (histochemistry) ศึกษาการสะสมสารลิกนินในเนื้อเยื่อของเปลือกผลมังคุดที่ไม่ตกกระแทกและตกกระแทก โดยการตัดชิ้นส่วนของเปลือกผลมังคุดด้านที่ตกกระแทกและไม่ตกกระแทกโดยตัดในแนวที่ตั้งฉากกับผิวของผลให้มีความหนาประมาณ 40 μm โดยใช้มือและใบมีดโกน (free-hand section) และนำชิ้นส่วนของเปลือกผลมังคุดที่ตัดได้ไปศึกษาการสะสมลิกนินโดยวิธีทาง histochemistry ดังต่อไปนี้

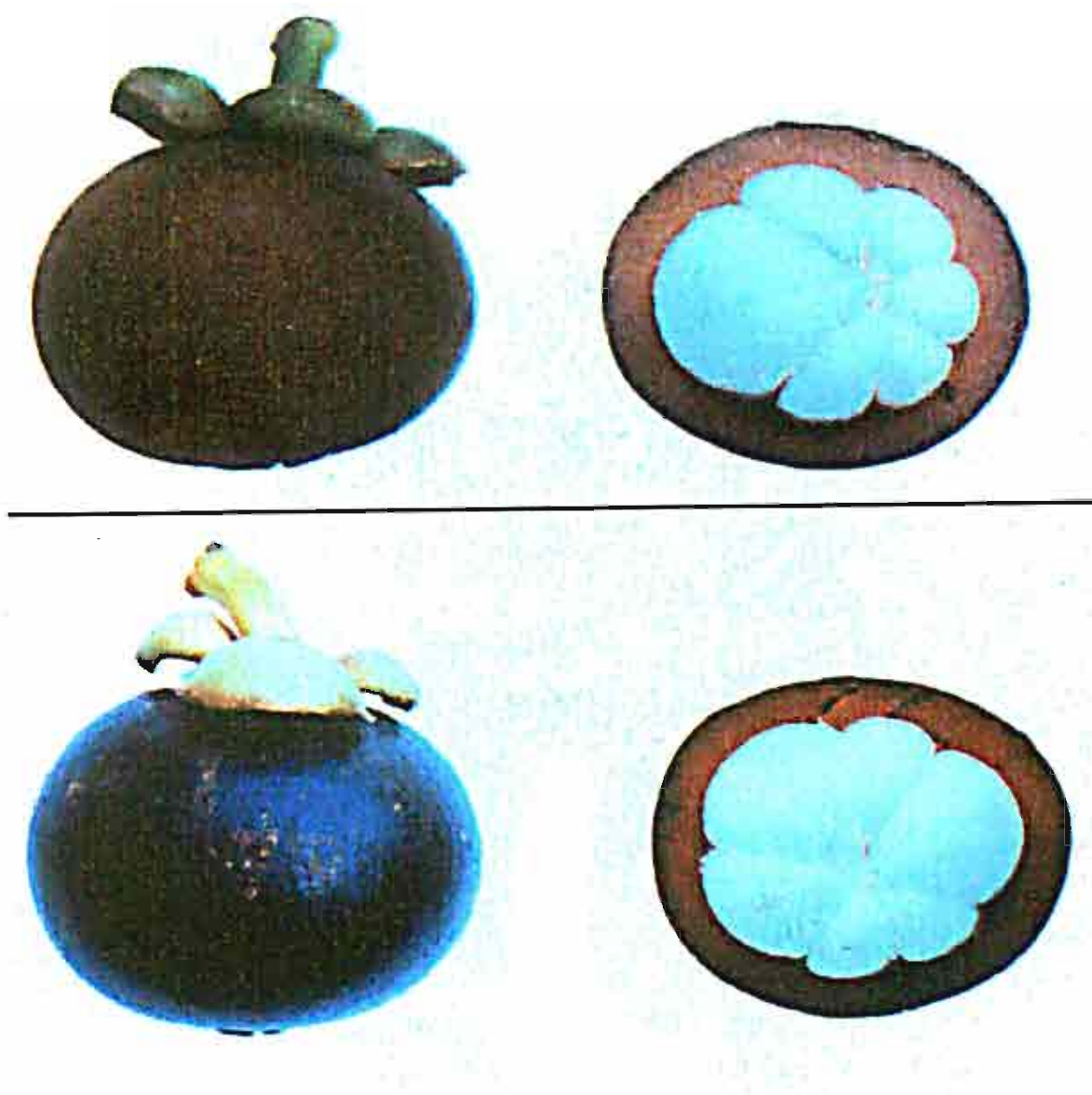


Figure 2 Mangosteen fruits at reddish brown (upper) and dark purple (lower) stages were used in the study.

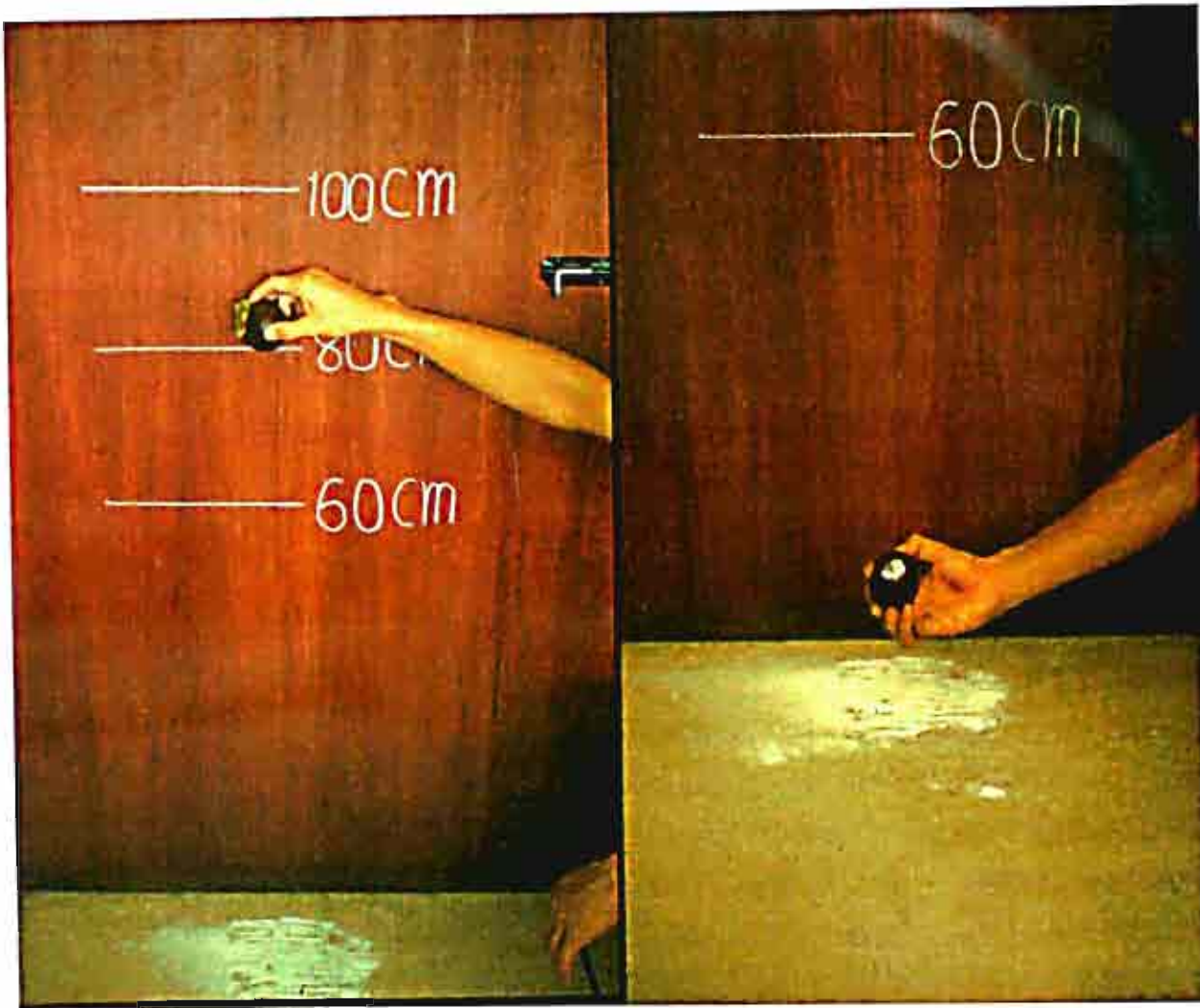


Figure 3 Mangosteen fruit was oriented so that the calyx and stigma were horizontal (left), before being released from a drop height and impacted on the concrete coated with a thin layer of powder (right).

1.2.1 Phloroglucinol-HCl Test โดยวิธีการของ Gahan (1984) กล่าวคือ แช่ชิ้นส่วนของเปลือกผลมังคุดในสารละลาย phloroglucinol เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมด้วยแอลกอฮอล์เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นานเป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นวางชิ้นส่วนของเปลือกผลมังคุดบนสไลด์ที่มีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 โมลาร์ 1 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip) และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

1.2.2 Toluidine Blue O Test โดยใช้วิธีของ (O'Brien et al., 1964) กล่าวคือ แช่ชิ้นส่วนของเปลือกผลมังคุดในสารละลาย toluidene blue O 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมด้วยสารละลาย phosphate Buffer เข้มข้น 0.1 M pH 6.8 นานเป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายออกและวางบนแผ่นสไลด์ที่มีหยดน้ำส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.2.3 Modified Chlorine Sulfite Test โดยใช้วิธีการของ Ride (1975) กล่าวคือ ล้างชิ้นส่วนของผลเปลือกผลมังคุดด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ชิ้นส่วนของเปลือกมังคุดในสารละลายส่วนผสมของ KMnO_4 1% (w/v) และ HCl 10 M ในอัตรา 1:1 นาน 2 นาที แล้วนำชิ้นส่วนของเปลือกผลมังคุดนี้ไปวางบนสไลด์ที่มีสารละลาย Na_2SO_3 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.3 ปริมาณสารลิกนิน โดยใช้วิธีของ Bruce and West (1989) กล่าวคือ ใช้เนื้อเยื่อเปลือกผลมังคุด 2 กรัม บดในสารละลายแอลกอฮอล์เมทานอล 25 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 นาที นำของเหลวทั้งหมดมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/A นำกากที่กรองได้ทั้งหมดบนกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำผลแห้งของกากมา 50 มิลลิกรัม แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก 2 N 5 มิลลิลิตร และกรดไฮโอไกลคอลลิก 0.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดแก้วไปวางไว้ในน้ำเดือดพร้อมกับการหลอดปฏิกิริยามีการเคลื่อนที่ตลอดเวลานาน 4 ชั่วโมง ทำให้หลอดปฏิกิริยาเย็นแล้วปั่นด้วยแรงเหวี่ยง $18,000 \times g$ นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนที่ใสด้านบนและนำกากที่ตกตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จนกระทั่งสารละลายใสปราศจากสี เติมสารละลาย NaOH 0.5 N 5 มิลลิลิตร ในตะกอนและปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) และสั่นเบาๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อสกัดลิกนินไฮโอไกลคอลลิก หลังจากนั้นนำตัวอย่างนี้ปั่นด้วยแรงเหวี่ยง $18,000 \times g$ นาน 20 นาที นำส่วนที่ใสมาเติมกรดไฮโดรคลอริกอย่างเข้มข้น 1 มล. แล้วปล่อยลิกนินไฮโอไกลคอลลิกตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง $10,000 \times g$ นาน 10 นาที ได้ตะกอนสีน้ำตาลส้ม และละลายตะกอนนี้ในสารละลาย NaOH 0.5 N 25 มิลลิลิตร และวัดค่าดูดแสง (absorbance) ที่คลื่นแสง 290 นานาเมตร (nm) ปริมาณลิกนินแสดงเป็นค่าหน่วยการดูดแสงต่อปริมาตรสารละลาย และน้ำหนักสดของเปลือกผลมังคุดที่ใช้สกัดลิกนิน $[(290 \text{ nm}) \text{ ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}]$

1.4 ปริมาณสารเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรต การวัดปริมาณสารเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรต (lignin-carbohydrate complex) ในเปลือกผลมังคุดด้านที่ตกกระทบและไม่ตกกระทบ ใช้วิธีสกัดของ Morrison (1973) การตรวจสอบปริมาณสารคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรตที่สกัดได้โดยใช้วิธีของ Hodge and Hofreiter (1962) และ Bradford (1976) ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุด

หลังจากผลมังคุดมีการตกกระทบคอนกรีตสูงจากพื้น 50 และ 100 เซนติเมตร และให้ผลมังคุดอยู่ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ทำการบันทึกข้อมูลการเปลี่ยนแปลงต่อไปนี้

2.1 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธีการของ Singleton and Rossi (1965) กล่าวคือ บั่นเปลือกผลมังคุด 3 กรัมกับ เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 12 มิลลิลิตร จนกระทั่งละเอียดแล้วนำของเหลวไปหมุนด้วยแรงเหวี่ยง 12,000xg นาน 20 นาที นำส่วนที่ใสของสารละลายไปตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวัดค่าดูดแสง (absorbance) ที่ 760 nm นอกจากนี้ยังนำสารละลายที่สกัดได้นี้ไปตรวจหา absorption spectra พร้อมกับตัวอย่างมาตรฐานสารฟีนอลิกบางตัว (*p*-coumaric acid และ sinapic acid) อีกด้วย

2.2 การตรวจสอบสารฟีนอลิกโดยวิธี TLC ใช้สารละลายฟีนอลิกที่สกัดได้ 20 μ l โดยเอทานอล แล้วใช้ microcapillary หยดสารละลายลงบนแผ่น silica gel plate (Sigma) ขณะเดียวกันหยดสารละลายฟีนอลิกมาตรฐานคือ กรดพาราคูมาริกและกรดไซแนปิก (*p*-coumaric acid และ sinapic acid) ลงบนแผ่น TLC เดียวกับสารสกัดฟีนอลิก นำแผ่น TLC นี้ไปแช่ในสารละลาย chloroform : acetic acid (4 : 1, v/v) เพื่อให้สารเคลื่อนที่และแยกตัวของสารฟีนอลิกจากสารสกัดและมาตรฐาน นำแผ่น TLC ออกจากสารละลาย chloroform : acetic acid ไปอบให้แห้งแล้วพ่นด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย เมทานอลคลอไรด์ 1% (FeCl_3 1% ในเมทานอล) เพื่อให้เห็นจุดของสารฟีนอลิกชนิดต่างๆที่มีการเคลื่อนที่ แตกต่างกัน

2.3 การตรวจสอบสารฟีนอลิกโดยวิธี HPLC การสกัดสารฟีนอลิกเพื่อใช้ในการตรวจสอบโดยวิธี HPLC นั้นดัดแปลงจากวิธีของ Zhang et al. (2000) กล่าวคือใช้เปลือกผลมังคุด 10 กรัม บั่นให้ละเอียดกับสารละลายสกัด 100 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย เอทานอล 65 เปอร์เซ็นต์ และเมตาโบซิลไฟท์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำของเหลวที่บั่นได้มาเขย่าเบาๆ นาน 0.5 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น นำกากที่เหลือจากการกรองไปสกัดด้วยวิธีการข้างต้นอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่กรองได้ทั้ง 3 ครั้ง มารวมกันและนำไปหมุนด้วยแรงเหวี่ยง 7,000xg นาน 15 นาที นำส่วนใสที่อยู่ด้านบนไประเหยให้แอลกอฮอล์หายไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยใช้ rotary evaporator สารสี

หรือเม็ดสี (pigment) ที่ยังเหลืออยู่ในสารละลายหลังการระเหยแอลกอฮอล์ออกไปแล้วถูกกำจัดโดยการสกัดอีก 2 ครั้งด้วยสารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ (2:1, v/v) สารละลายที่ได้นำมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 20 เปอร์เซ็นต์ และกรดเมตาฟอสฟอริก 2 เปอร์เซ็นต์ นำสารละลายนี้ไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (1:1, v/v) อีก 3 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้ (organic phase) 3 ครั้งมารวมกันและนำไประเหยให้แห้งภายใต้ลดความดัน (vacuum) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารที่ได้หลังการทำให้แห้งไปละลายด้วย เมทานอล (HPLC grade) 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาสารสกัดนี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารฟีนอลิก โดย HPLC ต่อไป

นำสารสกัดจากดังกล่าวข้างต้นมา 1 มิลลิลิตร มาเติมด้วยสารละลาย 250 μ l ซึ่งประกอบด้วย อะซิโตรไนไตรล (acetonitrile) 15 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล 30 เปอร์เซ็นต์ และกรด อะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันและนำไปกรองผ่าน Nylon Acrodisc 13 (0.45 μ m) ใช้สารละลายที่ผ่านการกรองนี้ 15 μ l ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Jasco Japan Spectroscopic Co., Ltd.) ใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm โดยใช้คอลัมน์ Alltima C 18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m size particle : Alltech, USA) mobile phase ประกอบด้วย อะซิโตรไนไตรล 10 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล 15 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารละลาย (solvent flow rate) 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งควบคุมโดย Tri Rotar SR HPLC Pump (Jasco) ขณะเดียวกันมีการใช้สารฟีนอลิกมาตรฐาน คือ กรดพาราความาริกและกรดไซแนปิก ฉีดเข้า HPLC ควบคู่กับสารสกัดฟีนอลิกจากเปลือกผลมังคุดด้วยสารฟีนอลิกมาตรฐาน 2 ชนิดนี้มีค่าการดูดแสงสูงสุดที่ 280 nm

การทดลองที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนิน

หลังจากผลมังคุดมีการตกกระทบคอนกรีตสูงจากพื้น 150 เซนติเมตร และให้ผลมังคุดอยู่ในสภาพที่อุณหภูมิห้องและมีออกซิเจนปกติ ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ดังต่อไปนี้

3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยใช้วิธีการของ Camm and Towers (1973)

3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ CAD โดยใช้วิธีการของ Goffner et al. (1992)

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ POD โดยใช้วิธีการของ Morita et al. (1988)

การวิเคราะห์โปรตีนเพื่อการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ใช้วิธีการของ Bradford (1976)

การทดลองที่ 4 การแสดงออกของจีน

คัดเลือกผลมังคุดระยะที่ 5 คือระยะผลมีม่วงเข้มที่มีขนาดและสีใกล้เคียงกันที่ไม่ได้รับความเสียหายจากโรคหรือแมลง และเชิงกล จากสวนเกษตรในภาคตะวันออกหรือภาคใต้ บรรจุลงในกล่อง

กระดาษลูกฟูกด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดบาดแผล แล้วจึงขนส่งโดยรถห้องเย็นมายังห้องปฏิบัติการภายใน 1 วันหลังจากเก็บเกี่ยว จากนั้นนำผลมังคุดมาจัดวางให้ขั้วผลและแกนกลาง อยู่ในแนวนอนก่อนปล่อยให้ผลตกกระทบพื้นคอนกรีตที่โรยแป้งฝุ่นไว้เพื่อทำเครื่องหมายด้านตกกระทบที่มีความสูง 100 เซนติเมตร (Figure 3) จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 25, 30, 1, 2, และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำมาตัดชิ้นส่วนเปลือกบริเวณที่ได้รับ ความเสียหายขนาด 1x1x0.8 นิ้ว มาทำการทดลองดังนี้ คือ

4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของ CAD ตามวิธีการของ Goffner et al. (1992)

4.2 วิเคราะห์โปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

4.3 ศึกษาการแสดงออกและการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน CAD โดยการสกัด mRNA จากเปลือกผลมังคุด โดยใช้วิธีของ Sambrook et al. (1989) และใช้เป็น template ในการทำ RT-PCR โดยใช้ primer ที่ถูกออกแบบเพื่อการเพิ่มปริมาณ cDNA ของ CAD mRNA ข้อมูลลำดับเบสที่จะใช้ในการออกแบบ primer จะได้มาจากรฐานข้อมูลของ gene bank (www.ncbi.nih.org) cDNA ที่ได้จะถูกนำโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy vector (Promega) และลำดับเบสของ cDNA ที่ได้จะทำการตรวจสอบโดยการทำการ sequencing และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ CAD cDNA กับพืชอื่นๆ

พลาสมิดสายผสมของ CAD cDNA จะใช้ในการเตรียม RNA probe โดยใช้ DIG RNA labelling kit เพื่อใช้ในการตรวจหาการแสดงออกของยีน CAD ในเปลือกผลมังคุดโดยวิธี northern blotting

การทดลองที่ 1 การสะสมลิกันินในเปลือกผลมังคุด

ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง (Figure 4A) และวัยสีม่วงเข้ม (Figure 4B) ทั้งด้านที่ไม่ตกกระโทบและตกกระโทบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติหลังการตกกระโทบทันที (ชั่วโมงที่ 0) ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระโทบมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบมีการเพิ่มขึ้นของความแน่นเนื้ออย่างรวดเร็วภายใน 3 ชั่วโมงหลังการตกกระโทบ และเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบสูงจากพื้นคอนกรีต 100 เซนติเมตร มีการเพิ่มของความแน่นเนื้อมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบสูงจากพื้นคอนกรีต 50 เซนติเมตร (Figure 4) เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้ม (Figure 5B) บริเวณที่ตกกระโทบมีการเพิ่มความแน่นเนื้อมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระโทบ (Figure 5A) การเพิ่มความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบภายใต้สภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (21 เปอร์เซ็นต์) มีมากกว่าภายใต้สภาพบรรยากาศที่ขาดออกซิเจน (Figure 5)

เมื่อมีการย้อมสีของเนื้อเยื่อเปลือกผลมังคุดทั้งบริเวณที่ไม่ตกกระโทบและตกกระโทบเพื่อตรวจสอบการสะสมและการเปลี่ยนแปลงของลิกันิน โดยวิธีการทาง histochemistry พบว่าการเปลี่ยนแปลงของลิกันินในชั้นของเซลล์ลิกงไปได้ผิวเปลือกมังคุดประมาณ 165 μm (Figure 6-12) ส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) และส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ (cytoplasm) ของเปลือกผลมังคุดทั้งบริเวณที่ไม่ตกกระโทบและตกกระโทบเมื่อมีการย้อมสีด้วย phloroglucinol, toluidine blue O และ KMnO_4 พบว่าส่วนต่างๆ เหล่านี้มีการติดสีแดงส้ม (Figure 6A-12A) น้ำเงิน (Figure 6B-12B) และน้ำตาลเหลือง (Figure 6C-12C) ตามลำดับ ชั้นของเซลล์ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบ (Figure 6-11) มีชั้นของเซลล์ที่มีการสะสมสารลิกันินหนากว่าชั้นของเซลล์ในบริเวณที่ไม่ตกกระโทบ (Figure 12) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบสูงจากพื้นคอนกรีต 100 เซนติเมตร (Figure 7,8) มีชั้นของเซลล์ที่มีการสะสมสารลิกันินหนากว่าชั้นของเซลล์ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบสูงจากพื้นคอนกรีต 50 เซนติเมตร (Figure 6,9) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนเป็นปกติ (21 เปอร์เซ็นต์) (Figure 9) มีชั้นของเซลล์ที่มีการสะสมสารลิกันินมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Figure 11) เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วง (Figure 8,9) มีชั้นของเซลล์ที่มีการสะสมสารลิกันินมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง (Figure 6,7) หลังการตกกระโทบ (Table 1)

การตรวจสอบปริมาณสารลิกันินในเนื้อเยื่อเปลือกผลมังคุดทั้งบริเวณที่ไม่ตกกระโทบและตกกระโทบโดยการทำปฏิกิริยาของกรดไทโอไกลคอลิก (thioglycolic acid) พบว่าปริมาณสารลิกันินใน

เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มบริเวณที่ตกกระทบ (Figure 13B) มีการเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ (Figure 13A) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีต 100 เซนติเมตร มีการสะสมปริมาณสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดที่ตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีต 50 เซนติเมตร และเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (21 เปอร์เซ็นต์) มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินอย่างรวดเร็ว ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน มีการเพิ่มปริมาณสารลิกนินเพียงเล็กน้อย (Figure 13A,13B)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสารประกอบเชิงซ้อนของลิกนินคาร์โบไฮเดรต (lignin-carbohydrate complex) ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนปกติมีการเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Figure 14A) ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจนไม่มีการเพิ่มของปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรต (Figure 14B) ในทำนองเดียวกันเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนมีปริมาณโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Figure 15A) ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน ไม่มีปริมาณโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรต (Figure 15B) สารคาร์โบไฮเดรตในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น 27.93-64.24 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น 19.13-27.60 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุด

เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบแล้วนาน 3 ชั่วโมง มีปริมาณสารฟีนอลิกน้อยกว่าเปลือกผลมังคุดด้านที่เพิ่มตกกระทบที่ 0 ชั่วโมง (Figure 16) เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มบริเวณที่ตกกระทบ (Figure 16B) มีปริมาณสารฟีนอลิกลดลงมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ (Figure 16A) และเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีปริมาณสารฟีนอลิกลดลงมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน (Figure 16A,16B)

ปริมาณสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดวัยต่างกัน (วัยสีน้ำตาลแดงและม่วงเข้ม) และตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีตต่างกัน (50 และ 100 เซนติเมตร) มีรูปแบบของการดูดช่วงแสงไม่ต่างกัน (spectral absorbance) และช่วงของการดูดแสงสูงสุด (maximum absorbance) ที่ 280 nm เหมือนกัน (Figure 17A, 17B, 17C, 17D) รูปแบบของการดูดช่วงแสงของสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดมีลักษณะคล้ายกับของสารกรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid) และกรดไซแนปิก

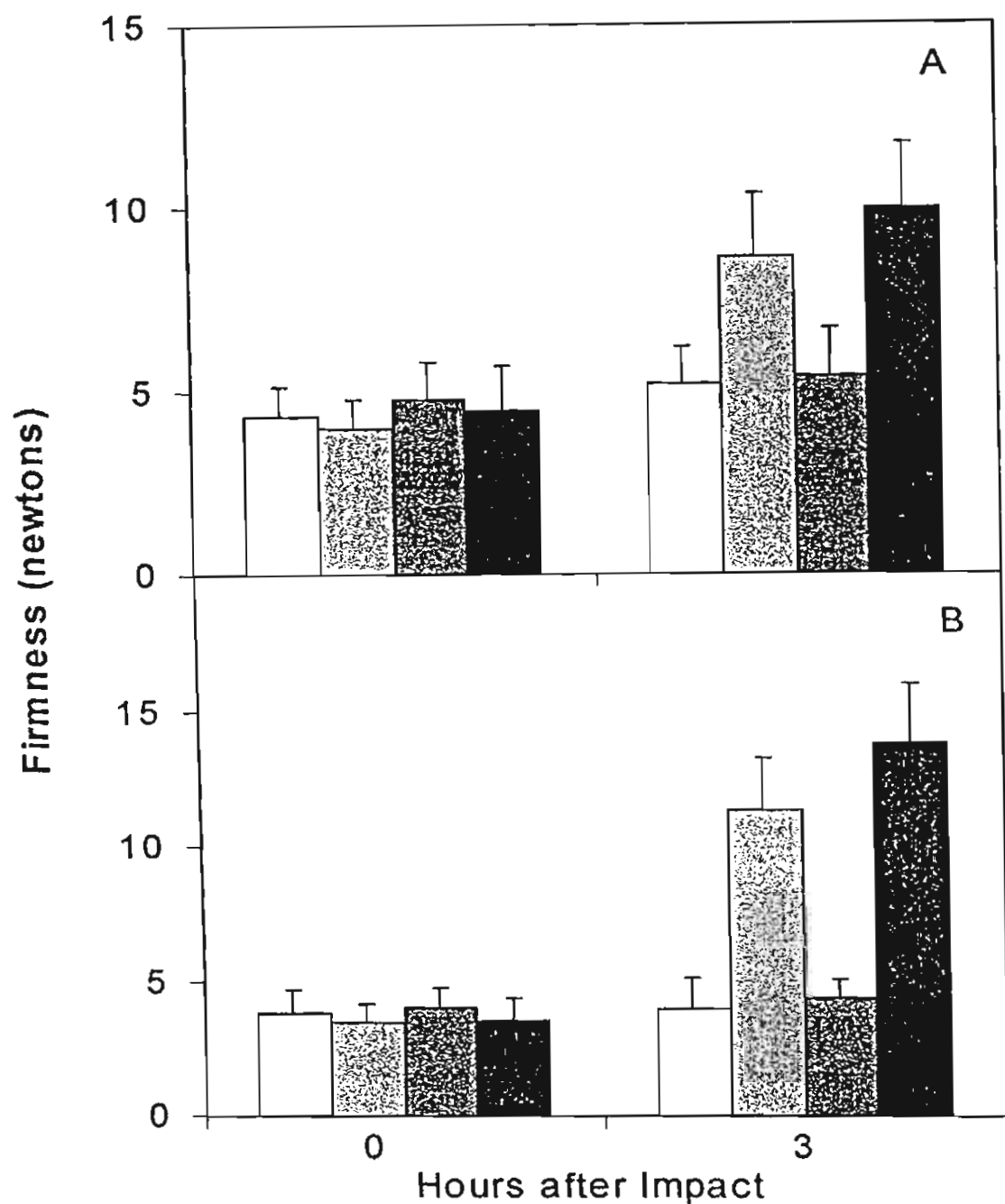


Figure 4 Firmness of undamaged (□, ■) and damaged (▨, ▩) pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□, ▨) and 100 (▩, ■) cm and hold in normal atmosphere. Mean values $\pm$ SD of 12 fruits.

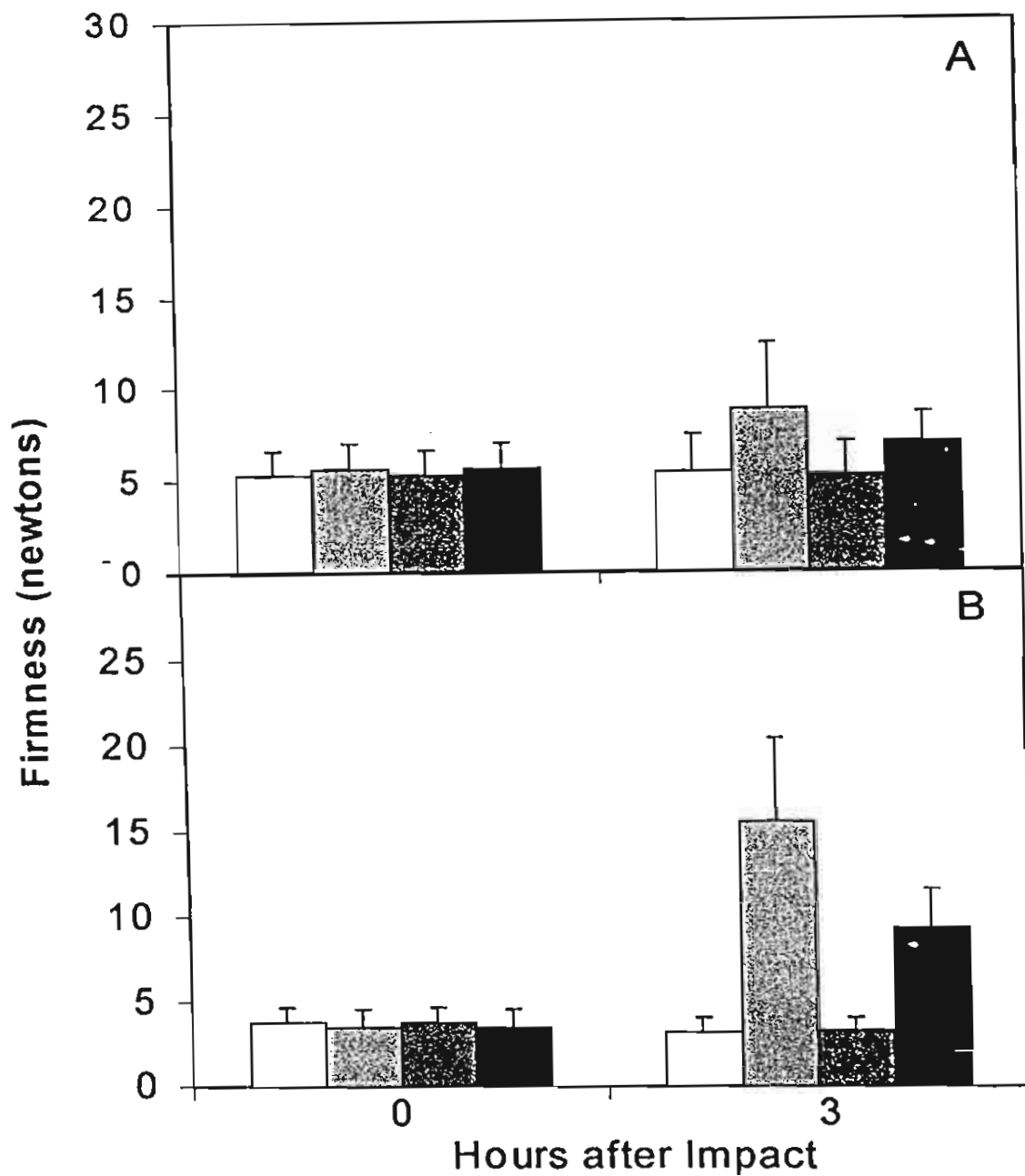


Figure 5 Firmness of undamaged (□, ▨) and damaged (▩, ■) pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm and held in normal (□, ▩) and nitrogen (▨, ■) atmospheres. Mean values $\pm$ SD of 12 fruits.

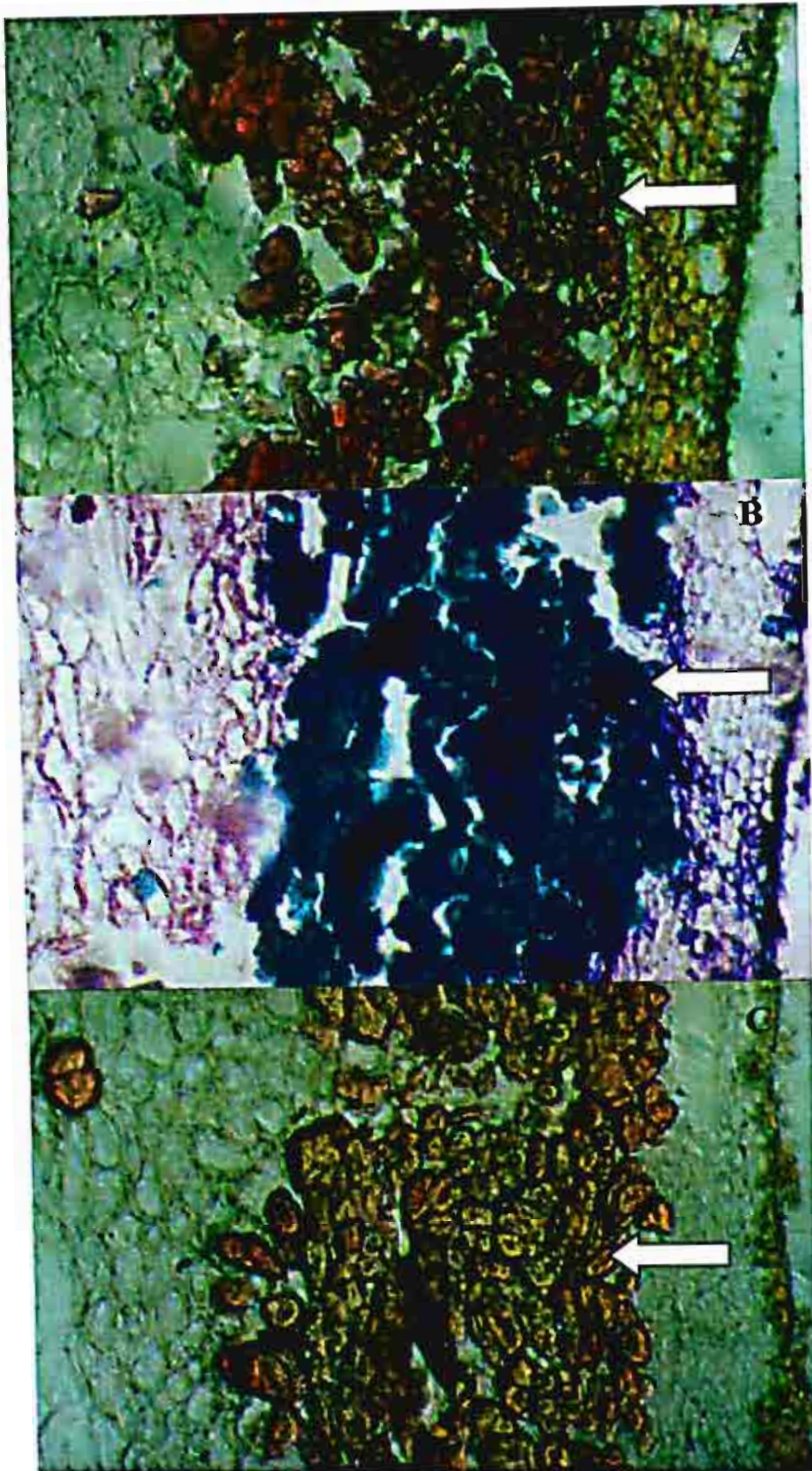


Figure 6 Lignin localization(arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit after impact at drop height of 50 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO_4 (C). A-C x 10.

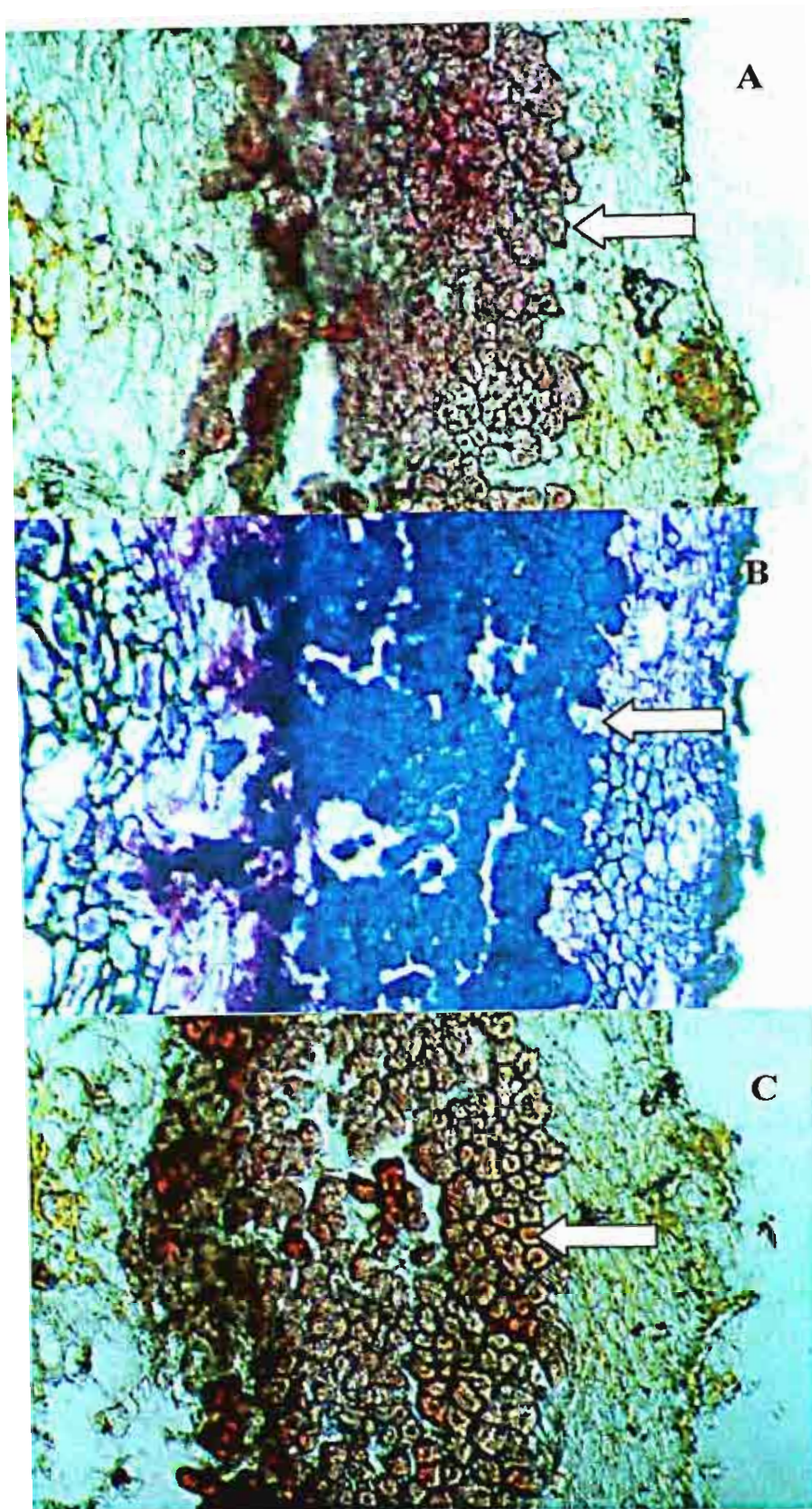


Figure 7 Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO_4 (C). A-C x 10.

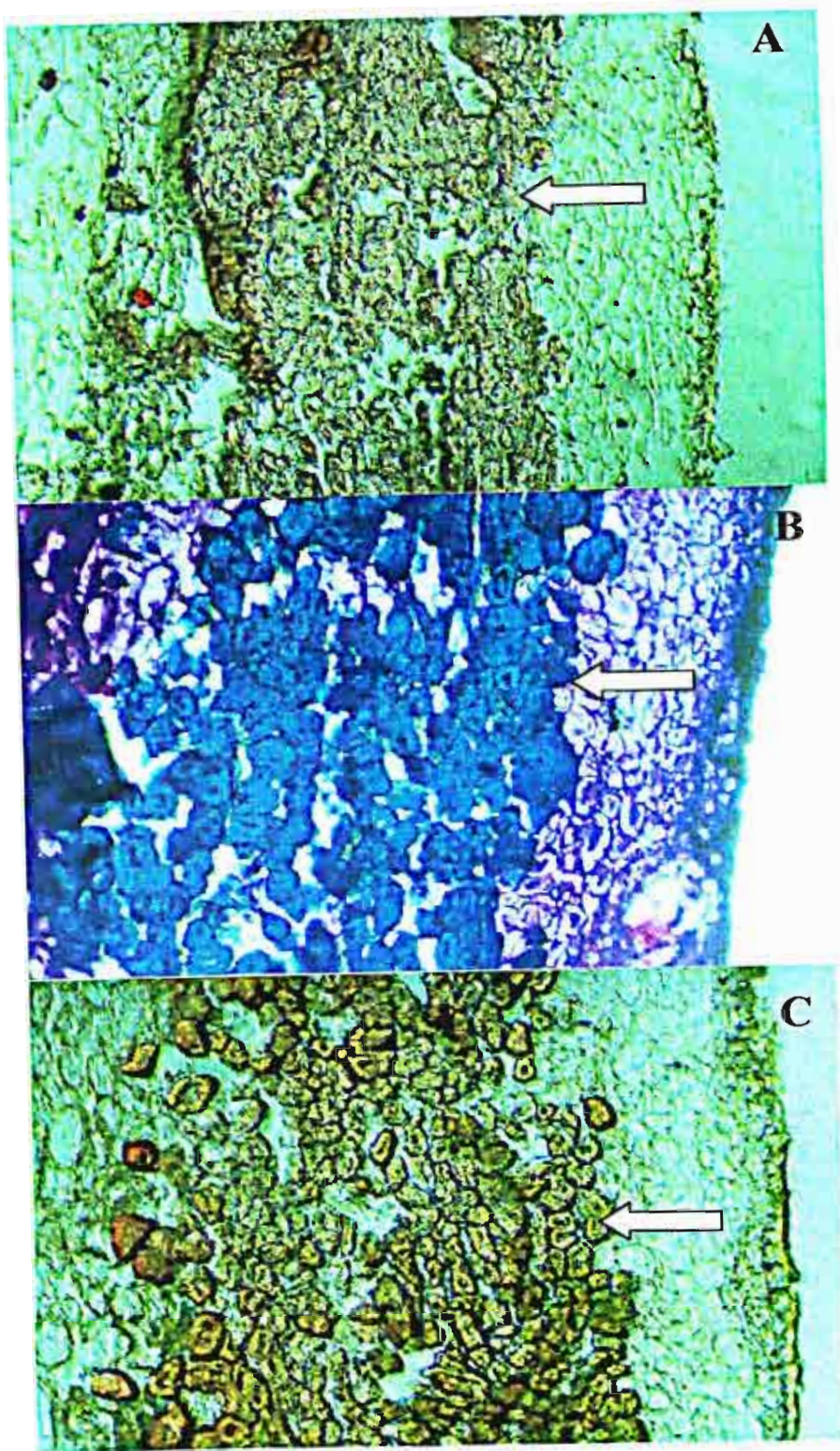


Figure 8 Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO_4 (C). A-C x 10.

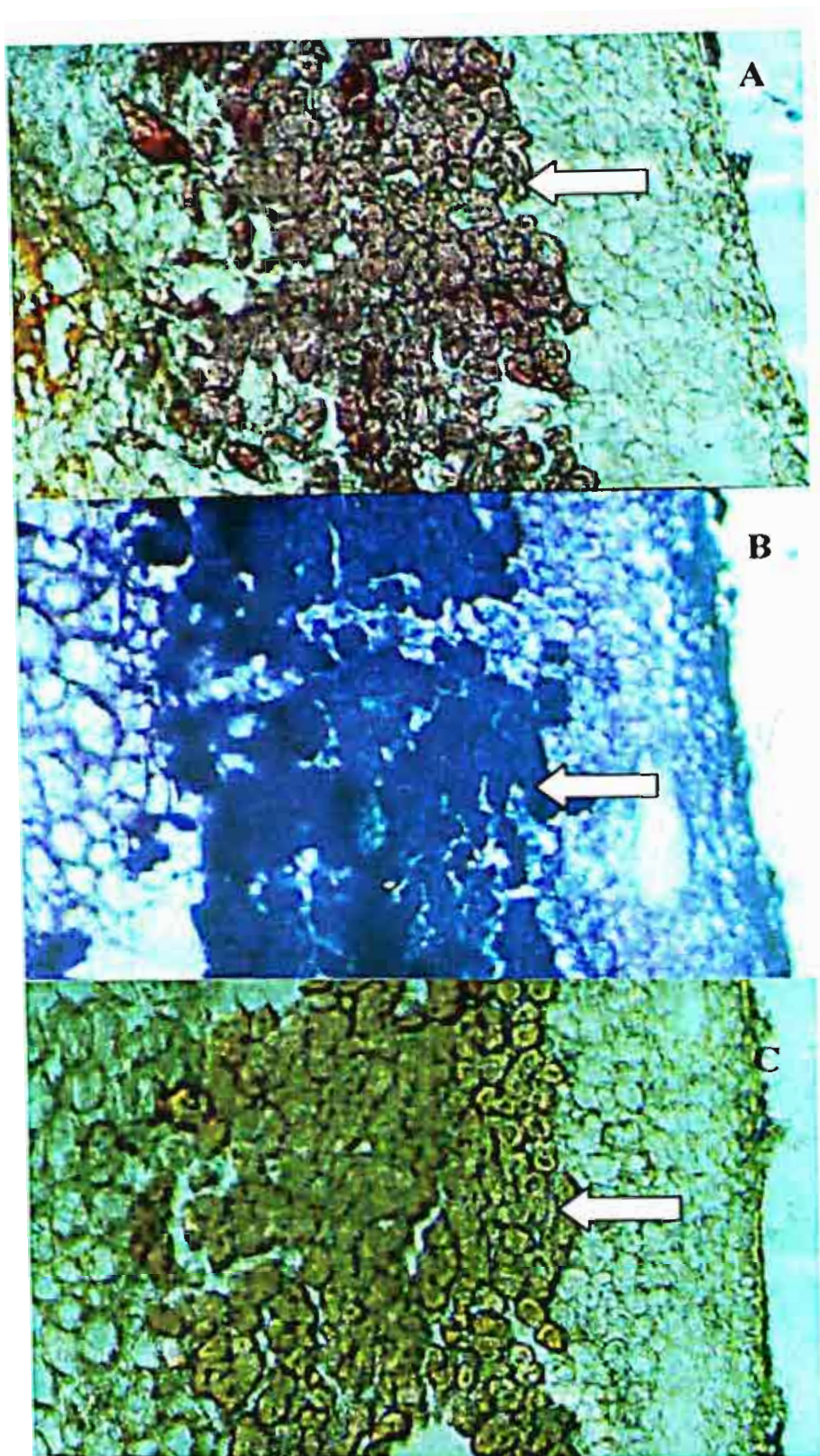


Figure 9 Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 50 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO_4 (C). A-C x 10.

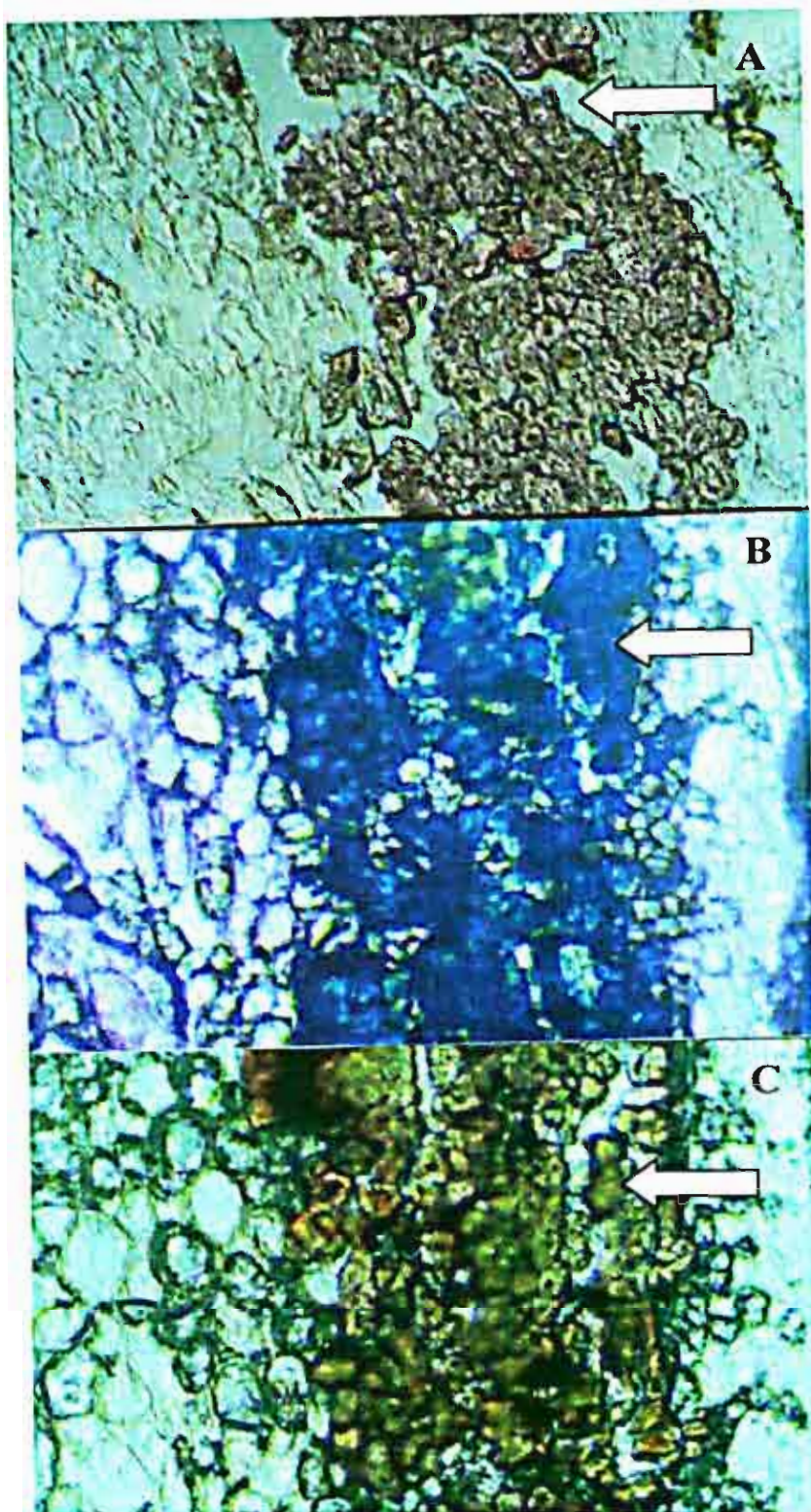


Figure 10 Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit 0 h after impact at drop height of 100 cm and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO_4 (C). A-C x 10.

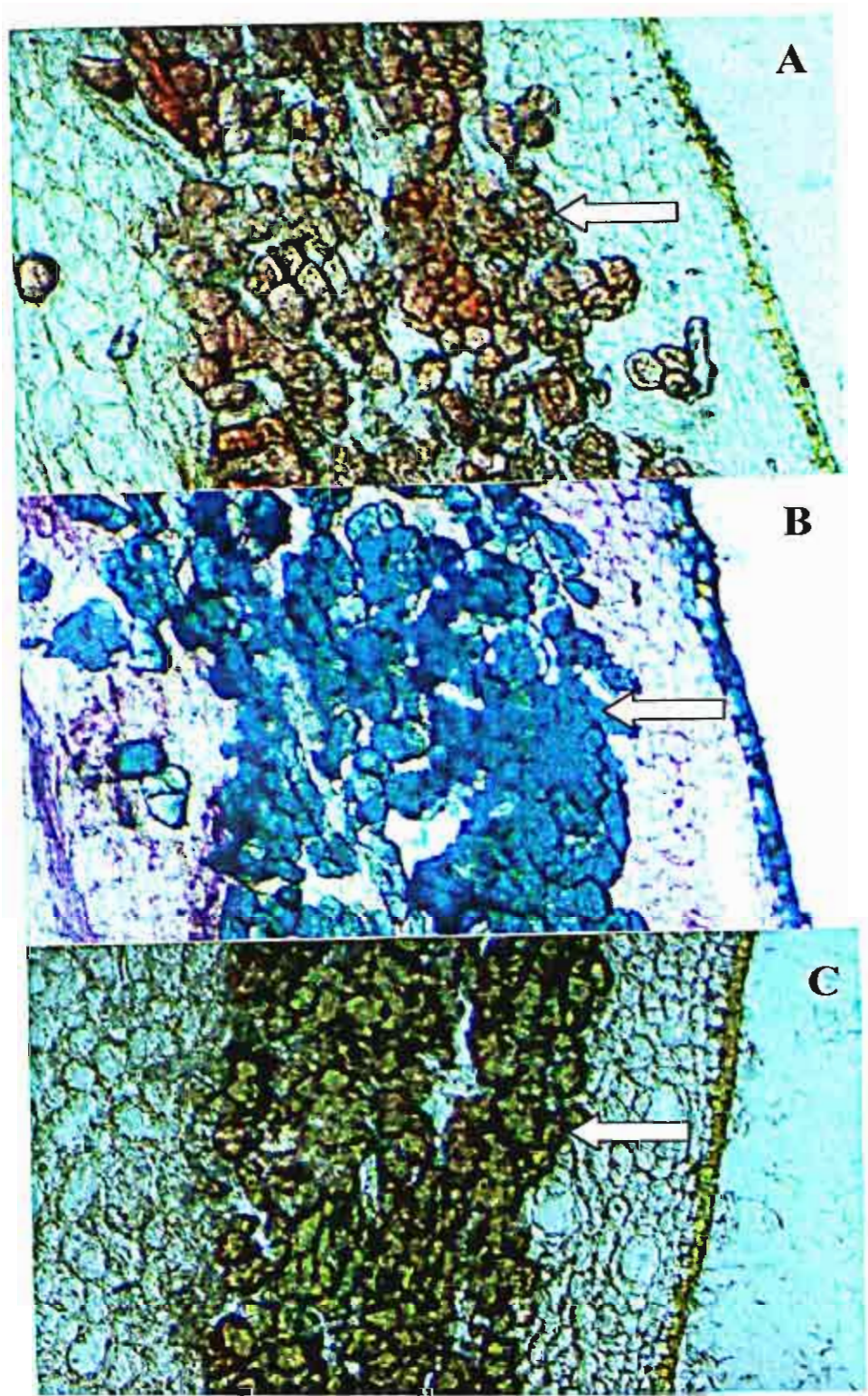


Figure 11 Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm held in nitrogen atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO_4 (C). A-C x 10.

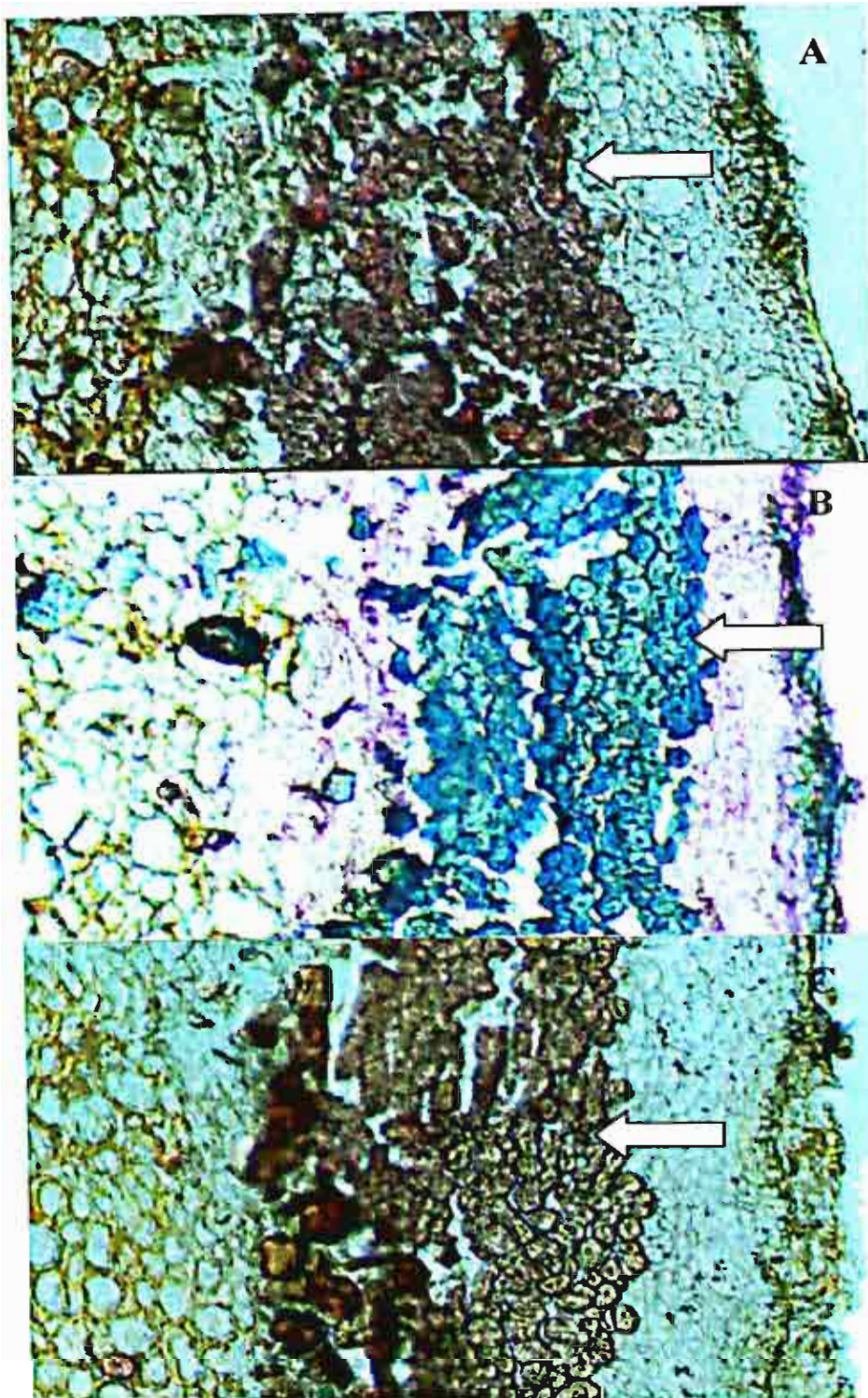


Figure 12 Lignin localization (arrows) of undamaged pericarp of dark purple mangosteen fruit and stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO_4 (C). A-C x 10.

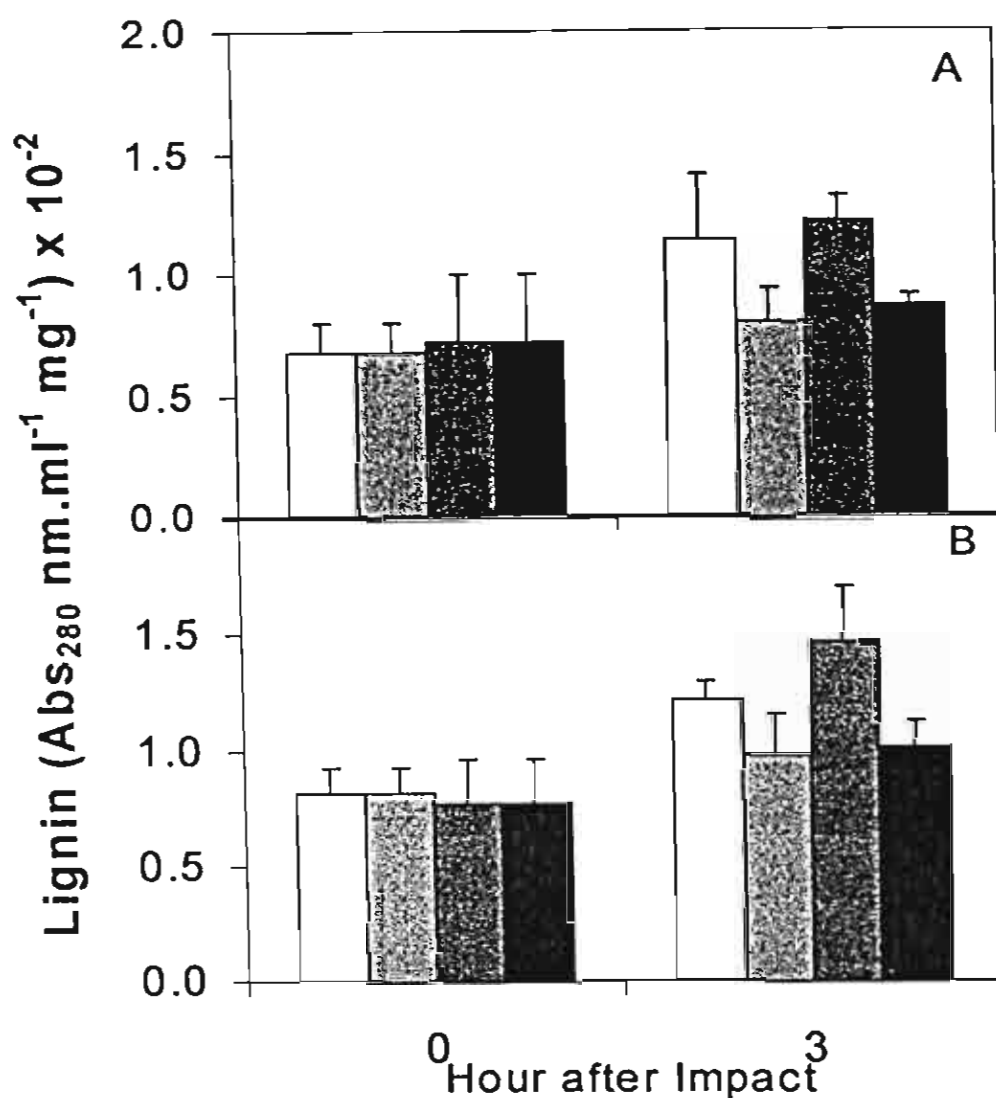


Figure 13 Lignin content of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□, ▤) and 100 (▨, ■) cm and held in normal (□, ▨) and nitrogen (▤, ■) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of three measurements.

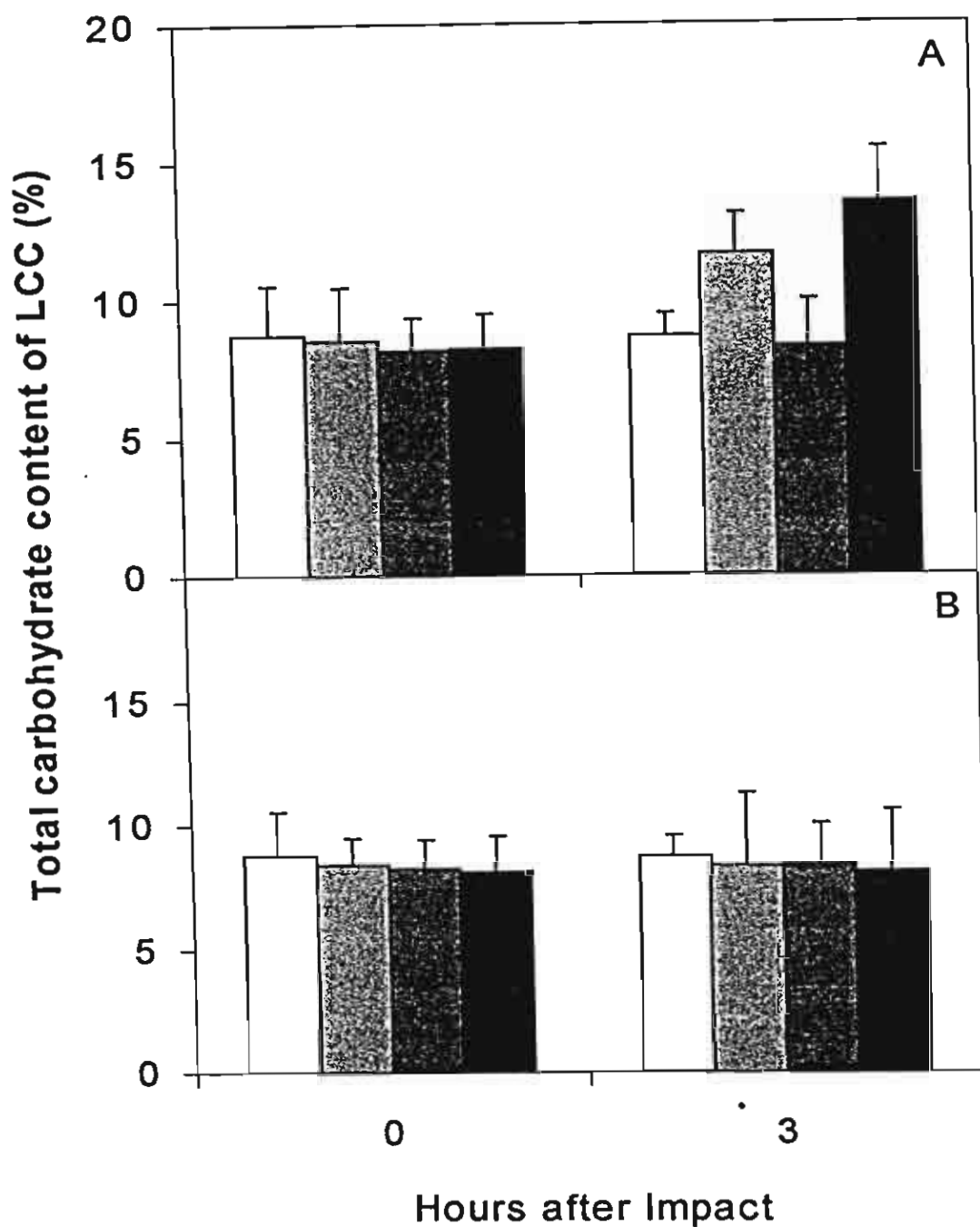


Figure 14 Carbohydrate content in lignin carbohydrate complex (LCC) of undamaged (□, ▒) and damaged (▓, ■) pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□, ▒) and 100 (▓, ■) cm and held in normal (A) and nitrogen (B) atmosphere (B). Mean values $\pm$ SD of six measurements.

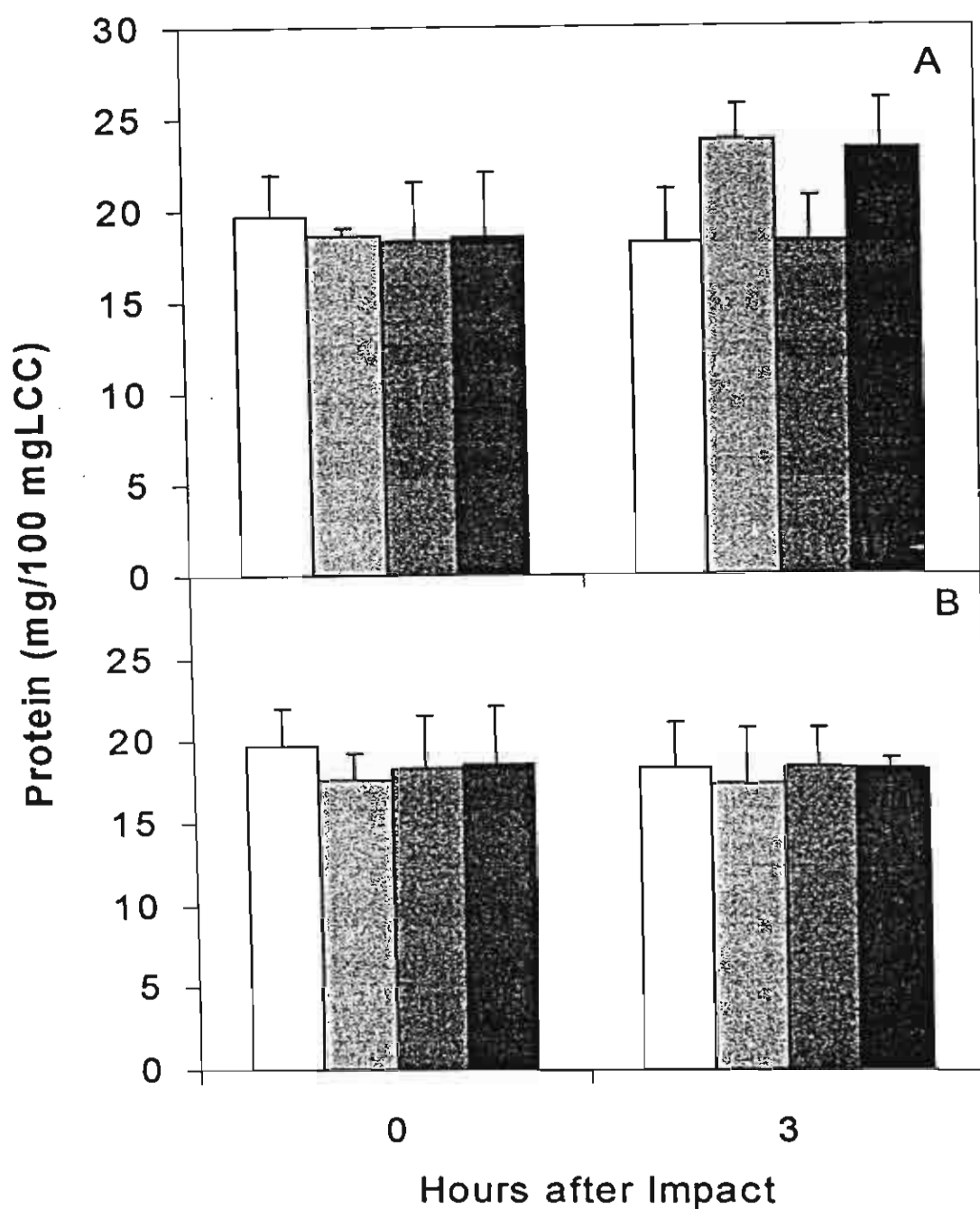


Figure 15 Protein content in lignin-carbohydrate complex (LCC) of undamaged (□, ■) and damaged (■, ■) pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop 50 (□, ■) and 100 (■, ■) cm and held in normal (A) and nitrogen (B) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of six measurements.

(sinapic acid) ที่เป็นสารฟีนอลิกมาตรฐาน (Figure 18) แต่การดูดแสงสูงสุดที่ 280 nm นั้นแตกต่างกันระหว่างสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดและจากสารฟีนอลิกมาตรฐาน สารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบที่ 0 ชั่วโมงมีค่าการดูดแสงที่ 280 nm สูงกว่าสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบแล้ว 3 ชั่วโมง และสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน มีค่าการดูดแสงที่ 280 nm สูงกว่าสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (Figure 17A, 17B, 17C, 17D) ทั้งกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกมีรูปแบบของการดูดช่วงแสงไม่แตกต่างกัน (Figure 18)

การตรวจสอบสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดด้วยวิธีแดงน้ำตาลและม่วงเข้ม ตกกระโทบที่ความสูงจากพื้นคอนกรีต 50 และ 100 เซนติเมตร หลังจากกระโทบที่ 0 และ 3 ชั่วโมง และอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนปกติหลังการตกกระโทบ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของการแยกสารโดยวิธีการทาง TLC คือปรากฏว่ามีสารฟีนอลิกที่แยกได้ 2 กลุ่ม ที่มี Rf ต่ำคือ 0.79 และมี Rf สูง คือ 0.92 (Figure 19) ขณะเดียวกันสารฟีนอลิกมาตรฐาน คือ กรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิก ที่หยดลงบนแผ่นซิลิกาเจลพร้อมกับสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดและผ่านการแยกสารโดยวิธี TLC พบว่ากรดพาราควมาริกมีการเคลื่อนที่และมี Rf อยู่ในกลุ่มเดียวกับสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดที่มี Rf ต่ำ คือ 0.79 (Figure 19 lane 1) ส่วนกรดไซแนปิกมีการเคลื่อนที่และมี Rf อยู่ในกลุ่มเดียวกับสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดที่มี Rf สูงคือ 0.92 (Figure 19 lane 2)

การตรวจสอบสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดโดยวิธี HPLC พบว่ามีค่าการดูดแสงที่ 280 nm เกิดขึ้น 2 ครั้งคือ ค่าการดูดแสงเกิดขึ้นที่เวลา (retention time) 20.49 นาที และที่เวลา 23.83 นาที โดยที่ค่าการดูดแสงที่ปรากฏในช่วงแรกนั้นมีค่าสูงกว่าค่าการดูดแสงที่ปรากฏในช่วงที่สอง (Figure 20A) ช่วงการดูดแสงที่ 280 nm ในครั้งแรกและครั้งที่สองของสารฟีนอลิกที่สกัดได้นี้ไปพ้องกับการดูดแสงเกิดขึ้นที่เวลาเดียวกับค่าของกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกซึ่งเป็นสารฟีนอลิกมาตรฐานที่ตรวจสอบโดยวิธี HPLC (Figure 20B)

เมื่อตรวจสอบปริมาณของสารฟีนอลิกที่เป็นกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดด้วยวิธีแดงน้ำตาลแดงบริเวณที่ไม่ตกกระโทบพบว่ามีมากเป็น 2 เท่า ของในเปลือกผลมังคุดสีม่วงเข้มบริเวณที่ไม่ตกกระโทบ (Figure 21) และปริมาณกรดไซแนปิกมีมากเป็น 20 เท่าของกรดพาราควมาริก (Figure 23) ปริมาณกรดพาราควมาริกและไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดของทั้งวิธีแดงน้ำตาลแดงและม่วงเข้มที่ตกกระโทบ สูงจากพื้นคอนกรีต 100 เซนติเมตร มีน้อยกว่าเมื่อตกกระโทบสูงจากพื้นคอนกรีต 50

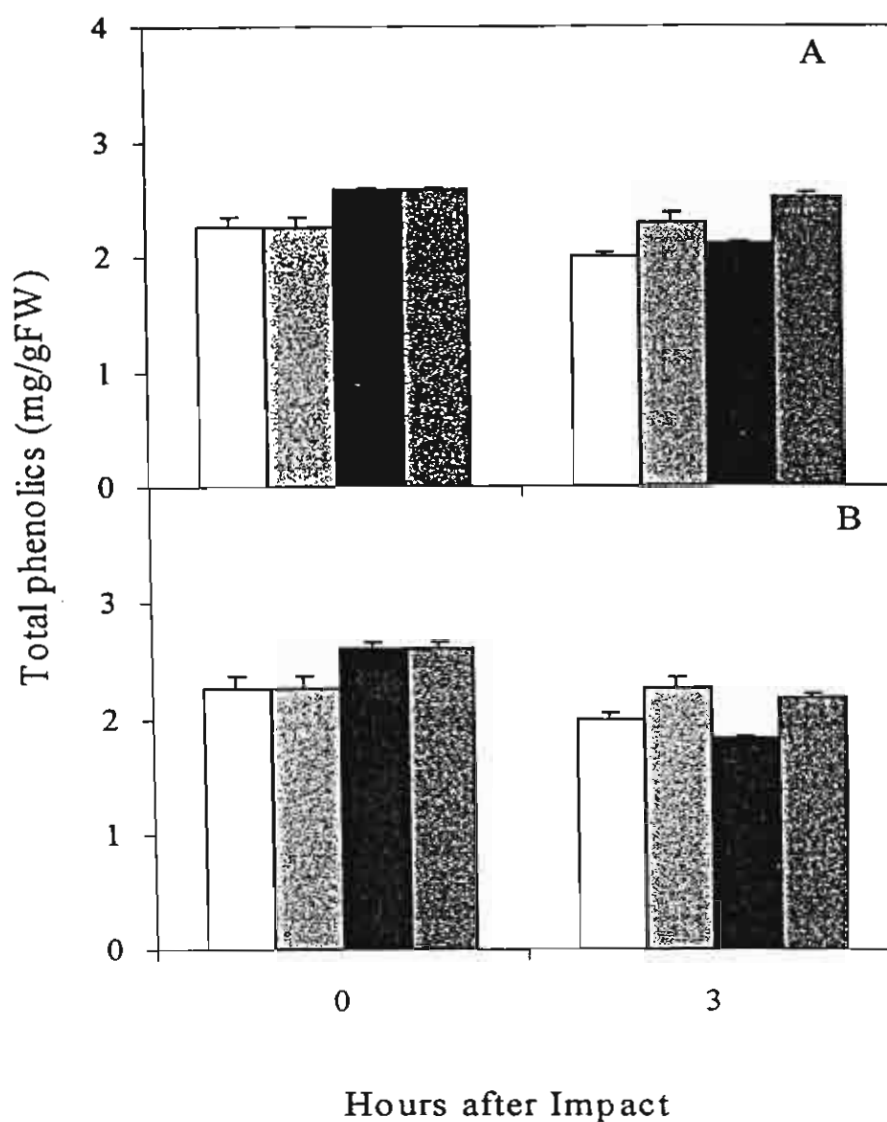


Figure 16 Changes in total phenoloic contents of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□, ▨) and 100 (■, ▩) cm and held in air (□, ■) and nitrogen (▨, ▩) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of five measurements.

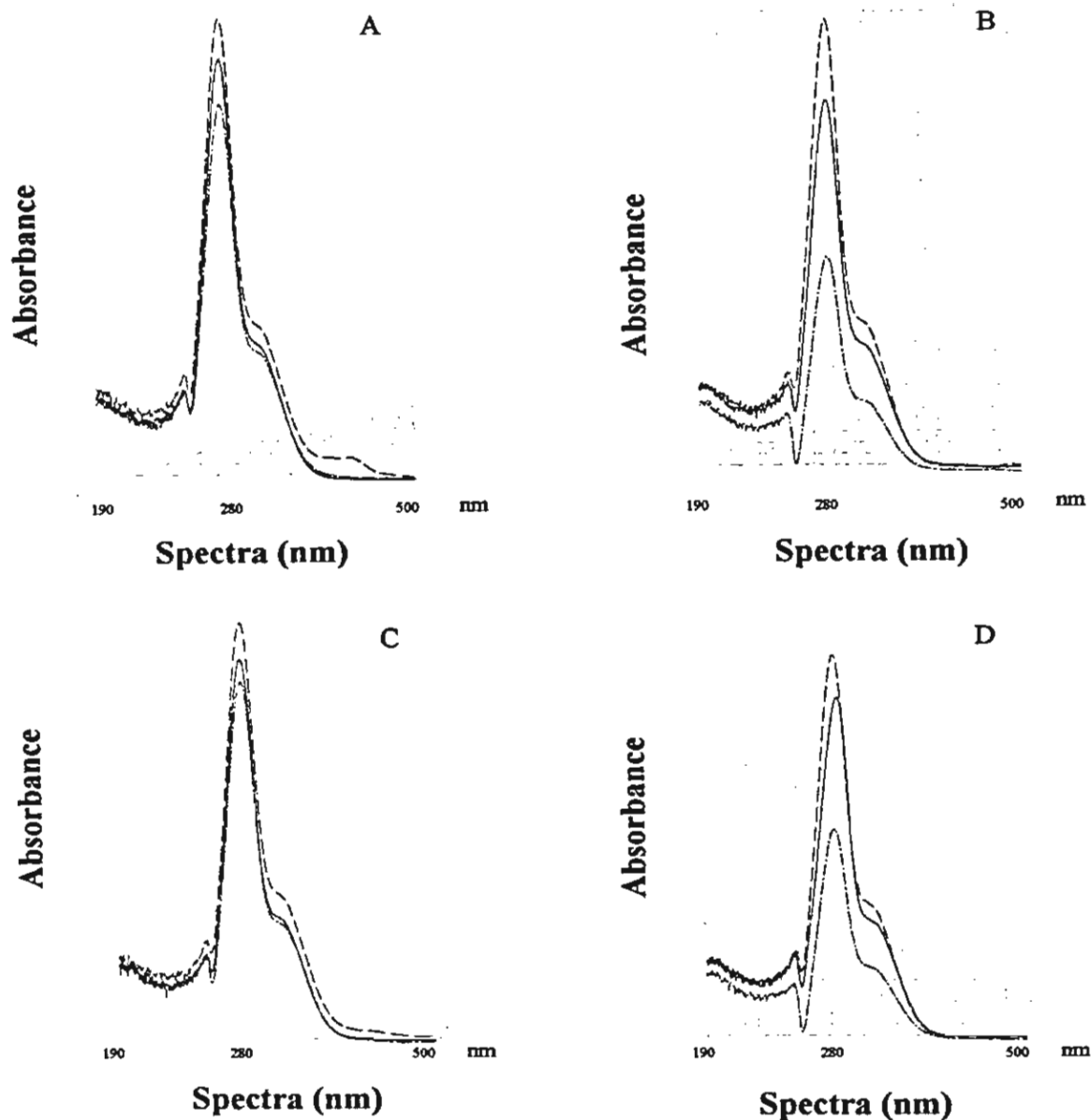


Figure 17 Changes in absorbance spectra of total phenolics of damaged pericarp of reddish brown (A,B) and dark purple (C,D) mangosteen fruit 0 (-----) and 3 (— , - - - -) h after impact at drop height of 50 (A,C) and 100 (B,D) cm and held in air (- - - - -) and nitrogen (———) atmosphere.

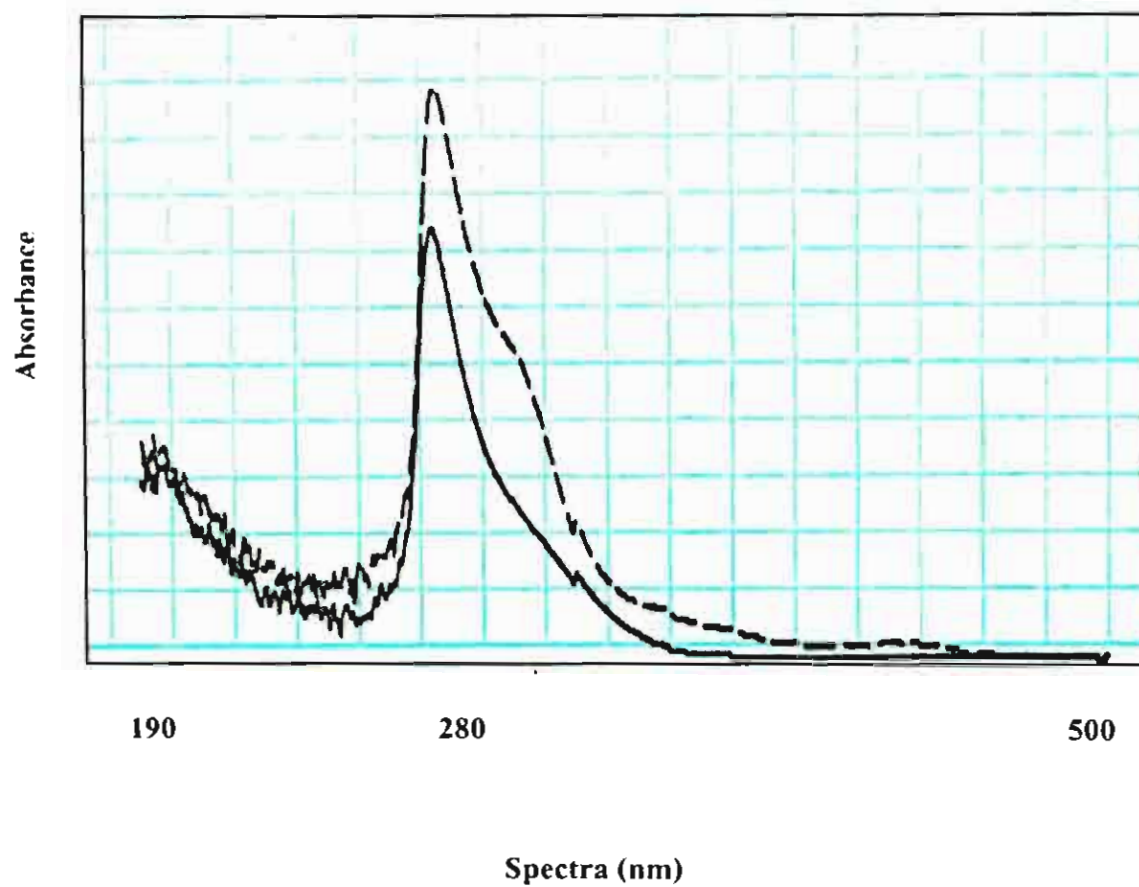


Figure 18 Changes in absorbance spectra of standard *p*-coumaric acid (-----) and sinapic acid (——).

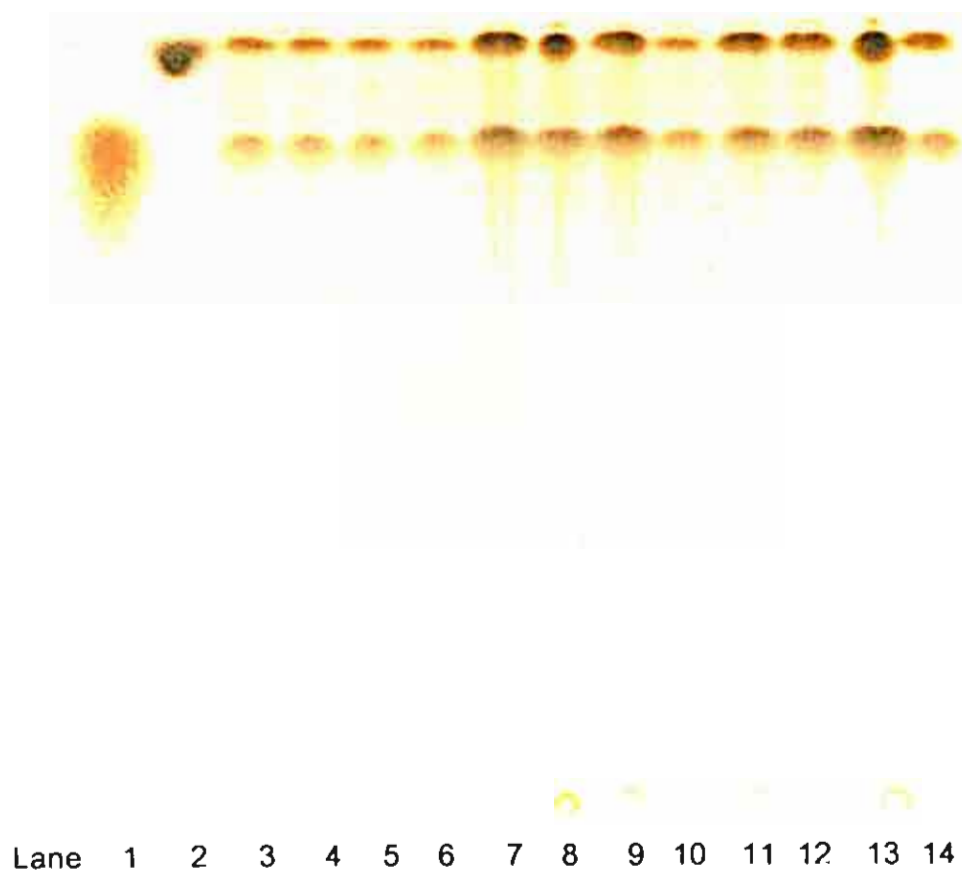


Figure 19 Thin layer chromatograms of phenolics of standard *p*-coumaric acid (lane 1), sinapic acid (lane 2), damaged pericarp of reddish brown (lanes 3-8) and dark purple (lanes 9-14) mangosteen fruit 0 (lanes 3,5,9,11) and 3 (lanes 4, 6-8, 10, 12-14) h at drop height of 50 (lanes 3, 4, 7, 9, 10, 13) and 100 (lanes 5, 6, 11, 12, 14) cm held in air (lanes 3-6, 9-12) and nitrogen (lanes 7, 8, 13, 14).

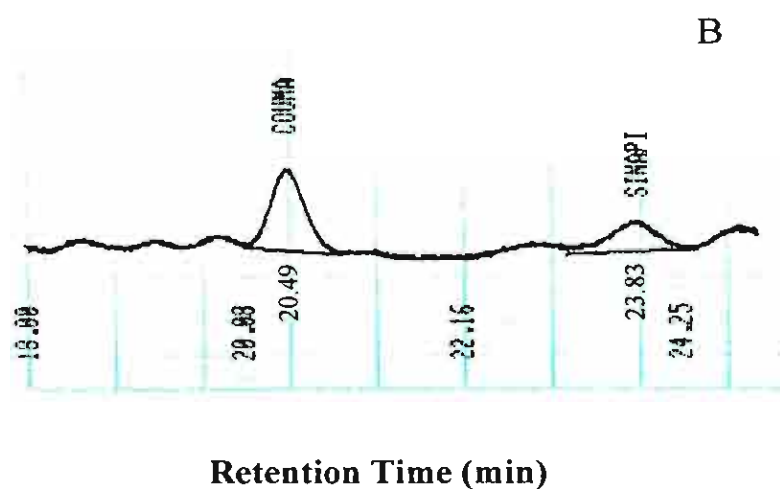
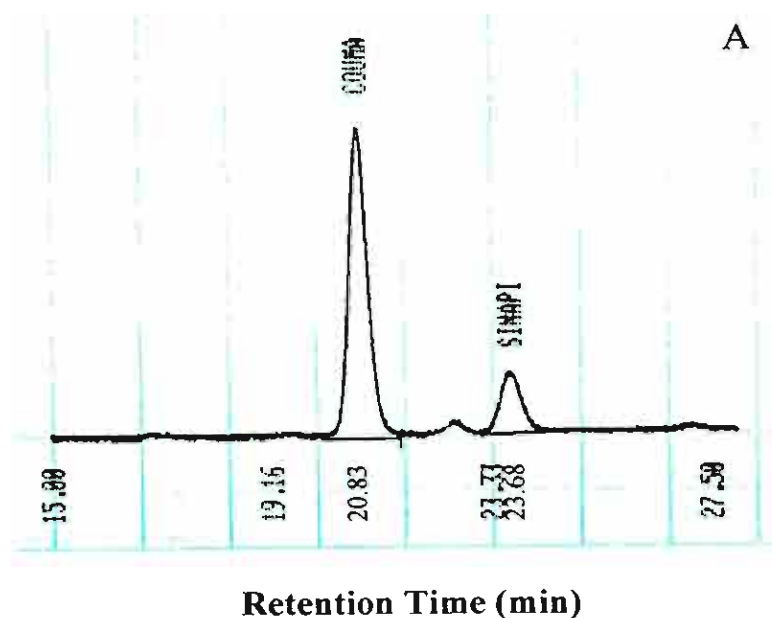


Figure 20 High pressure liquid chromatograms of standard *p*-coumaric acid and sinapic acid (A) and phenolics extracted from damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit 3 h after impact at drop height of 100 cm and held in air.

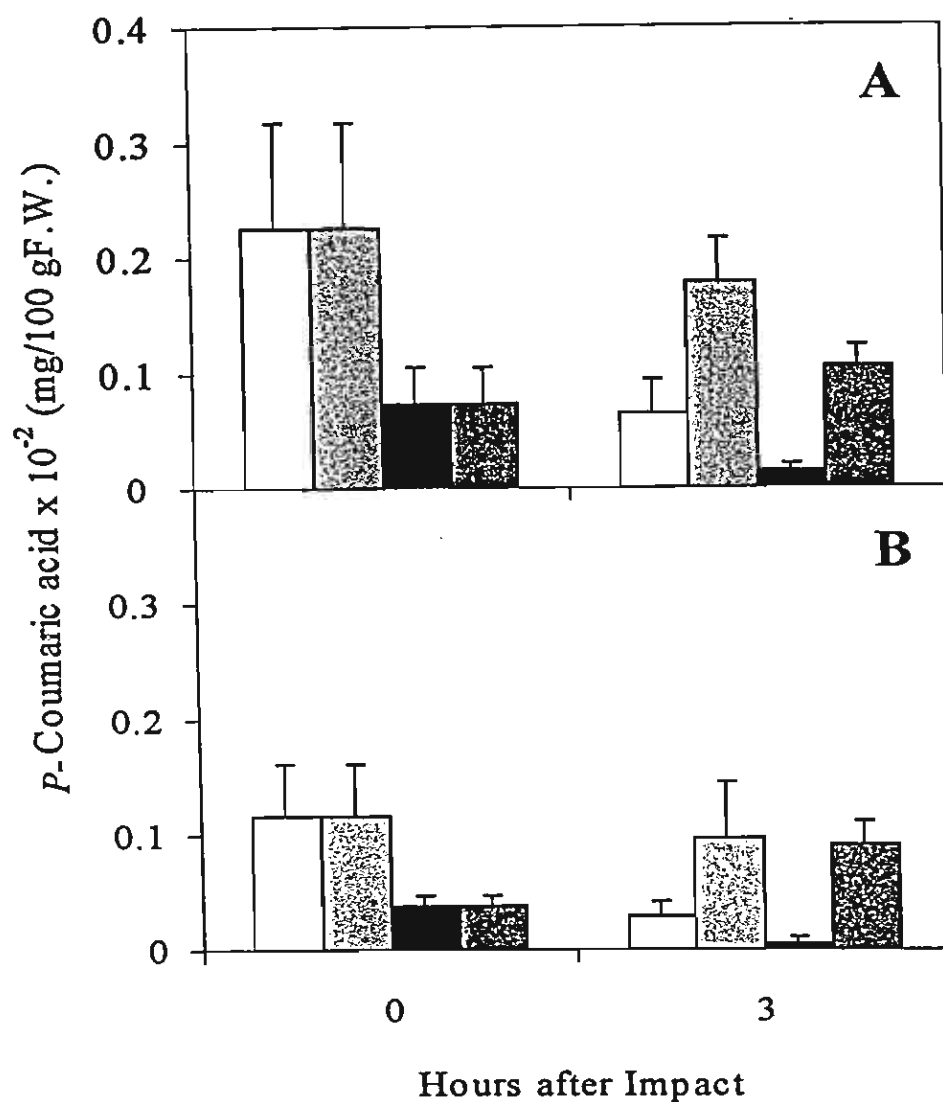


Figure 21 Changes in *p*-coumaric acid of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 cm (□, ▨) and 100 (■, ▩) cm and held in air (□, ■) and nitrogen (▨, ▩) atmospheres. Mean values $\pm$ SD of five measurements.

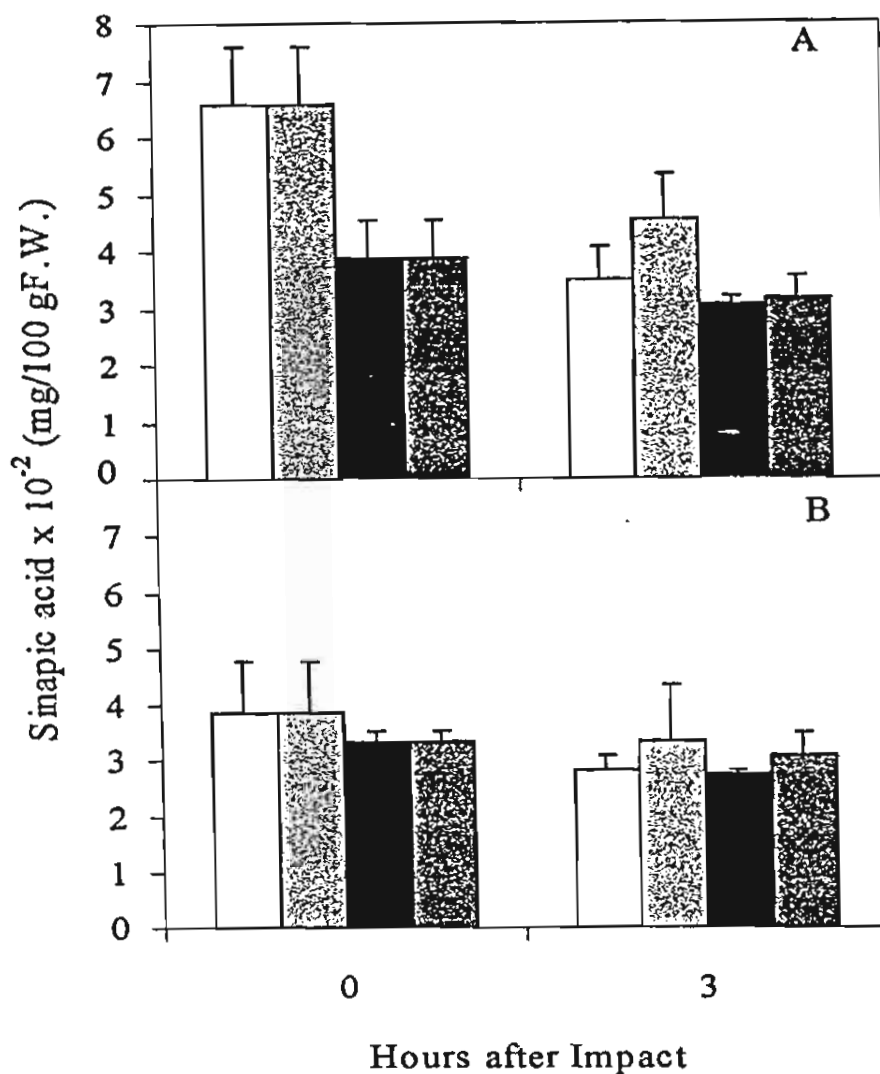


Figure 22 Changes in sinapic acid of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 ( , ) and 100 ( , ) cm and held in air ( , ) and nitrogen ( , ) atmospheres. Mean value $\pm$ SD of five measurements.

เซนติเมตร และปริมาณกรดพาราความาริก (Figure 21) ลดลงเร็วกว่าปริมาณกรดไซแนปิก (Figure 22) ปริมาณกรดพาราความาริกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีการลดลงเร็วกว่าอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน และปริมาณกรดพาราความาริกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (Figure 21) มีการลดลงมากกว่าปริมาณกรดไซแนปิก (Figure 22)

การทดลองที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนิน

กิจกรรมเอนไซม์ PAL ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบค่อยๆ มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ตั้งแต่นาทีที่ 0 จนกระทั่งนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในนาทีที่ 5 หลังการตกกระทบแล้วลดลง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึงจุดสูงสุดในนาทีที่ 15 หลังการตกกระทบ แล้วลดลงอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 20 แล้วค่อยๆ ลดลงหลังจากนาทีที่ 20 (Figure 23)

กิจกรรมเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบค่อยๆ มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จากนั้นที่ 0 จนถึงนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ CAD เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในนาทีที่ 5 หลังการตกกระทบแล้วลดลง กิจกรรมของเอนไซม์ CAD เพิ่มขึ้นมากและรวดเร็วในนาทีที่ 10 และเพิ่มถึงจุดสูงสุดในนาทีที่ 15 แล้วลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น และเพิ่มขึ้นอีกในนาทีที่ 30 หลังการตกกระทบแล้วค่อยๆ ลดลงจนถึงนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ (Figure 24)

กิจกรรมของเอนไซม์ POD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยตั้งแต่นาทีที่ 0 จนกระทั่งถึงนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ ขณะที่กิจกรรมของ POD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 10 และเพิ่มถึงจุดสูงสุดในนาทีที่ 15 แล้วลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในนาทีที่ 120 และ 180 หลังการตกกระทบ (Figure 25)

การทดลองที่ 4 การแสดงออกของจีน

การศึกษาการแสดงออกของจีน (gene expression) ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ เนื่องจาก CAD เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์สารลิกนินในพืชหลายชนิด และกิจกรรมของเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเพิ่มขึ้นมากกว่าหลายเท่าของเอนไซม์ PAL และ POD ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของจีนที่ควบคุมเอนไซม์ CAD ในเบื้องต้นได้สกัด RNA จากเปลือกผล

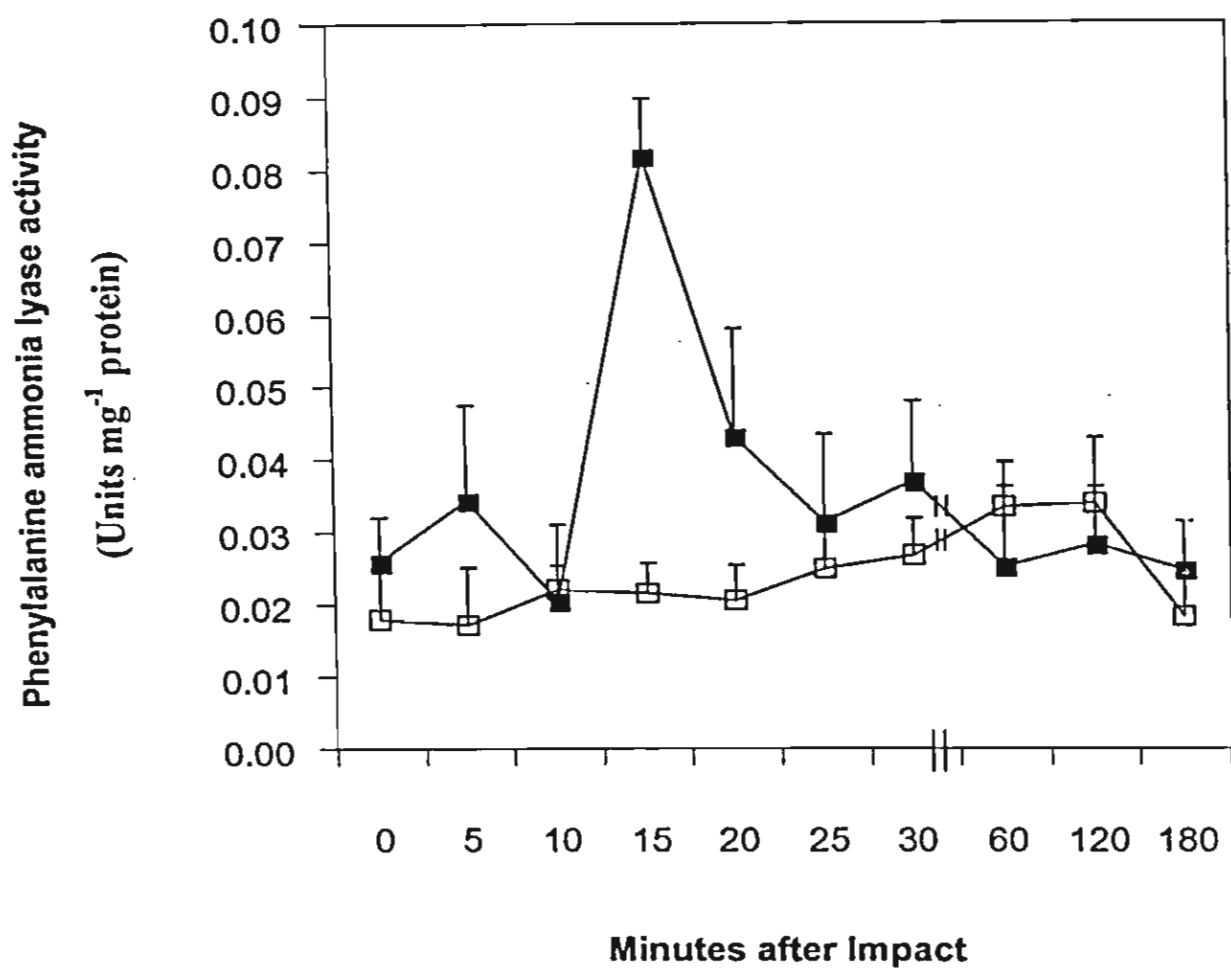


Figure 23 Phenylalanine ammonia lyase activity of undamaged (□) and damaged (■) pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm and held in air at room temperature.

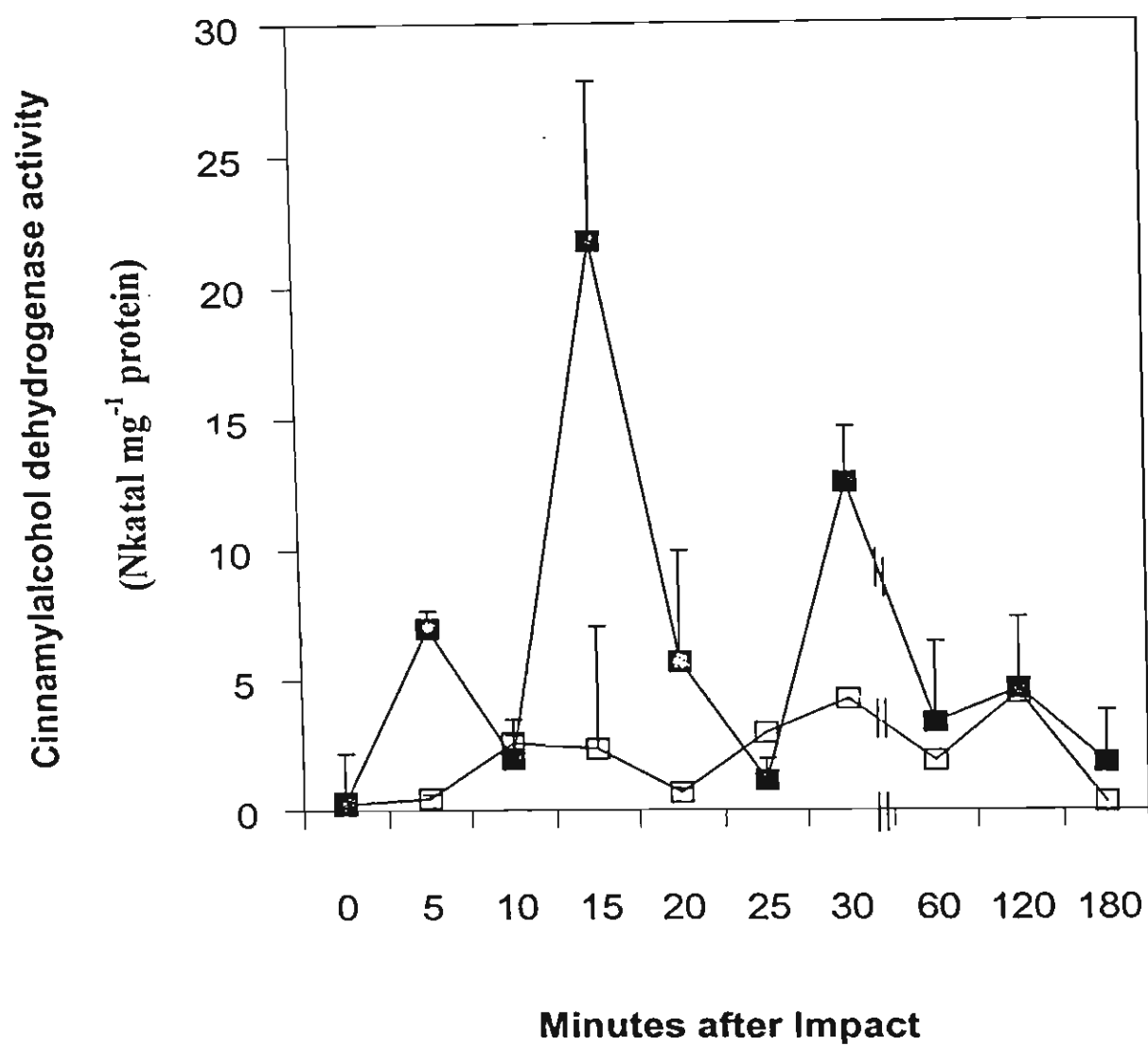


Figure 24 Cinnamyl alcohol dehydrogenase activity of undamaged (□) and damaged (■) pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm and held in air at room temperature.

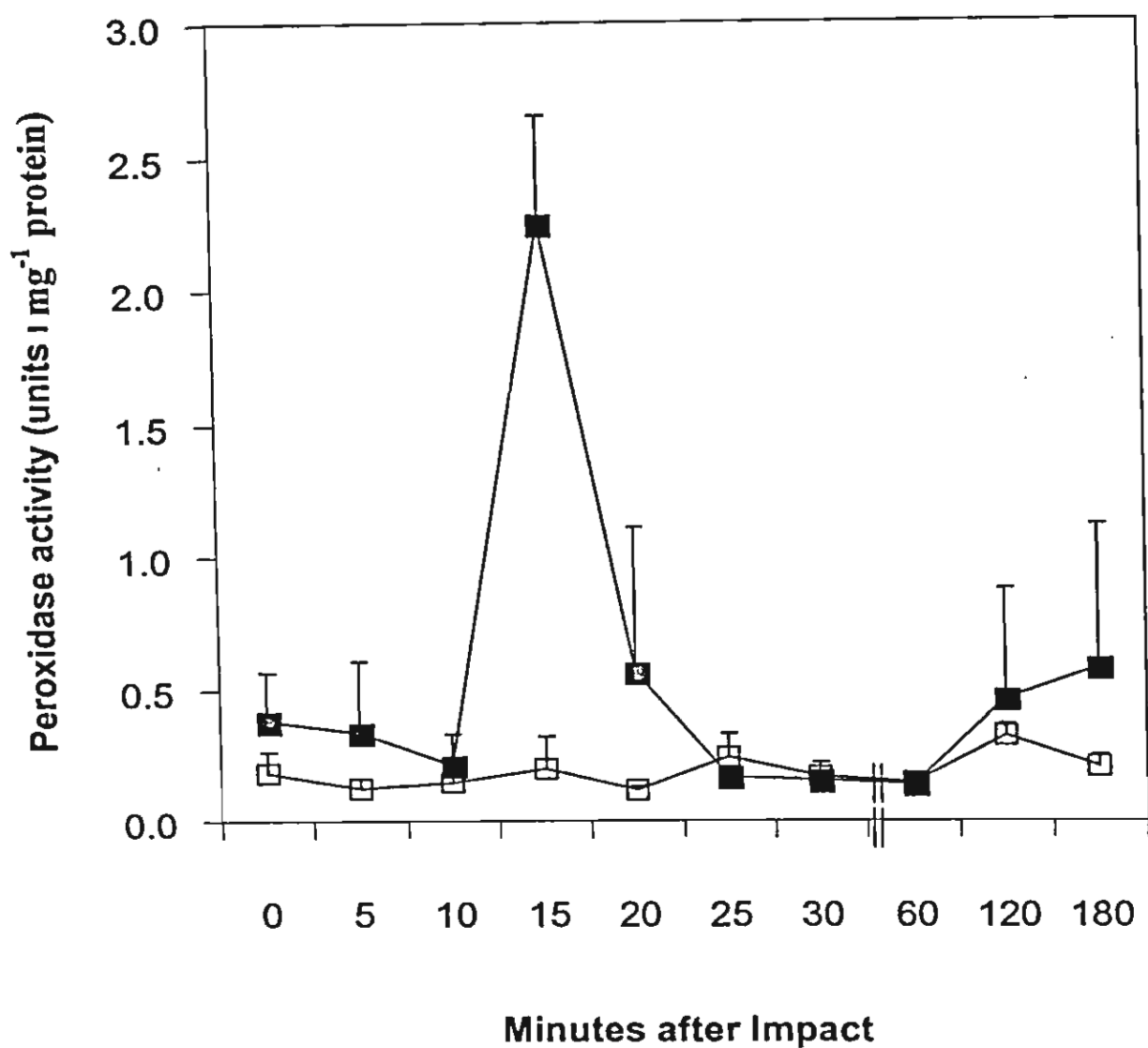


Figure 25 Peroxidase activity of undamaged (□) and damaged (■) pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm and held in air at room temperature.

มั่งคุด และสืบค้นข้อมูลของจีนที่ควบคุม CAD จากพืชชนิดต่าง จาก gene bank ของ National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nih.gov) เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (Figure 26) โดยเลือกเบสหลักที่ปรากฏเหมือนกันในจีนของพืชนั้น และสามารถออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งจะนำมาทดลองทำ polymerase reaction ต่อไปได้ดังนี้คือ

CAD

5' ---- 3' CCTATGG(TC)C CTGGGCA(TC)GA (AG)GTGGT(TCA) GGTGAGGT

3' ---- 5' CCCAT(CTA)GCCT TGGC(TAC)A(TCA)CTT CAC(GCT)CCCATGTG

Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)

Plants	CAD Gene at the Position 531-578				
1. <i>Fragaria x Ananasa</i>	TCCTCTGGTT	CCAGGGCATG	AGATTGTTGG	TGAAGTTACG	GAAGTAGG
2. <i>Pinus radiata</i>	CCCAATGGTC	CCTGGGCATG	AAGTGGTGGG	TATTGTAACA	GAGATTGG
3. <i>Saccharum officinalis</i>	CCCCATGGTC	CCTGGGCACG	AAGTGGTCGG	TGAGGTGGTG	GAAGTCGG
4. <i>Zea mays</i>	TCCTATGGTC	CCTGGGCACG	AGGTGGTCGG	CGAGGTGGTG	GAGGTCCG
5. <i>Eucalyptus globulus</i>	CCCTATGGTT	CCTGGGCATG	AAGTGGTGGG	TGAGGTTCCTG	GAGGTGGG
6. <i>Lolium perenne</i>	CCCCATGGTT	CCCGGGCATG	AGGTGGTAGG	CGAGGTGGTG	GAGGTCCG
7. <i>Eucalyptus gunnii</i>	CCCTATGGTT	CCTGGGCATG	AAGTGGTGGG	TGAGGTTCCTG	GAGGTGGG
8. <i>Eucalyptus gunnii</i>	CCCTATGGTT	CCTGGGCATG	AAGTGGTGGG	CGAGGTTCCTG	GAGGTGGG
9. <i>Arabidopsis thaliana</i>	TCCTATGGTT	CCTGGGCACG	AGGTAGTAGG	TGAGGTGTTG	GAGGTGGG
10. <i>Medicago sativa</i>	TCCTATGGTT	CCCGGGCATG	AAGTGGTTGG	TGAGGTACTA	GAGGTGGG

Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)

Plants	CAD Gene at the Position 1139-1170		
1. <i>Fragaria x Ananasa</i>	CACGTCGCCG	TGAAGTTTGC	CAAGGCTATGGG
2. <i>Pinus radiata</i>	CACATGGGTG	TCAAGATTGC	CAAAGCCTTTGG
3. <i>Saccharum officinalis</i>	CACATGGGCG	TGAAGGTGGC	CAAGGCCATGGG
4. <i>Zea mays</i>	CACATGGGCG	TGAAGGTAGC	CAAGGCCATGGG
5. <i>Eucalyptus globulus</i>	CACATGGGCG	TGAAGATAGC	CAAGGCCATGGG
6. <i>Lolium perenne</i>	CACATGGGCG	TGAAGGTGGC	CAAGTCCATGGG
7. <i>Eucalyptus gunnii</i>	CACATGGGGG	TGAAGATAGC	CAAGGCCATGGG
8. <i>Eucalyptus gunnii</i>	CACATGGGGG	TGAAGATAGC	CAAGGCCATGGG
9. <i>Arabidopsis thaliana</i>	CACATGGGTG	TGAAGATAGC	TAAAGCAATGGG
10. <i>Medicago sativa</i>	CACATGGGGG	TGAAAGTAGC	AAAGGCATTAGG

Figure 26 Consensus genes of CAD cDNA of different plants searched from the National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nih.gov).

การทดลองที่ 1 การสะสมสารลิกนินในเปลือกผลมังคุด

ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระโทบและได้รับอันตรายเนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเหนือจุดเยือกแข็ง เพียงแต่ความแน่นเนื้อการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระโทบนั้นเกิดขึ้นเฉพาะจุดของเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหายหรือเกิดขึ้นเฉพาะตรงบริเวณที่มีการตกกระโทบเท่านั้น (Tongdee and Suwanagul, 1989 ; Ketsa and Atantee, 1998) ขณะที่ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดที่เกิดขึ้นหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเหนือจุดเยือกแข็งนั้นเกิดขึ้นทั้งผล (Uthairatanakij and Ketsa, 1996) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สนับสนุนผลการวิจัยที่เคยรายงานไว้ว่า ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังการตกกระโทบนั้นขึ้นอยู่กับวัยของผลมังคุด ความสูงของการตกกระโทบ และสภาพของบรรยากาศ กล่าวคือความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มที่ตกกระโทบมีการเพิ่มมากขึ้นกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบที่สูงจากพื้นมากมีการเพิ่มมากขึ้นกว่าเปลือกผลมังคุดตกกระโทบสูงจากพื้นน้อยกว่า และความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีการเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน การเพิ่มความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบนี้เกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่มีการตกกระโทบเช่นเดียวกัน ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบนี้สนับสนุนข้อสรุปที่ว่า การเพิ่มขึ้นของความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่มีการตกกระโทบนั้นน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากสังเคราะห์สารลิกนินเพิ่มขึ้น การสังเคราะห์สารลิกนินเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อของพืชที่เกิดบาดแผลเนื่องจาก โรค แมลง และศัตรูอื่นๆ เป็นกลไกป้องกันตนเอง (defense mechanism) ของพืช เพราะสารลิกนินจะช่วยซ่อมแซมและเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ในส่วนของเนื้อเยื่อที่พืชได้รับอันตราย (Vance, et al., 1980) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ออกซิเจนปกติมีปริมาณของสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ลิกนินนั้นมีการเพิ่มขนาดของโมเลกุล (polymerization) ของสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์ลิกนินต้องการออกซิเจน โดยมีเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Whetten and Sederoff, 1995)

หลักฐานหรือข้อมูลที่สนับสนุนการเพิ่มปริมาณสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระโทบโดยที่มีวัยแตกต่างกัน การตกกระโทบที่สูงจากพื้นคอนกรีตต่างกัน และหลังการตกกระโทบอยู่ในสภาพของบรรยากาศต่างกัน คือการใช้กรรมวิธีของการย้อมสีเนื้อเยื่อเปลือกผลมังคุด (histochemical staining) ทั้งบริเวณที่ไม่มีการตกกระโทบและบริเวณที่มีการตกกระโทบซึ่งพบว่าการ

สะสมปริมาณสารลิกนินเพิ่มขึ้นในส่วนของเนื้อเยื่อเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบ ลักษณะของการสะสมสารลิกนินในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบนี้ มีรายงานว่าเกิดขึ้นเช่นเดียวกันในพืชหลายชนิด เช่น แรดิช (Asada and Matsumoto 1967) มันฝรั่ง (Friend, 1990) มะเขือเทศ (Griffiths and Isaac, 1966) และข้าวสาลี (Southerton and Deverall, 1990) คุณสมบัติที่สำคัญทางด้านสรีระของสารลิกนินที่มีการสะสมเพิ่มขึ้นนี้คือการสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อบริเวณที่ได้รับความเสียหาย เพื่อเป็นการป้องกันตัวเอง (Campbell and Sederoff, 1996)

หลังการตกกระทบเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบมีความแน่นเนื้อพร้อมการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของปริมาณสารลิกนิน การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบไม่ได้เกิดขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพิ่มความแน่นเนื้อในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบ เมื่อมีการพิจารณาความแน่นเนื้อและปริมาณของสารลิกนินที่มีอยู่แล้วในเบื้องต้น พบว่าการเพิ่มความแน่นเนื้อในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบภายใต้เงื่อนไขของวัยม้งคุด ความสูงของการตกกระทบและสภาพของบรรยากาศที่ต่างกันมีอยู่ในช่วง 215-385 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเพิ่มปริมาณสารลิกนินในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบมีอยู่ในช่วง 150-288 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินเพียงอย่างเดียวอาจจะไม่พอเพียงทำให้เกิดการเพิ่มความแน่นเนื้อในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่มีการตกกระทบ น่าจะมีสารอย่างอื่นที่เกิดขึ้นด้วยในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบและสารนี้เป็นตัวช่วยให้มีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมาก จากการวิเคราะห์ปริมาณสารคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนของลิกนินคาร์โบไฮเดรต (lignin-carbohydrate complex) ในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบ พบว่าปริมาณสารคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนมีการเพิ่มขึ้น 27.43-64.24 และ 19.31-27.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณสารคาร์โบไฮเดรตมีมากกว่าปริมาณสารโปรตีน การเพิ่มปริมาณสารของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนขึ้นอยู่กับสภาพของบรรยากาศที่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับการสังเคราะห์สารลิกนิน ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเพิ่มปริมาณสารทั้งคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนของลิกนินคาร์โบไฮเดรตในเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบนั้นขึ้นอยู่กับ การสังเคราะห์ลิกนิน (Whetten and Sederoff, 1995) มีรายงานว่าสารลิกนินในผนังเซลล์ของพืชสามารถรวมตัวกับสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์ของพืชเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้น (Kondo et al., 1990; Lam et al., 1994; Ralph et al., 1995) นอกจากนี้โปรตีนในผนังเซลล์ของพืชที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติก (aromatic amino acid) โดยเฉพาะไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งมีศักยภาพมากที่จะรวมตัวกับสารลิกนินกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้ (Whitmore, 1978., Keller et al., 1988., Whetten et al., 1998) การเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างสารลิกนินกับสารคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่อยู่ในผนังเซลล์ของพืช น่าจะมีส่วนในการเพิ่มขึ้น ความหนาแน่นเนื้ออย่างรวดเร็วของเปลือกผลม้งคุดบริเวณที่ตกกระทบ (Iiyama et al., 1994)

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุด

การลดลงของปริมาณสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินและความแน่นเนื้อ ปรากฏการณ์เช่นนี้อาจจะเป็นการแสดงถึงความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์สารลิกนินจากสารฟีนอลิกและนำไปสู่การเพิ่มความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ (Diaz et al., 1998; Ketsa and Atantee, 1998; Vance et al., 1980) เนื่องจากขั้นตอนของการสังเคราะห์ลิกนินในพืชนั้นได้มีผู้เสนอไว้อย่างน้อยมี 3 ทาง (pathway) ด้วยกัน การสังเคราะห์ ลิกนินแต่ละทางมีสารที่เป็นตัวกลาง (intermediate) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Whetten and Sederoff, 1995; Boudet et al., 1995) เพื่อตรวจสอบว่าสารฟีนอลิกตัวใดเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนินในเปลือกผลมังคุด จึงได้มีการตรวจสอบสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุดที่มีวัยต่างกัน ตกกระทบพื้นคอนกรีตที่มีความสูงจากพื้นต่างกัน และอยู่ในสภาพบรรยากาศต่างกันหลังการตกกระทบ โดยวิธีการทาง TLC และ HPLC ซึ่งพบว่าสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุดที่มีเงื่อนไขแตกต่างกันดังข้างต้นมีสารฟีนอลิก ที่สามารถแยกออกได้โดยวิธีการทาง TLC แค่ 2 กลุ่ม คือกลุ่มสารฟีนอลิกที่มี Rf ต่ำ (0.79) และมี Rf สูง (0.92) ซึ่งไปพ้องกับ Rf ของสารฟีนอลิกมาตรฐาน 2 ชนิด ที่ใช้ควบคุมกันระหว่างการแยกสารฟีนอลิกสกัดจากเปลือกผลมังคุด โดยวิธีการทาง TLC คือกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิก กรดพาราควมาริก มี Rf 0.79 ขณะที่กรดไซแนปิกมี Rf 0.92 เมื่อนำสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกผลมังคุดไปตรวจสอบโดยวิธีการทาง HPLC ควบคุมกับสารฟีนอลิกมาตรฐาน คือ กรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิก พบว่าสารฟีนอลิกที่มีค่าการดูดแสงที่ 280 nm มีอยู่ 2 กลุ่ม ซึ่งมี retention time ต่างกัน สารฟีนอลิกกลุ่มแรกมีค่า retention time 20.49 นาที และสารกลุ่มที่สอง มี retention time 23.68 นาที สารฟีนอลิก 2 กลุ่ม ที่สกัดจากเปลือกผลมังคุดนี้มี retention time พ้องกับสารฟีนอลิกมาตรฐานที่ใช้ตรวจสอบควบคุมกับสารฟีนอลิกที่สกัดได้ คือกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิก ซึ่งมีค่า retention time 20.83 และ 23.68 นาที ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบสารฟีนอลิกที่สกัดได้และสารฟีนอลิกมาตรฐานโดยวิธีการทาง TLC และ HPLC เป็นการยืนยันว่าสารฟีนอลิกที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนินเพิ่มขึ้นในเปลือกผลมังคุดบริเวณตกกระทบคือกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิก

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบตรงกันข้ามกับการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อและปริมาณสารลิกนิน กล่าวคือทั้งปริมาณกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกลดลงขณะที่ความแน่นเนื้อและปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ทั้งปริมาณกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มบริเวณที่ตกกระทบมีการลดลงมากกว่าในเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ ปรากฏการณ์เช่นนี้คล้ายกับการลดลงของปริมาณสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง และสีม่วงเข้ม การเปลี่ยนแปลงสาร

ฟีนอลิกในลักษณะเช่นนี้อาจจะเป็นเพราะว่าสารฟีนอลิกถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารลิกนินในเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มบริเวณที่ตกกระทบมากกว่าในเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ (Boudet et al., 1995) ซึ่งทำให้เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มบริเวณที่ตกกระทบมีปริมาณสารลิกนินเพิ่มมากขึ้นกว่าในเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ และนำไปสู่การเพิ่มความแน่นเนื้อในเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มบริเวณที่ตกกระทบมากกว่าในเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ (Ketsa and Atantee, 1998)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ พบว่าปริมาณกรดไซแนปิกมีมากกว่าหลายเท่าของปริมาณกรดพาราควมาริก แต่ปริมาณกรดพาราควมาริกลดลงมากกว่าปริมาณกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในปฏิกิริยาของขั้นตอนการเปลี่ยนกรดพาราควมาริกไปเป็นสารตัวกลางอื่นๆ นั้นเกิดขึ้นเร็วกว่าในปฏิกิริยาของขั้นตอนการเปลี่ยนกรดไซแนปิกไปเป็นสารตัวกลางอื่นๆ ในกระบวนการสังเคราะห์สารลิกนินของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ ปริมาณสารพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีการลดลงภายใต้สภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมากกว่าภายใต้สภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าการนำสารฟีนอลิกไปใช้ในการสังเคราะห์สารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบนั้นต้องการออกซิเจน ในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์สารลิกนินเป็นการรวมตัวของแอลกอฮอล์ประเภทพาราควมาริก (*p*-coumaryl alcohol) คอนิเฟอรอล (*coniferyl alcohol*) และ ซิแนปิล (*sinapyl alcohol*) ให้มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้นโดยปฏิกิริยาของ oxidative polymerization โดยมีเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในสภาพที่ต้องมีออกซิเจน (Boudet et al., 1995) การสังเคราะห์ลิกนินที่เกิดขึ้นในพืชกลุ่มแองจิโอสเปิร์ม (*angiosperm*) ที่เป็นพืชพวกไม้เนื้อแข็ง (*hardwood*) มีลักษณะของขั้นตอนเป็น *guaiacyl-syringyl lignin* คือในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์เป็นการรวมตัวของแอลกอฮอล์ประเภทคอนิเฟอรอลและซิแนปิล (Higuchi, 1985) ดังนั้นการตรวจพบกรดพาราควมาริกและกรดไซแนปิกในระหว่างการสังเคราะห์สารลิกนินของเปลือกผลมังคุดทั้งบริเวณที่ไม่ตกกระทบและตกกระทบเป็นการแสดงให้เห็นว่าสารฟีนอลิก 2 ชนิดนี้น่าจะเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารลิกนินในเปลือกผลมังคุด

การทดลองที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนิน

การสังเคราะห์สารลิกนินในพืชเป็นกระบวนการทางปฏิกิริยาทางเคมีที่มีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Hahlbrock and Grisebach, 1979 ; Boudet et al., 1996 ; Whetten et al., 1998 ; Boudet, 2000) เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนินในพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ PAL, cinnamate-4-hydroxylase (CAH), 4-coumate-3-hydroxylase

(C3H), 0-methyltransferase (OMT), ferulate-5-hydroxylase (F5H), hydroxycinnamate CoA ligase (HCL), cinnamoyl CoA reductase (CCR), CAD และ POD บทบาทของเอนไซม์เหล่านี้ในการสังเคราะห์สารลิกนินได้รับการยืนยันโดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) คือ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ลดลงในพืชจำลอง โดยใช้ antisense gene (Whetten et al., 1998) ผลจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ PAL, CAD และ POD ในเปลือกผลมังคุดทั้งบริเวณไม่ตกกระทบและตกกระทบ พบว่า เอนไซม์ทั้ง PAL, CAD และ POD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณตกกระทบต่างก็มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นมากในช่วงเวลาเดียวกันคือ ในช่วงเวลา 10-20 นาที หลังการตกกระทบ โดยมีกิจกรรมเพิ่มถึงจุดสูงสุดในนาที 15 หลังการตกกระทบ ขณะที่ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ไม่เพิ่มขึ้นหรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ข้อมูลจากการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบนั้นกระตุ้นให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, CAD และ POD เพิ่มขึ้น (Kahl, 1978)

PAL เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารฟีนอลิกซึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างสารอื่นๆ ต่อไป รวมถึงการสร้างสารลิกนิน (Cam and Towers, 1973 ; Hermann, 1995) แม้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL มีการเพิ่มขึ้นหลายเท่าในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ แต่ปริมาณทั้งหมดของสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุดที่บริเวณตกกระทบกลับมีปริมาณลดลง สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่า การสังเคราะห์สารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณตกกระทบนั้นมีการนำสารฟีนอลิกไปใช้ในการสังเคราะห์สารลิกนินมากกว่าการสังเคราะห์สารฟีนอลิกที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นใหม่ ปรากฏการณ์เช่นนี้คล้ายกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ POD และปริมาณของสารฟีนอลิกและลิกนินในระหว่างการงอกของละอองเกสรข้าวโพด คือในผนังเซลล์ของละอองเกสรมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ POD และปริมาณของสารลิกนินเพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณสารฟีนอลิกลดลง (Liu and Ger, 1997) CAD เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารในกลุ่มแอลดีไฮด์คือ *p*-coumaryl aldehyde, coniferyl aldehyde และ sinapyl aldehyde ไปเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์คือ *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ในปฏิกิริยาเคมีของการสังเคราะห์สารลิกนิน ก่อนที่สารแอลกอฮอล์เหล่านี้จะรวมตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยการกระตุ้นของ POD (Whetten et al., 1998) กิจกรรมของเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีการเพิ่มขึ้นหลายเท่ามากกว่ากิจกรรมของ PAL และ POD การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, CAD และ POD อย่างมาก และรวดเร็วภายในเวลา 15-20 นาที หลังการตกกระทบของผลมังคุดพร้อมกับมีการสังเคราะห์และสะสมสารลิกนิน และสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรตในบริเวณเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญทำให้มีการเพิ่มความแน่นเนื้อหรือความแข็งของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ

การทดลองที่ 4 การแสดงออกของจีน

เบื้องหลังการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ นั้น ถูกควบคุมโดยหน่วยพันธุกรรม หรือที่เรียกว่า จีน (gene) CAD เป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายในกระบวนการของการสังเคราะห์สารลิกนินก่อนที่สารตัวกลางตัวสุดท้ายจะเพิ่มขนาดของโมเลกุลโดยเอนไซม์ POD กลายเป็นสารลิกนิน (Boudet, 2000) มีการศึกษาการโคลนจีน และแสดงออกของเอนไซม์ CAD ในพืชหลายชนิด เช่น ยูคาลิปตัส (Goffner et al., 1992), Norway spruce (Galliano et al., 1993), อัลฟาฟ่า (Baucher et al., 1999), lucerne (Brill et al., 1999) และ ryegrass (McAlister et al., 2001) ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ CAD นั้นถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่และถูกควบคุมโดยจีน การศึกษาการแสดงออกจีนที่ควบคุมเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากการสืบข้อมูลจาก gene bank ข้างต้น เนื่องจากมังคุดเป็นพืชไม้ยืนต้นในเขตร้อน และยังไม่มีรายงานที่ศึกษาการแสดงออกของจีน ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CAD ในกลุ่มพืชที่ใกล้เคียงกับมังคุด อย่างไรก็ตาม ขณะนี้กำลังดำเนินงานในส่วนของการแสดงออกของจีนที่ควบคุม CAD คาดว่าจะได้ผลเร็ว ๆ นี้

หนังสืออ้างอิง

- กวิศร์ วาณิชกุล และสุรพงษ์ โกสิยะจินดา. 2522. การเจริญเติบโตของผลมังคุด. วิทยาศาสตร์ 13(1-2) : 63-77.
- เกียรติเกษม กาญจนพิสุทธิ์, มโนธรรม สัจจถาวร, อดุลย์ พงศ์สุวรรณ, พรรณ บุรณะ และลิขิต เขียดแก้ว. 2530. มังคุดราชินีแห่งผลไม้. สหมิตรออฟเซต, กรุงเทพฯ. 69 น.
- วรรณดา ตุลยธัญ, สุวรรณ สุภิमारส, อรไท สุขาเจริญ และสุภาพรรณ ตุลยพิรุฬห์ศิลป์. 2532. การสกัดแอนโธไซยานินจากเปลือกมังคุด. อาหาร 19(1) : 25-32.
- สมศักดิ์ อดัญญี. 2538. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางประการของเปลือกผลมังคุดที่แห้งตัวเนื่องจากการตกกระทบ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Almeyda, N. and W. Martin. 1976. Cultivation of neglected tropical fruits with promise. Part I. The mangosteen. Agriculture Research Service, USDA. 18 p.
- Asada, Y. and I. Matsumoto. 1967. Formation of lignin in the root tissues of Japanese radish affected by *Alternaria japonica*. Phytopathol. 57 : 1339-1343.
- Baucher, M., M.A. Bernard- Vailhe, B. Chabbert, J-M. Besle, C. Opsomer, M. Van Montagu and J. Botterman. 1999. Down-regulating of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. Plant Mol. Biol. 39 : 437-447.
- Boudet, A.M. 2000. Lignins and lignification : selected issues. Plant Physiol. Biochem. 38 : 81-96.
- Boudet, A.M. and J. Grima-Pettenati. 1996. Lignin genetic engineering. Mol Breeding 2: 25-39
- Boudet, A.M., C. and J. Lapierre Grima-Pettenati. 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. New Phytol. 129 : 203-236.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.

- Brill, E. M., S. Abrahams, C. M. Hayes, C.L.D. Jenkins and J. M. Watson. 1999. Molecular characterization and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 41 : 279-291.
- Bruce J.R. and C.A. West. 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.* 91 : 889-897.
- Bruce R.J. and C.A. West. 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectin fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.* 91: 899-897.
- Bucholtz, D.L., R.P. Cantrell, J.D. Axtell and V.L. Lechtenberg. 1980. Lignin biochemistry of normal and brown midrib mutant *Sorghum bicolor*. *J. Agri. Food Chem.* 28 : 1239-1241.
- Bunsiri, A., R.E. and S. Paull Ketsa. 2002. Lignin accumulation in relation to increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Plant Functional Biology*. In press
- Camm, E.C. and G.H.N. Towers. 1973. Phenylalanine ammonia lyase : A review. *Phytochem.* 12 : 961-973.
- Campbell, M.M. and R.R. Sederoff. 1996. Variation in lignin content and composition : Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.* 110 : 3-13.
- Campbell M.C. and R.R. Sederoff. 1996. Variation in lignin content and composition. *Plant Physiol.* 110: 3-13.
- Chandler, W.H. 1950. *Evergreen Orchards*. La and Febiger, Philadelphia. 542 p.
- Diaz, J., and A.R. Barcelo F.M. de Caceres. 1997. Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignin, during the early development of seedling of *Capicum annuum*. *New Phytol.* 136 : 183-188.

- Friend, J. 1976. Lignification in infected tissue. In: Biochemical aspects of plant-parasite relationships, pp. 291-303. J Friend and D.R. Threlfall (eds.). Academic Press, London.
- Gahan, P.B. 1984. Plant Histochemistry and Cytochemistry. Academic Press, London
- Galliano, H., M. Cabane, C. Eckerskom, F. Lottspeich, H. Sandersmann and D. Ernst. 1993. Molecular cloning, sequence analysis and elicitor/ozone induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). Plant Mol. Biol. 23 : 145-156.
- Goffner, D., I. Joffroy, J. Grima-Pettenati, C. Halpin, M.E. Knight, W. Schuch and A.M. Boudet. 1992. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. Planta 188 : 48-53.
- Grand, C. P. Parmentier, A. Boudet and A.M. Boudet. 1985. Comparison of lignin and of enzymes involved in lignification in normal and brown midrib (bm 3) mutant corn seedlings. Physiol. Veg. 23 : 905-911.
- Grand, C., A. Boudet and A.M. Boudet. 1983. Isoenzymes of hydroxycinnamate CoA ligase from poplar stems – properties and tissue distribution. Planta 158 : 225-229.
- Griffiths, D.A. and I. Isaac. 1966. Host : parasite relationships between tomato and pathogenic isolates of *Verticillium*. Ann. Appl. Biol. 58: 259-272.
- Hahlbrock, K. and H. Grisebach. 1979. Enzymatic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 105-130.
- Hermann, K-M. 1995. The Shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. Plant Physiol. 107 : 7-12.
- Higuchi, T. 1985. Biosynthesis of lignin, pp. 141-160. In: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. T. Higuchi (ed.). Academic Press, New York.
- Hodge, J.E. and B.T. Hofreiter. 1962. Determination of reducing sugar and carbohydrate, pp. 380-394. In: Methods in Carbohydrate Chemistry. R.L. Whistler and M.L. Wolfrom (eds.). Academic Press, N.Y.
- Iiyama, K., T.B.T. Lan and B.A. Stone. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. Plant Physiol. 104 : 315-320.

- Kahl, G. 1978. Biochemistry of Wounded Plant Tissues. Walter de Gruyter, N.Y. 680 p.
- Ke, D. and M.E. Salveit. 1989. Wound-induced ethylene production phenolic and metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiol. Plant.* 76 : 412-418.
- Keller, B., N. Saner and C.J. Lam 1988. Glycine-rich proteins in bean: gene structure and association of the proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7 : 3625-34.
- Ketsa, S. and S. Atantee. 1998. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Postharvest Biol. Technol.* 14 : 117-124.
- Ketsa, S. and M. Koolpluksee. 1993. Some physical and biochemical characteristics of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Postharvest Biol. Technol.* 2 : 209-215.
- Kondo, T., T. Hiroi, K. Mizuno and T. Kato. 1990. Characterization of lignin-carbohydrate complexes of Italian rue grass and alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 70 : 193-201.
- Kutsuki, H., M. Shimada and T. Higuchi. 1982. Distribution and roles of *p*-hydroxycinnamate : CoA ligase in lignin biosynthesis. *Phytochem.* 21 : 267-271.
- Lam, T.B.T., K. Iiyama and B.A. Stone. 1992 Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochem.* 31: 1179-1183.
- Lam, T.B.T., K. and B.A. Iiyama Stone. 1994. An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell walls of wheat internodes. *Phytochem.* 37: 327-333.
- Lewis, N., E. Yamamoto. 1990. Lignin, occurrence biogenesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 41 : 455-496.
- Liu, Z-H. and M-J. Ger. 1997. Changes in enzyme activity during pollen germination in maize, and possible evidence of lignin synthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* 24 :329-335.
- Luderitz, T., G. Schatz and H. Grisebach. 1982. Enzymic synthesis of lignin precursors- Purification and properties of 4-coumarate : CoA ligase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). *Eur. J. Biochem.* 123 : 583-586.

- Martin, F.W. 1980. Durian and mangosteen, pp. 407-414. In : S. Nagy and P.E. Shaw (eds.) Tropical & Subtropical Fruits. The AVI Publishing Co., Inc., Westport, Connecticut.
- McAlister, F. M., W.R. Lewis-Henderson, C.L.D. Jenkins and J. M. Watson. 2001. Isolation and expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Aust. J. Plant Physiol. 28: 1085-1094.
- Mitchell, H.J., J.L. Hall and M.S. Barber. 1994. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Plant Physiol. 104 : 551-556.
- Morita, Y., H.Yamashita, B. Mikami, H. Iwamoto, S. Aibara, M. Terada and J. Minani. 1988. Purification, crystallization and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus*. J. Biochem. 103 : 693-699.
- Morrison, I.M. 1993. Isolation and analysis of lignin carbohydrate complex from *Lolium multiflorum*. Phytochem. 12: 2979-2984.
- Morrison, T.A., J.R. Kessler, R.D. Hatfield and D.R. Buxton. 1994. Activity of two lignin biosynthesis enzymes during development of a maize internode. J. Sci. Food Agri. 65 : 133-139.
- O' Brien, T.P., N., and M.E. Feder McCully. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine-blue O. Protoplasma 59 : 367-373.
- Ralph, J., J.H., and R.D. Grabber Hatfield. 1995. Lignin-ferulate crosslinks in grasses : active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. Carbohydrate Res. 275 : 167-178.
- Sambrook, J., E.F. FriTsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Clonning : A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphosytungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Vitic. 30(3) : 182-185.
- Southerton, S.G. and B.J. Deverall. 1990. Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. Physiol. Mol. Plant Pathol. 36 : 483-494.

- Tongdee, S.C. and A. Suwanagul. 1989. Postharvest mechanical damage in mangosteen. *ASEAN Food J.* 4(4) : 151-155.
- Uthairatanakij, A. and S. Ketsa. 1996. Physico-chemical changes of pericarp of mangosteen fruits after low temperature storage, pp. 411-422. In : S. Vijayasegaran, M. Pauziah, M.S. Mohamed and S. Ahmad Tamizi (eds.). *Proceedings of International Conference on Tropical Fruits. Volume I.* Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI), Serdang, Selangor.
- Vance, C.P., T.R. Kirk and R.T. Sherwood. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18 : 259-288.
- Walter, M.H., J. Grima-Pettenati, C. Grand, A.M. Boudet and C.J. Lamb. 1988. Cinnamyl alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis : cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 5546-5550.
- Whetten R.W., J.J. and R.R. MacKay, R. Sederoff. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 : 585-609.
- Whetten, R.W. and R. Sederoff. 1995. Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell* 7 : 1001-1013.
- Whitmore, F.W. 1978. Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochem.* 17 : 421-425.

OUTPUT

Submitted manuscripts

- Lignin accumulation in relation to increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact
Submitted to the Journal of Functional Plant Biology
- Phenolic metabolism and lignin synthesis in damaged pericarp of mangosteen fruit after impact
Submitted to the Journal of Postharvest Biology and Technology

Lignin accumulation in relation to increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact

Apita Bunsiri^A, Robert E. Paull^B and Saichol Ketsa^{C*}

^{A,C}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture
Kesetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

^BDepartment of Tropical Plant and Soil Sciences, College of Tropical Agriculture and
Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96822, USA

*Corresponding author e-mail: agrsck@ku.ac.th

Abstract. Impact damaged mangosteen fruit pericarp showed a rapid increase in firmness. The degree of firmness increase depended upon fruit maturity, drop height and storage atmosphere after impact. Toluidine blue O, phloroglucinol and KMnO₄ reacted positively for lignin in both the cell wall and cytoplasm. The damaged pericarp showed thicker and darker staining indicative of cell lignification 3 h after impact than undamaged pericarp. Lignin concentration was higher in the damaged pericarp of more mature fruit, following a greater drop height and in air. Carbohydrate and protein in lignin-carbohydrate complex increased after impact. The results suggested that the lignification in cells following impact injury response, may play a role in the firmness increase of damaged mangosteen pericarp after impact.

Keywords : firmness, *Garcinia mangostana*, impact, lignin, lignin-carbohydrate complex, mangosteen, pericarp

Introduction

Lignin is a complex and highly variable biopolymer derived from oxidative polymerization of cinnamyl alcohol that bear three aromatic residues *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl (Whetten and Seredoff, 1995). Lignin is found in some plant cell walls in response to mechanical wounding and infection. These complex polymers of lignin are believed to contribute to compressive strength, and to resist microbial degradation (Vance et al., 1980).

Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) is a tropical fruit, thought to have originated in South-east Asia (Thailand, Malaysia and Indonesia) (Nakasone and Paull, 1998). It is considered to be a climacteric fruit due to its respiratory behavior after harvest (Noichinda, 1992). Mangosteen fruit pericarp shows a rapid increase in firmness following impact and is accompanied by an increase in lignin content and a decrease in phenolic content (Tongdee and Suwanagul, 1989; Ketsa and Atantee, 1998). Anaerobic condition and protein synthesis inhibitors reduces the increase in the firmness and lignin content, and the decrease in phenolic in the damaged pericarp (Ketsa and Atantee, 1998). The objective of this study was to determine the relationship between the histochemical and lignin changes in pericarp damaged by impact.

Materials and Methods

Plant material

Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit were obtained from a commercial orchard in Chanthaburi Province, in Eastern Thailand. Fruit at the reddish brown and dark purple stages were carefully harvested to minimize possible mechanical damage and were packed in 10 kg corrugated fibreboard boxes and transported by truck to the laboratory within 1 day of harvest. Fruit were then selected for uniformity of colour and size.

Drop test and firmness

Fruit were orientated so that the calyx and stigma were horizontal, before being released from drop heights of 50 and 100 cm. The concrete impact area was covered with a thin layer of white flour to allow the impact point to be determined and to be outlined with a marker pen. After impact the fruit were held at room temperature (29.5°C, 74%RH) in either air or nitrogen atmosphere. Pericarp firmness, lignin content and histochemical study for lignin localization of damaged and undamaged pericarp on the opposite side to the impact area of the same fruit determined.

Firmness of undamaged and damaged pericarp without peeling was determined using a fruit firmness tester (Effegi) fitted with a spherical plunger 0.27 cm in diameter. The plunger was inserted to a depth of 5 mm and the force recorded in newton. At each observation, 12 fruit from each treatment were measured.

Histochemical tests

Free-hand sections, approximately 40 μm , were prepared for light microscopy by cutting perpendicularly to the fruit surface of both undamaged and damaged pericarp 0 and 3 h after impact. Sections were stained with 10% w/v phloroglucinol solution in 95% ethanol for 3 min (Gahan, 1984), drained, placed on a slide, added a drop of 10 M HCl was added to sections, covered with a coverslip and observed under a light microscope. Other sections were either soaked in a 0.05% w/v toluidine blue O in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8, for 2 min rinsed and mounted in distilled water for microscopic examination (O'Brien et al., 1964) or in a 1:1 mixture of 1% w/v KMnO_4 and 10 M HCl for 2 min (Ride, 1975). After transferring to slides, sections were mounted in 20% w/v Na_2SO_3 in water, covered with a coverslip and observed under a light microscope.

Lignin analysis

Lignin was estimated as lignin thioglycolic acid (LTGA) in a method similar to that used by Bruce and West (1989). Pericarp (0.2 g) was homogenized in 25 ml of methanol for 5 min. The homogenates were vacuum-filtrated through Whatman GF/A and the resulting residues dried at 60°C for 24 h. To 50 ml of alcohol-insoluble residue, 5 ml of 2N HCl was added and 0.5 ml of thioglycolic acid and the mixture was placed in a boiling water bath and shaken for 4 h at 100°C. The extracts were cooled and centrifuged at 18,000 $\times g$ for 20 min at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet washed three times with distilled water until the colour disappeared. The resulting pellet was resuspended in 5 ml of 0.5 N NaOH, sealed with parafilm, and agitated gently at 25°C for 18 h to extract lignin thioglycolate. The samples were centrifuged at 18,000 $\times g$ for 20 min and to each supernatant was added 1 ml of concentrated HCl, and the lignin thioglycolic acid allowed to precipitate at 4°C for 4 h. Following centrifugation at 10,000 $\times g$ for 10 min, the orange-brown pellets were dissolved in 25 ml of 0.5 N NaOH, and the absorbance (A) at 290 nm measured. The degree of lignification was expressed as absorbance units (290 nm) $\text{ml}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of pericarp tissue (extracted fresh weight).

Lignin-carbohydrate complex

Lignin-carbohydrate complex (LCC) of undamaged and damaged pericarp tissue of dark purple fruit was extracted by a method described by Morrison (1973).

Carbohydrate and protein contents in extracted LCC were determined by methods used by Hodge and Hofreiter (1962) and Bradford (1976), respectively.

Results

Firmness

The firmness of undamaged and damaged pericarp of reddish brown (Fig. 1A) and dark purple (Fig. 1B) fruit was not significantly different immediately after impact. Undamaged pericarp firmness showed a small nonsignificant increase while the firmness of damaged pericarp rapidly increased within 3 h of impact and the firmness of damaged pericarp subject to a 100 cm drop height was greater than from 50 cm drop. Regardless of drop height, damaged pericarp of dark purple fruit had a significantly greater firmness than the damaged pericarp of reddish brown fruit after impact. The firmness of the damaged pericarp of reddish brown (Fig. 2A) and dark purple (Fig. 2B) mangosteen fruit held in air was greater than that held in nitrogen.

Staining of undamaged and damaged pericarp

Changes were seen in sections of undamaged and damaged pericarp treated with the three lignin stains in a layer of cells 165 μ m beneath the epidermal surface (Fig. 3-9). Phloroglucinol, toluidine blue O and KMnO_4 stained red-orange (Fig. 3A-9A), blue (Fig. 3B-9B) and yellow-brown (Fig. 3C-9C), respectively, both the cell walls and cytoplasm of these cells. This layer in damaged pericarp (Fig. 3-8) was thicker than in undamaged pericarp (Fig. 9). Damaged pericarp from fruit dropped of 100 cm (Fig. 4, 6) had a thicker stained lignified cells layer than pericarp from fruit dropped 50 cm (Fig. 3, 5). The pericarp of fruit held in air (Fig. 4) had a thicker layer of stained lignified cells than damaged pericarp held in nitrogen (Fig. 8). Regardless of drop height, damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit (Fig. 5,6) had a thicker layer of stained lignified cells than that of reddish brown mangosteen fruit (Fig. 3, 4) after impact (Table1).

Gross lignin content

Similar UV-absorbance spectra were produced by the reaction of thioglycolic acid with lignin from undamaged and damaged pericarp. The lignin content of the damaged pericarp of dark purple fruit (Fig. 10) increased more rapidly than from reddish brown fruit (Fig. 10). The lignin content of damaged pericarp dropped from 100 cm was greater than from 50 cm drop (Fig.10A,10B). When dropped fruit held in

air the lignin content of the pericarp increased rapidly, while if held under nitrogen increased only slightly (Fig.10A,10B).

Lignin carbohydrate complex

Carbohydrate in LCC of damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit increased considerably under air storage (Fig. 11A). while the carbohydrate in LCC of damaged pericarp of dark purple fruit did not increase under nitrogen atmosphere (Fig. 11B). Similarly, protein in LCC of damaged pericarp of dark purple fruit increased significantly under air (Fig. 12A), while protein in LCC of damaged pericarp of dark purple fruit did not increase under nitrogen atmosphere (Fig. 12B). The increase in carbohydrate ranged from 27.93 to 64.24%, while the increase in protein ranged from 19.31 to 27.60%.

Discussion

Mangosteen pericarp firmness increased following impact and when subjected to chilling injury (Tongdee and Suwanagul, 1989; Ketsa and Atantee, 1998, Uthairatakij and Ketsa, 1996). The firmness of mangosteen fruit increases rapidly following impact (Fig. 1) and the increased firmness of damaged pericarp occurred concomitantly with an increase of lignin content (Fig. 10). This supports the conclusion that wounding increases lignin synthesis in damaged mangosteen pericarp after impact (Vance *et al.*, 1982). Lignin content in damaged pericarp was less under nitrogen atmosphere than under atmospheric oxygen (Fig. 10) as the final step of lignin biosynthesis requires oxygen for the polymerization of monomeric lignin precursors catalyzed by peroxidase (Whetten and Sederoff, 1995).

Evidence for increased amounts of lignin in the damaged pericarp after impact with different drop heights, atmospheres and developmental stages was supported by histochemical staining of the cell walls and cytoplasm and consistent with the increase in thioglycolic lignin (Fig. 3-8). Lignification occurs in Japanese radish (Asada and Matsumoto, 1967), potato (Friend, 1976), tomato (Griffiths and Isaac, 1966) and wheat (Southerton and Deverall, 1990) in response to infection and mechanical wounding. Important physiological properties of lignin include mechanical support compression strength and plant defence based on the resistance to degradation (Campbell and Sederoff, 1996). Additional lignin in mangosteen fruit pericarp after impact may result in the increased firmness found in damaged pericarp.

The increase in lignin content in damaged pericarp was not substantial compared to the increase in damaged pericarp firmness as the basal lignin content in undamaged pericarp was initial high (Fig. 10). The increase in firmness of damaged pericarp 3 h after impact was 215 to 385 % (Fig. 1, 2), while the increase in lignin content of damaged pericarp was 150 to 288% (Fig. 10) depending on fruit maturity and drop height. This suggested that the increase in lignin content alone may not solely contribute to the rapid increase in firmness of damaged pericarp after impact because the increased firmness was not highly correlated with increased lignin. LCC also increased in damaged pericarp of mangosteen fruit and the increase in carbohydrate was greater than that for protein (Fig. 11 and 12). The increase in carbohydrate and protein in LCC of damaged pericarp depended on oxygen. This suggested that increased carbohydrate and protein in LCC depends on lignin synthesis that requires oxygen (Whetten and Sederoff, 1995). Lignin has been shown to participate in cross-linking between the lignin polymer and cell wall polysaccharides (Kondo *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1994; Ralph *et al.*, 1995). Moreover, proteins rich in aromatic amino acid residues, particularly tyrosine, have also been suggested as potential sites for nucleation of lignin deposit (Whetten *et al.*, 1998). Early work by Whitmore (1978) suggested that linkages are formed between cell wall proteins and lignin. More recently, Keller *et al.* (1988) suggested that the tyrosine residues of glycine-rich cell wall protein may be involved in linkages to lignin. These linkages may result in strong lignin complexes (Iiyama *et al.*, 1994), and in turn increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact.

In conclusion, firmness and lignin content of damaged pericarp of mangosteen fruit rapidly increased after impact and the increase in firmness and lignin content and lignin-carbohydrate complex depended on fruit maturity, drop height and oxygen level. The result of histochemical study stained with phloroglucinol, toluidine blue O and KMnO_4 confirmed the newly synthesized lignin occurred in a layer of damaged pericarp cells just below the surface.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Thailand Research Fund grant no. BRG /15/2541 and PHD /00081/2541. We thank Fuengfah Janthaniyom for her technical assistance.

References

- Asada Y, Matsumoto I (1967) Formation of lignin in the root tissues of Japanese radish affected by *Alternaria japonica*. *Phytopathology* 57, 1339-1343.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bruce JR, West CA (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology* 91, 889-897.
- Campbell MM, Sederoff RR (1996) Variation in lignin content and composition. *Plant Physiology* 110, 3-13.
- Friend J (1976) Lignification in infected tissue. In 'Biochemical aspects of plant-parasite relationships' (Eds J Friend and DR Threlfall) pp. 291-303. (Academic Press: London).
- Gahan PB (1984) Plant Histochemistry and Cytochemistry. Academic Press, London
- Griffiths DA, Isaac I (1966) Host : parasite relationships between tomato and pathogenic isolates of *Verticillium*. *Annual Applied of Biolology* 58, 259-272.
- Hodge JE, Hofreiter BT (1962) Determination of reducing sugar and carbohydrate. In 'Methods in carbohydrate chemistry' (Eds RL Whistler and ML Wolfrom) pp. 380-394. (Academic Press : N.Y.).
- Iiyama K, Lan TBT, Stone BA (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology* 104, 315-320.
- Keller B, Saner N, Lam CJ (1988) Glycine-rich proteins in bean: gene structure and association of the proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO Journal* 7, 3625-34.

- Ketsa S, Atantee S (1998) Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Postharvest Biology and Technology* **14**, 117-124.
- Kondo T, Hiroi T, Mizuno K, Kato T (1990) Characterization of lignin-carbohydrate complexes of Italian ryegrass and alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science* **70**, 193-201.
- Lam TBT, Iiyama K, Stone BA (1992) Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochemistry* **31**, 1179-1183.
- Lam TBT, Iiyama K, Stone BA (1994) An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell walls of wheat internodes. *Phytochemistry* **37**, 327-333.
- Morrison IM (1993) Isolation and analysis of Lignin carbohydrate complex from *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry* **12**, 2979-2984.
- Nakasone HY, Paull RE (1998) Tropical Fruits. CAB International, Oxon.
- Noichinda S (1992) Effect of modified atmosphere condition on quality and storage life of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit. M.S. Thesis. Kasetsart University, Bangkok.
- O' Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine-blue O. *Protoplasma* **59**, 367-373.
- Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD (1995) Lignin-ferulate crosslinks in grasses : active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research* **275**, 167-178.
- Ride JP (1975) Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiological Plant Pathology* **5**, 125-134.

- Southerton SG, Deverall BJ (1990) Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat expressing resistance to leaf rust fungus. *Plant Pathology* **39**, 223-230.
- Tongdee SC, Sawangul A (1996) Postharvest mechanical damage in mangosteen. *ASEAN Food Journal* **4**, 151-155.
- Uthairatanakij A, Ketsa S (1996) Physico-chemical changes of pericarp of mangosteen fruits after low temperature storage. In: 'Proceedings of international conference on tropical fruits' (Eds S Vijasegaran, MS Pauziah, M Mohamed and SA Tarmizi) pp. 411-422. (Malaysian Agricultural Research and Development Institute: Kuala Lumpur).
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 259-288.
- Whetten R, Seredoff R (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1001-1013.
- Whetten R, MacKey JJ, Seredoff RR (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 585-600.
- Whitmore FW (1978) Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochemistry* **17**, 421-425.

Table 1 Stained lignin thickness of undamaged and damaged pericarp of mangosteen fruit after impact with different heights and stored under different atmospheres. Mean values are the average of 3 measurements.

Treatment	Lignin thickness (μm)			
	Immediate after impact		3 h after impact	
	Reddish brown	Dark purple	Reddish brown	Dark purple
Drop height (normal air)				
50 cm	500 $\pm$ 91	500 $\pm$ 90	546 $\pm$ 95	579 $\pm$ 61
100 cm	553 $\pm$ 91	579 $\pm$ 43	568 $\pm$ 12	592 $\pm$ 79
Atmosphere (100 cm)				
Normal air	553 $\pm$ 45	579 $\pm$ 43	568 $\pm$ 12	592 $\pm$ 79
Nitrogen	503 $\pm$ 36	500 $\pm$ 30	491 $\pm$ 66	558 $\pm$ 41

Legends to Figures

- Figure 1** Firmness of undamaged (□, □) and damaged (□, ■) pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□, □) and 100 (□, ■) cm and held in normal atmosphere. Mean values $\pm$ SD of 12 fruits.
- Figure 2** Firmness of undamaged (□, □) and damaged (□, ■) pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm and held in normal (□, □) and nitrogen (□, ■) atmospheres. Mean values $\pm$ SD of 12 fruits.
- Figure 3** Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit after impact at drop height of 50 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO₄ (C). A-C x 10.
- Figure 4** Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO₄ (C). A-C x 10.
- Figure 5** Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO₄ (C). A-C x 10.
- Figure 6** Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 50 cm held in normal atmosphere for 3 h and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO₄ (C). A-C x 10.

Figure 7 Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit 0 h after impact at drop height of 100 cm and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO₄. A-C x10.

Figure 8 Lignin localization (arrows) of damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit after impact at drop height of 100 cm held in nitrogen atmosphere for 3 h, and then stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO₄ (C). A-C x 10.

Figure 9 Lignin localization (arrows) of undamaged pericarp of dark purple mangosteen fruit and stained with phloroglucinol (A), toluidine blue O (B) and KMnO₄ (C). A-C x 10.

Figure 10 Lignin content of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□ □) and 100 (■ ■) cm and held in normal (□ ■) and nitrogen (□ ■) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of three measurements.

Fig. 11 Carbohydrate content in lignin carbohydrate complex (LCC) of undamaged (□ ■) and damaged (■ ■) pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□ ■) and 100 (■ ■) cm and held in normal (A) and nitrogen (B) atmosphere (B). Mean values $\pm$ SD of six measurements.

Fig. 12 Protein content in lignin-carbohydrate complex (LCC) of undamaged (□ ■) and damaged (■ ■) pericarp of dark purple mangosteen fruit after impact at drop 50 (□ ■) and 100 (■ ■) cm and held in normal (A) and nitrogen (B) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of six measurements.

Fig. 1

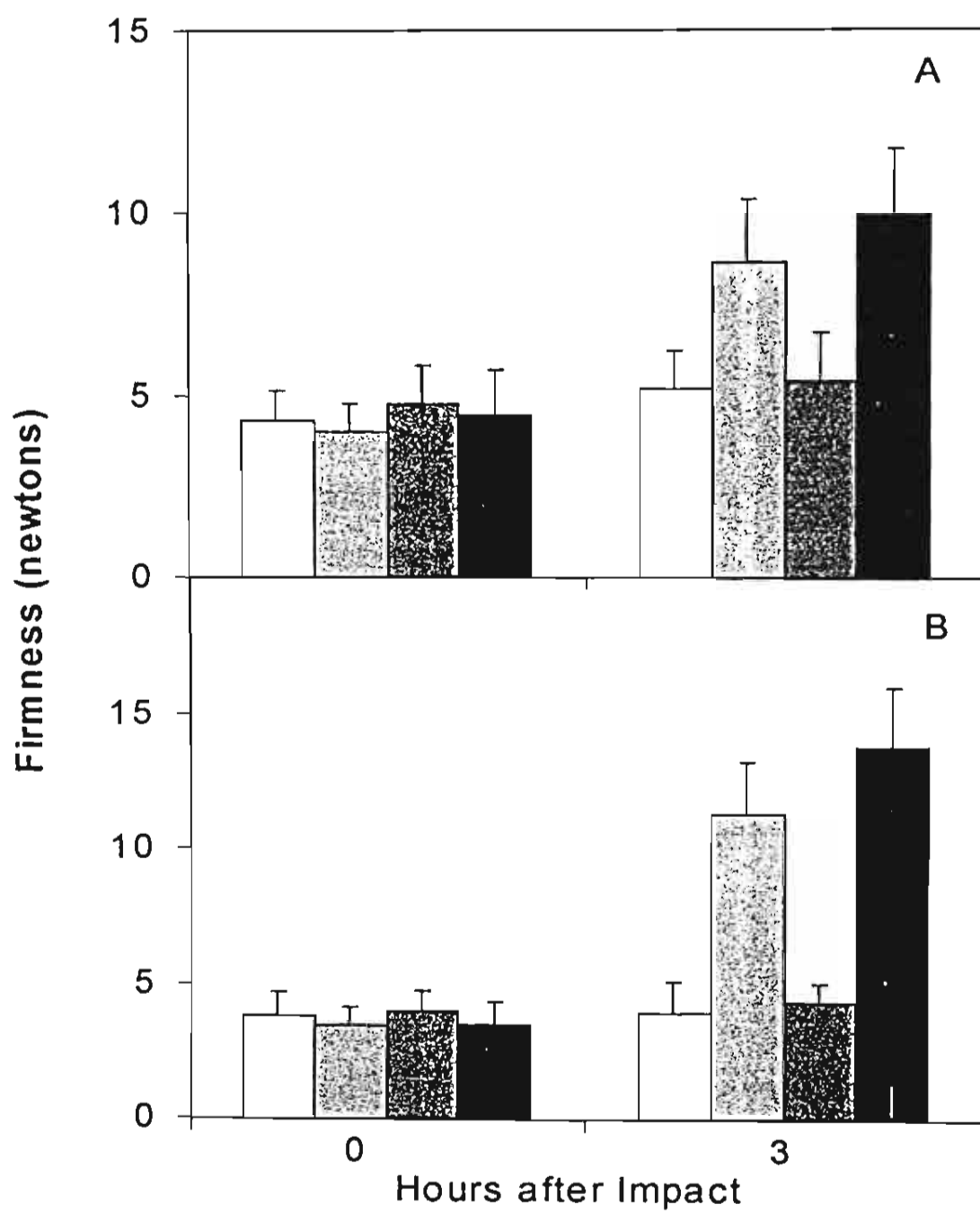


Fig. 2

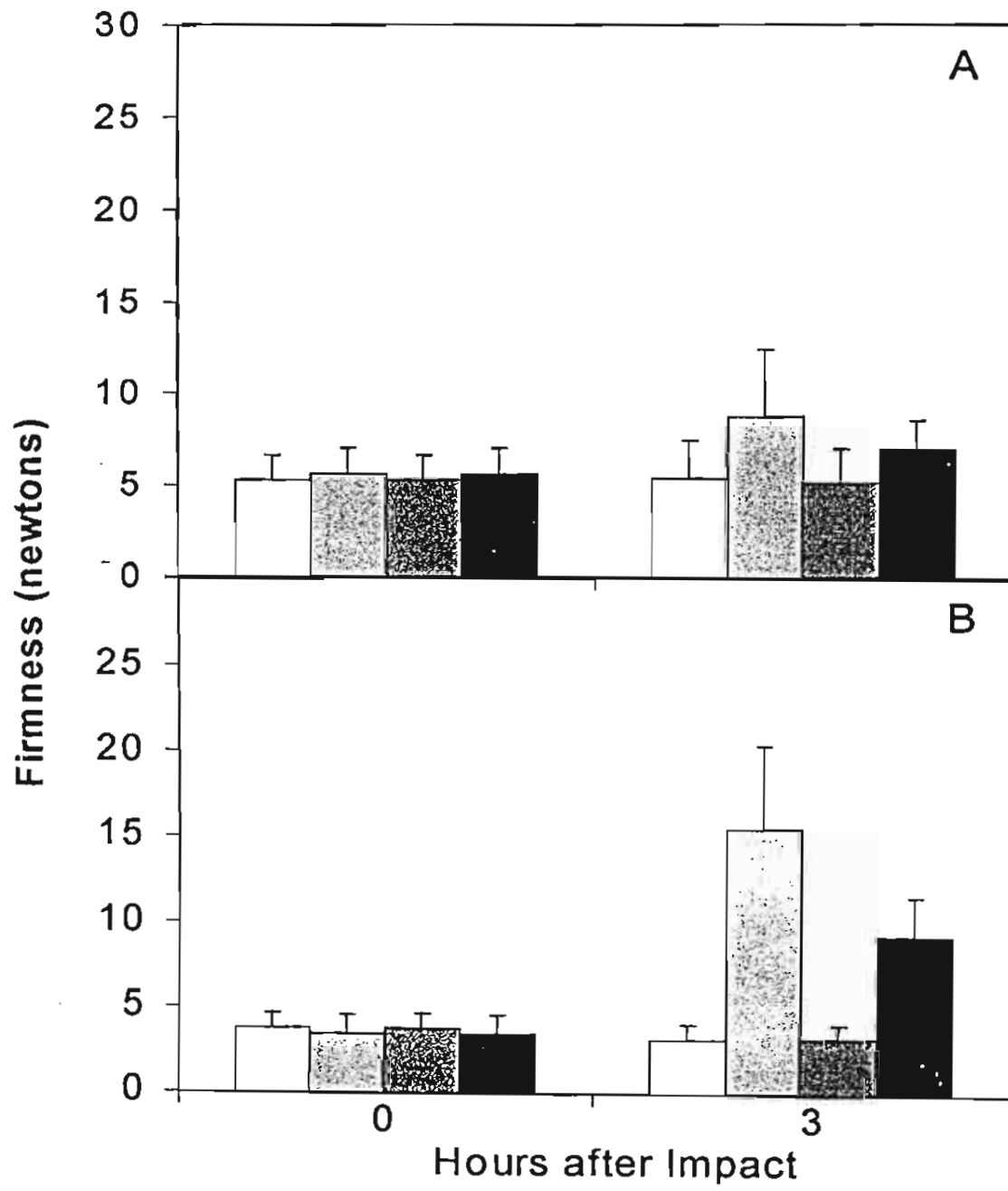


Fig. 3

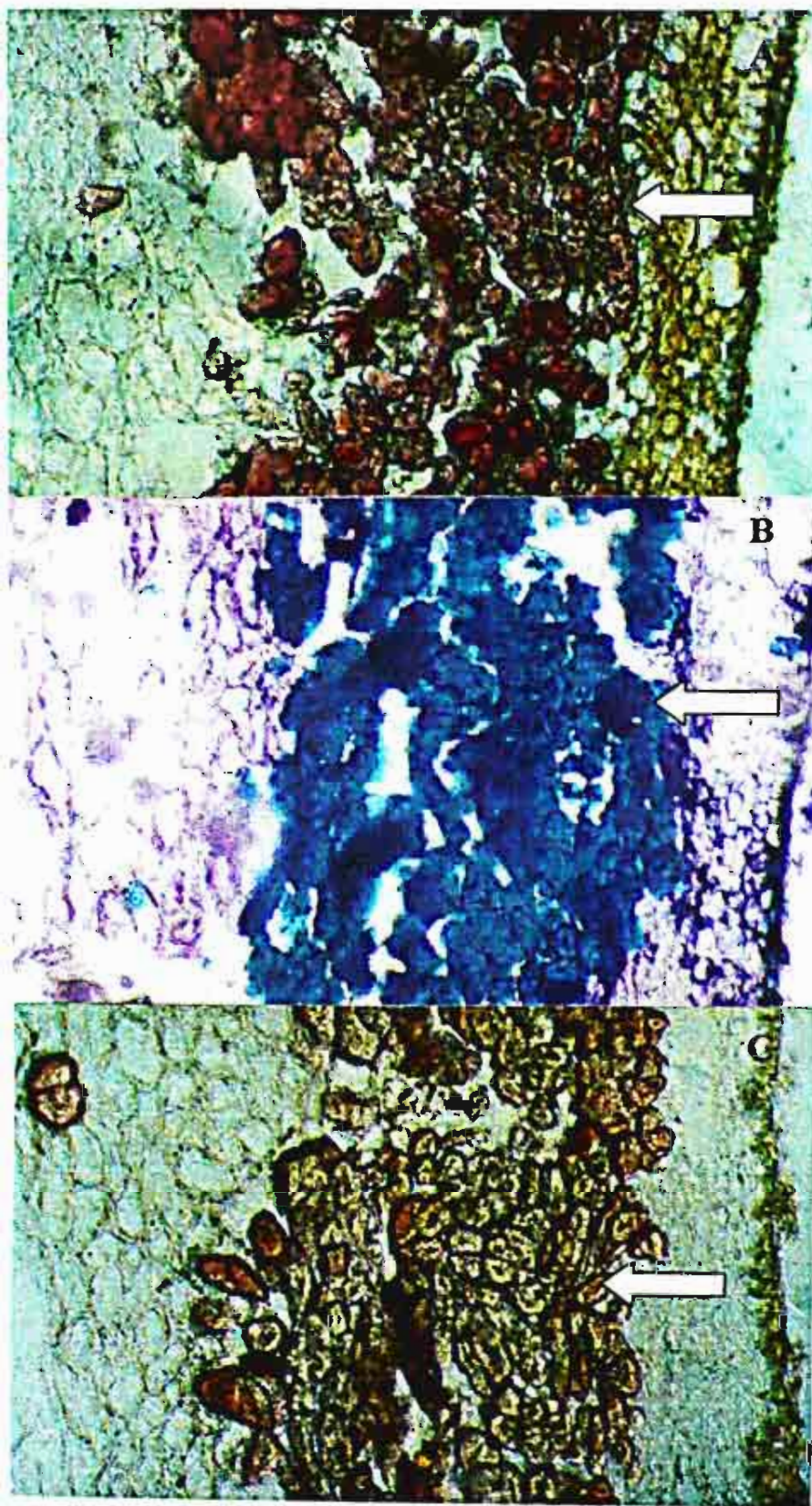


Fig. 4

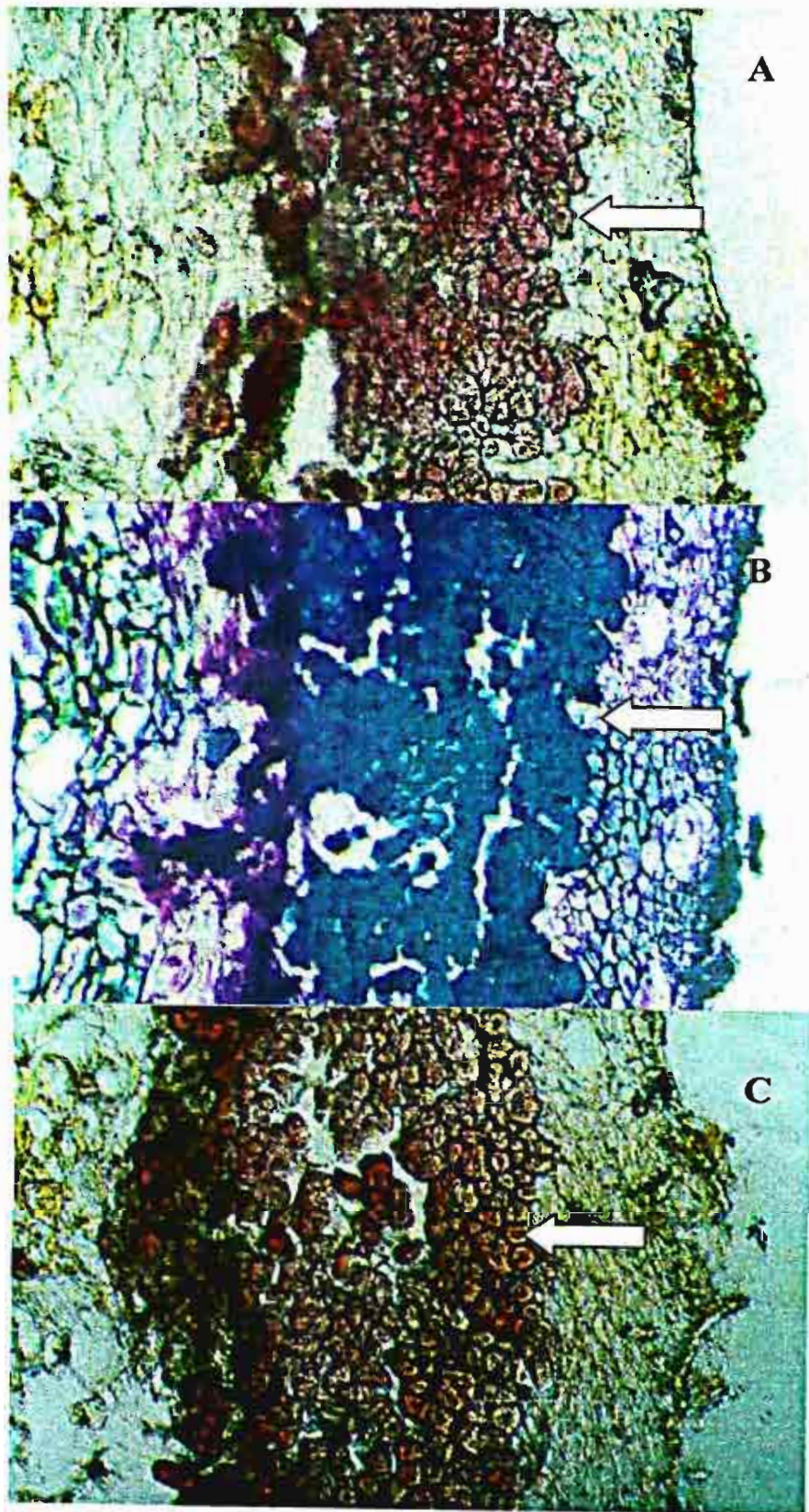


Fig. 5

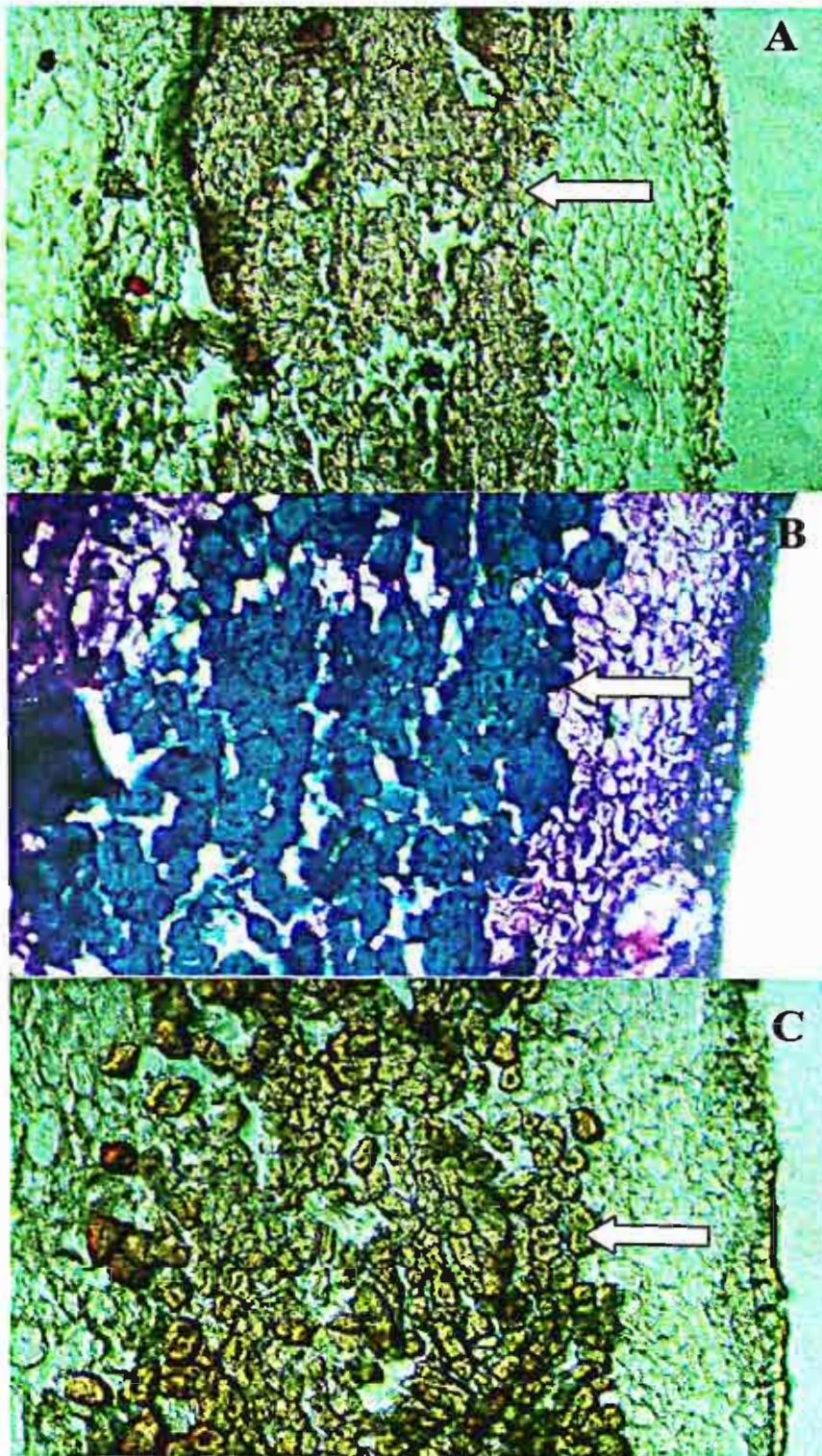


Fig. 6

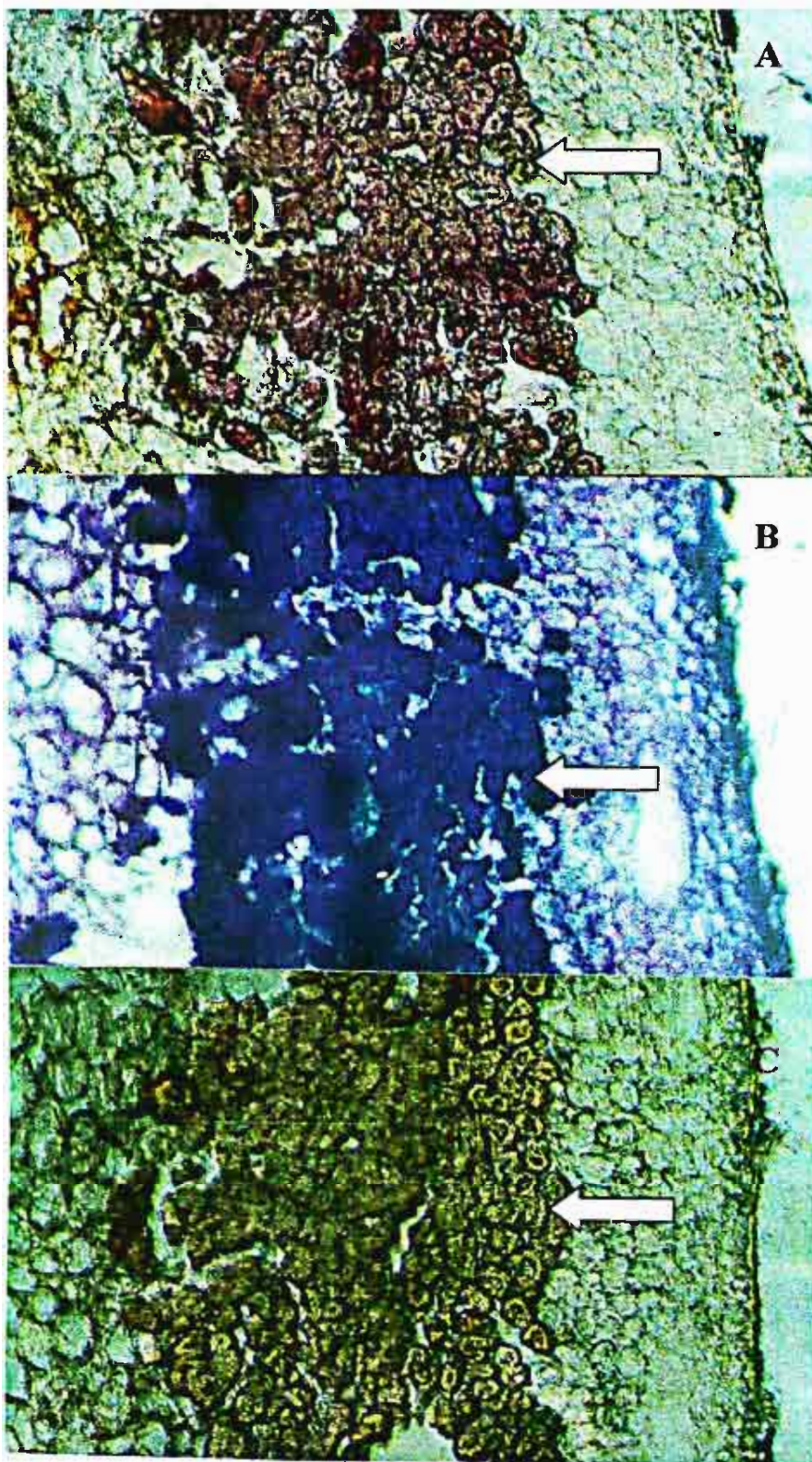


Fig. 7

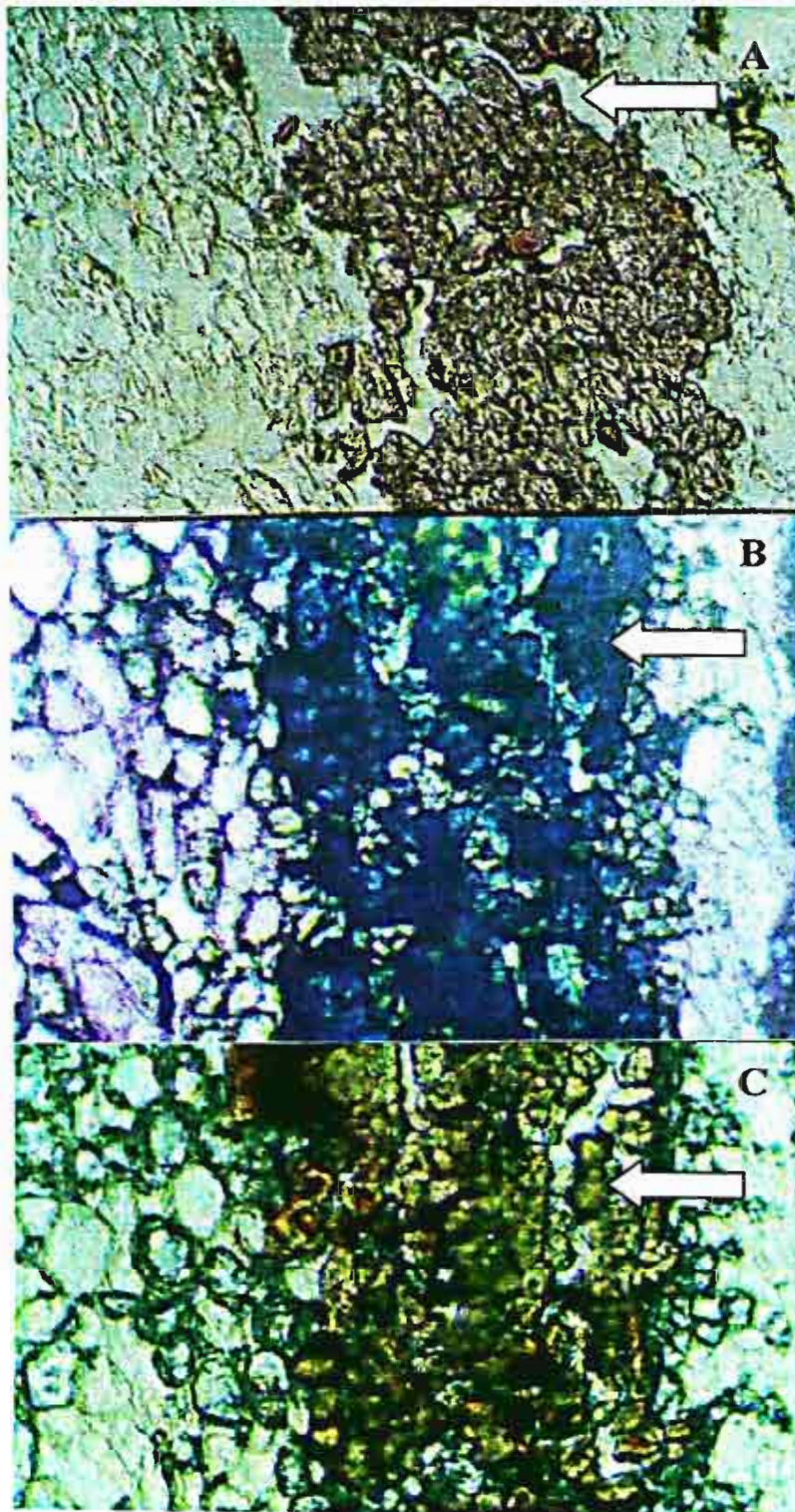


Fig. 8

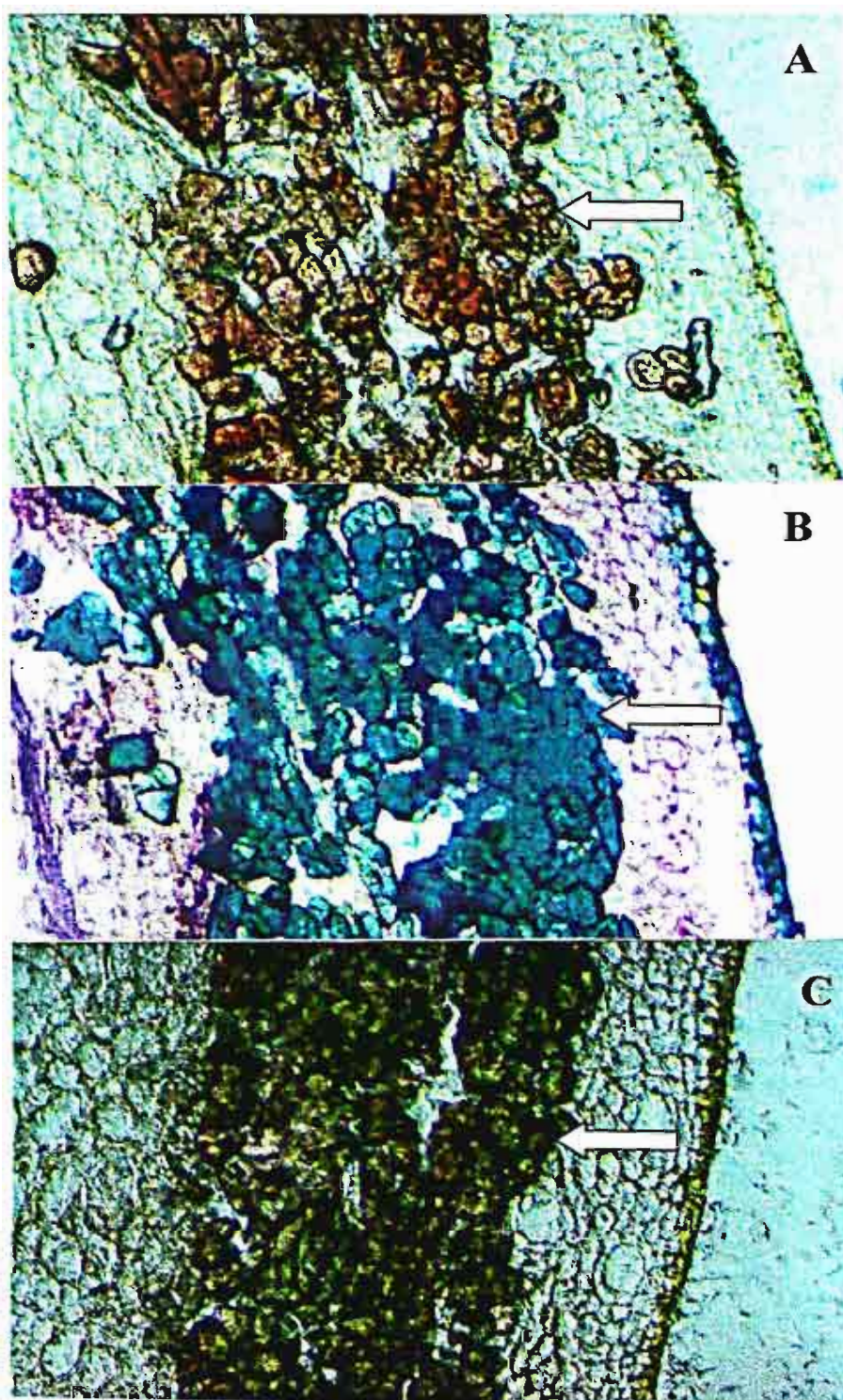


Fig. 9

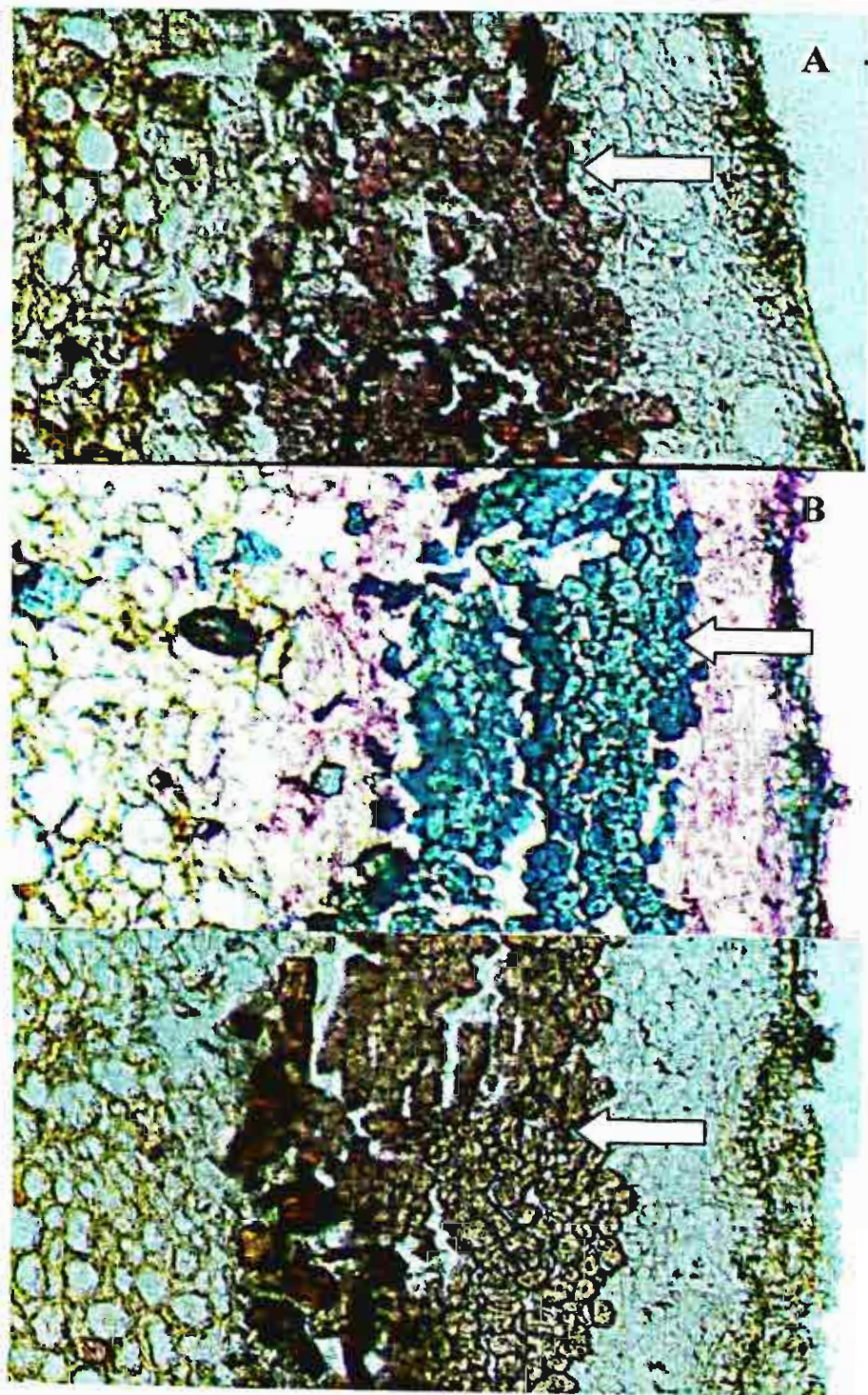


Fig. 10

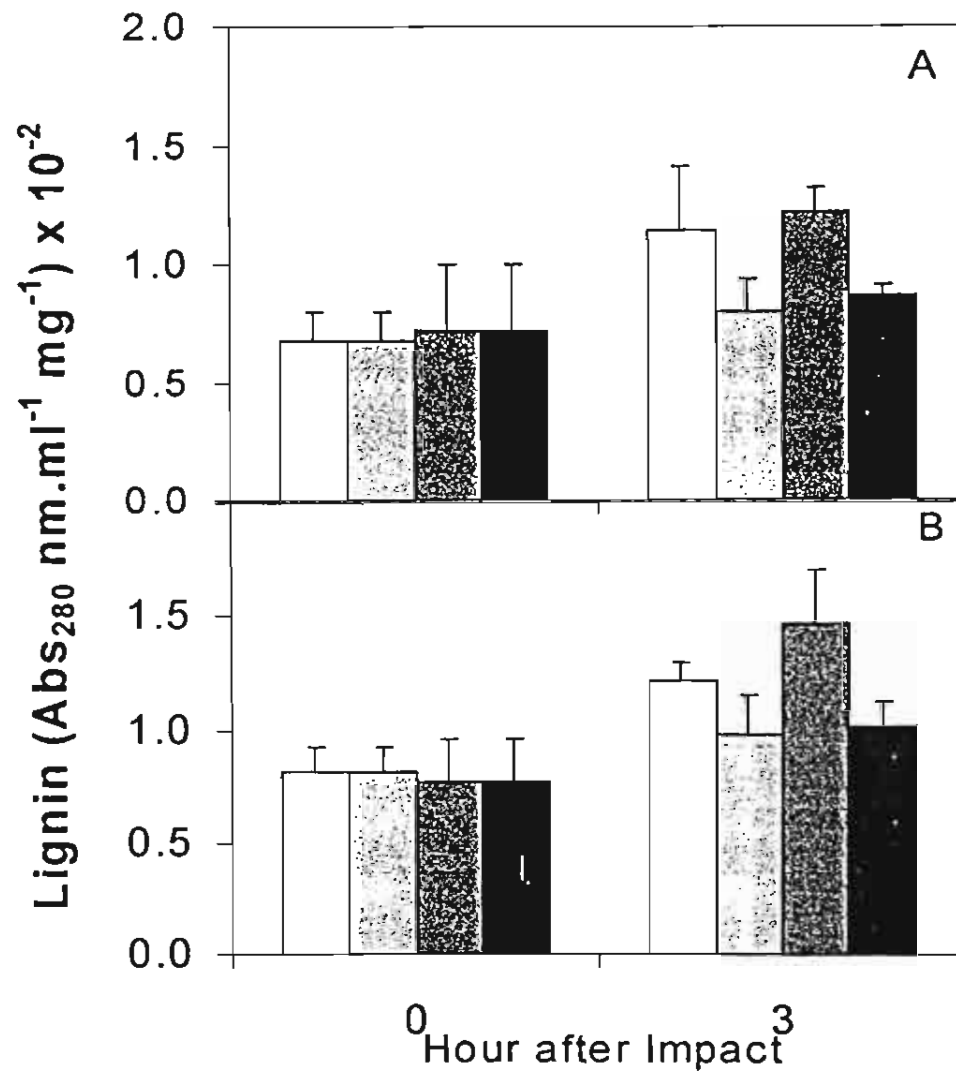


Fig. 11

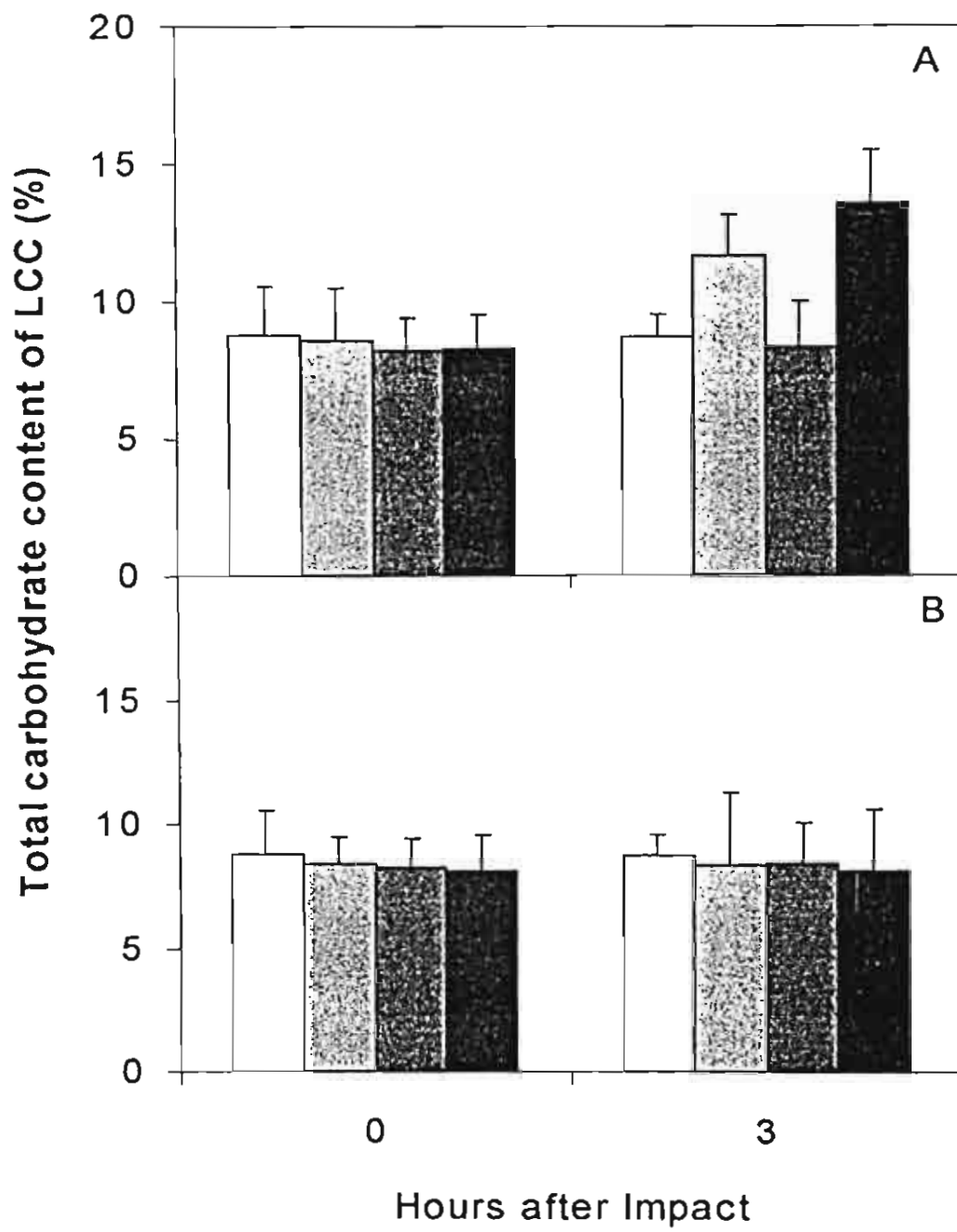
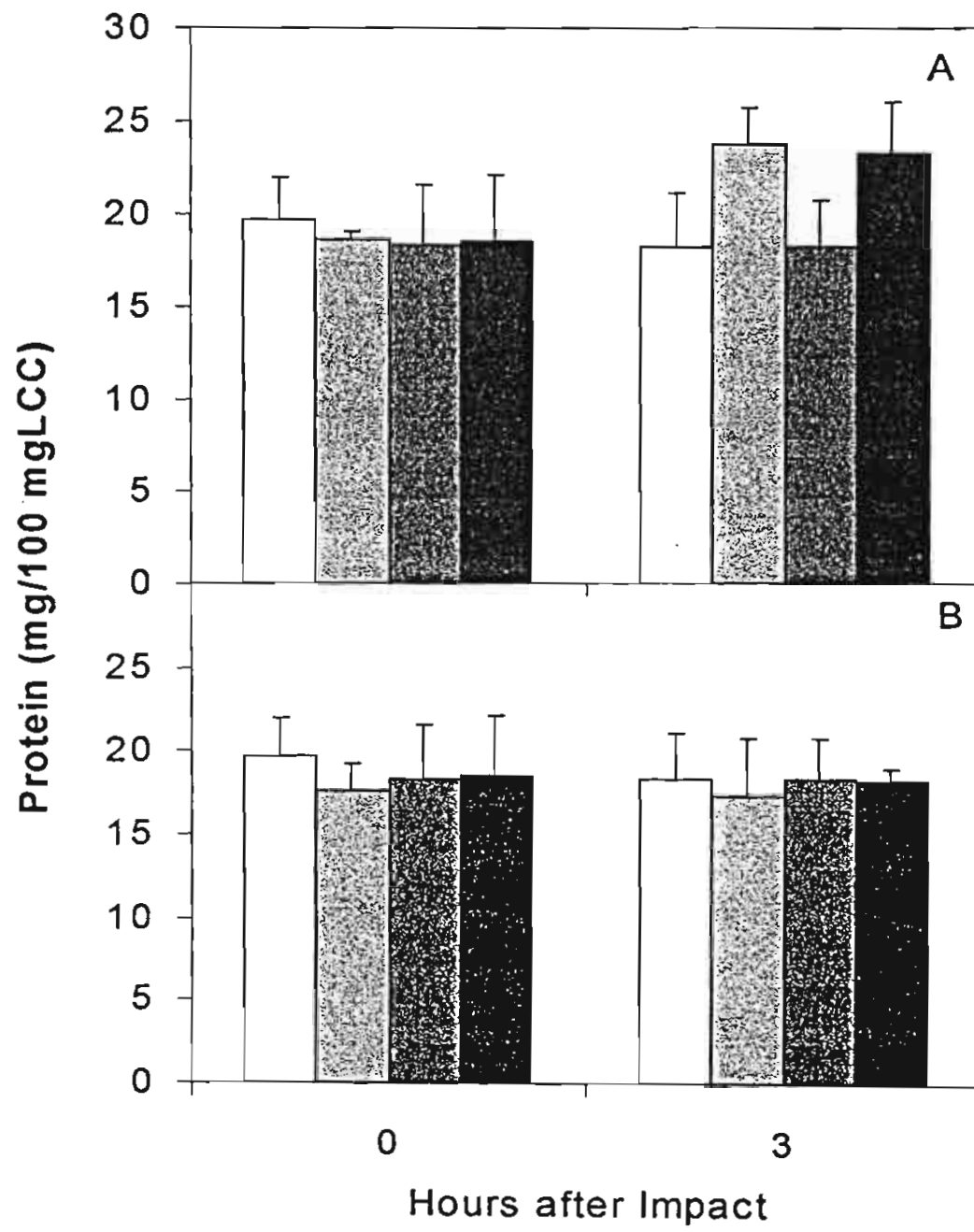


Fig. 12



Phenolic Metabolism and Lignin Synthesis in Damaged Pericarp of Mangosteen Fruit after Impact

Apita Bunsiri¹, Saichol Ketsa^{2*} and Robert E. Paul³

^{1,3}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

³Department of Tropical Plant and Soil Sciences, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96822, USA

Abstract. Firmness and lignin content increased while total phenolics decreased in damaged mangosteen pericarp after impact. The phenolic compounds associated with lignin synthesis in damaged pericarp of mangosteen fruit after impact were separated and identified by UV absorption spectra, TLC and HPLC analyses. The phenolic acids unique to damaged pericarp of mangosteen fruit were identified as *p*-coumaric acid and sinapic acid, and *p*-coumaric acid decreased more rapidly than sinapic acid after impact. *p*-Coumaric acid and sinapic acid contents in damaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit were greater than of dark purple mangosteen fruit and sinapic acid content was 20 to 40 fold greater than that of *p*-coumaric acid. The decrease in both *p*-coumaric acid and sinapic acid in damaged pericarp occurred more rapidly under normal air than under nitrogen atmosphere.

Key words : *p*-Coumaric acid – Damaged pericarp - Firmness – Lignin - Mangosteen fruit - Sinapic acid – Total phenolics

Abbreviations : HPLC = high pressure liquid chromatography; TLC = thin layer chromatography

*Correspondence to S. Ketsa. E-mail : agrsck@ku.ac.th; Fax : 66 02 5791951

Introduction

Lignin, a complex phenolic polymer, impacts mechanical support to the xylem and has a role in plant defense mechanisms (Vance et al., 1980). The basic monomeric units are the monolignols *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol and sinapyl alcohol (Whetten and Sederoff, 1995). Lignin synthesis and composition have long been known to vary between species and in response to the environment (Campbell and Sederoff, 1996). Gymnospermous wood lignins (pine, spruce, fir, etc), are typically composed of guaiacyl units, polymerized from coniferyl alcohol, and small proportions of *p*-hydroxyphenyl units, polymerized from *p*-coumaryl alcohol. Angiospermous wood lignins contain both sinapyl units, polymerized from sinapyl alcohol and guaiacyl units, with a small proportion of *p*-hydroxyphenyl units (Whetten et al., 1998). Biosynthesis of lignins involves a series of enzymes whose compartmentation may differ greatly, the final stage being polymerization and accumulation in the cell wall (Hahlbrock and Grisebach, 1979; Whetten et al., 1998; Boudet, 2000).

Wounding is one of many stresses that alter phenylpropanoid metabolism and increase lignin production (Dixon and Paiva, 1995). Total phenolics of damaged mangosteen fruit pericarp was less than undamaged pericarp after impact (Ketsa and Atantee, 1998), and damaged pericarp had more total phenolics in nitrogen atmosphere than in air. In contrast to total phenolics, damaged pericarp had more lignin content than undamaged pericarp and damaged pericarp in air had a greater lignin content than in nitrogen atmosphere. When infiltrated with cycloheximide damaged pericarp had lower lignin content and greater total phenolics than without cycloheximide (Ketsa and Koolpluksee, 1993; Ketsa and Atantee, 1998). The results suggested that impact enhanced the incorporation of phenolic compounds into lignin (Ketsa and Atantee, 1998). The goal of this research was to determine whether there were phenolic compounds uniquely associated with lignin synthesis in mangosteen pericarp and to determine how impact regulated lignin synthesis.

Materials and methods

Plant material. Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit were obtained from a commercial orchard in Chanthaburi Province, Eastern Thailand. Fruit at the reddish brown and dark purple stages were carefully harvested to minimize possible mechanical damage and packed in 10 kg corrugated fibreboard boxes and transported by truck to the laboratory within 1 day of harvest. Fruit were then selected for uniformity of colour and size.

Drop test and firmness. Fruit were orientated so that the calyx and stigma were horizontal, before being released from drop heights of 50 and 100 cm. The concrete impact area was spread with a thin layer of white flour to allow the impact point to be determined and then outlined with a marker pen. After impact, the fruit were held at room temperature (28.7°C, 76% RH) in either air or a nitrogen atmosphere. Pericarp firmness, total phenolics, lignin and individual phenolic contents were determined on the same fruit from damaged and on the undamaged pericarp on the opposite side from the impact area.

Firmness of the undamaged and damaged pericarp without peeling was determined using a fruit firmness tester (Effegi) fitted with a spherical plunger 0.20 cm in diameter. The plunger was inserted to a depth of 5 mm and the force recorded in newtons. At each observation, 25 fruit from each treatment was measured.

Analysis of lignin. Lignin was extracted with methanol and measured (Bruce and West, 1989). Pericarp (3 g) was homogenized for 1 min and extracted three times with 50 ml of methanol. The first two homogenizations of samples were vacuum-filtrated through Whatman no. 42 and the last extract through Whatman GF/A. The resulting combined residue was dried at 60°C for 24 h. Lignin was determined quantitatively by derivatization of the alcohol-insoluble residue with thioglycolic acid, 10 mg of residue was mixed with 5 ml of 2N HCl and 0.5 ml of thioglycolic acid, and placed in a boiling water bath and shaken. After 5 h at 100°C, the extracts were cooled and centrifuged at 18,000xg for 30 min at 0°C. The supernatant was discarded and the pellet washed once with 5 ml of H₂O. The resulting pellet was resuspended in 5 ml of 0.5 N NaOH, sealed

with parafilm, and agitated gently at 25°C for 18 h to extract the lignin thioglycolate. The supernatants were centrifuged (18,000 x g for 20 min) and 1 ml of concentrated HCl was added to each supernatant and the lignin thioglycolic acid allowed to precipitate at 4° C for 4 h. Following centrifugation at 10,000 x g for 15 min, the orange-brown pellets were dissolved in 10 ml of 0.5 N NaOH, and the absorbance (A) at 280 nm measured.

Phenolic extraction and analysis. Total phenolics were extracted from undamaged and damaged pericarp using a modified method previously reported (Zhang et al, 2000). Ten g pericarp were homogenized with 100 ml extraction solution (65% ethanol containing 0.5% metabisulfite). The homogenate was shaken gently for 0.5 h and then filtered through 4-layer cheese cloth. The remaining residue was re-extracted twice with 50 ml extraction solution as above. The combined infiltrate was centrifuged at 7,000 x g for 15 min. The alcohol was removed from the supernatant on a rotary evaporator at 40°C for 15 min. Pigments in supernatant were removed by two successive re-extractions with petroleum ether (2:1, v/v). Anhydrous ammonium sulfate 20% and 2% metaphosphoric acid were added to the solution. Phenolic compounds were extracted 3 times by ethyl acetate (1:1, v/v), then evaporated and dried under vacuum at 40°C for 10 min. The residues were redissolved in 10 ml methanol (HPLC grade). Solutions were stored at -20°C for further analysis of phenolic compounds. Extracted total phenolic content was determined using the method of Singleton and Rossi (1965), and absorbance at 760 nm was measured. The absorption spectra of extracted total phenolics and external standards of coumaric acid and sinapic acid were also determined with methanol as the blank.

Chromatographic analysis. To detect different phenolic fractions, 20 µl of the extracted total phenolics were chromatographed directly on Sigma silica gel plates and developed with chloroform/acetic acid (4:1,v/v). External standards of *p*-coumaric acid and sinapic acid were also chromatographed in the same manner as extracted total phenolics. After developing and drying, the plates were sprayed with 1% of methanolic ferric chloride solution (1% FeCl₃ in methanol) to view spots of phenolic compounds.

High-performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds. One ml of freeze-dried sample was redissolved in 250 μ l of solvent consisting of 15 % v/v acetonitrile, 30% v/v methanol and 2% v/v acetic acid and filtered through Nylon Acrodisc 13 (0.45 μ m). Sample (5 μ l) was analysed by HPLC with UVIDEC-100-IV UV spectrophotometer (Jasco Japan Spectroscopic Co., Ltd.) at 280 nm. The chromatograms were recorded and integrated with a Chromatogram DP-L220 LC Data Processor (Jasco). Separation was achieved on an Alltima C 18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m size particle : Alltech, USA) using 10% v/v acetonitrile, 15% v/v methanol and 2% v/v acetic acid as the mobile phase at flow rate of 0.5 ml/min.

Statistical analysis. Data means $\pm$ SE were calculated from at least two independent assays, each containing 5 replicates.

Results

Firmness. Firmness of damaged area of pericarp in both reddish (Fig.1A) and dark purple (Fig.1B) fruit significantly increased 3 h after impact and the firmness of damaged area of dark purple fruit increased more rapidly than that of reddish brown fruit. Regardless of fruit maturity, nitrogen atmosphere considerably inhibited the increase in firmness of damaged pericarp compared to fruit held in air (Fig.1A, 1B).

Lignin. Lignin content of damaged area of pericarp in both reddish brown (Fig. 2A) and dark purple (Fig. 2B) fruit held in air increased more than that of fruit held in nitrogen atmosphere. Lignin content of damaged area in pericarp of dark purple fruit (Fig. 2B) increased more than that of reddish brown fruit (Fig. 2A), particularly if drop height was 100 cm.

Total phenolics. The phenolic content of the damaged area of the pericarp at 3 h after impact was less than at impact (Fig. 3A, 3B) and the phenolic content of damaged pericarp of dark purple fruit (Fig. 3B) was reduced further than that of reddish brown

fruit (Fig. 3A) at drop height 100 cm. Damaged pericarp in air had less phenolics than that of damaged pericarp held in a nitrogen atmosphere.

Total phenolics extracted from damaged pericarp at different maturity stages, drop heights and atmospheres showed similar spectral absorbance patterns and their maximum absorbance was at 280 nm (Fig. 4A, 4B, 4C, 4D) and similar to the spectral absorbance of *p*-coumaric acid and sinapic acid (Fig. 4E). The only difference between treatments was in their absorbance at 280 nm total phenolics from damaged pericarp fruit at impact was greater than 3 h after impact. Total phenolics extracted from damaged pericarp of fruit held in nitrogen was greater than that held in air (Fig. 4A, 4B, 4C, 4D).

Phenolics analysed by TLC. Phenolics separated from damaged pericarp 0 and 3 h after impact at drop height of 50 and 100 cm of reddish brown and dark purple fruit held in air and nitrogen atmosphere showed no difference in separation. Only two of separated phenolics with low (0.79) and high (0.92) R_fs (Fig. 6). *p*-Coumaric acid (Fig. 6 lane 1) and sinapic acid (Fig. 6 lane 2) had similar R_fs to that of phenolics extracted from damaged pericarp.

Phenolics analysed by HPLC. When analysed by HPLC, phenolics extracted from damaged pericarp showed a prominent peak at 20.49 min and a minor peak at 23.83 min when monitored at 280 nm (Fig. 7A). Absorption spectra analyses confirmed the presence of *p*-coumaric acid (20.83 min) and sinapic acid (23.68 min) in the extract of damaged pericarp (Fig. 7B). Undamaged pericarp of reddish brown mangosteen fruit contained both *p*-coumaric acid and sinapic acid about 2 times higher than that of dark purple mangosteen fruit and sinapic acid contents (Fig. 8) were about 20 times higher than that of *p*-coumaric acid (Fig. 9). *p*-Coumaric acid and sinapic acid content of damaged pericarp at impact of both reddish brown and dark purple fruit dropped 100 cm was much less than that dropped 50 cm. *p*-Coumaric acid (Fig. 8) decreased more rapidly than sinapic acid (Fig. 9). *p*-Coumaric acid contents of damaged pericarp of fruit held in air for 3 h after impact decreased more rapidly than that held in nitrogen atmosphere and *p*-coumaric acid of damaged pericarp held in air (Fig. 8) declined more rapidly than sinapic acid (Fig. 9).

Discussion

Plants respond to wounding with increased production of lignin involved in the wound repair and microbial invasion defense (Vance et al., 1980). Lignin accumulation is accompanied by the activation of a series of enzymes, whose compartmentation may differ with the final stage being oxidative polymerization of *p*-coumaryl, coniferyl, and sinapyl alcohols by peroxidases (Boudet et al., 1996). In mangosteen fruit, impact-induced increases in firmness and lignin, and a decrease in phenolics occurred in the damaged pericarp (Ketsa and Atantee, 1995; Bunsiri et al., 2002).

The decline in total phenolics in damaged pericarp of mangosteen fruit after impact is related to the increase in lignin content (Diaz et al., 1998., Ketsa and Atantee, 1998). The decline in total phenolics could be due to an over supply for lignin synthesis alone, or feedback inhibition of its own synthesis (Diaz et al., 1997).

In our previous report (Ketsa and Atantee, 1998) a complicated TLC chromatogram was observed be due possibilities to impurities in the damaged pericarp extract. In the present study, the extract was repeatedly washed until all pigments were removed and a single absorption peak was observed. Many phenolics are involved in lignin synthesis (Whetten and Sederoff, 1995). When standard phenolics including *p*-coumaric acid and sinapic acid only two phenolics were found in the pericarp one with low (0.79) and high (0.92) Rf. These Rfs were identical to standard *p*-coumaric acid and sinapic acid. These results suggested that the major phenolics were *p*-coumaric acid and sinapic acid and there may be involved in mangosteen pericarp lignin synthesis. In order to confirm the involvement of *p*-coumaric acid and sinapic acid in lignin synthesis of mangosteen pericarp, extract of damaged pericarp was analysed by HPLC and their corresponding absorbance spectra for the two peaks indicated the presence of *p*-coumaric acid and sinapic acid.

In contrast to firmness and lignin, the content of *p*-coumaric acid and sinapic acid in damaged pericarp decreased more rapidly in dark purple mangosteen fruit than in reddish brown mangosteen fruit after impact. This was similar the changes in total phenolics of damaged pericarp. The results suggested that the incorporation of phenolic acids into lignin synthesis of damaged pericarp was greater in dark purple mangosteen fruit than in reddish brown mangosteen fruit, resulting in a greater lignin content in damaged pericarp of dark purple fruit.

Although sinapic acid in damaged pericarp was 20 to 40 fold greater than *p*-coumaric acid but *p*-coumaric acid decreased more rapidly than sinapic acid. This suggested that the turn over rate of *p*-coumaric acid may have been greater than sinapic acid. Similarly both *p*-coumaric acid and sinapic acid in damaged pericarp of mangosteen fruit decreased more rapidly under normal air than under nitrogen. The results suggested that the incorporation of phenolic acids into lignin synthesis requires oxygen (Ketsa and Atantee, 1998), as the final step is the oxidative polymerization of *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols by peroxidase (Boudet et al., 1996). The presence of *p*-coumaric acid and sinapic acid during lignin synthesis in nondamaged and damaged pericarp of mangosteen fruit suggested that these two phenolic compounds were intermediates of mangosteen pericarp lignin biosynthesis. (Boudet et al., 1995; Whetten and Sederoff, 1995).

Acknowledgements The research was financially supported by the Thailand Research Fund grant no. BRG/15/2541 and PHD/00081/2541.

References

- Boudet AM (2000) Lignins and lignification : selected issues. *Plant Physiol Biochem* 38 : 81-96
- Boudet AM, Lapierre C, Grima-Pettenati J (1995) Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol* 129 : 203-236
- Boudet, AM, Grima-Pettenati J (1996) Lignin genetic engineering. *Mol Breeding* 2: 25-39
- Bruce RJ, West CA (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectin fragments in suspension cultures of custor bean. *Plant Physiol* 91: 899-897
- Bunsiri A, Paull RE, Ketsa S (2002) Lignin accumulation in relation to increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Plant Functional Biology*. In press
- Campell MC, Sederoff RR (1996) Variation in lignin content and composition. *Plant Physiol* 110: 3-13

- Diaz J, Barcelo AR, de Caceres FM (1997) Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignin, during the early development of seedling of *Capicum annuum*. New Phytol 136 : 183-188
- Dixon RA, Pavia NL (1995) Stress-induced phenyl propanoid metabolism. Plant Cell 7 : 1085-1097
- Higuchi T (1985) Biosynthesis of lignin. In: Higuchi T (ed). Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press, New York, pp. 141-160
- Hahlbrock K, Grisebach H (1979) Enzymatic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. Ann Rev Plant Physiol 30: 105-130
- Ketsa S, Atantee S (1998) Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. Postharvest Biol Technol 14: 117-124
- Ketsa S, Koolpheksee M (1993) Some physical and biochemical characteristics of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. Postharvest Biol Technol 2 : 209-213
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann Rev Phytopathol 18: 259-288
- Whetten R, Sederoff R (1995) Lignin biosynthesis. Plant Cell 7: 1001-1013
- Whetten RW, MacKay JJ, Sederoff R (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49 : 585-609
- Zhang D, Quantick PC, Grigor JM (2000) Changes in phenolic compounds in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit during postharvest changes. Postharvest Biol Technol 19: 165-172

Legends to Figures

Fig. 1A-B. Changes in firmness of damaged pericarp of brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 ( , ) and 100 ( , ) cm and held in air ( , ) and nitrogen ( , ) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of 25 measurements.

Fig. 2A-B. Changes in lignin content of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 ( , ) and 100 ( , ) cm and held in air ( , ) and nitrogen ( , ) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of five measurements.

Fig. 3A-B. Changes in total phenoloic contents of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 ( , ) and 100 ( , ) cm and held in air ( , ) and nitrogen ( , ) atmosphere. Mean values $\pm$ SD of five measurements.

Fig. 4A-D. Changes in absorbance spectra of total phenolics of damaged pericarp of reddish brown (A,B) and dark purple (C,D) mangosteen fruit 0 (-----) and 3 (——,-----) h after impact at drop height of 50 (A,C) and 100 (B,D) cm and held in air (- - - - -) and nitrogen (——) atmosphere.

Fig. 5. Changes in absorbance spectra of standard *p*-coumaric acid (-----) and sinapic acid (——).

Fig. 6. Thin layer chromatograms of phenolics of standard *p*-coumaric acid (lane 1), sinapic acid (lane 2), damaged pericarp of reddish brown (lanes 3-8) and dark purple (lanes 9-14) mangosteen fruit 0 (lanes 3,5,9,11) and 3 (lanes 4, 6-8, 10, 12-14) h at drop height of 50 (lanes 3, 4, 7, 9, 10, 13) and 100 (lanes 5, 6, 11, 12, 14) cm held in air (lanes 3-6, 9-12) and nitrogen (lanes 7, 8, 13, 14).

Fig. 7. High pressure liquid chromatograms of standard *p*-coumaric acid and sinapic acid (A) and phenolics extracted from damaged pericarp of dark purple mangosteen fruit 3 h after impact at 100 cm and held in air (B).

Fig. 8. Changes in *p*-coumaric acid of damage pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 cm (□, □) and 100 (■, ■) cm and held in air (□, ■) and nitrogen (□, ■) atmospheres. Mean values $\pm$ SD of five measurements.

Fig. 9. Changes in sinapic acid of damaged pericarp of reddish brown (A) and dark purple (B) mangosteen fruit after impact at drop height of 50 (□, □) and 100 (□, □) cm and held in air (□, ■) and nitrogen (□, ■) atmospheres. Mean value $\pm$ SD of five measurements.

Figure 1

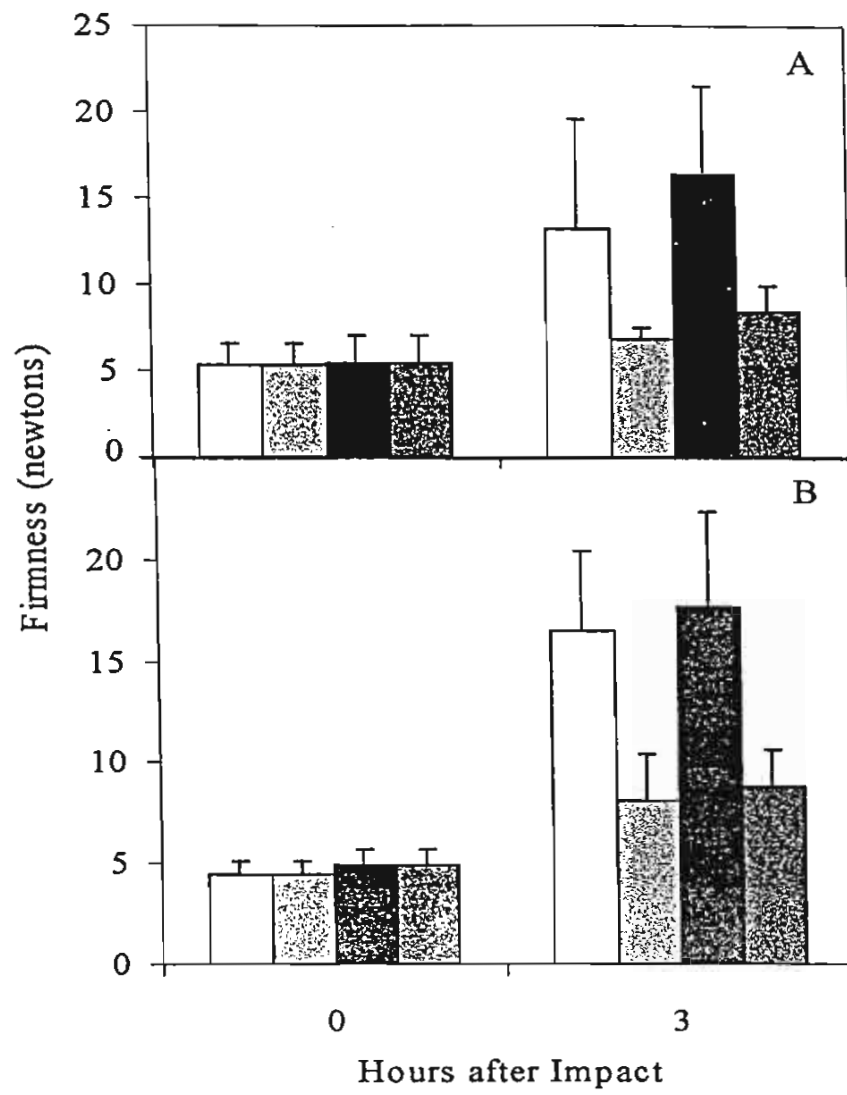


Figure 2

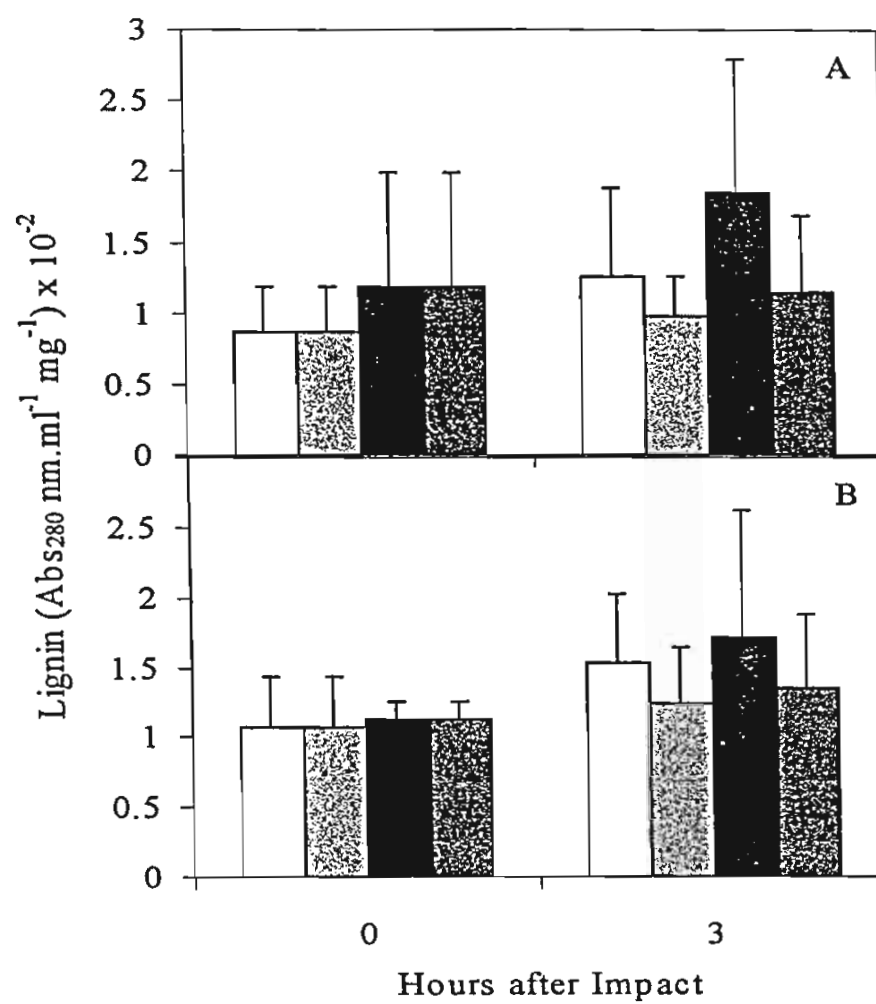


Figure 3

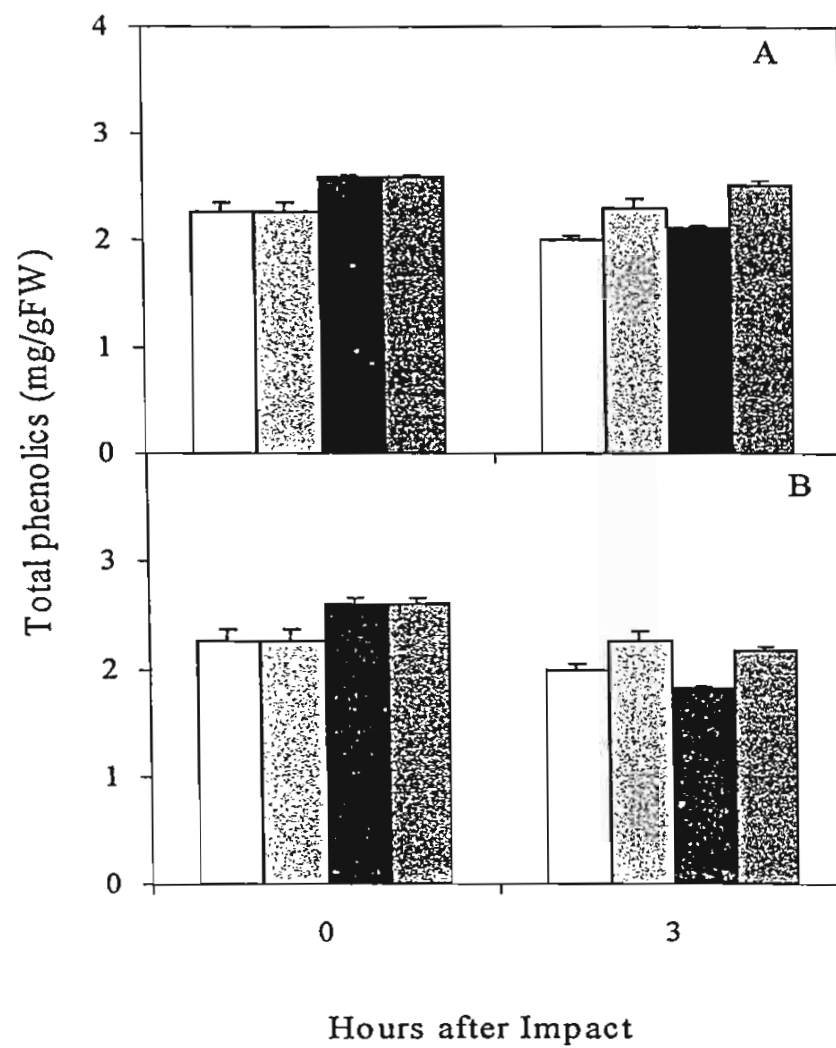


Figure 4

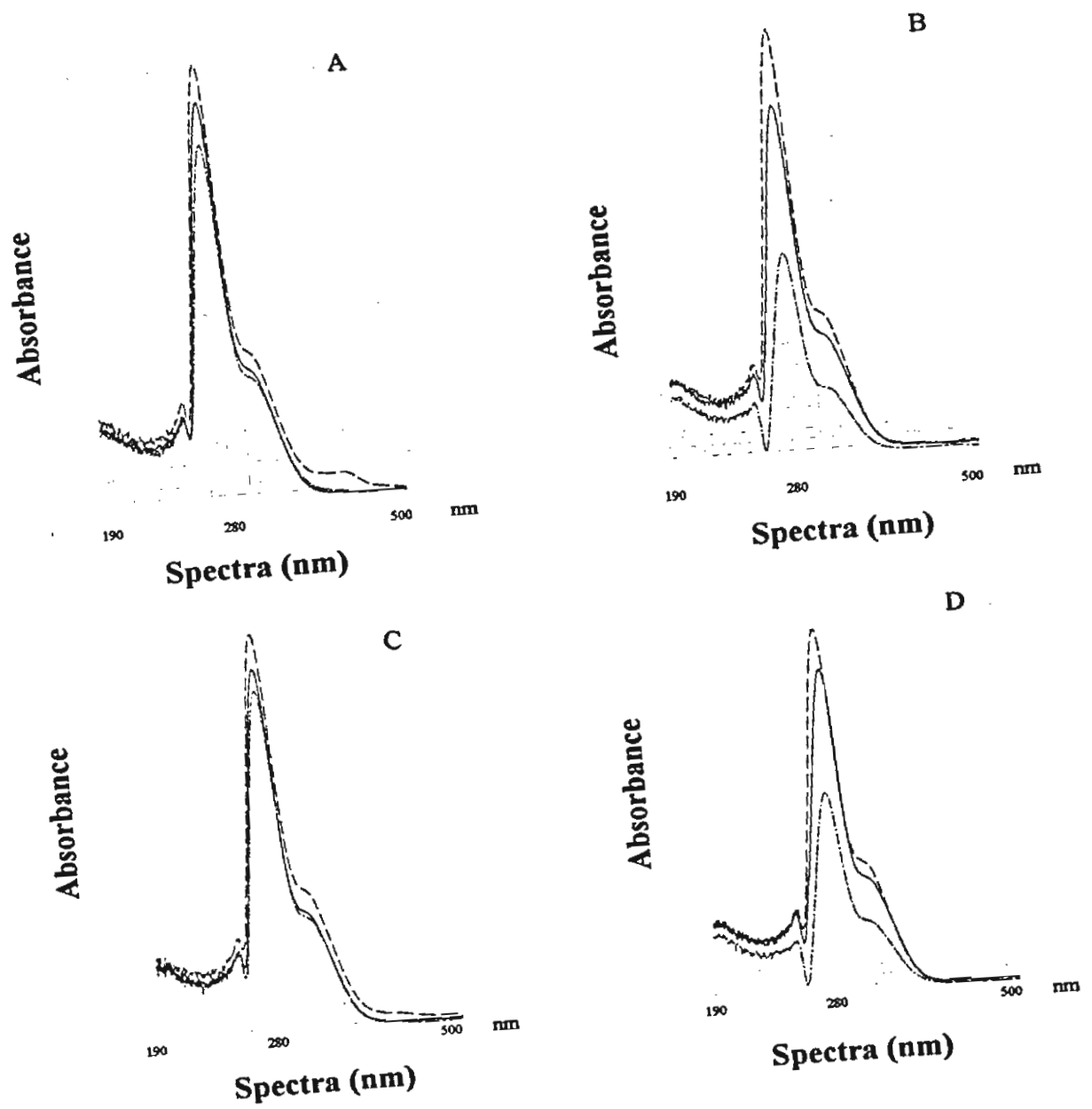


Figure 5

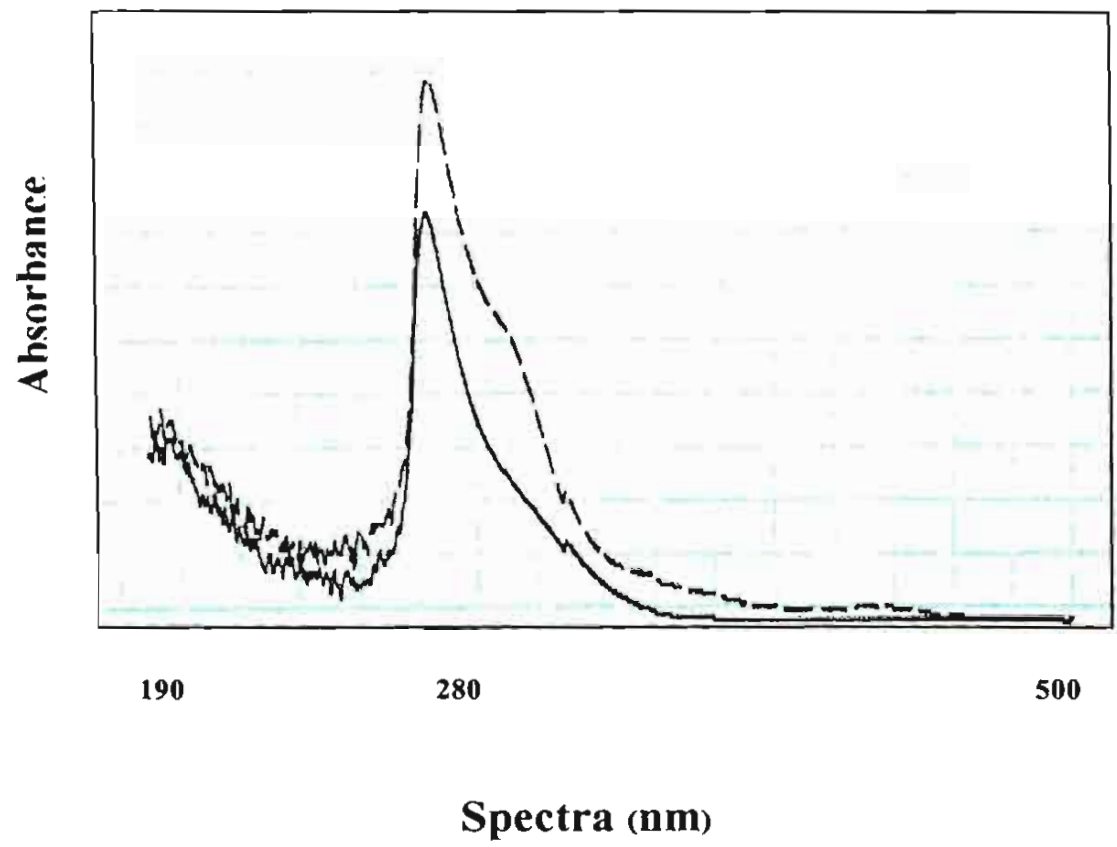
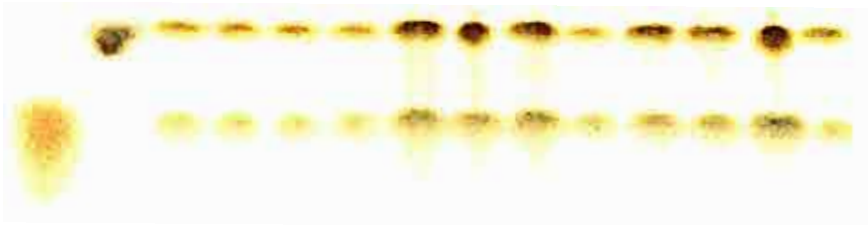


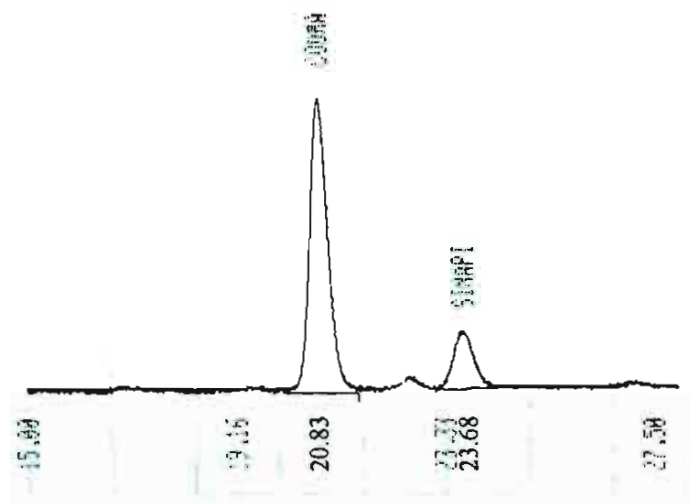
Figure 6



Lane 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

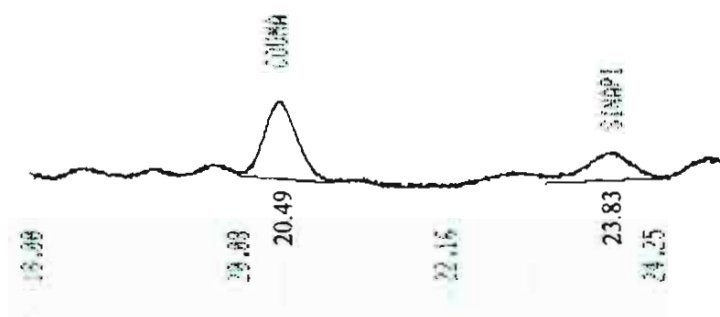
Figure 7

A



Retention Time (min)

B



Retention Time (min)

Figure 8

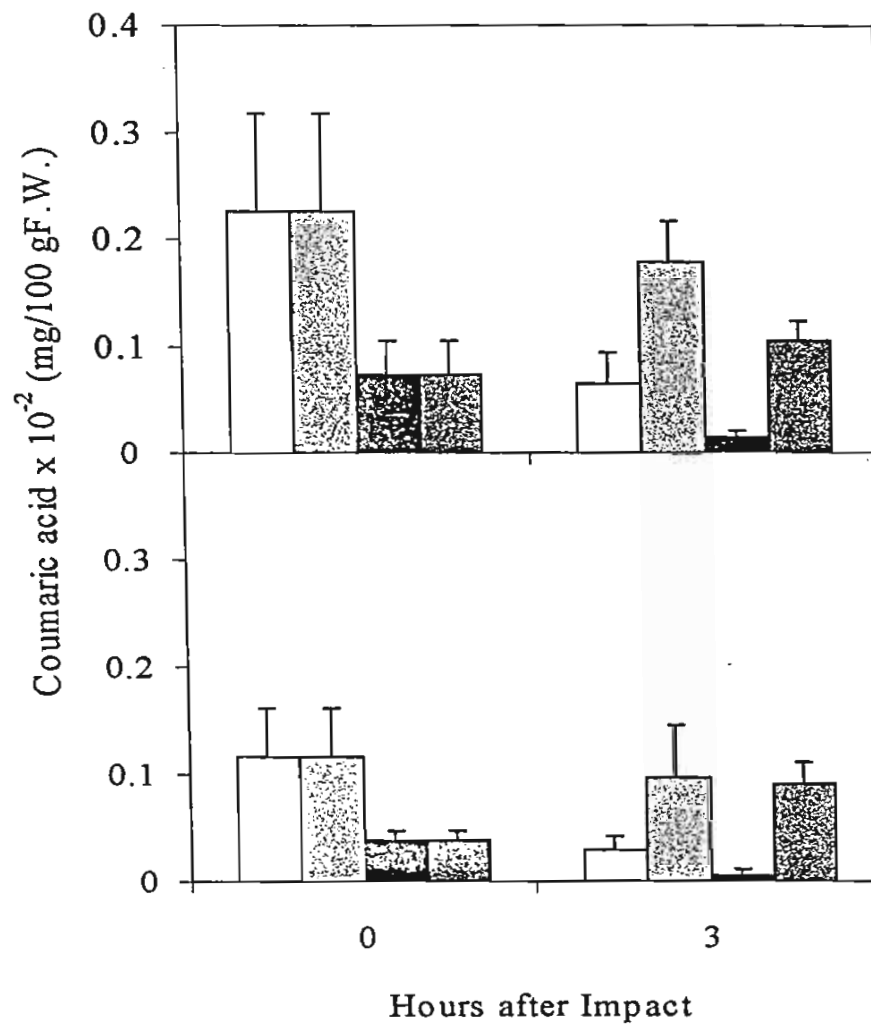
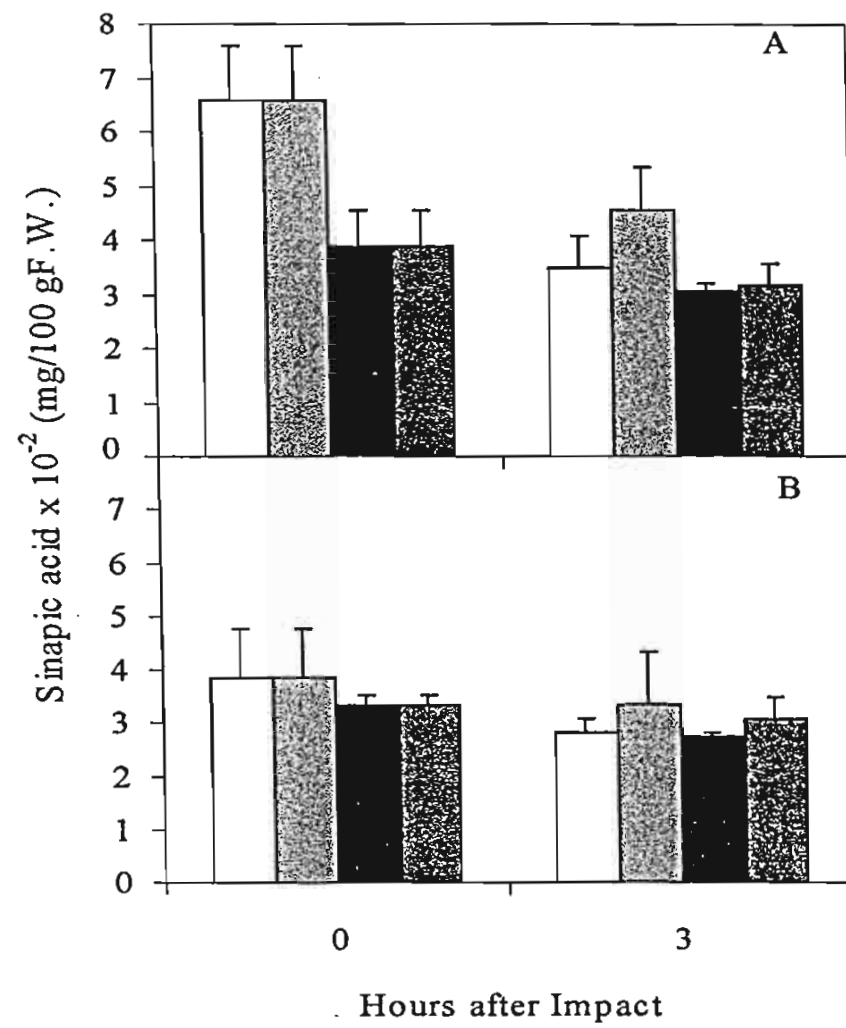


Figure 9



การนำไปใช้ประโยชน์

การประยุกต์ใช้ผลงานวิจัย

1. การนำไปใช้ประโยชน์

☒ เชิงพาณิชย์

- มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ โดยโครงการ

-

- มีการนำไปประยุกต์ใช้โดย ภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป

ใช้ในการอธิบายสาเหตุการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดที่ได้รับความเสียหายเชิงกล และแนะนำให้เกษตรกรและผู้เกี่ยวข้องได้ระมัดระวังในการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวผลมังคุดไม่ให้ได้รับอันตรายจากความเสียหายเชิงกล เช่น การตก การบีบ เป็นต้น

☒ เชิงนโยบาย

- มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย

-

- เกิดมาตรการใหม่

-

☒ เชิงสาธารณะ

- มีเครือข่ายความร่วมมือเกิดขึ้น/เชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

Prof. Dr. R.E.Paull, Department of Tropical Plant and Soil Sciences, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, USA โดยทำหน้าที่เป็นที่ปรึกษาของโครงการและเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ร่วมของนักศึกษา คปท. (นางอภิตา บุญศิริ) ได้ให้คำแนะนำและจัดเตรียมข้อเสนอโครงการตั้งแต่เริ่มต้น ให้คำแนะนำระหว่างการทำวิจัยและตรวจต้นฉบับ (manuscript) ก่อนส่งไปตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ และหลังจากสิ้นสุดโครงการนี้แล้ว ยังคงมีการร่วมมือของการวิจัยต่อไปอีก

- สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง

หลังจากนางอภิตา บุญศิริ ได้นำเสนอส่วนหนึ่งของงานวิจัยจากโครงการนี้ในที่สัมมนาของนักศึกษาปริญญาเอกโครงการกาญจนาภิเษก สวท. พิษศาสตร์ ครั้งที่ 1 วันที่ 25 สิงหาคม 2544 ณ KU Home (RGJ Seminar Series : Aggie Net I Plant Science)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ปรากฏว่ามีผู้ให้ความสนใจมากเกี่ยวกับกลไกการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระเทป

☒ **เชิงวิชาการ**

- การพัฒนาการเรียนการสอน

ใช้ประกอบการสอนวิชา 007582 (Postharvest Physiology of Horticultural Crops) และ 007682 (Advanced Postharvest Physiology and Technology) ซึ่งเป็นวิชาสำหรับหลักสูตรปริญญาโทและเอกของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- สร้างนักวิจัยใหม่

นางอภิตา บุญศิริ นักศึกษา คปก. รุ่น 1 ซึ่งคาดว่าจะจบการศึกษาได้ในภาคต้นปีการศึกษา 2545 และกลับเข้าปฏิบัติงานในตำแหน่งนักวิจัยที่หน่วยต้นสังกัดเดิม คือ หน่วยวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน