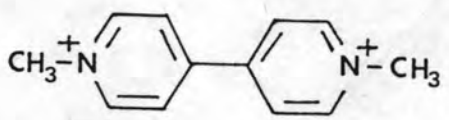
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

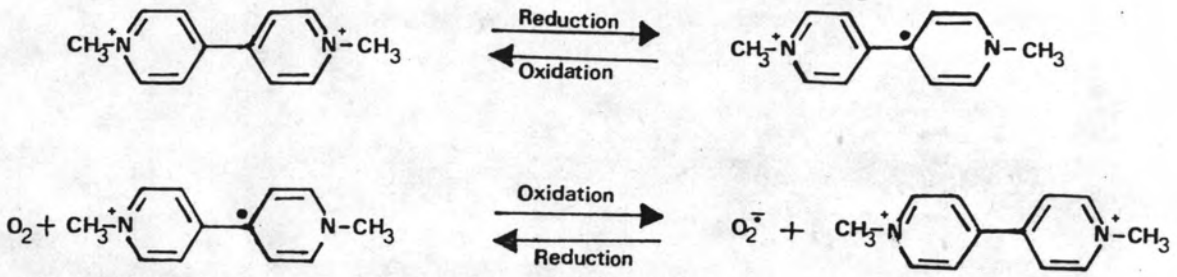
บทนำ

พาราควอท (paraquat) เป็นสารกำจัดวัชพืช (herbicide) ในกลุ่ม bipyridinium ประเภททำลายพืชแบบสัมผัส (contact herbicide) ไม่เลือกทำลาย (non-selective) กำจัดวัชพืชได้ทั้งใบแคบและใบกว้าง มีสูตรเคมีดังนี้



1,1'-dimethyl 4,4'-bipyridinium

การออกฤทธิ์ของพาราควอทมีความจำเพาะต่อเซลล์ที่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ เชื่อว่าพาราควอทจะทำลายพืชในขณะมีแสง โดยพาราควอทในรูปไดแคทไอออน(paraquat di-cation, PQ^{2+}) จะถูกรีดิวส์ด้วยแสง (photoreduced) ได้พาราควอทโมโนแคทไอออนเรดิกัล (paraquat mono-cation radical, PQ^{+}) แล้วจะถูกออโตออกซิเดชั่น (auto-oxidation) โดยโมเลกุลของออกซิเจนได้กลับมาเป็นพาราควอทไดแคทไอออนและสารประกอบซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัล(superoxide radical, O_2^{-}) ดังสมการรูปที่ 1.1 สารประกอบซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัลที่เกิดขึ้นเป็นพิษต่อพืช นอกจากนั้นเมื่อซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัลทำปฏิกิริยาต่อไปกับไฮโดรเจน ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และได้ไฮดรอกซิลเรดิกัล ซึ่งเป็นพิษต่อพืช ทำให้เกิดเปอร์ออกซิเดชั่นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวบนเยื่อไธลาคอยด์ และเกิดการแยกตัวของพลาสมาเลมมา (plasmalemma) ทำให้เซลล์รั่ว ทำความเสียหายต่อโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ เซลล์บริเวณนั้นจะตายเป็นหย่อม ๆ และพืชก็จะแห้งเฉาตายไปในที่สุด (Summer, 1980) การใช้พาราควอทเป็นสารกำจัดวัชพืช



$$P^{+\bullet} + O_2^{\bar{}} \longrightarrow P^{2+} + O^{2-} \qquad 1$$

$$2O_2^{\bar{}} \longrightarrow O_2 + O_2^{2} \qquad 2$$

$$2H_2^{-} + O_2^{2-} \longrightarrow H_2O_2 \qquad 3$$

$$H_2O_2 + P^{+\bullet} \longrightarrow P^{2+} + OH^{\bullet} - OH^{-} \qquad 4$$

$$OH^{\bullet} + P^{+\bullet} \longrightarrow P^{2+} + OH^{-} \qquad 5$$

$$OH^{-} + H^{-} \longrightarrow H_2O \qquad 6$$

รูปที่ 1.1 สมการแสดงการเกิด พาราควอทเรดิกัลและซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัล ซึ่งมีผลต่อเนื่องทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไฮดรอกซิลเรดิกัล ($OH^{\bullet}$) โดยปฏิกิริยาต่อเนื่องในสมการที่ 1-6

ก. พาราควอทไดแคทไอออน (P^{2+})

ข. พาราควอทโมโนแคทไอออนเรดิกัล ($P^{+\bullet}$)

(Farrington และคณะ, 1973, Habour และ Bolton, 1975 และ Summer, 1980)

เริ่มกระทำกันมาเป็นเวลานานตั้งแต่ปี 1966 (เผ่าพงศ์ พงศ์พนรัตน์, 2525) มีผลทำให้วัชพืชหลายชนิดเกิดลักษณะการต้านพาราควอทขึ้นได้ (Fuerst และคณะ, 1985, Shaalteil และ Gressel,1985, Tanaka และคณะ,1986)

มีผู้สนในศึกษาหากลไกการต้านพาราควอท เพื่อถ่ายทอดลักษณะการต้านทานพาราควอทไปสู่พืชปลูก (crop plants) การศึกษาโดยส่วนใหญ่จะกระทำโดยใช้เซลล์วัชพืชที่ต้านพาราควอทจากแหล่งธรรมชาติเป็นเป้าหมายของการวิจัย มีรายงานว่าการต้านพาราควอทในวัชพืช Conyza bonariensis L.Crong เกิดขึ้นได้โดยมีกลไกป้องกันพาราควอทไม่ให้เข้าในคลอโรพลาสต์ ในขณะเดียวกันปริมาณเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสสูงขึ้นด้วย (Fuerst และคณะ, 1985; Shaaltiel และ Gressel,1987) ลักษณะดังกล่าวนี้กลับไม่สามารถตรวจพบในวัชพืช Hordeum glauncum (Powles และ Cornic,1987) เช่นเดียวกับผลการทดลองในเฟิร์น (Ceratopteris reinhardtii Brong) ก็ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างในระบบเอนไซม์ดังกล่าวเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังไม่พบความเปลี่ยนแปลงของระดับโคเอนไซม์แอสคอเบทและกลูตาไธโอน ที่คาดว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการลดพิษของสารประกอบซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Carroll และคณะ,1988) มีนักวิจัยอีกกลุ่มหนึ่งใช้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงใน in vitroเป็นแม่บทของการศึกษากลไกการต้านพาราควอท Furusawa และคณะ(1984) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในแคลลัสยาสูบ (Nicotiana tabacum L.CV. Samsun)ที่ต้านพาราควอทมีระดับสูงกว่าเอนไซม์ของแคลลัสยาสูบสายพันธุ์ดั้งเดิม เป็นช่วงกว้างตั้งแต่ 147-159 เท่า อย่างไรก็ตามวัดแอคติวิตีของคะตะเลสและเปอร์ออกซิเดสได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่เนื่องจากกลุ่มเซลล์แคลลัสไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ดังนั้นกลไกการต้านพาราควอทในเซลล์พืชเพาะเลี้ยง อาจแตกต่างไปจากเซลล์สีเขียวในธรรมชาติ Erickson

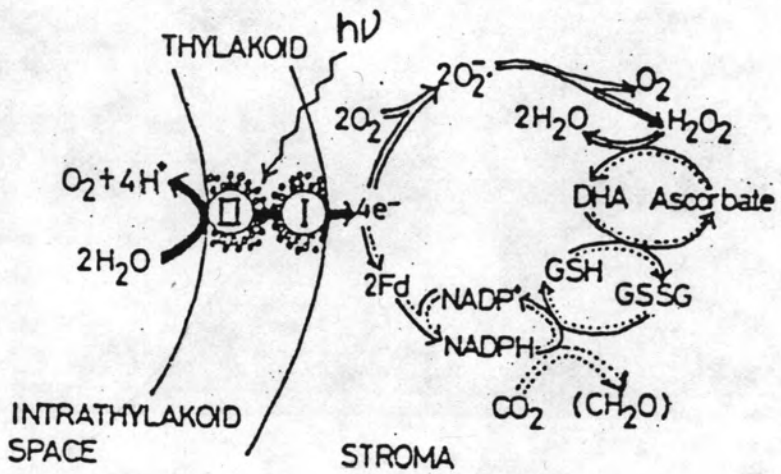
และคณะ(1984) ได้เสนอว่า Chlamydomonas reinhardtii เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนพืชในการศึกษากลไกการต้านสารกำจัดวัชพืชที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง โดยที่ C. reinhardtii เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวจัดอยู่ใน ดิวิชัน คลอโรไฟตา(Division Chlorophyta)ชั้นคลอโรไฟซิอิ(Class Chlorophyceae) มีคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วย (cup shape) 1 อัน มีเยื่อไธลาคอยด์ประกอบด้วย Photosystem I (PS I) และ Photosystem II (PS II) เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง (Levine, 1968) มี antenna system ของ PS I เรียกว่า CPO (Chlorophyll protein O) ซึ่งมีรงควัตถุ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีเหมือน LHG II (Light havesting complexes II) ในพืชชั้นสูง (Olive และคณะ 1983) ซึ่งได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือก C. reinhardtii ให้ต้านสารกำจัดวัชพืช DCMU, อะทราซีน และไทรอาซีน โดยการทำให้เกิดการมิวเตชั่นด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) และ 5-ฟลูออโรดี-ลออกซิยูริดีน (5-fluorodeoxyuridine) (Galloway และ Mets, 1982) หรือการใช้สาร 5-ฟลูออโรดีออกซียูริดีน ทำให้เกิดมิวเตชั่นใน C. reinhardtii สามารถต้านทาน DCMU และอะทราซีนได้ C. reinhardtii เจริญได้รวดเร็วในระยะเวลาสั้น ๆ เช่นเดียวกับแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังมีระบบการสืบพันธุ์ 2 รูปแบบ คือใช้เพศและไม่ใช้เพศ ทำให้สามารถตรวจสอบลักษณะการมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นว่าเกิดขึ้นในระดับยีนส์หรือระดับเซลล์ได้ สุพร นุชดำรงค์ และ สัณห์ พณิชยกุล (2530 ก.ข.) ได้ศึกษากลไกการต้านพาราควอทของพืชโดยการพัฒนา C. reinhardtii ต้านพาราควอทขึ้นด้วยเทคนิคการกลายพันธุ์ สายพันธุ์ที่สร้างขึ้นนี้สามารถวัดองศาการต้านทานพาราควอทได้อย่างถูกต้องแน่นอนด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และเมื่อนำ C. reinhardtii สายพันธุ์ PPQ-10/3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านพาราควอท มาศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่ต้านพาราควอท พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เพิ่มขึ้น 2 เท่า นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณเอน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

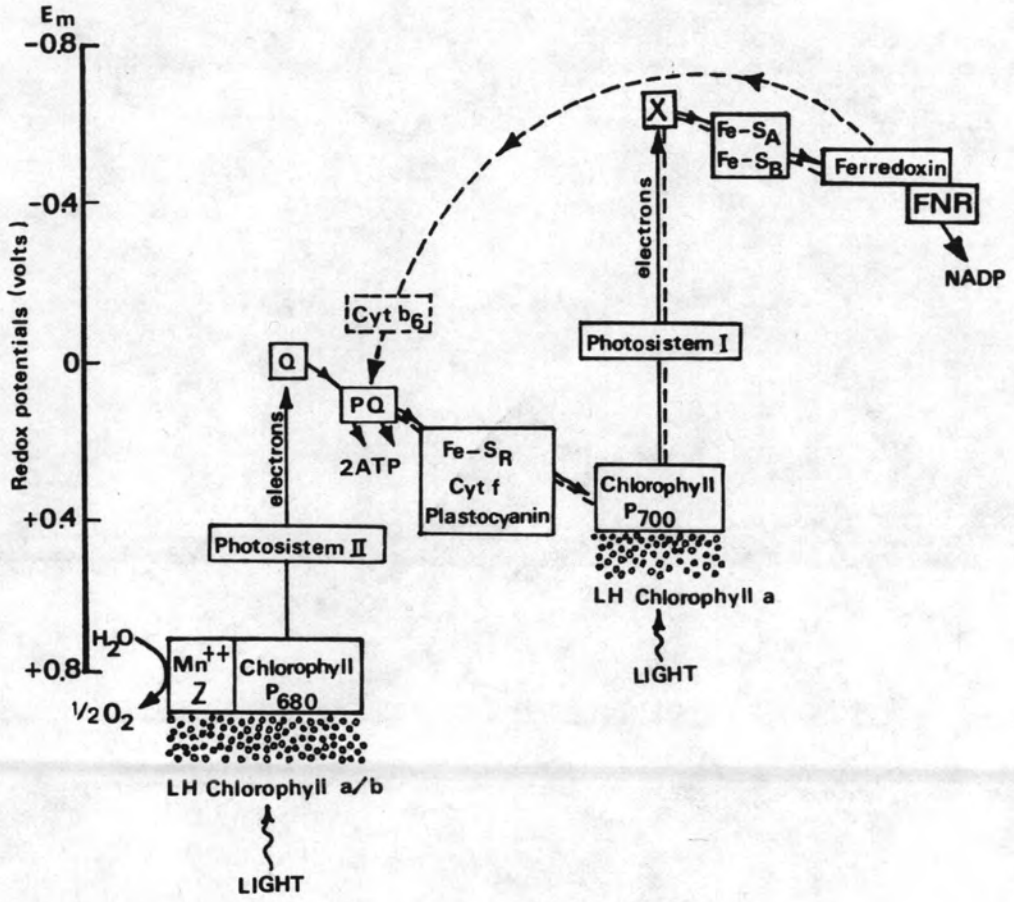
ไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส มีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 25 เท่า โดยไม่พบความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของเคนไซม์ระหว่าง 2 สายพันธุ์ (สุพร นุชด่ารงค์ และสัณห์ พณิชยกุล, 2532)

การกำจัดพิษของสารซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัล เชื่อว่าน่าจะถูกกำจัดโดยเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไปของพืชคือซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase,SOD), คะตะเลส (calalase)และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase)(Fridovich, 1976) นอกจากนี้ Foyer และ Halliwell (1976) เสนอว่า กลไกการกำจัดพิษของพาราควอทน่าจะผ่านระบบการทำงานต่อเนื่องกันของเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase)และเอนไซม์ดีไฮโดรแอสคอเบทรีดักเตส (dehydroascorbate reductase) โดยมีโคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ NADPH, กลูตาไธโอน (glutathione,GSSG) และแอสคอเบท (ascorbate,ASC) ต่อมา Nagano และ Asada (1981)ได้เสนอสมมติฐาน ซึ่งเป็นแม่บทของการกำจัดซุปเปอร์ออกไซด์ในเซลล์พืชเป็นภาพรวมของการกำจัดพิษของออกซิเจนในคลอโรพลาสต์(รูปที่ 1.2)

เอนไซม์เฟอริดอกซินเอนเอดีพีรีดักเตส (Ferredoxin-NADP reductase,FNR) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการส่งอิเลคตรอนจากเฟอริดอกซิน ไปยัง NADP ซึ่งเป็นรีดิวส์ชิงแฟคเตอร์ที่จำเป็นที่สุดในปฏิกิริยาทางชีววิทยา ในพืช (Biological reaction) เป็นปฏิกิริยาสุดท้ายในกระบวนการส่งผ่านอิเลคตรอนในวิถีการสังเคราะห์แสง ดังรูปที่ 1.3 ประกอบด้วย FAD (Flavin adenine dinucleotide) เป็นโคเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารนำอิเลคตรอน (electron carrier)เนื่องจากเอนไซม์ FNR นี้มีส่วนสำคัญในการควบคุมการส่งผ่านอิเลคตรอนแบบไม่วนกลับ (non - cyclic) และแบบวนกลับ (cyclic) จึงเกิดทั้ง NADPH



รูปที่ 1.2 สมมติฐานการเกิดและกำจัดสารประกอบซุปเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในคลอโรพลาสต์ โดยโมเลกุลแอสคอเบทจะเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำ (Nagano และ Asda,1981) I=PSI, II=PSI, Fd=เฟอริ-ดอกซิน, $(CH_2O)_n$= คาร์โบไฮเดรท, GSH = กลูตาไธโอน(รีดิวส์), GSSH = กลูตาไธโอน (ออกซิไดส์), DHA = ดีไฮโดรแอสคอเบท



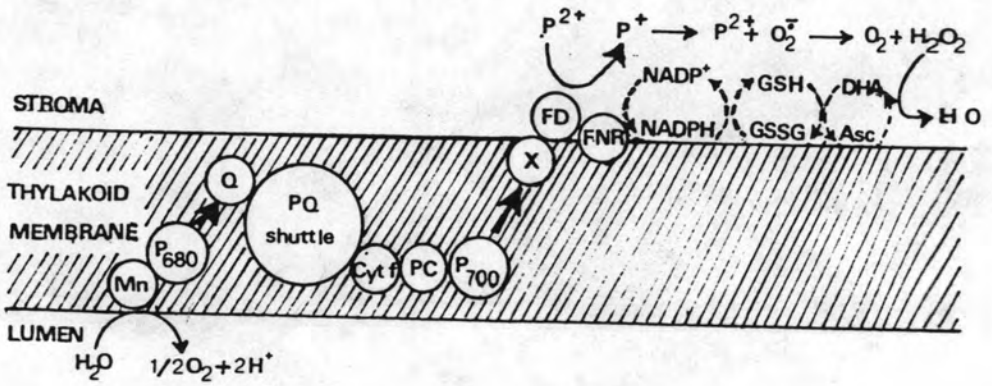
รูปที่ 1.3 Z-scheme แสดงวิถีของการส่งผ่านอิเลคตรอนในคลอโรพลาสต์ แกนตั้งแสดงค่าศักย์รีดอกซ์มาตรฐาน (Standard redox potential) ของตัวกลางต่าง ๆ ที่อยู่ในแนวแกนนอน ผู้เสนอ Z-scheme คนแรกคือ Hill และ Bendall (1960) รูปนี้ปรับปรุงโดย Boton และ Hall (1979)

และ ATP ซึ่งเป็นสารเคมีที่สำคัญที่สุด สามารถให้พลังงานสูงมากในการผลักดันปฏิกิริยาต่าง ๆ ในเมตาโบลิสมของสิ่งมีชีวิต ดังนั้น เอนไซม์ FNR จึงได้รับความสนใจศึกษานับแต่ปี 1956 (Avron และ Jagendorf) โดยได้มีงานวิจัยและศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ FNR ในพืชชั้นสูงชนิดต่าง ๆ ในการหาคุณสมบัติและกลไกการทำงานของ FNR ต่อมา มากมาย

ในหัวผักกาด (Radish, Raphanus sativus var. acanthiformis cultivar miyashige) ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของ FNR ที่ทำให้บริสุทธิ์ (Morigasaki และคณะ, 1990) ส่วนในถั่ว (pea, Pisum sativum cv. Feltham First) พบว่า ยีนส์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ FNR มี 2 ยีนส์ (Newman และ Gray, 1988) ซึ่งอาจสอดคล้องกับการศึกษาในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของมะเขือเทศ (Cherry-types tomatoes, Lycopersicon esculentum cv.VFNT และ cv. Momotara) ซึ่งพบ FNR 2 รูปแบบ จากการแยกในคอลัมน์ดีอีเออี และแยกในเอสดีเอสโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส (Green และคณะ. 1991) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผักโขมฝรั่ง (Spinach, Spinacea oleracea) มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ FNR ที่ทำให้บริสุทธิ์ (Avron และ Curti, 1980) ศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์และการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี ของ FNR เพื่อหาบริเวณที่ FNR จับกับสับสเตรทและโคแฟคเตอร์ (Cofactor) (Nakamura และ Kimura, 1971, Chang และคณะ, 1991) มีรายงานว่ามีไอโซไซม์ของ FNR ถึง 8 รูปแบบ (Gozzer, 1977, Elletson และ Krogmann 1979, Hasuni และคณะ, 1983) โดยมีการศึกษาโครงสร้างระดับอะตอมเพื่อหาโครงสร้าง 3 มิติ ของ FNR (Karplus และคณะ 1991) และยังได้ศึกษาการเรียงลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ FNR อย่างสมบูรณ์ โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ FNR ที่ทำให้บริสุทธิ์

ซึ่งแยกได้จาก ผักโขมฝรั่ง (Spinacea oleracea)(Karplus และคณะ, 1981) กับ FNR จากถั่ว (pea,Pisum sativum)(Newman และ Gray 1988) และสไปรูไลนา (Spirulina platensis) (Yao และคณะ 1984) นอกจากนั้นในพืชชั้นต่ำมีการศึกษาในยูกลีนา (Euglena glacilis Kleds var.bacillasis Cori)แยกเอนไซม์ทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติต่าง ๆ ของ FNR (Spano และ Schiff,1987) ตลอดจนในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจำพวก Cyanobacterium เช่น Nostoc miscorum 7119 โดยศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยา ไดอะโฟเรสของ FNR ที่สัมพันธ์กับเฟอริดอกซิน, เกลือ, อุณหภูมิ และพีเอช (Melamed-Herel และ คณะ,1985) ใน Anabaena variabillis พบว่า เฟอริดอกซินและ $NADP^+$ มีตำแหน่งที่จับบนเอนไซม์ต่างกัน (Sancho และ Gomez-Morena,1991) และในสไปรูไลนา (Spirulina platensis) สามารถแยก FNRได้ 2 รูปแบบ จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟฟาเด็กซ์ เอ-40 (DEAE-Sephadex A-40) (Manki และคณะ,1979) อย่างไรก็ตามถึงแม้งานวิจัยจะได้ดำเนินมาเป็นเวลานานเกี่ยวกับเอนไซม์ FNR แต่ก็ยังไม่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ชนิดนี้ ใน C. reinhardtii

จากการพิจารณาภาพรวมของส่วนประกอบของการส่งผ่านอิเลคตรอนในคลอโรพลาสต์บริเวณเยื่อไธลาคอยด์ เสนอโดย Trebts (1974) และกระบวนการกำจัดพิษของสารประกอบซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อมีพาราควอทเข้ามาแย่งรับอิเลคตรอน (Foyer และ Halliwell, 1976) รูปที่ 1.4 ซึ่งแสดงแผนภาพสมมติฐานรวมของส่วนประกอบการส่งผ่านอิเลคตรอนในคลอโรพลาสต์บริเวณเยื่อไธลาคอยด์ประกอบกับสมมติฐานของ Bowyer และคณะ (1988) ได้เสนอว่าพาราควอทควรจะเข้าแข่งขันแย่งรับอิเลคตรอนจากเฟอริดอกซินซึ่งเป็นสารตัวกลางใน PS I ได้โดยเฟอริดอกซินจะส่งอิเลคตรอนไปรีดิวส์ NADP



รูปที่ 1.4 สมมติฐานการเรียงตัวของส่วนประกอบใน วิถีการส่งผ่านอิเลคตรอนบนเยื่อไธลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์ (Trebts, 1974) ร่วมกับสมมติฐานของการแย่งรับอิเลคตรอนของพาราควอทเฟอริดอกซินเกิดซุปเปอร์ออกไซด์เรดิกัล (Bowyer และคณะ, 1988) และสมมติฐานกระบวนการกำจัดพิษของสารประกอบซุปเปอร์ออก-ไซด์เรดิกัลและ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Foyer และ Halliwel, 1976)

ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR ที่เกี่ยวข้องการทำงานของเฟอริดอกซิน ซึ่งในวิถีการสังเคราะห์แสง (Avron และ Jagendorf, 1956) อัตราการส่งอิเลคตอรอนจะเร็วหรือช้าย่อมขึ้นอยู่กับเอนไซม์นี้ว่า สามารถเร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเลคตรอนได้ดีเพียงใด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่ากลไกการต้านพาราควอทในพืช อาจเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเอนไซม์ FNR นี้

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาและวิจัยถึงธรรมชาติและคุณสมบัติของเอนไซม์ FNR ใน C. reinhardtii ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม 137c และสายพันธุ์ต้านพาราควอท PPQ-10/3 โดยคาดว่าเอนไซม์ FNR นี้น่าจะเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านพาราควอทในเซลล์สาหร่าย ซึ่งผลการวิจัยนอกจากมีผลทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีวเคมีของการต้านสารประกอบเคมีที่มีพิษ อีกทั้งยังอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการต้านพาราควอทในพืชชั้นสูงต่อไป นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าว ซึ่งสามารถให้ข้อมูลพื้นฐาน ของกลไกการทำงานของเอนไซม์ FNR ในเซลล์สาหร่าย C. reinhardtii ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนเลย