ชื่องานวิจัย การเปลี่ยนแปลงสารฟีนอลิก ลิกนิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระทบ

Title of Paper Changes in Phenolics, Lignin and Enzymes Involved in the Increased Firmness of Damaged Mangosteen of Mangosteen Fruit after Impact

ผู้วิจัย สายชล เกตุษา[1] และอภิตา บุญศิริ [2]

Authors Saichol Ketsa[1] and Apita Bunsiri[2]

บทคัดย่อ

การตรวจสอบผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงและน้ำเงินม่วง ที่ตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีต 50 และ 100 เซนติเมตร และให้อยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีและมีออกซิเจน ผลการวิจัยพบว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีความแน่นเนื้อ (ความแข็ง) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 3 ชั่วโมงหลังการตกกระทบ ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดที่เพิ่มขึ้นนี้ขึ้นกับวัยของผลมังคุด ความสูงของการตกกระทบ และสภาพของบรรยากาศหลังการตกกระทบ กล่าวคือเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้ม (แก่มาก)บริเวณที่ตกกระทบมีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง(แก่น้อย) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบที่สูงกว่ามีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบที่สูงน้อยกว่าและเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจนเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีการสะสมสารลิกนินเพิ่มขึ้นมาก เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงบริเวณที่ตกกระทบมีปริมาณสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ และเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีปริมาณสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพของบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีปริมาณคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรทเพิ่มขึ้นอีกด้วยการเพิ่มความแน่นเนื้อและสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของปริมาณสารฟีนอลิก

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

---

[1] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

[2] หน่วยวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
Postharvest Research Unit, Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kesetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, Thailand

ABSTRACT

Reddish brown and dark purple mangosteen fruits were released from drop height of 50 and 100 cm and they were held at room temperature in either air or nitrogen atmosphere. The results showed that 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. 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.

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.

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

คำนำ

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 และสีม่วง ตามลำดับ (Chandler, 1950) ผลมังคุดมีเปลือกหนา และน่าจะทนทานต่อการกระทบกระเทือน แต่ความจริงแล้วมังคุดเป็นผลไม้ที่บอบบางมาก ถ้าถูกกระทบกระแทกจะทำให้เปลือกเกิดรอยช้ำ และเกิดเปลือกแข็ง Tongdee and Suwanakul (1989) รายงานว่าเปลือกชั้นนอกของผลเกิดความเสียหายเล็กน้อย เมื่อตกจากความสูง 10 เซนติเมตร ความเสียหายเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งถึงเนื้อในถ้าตกกระทบจากความสูง 20 เซนติเมตรหรือมากกว่า แรงกดบนผล 3-4 กิโลกรัม ทำให้เปลือกชั้นนอกเสียหาย น้อยมากหรือไม่เสียหายเลย แต่แรงกด 5 กิโลกรัมหรือมากกว่า สามารถทำให้เปลือกชั้นนอกเสียหายได้ และเสียหายมากขึ้นในผลที่แก่จัด จำนวนชั้นที่บรรจุมังคุดไม่มีผลต่อการเกิดความเสียหายโดยตรง แต่มีผลทางอ้อมที่ช่วยเสริมให้เกิดความเสียหายมากขึ้น โดยก่อให้เกิดอาการเปลือกแข็ง และเนื้อผล ในส่วนที่รับประทานได้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เช่นเดียวกับการศึกษาการแข็งตัวของเปลือกมังคุดของ Ketsa and Koolpluksee (1993) พบว่า มังคุดที่ตกจากที่สูงมีการแข็งตัวอย่างรวดเร็วกว่าผลที่ตกจากที่ต่ำกว่า และผลมังคุดที่มีความบริบูรณ์ของผลมากกว่า สามารถเกิดอาการเปลือกแข็งได้รวดเร็วกว่าผลมังคุดที่มีความบริบูรณ์น้อยกว่า เมื่อตกกระทบในระดับความสูงที่เท่ากัน ผลมังคุดเปลือกสีม่วงแดงเกิดอาการเปลือกแข็งได้อย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง ขณะที่ผลที่มีเปลือกสีเหลืองอ่อนอมเขียวเกิดอาการเปลือกแข็งภายใน 18 ชั่วโมง

Whetten and Sederoff (1995) รายงานว่าจุดที่น่าจะเป็นจุดควบคุมการสังเคราะห์ลิกนิน (rate limiting steps) มี 3 จุดคือ เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase, PAL) เอนไซม์ซินนามิกแอซิดโคเอไลเกส (cinnamic acid CoA lygase) และซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส Mitchell et al. (1994) ศึกษาการชักนำกิจกรรมของซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) ในใบข้าวสาลีที่มีการสร้างลิกนินพบว่าจากการให้ไคโตแซนไฮโดรไลเสท ที่ถูกอะเซททิลเลทไปบางส่วนหรือสปอร์ของ *Botrytis cineria* กับใบข้าวสาลีที่ทำบาดแผล พบว่ามีการสังเคราะห์ลิกนินเพิ่มมากขึ้น และพบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และเปอร์ออกซิเดส(peroxidase, POD) ซึ่งจากการศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ซินนามิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสพบว่า การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์โคนิเฟริลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสไม่แตกต่างจากใบพืชปกติ(control) แต่กลับพบกิจกรรมของเอนไซม์ไซแนปปิลแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเพิ่มมากขึ้นมากกว่าใบพืชปกติถึง 10 เท่า ในผักกาดหอมที่เกิดอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาที่เรียก russet spot มีการเพิ่มปริมาณของลิกนินและสารประกอบฟีนอลิกในบริเวณแสดงอาการและบริเวณใกล้เคียง และมีการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส และฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดลิกนินเช่นกัน (Ke และ Saltveit, 1989) ตรงข้ามกับที่ Morrison et al. (1994) พบว่า การสังเคราะห์ลิกนินในผนังเซลล์ชั้นที่สองของปล้องข้าวโพด(internode) ไม่มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า กลไกการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดที่เกิดจากการตกกระทบนั้นยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัดว่า สารฟีนอลิกและสารลิกนินก่อให้เกิดอาการเปลือกแข็งของมังคุดได้อย่างไรและมีเอนไซม์อะไรที่เกี่ยวข้อง การทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงชนิดของสารฟีนอลิกและศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดลิกนินซึ่งก่อให้เกิดอาการแข็งตัวของเปลือกมังคุดหลังการตกกระทบ เพื่อให้เข้าใจกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการเปลือกแข็งของมังคุดได้ชัดเจนขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในการหาแนวทางป้องกันการเกิดอาการดังกล่าวต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ผลมังคุดที่ใช้ในการทดลองให้มาจากการซื้อจากสวนมังคุดในภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ผลที่ใช้ในการทดลองที่ 2 วัย คือ วัยสีผิวของเปลือกผลเป็นสีชมพูแดง (reddish brown) และวัยสีผิวของเปลือกผลเป็นสีม่วงเข้ม (dark purple) ทำการเก็บเกี่ยวผลมังคุดอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้มีการตกกระทบและบรรจุผลมังคุดที่เก็บเกี่ยวได้ลงในภาชนะบรรจุกล่องกระดาษลูกฟูก ขนาด 10 กิโลกรัม และทำการขนส่งโดยรถยนต์ห้องเย็นมายังห้องปฏิบัติการวิจัยทันทีหลังจากเก็บเกี่ยว ทำการคัดเลือกผลมังคุดให้มีความสม่ำเสมอทั้งขนาดและสีผิวก่อนทำการทดลอง การทำให้ผลมังคุดตกกระทบบนพื้นคอนกรีตทำโดยการจับขั้วผลมังคุดและแกนกลางอยู่ในแนวระนาบขนาดกับพื้นคอนกรีตสูงที่ระดับ 50 และ 100 เซนติเมตร ขณะเดียวกันบนพื้นคอนกรีตที่ผลมังคุดจะตกกระทบ โรยด้วยแป้งฝุ่น เมื่อปล่อยผลมังคุดตามระดับความสูงต่างๆ ผลมังคุดจะตกกระทบบนพื้นคอนกรีตที่มีแป้งฝุ่นโดยและบริเวณตกกระทบของผลมังคุดจะติดแป้งฝุ่น หลังจากนั้นจึงใช้ปากกาเน้นข้อความเขียนวงกลมบริเวณตกกระทบของเปลือกผลมังคุด โดยวิธีนี้จะทำให้ทราบบริเวณตกกระทบของเปลือกผลมังคุดที่แน่นอน นำผลมังคุดที่ตกกระทบไปไว้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (21 เปอร์เซนต์) และไม่มีออกซิเจนคือสภาพที่มีไนโตรเจน 100 เปอร์เซนต์ โดยให้ผลมังคุดอยู่ใน vacuum desiccator แล้วดูดอากาศภายในออกแล้วค่อยๆ แทนที่ด้วยไนโตรเจน หลังจากนั้นจึงนำผลมังคุดออกมาวัดความแน่นเนื้อและองค์ประกอบเคมีต่างๆ ทุกๆ 1 2 และ 3 ชั่วโมง หลังการตกกระทบ

1. ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุด ใช้ firmness tester (Effegi) ที่มีหัวกด (plunger) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วัดความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบและตกกระทบ จึงเห็นแต่ละผลจะวัดความแน่นเนื้อ 2 จุด ซึ่งอยู่ตรงกันข้าม

2. ปริมาณสารฟีนอลิก (total phenolics) โดยใช้วิธีการของ Singleton and Rossi (1965)

3. ปริมาณสารลิกนิน โดยใช้วิธีของ Bruce and West (1989)

ปริมาณสารเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรต (lignin-carbohydrate complex) การวัดปริมาณสารเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรท ในเปลือกผลมังคุดด้านที่ตกกระทบและไม่ตกกระทบ ใช้วิธีสกัดของ Morrison (1973) การตรวจสอบปริมาณสารคาร์โอไฮเดรท และโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรทที่สกัดไว้โดยใช้วิธีของ Hodge and Hofreiter (1962) และ Bradford (1976) ตามลำดับ

4. กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนิน หลังจากผลมังคุดมีการตกกระทบคอนกรีตสูงจากพื้น 150 เซนติเมตร และให้ผลมังคุดอยู่ในสภาพที่อุณหภูมิห้องและมีออกซิเจนปกติ ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ดังต่อไปนี้

กิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยใช้วิธีการของ Camm and Towers (1973)

กิจกรรมของเอนไซม์ CAD โดยใช้วิธีการของ Goffner et al. (1992)

กิจกรรมของเอนไซม์ POD โดยใช้วิธีการของ Morita et al. (1988)

การวิเคราะห์โปรตีนเพื่อการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ใช้วิธีการของ Bradford (1976)

5. การแสดงออกของจีน คัดเลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มที่มีขนาดและสีใกล้เคียงกันที่ไม่ได้รับความเสียหายจากโรคหรือแมลง และเชิงกล จากสวนเกษตรในภาคตะวันออกหรือภาคใต้ บรรจุลงในกล่องกระดาษลูกฟูกด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดบาดแผล แล้วจึงขนส่งโดยรถห้องเย็นมายังห้องปฏิบัติการภายใน 1 วันหลังจากเก็บเกี่ยว จากนั้นนำผลมังคุดมาจัดวางให้ขั้วผลและแกนกลาง อยู่ในแนวนอน ก่อนปล่อยให้ผลตกกระทบพื้นคอนกรีตที่โรยแป้งฝุ่นไว้เพื่อทำเครื่องหมายด้านตกกระทบที่ความสูง 100 เซนติเมตร จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 25, 30, 1, 2, และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำมาตัดชิ้นส่วนเปลือกบริเวณที่ได้รับความเสียหายขนาด 1x1x0.8 นิ้ว มาทำการทดลองดังนี้ คือ

5.1 วิเคราะห์กิจกรรมของ CAD ตามวิธีการของ Goffner et al. (1992)

5.2 วิเคราะห์โปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

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

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

ผลการทดลอง

ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุด

ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง (Figure 1A) และวัยสีม่วงเข้ม (Figure 1B) ทั้งด้านที่ไม่ตกกระทบและตกกระทบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติหลังการตกกระทบทันที (ชั่วโมงที่ 0) ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีการเพิ่มขึ้นของความแน่นเนื้ออย่างรวดเร็วภายใน 3 ชั่วโมงหลังการตกกระทบ และเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีต 100 เซนติเมตร มีการเพิ่มของความแน่นเนื้อมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีต 50 เซนติเมตร (Figure 4) เปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้ม (Figure 2B) บริเวณที่ตกกระทบมีการเพิ่มความแน่นเนื้อมากกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ (Figure 2A) การเพิ่มความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบภายใต้สภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (21 เปอร์เซนต์) มีมากกว่าภายใต้สภาพบรรยากาศที่ขาดออกซิเจน (Figure 2)

ปริมาณสารฟีนอลิกในเปลือกผลมังคุด

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

ปริมาณสารลิกนินในเปลือกผลมังคุด

การตรวจสอบปริมาณสารลิกนินในเนื้อเยื่อเปลือกผลมังคุดทั้งบริเวณไม่ตกกระทบและตกกระทบโดยการทำปฏิกิริยาของกรดไทโอไกลคอลิก (thioglycolic acid) พบว่าปริมาณสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มบริเวณที่ตกกระทบ (Figure 4B) มีการเพิ่มขึ้นมากกว่าในเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดงบริเวณที่ตกกระทบ (Figure 4A) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีต 100 เซนติเมตร มีการสะสมปริมาณสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดที่ตกกระทบสูงจากพื้นคอนกรีต 50 เซนติเมตร และเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ (21 เปอร์เซนต์) มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินอย่างรวดเร็ว ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน มีการเพิ่มปริมาณสารลิกนินเพียงเล็กน้อย (Figure 4A,4B)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรทในสารประกอบเชิงซ้อนของลิกนินคาร์โบไฮเดรท (lignin-carbohydrate complex) ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนปกติมีการเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Figure 5A) ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจนไม่มีการเพิ่มของปริมาณคาร์โบไฮเดรทในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรท (Figure 5B) ในทำนองเดียวกันเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนมีปริมาณโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรทเพิ่มขึ้นอย่างมาก (Figure 6A) ขณะที่เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน ไม่มีปริมาณโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรท (Figure 6B) สารคาร์โบไฮเดรทในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรทเพิ่มขึ้น 27.93-64.24 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรทเพิ่มขึ้น 19.13-27.60 เปอร์เซ็นต์

กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนิน

กิจกรรมเอนไซม์ PAL ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบค่อยๆ มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ตั้งแต่นาทีที่ 0 จนกระทั่งนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในนาทีที่ 5 หลังการตกกระทบแล้วลดลง และเพิ่มขึ้นมากอย่างรวดเร็วถึงจุดสูงสุดในนาทีที่ 15 หลังการตกกระทบ แล้วลดลงอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 20 แล้วค่อยๆ ลดลงหลังจากนาทีที่ 20 (Figure 7)

กิจกรรมเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบค่อยๆ มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จากนาทีที่ 0 จนถึงนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ CAD เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในนาทีที่ 5 หลังการตกกระทบแล้วลดลง กิจกรรมของเอนไซม์ CAD เพิ่มขึ้นมากและรวดเร็วในนาทีที่ 10 และเพิ่มถึงจุดสูงสุดในนาทีที่ 15 แล้วลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น และเพิ่มขึ้นอีกในนาทีที่ 30 หลังการตกกระทบแล้วค่อยๆ ลดลงจนถึงนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ (Figure 8)

กิจกรรมของเอนไซม์ POD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยตั้งแต่นาทีที่ 0 จนกระทั่งถึงนาทีที่ 180 หลังการตกกระทบ ขณะที่กิจกรรมของ POD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเพิ่มขึ้นมากอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 10 และเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุดในนาทีที่ 15 แล้วลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในนาทีที่ 120 และ 180 หลังการตกกระทบ (Figure 9)

การแสดงออกของจีน

การศึกษาการแสดงออกของจีน (gene expression) ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ เนื่องจาก CAD เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์สารลิกนินในพืชหลายชนิด และกิจกรรมของเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบเพิ่มขึ้นมากกว่าหลายเท่าของเอนไซม์ PAL และ POD ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของจีนที่ควบคุมเอนไซม์ CAD ในเบื้องต้นได้สกัด RNA จากเปลือกผลมังคุด และสืบค้นข้อมูลของจีนที่ควบคุม CAD จากพืชชนิดต่าง จาก gene bank ของ National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nih.gov) เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (Figure 10) 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

บทวิจารณ์

ความแน่นเนื้อของเปือกผลมังคุดหลังการตกกระทบและได้รับอันตรายเนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเหนือจุดเยือกแข็ง เพียงแต่ว่าความแน่นเนื้อการแข็งตัวของเปลือกผลมังคุดหลังการตกกระทบนั้นเกิดขึ้นเฉพาะจุดของเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหายหรือเกิดขึ้นเฉพาะตรงบริเวณที่มีการตกกระทบเท่านั้น (Tongdee and Suwanagul, 1989 ; Ketsa and Atantee,1998) ขณะที่ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดที่เกิดขึ้นหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเหนือจุดเยือกแข็งนั้นเกิดขึ้นทั้งผล ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สนับสนุนผลการวิจัยที่เคยรายงานไว้ว่า ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังการตกกระทบนั้นขึ้นอยู่กับวัยของผลมังคุด

ความสูงของการตกกระทบ และสภาพของบรรยากาศ กล่าวคือความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดวัยสีม่วงเข้มที่ตกกระทบมีการเพิ่มมากขึ้นกว่าเปลือกผลมังคุดวัยสีน้ำตาลแดง ความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบที่สูงจากพื้นมากมีการเพิ่มมากขึ้นกว่าเปลือกผลมังคุดตกกระทบสูงจากพื้นน้อยกว่า และความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติมีการเพิ่มขึ้นมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน การเพิ่มความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบนี้เกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่มีการตกกระทบเช่นเดียวกัน ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบนี้สนับสนุนข้อสรุปที่ว่า การเพิ่มขึ้นของความแน่นเนื้อของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่มีการตกกระทบนั้นน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากสังเคราะห์สารลิกนินเพิ่มขึ้น การสังเคราะห์สารลิกนินเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อของพืชที่เกิดบาดแผลเนื่องจาก โรค แมลง และศัตรูอื่นๆ เป็นกลไกป้องกันตนเอง (defense mechanism) ของพืช เพราะสารลิกนินจะช่วยซ่อมแซมและเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลในส่วนของเนื้อเยื่อที่พืชได้รับอันตราย (Vance, et al., 1980) เปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ออกซิเจนปกติมีปริมาณของสารลิกนินมากกว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบและอยู่ในสภาพบรรยากาศที่ไม่มีออกซิเจน ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ลิกนินนั้นมีการเพิ่มขนาดของโมเลกุล (polymerization) ของสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์ลิกนินต้องการออกซิเจน โดยมีเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Whetten and Sederoff, 1995)

หลังการตกกระทบเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีความแน่นเนื้อพร้อมการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของปริมาณสารลิกนิน การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบไม่ได้เกิดขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับการเพิ่มของความแน่นเนื้อในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ เมื่อมีการพิจารณาความแน่นเนื้อและปริมาณของสารลิกนินที่มีอยู่แล้วในเบื้องต้น พบว่าการเพิ่มของความแน่นเนื้อในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบภายใต้เงื่อนไขของวัยมังคุด ความสูงของการตกกระทบและสภาพของบรรยากาศที่ต่างกันมีอยู่ในช่วง 215-385 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเพิ่มปริมาณสารลิกนินในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีอยู่ในช่วง 150-288 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลิกนินเพียงอย่างเดียวอาจจะไม่พอเพียงทำให้เกิดการเพิ่มความแน่นเนื้อในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่มีการตกกระทบ น่าจะมีสารอย่างอื่นที่เกิดขึ้นด้วยในเปลือกผลมังคุดบริเวณตกกระทบและสารนี้เป็นตัวช่วยให้มีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นมาก จากการวิเคราะห์ปริมาณสารคาร์โบไฮเดรท และโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนของลิกนินคาร์โบไฮเดรท (lignin-carbohydrate complex) ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ พบว่าปริมาณสารคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนมีการเพิ่มขึ้น 27.43-64.24 และ 19.31-27.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณสารคาร์โบไฮเดรทมีมากกว่าปริมาณสารโปรตีน การเพิ่มปริมาณสารของคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนขึ้นอยู่กับสภาพของบรรยากาศที่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับการสังเคราะห์สารลิกนิน ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเพิ่มปริมาณสารทั้งคาร์โบไฮเดรท และโปรตีนในสารประกอบเชิงซ้อนของลิกนินคาร์โบไฮเดรทในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบนั้นขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์ลิกนิน (Whetten and Sederoff, 1995) มีรายงานว่าสารลิกนินในผนังเซลล์ของพืชสามารถรวมตัวกับสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์ของพืชเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้น (Kondo et al., 1990; Lam et al., 1994; Ralph et al., 1995) นอกจากนี้โปรตีนในผนังเซลล์ของพืชที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติก (aromatic amino acid) โดยเฉพาะไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งมีศักยภาพมากที่จะรวมตัวกับสารลิกนิน
กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้ (Whitmore, 1978., Keller et al., 1988., Whetten et al., 1998) การเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างสารลิกนินกับสารคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนที่อยู่ในผนังเซลล์ของพืช น่าจะมีส่วนในการเพิ่มขึ้นความหนาแน่นเนื้ออย่างรวดเร็วของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ (Iiyama et al.,1994)

การสังเคราะห์สารลิกนินในพืชเป็นกระบวนการทางปฏิกริยาทางเคมีที่มีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเป็นตัวเร่ง ปฏิกริยา (Hahlbrock and Grisebach, 1979; Boudet et al., 1996 ; Whetten et al., 1998 ; Boudet, 2000) เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนินในพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ PAL, cinnamate-4-hydroxylase (CAH), 4-courmate-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 พบว่าเอนไซม์ทั้ง PAL, CAD และ POD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณตกกระทบต่างก็มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นมากในช่วงเวลาเดียวกันคือ ในช่วงเวลา 10-20 นาที หลังการตกกระทบ โดยมีกิจกรรมเพิ่มถึงจุดสูงสุดในนาที 15 หลังการตกกระทบ ขณะที่ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ไม่ตกกระทบนั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ไม่เพิ่มขึ้นหรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบนั้นกระตุ้นให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, CAD และ POD เพิ่มขึ้น (Kahl, 1978)

PAL เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกริยาการสังเคราะห์สารฟีนอลิกซึ่งถูกนำไปใช้การสร้างสารอื่นๆ 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 เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกริยาการเปลี่ยนสารในกลุ่มแอลดีไฮด์คือ p-coumaryl aldehyde, coniferyl aldehyde และ sinapyl aldehyde ไปเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์คือ *p*-coumarly alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol ในปฏิกริยาเคมีของการสังเคราะห์สารลิกนิน ก่อนที่สารแอลกอฮอล์เหล่านี้จะรวมตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยการกระตุ้นของ POD (Whetten et al., 1998) กิจกรรมของเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบมีการเพิ่มขึ้นหลายเท่ามากกว่ากิจกรรมของ PAL และ POD การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, CAD และ POD อย่างมาก และรวดเร็วภายในเวลา 15-20 นาที หลังการตกกระทบของผลมังคุดพร้อมกับมีการสังเคราะห์และสะสมสารลิกนิน และสารประกอบเชิงซ้อนลิกนินคาร์โบไฮเดรทในบริเวณเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญทำให้มีการเพิ่มความแน่นเนื้อหรือความแข็งของเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ

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 CADนั้นถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่และถูกควบคุมโดยจีน การศึกษาการแสดงออกจีนที่ควบคุมเอนไซม์ CAD ในเปลือกผลมังคุดบริเวณที่ตกกระทบ จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากการสืบค้นข้อมูลจาก gene bank ข้าง

ต้น เนื่องจากมังคุดเป็นพืชไม้ยืนต้นในเขตร้อน และยังไม่มีรายงานที่ศึกษาการแสดงออกของจีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ CAD ในกลุ่มพืชที่ใกล้เคียงกับมังคุด การสังเคราะห์ไพรเมอร์โดยใช้เบสหลักที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลนั้นยังไม่สามารถใช้ได้กับ RNA ที่สกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ตกกระทบ อย่างไรก็ตาม ขณะนี้กำลังดำเนินงานในส่วนของการแสดงออกของจีนที่ควบคุม CAD คาดว่าจะได้ผลเร็วๆ นี้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ทบวงมหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

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 digetibility. 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.

Camm, E.C. and G.H.N. Towers. 1973. Phenylalanine ammonia lyase : A review. Phytochem. 12 : 961-973.

Chandler, W.H. 1950. Evergreen Orchards. La and Febiger, Philadelphia. 542 p.

Galliano, H., M. Cabane, C. Eckerskorn, 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.

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 pattway as an entry to aromatic secondary metabohism. Plant Physiol. 107 : 7-12.

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. Wotform (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. Saltveit. 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 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 alfafa. Can. J. Plant Sci. 70 : 193-201.

Lam, T.B.T., K. and B.A. Iiyama Stone. 1994. An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractioned cell walls of wheat internodes. Phytochem. 37: 327-333.

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 (*Tritichum 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.

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.

Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphosyntungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Vitic. 30(3) : 182-185.

Tongdee, S.C. and A. Suwanagul. 1989. Postharvest mechanical damage in mangosteen. ASEAN Food J. 4(4) : 151-155.

Vance, C.P., T.R. Kirk and R.T. Sherwood. 1980. Lignification as a machanism of disease resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 18 : 259-288.

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.