



การชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน *PR-1*
ในยางพาราโดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ
**Induced Resistance and Expression of *PR-1* Gene in *Hevea brasiliensis*
Muell. Arg. by Various Stimulants.**

ยุรฉัตร ยอดโยธี
Yurachat Yodyotee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Prince of Songkla University**

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน PR-1 ใน
ยางพาราโดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ
ผู้เขียน นางสาวยุรฉัตร ยอดโยธี
สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเช่าวี)

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเช่าวี)

.....กรรมการ

(ดร.นิอร จีรพงศกรกุล)

.....กรรมการ

(ดร.ชัชมนต์ แดงกนิษฐ์ นาถาวร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

| | |
|-----------------|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน <i>PR-1</i> ใน ยางพาราโดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ |
| ผู้เขียน | นางสาวยุรฉัตร ยอดโยธี |
| สาขาวิชา | ชีวเคมี |
| ปีการศึกษา | 2553 |

บทคัดย่อ

Phytophthora palmivora เชื้อก่อโรคสำคัญในยางพาราที่เป็นสาเหตุของโรคใบร่วงและโรคเส้นดำซึ่งสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกร การชักนำการต้านทานต่อโรคดังกล่าวจึงมีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจของประเทศ ผู้วิจัยได้ศึกษาการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) โดยใช้ตัวกระตุ้นต่างๆ ได้แก่ กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA) ปุ๋ย N-P-K (สูตร 25-7-7) และโคโคซาน ($\geq 75\%$ deacetylation) หลังจากกระตุ้นใบยางพาราด้วยตัวกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วตามด้วยการวางซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าโคโคซานความเข้มข้น 1% มีคุณสมบัติในการชักนำการต้านทานในใบยางพาราได้ดีที่สุด รองลงมาคือ SA ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ส่วนปุ๋ย N-P-K ไม่สามารถชักนำการต้านทานโรคโดยวิธีการที่ได้ออกแบบไว้ในขณะนี้ นอกจากนี้ยังพบว่า SA และปุ๋ย N-P-K เป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้ใบยางพารามีการผลิตสคอพอลิตินขึ้นในช่วงเวลาที่ศึกษา (12 ชั่วโมง) ในขณะที่โคโคซานไม่มีการกระตุ้นดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามตัวกระตุ้นทั้ง 2 กลุ่มทั้งที่มีการผลิตและไม่ผลิตสคอพอลิตินก็สามารถชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราได้ สำหรับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ SA เป็นตัวกระตุ้น เพื่อศึกษาการต้านทานโรคผ่านการแสดงออกของยีน *PR-1*

โปรตีน *PR-1* เป็น pathogenesis related proteins (PRs) ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในวิถีการป้องกันตนเองของพืชในแบบ systemic acquired resistance (SAR) ซึ่งมี SA เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ degenerate primers ของยีน *PR-1* ถูกออกแบบจากบริเวณ conserved sequences ของยีน *PR-1* จาก *Arabidopsis thaliana* และ *Eutrema wasabi* (accession no. NM_127025.2 และ AB271488.1 ตามลำดับ) แล้วนำมาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดยใช้ cDNA จากยางพาราเป็น template ผลการทดลองได้ขนาดของ PCR product เท่ากับ 350 base pairs (bp) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่น 65-99% จากนั้นออกแบบ specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แล้วเพิ่มจำนวนอีกครั้งได้ PCR product ขนาด 210 bp ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นในช่วง 60-97% จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน *PR-1* ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) ผลจากการ

ทำ 3' RACE ปรากฏ 2 แถบของยีน *PR-1* ขนาด 603 และ 404 bp ที่มีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นในช่วง 33-43% และ 58-72% ตามลำดับ เมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่าทั้ง 2 แถบมี codon ที่เริ่มแปลรหัสได้และ stop codon อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งมีความยาวเท่ากันคือ 93 กรดอะมิโน โดยมีความแตกต่างกันเพียง 1 residue และมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน *PR-1* ในพืชอื่นหลายชนิดอยู่ในช่วง 91-100% จึงสรุปได้ว่าประสบความสำเร็จในการได้มาซึ่งลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน *PR-1* ซึ่งประกอบด้วย cysteine 5 residues จากทั้งหมดที่มีในโปรตีนในพืชอื่นเท่ากับ 6 residues และพบบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์สูงติดต่อกันคือบริเวณ GHYTQVW ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็นองค์ประกอบของ SCP-*PR-1* like domain ในโปรตีน *PR-1* และเป็นการยืนยันว่า specific primer ที่ออกแบบไว้จำเพาะกับยีน *PR-1* ในยางพารา

ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยรวมโดยใช้ specific primers ที่ออกแบบได้พบว่าเมื่อกระตุ้นใบและต้นกล้ายางพาราด้วย exogenous SA ความเข้มข้นต่างๆ และกระตุ้นใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า exogenous SA และ เชื้อ *P. palmivora* ทำให้ยางพารามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นและผลิตสคอพอลิตินด้วย ซึ่งการแสดงออกของยีน *PR-1* นี้เองจะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นระบบ SAR ต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *PR-1* มีค่าสูงสุดในใบระยะอ่อนที่สุดและลดลงในเนื้อเยื่อใบที่มีอายุมากขึ้นตามลำดับ สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างยีน *PR-1* กับระดับความต้านทานในใบยางพาราพบว่าการแสดงออกสูงสุดในยางพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และต่ำที่สุดในพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600)

Thesis Title Induced Resistance and Expression of *PR-1* Gene in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by Various Stimulants.
Author Miss Yurachat Yodyotee
Major Programs Biochemistry
Academic Year 2010

ABSTRACT

Phytophthora palmivora is a pathogen of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (rubber plant) which is the causative agent of leaf fall and black stripe. Since rubber plant is one of the economic crops of Thailand, the induction of disease resistance should deserve particularly attention for a sustainable agriculture. Detached leaves of *H. brasiliensis* were treated for 12 h with either three stimulants, salicylic acid (SA), N-P-K fertilizer formula 25-7-7 sets and chitosan ($\geq 75\%$ deacetylation), followed by inoculated with *P. palmivora* (1×10^5 zoospores/ml). Treatment with 1% chitosan was the most effective by observing the reduction of necrosis lesion diameter. However, SA 12.5 mM reduced the necrosis lesion diameter as well, but in a lesser degree, while N-P-K did not induce resistance under the experimental design. Except for chitosan, SA and N-P-K fertilizer also induced scopoletin biosynthesis which referred the same pathway of these two stimulants. In this research, we chose SA to induce the defense mechanism in *H. brasiliensis* via *PR-1* gene expression.

Pathogenesis related proteins 1 (*PR-1*) is the most abundant of pathogenesis related proteins (*PRs*), induced by pathogens or SA. *PR-1* is commonly used as a marker for systemic acquired resistance (*SAR*). The research was pursued using degenerate primers designed from conserved sequences of the *PR-1* gene in *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema wasabi* (accession no. NM_127025.2 and AB271488.1, respectively). The *PR-1* gene of *H. brasiliensis* was amplified by PCR using *H. brasiliensis* cDNA as template. Then, the specific primers were derived from the obtained sequences (350 bp, 65-99% sequence identities to *PR-1* gene from other plants). The partial sequences (210 bp) amplified using the specific primers showed moderate to high sequence identities (60-97%) to *PR-1* gene from other plants. Full-length of *PR-1* gene was identified using Rapid Amplification of cDNA Ends

(RACE). The 3' RACE of *PR-1* gene was successfully obtained from *H. brasiliensis* containing 2 bands of 603 and 404 bp, the sequence identity to other *PR-1* genes were approximately 33-43% and 58-72%, respectively. When starting to read at the same codon and using the same stop codon, the deduced amino acid sequences of these 2 fragments were equal (93 residues). Only one residue is different between these two peptides and they exhibited 91-100% sequence identity to other *PR-1* proteins. The partial sequence of these proteins contained 5 out of 6 cysteine residues found in full length of *PR-1* protein. The amino acid sequence GHYTQVW, a particularly well-conserved region in other *PR-1*, called SCP_*PR-1* like domain, were also detected in these two *PR-1* proteins.

Moreover, the specific primers have been used to determine the expression of *PR-1* gene in *H. brasiliensis* at different conditions. The expression of *PR-1* gene and the accumulation of scopoletin were enhanced when treated with exogenous SA and *P. palmivora* (1×10^5 zoospores/ml) on detached leaves and seedling then *PR-1* gene expression was activators of SAR. The expression of *PR-1* gene at different leaves stages and different cultivars were also investigated. The result indicated that the *PR-1* transcript was strongly accumulated in younger leaves, while lower level was observed in older ones. The transcription level in different cultivars was observed and found that the mRNA of *PR-1* gene was induced according to the level of resistance of each cultivar, BPM-24, RRIT251 and RRIM600, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ร.ศ.ดร.นันทา เชิงเชาว์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในด้านการทำวิจัย และยังแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ มาโดยตลอด รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ร.ศ.ดร.พรทิพย์ ประพันธ์พจน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ ดร.ชัชมนต์ แดงกนิษฐ์ นาถาวร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความกรุณาในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น ขอขอบพระคุณ ดร.นิอร จีระพงศรกุล กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและกรุณาเสียสละเวลาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ตลอดมา รวมทั้งภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนบางส่วนในการทำวิจัยและทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์จากโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่สนับสนุนเงินทุนการศึกษาและมอบโอกาสที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย และทุกคนในครอบครัวซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุด ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา

ยุรฉัตร ยอดโยธี

สารบัญ

| เรื่อง | หน้า |
|---------------------------------|------|
| บทคัดย่อ | (3) |
| Abstract | (5) |
| กิตติกรรมประกาศ | (7) |
| รายการตาราง | (9) |
| รายการรูปประกอบ | (10) |
| ตัวย่อและสัญลักษณ์ | (13) |
| 1. บทนำ | |
| ที่มาและความสำคัญ | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 27 |
| 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 28 |
| 3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง | 49 |
| 4. สรุปผลการทดลอง | 93 |
| เอกสารอ้างอิง | 96 |
| ภาคผนวก | 104 |
| ประวัติผู้เขียน | 107 |

รายการตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 1.1 คุณสมบัติของ PRs แต่ละชนิด | 11 |
| 1.2 คุณสมบัติของโปรตีน PR-1 ในยาสูบและมะเขือเทศ | 16 |
| 1.3 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน PR-1 ชนิดต่างๆ | 16 |
| 2.1 ซึ่อสารเคมีเกรตดิวิเคราะห์และบริษัทผู้ผลิต | 28 |
| 2.2 ซึ่อสารเคมีเกรตดิชีววิทยาและบริษัทผู้ผลิต | 29 |
| 3.1 คะแนนการเรืองแสงของสคอพอลิตินหลังกระตุ้นด้วย SA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง | 53 |
| 3.2 คะแนนการเรืองแสงของสคอพอลิตินหลังกระตุ้นด้วยปุ๋ย N-P-K เป็นเวลา 12 ชั่วโมง | 56 |
| 3.3 คุณสมบัติของ degenerate primers ที่ใช้ | 64 |
| 3.4 คุณสมบัติของ specific primers ที่ใช้ | 66 |

รายการรูปประกอบ

| รูปที่ | หน้า |
|--|------|
| 1.1 ลักษณะใบ ผล ช่อดอกและต้นกล้าของยางพารา | 4 |
| 1.2 โรคในยางพาราที่เกิดจากเชื้อ <i>P. palmivora</i> และ <i>P. botryosa</i> | 6 |
| 1.3 วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Phytophthora</i> | 7 |
| 1.4 โครงสร้างสปอร์แรงเจียมของเชื้อ <i>P. palmivora</i> | 7 |
| 1.5 โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน PR-1b ในมะเขือเทศ | 14 |
| 1.6 กลไกของระบบการป้องกันตนเองของพืชแบบ SAR เมื่อพืชถูกรุกรานโดยเชื้อก่อโรค | 18 |
| 1.7 วิธีการสังเคราะห์ SA ในพืช | 19 |
| 1.8 บทบาทของ SA ในการเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR | 21 |
| 1.9 เปรียบเทียบกลไกของระบบการป้องกันตนเองของพืช 2 ระบบ ได้แก่ ระบบ ISR และ ระบบ SAR | 24 |
| 1.10 โครงสร้างทางเคมีและปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ในการเตรียมไมโครโซมจากไคติน | 25 |
| 2.1 เชื้อ <i>P. palmivora</i> บนอาหาร PDA | 31 |
| 2.2 เชื้อ <i>P. palmivora</i> บนอาหาร V ₈ | 31 |
| 2.3 การบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ | 33 |
| 2.4 ระยะเวลาเจริญเติบโตของใบยางพาราที่ใช้ในการทดลอง | 34 |
| 2.5 ตำแหน่งของใบยางพารา 6 ใบ ที่ใช้ในการทดลองซึ่งมาจากต้นเดียวกันและมีความอ่อน-แก่ ใกล้เคียงกัน | 34 |
| 2.6 การเตรียมใบยางพาราโดยการแบ่งครึ่งใบยางพาราเป็นใบส่วนบนและใบส่วนล่าง | 36 |
| 2.7 ใบยางพาราช่วงอายุต่างๆ | 38 |
| 2.8 ลักษณะของใบยางพาราที่ใช้ในการทดลองที่มาจากต้นเดียวกันและมีความอ่อน-แก่ ใกล้เคียงกัน | 39 |
| 2.9 แผนผังสรุปขั้นตอนการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' | 42 |
| 2.10 แผนผังสรุปขั้นตอนการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' | 43 |

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 3.1 เปรียบเทียบตัวอย่างรอยไหม้ของเชื้อหลังบ่มไບียงพันธุ์ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ <i>P. palmivora</i> ความเข้มข้นต่างๆ | 49 |
| 3.2 สดอพอลิตินที่สังเคราะห์ขึ้นที่เวลาต่างๆ หลังจากไບียงพันธุ์ RRIM600 ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ <i>P. palmivora</i> ความเข้มข้นต่างๆ | 50 |
| 3.3 ไบียงพาราที่ผ่านการทดสอบด้วย SA ความเข้มข้นต่างๆ แล้วตามด้วยการวางเชื้อ | 52 |
| 3.4 เปอร์เซนต์การเกิดรอยไหม้ของไบียงพาราที่เวลาต่างๆ หลังจากกระตุ้นด้วย SA แล้วตามด้วยการวางเชื้อ | 53 |
| 3.5 การเกิดรอยไหม้หลังบ่มไบียงพาราด้วยเชื้อ <i>P. palmivora</i> จากผลการทดสอบการยับยั้งโดยตรง | 54 |
| 3.6 การเกิดรอยไหม้ของไบียงพาราหลังจากกระตุ้นไบียงด้วยปุ๋ย N-P-K แล้วตามด้วยการวางเชื้อ | 56 |
| 3.7 เปอร์เซนต์การเกิดรอยไหม้ของไบียงพาราหลังจากกระตุ้นด้วยปุ๋ย N-P-K แล้วตามด้วยการวางเชื้อ | 57 |
| 3.8 รอยไหม้ที่เกิดขึ้นหลังบ่มไบียงพาราด้วยเชื้อ <i>P. palmivora</i> กับไบียงที่ผ่านการกระตุ้นด้วยโคโตซานความเข้มข้นต่างๆ | 58 |
| 3.9 เปอร์เซนต์การเกิดรอยไหม้ของไบียงพาราหลังจากกระตุ้นด้วยโคโตซาน | 59 |
| 3.10 การเกิดรอยไหม้หลังบ่มไบียงพาราด้วยเชื้อ <i>P. palmivora</i> จากผลการทดสอบการยับยั้งโดยตรง | 60 |
| 3.11 ผลการทำ sequence alignment ของยีน <i>PR-1</i> จาก <i>Arabidopsis thaliana</i> และ <i>Eutrema wasabi</i> | 63 |
| 3.12 PCR product ของยีน <i>PR-1</i> จากการทำให้ PCR โดยใช้ degenerate primers | 64 |
| 3.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>PR-1</i> ในไบียงพาราที่อ่านได้จาก degenerate primers | 66 |
| 3.14 PCR product ของยีน <i>PR-1</i> จากการทำให้ PCR โดยใช้ specific primers | 67 |
| 3.15 PCR product ที่ได้จากการทำ 3' RACE | 68 |
| 3.16 การตรวจสอบแถบ A และ B ที่ได้จากการทำ 3' RACE | 69 |
| 3.17 พลาสมิดลูกผสมที่สกัดโดยใช้ชุดสกัด Qiagen® Plasmid Purification | 71 |
| 3.18 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>PR-1</i> ที่อ่านได้ | 73 |

รายการประกอบ (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|--|------|
| 3.19 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ | 74 |
| 3.20 ผลการ blast ลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank พบตำแหน่ง SCP PR-1 like domain | 75 |
| 3.21 เปรียบเทียบ domain สำคัญของโปรตีนที่ได้ กับโปรตีน PR-1 จากพืชอื่น | 75 |
| 3.22 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบ A และ B กับโปรตีน PR-1 จากพืชชนิดต่างๆ | 77 |
| 3.23 แผนผังสรุปขั้นตอนการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' โดยการใช้อยู่ specific reverse primer เส้นเดียว | 78 |
| 3.24 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ specific reverse primer | 79 |
| 3.25 ผลการแสดงออกของยีน PR-1 หลังจากกระตุ้นใบยางพาราด้วย SA | 80 |
| 3.26 ผลการแสดงออกของยีน PR-1 ในใบยางที่กระตุ้นด้วยเชื้อ <i>P. palmivora</i> | 82 |
| 3.27 การแสดงออกของยีน PR-1 ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกัน | 85 |
| 3.28 ใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 ที่มีอายุต่างกันหลังปมด้วยเชื้อ | 86 |
| 3.29 การแสดงออกของยีน ITS ของเชื้อ <i>P. palmivora</i> ในใบยางพาราอายุแตกต่างกัน | 87 |
| 3.30 ใบยางพาราพันธุ์ต่างๆหลังปมด้วยเชื้อ <i>P. palmivora</i> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง | 88 |
| 3.31 ผลการแสดงออกของยีน PR-1 ในใบยางพาราแต่ละสายพันธุ์ | 89 |
| 3.32 การแสดงออกของยีน ITS ของเชื้อ <i>P. palmivora</i> ในใบยางพาราแต่ละสายพันธุ์ | 91 |

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

| | | |
|-------------|---|--|
| α | = | alpha |
| bp | = | base pairs |
| β | = | beta |
| β -ME | = | β -mercaptoethanol |
| h | = | hour |
| kDa | = | kilodalton |
| pH | = | -log hydrogen ion concentration |
| λ | = | lamda |
| Tm | = | melting temperature |
| ml | = | milliliter |
| mM | = | millimolar |
| O.D. | = | optical density |
| % | = | percent |
| SDS | = | sodium dodecyl sulphate |
| Tris-HCl | = | Tris (hydroxymethylaminomethane) hydrochloride |
| v/v | = | volume per volume |
| w/v | = | weight per volume |
| UV | = | ultraviolet |

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) เป็นพืชที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศจำนวนมาก จึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรไทยเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามประเทศไทยมีลักษณะภูมิอากาศเป็นแบบร้อนชื้น ดังนั้นปัญหาสำคัญของเกษตรกรคือการติดเชื้อโรคของยางพารา ได้แก่ โรคฝักเน่า โรคราแป้ง โรคใบร่วงและโรคเส้นดำ ฯลฯ ซึ่งทำให้ผลผลิตของยางพาราลดลง ความรุนแรงของโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันไป แต่เมื่อพิจารณาความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยางธรรมชาติ โรคใบร่วงและโรคเส้นดำเป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายกับยางพารามากที่สุดโรคหนึ่งเพราะทำให้ผลผลิตน้ำยางพาราลดลง เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคนี้คือเชื้อ *Phytophthora* ที่สามารถเข้าทำลายต้นยางพาราได้แทบทุกส่วนไม่ว่าจะเป็น ราก ลำต้น กิ่ง ใบและผล ซึ่งเมื่อต้นยางพาราติดเชืชนิดนี้แล้วจะทำให้เกิดใบร่วง หน้ำยางเสียทำให้กรีดยางไม่ได้และยังทำให้ต้นยางพารามีระยะเวลาที่ให้ผลผลิตสั้นลงเป็นเวลา 6-18 ปีอีกด้วย (สถาบันวิจัยยาง, 2550) เกษตรกรส่วนใหญ่จึงเลือกวิธีแก้ปัญหาโดยการฉีดพ่นต้นยางพาราด้วยสารเคมีเพื่อควบคุมเชื้อดังกล่าว แต่วิธีการนี้จะส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรเองในระยะยาว ดังนั้นการชักนำให้ต้นยางพารามีความต้านทานต่อเชื้อมากขึ้นโดยใช้สารกระตุ้นจากธรรมชาติหรือสารกระตุ้นที่ไม่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมย่อมส่งผลดีทั้งในปัจจุบันและอนาคต

ในธรรมชาติพืชจะมีวิธีการป้องกันตนเองจากเชื้อที่มารุกรานทั้งทางโครงสร้างของพืช (structural defenses) เช่น การสร้างแว็กซ์และคิวตินเคลือบผิวใบด้านนอก และทางชีวเคมี (biochemical defenses) เช่น การปล่อยไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ รวมทั้งการสังเคราะห์ pathogenesis-related proteins (PRs) กลุ่มต่างๆ (Van Loon and Van Strien, 1999) การป้องกันตนเองทางชีวเคมีนับว่ามีบทบาทสำคัญไม่น้อยไปกว่าการป้องกันตนเองทางโครงสร้างของพืช ยกตัวอย่างเช่น เมื่อชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคโดยการชักนำให้เกิดการป้องกันตนเองทางชีวเคมีแล้วจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อช้าลงจนไม่สามารถทำอันตรายแก่พืช แม้ว่าการป้องกันตนเองทางโครงสร้างของพืชจะมีความบกพร่องก็ตาม (ไพโรจน์, 2525) ยางพารามีกลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเช่นเดียวกับพืชทั่วไป โดยการสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆ ขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จากรายงานของนิลุล (2545) พบว่าเชื้อ *P. botryosa* สามารถ

กระตุ้นให้ใบยางพาราสร้าง PRs ได้แก่ เอนไซม์ β -1,3-กลูคาเนส (PR-2) และเอนไซม์โคติเนส (PR-3) เพิ่มมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ Churngchow และ Rattarasarn (2001) รายงานว่าภายหลังจากการกระตุ้นใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* แล้วยางพาราจะมีการผลิตสคอพอลิติน (ไฟโตอิเล็กซินชนิดหนึ่ง) ในยางพันธุ์ต้านทานสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ

โดยทั่วไปพืชสามารถชักนำระบบการป้องกันตนเองให้มีการต้านทานโรคเพิ่มขึ้นได้โดยใช้ตัวกระตุ้นที่เป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์ (biotic elicitors) หรือสารที่มาจากเชื้อโรคหรือมาจากการทำปฏิกริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อโรคและไบโอติกอิลิซิเตอร์ (abiotic elicitors) เช่น ไอออนของโลหะหนัก ได้แก่ คอปเปอร์ซัลเฟต เป็นต้น กระบวนการทางชีวเคมีที่ชักนำให้พืชเกิดการต้านทานต่อโรคได้ส่วนหนึ่งเกิดจากการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนหรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยผ่านระบบสำคัญที่เรียกว่า systemic acquired resistance (SAR)

ระบบ SAR เป็นระบบป้องกันตนเองของพืชที่สำคัญระบบหนึ่ง ซึ่งมีโมเลกุลส่งสัญญาณคือ กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA) และยังเกี่ยวข้องกับการสะสม PRs โดยเฉพาะโปรตีน PR-1 ระบบ SAR นี้สามารถชักนำให้เกิดการต้านทานโรคของพืชบางชนิดโดยไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่งและมีความต้านทานทั้งบริเวณที่ถูกบุกรุกโดยตรง (local resistance) และบริเวณที่ไกลออกไปที่ไม่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค (systemic resistance) ระบบ SAR สามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลาสั้น ส่งผลให้พืชนั้นมีความทนทานต่อเชื้อบุกรุกหลายๆ ชนิดได้ในระยะหนึ่ง (Van Loon *et al.*, 2006)

โปรตีน PR-1 มักถูกใช้เป็นเครื่องหมายบ่งบอกภาวะการเกิดระบบ SAR เนื่องจาก SA ที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR จะส่งสัญญาณกระตุ้นโปรตีน NPR1/NIM1 ที่ควบคุม transcription factor ของยีน *PR-1* แล้วเกิดการสร้างโปรตีน PR-1 เป็นจำนวนมาก (Gozzo, 2003, Van Loon and Van Strien, 1999) นอกจากนี้เมื่อพืชมีการผลิตโปรตีน PR-1 มากขึ้น การติดเชื้อโรคจะลดน้อยลง เช่น ในยาสูบที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรม (transgenic tobacco) ให้มีการแสดงออกของยีน *PR-1* ในระดับสูงจะมีความทนทานต่อการติดเชื้อใน Class Oomycete 2 ชนิด ได้แก่ *P. parasitica* และ *Peronospora tabacina* (Alexander *et al.*, 1993) และอีกการทดลองซึ่งนำยีน *PR-1* กลุ่ม basic จากพริกไทย (*Capsicum annuum*) ตัดแต่งพันธุกรรมให้มีการแสดงออกในต้นยาสูบ พบว่านอกจากจะทำให้ยาสูบทนทานต่อเชื้อโรคแล้วยังทนต่อการทดสอบด้วยโลหะหนัก (heavy metal) ได้แก่ $CdCl_2$ และ $HgCl_2$ อีกด้วย (Sarowar, 2005)

SA และโคโตซานเป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์ที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นสารที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษ และมีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าสามารถชักนำการต้านทานโรคได้ ซึ่งการให้ SA จากภายนอกเป็นการกระตุ้นการเกิดระบบ SAR นอกจากนี้จากการศึกษาของ Wong และคณะ (2002) ที่ศึกษาการใช้สารเคมีต่างๆ ได้แก่ potassium cyanide, antimycinA และ SA ชักนำความต้านทานต่อเชื้อไวรัส (*Turnip vein clearing virus*, TVCV) ใน *Arabidopsis*

thaliana พบว่าสารเคมีทั้งสามชนิดสามารถชักนำความต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้แต่เฉพาะ SA เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการเกิดระบบ SAR ได้ (ชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1*) Iriti และคณะ (2010) รายงานว่าการดูดซึมไคโตซานเข้าทางปากใบจะสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองในพืชได้โดยทำให้เกิดการสะสมแคลโลสเพิ่มขึ้นทำให้พืชที่ทดสอบมีความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น นอกจากนี้มีรายงานว่า 0.1 โมลาร์ ของสารละลายปุ๋ย NPK สามารถชักนำระบบ induced systemic resistance (ISR) ได้ ทำให้ข้าวโพดมีความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (northern leaf blight, NLB) (Reuveni *et al.*, 1996) ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นความต้านทานของปุ๋ย NPK ที่เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ในการทำสวนยางพาราเป็นปกติอยู่แล้วจึงมีความน่าสนใจ นอกจากนี้ Chirapongsatongkul (2008) พบว่า TTF5PTM ซึ่งได้จากส่วนผสมของ ปุ๋ย NPK กรดอะมิโน และสารสกัดจากสาหร่าย สามารถชักนำให้มีการสร้าง PRs หลายชนิด ได้แก่ โปรตีน *PR-1*, *PR-3* และ *PR-5* ในใบยางสูบ และเมื่อทำการทดลองภาคสนามพบว่าสามารถชักนำให้ยางสูบป้องกันตนเองจากการติดเชื้อได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการใช้ตัวกระตุ้นได้แก่ SA ไคโตซาน และปุ๋ย NPK เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้เพื่อชักนำการต้านทานโรคในต้นกล้ายางพาราต่อไป รวมทั้งเพื่อคัดเลือกตัวกระตุ้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษายีน *PR-1* ที่จะเป็นเครื่องหมายสำหรับบ่งบอกการเกิดระบบ SAR ในยางพารา ทั้งในแง่ของการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้แก่ ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* เบื้องต้นเมื่อผ่านการกระตุ้นโดยเชื้อก่อโรคของยางพารา (*P. palmivora*) การแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราช่วงอายุต่างๆ และการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *PR-1* และความสามารถในการต้านทานโรคของยางพาราแต่ละพันธุ์ ตลอดจนในแง่ของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *PR-1* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไปทั้งในด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับสิ่งมีชีวิตอื่นและการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปศึกษาในระดับโปรตีนต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 ยางพารา

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ เนื่องจากประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลกมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 โดยในภาคใต้มีพื้นที่ปลูกยางพารามากที่สุดประมาณ 10.96 ล้านไร่ (สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร, 2553) ดังนั้นการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยางพาราจึงเป็นประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก

ยางพารามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีลักษณะใบ ผล ช่อดอกและต้นกล้าดังรูปที่ 1.1 ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่มีอายุยืนยาวหลายสิบปี มีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณลุ่มน้ำอเมซอนประเทศบราซิลและประเทศเปรูในทวีปอเมริกาใต้ ยางพาราสามารถจัดลำดับทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Malpighiales

Family: Euphobiaceae

Genus: *Hevea*

Species: *Hevea brasiliensis*

Scientific name: *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

Common name: Para Rubber



รูปที่ 1.1 ลักษณะใบ ผล ช่อดอกและต้นกล้าของยางพารา (ที่มา: Nieto and Rodriguez, 2003)

ยางพาราเป็นพืชที่เจริญเติบโตเร็ว สามารถสูงได้ถึง 40 เมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นระดับอกถึง 35 เซนติเมตร มีลำต้นตั้งตรง เปลือกหนา ยางพาราเจริญเติบโตได้ดีที่สภาพภูมิอากาศร้อนชื้น ในดินร่วนที่มี pH อยู่ระหว่าง 4.0-6.5 และมีการระบายน้ำดี อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการปลูกยางพาราอยู่ระหว่าง 22-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% ปริมาณน้ำฝนประมาณ 1,500-3,000 มิลลิเมตรต่อปี (Nieto and Rodriguez, 2003)

1.1.1 โรคยางพาราที่พบในประเทศไทย

ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นที่เกษตรกรมักประสบปัญหาเรื่องโรคระบาดในระยะใดระยะหนึ่งของการทำสวนยางพารา ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตและพบได้ในทุกส่วนของยางพารา (สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร, 2553) โรคนยางพาราที่ระบาดในประเทศไทยส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา สามารถจำแนกได้ตามส่วนต่างๆ ของยางพาราที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายได้แก่ ใบ กิ่งก้าน ลำต้นและราก โดยเชื้อราดังกล่าวสามารถอาศัยอยู่ข้ามฤดูและปนอยู่กับซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรีย์วัตถุในดิน หรืออยู่บนพืชอาศัยบางชนิด

ตัวอย่างโรคที่เกิดในยางพารา

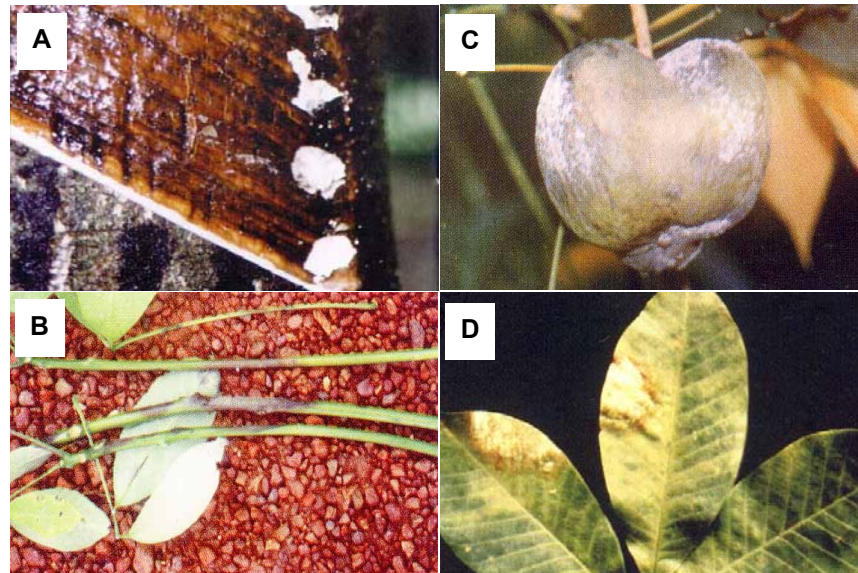
1) โรคใบจุดตานก (bird's eye spot) มักพบในแปลงกล้วยพาราที่ปลูกไว้เป็นต้นต่อ มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Drechslera heveae*

2) โรคราแป้ง (powdery mildew) ระบาดบนใบยางพาราอ่อนที่แตกออกมาใหม่ภายหลังจากการผลัดใบประจำปี จึงเป็นสาเหตุให้ใบยางพาราร่วงและกิ่งแขนงบางส่วนอาจแห้งตายไป โรคราแป้งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Oidium heveae*

3) โรคเส้นดำ (black stripe) เป็นโรคทางลำต้นที่มีความสำคัญมากโรคหนึ่ง เนื่องจากเชื้อจะเข้าทำลายหน้ากรีดยางพาราซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยวผลผลิตตั้งรูปที่ 1.2A จึงไม่สามารถกรีดยางพาราข้ามปีเปลือกที่งอกใหม่ ทำให้ระยะเวลาการให้ผลผลิตสั้นลงและได้น้ำยางพาราที่น้อยลงซึ่งโรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora*

4) โรคใบร่วงจากเชื้อ *Phytophthora* (*Phytophthora* leaf fall) มักระบาดในช่วงฤดูฝน เชื้อ *Phytophthora* จะเข้าทำลายส่วนต่างๆ ของต้นยางพาราทั้งใบ ฝัก กิ่งก้านและหน้ากรีดยางพารา ดังรูปที่ 1.2B, 1.2C และ 1.2D ฝักที่ถูกทำลายจะเน่าและเป็นสีดำค้างอยู่บนต้นยางพารา ไม่แตกและร่วงหล่นตามธรรมชาติกลายเป็นแหล่งพักของเชื้อที่สำคัญ โรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. botryosa*, *P. palmivora* และ *P. parasitica*

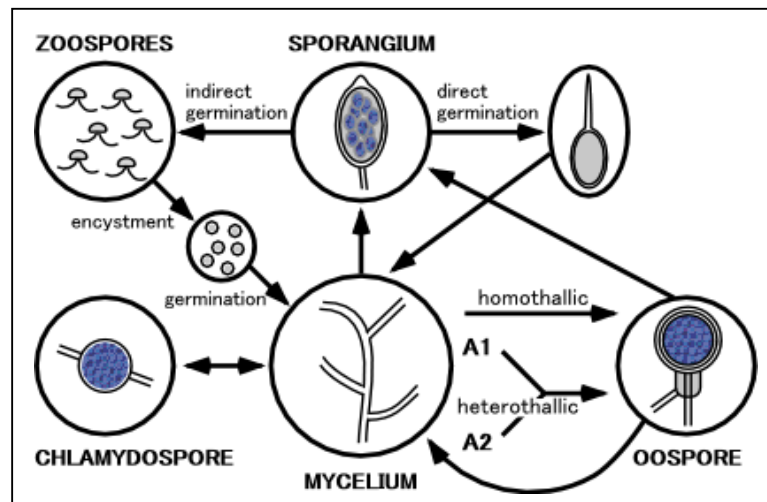
ความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นในยางพาราจะแตกต่างกันออกไป แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยางธรรมชาติ โรคใบร่วงและโรคเส้นดำเป็นโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่งซึ่งจะทำให้ผลผลิต (น้ำยาง) ของยางพาราลดน้อยลง รวมทั้งยังทำให้ต้นยางพารามีระยะเวลาที่ให้ผลผลิตสั้นลงเป็นเวลา 6-18 ปีอีกด้วย (สถาบันวิจัยยาง, 2550)



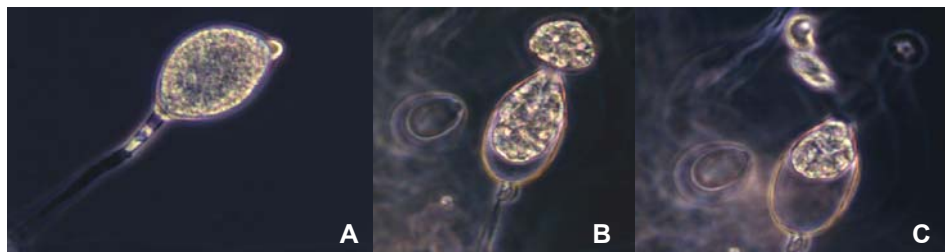
รูปที่ 1.2 โรคในยางพาราที่เกิดจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* A: โรคเส้นดำ B, C และ D: โรคก้านใบร่วง ผลร่วง และใบร่วงตามลำดับ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. palmivora*

1.2 เชื้อ *Phytophthora*

เชื้อ *Phytophthora* จัดอยู่ใน Class Oomycetes หรือกลุ่มรณาน้ำมีเส้นใยสีขาว ผงเซลล์ประกอบด้วย cellulose- β -glucans จึงจัดอยู่ใน Kingdom Chromista เชื้อ *Phytophthora* มีรูปร่างคล้ายรา สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศดังรูปที่ 1.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างโอโอสปอร์ (oospore) ที่เกิดจากการผสมของแอนเทอริเดียม (antheridium) และโอโอโกเนียม (oogonium) ซึ่งพบในท้องทดลองเท่านั้นและการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีการแตกกิ่งก้านสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophores) โดยมีซุโอสปอร์ (zoospores) เจริญอยู่ภายในดังรูปที่ 1.4 ส่วนที่เป็นสปอร์แรงจิโอฟอร์นั้นจะมีลักษณะบวมพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียมจะมีรูปร่าง ลักษณะ และขนาด แตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ซึ่งจะผลิตซุโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลลาจึงสามารถว่ายน้ำไปยัง host ได้



รูปที่ 1.3 วงจรชีวิตของเชื้อ *Phytophthora* (ที่มา: <http://www.en.wikipedia.org/phytophthora>)



รูปที่ 1.4 โครงสร้างสปอร์แรงเจียมของเชื้อ *P. palmivora* A: โครงสร้างสปอร์แรงเจียมของเชื้อ *P. palmivora* ที่มีชูโอสปอร์อัดแน่นอยู่ภายใน B และ C: สปอร์แรงเจียมที่กำลังปล่อยชูโอสปอร์ออกสู่ภายนอก (ที่มา: Botany laboratory, 2553)

เชื้อ *Phytophthora* เป็นเชื้อก่อโรคในพืชหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ (www.en.wikipedia.org/phytophthora) รวมถึงพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น สับปะรด มะละกอ ส้ม ยาสูบ ทุเรียน มะเขือเทศและยางพารา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบร่วง เส้นดำ ผลเน่า รากเน่า และโคนเน่า ที่ทำให้ผลผลิตของยางพาราลดลงนั่นเอง

เชื้อ *Phytophthora* สามารถทำให้เกิดโรคพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ในทางตรง สปอร์แรงเจียมที่อยู่ในพืชที่ติดเชื้ออยู่ก่อนหน้าสามารถเจริญเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยตรง ในทางอ้อม เชื้อ *Phytophthora* สามารถผลิตชูโอสปอร์ซึ่งว่ายไปกับน้ำแล้วเกาะติดอยู่บนพื้นผิวของพืชที่เปียกชื้นและรอที่จะเข้าสู่พืช เชื้อ *Phytophthora* มักระบาดในช่วงที่มีความชื้นสูงและฝนตกชุกโดยอาศัยน้ำพัดพาชูโอสปอร์ไปอย่างรวดเร็วและทำให้เกิดการติดเชื้อในพืชต่างๆ ผ่านทางน้ำหรือทางดินที่ชุ่มชื้น (ไพโรจน์, 2525) เชื้อจะเข้าสู่พืชโดยการงอกของชูโอสปอร์แล้วแทง

ผ่านผนังเซลล์ เช่น อาจผ่านทางคิวติเคิลและอพิเทอมิสโดยตรงหรือผ่านทางบาดแผลและช่องเปิดตามธรรมชาติ จากนั้นจะเข้าทำลายพืชโดยการงอกของ germ tube เพื่อขยายเป็นเส้นใยในต้นพืช เชื้อ *Phytophthora* จะใช้อาหารจากพืชเพื่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ จากนั้นจะเข้าทำลายที่ส่วนฝัก ก้าน ยอด และแผ่นใบโดยเฉพาะด้านล่างทางรูปใบ ทำให้ใบร่วงจากนั้นจะแพร่พันธุ์เป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว (ฐานข้อมูลยางพารา, 2551, ไพโรจน์, 2525)

เชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* เป็นสายพันธุ์ของเชื้อ *Phytophthora* ซึ่งพบในประเทศไทยว่าเป็นสาเหตุของโรคในยางพาราที่สามารถทำลายได้ทุกส่วนของยางพารา

1.3 กลไกการตอบสนองของพืชต่อเชื้อก่อโรค

พืชสามารถตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยมีกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคได้ 2 ทาง ได้แก่ กลไกการป้องกันตนเองทางโครงสร้างของพืช (structural defenses) และทางชีวเคมี (biochemical defenses) ดังนี้

1.3.1 ทางโครงสร้างของพืช (structural defenses)

เป็นลักษณะของสิ่งกีดขวางตามธรรมชาติ (physical barriers) ที่จะป้องกันไม่ให้เชื้อผ่านเข้าสู่พืชได้อย่างง่ายดาย เกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อ

โครงสร้างที่มีก่อนการติดเชื้อ ได้แก่ การมีแว็กซ์ที่เคลือบผิวของพืชไว้ ซึ่งจะป้องกันการเกาะติดของน้ำที่จะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อได้ การมีชั้นคิวติเคิลหนาจะช่วยให้พืชทนต่อการถูกเชื้อเจาะได้ นอกจากนี้ขนาด ตำแหน่งที่อยู่และรูปร่างของปากใบ มีความสำคัญต่อเชื้อที่สามารถทำให้พืชติดโรคผ่านทางปากใบ รวมทั้งความหนาของผนังเซลล์ที่จะป้องกันการงอกของสปอร์ของเชื้อราซึ่งเป็นเกราะป้องกันของพืชทางโครงสร้างอีกชั้นหนึ่ง

นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อ ซึ่งจะมีการผลิตขึ้นหลังจากพืชถูกกระตุ้นด้วยเชื้อโรค เนื่องจากเชื้อโรคหลายชนิดจะมีการปล่อยสารเคมีที่ไม่จำเพาะ (non-specific elicitors) เช่น การผลิตสารพิษต่างๆ สารพวกไกลโคโปรตีน รวมทั้งเอนไซม์ของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ protease เป็นต้น แล้วสารเคมีดังกล่าวนี้จะถูกพืชจดจำและทำให้มีการส่งสัญญาณเพื่อให้เกิดระบบการป้องกันตนเองขึ้น ตัวอย่างโครงสร้างที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อ ได้แก่ การมีผนังเซลล์หนาขึ้นจากการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการแพร่กระจายของเชื้อมากขึ้น รวมทั้งการสะสมแคลโลสบริเวณผนังเซลล์ชั้นในของพืช เชื้อโรคจึงไม่สามารถแทรกตัวเข้ามาภายในเซลล์ การสร้าง cork layers หรือเซลล์ที่เจริญเป็นชั้นๆ สามารถยับยั้งการบุกรุกของเชื้อและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้ การปริแตกของเนื้อเยื่อ (abscission regions) เพื่อป้องกันการกระจายเป็นวงกว้างของเชื้อ การสะสมยางเหนียว (gums) ทำให้เชื้อโรคบางชนิดหยุดการเจริญเติบโตและตายไปในที่สุด รวมทั้งการเกิด hypersensitive cell death ซึ่งเป็นการตอบสนองโดยการตายอย่างรวดเร็วของพืชบริเวณที่ติด

เชื้อทำให้เชื้อไม่สามารถแพร่กระจายไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ โดยจะสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาลอย่างชัดเจน

1.3.2 ทางชีวเคมี (biochemical defenses)

แม้ว่าพืชจะมีการป้องกันตัวเองทางโครงสร้างแล้วแต่เชื้อโรคต่างๆ ก็ยังสามารถรุกรานเข้าไปในพืชได้ อย่างไรก็ตามพืชยังมีการป้องกันทางชีวเคมีอีกทางหนึ่งนั่นคือการผลิตสารที่มีความเป็นพิษต่อเชื้อและยับยั้งไม่ให้เชื้อแพร่กระจายลุกลามในต้นพืชได้ การป้องกันทางชีวเคมีสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อเช่นเดียวกับการป้องกันทางโครงสร้าง (Agrios, 1997)

สารเคมีที่พืชผลิตขึ้นก่อนการติดเชื้อ เช่น ในมะเขือเทศและบีทรูทจะมีการผลิตสารหลังที่เป็นพิษต่อเชื้อโรค (fungitoxic exudates) ซึ่งจะสามารถยับยั้งการงอกของซุสสปอร์ของเชื้อโรคได้หรือในพืชบางชนิดจะมีการผลิต phytoanticipins ก่อนที่พืชจะมีการติดเชื้อ รวมทั้งยังผลิตสารประกอบฟีนอลิกต่างๆ ด้วย หรือในบางกรณีสารที่พืชหลั่งออกมาเป็นปกติอยู่แล้วก็อาจมีความเป็นพิษต่อเชื้อโรคได้เช่นเดียวกัน เช่น ไดอีน (dienes) เป็นสารประกอบที่คล้ายกรดไขมันชนิดหนึ่งจะมีการผลิตในปริมาณสูงในเซลล์ของใบและผลอ่อนแล้วทำให้ใบและผลอ่อนนั้นมีความต้านทานต่อเชื้อมากกว่าเซลล์ที่แก่กว่า (Agrios, 1997)

ส่วนสารเคมีที่พืชผลิตขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อ เช่น ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่เป็นพิษต่อเชื้อก่อโรค ในยางพารามีการศึกษากลไกการตอบสนองต่อเชื้อเป็นครั้งแรกโดย Tan และ Low (1975) โดยพบการเกิดสารเรืองแสงภายใต้แสง UV ในเนื้อเยื่อใบภายใต้การตอบสนองต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สารประกอบดังกล่าวยังถูกชักนำให้มีการผลิตขึ้นในยางพาราหลังจากติดเชื้อ *Microcyclus ulei* ด้วยและพบว่าสารเรืองแสงดังกล่าวคือ hydroxycoumarin ให้ชื่อว่า สคอพอลิติน (scopoletin) (Giesemann *et al.*, 1968) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินชนิดหนึ่ง พันธุ์วอร์รี่ (2547) บ่มแคลลัสยางพาราพันธุ์ GT1 (ค่อนข้างต้านทาน) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) ด้วยซุสสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* พบว่าซุสสปอร์สามารถกระตุ้นแคลลัสให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในพันธุ์ GT1 มากกว่าพันธุ์ RRIM600 โดยปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินแปรผันตรงกับระดับความต้านทานโรคของยางพารา นอกจากนี้ยังมีการเกิด hypersensitive cell death ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของกลไกป้องกันโรคที่สำคัญมากที่สุดแบบหนึ่งในทางชีวเคมีที่เกิด hypersensitive cell death จะมีการปล่อยสารพิษที่จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้เชื้อตายลงเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีการปล่อยสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ (antimicrobial substance) เช่น pathogenesis-related proteins (PRs) เพื่อป้องกันการแพร่ขยายเป็นวงกว้างของเชื้ออีกด้วย ในยางพาราเองก็มีการศึกษา PRs เช่น อรวรรณ (2551) พบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แล้วทำให้กิจกรรมของ protease inhibitors (PIs) ซึ่งเป็น PRs ชนิดหนึ่ง (PR-6) เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อนำ PI ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาศึกษาผลกระทบต่อเชื้อก่อโรค *P. palmivora* พบว่ามีผลยับยั้งการงอกของซุโอสปอร์ของเชื้อดังกล่าว

1.4 Pathogenesis-related proteins (PRs)

PRs คือกลุ่มของโปรตีนที่พืชผลิตขึ้นภายหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อโรคหรือภาวะเครียดต่างๆ (Antoniw *et al.*, 1980) เช่น การกดต้นจากสารเคมีและฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมทั้งการเกิดบาดแผลและการกระตุ้นจากอิลิซิเตอร์ต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายให้กับตนเอง ซึ่งเมื่อพืชผลิตโปรตีนชนิดนี้แล้วจะมีความเป็นพิษต่อเชื้อโรคที่มารุกราน การผลิต PRs ในพืชนั้นไม่ใช่เพียงแต่จะผลิตเพื่อป้องกันเชื้อโรคบริเวณที่ถูกรุกรานโดยตรงเท่านั้นแต่ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดระบบ systemic acquired resistance (SAR) อีกด้วย (Van Loon and Van Strien, 1999) ดังนั้นโปรตีนกลุ่มนี้จึงมีบทบาทสำคัญต่อพืชในการป้องกันตนเองจากเชื้อโรค รวมทั้งมีความสำคัญต่อการปรับตัวเพื่อการดำรงชีวิตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Edreva, 2005)

PRs มักถูกแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ ลำดับกรดอะมิโน ความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (serological relationship) รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆ ในปัจจุบันสามารถจัดแบ่ง PRs ออกเป็น 17 กลุ่ม และได้มีการระบุคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ หน้าที่และกิจกรรมของเอนไซม์ใน PRs แล้วหลายกลุ่ม เช่น PR-3 PR-4 PR-8 และ PR-11 มีสมบัติเป็นเอนไซม์โคติเนส PR-2 มีสมบัติเป็นเอนไซม์ β -1,3-กลูคาเนส และ PR-6 มีสมบัติเป็น PIs (Van Loon and Van Strien, 1999, Sels *et al.*, 2008) ดังตารางที่ 1.1 โดยมีหลักเกณฑ์ที่จะใช้ในการจัดกลุ่ม PRs กลุ่มใหม่ขึ้นดังนี้ (1) โปรตีนนั้นๆ จำเป็นต้องผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อพืชภายหลังจากการเหนี่ยวนำโดยเชื้อโรค ซึ่งในภาวะปกติพืชจะไม่มีการผลิตโปรตีนชนิดนี้ขึ้น (2) การชักนำการแสดงออกของโปรตีนนั้นๆ จะต้องเกิดขึ้นจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อก่อโรคอย่างน้อย 2 คู่ หรือในกรณีที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อก่อโรคเพียงคู่เดียวจะต้องมีการยืนยันผลการวิจัยจากห้องปฏิบัติการวิจัยที่แตกต่างกัน (Van Loon and Van Strien, 1999)

PRs ที่พืชสร้างขึ้นมักมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่มีผลโดยตรงต่อเชื้อเช่น เอนไซม์โคติเนส และ β -1,3-กลูคาเนส ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการย่อยสลายโคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์เชื้อราและ β -1,3-กลูแคน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังมี PRs บางกลุ่มที่ไม่ได้มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์แต่เมื่อพืชผลิตขึ้นแล้วทำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อมากขึ้น ได้แก่ โปรตีน PR-1 PRs พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ยาสูบ มะเขือเทศ ข้าวบาร์เลย์ แดงกวา ข้าวสาลี หัวผักกาด และ *Arabidopsis* เป็นต้น (Gozzo, 2003)

ตารางที่ 1.1 คุณสมบัติของ PRs แต่ละชนิด

| Family | Type member | Properties |
|--------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| PR-1 | Tobacco PR-1a | Unknown |
| PR-2 | Tobacco PR-2 | β -1,3-glucanase |
| PR-3 | Tobacco P, Q | Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII |
| PR-4 | Tobacco 'R' | Chitinase type I, II |
| PR-5 | Tobacco S | Thaumatococin-like |
| PR-6 | Tomato Inhibitor I | Proteinase-inhibitor |
| PR-7 | Tomato P ₆₉ | Endoproteinase |
| PR-8 | Cucumber chitinase | Chitinase type III |
| PR-9 | Tobacco "lignin-forming peroxidase" | Peroxidase |
| PR-10 | Parsley "PR1" | Ribonuclease-like |
| PR-11 | Tobacco "class V" chitinase | Chitinase, type I |
| PR-12 | Radish Rs-AFP3 | Defensin |
| PR-13 | Arabidopsis THI2.1 | Thionin |
| PR-14 | Barley LTP4 | Lipid-transfer protein |
| PR-15 | Barley OxOa (germin) | Oxalate oxidase |
| PR-16 | Barley OxOLP | Oxalate-oxidase-like |
| PR-17 | Tobacco PRp27 | Unknown |

ที่มา: Van Loon and Van Strien, 2006

1.5 PRs ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำความต้านทานในพืช

ก่อนหน้านี้อาศัยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง PRs และความต้านทานในพืชสามารถเข้าใจได้ยากแต่ปัจจุบันสามารถวิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น โดย Edreva (2005) ได้สรุปความสัมพันธ์ดังกล่าวไว้ดังนี้

- 1) ระหว่างที่พืชพันธุ์ต้านทานติดเชื้อโรคจะมีการสะสม PRs ในปริมาณมากกว่าพืชพันธุ์อ่อนแอหลายเท่า
- 2) ในพืชที่มีความต้านทานสูงอยู่แล้วในธรรมชาติ (พืชพันธุ์ต้านทาน) มักจะมีการแสดงออกของ PRs ในระดับสูง
- 3) ในพืชที่มีการตัดแต่งพันธุกรรม (transgenic plants) ให้มียีน PR แสดงออกมากเกินไป (overexpressing PR gene) จะมีความต้านทานต่อโรคเพิ่มขึ้นเช่นยาสูบที่มียีน *PR-1a* overexpressing จะทนต่อเชื้อ *Peronospora tabacina* และ *P. parasitica* var. *nicotianae*
- 4) การสะสม PRs ในพืชจะทำให้เกิดความต้านทานในพืชทั้งบริเวณที่ติดเชื้อ (local resistance) และบริเวณอื่นที่ไกลออกไป (systemical resistance) PRs จึงมักถูกใช้เป็นเครื่องหมาย

(marker) สำหรับการเกิดภาวะ systemic acquired resistance หรือ ภาวะ SAR และเรียกยีน PR (PR-genes) ที่เกี่ยวข้องกับระบบ SAR ว่า SAR-genes

1.6 Pathogenesis Related protein-1 (PR-1)

โปรตีน PR-1 เป็น PRs ชนิดแรกที่ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1970 ในใบยาสูบที่ติดเชื้อ Tobacco Mosaic virus (TMV) โปรตีน PR-1 เป็นโปรตีนที่ปรากฏในพืชทุกชนิดเท่าที่มีการศึกษามาและยังมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ PRs กลุ่มอื่นๆ โดยคิดเป็น 1-2% ของโปรตีนรวมทั้งหมดในใบพืช (Buchel and Linthorst, 1999) นอกจากนี้โปรตีน PR-1 ยังใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับบอกลถึงการเกิดภาวะ SAR ในพืชด้วย เนื่องจาก SA ที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR จะส่งสัญญาณกระตุ้นโปรตีน NPR1/NIM1 ที่ควบคุม transcription factor ของยีน PR-1 แล้วเกิดการสร้างโปรตีน PR-1 เป็นจำนวนมาก (Gozzo, 2003, Van Loon and Van Strien, 1999) ต่อมานักวิจัยได้ค้นพบโปรตีน PR-1 ตามมาอีกในพืชหลายชนิด ได้แก่ *Arabidopsis* (Uknes *et al.*, 1992) ข้าวบาร์เลย์ (Muradov *et al.*, 1993) มะเขือเทศ (Tornero *et al.*, 1994) ข้าวโพด (Morris *et al.*, 1998) ข้าวสาลี (Molina *et al.*, 1999) พริกไทย (Kim and Hwang, 2000) และข้าว (Agrawal *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2001) เป็นต้น และยังพบว่าโปรตีน PR-1 เป็นเครื่องหมายสำคัญที่จะบ่งบอกการตอบสนองของพืช เนื่องจากจะตรวจพบโปรตีน PR-1 ได้เมื่อพืชมีการต้านทานโรคมากขึ้น

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ของโปรตีน PR-1 ในแง่ของหน้าที่การทำงานในเซลล์และโมเลกุลเป้าหมายในการทำหน้าที่ว่าเป็นอย่างไร รวมถึงยังไม่สามารถหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PR-1 กับโปรตีนชนิดอื่นๆ ได้ ทราบแต่เพียงว่ามีการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน PR-1 เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากเมื่อพืชติดเชื้อ เกิดบาดแผลหรือได้รับการกดดันจากสิ่งแวดล้อม แสง UV รวมทั้งสารเคมีต่างๆ เช่น SA เป็นต้น (Buchel and Linthorst, 1999) จากการศึกษาของ Kim และ Hwang (2000) เกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ในพริกไทยหลังจากทดสอบด้วย SA และ DL- β -amino-n-butyric acid (BABA) โดยการฉีดพ่นลงบนต้นอ่อนพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ดังกล่าวในระดับสูงขึ้น

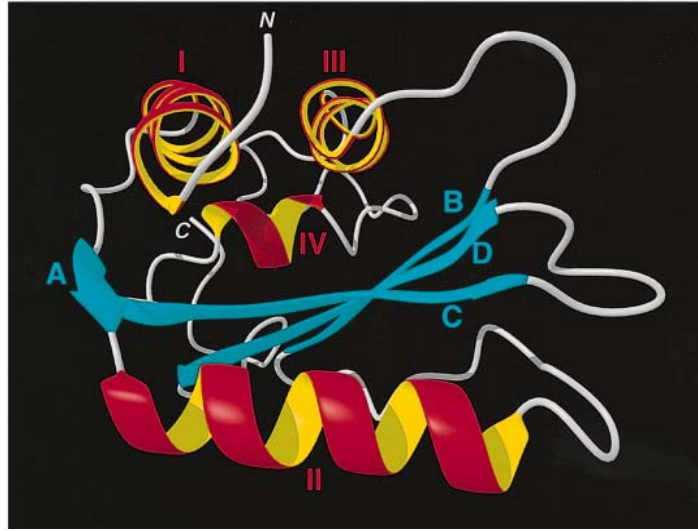
งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเมื่อพืชมีการผลิตโปรตีน PR-1 มากขึ้น จะทำให้พืชมีการติดเชื้อโรคลดน้อยลง เช่น ในยาสูบที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรม (transgenic tobacco) ให้มีการแสดงออกของยีน PR-1 ในระดับสูงจะมีความทนทานต่อการติดเชื้อใน Class Oomycete 2 ชนิด ได้แก่ *P. parasitica* และ *Peronospora tabacina* (Alexander *et al.*, 1993) และอีกการศึกษาทดลองที่ทำในยาสูบเช่นเดียวกันแต่เป็นการตัดแต่งพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน PR-1 กลุ่ม basic จากพริกไทย (*Capsicum annuum*) พบว่าทำให้ยาสูบทนทานต่อเชื้อโรคและยังทนต่อการทดสอบด้วยโลหะหนัก (heavy metal) ได้แก่ CdCl₂ และ HgCl₂ อีกด้วย (Sarowar, 2005) Hong และ Hwang (2002) ศึกษาการตอบสนองของโปรตีน PR-1 ในมะเขือเทศเมื่อมี

การกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. capsici* และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Western blot พบการแสดงออกของโปรตีน PR-1 (น้ำหนักโมเลกุล 17 กิโลดาลตัน) ในปริมาณสูงหลังจากการติดเชื้อไปแล้ว 12-24 ชั่วโมง Niderman และคณะ (1995) พบว่าโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic จากมะเขือเทศที่ทำบริสุทธิ์แล้ว สามารถยับยั้งการงอกของซุสเปอร์ของเชื้อ *P. infestans* ได้ (*in vitro*) และยังสามารถทำให้การติดเชื้อในใบมะเขือเทศ (*in vivo*) ลดลงอีกด้วย

จากเหตุผลที่ว่าปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของโปรตีน PR-1 ดังนั้นการศึกษาโปรตีนนี้จึงมักอาศัยความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยาของโปรตีน PR-1 จึงทำให้สามารถค้นหาโปรตีนชนิดนี้โดยการใช้ PR-1 antiserum จากยาสูบ เช่น การศึกษาของ White และคณะ (1987) ใช้ PR-1a antiserum ในการหาโปรตีน PR-1 จากข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ มะเขือเทศ มันฝรั่ง บานไม่รู้โรย มันฝรั่ง (*Solanum demissum*) และ goosefoot (*Chenopodium amaranticolor*) นอกจากนี้การสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PR-1 ผ่านทางฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อศึกษาย้อนกลับไปยังโปรตีนก็ยังสามารถทำได้ด้วย เนื่องจากกลุ่มยีน PR-1 นี้มีบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูง (conserved regions) และปรากฏยีนนี้ในพืชทุกชนิดเท่าที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้รวมทั้งยังพบโปรตีน homologous PR-1 ได้ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ด้วย เช่น ยีสต์ แมลงและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Van Loon *et al.*, 2006) Sarowar (2005) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จากพืชของแดนชนิดหนึ่งแล้วมีความคล้ายคลึงกับยีน PR-1a ในยาสูบ

งานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Fernández และคณะ (1997) ได้วิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน PR-1 จากโปรตีน PR-1b ของมะเขือเทศ โดยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) ปรากฏโครงสร้างของโปรตีนที่มีลักษณะจำเพาะซึ่งประกอบด้วย 4 α -helixes และ 4 β -strands ซึ่งเป็นบริเวณที่มี conserved cysteine จำนวน 6 residues เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโปรตีน PR-1 จากพืชหลายๆ ชนิด และยังมีบริเวณที่มีความอนุรักษ์ระหว่างโปรตีน PR-1 ในพืชและโปรตีน homologous PR-1 ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วย ได้แก่บริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น CGHYTQVW[R/K]X[S/T][V/T][R/S]XGC (Van Loon and Van Strien, 1999) แสดงให้เห็นว่าบริเวณนี้มีความสำคัญเป็นอย่างมากจึงถูกเลือกให้คงอยู่ในสายวิวัฒนาการ

โครงสร้าง 4 α -helixes และ 4 β -strands ที่กล่าวมามีการจัดเรียงแบบ antiparallel ระหว่างเกลียวของ α -helix ส่วนที่เป็น α -helix นี้จะอัดตัวแน่นอยู่ที่ 2 ด้านของ β -strand เป็นโครงรูป α - β - α sandwich ทำให้มองเห็นเป็นโครงรูปที่อัดแน่น มีลักษณะเป็น 2 โมเลกุล ที่มีแกนตรงกลาง โครงรูปนี้เสถียรได้ด้วยพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) และพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก ดังรูปที่ 1.5 โครงรูปของโปรตีน PR-1 ที่ประกอบกันแน่นดังกล่าวจึงน่าจะทำให้ทำให้โปรตีนชนิดนี้มีความเสถียรสูงและมีความสามารถในการทนต่อการย่อยของเอนไซม์ proteases ได้



รูปที่ 1.5 โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน PR-1b ในมะเขือเทศ ประกอบไปด้วย 4 α -helixes (I-IV แถบสีแดงและแถบสีเหลือง) และ 4 β -strands (A-D แถบสีฟ้า) และโพลีเพปไทด์สายอื่นๆ แสดงเป็นแถบสีเทา (ที่มา: Fernández *et al.*, 1997)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการแยกยีน *PR-1* จำนวน 16 ยีน ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. *Samsun NN*) ที่ติดเชื้อ TMV ซึ่งผลิตโปรตีน PR-1 ได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่ม acidic และ basic โดยมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1.2 และมีการดะมีโนที่เป็นองค์ประกอบดังตารางที่ 1.3

1) โปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic

ได้มีการตรวจสอบคุณลักษณะของโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic เป็นครั้งแรกในใบยาสูบ พบว่าประกอบด้วยโปรตีน PR-1a, PR-1b และ PR-1c แบ่งเป็นกลุ่ม a b และ c ดังกล่าวได้ตามการเคลื่อนที่ของประจุในสนามไฟฟ้า โปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15-17 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กันในทางซีรั่มวิทยาของโปรตีน PR-1 ระหว่างพืชแต่ละชนิด เมื่อพิจารณาเฉพาะโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic ของใบยาสูบแล้ว พบว่าทั้ง 3 ชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนมากกว่า 90% โปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic มี open reading frame 168 กรดอะมิโน ประกอบไปด้วย signal peptide 30 กรดอะมิโน และ coding sequences 138 กรดอะมิโน ซึ่งเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ Southern blot แล้วพบว่าประกอบด้วยยีนอย่างน้อย 8 ยีน ที่ถูกถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic

สามารถตรวจพบโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic ได้บริเวณ extracellular space และ xylem ของต้นยาสูบที่ติดเชื้อ TMV และจะมีการสะสมโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic นี้ไว้ใน vacuole

(crystal idioblast) ของใบยาสูบเพิ่มขึ้นถึง 10,000 เท่า หรือคิดเป็น 1-2% ของโปรตีนที่ผลิตขึ้นทั้งหมดภายในใบ (Buchel and Linthorst, 1999)

Rauscher และคณะ (1999) รายงานว่าหลังจากทำบริสุทธิ์โปรตีน PR-1a จากถั่วลิสงเตา แล้วทดสอบกับเชื้อ *Uromyces fabae* (เชื้อก่อโรคใบสนิม) พบว่ามีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ (inhibition of fungal differentiation)

2) โปรตีน PR-1 กลุ่ม basic

โปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ถูกค้นพบจากการทำ cross hybridizations กับโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic (Cornelissen, 1987) จนสามารถตรวจจับโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ซึ่งมีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 10.7 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic มี open reading frame 177 กรดอะมิโน ประกอบด้วย N-terminal ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) 30 กรดอะมิโน ซึ่งจะทำหน้าที่ในการเป็น signal peptide เพื่อนำโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ผ่าน endoplasmic reticulum และด้าน C-terminal ประกอบด้วย 18 กรดอะมิโน ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ แต่ น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการระบุเซลล์เป้าหมายที่จะไปทำหน้าที่และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 ของใบยาสูบกลุ่ม basic พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic 67%

Van Loon และ Van Strien (1999) ได้รายงานว่ามีโปรตีน P14 ที่สกัดจากมะเขือเทศมีคุณสมบัติเหมือนกับโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ที่สกัดได้จากยาสูบ (ตารางที่ 1.2) และยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งการทดลองแบบ *in vitro* โดยยับยั้งการงอกของซุสเปอร์และการเจริญของ mycelium ของเชื้อ *P. infestans* และแบบ *in vivo* โดยสามารถลดการติดเชื้อบริเวณใบของมะเขือเทศได้ นอกจากนี้ Niderman และคณะ (1995) พบว่ามี isoform ของโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic อื่นๆ อีกหลายชนิดที่มีสมบัติในการต้านเชื้อราอีกด้วย

ตารางที่ 1.2 คุณสมบัติของโปรตีน PR-1 ชนิดต่างๆ ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*; Nt) และ มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Baby, Le)

| Member | Molecular weight (kDA) | Isoelectric point | Percentage homology at protein level | Serogroup |
|--------|------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------|
| Nt.a | 15 | 4.0 | 100 | I |
| Nt.b | 15 | 4.4 | 94 | II |
| Nt.c | 15 | 4.5 | 91 | III |
| Nt.d | 15 | | | |
| Ns.e | 15 | | | I |
| Ng.f | 14 | | | II |
| Nt.g | 17 | 10.7 | 67 | IV |
| Nl.h | 15 | | | |
| Le.a | 14 | 10.7 | 60 | IV |
| Le.b | 14 | 10.9 | | IV |
| Le.c | 14 | | | IV |

ที่มา: Van Loon and Van Strien, 1999

ตารางที่ 1.3 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน PR-1 ชนิดต่างๆ ได้แก่ โปรตีน PR-1a PR-1b กลุ่ม acidic และ โปรตีน PR-1G กลุ่ม basic ของยาสูบ และโปรตีน PR-1 (p14) กลุ่ม basic ของมะเขือเทศ

| | 1a | 1b | G | p14 |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| Ala (A) | 15 | 14 | 16 | 14 |
| Val (V) | 14 | 16 | 11 | 9 |
| Leu (L) | 5 | 5 | 8 | 6 |
| Ile (I) | 0 | 1 | 5 | 3 |
| Pro (P) | 4 | 4 | 11 | 5 |
| Phe (F) | 1 | 1 | 5 | 2 |
| Trp (W) | 3 | 3 | 6 | 5 |
| Tyr (Y) | 11 | 10 | 9 | 7 |
| Met (M) | 2 | 2 | 6 | 1 |
| Gly (G) | 12 | 13 | 14 | 16 |
| Ser (S) | 8 | 8 | 9 | 8 |
| Thr (T) | 5 | 5 | 5 | 3 |
| Cys (C) | 6 | 6 | 7 | 6 |
| Asn (N) | 11 | 12 | 21 | 13 |
| Gln (Q) | 12 | 12 | 12 | 8 |
| Asp (D) | 11 | 10 | 6 | 6 |
| Glu (E) | 6 | 4 | 2 | 2 |
| Lys (K) | 2 | 3 | 4 | 3 |
| Arg (R) | 5 | 4 | 12 | 10 |
| His (H) | 5 | 5 | 4 | 3 |
| | 138 | 138 | 173 | 130 |

ที่มา: Cornelissen, 1987

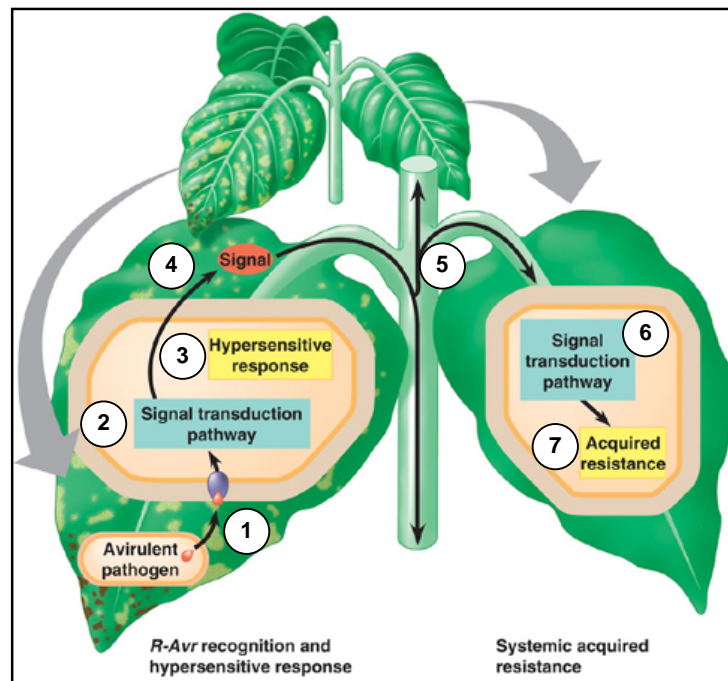
ระดับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ นับว่าอยู่ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับระดับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 10^3 - 10^4 เท่าภายหลังจากการกระตุ้นโดย TMV และอาจเพิ่มมากขึ้นถึง 10% ของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในใบยาสูบ (Hooft Van Huijsdijnen *et al.*, 1986) จนอาจกล่าวได้ว่าโปรตีน PR-1 เป็น PRs กลุ่มที่เพิ่มมากที่สุดหลังจากการติดเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 เพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคนั้นจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ซึ่งสันนิษฐานได้ว่ากระบวนการสังเคราะห์หรือการขนส่งโมเลกุลที่เป็นตัวส่งสัญญาณเพื่อให้ผลิตโปรตีน PR-1 เป็นกระบวนการที่ช้าโดยสามารถตรวจพบโปรตีน PR-1 ได้ 2-8 วัน หลังจากติดเชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถพบโปรตีน PR-1 ได้ทั้งบริเวณที่ติดเชื้อ บริเวณข้างเคียงรวมทั้งบริเวณที่ห่างไกลออกไปด้วย

มีงานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ทั้งในระดับโปรตีนและระดับยีนอย่างกว้างขวาง นับตั้งแต่มีการค้นพบโปรตีน PR-1 ในยาสูบ ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วว่าจะมีการผลิตโปรตีนชนิดนี้มากเมื่อพืชมีการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้นจากสารต่างๆ นักวิจัยจึงสนใจที่จะชักนำให้พืชมีการผลิตโปรตีน PR-1 ในระดับสูงโดยการกระตุ้นพืชด้วยสารกระตุ้นต่างๆ เพื่อให้พืชเกิดภาวะ SAR จนสามารถต้านทานต่อเชื้อได้ ยกตัวอย่างจากการศึกษาของ Rauscher และคณะ (1999) ซึ่งใช้ SA และ 2,6-dichloro-isonicotinic acid (INA) ในการยับยั้งโรคใบสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *U. fabae* ในถั่วลิ้นเต่า พบว่าสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดนี้ช่วยลดการติดเชื้อลงได้ โดยการลดความหนาแน่นของตุ่ม (pustule) ที่เกิดจากโรคใบสนิมได้และพบว่าความต้านทานที่ถูกกระตุ้นโดย SA และ INA เป็นไปในทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีน PR-1a นอกจากนี้ยังมีการใช้ benzothiadiazole (BTH) ซึ่งเป็น analog กับ SA ในการเป็นสารกระตุ้นให้พืชเกิดภาวะ SAR ได้แก่ การศึกษาของ Kohler (2002) ซึ่งใช้ BTH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ฉีดพ่น *Arabidopsis* หลังจากนั้น 3 วัน จึงฉีดพ่นด้วยเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่าการแสดงออกของยีน PR-1 ในระดับสูงในขณะที่มีการติดเชื้อดังกล่าวลดลง

นอกจากนี้พบว่าการสะสมโปรตีน PR-1 ในปริมาณที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันของพืชด้วย จากการศึกษาของ Kim และ Hwang (2000) ซึ่งศึกษาโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ในพริกไทย พบว่าการแสดงออกของโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic มากที่สุดในใบที่ผ่านการทดสอบด้วย SA และ methyl jasmonate (MeJA) แต่ในเนื้อเยื่อชุดควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบใดๆ กลับพบว่าการแสดงออกสูงที่สุดในเนื้อเยื่อรากและดอก โดยไม่พบการแสดงออกเลยในส่วนใบ ลำต้นและผลสุก ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความต้องการการปกป้องจากเชื้อโรคที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

1.7 Systemic Acquired Resistance (SAR)

SAR คือระบบป้องกันตนเองที่สามารถชักนำให้เกิดการต้านทานโรคของพืชโดยไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่งและมีความต้านทานทั้งบริเวณที่ถูกบุกรุกโดยตรงและบริเวณที่ไกลออกไปที่ไม่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค (Hopkins and Hüner, 2004) ระบบ SAR จะเกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ ภายหลังจากการติดเชื้อโรคแต่จะสามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลาานส่งผลให้พืชนั้นมีความทนทานต่อเชื้อบุกรุกหลายๆ ชนิดในเวลาต่อมาได้ โดยพืชที่มี SAR จะสามารถต้านทานต่อเชื้อบุกรุกครั้งต่อไป ซึ่งอาจเป็นเชื้อชนิดเดิมหรือเป็นเชื้อที่แตกต่างจากเดิมก็ได้ ระบบ SAR มีโมเลกุลส่งสัญญาณคือ SA และเกี่ยวข้องกับสารประกอบ PRs โดยเฉพาะโปรตีน PR-1 ดังรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 กลไกของระบบการป้องกันตนเองของพืชแบบ SAR เมื่อพืชถูกรุกรานโดยเชื้อก่อโรค (1) จะมีการส่งสัญญาณไปยังระบบการป้องกันตนเองของพืช (2) และเกิด hypersensitive response เพื่อยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ (3) จากนั้นจะมีการกระตุ้นระบบการป้องกันตัวเองต่างๆ เช่น มีการผลิตโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ (4, 5 และ 6) เพื่อให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อที่จะมารุกรานในครั้งต่อไปได้ (7) (ที่มา: http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09_14.html)

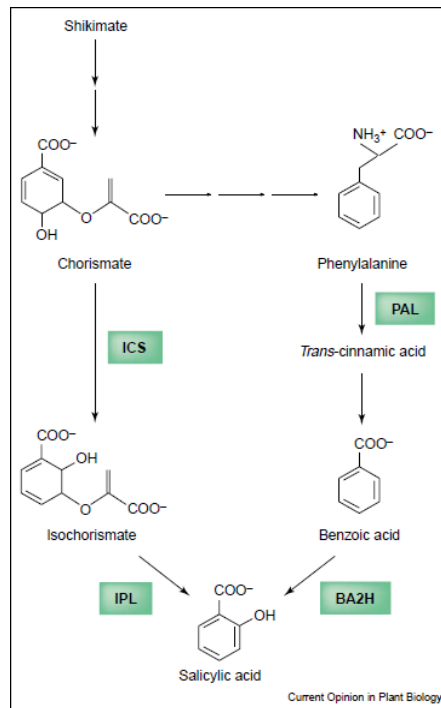
1.8 อิลิซิเตอร์ (elicitors)

อิลิซิเตอร์ คือสารซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองในพืช ได้แก่ การสะสมไฟโตอิเล็กซิน การสังเคราะห์ PRs และการตายของเซลล์ (necrosis) เป็นต้น อิลิซิเตอร์จะกระตุ้นวิถีต่างๆ ของระบบป้องกันตนเองในพืชให้มีการส่งสัญญาณต่อไปทำให้พืชมีความต้านทานเพิ่มขึ้น (Mejía-Teniente *et al.*, 2010)

อิลิซิเตอร์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือไบโอติกอิลิซิเตอร์ (biotic elicitors) ได้แก่สารที่มาจากเชื้อโรคหรือมาจากการทำปฏิกริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อก่อโรค เช่น อิลิซิตินของเชื้อ *P. palmivora* ซึ่งสามารถกระตุ้นแคลลัสของยางพาราให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิทินและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ (Chirapongsatunkul *et al.*, 2008) และอไบโอติกอิลิซิเตอร์ (abiotic elicitors) ได้แก่ แสง UV และ ไอออนของโลหะหนัก เช่น คอปเปอร์ซัลเฟต

1.8.1 กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA)

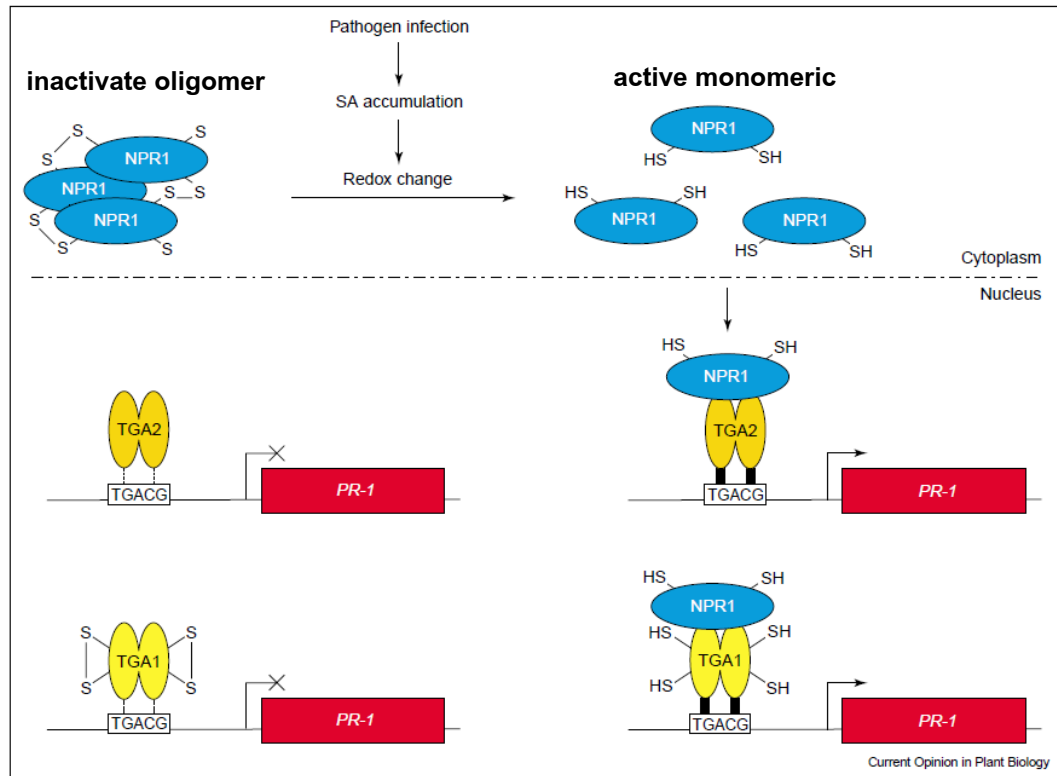
SA เป็นสารประกอบพวก aromatic ที่มีหมู่ hydroxyl SA ในพืชสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโน phenylalanine โดยเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) นอกจากนี้พืชสามารถสังเคราะห์ SA โดยใช้สารตั้งต้นคือ chorismate โดยเอนไซม์ isochorismate synthase (ICS) และ isochorismate pyruvate lyase (IPL) ดังรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 วิธีการสังเคราะห์ SA ในพืช (ที่มา: Shah, 2003)

SA เป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง การหายใจ การขนส่งและการนำเอาไอออนต่างๆ ไปใช้ในพืช รวมทั้งยังมีบทบาทเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้พืชเกิดกระบวนการป้องกันตนเองในพืช และเป็นโมเลกุลที่ชักนำให้พืชผลิต PRs ดังนั้น SA จึงมีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคของพืชหลายชนิดทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวสาลี พักทอง ยาสูบ มะเขือเทศ และ *Arabidopsis*

การเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณของ SA ในระบบ SAR มี 2 กระบวนการ กระบวนการแรกควบคุมโดย non-expressor of pathogenesis-related 1 (NPR1) ส่วนกระบวนการที่ 2 เป็นกระบวนการที่ไม่ขึ้นกับ NPR1 NPR1 เป็นโปรตีนที่ควบคุมการเกิด SAR ซึ่งมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยพบว่าเมื่อพืชเกิดระบบ SAR แล้ว NPR1 จะถูกขนส่งไปยังนิวเคลียสและควบคุมการแสดงออกของยีน *PR-1* ผ่านทาง TGA transcription factors (TGAs) สามารถอธิบายความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 1.8 ในสภาวะปกติ NPR1 จะอยู่ใน cytoplasm ในรูป oxidized NPR1 (inactive oligomer) และ TGAs ไม่ทำงาน แต่เมื่อถูกกระตุ้นโดยเชื้อแล้วจะมีการสะสม SA มากภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิด reducing environment ทำให้ NPR1 ถูก reduced ไปเป็นโมเลกุลที่ active (active monomeric) ซึ่งจะถูกขนส่งไปยังนิวเคลียสแล้วสามารถจับกับ TGAs ทำให้ TGAs เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformation change) จากเดิมที่เกาะกับ promoter (TGACG) ในรูป *trans*-TGAs ไปเป็น *cis*-TGAs การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนี้ทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* (Pieterse and Van Loon, 2004)



รูปที่ 1.8 บทบาทของ SA ในการเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR ที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* ผ่านทางโปรตีน NPR-1 และ TGA transcription factors (ที่มา: Pieterse and Van Loon, 2004)

จากการศึกษาระบบป้องกันตนเองของยาสูบต่อเชื้อ TMV พบว่าหลังจากยาสูบติดเชื้อ TMV แล้ว จะมีการสะสม SA ในระดับสูงในบริเวณที่ติดเชื้อ หลังจากนั้นทั้งเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อจะผลิต PRs แล้วทำให้ยาสูบมีการต้านทานต่อเชื้อ TMV มากขึ้น ความเข้าใจเกี่ยวกับ SA ในการชักนำการต้านทานในพืชมีมากขึ้น จากการศึกษาที่พบว่า *Arabidopsis* จะอ่อนแอลงเมื่อกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ลดลง ซึ่งเอนไซม์ PAL ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสังเคราะห์ SA โดยความต้านทานของ *Arabidopsis* จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อใส่ SA จากภายนอกให้แก่พืช (Mauch-Mani and Slusarenko, 1996) และจากการศึกษาในพืชที่มีการตัดแต่งพันธุกรรม (transgenic plants) ที่ทำให้มีการแสดงออกของยีน *nahG* หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ salicylate hydroxylase ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน SA ไปเป็น catechol ทำให้เซลล์พืชดังกล่าวมี SA ลดลงซึ่งส่งผลให้พืชมีความอ่อนแอต่อเชื้อมากขึ้นและยังไม่สามารถเกิด SAR ได้ การศึกษาข้างต้นทั้งหมดแสดงให้เห็นความสำคัญของการเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณของ SA

SA มีบทบาทในการชักนำการต้านทานโรคของพืชโดยจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ที่จะทำหน้าที่สลาย H_2O_2 ดังนั้น SA จะทำให้พืชมีการสะสม H_2O_2 ที่จะไปกระตุ้นระบบต่างๆ ได้แก่ กระบวนการหายใจ การสังเคราะห์แสง และการเกิด hypersensitive cell death นอกจากนี้ H_2O_2 ยังทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณตัวที่ 2 (secondary messenger) ที่จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน PRs ต่อไปได้ (Durner *et al.*, 1997)

นอกจากนี้การให้ SA จากภายนอกยังเป็นการกระตุ้นการเกิดระบบ SAR จากการศึกษารายงานของ Wong และคณะ (2002) ซึ่งศึกษาการใช้สารเคมีต่างๆ ได้แก่ potassium cyanide, antimycinA และ SA ในการชักนำความต้านทานต่อเชื้อไวรัส (*Turnip vein-clearing virus*, TVCV) ใน *Arabidopsis thaliana* พบว่าสารเคมีทั้งสามชนิดสามารถชักนำความต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้ แต่มีเฉพาะ SA เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการเกิดระบบ SAR ได้ (ชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้) และจากการทดลองในยาสูบโดยการฉีดพ่น SA ลงบนต้นอ่อนของยาสูบ พบว่ายีน *PR-1* มีการแสดงออกสูงที่สุดหลังจากฉีดพ่นเป็นเวลา 1 วัน และเมื่อฉีดพ่นเชื้อ TMV ตามลงไป พบว่า SA สามารถชักนำความต้านทานของยาสูบภายในเวลา 2 วัน โดยพบว่าการติดเชือลดลงและมีการแสดงออกของยีน *PR-1* ในระดับสูง (Ward, 1991)

1.8.2 ปุ๋ย

ปุ๋ย หมายถึง สารเคมีหรือสิ่งที่เราใส่ลงไปในดินเพื่อให้ธาตุอาหารต่างๆ แก่พืช โดยเฉพาะไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) ที่พืชยังขาดอยู่ ทั้งนี้เพื่อให้พืชได้รับธาตุอาหารอย่างเพียงพอจนพืชสามารถเจริญเติบโตงอกงามดีและให้ผลิตผลสูงขึ้น โดยทั่วไปปุ๋ยแบ่งออกเป็นสองประเภทคือ ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยเคมีหรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์

1) ปุ๋ยอินทรีย์ ได้แก่ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสด วัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมบางชนิดซึ่งเป็นพวกอินทรีย์สาร

ตัวอย่างปุ๋ยคอกเช่น มูลหมู มูลเป็ด มูลไก่ ซึ่งเป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวาง ปุ๋ยคอกช่วยปรับปรุงดินให้โปร่งและร่วนซุย ทำให้การเตรียมดินง่าย ต้นกล้าจะตั้งตัวได้เร็วและมีโอกาสรอดสูง ปุ๋ยคอกมีปริมาณธาตุอาหารค่อนข้างต่ำ มี N ประมาณ 0.5% P 0.25% และ K 0.5% ส่วนปุ๋ยหมักได้จากการหมักเศษพืช เช่น หญ้าแห้ง ใบไม้ ฟางข้าว ฯลฯ ให้เน่าเปื่อย ก่อนนำไปใส่ในดินเป็นปุ๋ย

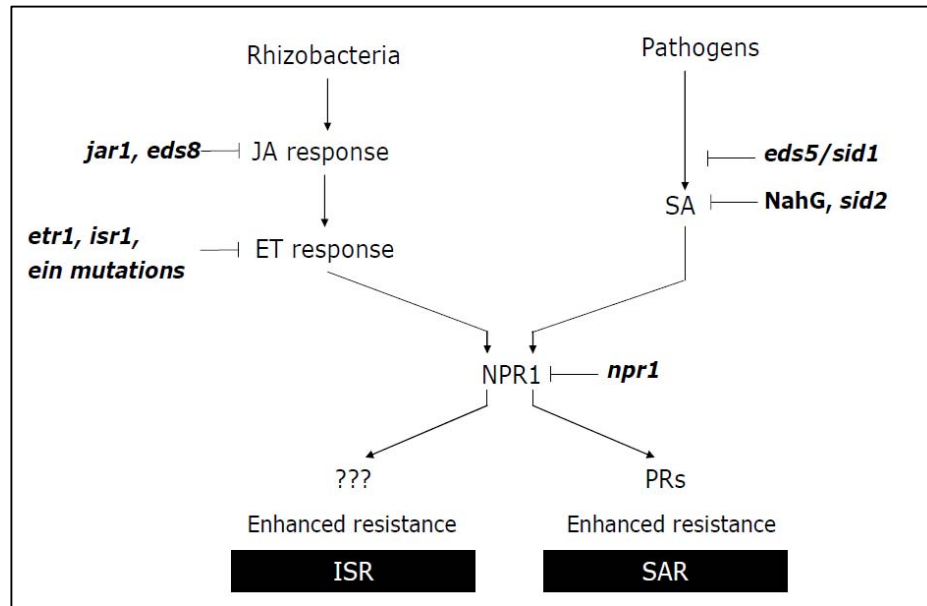
2) ปุ๋ยเคมี เป็นปุ๋ยที่ได้จากการผลิตหรือสังเคราะห์ทางอุตสาหกรรมจากแร่ธาตุต่างๆ ที่ได้ตามธรรมชาติหรือเป็นผลพลอยได้ของโรงงานอุตสาหกรรมบางชนิด ปุ๋ยเคมีมี 2 ประเภท คือ แม่ปุ๋ยหรือปุ๋ยเดี่ยวและปุ๋ยผสม

ปุ๋ยเดี่ยวหรือแม่ปุ๋ย เป็นสารประกอบทางเคมี มีธาตุอาหารปุ๋ยคือ N หรือ P หรือ K เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยหนึ่งหรือสองธาตุ แล้วแต่ชนิดของสารประกอบที่เป็นแม่ปุ๋ยนั้นๆ และจะมี

ปริมาณของธาตุอาหารปุ๋ยที่คงที่ เช่น ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต มี N 20% ส่วนปุ๋ยโพแทสเซียมไนเตรดมี 2 ธาตุ คือ N 13% และ K 46% อยู่รวมกัน

ปุ๋ยผสม เป็นปุ๋ยที่เกิดจากการนำเอาปุ๋ยเดี่ยวหลายๆ ชนิดมาผสมรวมกัน เพื่อให้ปุ๋ยที่ได้มีปริมาณและสัดส่วนของธาตุอาหาร N P และ K ตามที่ต้องการ ซึ่งสูตรและเกรดปุ๋ยจะมีความเหมาะสมกับชนิดพืชและดินปลูกที่แตกต่างกัน ปุ๋ยผสมนี้มีขายในท้องตลาดทั่วไป ปัจจุบันเทคโนโลยีในการทำปุ๋ยผสมได้พัฒนาไปไกล สามารถผลิตปุ๋ยผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ มีการบดเป็นเม็ดขนาดสม่ำเสมอสะดวกในการใส่ลงไปในไรนา ปุ๋ยนี้เก็บไว้เป็นเวลานานก็จะไม่จับกันเป็นก้อนจึงสะดวกแก่การใช้งาน ส่วนการนำแม่ปุ๋ยมาผสมกันเพื่อให้ได้สูตรตามที่ต้องการหรือบดจนละเอียดเข้ากันดีเรียกว่าปุ๋ยผสมเช่นกัน (<http://www.school.net.th/library/snet6/envi2/subsoil/puy.htm>)

นอกจากเกษตรกรจะใช้ประโยชน์จากปุ๋ยในการบำรุงดินและพืชแล้ว ยังมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาผลของปุ๋ยสูตร N-P-K ซึ่งใช้กันอยู่ในปัจจุบันว่ามีคุณสมบัติในการชักนำระบบป้องกันตัวเองของพืชได้ด้วย Reuveni และคณะ (1996) รายงานว่าการฉีดพ่นปุ๋ยฟอสเฟต (K_2HPO_4 (pH 9.4), KH_2PO_4 (pH 4.5), KH_2PO_4 (pH 9.1) ปรับ pH ด้วย KOH) และ Na_4PO_7 (pH 9.4)) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สามารถชักนำต้นอ่อนข้าวโพดให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันแบบ induced systemic resistance (ISR) ได้ ซึ่งทำให้ต้นอ่อนข้าวโพดต้านทานต่อเชื้อ *Exserohilum turcicum* และ *Puccinia sorghi* ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ (northern leaf blight, NLB) ซึ่งระบบ ISR นี้เป็นระบบป้องกันตนเองของพืชอีกแบบหนึ่งซึ่งชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรคโดยเชื้ออื่นที่ไม่ใช่เชื้อก่อโรคของพืชนั้นๆ เช่นมี plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) เป็นตัวชักนำและมีโมเลกุลส่งสัญญาณเป็นกรดจัสโมนิก (jasmonic acid, JA) และเอทิลีน (ethylene, ET) (Verhagen *et al.*, 2006) ซึ่งจะแตกต่างกับระบบ SAR อยู่ 2 ประการ ได้แก่ ประการแรกคือตัวกระตุ้นที่เกิดระบบดังกล่าวและประการที่ 2 คือ โมเลกุลส่งสัญญาณภายในระบบ (รูปที่ 1.9)



รูปที่ 1.9 เปรียบเทียบกลไกของระบบการป้องกันตนเองของพืช 2 ระบบ ได้แก่ ระบบ ISR และระบบ SAR (ที่มา: Verhagen *et al.*, 2006)

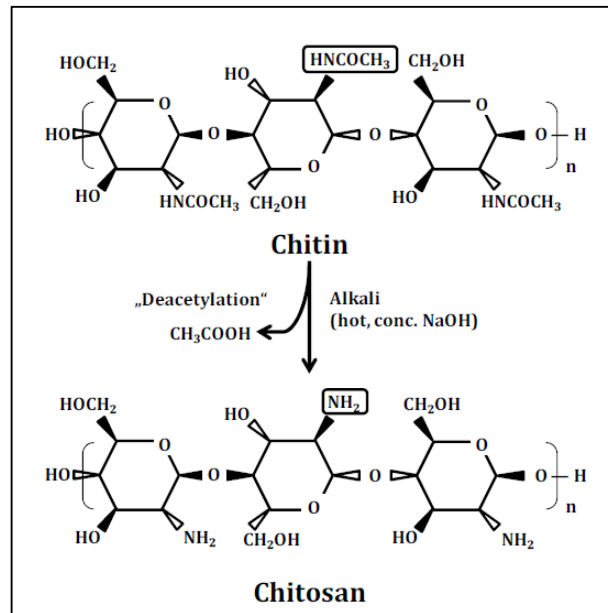
ยังมีรายงานอีกว่าการใช้ปุ๋ย N-P-K เพื่อต่อต้านเชื้อราได้ผลดีในพืชหลายชนิด เช่น แตงกวา องุ่น ข้าวโพดและมะม่วง (Reuveni *et al.*, 1996) รวมทั้งการใช้ปุ๋ยฟอสเฟตซึ่งเป็นธาตุอาหารหนึ่งในปุ๋ยฉีดพ่นลงบนใบข้าวโพด (*Zea mays* cv *Jubilee*) ที่งัไว้เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง แล้วพ่นเชื้อ *P. sorghi* ตามลงไป หลังจากนั้น 6 วัน พบว่าสามารถชักนำความต้านทานของข้าวโพดต่อเชื้อดังกล่าวได้โดยทำให้ลดจำนวนของตุ่ม (pustules) บนใบข้าวโพดที่เกิดจากโรคราสนิมได้ถึง 98% ทั้งใบที่ถูกฉีดพ่นโดยตรงรวมถึงใบที่งอกใหม่ด้วย (Reuveni, 1994)

จากการศึกษาของ Chirapongsatongkul (2008) โดยการฉีดพ่น TTF5PTM ซึ่งเป็นปุ๋ยชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วย ปุ๋ย N-P-K กรดอะมิโน และสารสกัดจากสาหร่าย สามารถชักนำให้มีการสร้าง PRs หลายชนิด ได้แก่ โปรตีน PR-1, PR-3 และ PR-5 ในใบยาสูบ ผลการทดลองยังสรุปได้ว่า TTF5PTM สามารถกระตุ้นการเกิดทั้งระบบ SAR และ ISR รวมทั้งการทดลองภาคสนามพบว่าสามารถชักนำให้ยาสูบป้องกันตนเองจากการติดเชื้อได้

1.8.3 ไคโตซาน

ไคโตซาน คือสารพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดหนึ่งซึ่งเตรียมได้โดยการทำปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ของไคติน (รูปที่ 1. 10) ไคโตซานเป็นโครงสร้างของเปลือกกุ้งปู แกนปลาหมึกและผนังเซลล์ของเห็ด ราวบางชนิด การลดหมู่อะซิติล ($\text{CH}_3\text{CO}-$) ลงทำให้มีการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโน ($-\text{NH}_2$) บนโมเลกุล ทำให้ไคโตซานมีคุณสมบัติโดดเด่นคือมีประจุบวกสูง จึงมีความไวต่อการทำปฏิกิริยาต่างๆ (ศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551) การเกิดเป็นไคโตซานนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของการเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล ซึ่งวัดจากค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (degree of deacetylation) การทำปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติลจะคิดเป็นหน่วยร้อยละ (percentage of degree of deacetylation, %DD) (กมลศิริ, 2546)

ไคโตซานประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาล D-glucosamine ที่ต่อกันเป็นสายยาวและเชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic ดังรูปที่ 1.10 ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทั้งหมด รวมทั้งไม่ละลายในน้ำที่มีค่า pH เป็นกลางหรือต่างแต่สามารถละลายได้ในกรดอ่อน เช่น กรดฟอรั่มิกและกรดอะซิติก



รูปที่ 1.10 โครงสร้างทางเคมีและปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ในการเตรียมไคโตซานจากไคติน

โคโตซานสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น การถนอมอาหาร การบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมผลิตเส้นใยและเส้นด้าย การแพทย์และเภสัชกรรมโดยผลิตเป็นวัสดุทดแทนกระดูกหรือปิดบาดแผลและเป็นสารห้ามเลือด (ศูนย์ชีวภาพโคติน-โคโตซาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551)

นอกจากคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นยังพบว่าโคโตซานมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้โดยตรง เช่น ไวรัส แบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคในพืชต่างๆ เช่น *Botrytis cinerea* (Trotel-Aziz *et al.*, 2006) และ *P. capsici* (Xu *et al.*, 2007)

นอกจากนั้นก็มีคุณสมบัติที่สำคัญคือโคโตซานสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองในพืชได้ ดังที่ทราบกันว่าโคโตซานเป็นอิทธิฤทธิ์ที่เป็น pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) หรือโมเลกุลที่ถูกจดจำได้ว่ามีคุณสมบัติเป็นเชื้อ เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับโคตินที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อราหลายชนิด ดังนั้นจึงสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชได้โดยไม่จำเป็นต้องเป็นเวลานาน และกระตุ้นระบบ SAR ได้ด้วย (Uthairatanakij *et al.*, 2007) เช่น จากการศึกษาของ Vasyukova และคณะ (2001) พบว่าการทดสอบมันฝรั่งในส่วนของหัว (tubers) ด้วยโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5 กิโลดาลตัน ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-กลูคาเนส และ โคติเนส เพิ่มขึ้นที่เวลา 12 และ 48 ชั่วโมง และยังผลทำให้มีการสะสมของ rishitin (ไฟโตอเล็กซินชนิดหนึ่ง) ในปริมาณสูงอีกด้วย หลังจากนั้นนำมันฝรั่งที่ผ่านการทดสอบด้วยโคโตซานมาทำให้ติดเชื้อ *P. infestans* พบว่ามันฝรั่งมีการติดเชื่อน้อยลงทั้งบริเวณพื้นที่ผิวของหัวมันฝรั่งที่ทดสอบโดยตรงด้วยโคโตซาน (local resistance) และบริเวณที่ไกลออกไป (systemic resistance) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Iriti (2010) โดยใช้โคโตซานเพื่อชักนำความต้านทานต่อ Tobacco Necrosis virus (TNV) ในถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) ให้ผลว่าโคโตซานไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ TNV โดยตรง แต่การดูดซึมโคโตซานเข้าทางปากใบจะสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองในพืชได้โดยทำให้เกิดการสะสมแคลโลสเพิ่มขึ้น การศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบว่าโคโตซานสามารถกระตุ้นการผลิต PRs กลุ่มต่างๆ ได้ด้วยทั้งในระดับโปรตีนและในระดับยีน เช่น การศึกษาในข้าว (*Oryza sativa*) มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน OsPR5 และ OsPR10 ซึ่งเป็น PRs ที่สำคัญในข้าวเป็นอย่างมากหลังจากทดสอบด้วยโคโตซาน (Agrawal *et al.*, 2002) และยังสามารถชักนำให้พืชผลิตไฟโตอเล็กซินได้ในพืชหลายชนิดอีกด้วย (Uthairatanakij *et al.*, 2007)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการใช้ตัวกระตุ้น ได้แก่ SA ปุ๋ย N-P-K และโคโคซาน ในการกระตุ้นการต้านทานโรคในใบยางพารา
2. ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *PR-1* ในยางพาราเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไป
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพารา
 - 1) ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในยางพาราเมื่อกระตุ้นด้วย SA
 - 2) ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในยางพาราเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora*
 - 3) ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราที่มีอายุแตกต่างกัน
 - 4) ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ กัน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

วัสดุ

1) สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

ตารางที่ 2.1 ชื่อสารเคมีเกรดวิเคราะห์และบริษัทผู้ผลิต

| ชื่อสารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|--|---------------|
| ปุ๋ย N-P-K (สูตร 25-7-7) | ปุ๋ยไวคิง |
| Absolute ethanol | Merck |
| Acetic acid | Merck |
| Agar | วิทยาสรม |
| Ampicillin | Sigma |
| Bromophenol blue | Sigma |
| Calcium carbonate | Fluka |
| Chitosan ($\geq 75\%$ deacetylated, 90-150 KDa) | Sigma |
| Ethylenediaminetetracetic (EDTA) | Baker |
| Glycerol | Carlo Erbr |
| Hydrochloric acid | Merck |
| Isopropanol | Sigma |
| β -mercaptoethanol | Merck |
| Potato dextrose agar | Difco |
| Scopoletin | Sigma |
| Sodium chloride (NaCl) | BDH |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) | Merck |
| Sodium salicylate | Sigma |
| Sucrose | Carlo Erbr |
| Triton-X 100 | Merck |
| V ₈ | Campbell Soup |
| Yeast extract | Sigma |

2) สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (molecular biology grade)

ตารางที่ 2.2 ชื่อสารเคมีเกรดอณูชีววิทยาและบริษัทผู้ผลิต

| ชื่อสารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|--|----------------|
| Agarose | Vivantis |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) | Vivantis |
| Deoxynucleotide-5'-triphosphate (dNTP) | Roche |
| Diethylpyrocarbonate (DEPC) | Bio Basic inc. |
| DNA Ladder 100 bp plus | Vivantis |
| DNaseI recombinant, grade I | Roche |
| Ethidium bromide | Vivantis |
| High Pure PCR Product Purification Kit | Roche |
| Isopropylthio- β -galactoside (IPTG) | Sigma |
| Luria Bertaini (LB) | Sigma |
| QIAprep [®] Miniprep Kit | Qiagen |
| QIAquick Gel Extraction Kit protocol | Qiagen |
| Oligo dT primer | Invitrogen |
| 5',3'- RACE Kit, 2 nd Generation Kits | Roche |
| Rnase-free Dnase set | Qiagen |
| Spectrum [™] Plant total RNA Kit | Sigma |
| SuperScript [™] III First-Strand Synthesis System | Invitrogen |
| T4 DNA ligase | Promega |
| Taq DNA polymerase | Invitrogen |

จุลินทรีย์

- 1) แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 (Invitrogen)
- 2) เชื้อ *Phytophthora palmivora*

อณูชีวโมเลกุล (molecular biology molecule)

- 1) พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®] T-Easy vector (Promega)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ

- 1) กล้องจุลทรรศน์ Olympus CH40 (Japan)
- 2) กล้องถ่ายรูป Sony cybershot W5 5.1 ล้านพิกเซล digital (Japan)
- 3) โกร่งบด
- 4) เครื่องแก้วพื้นฐาน (กระบอกลดแรงดัน ขวดปรับปริมาตร ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ และหลอดทดลอง เป็นต้น)
- 5) เครื่องชั่งสองตำแหน่ง Diethelm model 12909657 (Japan)
- 6) เครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis system) (Mupid)
- 7) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
- 8) ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร
- 9) ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)
- 10) ไมโครอโตปีเปต พร้อมทิป ขนาด 0.1-2, 2-20, 10-100, 100-1000 และ 1000-5000 ไมโครลิตร
- 11) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave SS-320 Tomy Japan)
- 12) Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
- 13) Gel Doc รุ่น BioDoc-It™ system
- 14) Heat box
- 15) Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
- 16) Petroff hausser counting chamber
- 17) pH meter Cyperscan 1000 (Singapore)
- 18) Spectrofluorometer RF-1501 Shimadzu (Japan)
- 19) Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler
- 20) UV box, Vilber Lourmat (France)
- 21) UV light transilluminator (UVP)

วิธีการทดลอง

2.1 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพารา

2.1.1 การเตรียมเชื้อ *Phytophthora palmivora* เพื่อใช้ศึกษาการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600)

2.1.1.1 การเตรียม *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์

นำเชื้อ *P. palmivora* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางสงขลา มาแยกอีกครั้งโดยการกลั่นเชื้อสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA, ดูภาคผนวก) จากนั้นย้ายโคลนนี้เดี่ยวที่ได้ลงบนอาหาร PDA ถาดใหม่ เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปใช้งาน (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 เชื้อ *P. palmivora* บนอาหาร PDA เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

หลังจากเตรียมเชื้อ *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์แล้วเมื่อต้องการเชื้อสปอร์สามารถกระตุ้นได้โดยการย้ายเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V_8 (ดูภาคผนวก) เป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 2.2) อาหารดังกล่าวจะกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์แรงเจียมซึ่งมีเชื้อสปอร์อยู่ภายใน



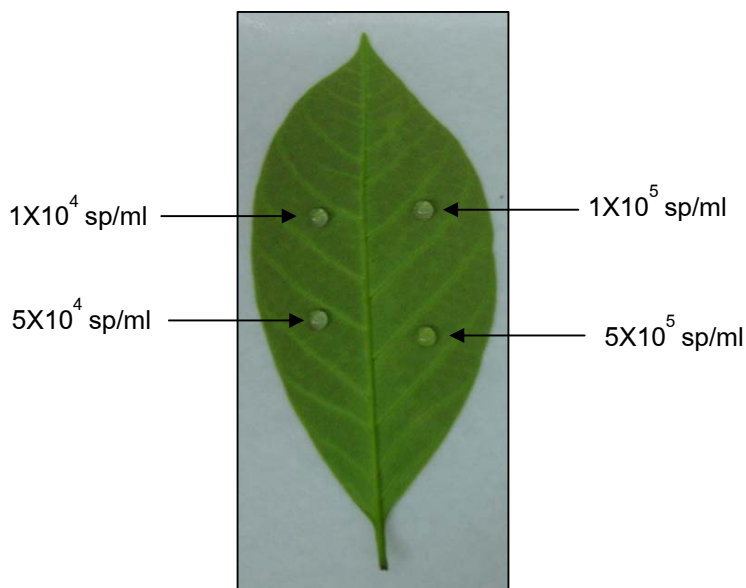
รูปที่ 2.2 เชื้อ *P. palmivora* บนอาหาร V_8 เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์แรงเจียม

2.1.1.2 การเตรียมซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora*

เทน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงบนสายราที่เจริญเติบโตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ V_8 แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ซูโอสปอร์ที่อยู่ในสปอร์แรงเจียมจะว่ายน้ำออกมา นับจำนวนซูโอสปอร์โดยการหยดซูโอสปอร์ลงบน Petroff Hauser counting chamber แล้วนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วเจือจางกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่ต้องการ

2.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *P. palmivora*

วางใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ลงบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น วางซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 และ 5×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร บนหลังใบยางพาราปริมาตร 40 ไมโครลิตร ต่อหยดเรียงลำดับความเข้มข้น ดังรูปที่ 2.3 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บหยดซูโอสปอร์และวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนที่ โดยเก็บหยดน้ำกลั่นเมื่อเวลาผ่านไป 2, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหาความเข้มข้นของสโคพอลิติน (scopoletin) ที่ถูกสร้างขึ้นด้วยเครื่อง spectrofluorometer (ดูรายละเอียดข้อ 2.1.2.1) (จะมีการวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปแทนที่ทุกครั้งที่เก็บหยดน้ำกลั่นขึ้นซึ่งเป็นการเก็บสารละลายตัวอย่างแบบสร้างใหม่, newly synthesized scopoletin) ผู้วิจัยได้สังเกตผลการเรืองแสงของสโคพอลิตินทั้งในหยดน้ำและในเนื้อใบภายใต้แสง UV ต่อมาสังเกตและบันทึกการเกิดรอยไหม้บนใบยางพาราเมื่อครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดใบยางพาราซึ่งล้อมรอบบริเวณที่วางซูโอสปอร์ขนาด 2x2 เซนติเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับสกัด RNA และศึกษาการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับใบยางพาราชุดควบคุม (เวลา 0 ชั่วโมง) ซึ่งเป็นใบที่มาจากกิ่งเดียวกัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง



รูปที่ 2.3 การบ่มใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้นต่างๆ แต่ละใบวางหยด ซุโอสปอร์ 4 ความเข้มข้นๆ ละ 40 ไมโครลิตร (sp/ml = ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร)

2.1.2.1 วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิติน

นำหยดน้ำซึ่งเก็บไว้ที่เวลา 2, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ไปวัดค่าการเรืองแสง ด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์สคอพอลิตินกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิติน (ดูภาคผนวก)

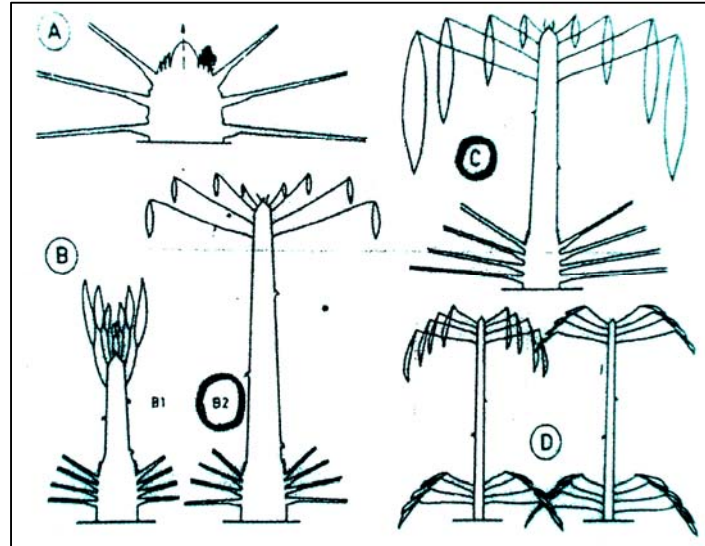
2.1.3 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยการใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ

จากผลการทดลองในข้อ 2.1.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *P. palmivora* คือ 1×10^5 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะนำมาใช้ในการศึกษาการชักนำการต้านทานโรคของใบยางพารา พันธุ์ RRIM600 ต่อไป

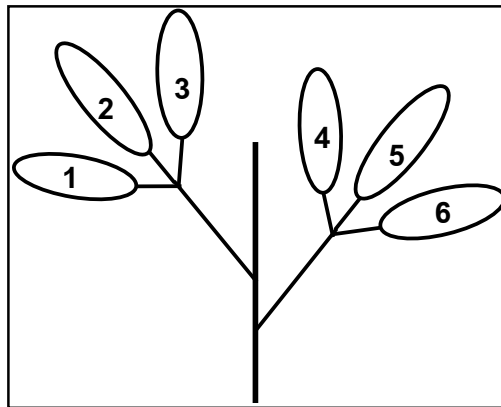
2.1.3.1 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยการใช้กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA)

ก. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ศึกษาการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยใช้ SA เป็นตัวกระตุ้น

ใช้ใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ระยะ B₂-C (รูปที่ 2.4) ที่มาจากต้นและกิ่งเดียวกัน ในการทดลองนี้เลือกใช้ใบ 6 ใบ ที่มีความอ่อน-แก่ ใกล้เคียงกัน เป็นตัวแทนของแต่ละกิ่งของต้นยางพารา ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.4 ระยะการเจริญเติบโตของใบยางพารา ระยะที่ใช้ในการทดลอง คือ ใบเพสลาด (ระยะ B₂-C) (Breton *et al.*, 1997)

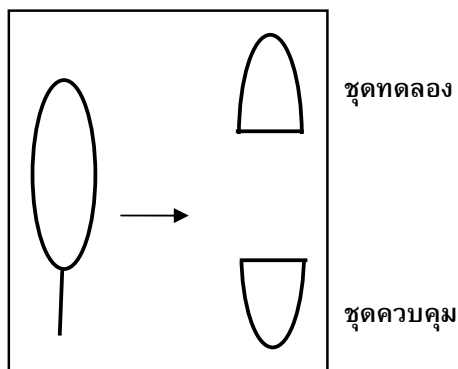


รูปที่ 2.5 ตำแหน่งของใบยางพารา 6 ใบ ที่เลือกใช้ในการทดลองซึ่งมาจากกิ่งเดียวกันและมีความอ่อน-แก่ ใกล้เคียงกัน

วิธีการที่ 1: คัดเลือกโบบางพาราที่เหมาะสมไว้ 5 โบบจาก 6 โบ ที่ตัดเก็บไว้ข้างต้น (ลักษณะโบบางพาราที่เหมาะสมคือต้องสะอาด ไม่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้าและมีขนาดใกล้เคียงกันที่สุด) มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง ตัดส่วนปลายโบบและก้านโบบออกแล้วแช่โบบางพาราใน Triton-X 100 ความเข้มข้น 0.1% (v/v) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายแว็กซ์ที่เคลือบผิวโบบออก จากนั้นแช่โบบางพาราลงในสารละลาย SA ความเข้มข้นของสารละลาย SA ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้จากการศึกษาของนางสาวฐิติกร จันทร์วุ่น (นักศึกษาระดับปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งมี รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเขาว์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา) ได้แก่ 0, 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นละ 1 โบบ) แช่โบบางพาราทั้งโบบไปเพื่อให้ปากโบบสัมผัสกับสารละลาย SA โดยตรงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้โบบางพารา 5 โบบ จากอีกกึ่งเป็นชุดควบคุม โดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อบ่มโบบางพาราแทนสารละลาย SA เมื่อครบ 1 ชั่วโมงนำโบบางพาราทั้ง 10 โบบไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งและวางลงบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตผลการเรืองแสงของสคอพอลิดีนทุก 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ผลของสารละลาย SA ต่อโบบางพาราเบื้องต้น

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า Triton-X 100 มีผลกระทบต่อโบบางพาราอย่างรุนแรง ทำให้โบบางพาราบอบซ้า ผู้วิจัยจึงตัดขั้นตอนการแช่โบบางพาราใน Triton-X 100 ออกไปและเปลี่ยนให้ชุดควบคุมและชุดทดลองอยู่ในโบบเดียวกันดังรายละเอียดในวิธีการที่ 2

วิธีการที่ 2: คัดเลือกโบบางพารา 5 โบบ เช่นเดียวกับวิธีการที่ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง แบ่งครึ่งโบบางพาราเป็นโบบส่วนบนและโบบส่วนล่างดังรูปที่ 2.6 โดยโบบส่วนบนจะใช้เป็นชุดทดลองและโบบส่วนล่างเป็นชุดควบคุม แล้วแช่โบบางพาราส่วนบนลงในสารละลาย SA ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ โดยแช่โบบางพาราให้ด้านปากโบบสัมผัสกับสารละลาย SA โดยตรง และแช่โบบส่วนล่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำโบบางพาราทั้ง 10 ชิ้น ไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งและวางลงบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตการเรืองแสงของสคอพอลิดีน



รูปที่ 2.6 การเตรียมใบยางพาราโดยแบ่งครึ่งใบยางพาราเป็นใบส่วนบน (ชุดทดลอง) และใบส่วนล่าง (ชุดควบคุม)

ข. การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราต่อเชื้อ *P. palmivora* โดยการใช้ SA

ทดสอบใบยางพาราด้วยสารละลาย SA วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยเลือกใช้สารละลาย SA ความเข้มข้น 12.5 และ 25 มิลลิโมลาร์ ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นวางหยดซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.1.2 สังเกตการเรียงแสงของสคอพอลิดิน เปรียบเทียบขนาดของรอยไหม้กับใบชุดควบคุมเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังจากวางเชื้อ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.1.3.2 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยการใช้ปุ๋ย NPK

เตรียมปุ๋ย N-P-K (สูตร 25-7-7) ตราเรือใบไวคิง ความเข้มข้น 0%, 2%, 3%, 4% และ 5% (w/v) ตูภาคผนวก เพื่อทดสอบกับใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 จำนวน 5 ใบ ระยะ B₂-C ที่มาจากกิ่งเดียวกันตั้งรูปที่ 2.5 ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง ตัดแบ่งครึ่งใบยางพาราออกเป็น 2 ส่วนตั้งรูปที่ 2.6 ทำการทดสอบกับปุ๋ย NPK ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 2.1.3.1ข.

2.1.3.3 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยการใช้โคโตซาน

เตรียมโคโตซาน (Sigma, $\geq 75\%$ deacetylated, 50-190 kDa) ความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% และ 1% ตูภาคผนวก เพื่อทดสอบกับใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 จำนวน 3 ใบ ที่คัดเลือกไว้ ทดสอบกับโคโตซานโดยแช่ใบยางพาราให้ด้านปากใบสัมผัสกับสารละลายโคโตซานโดยตรง และใบส่วนล่างเป็นชุดควบคุมซึ่งแช่ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ pH 5.6 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำใบยางพาราไปล้างให้

สะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง และวางลงบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่น ปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้นสังเกตรอยไหม้ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2.2 ศึกษา ยีน *PR-1* ในใบยางพารา

2.2.1 การออกแบบ degenerate primers

ออกแบบ degenerate primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความอนุรักษ์ของยีน *PR-1* จากพืช 2 ชนิด คือ *Arabidopsis thaliana* (accession no. NM_127025.2) และ *Eutrema wasabi* (accession no. AB271488.1) จากฐานข้อมูลใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) และเปรียบเทียบสาย DNA ของพืชดังกล่าวเพื่อหาบริเวณที่มีความอนุรักษ์โดยใช้โปรแกรม Clustal-X alignment (Thompson *et al.*, 2001)

2.2.2 การทดสอบยางพาราด้วย SA และซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

2.2.2.1 การทดสอบใบยางพาราด้วย SA

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในยางพาราด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR จะศึกษาในยางพาราพันธุ์ต้านทาน BPM-24 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคในธรรมชาติดังนั้นการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นจะเป็นผลการทดลองที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เราต้องการศึกษา ได้แก่ ผลของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* และผลของ SA เท่านั้น

เตรียมใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) ระยะ B₂-C จำนวน 6 ใบ ดังรูปที่ 2.5 นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อซับให้แห้ง ตัดส่วนปลายใบและก้านใบออกแล้วแช่ใบที่ 1-5 ในสารละลาย SA ความเข้มข้น 0, 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นละ 1 ใบ) ทดลองโดยแช่ใบยางพาราให้ปากใบสัมผัสกับสารละลาย SA โดยตรง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำใบยางพารามาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งและวางบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บใบยางพาราหลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัด RNA (สำหรับใบที่ 6 สกัด RNA โดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยสารละลาย SA เพื่อดูการแสดงออกของยีน *PR-1* ในเบื้องต้น)

2.2.2.2 การทดสอบใบยางพาราที่มีอายุแตกต่างกันด้วยเชื้อ *P. palmivora*

เตรียมใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 ที่มีอายุแตกต่างกันตั้งแต่ 13-19 วัน นับตั้งแต่วันที่กิ่งยางพาราเริ่มแตกตา โดยเรียงลำดับตามความอ่อน-แก่ ดังรูปที่ 2.7 และแบ่งเป็น 2 ชุด คือ

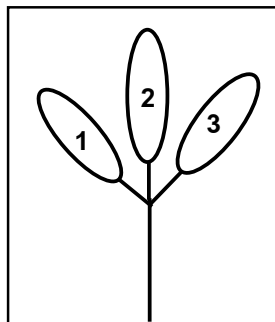
ชุดควบคุมและชุดทดลอง ในชุดทดลองจะบ่มใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีการแช่ทั้งใบเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2.1 และในชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซุโอสปอร์ เมื่อครบเวลานำใบยางพาราทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุมล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งและวางลงบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น ตั้งพักที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเรียงแสงของสโคพอลิตินควบคู่ไปด้วย เก็บตัวอย่างใบยางพาราเมื่อครบ 24 ชั่วโมง (นับตั้งแต่ใบยางเริ่มสัมผัสกับซุโอสปอร์) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับสกัด RNA เตรียม cDNA และเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ต่อไป ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง



รูปที่ 2.7 ใบยางพาราช่วงอายุต่างๆ (ประมาณ 13, 15, 17, 18 และ 19 วัน ตามลำดับ)

2.2.2.3 การทดสอบใบยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเชื้อ *P. palmivora*

เตรียมใบยางพันธุ์ต่างๆ ประกอบด้วยพันธุ์ BPM-24, RRIT251 และ RRIM600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคในระดับสูง ปานกลางและต่ำ ตามลำดับ เลือกใช้ใบระยะ B₂-C ซึ่งมีอายุประมาณ 17-18 วัน (นับตั้งแต่วันที่กิ่งยางพาราเริ่มแตกตา) (โดยแต่ละพันธุ์จะคัดเลือกใบยางพาราจากรูปที่ 2.8) นำใบยางพาราพันธุ์ละ 3 ใบ มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง หลังจากนั้นบ่มใบยางพาราใบที่ 1 ด้วยซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ใบที่ 2 จะเป็นชุดควบคุมบ่มด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ใบที่ 3 จะเก็บเพื่อสกัด RNA ทันทีโดยไม่ต้องบ่มในซุโอสปอร์ ทั้งนี้เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนในเบื้องต้น ในการทดลองนี้จะเก็บตัวอย่างใบยางพาราเมื่อครบ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อสกัด RNA, เตรียม cDNA และศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ต่อไป



รูปที่ 2.8 ลักษณะของใบยางพาราที่ใช้ในการทดลองที่มาจากก้านเดียวกันและมีความอ่อน-แก่ใกล้เคียงกัน

2.2.3 การสกัด RNA จากใบยางพาราด้วยชุดสกัด Spectrum™ Plant total RNA Kit (Sigma)

นำใบยางพาราซึ่งเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ให้มีน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ที่ผสม β -ME ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10) แล้ว vortex ให้ lysis buffer สัมผัสกับตัวอย่างพืชอย่างทั่วถึงประมาณ 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน filtration column แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสที่ผ่าน filtration column มาผสมกับ binding solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ หลายๆ ครั้ง แล้วใส่ส่วนผสมดังกล่าวลงใน binding column หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนใสที่ผ่าน column ลงมา แล้วล้าง binding column ด้วย wash solution I จากนั้นใส่ DNaseI เพื่อกำจัด DNA ที่ปนเปื้อน ลงใน binding column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที และล้าง binding column ด้วย wash solution II ปริมาตร 750 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำการล้าง column 2 รอบ) จากนั้นย้าย binding column ลงในหลอดใหม่ แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ binding column แห้งและสุดท้ายชะ RNA จาก binding column ด้วย elution solution ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร RNA ที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{260nm}/A_{280nm}) ระหว่าง 1.7-1.9 เก็บ RNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2.2.4 การเตรียม cDNA จาก RNA ของยางพารา ด้วยชุด SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

ผสม 50 มิลลิโมลาร์ oligo (dT)₂₀ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ RNA ที่สกัดได้จากข้อ 2.2.3 จำนวน 1-2 ไมโครกรัม และ 10 มิลลิโมลาร์ dNTP (ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 1 นาที ต่อมาใส่ส่วนผสมต่างๆ ดังนี้ 5X first-strand buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, น้ำ diethylpyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 0.1 โมลาร์ dithiothreitol (DTT) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ III RT (200 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำ cDNA ที่ได้เจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำ DEPC จะได้ cDNA ที่พร้อมสำหรับใช้เป็น template ในการทำ PCR

2.2.5 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR

นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 2.2.4 มาเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ degenerate forward primer และ degenerate reverse primer ที่ออกแบบได้จากข้อ 2.2.1 ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ degenerate forward primer (5'-TTCACAACCAGGCACGAGSAGCGGT-3'; S=G,C) และ 10 มิลลิโมลาร์ degenerate reverse primer (5'-ATGGTTCCACCATTGTTCACCTCAC-3') ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และใส่ cDNA จำนวน 100 นาโนกรัม (คำนวณจากปริมาณ RNA เริ่มต้น) แล้วปรับให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 25 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำ DEPC หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler เพิ่มปริมาณ DNA โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

| | | | | |
|--------------|----------------------|---------------------|------------------|--------|
| โปรแกรมที่ 1 | Initial denaturation | ที่ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที | 1 รอบ |
| โปรแกรมที่ 2 | Denaturation | ที่ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | 40 รอบ |
| | Annealing | ที่ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | |
| | Extension | ที่ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | |
| โปรแกรมที่ 3 | Extension | ที่ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 10 นาที | 1 รอบ |
| | | ที่ 4 องศาเซลเซียส | ∞ | |

นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้ กับ 100 bp DNA ladder plus (Vivantis)

2.2.6 การทำบริสุทธิ์ PCR product

ทำบริสุทธิ์ PCR product ด้วยชุด High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) โดยนำ PCR product ที่ต้องการทำบริสุทธิ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติม binding buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใส่ส่วนผสมลงใน column (High Pure filter tube) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนใสด้านล่างที่ผ่าน column ลงมา จากนั้นล้าง column 2 ครั้ง ด้วย wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร (ตามลำดับ) ในแต่ละครั้งจะหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนสุดท้ายชะ PCR product ที่ต้องการด้วย elution buffer ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ส่วนใสด้านล่างที่ได้คือ PCR product ที่บริสุทธิ์และมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น นำ PCR product มาตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และเก็บตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในขั้นตอนต่อไป

2.2.7 การเตรียม DNA เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เตรียม PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วปริมาตร 4 ไมโครลิตร กับ degenerate forward primer และ degenerate reverse primer ปริมาตรอย่างละ 4 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.2.8 การออกแบบ specific primers

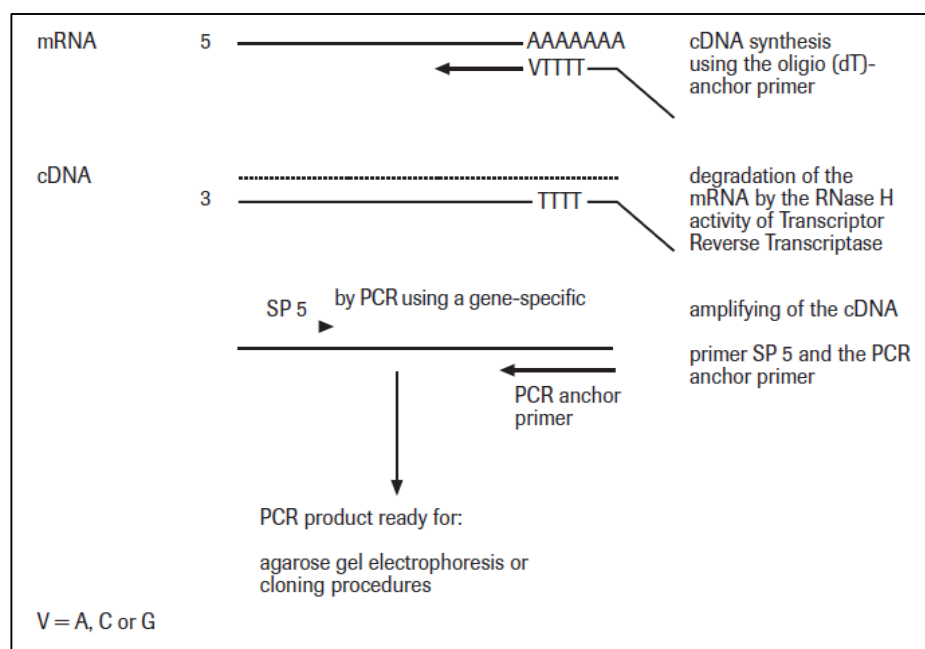
เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PR-1* จากการวิเคราะห์ในข้อ 2.2.7 ทำการออกแบบ specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวโดยใช้โปรแกรม Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) หลังจากเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับข้อมูลอื่นที่มีใน GenBank โดยการ Blast ผ่าน <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ก็จะได้ specific primers ที่จะนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน *PR-1* ในยางพาราด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) รวมทั้งใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *actin* ของยางพารา

2.2.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน *PR-1* ในยางพารา ด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)

เตรียม full-length ของยีน *PR-1* ด้วยชุด 5', 3'- RACE Kit, 2nd Generation (Roche) โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.2.9.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3'

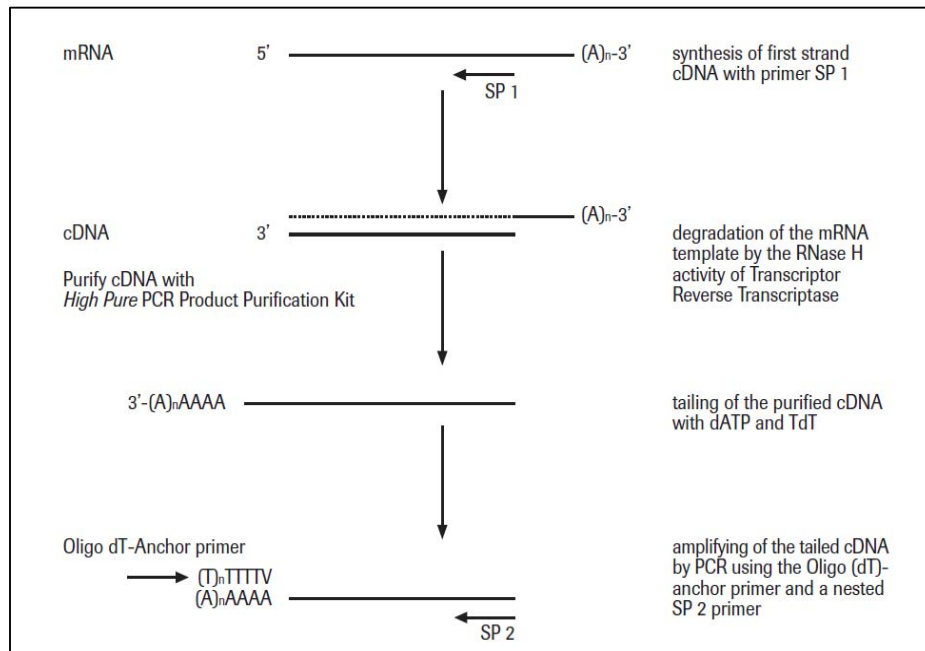
สร้างสาย first-strand cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ตามขั้นตอนของบริษัท โดยใช้ adapter primer ที่ต่อเข้ากับ oligo dT (oligo dT- anchor primer) RT ในชุด kit มี RNase H activity ที่จะย่อยสลาย RNA จากนั้นเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ในชุด kit จะทำการสร้าง 2nd strand cDNA ด้วย specific forward primer ที่ออกแบบได้จากข้อ 2.2.8 แล้วตามด้วยปฏิกิริยาทั่วไปของวิธี PCR โดยใช้ specific forward primer และ PCR anchor primer (primer ที่ complementary กับ oligo dT-anchor primer) เป็น reverse primer เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 3' ดังรูปที่ 2.9 ตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel จากนั้นทำบริสุทธิ์แถบ DNA ที่ได้ตามวิธีการในข้อ 2.2.9.3 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วตรวจสอบกับฐานข้อมูลใน GenBank



รูปที่ 2.9 แผนผังสรุปขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' (www.roche-applied-science.com)

2.2.9.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5'

สร้างสาย first-strand cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ตามขั้นตอนของบริษัทโดยใช้ specific reverse primer ที่ออกแบบได้จากข้อ 2.2.8 เติม dA-tailing ทางด้าน 3' ของ cDNA ที่ได้ด้วยเอนไซม์ terminal transferase (80 ยูนิตต่อไมโครลิตร) เพื่อเป็นตำแหน่งในการจับของ oligo dT-anchor primer จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ oligo dT-anchor primer และ specific reverse primer เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 5' (โดยเริ่มต้นจะทำการสร้าง 2nd strand cDNA ด้วย oligo dT-anchor primer จากนั้นจึงจะเข้าสู่ปฏิกิริยาทั่วไปของวิธี PCR, รูป 2.10) ตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และทำริสซุทธ์แถบ DNA ที่ได้ตามวิธีการในข้อ 2.2.9.3 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank



รูปที่ 2.10 แผนผังสรุปขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' (www.roche-applied-science.com)

2.2.9.3 การทำริสซุทธ์ PCR product จาก agarose gel

PCR product ที่ผ่านการแยกด้วยวิธี gel electrophoresis สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit protocol (Qiagen) เริ่มจากการตัดเจลตรงตำแหน่งของ DNA ที่ต้องการแล้วเติม QG buffer (เติม QG buffer 300 ไมโครลิตรต่อเจลน้ำหนัก 0.1 กรัม) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ประมาณ 15-30 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

นาน 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมด ในระหว่างที่บ่มจะต้อง vortex ทุก 2-3 นาที เมื่อครบเวลาเติม isopropanol (เติม isopropanol 100 ไมโครลิตรต่อเจนน้าหนัก 0.1 กรัม) ผสมให้เข้ากันแล้วนำสารละลายนี้ใส่ใน column (QIAquick spin column) ครั้งละ 700 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที ที่งสารละลายที่ผ่าน column จากนั้นเติม QG buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง column อีกครั้งด้วย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ย้าย column ไปใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่แล้วชะ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วโดยการเติม EB buffer ปริมาตร 30-40 ไมโครลิตร (ขึ้นกับความเข้มข้นของแถบ DNA บนเจล) นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลาย DNA ที่ชะได้ตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.10 การโคลนยีน *PR-1* จากยางพารา

2.2.10.1 การเชื่อมต่อระหว่างยีน *PR-1* กับพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยเอนไซม์ T4

DNA ligase

หลังจากเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ด้วยเทคนิค PCR แล้วจะเชื่อมต่อ PCR product กับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยมี ligation reaction ดังนี้

| | | |
|------------------------------------|---------------|------------------------------------|
| 2X rapid ligation buffer | ปริมาตร 5 | ไมโครลิตร |
| เวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy | ปริมาตร 0.5 | ไมโครลิตร (คิดเป็น 25 นาโนกรัม) |
| เอนไซม์ T4 DNA ligase | ปริมาตร 0.5 | ไมโครลิตร |
| PCR product | ปริมาตร 4 | ไมโครลิตร (คิดเป็น 70-80 นาโนกรัม) |
| | รวมปริมาตร 10 | ไมโครลิตร |

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้เวกเตอร์ลูกผสมตามต้องการ

2.2.10.2 การนำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (competent cells) โดยวิธี heat shock transformation

ย้ายเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่ competent cell ในที่นี้คือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10 (Invitrogen) ด้วยวิธี heat shock transformation โดยผสมเวกเตอร์ลูกผสมปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา

2 นาที จากนั้นเติม LB broth ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อให้เซลล์เกาะกลุ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดส่วนผสมนี้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร spread ลงบน LB agar ที่มี ampicillin (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), Isopropylthio- β -galactoside (IPTG) (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จะเห็นโคโลนีของแบคทีเรียซึ่งมีสีขาวและสีฟ้า จากนั้นจึงแยกเอาเฉพาะโคโลนีสีขาวซึ่งได้รับเวกเตอร์ลูกผสมไปเลี้ยงใน LB broth ผสม ampicillin นำแบคทีเรียที่เจริญเติบโตไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.1.10.3 การแยกพลาสมิดของแบคทีเรียเพื่อตรวจหาเวกเตอร์ลูกผสมโดยใช้ STET buffer

นำโคโลนีสีขาวจากข้อ 2.2.10.2 มาเลี้ยงใน LB broth ผสม ampicillin ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้หมუნเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วย STET buffer (ประกอบด้วย 8% sucrose, 5% Triton-X 100, 50 มิลลิโมลาร์ EDTA, 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 40 วินาที แช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนโปรตีนสีขาว เขี่ยโปรตีนดังกล่าวออกด้วยไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแล้วเติม isopropanol ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (หรือบ่มข้ามคืน) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนพลาสมิดแล้วทำให้ตะกอนแห้งด้วยกระดาษที่ซูดปลอดเชื้อเป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนกลับด้วยน้ำ DEPC และเก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.10.4 การสกัดพลาสมิดของแบคทีเรีย

ใช้ชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) โดยการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญอยู่ใน LB agar ผสม ampicillin ไปเลี้ยงใน LB broth ผสม ampicillin ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้หมუნเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทอาหารทิ้งและใส่ P1 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (ผสม RNase A ลงใน P1 buffer ก่อนใช้งานให้มีความเข้มข้นสุทธิของ RNase A ใน P1 buffer

เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ P2 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ ให้เข้ากัน ใส่ N3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จะเห็นตะกอนสีขาว (ประกอบไปด้วย genomic DNA, โปรตีน และเศษเซลล์ต่างๆ) จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนและนำ supernatant ที่มีพลาสมิดอยู่ใส่ลงใน column (QIAprep spin column) จากนั้น wash column ด้วย PB buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที wash column อีกครั้งด้วย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และชะพลาสมิดที่ต้องการลงในหลอดใหม่ด้วย EB buffer ปริมาตร 30-40 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้พลาสมิดของแบคทีเรียตามต้องการ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.10.5 การตรวจสอบชิ้น DNA ที่โคลนได้ด้วยการทำ PCR

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากแต่ละโคโลนีของแบคทีเรียมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *PR-1* เพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนของยีน *PR-1* ในพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้หรือไม่ นำ PCR product ไปตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และเตรียมส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

2.2.10.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-1*

หลังจากตรวจพบว่ามียีน *PR-1* ผู้วิจัยจะนำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้ T7 และ SP6 เป็นโปรโมเตอร์

2.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

2.3.1 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1*

เตรียม cDNA ที่ต้องการจากตัวอย่างพืชข้อ 2.1.2 และ 2.2.2 ตามวิธีการข้อ 2.2.3 และ 2.2.4 จำนวน 100 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific forward primer และ specific reverse primer ที่ออกแบบได้จากข้อ 2.2.8 ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม reaction mixture ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ specific

forward primer (5'-TCTTGTGCATTCCAGCAATC-3') และ 10 มิลลิโมลาร์ specific reverse primer (5'-CACCTCACCTTAGCACATCCT-3') ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และปรับให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 25 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำ DEPC หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง DNA Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

| | | | | |
|--------------|----------------------|---------------------|------------------|--------|
| โปรแกรมที่ 1 | Initial denaturation | ที่ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที | 1 รอบ |
| โปรแกรมที่ 2 | Denaturation | ที่ 95 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | 25 รอบ |
| | Annealing | ที่ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | |
| | Extension | ที่ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | |
| โปรแกรมที่ 3 | Extension | ที่ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 10 นาที | 1 รอบ |
| | | ที่ 4 องศาเซลเซียส | ∞ | |

นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel ย้อม DNA ด้วย ethidium bromide และวัดค่าสัดส่วนความเข้มของแถบ DNA ที่ได้ กับยีน *actin* จากยารักษา (ยีนอ้างอิงที่มีการแสดงออกคงที่)

2.3.2 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *18s rDNA*

นำ cDNA ที่ได้จากการทดลองของนางสาวฐิติกร จันทร์วุ่น ซึ่งฉีดพ่นต้นกล้วยพาราอายุประมาณ 1 เดือนด้วย SA ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จำนวน 100 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณยีน *18s rDNA* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific forward และ reverse primer โดยมี reaction mixture ที่ประกอบด้วย PCR buffer, MgCl₂, dNTP และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 ส่วน specific forward primer และ specific reverse primer คือ 5'-CTCTGGATACATTAGCATGG-3' และ 5'-CATAGAATCAAAGAAAGAGCTC-3' ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง DNA Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA โดยตั้งโปรแกรมเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 นำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide

2.3.3 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *actin*

นำ cDNA เดียวกันกับที่ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ข้อ 2.3.1 จำนวน 100 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณยีน *actin* ด้วยวิธี PCR โดยมี reaction mixture ที่ประกอบด้วย PCR buffer, MgCl₂, dNTP และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 ส่วน specific forward primer และ specific reverse primer คือ 5'-CACCACCACTGCCGAACGGG-3'

และ 5'-ACGGTCTGCAATGCCAGGGA-3' ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง DNA Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA โดยตั้งโปรแกรมเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 นำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide

2.3.4 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน *Internal Transcribed Spacer (ITS)* ของเชื้อ *P. palmivora*

นำ cDNA ปริมาณ 100 นาโนกรัม เพิ่มปริมาณยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primers (Tsai *et al.*, 2006) ในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม reaction mixture เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 โดยมี specific forward primer เป็น 5'-CACGTGAACCGTATCAAAA CT-3' และ specific reverse primer เป็น 5'-CAATCATACCACCACAGCTGA-3' แล้วนำเข้าเครื่อง DNA Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA โดยตั้งโปรแกรมเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 นำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และย้อม DNA ด้วย ethidium bromide

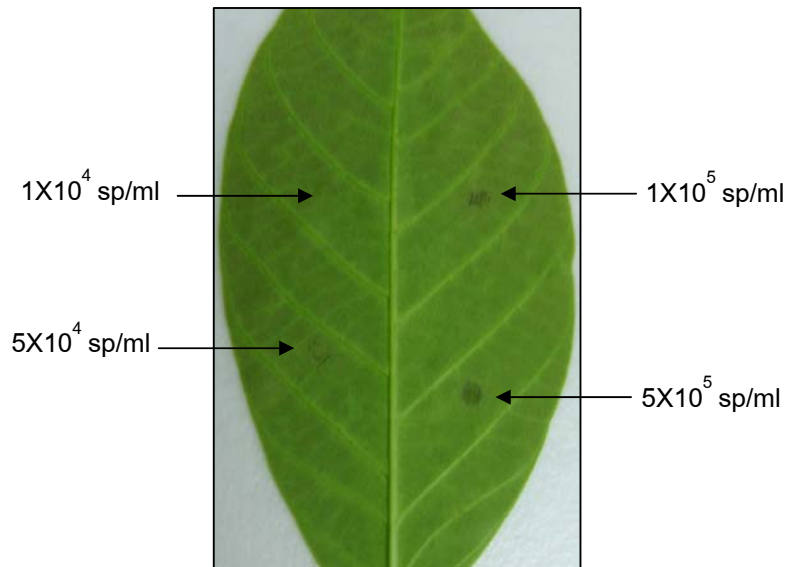
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพารา

3.1.1 ผลการหาความเข้มข้นของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ที่เหมาะสมเพื่อใช้ศึกษาการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพารา

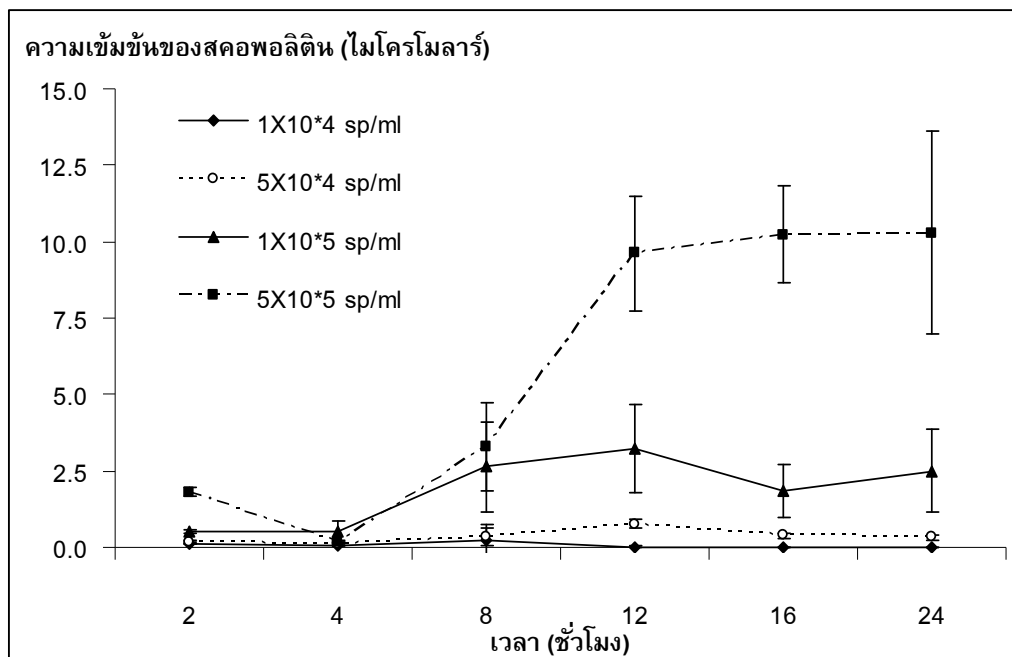
หลังจากวางหยดซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 และ 5×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร บนใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตขนาดของรอยไหม้ การสังเคราะห์สคอพอลิตินและการแสดงออกของยีน *PR-1* เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป พบว่ามีการลุกลามของเชื้อเห็นเป็นรอยไหม้ที่มีขนาดต่างๆ บนใบยาง โดยที่ความเข้มข้น 1×10^4 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ยังไม่เห็นรอยไหม้ ในขณะที่อีก 3 ความเข้มข้นสามารถเห็นรอยไหม้แปรผันตรงกับความเข้มข้นของซูโอสปอร์ ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 เปรียบเทียบรอยไหม้บนใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 หลังบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้นต่างๆ (sp/ml) คือ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร)

เมื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ใบยางพาราผลิตแล้วปล่อยให้ละลายเข้าไปในหยดน้ำซึ่งวางแทนที่ตำแหน่งของซูโอสปอร์ที่เวลาต่างๆ (ซึ่งเป็นการเก็บสารละลายตัวอย่างแบบ

สร้างใหม่, newly synthesized scopoletin) ได้แก่ 2, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง พบว่าระดับของสโคพอลิตินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 3.2 ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งที่มีซูโอสปอร์ความเข้มข้นสูงจำนวนเซลล์ของไบบางพาราที่ถูกเจาะมีมากกว่า บริเวณนั้นก็จะมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมากกว่า จะเห็นว่าความเข้มข้น 5×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร กระตุ้นให้ไบบางพาราสร้างสโคพอลิตินมากที่สุดตั้งแต่เวลา 8 ชั่วโมง (จากแนวโน้มกราฟในรูปที่ 3.2) และมากกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างชัดเจนที่เวลา 12 ชั่วโมง (9.61 ± 1.90 ไมโครโมลาร์) เป็นต้นไป อย่างไรก็ตามสโคพอลิตินในไบบางพารานอกจากมีผลในการยับยั้งเชื้อแล้วยังเป็นพิษต่อเซลล์ของไบบางพาราด้วย ดังนั้นการที่เซลล์ของไบบางพาราผลิตสโคพอลิตินในปริมาณสูงเกินไปนั้นอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์เอง (จีระภา, 2551) ทำให้เซลล์ของไบบางพาราอ่อนแอลงและตายในที่สุดส่งผลให้ active cells ที่สามารถผลิต RNA และโปรตีนมีจำนวนลดลงด้วย ผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นที่ 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ต่อไป เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวทำให้ไบบางพารามีปริมาณการสร้างสโคพอลิตินที่เหมาะสมกล่าวคือไม่มากจนเกินไปและสามารถสังเกตเห็นการลดลงของรอยเจาะได้ชัดเจนหลังจากมีการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อเชื้อ ในขณะที่ซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่ำเกินไปจะทำให้เกิด hypersensitive cell death (Chirapongsatunkul, 2008) ซึ่งอาจจะทำให้เห็นผลการชักนำการต้านทานที่ไม่ชัดเจน



รูปที่ 3.2 สโคพอลิตินที่สังเคราะห์ขึ้นที่เวลาต่างๆ หลังจากไบบางพันธุ์ RRIM600 ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้นต่างๆ (sp/ml คือ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร) (บาร์ คือ \pm S.D. คัดจากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 4 การทดลอง)

จากการทดลองข้างต้นเก็บตัวอย่างโดยตัดใบยางพาราซึ่งล้อมรอบบริเวณที่วางซูโอสปอร์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ขนาด 2X2 เซนติเมตร เพื่อรอสกัด RNA สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วย specific primers ต่อไป

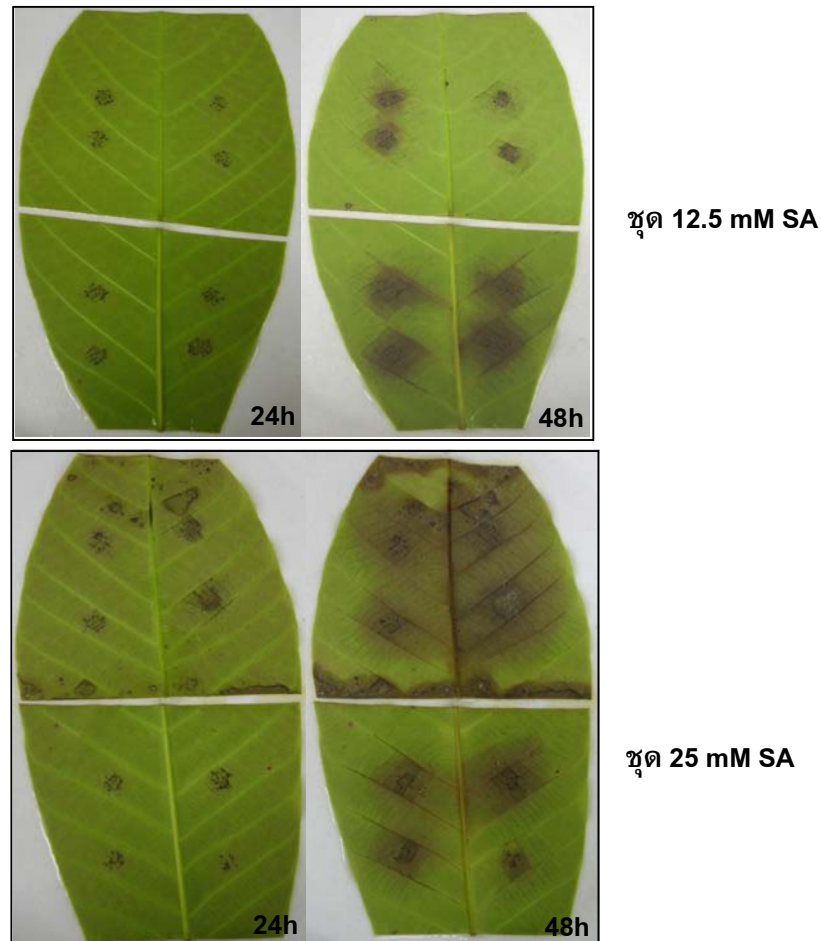
3.1.2 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ

3.1.2.1 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยใช้กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA)

จากการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์ผลการชักนำการต้านทานโรคของยางพาราโดยใช้ SA เป็นตัวกระตุ้นในวิธีการที่ 1 ซึ่งใช้ Triton-X 100 เพื่อละลายแวกซ์ที่เคลือบผิวใบออกพบว่ามีผลกระทบอย่างรุนแรงทำให้ใบยางพาราบอบช้ำมาก ส่งผลให้ใบยางพาราตาย จึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลการชักนำการต้านทานโรคได้ นอกจากนั้น Triton-X 100 ไม่สามารถละลายแวกซ์ได้อย่างสม่ำเสมอและใกล้เคียงกันทั่วทั้งใบทำให้ผลการทดลองมีความแปรปรวนสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดลองต่อในวิธีการที่ 2 ซึ่งไม่มีการใช้ Triton-X 100 แต่จะตัดใบออกเป็น 2 ส่วน เพื่อให้สารที่ต้องการทดสอบถูกดูดซึมเข้าทางรอยตัดและทางปากใบ ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้สังเกตการเรืองแสงของสคอพอลิตินภายใต้แสง UV ควบคู่ไปด้วยกัน

ผลการทดลองหลังจากแช่ใบยางพาราส่วนบนลงในสารละลาย SA ความเข้มข้น 12.5 และ 25 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 12 ชั่วโมง แล้วสังเกตผลการเรืองแสงของสคอพอลิติน ผลการทดลองในตารางที่ 3.1 เป็นค่าที่ได้จากการประเมินคะแนนโดยผู้วิจัยเมื่อสังเกตภายใต้แสง UV กำหนดให้ 5 = เรืองแสงมากที่สุด, 4 = เรืองแสงมาก, 3 = เรืองแสงปานกลาง, 2 = เรืองแสงน้อย และ 1 = เรืองแสงน้อยมาก แล้วนำค่าจากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย พบว่าใบซึ่งทดสอบด้วย SA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ มีการเรืองแสงทั้งบริเวณเส้นใบและบริเวณเนื้อใบ ซึ่งแตกต่างกับความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ที่ส่วนมากมีการเรืองแสงบริเวณเส้นใบและบริเวณขอบของรอยตัด สำหรับใบยางพาราส่วนล่างที่แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อในชุดควบคุมไม่พบการเรืองแสง หลังจากนั้นจึงวางหยดซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สังเกตการติดเชื้อเปรียบเทียบระหว่างใบส่วนบนซึ่งเป็นชุดทดสอบและใบส่วนล่างซึ่งเป็นชุดควบคุม โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยไหม้ที่เกิดขึ้น (ดูรูปที่ 3.3) จำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดรอยไหม้ในใบยางพารา (necrosis) กำหนดให้ 100% ของการเกิดรอยไหม้ คือ ใบส่วนบน (ชุดทดสอบ) มีขนาดของรอยไหม้เท่ากับใบส่วนล่าง (ชุดควบคุม) ผลการทดลองในตารางที่ 3.1 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดรอยไหม้ในชุดทดสอบด้วย SA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าของชุดควบคุม ในทุกชั่วโมงที่ทำการศึกษาและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรอยไหม้สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ($415.9 \pm 2.58\%$) คือมีการลุกลามของเชื้อเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากใบที่ผ่านการทดสอบด้วย SA มีความ

บอบช้ำมากกว่าชุดควบคุม สังเกตจากการมีรอยช้ำบริเวณขอบใบ และพิจารณาจากการเรืองแสงของสคอพอลิตินดั่งที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นความเข้มข้นของ SA 25 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้ในการทดลองยังเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไป ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อใบอย่างพารามากกว่าจะชักนำให้ใบอย่างพารามีความทนทานต่อเชื้อมากขึ้น

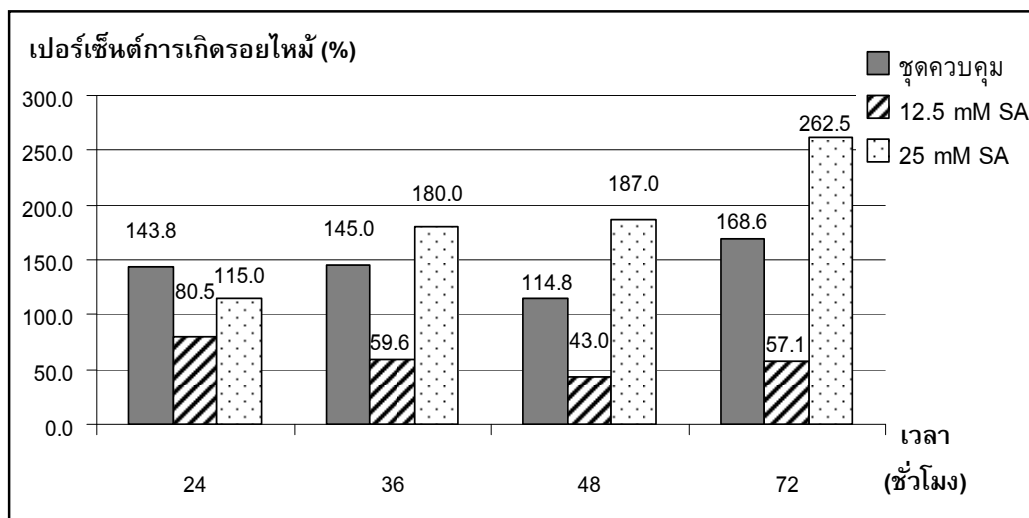


รูปที่ 3.3 ใบอย่างพาราที่ผ่านการทดสอบด้วย SA ความเข้มข้น 12.5 และ 25 มิลลิโมลาร์ แล้วตามด้วยการวางเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (mM คือ มิลลิโมลาร์, h คือ ชั่วโมง) (ใบส่วนบนเป็นชุดทดสอบ, ใบส่วนล่างเป็นชุดควบคุม) (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

ตารางที่ 3.1 คะแนนการเรืองแสงของสคอพอลิดีนบนไบบางพาราหลังจากกระตุ้นด้วย SA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

| ชุดการทดลอง | การเรืองแสง (คะแนน) |
|-------------|---------------------|
| ชุดควบคุม | 0.0 ± 0.0 |
| 12.5 mM SA | 2.4 ± 0.8 |
| 25 mM SA | 4.4 ± 0.8 |

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 การทดลอง ± S.D.

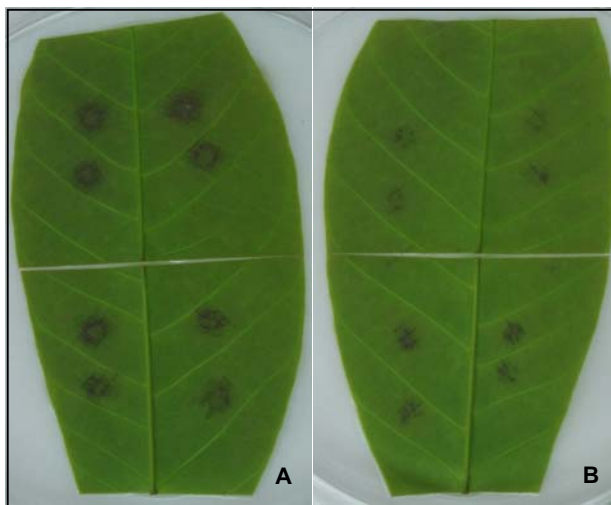


รูปที่ 3.4 เปอร์เซนต์การเกิดรอยใหม่ของไบบางพาราที่เวลาต่างๆ หลังจากกระตุ้นไบบางพาราด้วย SA แล้วตามด้วยการวางเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (mM คือ มิลลิโมลาร์) (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

จากรูปที่ 3.4 จะเห็นได้ว่า SA ที่มีบทบาทกระตุ้นให้ยางพารามีการต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ได้คือที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากไบบางพาราที่กระตุ้นด้วย SA ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถทำให้ไบบางพาราติดเชื้อน้อยลงกว่าชุดควบคุม (พิจารณาจากเปอร์เซนต์การเกิดรอยใหม่) ในขณะที่ 25 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นของ SA ที่สูงเกินไปทำให้ไบบางพาราอ่อนแอจึงติดเชื้อมากกว่าชุดควบคุม

นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างสคอพอลิดีน SA และการต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ของไบบางพารา คือ หากพบว่าความเข้มข้นใดของ SA ที่ทำให้มีการเรืองแสงของสคอพอลิดีนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 และเรืองแสงมากที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยมีการเรืองแสงทั้ง

บริเวณก้านใบและกระจายทั่วเข้าไปในเนื้อใบแล้วนั้นให้สันนิษฐานเบื้องต้นว่าความเข้มข้นดังกล่าวรุนแรงเกินไป ทำให้ใบยางพาราบอบช้ำจาก SA และให้ผลการทดลองในทิศทางตรงข้ามคือจะอ่อนแอและติดเชื้อรุนแรงกว่าชุดควบคุมดังรูปที่ 3.3 ขณะเดียวกันหากใบยางพารามีการตอบสนองโดยการผลิตสคอพอลิตินไม่มากนัก มีการเรืองแสงเฉพาะก้านใบเพียงเล็กน้อยสันนิษฐานได้ว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำการต้านทานในใบยางพารา จากการศึกษาของนางสาวฐิติกร จันทร์รุ่ง รายงานว่า SA มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ได้ ดังนั้นการให้ SA จากภายนอก (exogenous SA) จึงอาจไปมีผลยับยั้งเชื้อโดยตรงด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบผลการยับยั้งโดยตรง (direct inhibition) โดยการแช่ใบยางพาราใน SA ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น แต่จะวางซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรทันที เปรียบเทียบกับชุดทดลองซึ่งวางซูโอสปอร์ของเชื้อหลังจากทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง พบว่าใบยางที่วางเชื้อทันทีไม่สามารถลดขนาดของรอยไหม้ ในขณะที่ใบยางที่วางเชื้อหลังจากเวลาผ่านไปอีก 12 ชั่วโมง มีผลทำให้ขนาดรอยไหม้ลดลงดังรูปที่ 3.5 นอกจากนี้เมื่อ SA เข้าไปในใบก็จะถูกเฝ้าจางด้วยน้ำภายในเซลล์และการวางทิ้งไว้อีก 12 ชั่วโมง ก่อนการหยดเชื้อก็จะทำให้ SA ถูก metabolized ไป รวมทั้งการทดลองนี้ยังมีการล้าง SA ที่เคลือบบนใบออกก่อนการหยดเชื้อด้วย ดังนั้นการลดลงของรอยไหม้จึงน่าจะเกิดจากการกระตุ้นระบบการต้านทานโรค รวมถึงระบบ SAR ในยางพารา



รูปที่ 3.5 การเกิดรอยไหม้หลังปรมใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* จากผลการทดสอบการยับยั้งโดยตรง (direct inhibition) กับใบยางพาราที่ผ่านการกระตุ้นด้วย SA 12.5 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 36 ชั่วโมง **A:** วางเชื้อทันที **B:** วางเชื้อหลังจากกระตุ้นด้วย SA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ใบส่วนบนเป็นชุดทดสอบ ใบส่วนล่างเป็นชุดควบคุม) (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

SA ที่พืชผลิตขึ้นเอง (internal SA) หรือ endogenous SA นอกจากจะเป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในการสร้างความต้านทานให้กับพืชทั้งระบบ local และ systemic acquired resistance (SAR) (Loake and Grant, 2007) การตอบสนองในระบบ SAR เช่น การเกิด hypersensitive reaction จะทำให้มีการสะสม SA มากขึ้นในเซลล์พืชทั้งบริเวณนั้นและบริเวณที่ไกลออกไป exogenous SA ก็สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ SAR gene ด้วย เช่น การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Zhang และคณะ (2004) พบว่าการให้ SA ในยาสูบที่ตัดแต่งพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน *nahG* (ยีนซึ่ง encode เอนไซม์ salicylate hydroxylase ทำหน้าที่เปลี่ยน SA ไปเป็น catechol) พบว่าใบยาสูบจะติดเชื้อ TMV เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองของผู้วิจัยพบว่า exogenous SA ก็สามารถชักนำให้ใบยางพาราทนทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ได้เช่นเดียวกัน และยังพบว่าการกระตุ้นการต้านทานในใบยางพาราโดย SA นี้ มีกระบวนการซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตสคอพอลิตินด้วย นอกจากนี้การศึกษาของ He และ Wolyn (2005) ซึ่งได้ใช้รากของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) ลงใน SA (ความเข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์) พบว่าสามารถลดความรุนแรงของการติดเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* และยังกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase, phenylalanine ammonium lyase และกระตุ้นการผลิตลิกนินด้วย Pieterse และ Van Loon (2006) รายงานว่า exogenous SA และสารที่เป็น analog กับ SA เช่น INA และ BTH สามารถชักนำระบบ SAR และกระตุ้น PR genes ได้เช่นเดียวกัน

จากการทดลองซ้ำหลายครั้งพบว่ามีความแปรปรวนเป็นอย่างมากเพราะเมื่อใบยางพารามีอายุเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของ SA ที่ใช้เพื่อชักนำการต้านทานโรคจะต้องสูงขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ใบอ่อนต้องลดความเข้มข้นลงไม่เช่นนั้นอาจทำให้ใบยางพาราตายได้ ดังนั้นความเข้มข้นของ SA สำหรับการทดลองหนึ่งอาจไม่เหมาะสมกับอีกการทดลองหนึ่ง สำหรับการทำการทดลองครั้งนี้พบว่าสารละลาย SA มีความเหมาะสมอยู่ในช่วงความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่เกิน 25 มิลลิโมลาร์

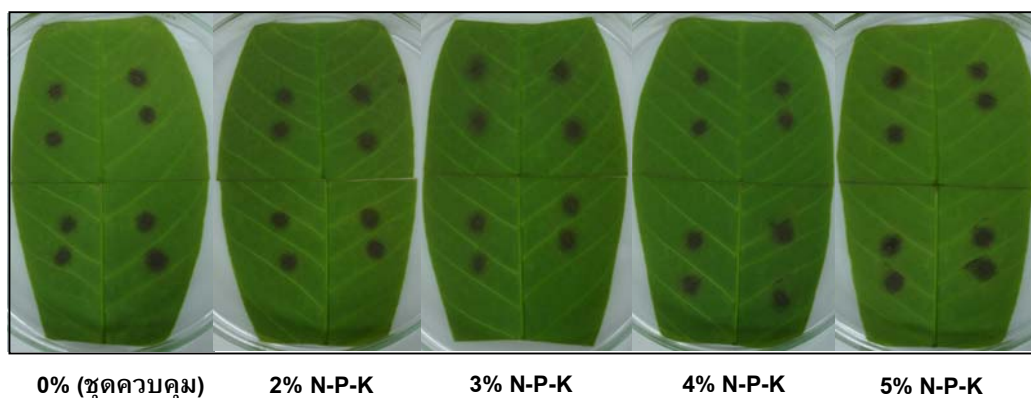
3.1.2.2 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยใช้ปุ๋ย N-P-K

ทดลองใช้ใบยางพาราส่วนบนในสารละลายปุ๋ย N-P-K (สูตร 25-7-7) ความเข้มข้น 2%, 3%, 4% และ 5% พบว่าใบยางพารามีการผลิตสคอพอลิติน ในช่วง 8-12 ชั่วโมง หลังจากให้สารละลายปุ๋ย โดยการเรียงแสงของสคอพอลิตินมีค่าแปรผันตามความเข้มข้นของปุ๋ย N-P-K ดังตารางที่ 3.2 หลังจากกระตุ้นด้วยปุ๋ย N-P-K ครบ 12 ชั่วโมง จึงวางหยดเชื้อโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร และสังเกตรอยไหม้บนใบยางพารา หลังจากวางเชื้อครบ 36 ชั่วโมง พบว่า ไม่มีความแตกต่างของขนาดรอยไหม้ที่เกิดขึ้นของใบยางส่วนบนที่แช่ในปุ๋ย N-P-K กับใบยางชุดควบคุมส่วนล่างในทุกช่วงเวลาที่ศึกษา ดังรูปที่ 3.6 และ 3.7

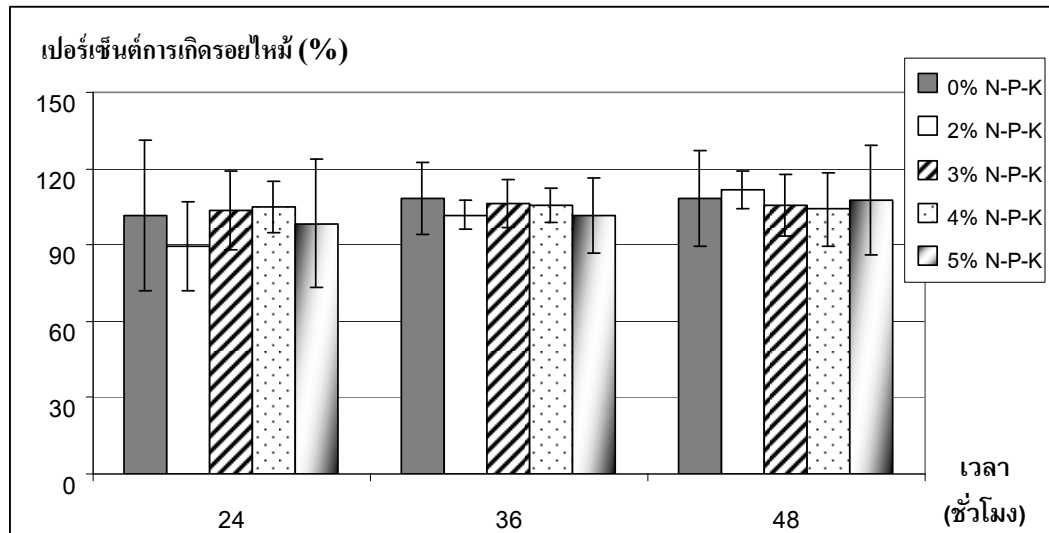
ตารางที่ 3.2 คะแนนการเรียงแสงของสคอพอลิตินบนใบยางพาราหลังจากกระตุ้นด้วยปุ๋ย N-P-K เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

| ชุดการทดลอง | การเรียงแสง (คะแนน) |
|-------------|---------------------|
| ชุดควบคุม | 0.0 ± 0.0 |
| 2% N-P-K | 0.5 ± 0.0 |
| 3% N-P-K | 1.0 ± 0.0 |
| 4% N-P-K | 1.3 ± 0.5 |
| 5% N-P-K | 2.5 ± 1.0 |

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ 4 การทดลอง \pm S.D.



รูปที่ 3.6 การเกิดรอยไหม้หลังบ่มใบยางพาราที่ผ่านการกระตุ้นด้วยปุ๋ย N-P-K ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเชื้อโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง (ใบส่วนบนเป็นชุดทดสอบ ใบส่วนล่างเป็นชุดควบคุม) (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 4 ซ้ำการทดลอง)



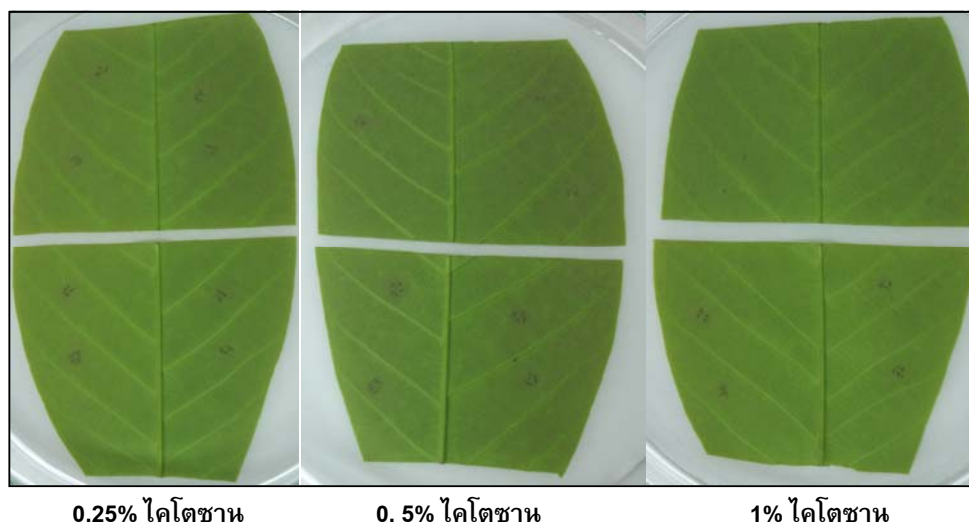
รูปที่ 3.7 เปอร์เซนต์การเกิดรอยใหม่ของใบยางพาราที่เวลาต่างๆ หลังจากกระตุ้นใบยางพาราด้วยปุ๋ย N-P-K ความเข้มข้นต่างๆ แล้วตามด้วยการวางเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (แสดงค่าเฉลี่ยของ 4 การทดลอง \pm S.D.)

จากผลการทดลองพบว่าปุ๋ย N-P-K (สูตร 25-7-7) ไม่สามารถชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราได้ด้วยวิธีการทดลองนี้ แม้ว่าจากผลการทดลองจะแสดงถึงการชักนำระบบการป้องกันตนเองผ่านทาง การสร้างสคอพอลิตินก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่สามารถกระตุ้นให้พืชมีการผลิตสคอพอลิตินได้ ไม่จำเป็นต้องมีความสามารถในการชักนำการต้านทานโรคของพืชได้ แต่การผลิตสคอพอลิตินดังกล่าวเป็นเพียงการตอบสนองของพืชที่มีต่อสารนั้นซึ่งจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้การที่ปุ๋ย N-P-K ไม่สามารถชักนำการต้านทานได้อาจเป็นผลจากความเข้มข้นของสารที่ยังไม่เหมาะสม รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการศึกษาคือ 12 ชั่วโมง หลังจากการกระตุ้นด้วยปุ๋ย N-P-K อาจยังไม่ใช่วิธีการที่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาการต้านทานโรค เนื่องจากธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบของปุ๋ยล้วนมีขนาดเล็กอยู่ในรูปที่ละลายน้ำและแตกตัวง่าย กล่าวคือ ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี เป็นผลรวมของ $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ และ urea-N ซึ่งรวมแล้วเป็นเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมดของน้ำหนักรวมของปุ๋ยที่ปรากฏในฉลากปุ๋ย ฟอสฟอรัสก็เช่นเดียวกันซึ่งจะแตกตัวให้ H_2PO_4^- หรือ HPO_4^{2-} รวมทั้งเปอร์เซ็นต์โพแทสเซียมซึ่งระบุไว้ที่ฉลากจะบอกปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายน้ำ โดยปุ๋ยเคมีที่ให้ธาตุโพแทสเซียมได้แก่ KCl, K_2SO_4 และ KNO_3 (ยงยุทธ, 2553) จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าไอออนที่แตกตัวง่ายและมีขนาดเล็กดังกล่าวน่าจะชักนำให้ใบยางมีการต้านทานโรคได้รวดเร็วกว่าสารอื่นเช่น SA จากการทดลองข้างต้น อย่างไรก็ตามปุ๋ย N-P-K ที่ใช้ก็ยังมีธาตุอาหารรอง (secondary element) ประกอบด้วยได้แก่ MgO (1.4%) และ CaO (3.0%)

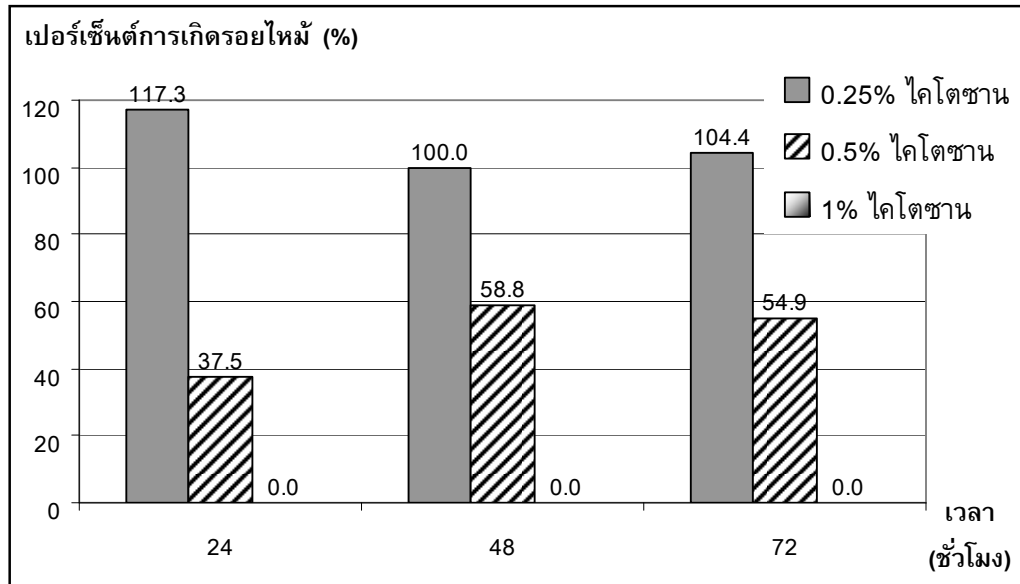
(<http://www.pravitgroup.co.th/2577.htm>) ดังนั้นผลการทดลองอาจเป็นผลแปรปรวนมาจากธาตุอาหารรองดังกล่าวด้วย

3.1.2.3 การชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยใช้ไคโตซาน

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของไคโตซานที่สามารถละลายได้คือ 1% ใน 50 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติก จึงใช้ไคโตซานความเข้มข้น 0.25%, 0.5% และ 1%, ดูภาคผนวก ในการทดสอบ โดยใบส่วนบนทดสอบกับไคโตซานและใบส่วนล่างเป็นชุดควบคุม ทดสอบกับกรดอะซิติกความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าไคโตซานไม่ทำให้ใบยางพารามีการผลิตสคอพอลิตินขึ้นในช่วงเวลาที่ศึกษา (0-12 ชั่วโมง หลังจากให้สาร) เมื่อครบ 12 ชั่วโมงจึงวางซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วสังเกตการเกิดรอยไหม้หลังวางเชื้อครบ 24 ชั่วโมง พบว่าชุดทดลองซึ่งแช่ในสารละลายไคโตซานมีการติดเชื่อน้อยกว่าชุดควบคุมโดยชุดที่สังเกตได้ชัดเจนที่สุดคือไคโตซานที่ความเข้มข้น 1% รองลงมาคือ 0.5% และที่ความเข้มข้น 0.25% ติดเชื้อใกล้เคียงกับชุดควบคุมมากที่สุด ดังรูปที่ 3.8 และเปอร์เซ็นต์การติดเชื่อรูปร่างที่ 3.9 และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่ามีการลามของเชื้อแตกต่างกันอย่างชัดเจน จะเห็นว่าใบชุดทดลองซึ่งแช่ไคโตซานความเข้มข้น 1% สามารถหยุดการเจริญของเชื้อได้ในขณะที่ใบควบคุมส่วนล่างมีการลุกลามต่อไป (รูปที่ 3.9)

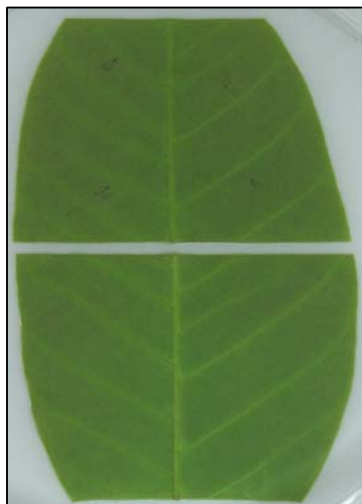


รูปที่ 3.8 รอยไหม้ของใบยางพาราหลังปนเปื้อนใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร กับใบยางพาราที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ใบส่วนบนเป็นชุดทดสอบ ใบส่วนล่างเป็นชุดควบคุม) (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)



รูปที่ 3.9 เปอร์เซ็นต์การเกิดรอยไหม้ของใบยางพาราที่เวลาต่างๆ หลังจากกระตุ้นใบยางพาราด้วยไคโตซานตามด้วยการวางเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ชูโอสปอร์ต่อมิลลิตร (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมพบว่าทั้งความเข้มข้น 0.5% และ 1% ของไคโตซานมีความสามารถชักนำให้ใบยางพาราด้านทานต่อโรคได้ ดังรูปที่ 3.8 จึงกล่าวได้ว่าช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.5% - 1% ซึ่งจะสามารถสังเกตผลการชักนำการด้านทานได้ชัดเจนประมาณ 1-2 วัน หลังจากใบยางพาราได้รับไคโตซาน อย่างไรก็ตาม ไคโตซานอาจมีผลยับยั้งเชื้อโดยตรงด้วย จากรายงานของ Xu และคณะ (2007) พบว่าไคโตซานและโอลิโกไคโตซาน (oligochitosan) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Phytophthora capsici* และการศึกษาของ Trotel-Aziz และคณะ (2006) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Botrytis cinerea* ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งผสมไคโตซานพบว่าสามารถลดการเจริญของเชื้อได้ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดสอบผลการยับยั้งโดยตรง (direct inhibition) โดยการแช่ใบยางพาราในไคโตซานความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทั้งใบส่วนบนและใบส่วนล่าง แล้ววางชูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ชูโอสปอร์ต่อมิลลิตรทันที เปรียบเทียบกับชุดที่วางเชื้อหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าชูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* สามารถเจาะเข้าไปในเนื้อใบยางพาราได้ นั่นคือไม่มีผลยับยั้งเชื้อโดยตรง ในขณะที่ใบยางที่วางเชื้อหลังจากเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ไม่พบการเจาะของเชื้อแสดงว่าไคโตซานสามารถชักนำให้ใบยางพารามีการด้านทานโรคได้ดังรูปที่ 3.10

วางเชื้อ *P. palmivora* ทันทีวางเชื้อ *P. palmivora* หลัง
การกระตุ้น 12 ชั่วโมง

รูปที่ 3.10 การเกิดรอยไหม้หลังบ่มใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* จากผลการทดสอบการยับยั้งโดยตรง (direct inhibition) กับใบยางพาราที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1% ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ใบส่วนบนวางเชื้อ *P. palmivora* ทันที ใบส่วนล่างวางหลังจากกระตุ้นด้วยไคโตซานแล้ว 12 ชั่วโมง) (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

จากผลการทดลองแสดงว่าไคโตซานสามารถกระตุ้นให้ใบยางพารามีความต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ได้ ดังนั้นไคโตซานไม่ได้กระตุ้นระบบป้องกันตนเองเฉพาะเชื้อก่อโรคที่มีผนังเซลล์เป็นไคตินเท่านั้นแต่ยังรวมไปถึงเชื้อก่อโรคที่ไม่ได้มีไคตินเป็นองค์ประกอบหลักอีกด้วย เช่น *P. palmivora* ในการทดลองครั้งนี้และ *P. infestans* ซึ่งศึกษาโดย Vasyukova (2001) และคณะ

Rabea และคณะ (2003) เสนอว่าความสามารถในการกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชโดยไคโตซานนั้นเกิดจากความเป็นประจุบวกสูง ทำให้ไคโตซานสามารถทำปฏิกิริยากับ plasma membrane ได้ โดยจะเข้าจับกับส่วนที่เป็นประจุลบของ phospholipids แล้วทำให้เกิดการกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชขึ้น เช่น การศึกษาของ Iriti และ Faoro (2008) กล่าวว่าไคโตซานจะกระตุ้นให้เกิดการสะสมแคลโลส (callose) ซึ่งสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อได้ นอกจากนี้จากการทบทวนเอกสารของ Iriti และ Faoro (2009) พบว่าไคโตซานยังมีผลทำให้เกิดระบบ SAR, oxidative burst, hypersensitive response (HR), การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน, abscissic acid (ABA), jasmonate และ PRs ด้วย

ไคโตซานไม่เพียงแต่สามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชเท่านั้นแต่ยังมีสมบัติในการทำให้องค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อราผิดรูปไปและเสียคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeability) ส่งผลให้สารชีวโมเลกุลและสารประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์แพร่ผ่าน

ออกมานอกเซลล์และสารจากภายนอกเซลล์ก็สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น ทำให้เซลล์ของเชื้อราเสียชีวิต ไคโตซานจึงสามารถยับยั้งไม่ให้เชื้อผลิตสารพิษและยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Rabea *et al.*, 2003)

จากการศึกษาพบว่า SA และปุ๋ย N-P-K เป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้ใบยางพารามีการผลิตสคอพอลิตินขึ้นในช่วงเวลาที่ศึกษา (12 ชั่วโมง) ในขณะที่ไคโตซานไม่มีการกระตุ้นการผลิตสคอพอลิติน แสดงว่า SA และปุ๋ย N-P-K มีแนวโน้มที่จะชักนำการต้านทานผ่านทางวิถีเดียวกันคือการสังเคราะห์สคอพอลิตินนั่นคือการผลิตสคอพอลิตินจะถูกระตุ้นได้ด้วย SA (โมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR) แม้ว่าจะยังไม่มีการยืนยันว่าการผลิตสคอพอลิตินมีความเกี่ยวข้องกับระบบ SAR โดยตรง แต่การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า SA จะกระตุ้นให้มีการสร้างไฟโตอเล็กซินทางอ้อม โดย SA จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) แล้ว ROS นี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้มีการผลิตไฟโตอเล็กซินดังกล่าวได้ ดังนั้นการสังเคราะห์ผลิตสคอพอลิตินจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถดูผลการตอบสนองของพืชเบื้องต้นได้แม้ว่าจะไม่ทำให้พืชเกิดความต้านทานได้เสมอไป

จากที่กล่าวข้างต้นว่าการผลิตสคอพอลิตินไม่ใช่การตอบสนองของระบบ SAR โดยตรง ดังนั้นการกระตุ้นใบยางพาราด้วยไคโตซานซึ่งไม่มีการผลิตสคอพอลิตินจึงยังสรุปไม่ได้ว่าการต้านทานที่เกิดขึ้นนั้นผ่านทาง pathway ไคโตซาน จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าไคโตซานสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชได้หลายทาง ได้แก่ กระตุ้นให้พืชเกิดระบบ SAR (Uthairatanakij *et al.*, 2007) และระบบที่เกี่ยวข้องกับการผลิต abscisic acid ได้ (Iriti and Faoro, 2008) จึงควรศึกษาต่อไปว่าเมื่อกระตุ้นด้วยไคโตซานแล้วมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในเซลล์ยางพาราอย่างไร นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไคโตซานจะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง secondary metabolite ต่างๆ รวมทั้งสามารถชักนำให้พืชผลิตไฟโตอเล็กซินได้ในพืชหลายชนิด (Uthairatanakij *et al.*, 2007) เช่น rishitin และ pisatin ในมันฝรั่งและพืชตระกูลถั่ว แต่ในการศึกษารั้งนี้ซึ่งไม่พบการเรืองแสงของสคอพอลิตินอาจเนื่องจากไคโตซานที่ใช้มีขนาดโมเลกุลใหญ่อาจถูกดูดซึมเข้าทางปากใบและทางรอยตัดได้น้อย ซึ่งอาจเป็นความเข้มข้นที่ไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการเรืองแสงของสคอพอลิตินได้ Aziz และคณะ (2006) พบว่าปริมาณของไฟโตอเล็กซินที่ผลิตขึ้นในใบองุ่นซึ่งถูกกระตุ้นด้วยไคโตซานนั้นแปรผันตรงกับน้ำหนักโมเลกุลและการทำปฏิกิริยากับการกำจัดหมู่อะซิติล (percentage of degree of deacetylation, %DD) นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติของไคโตซานซึ่งเป็นสารกระตุ้นธรรมชาติจะสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชได้แม้จะมีปริมาณน้อยและไม่ทำให้พืชเกิดความเสียหายด้วย (Mejía-Teniente *et al.*, 2010) จึงยังไม่ทำให้เกิดภาวะเครียดแก่พืชซึ่งยังไม่มีการผลิตสคอพอลิตินขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่ายังไม่สามารถบ่งบอกได้ชัดเจนถึงความเชื่อมโยงในวิถีของระบบป้องกันตนเองของยางพาราแต่ตัวกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด (SA และไคโตซาน) สามารถชักนำให้เกิดการต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ในใบยางพาราได้

เนื่องจากปีนี้มีฝนตกชุกทำให้ยางต้นกล้าติดเชื้อตลอดปี ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องใช้ใบยางพาราจากศูนย์วิจัยยางสงขลาที่มีความสมบูรณ์กว่า ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถใช้ใบเดียวกันได้ทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม จึงสามารถลดความแปรปรวนได้ระดับหนึ่งแต่มีข้อเสียคือต้องศึกษาผลการชักนำการต้านทานโรคในช่วงเวลาที่จำกัด (จากผลการทดลองเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ไม่สามารถทำการทดลองต่อได้เพราะเชื้อมีการลุกลามทั่วไปใกล้เคียงกันทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม) เนื่องจากเป็น detached leaves ใบจึงอ่อนแอกว่าปกติ ดังนั้นจึงควรทดลองกับต้นกล้ายางพาราด้วยเพราะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงและเป็นประโยชน์ต่อชาวสวนในอนาคต

ผลการทดลองโดยใช้ detached leaves แม้ว่าโคโตซานมีคุณสมบัติในการชักนำการต้านทานในใบยางพาราได้ดีที่สุด สามารถเห็นผลการทดลองชัดเจนที่สุดแต่โคโตซานมิได้มีการชักนำการต้านทานผ่านวิถีของการผลิตสคอพอลิติน ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะวิเคราะห์ผลเบื้องต้นว่าใบยางพาราได้รับอิทธิพลจากสารดังกล่าวแล้วหรือไม่เมื่อทดลองจริงกับยางต้นกล้า อีกทั้งงานวิจัยที่มุ่งหมายในอนาคตเป็นการศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกของระบบ SAR ในยางพาราให้มากยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาต่อจากนี้ไปจะเป็นการศึกษาโดยใช้ SA เป็นตัวกระตุ้นหลักเนื่องจาก SA เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR โดย SA จะทำให้ภายในเซลล์เกิด reducing environment ทำให้โปรตีน NPR1 ถูก reduced ไปเป็นโมเลกุลที่ active ซึ่งจะถูกขนส่งไปยังนิวเคลียสและควบคุมการแสดงออกของยีน PR-1 ผ่านทาง TGAs (Pieterse and Van Loon, 2004) และสามารถตรวจสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์เบื้องต้นได้ง่ายคือสังเกตการสังเคราะห์สคอพอลิติน สำหรับปุ๋ย N-P-K ที่ไม่สามารถชักนำการต้านทานของใบยางพาราได้จากการทดลองนี้ เนื่องจากมีหลายองค์ประกอบที่ต้องพิจารณาทั้งส่วนผสมจากผู้ผลิต โมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราที่แท้จริง ผู้วิจัยจึงยังไม่นำมาใช้เป็นตัวกระตุ้นเพื่อศึกษากลไกการเกิด SAR ในขณะนี้

จากที่มีการศึกษาในงานวิจัยหลายชิ้นสรุปว่า SA เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณให้กับระบบ SAR ซึ่งจะกระตุ้นระบบดังกล่าวโดยทำให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน PR-1 จนมีการระบุไว้ว่าโปรตีน PR-1 เป็นเครื่องหมาย (marker) สำหรับบ่งบอกถึงภาวะ SAR ที่เกิดขึ้นในพืช การเพิ่มขึ้นของโปรตีน PR-1 ในยางพาราจึงเป็นประเด็นสำคัญของการวิจัยครั้งนี้ แต่เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลเบื้องต้นของโปรตีน PR-1 ในยางพารา แม้ว่าผู้วิจัยจะมี antibody ของโปรตีน PR-1 จากยาสูบ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีน PR-1 ในยางพารา โดยวิธี Western blot ได้ แต่มีงานวิจัยหลายชิ้นได้ระบุไว้ว่าการสังเคราะห์โปรตีน PR-1 ถูกควบคุมที่ระดับ transcription ผู้วิจัยจึงหันมาใช้ประโยชน์จาก DNA technology โดยการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน PR-1 เพื่อนำไปสู่การศึกษาโปรตีน PR-1 ในยางพาราต่อไป

3.2 ผลการศึกษา ยีน PR-1 ในใบยางพารา

3.2.1 ผลการออกแบบ degenerate primers

ผลการออกแบบ degenerate primers ของยีน PR-1 ในใบยางพารา (*H. brasiliensis*) จากพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* และ *Eutrema wasabi* (accession no. NM_127025.2 และ AB271488.1 ตามลำดับ) ซึ่งได้พิจารณาแล้วว่าเป็นพืชที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PR-1 ที่มีความอนุรักษ์ (conserved) มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีน PR-1 ของพืชอื่นๆ จากฐานข้อมูลใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) หลังจากทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal-X alignment (Thompson *et al.*, 2001) พบบริเวณที่มีความอนุรักษ์ของยีน PR-1 ดังรูปที่ 3.11 ผู้วิจัยได้เลือก 2 บริเวณ (ในกรอบสี่เหลี่ยม) เพื่อออกแบบเป็น degenerate forward primer (F) และ degenerate reverse primer (R) ของยีน PR-1 ในใบยางพารา โดยตั้งชื่อ primers นี้ว่า AraPR-1F และ AraPR-1R สำหรับ degenerate forward และ reverse primer ตามลำดับ ซึ่งมีคุณสมบัติดังตารางที่ 3.3

| | | |
|---------------|---|-------|
| NM_127025.2 : | ATGAAATTTACTGGCTATTCTCGATTTTAAATCGTCTTTGTAGCTCTTGTAGGTGCTCTT | : 60 |
| AB271488.1 : | ATGAAAGTCATTAGCTATTCTCGACTTCTACTAATCTTGGCAGCCCTTGTAGGAGCTATTT | : 60 |
| | F | |
| NM_127025.2 : | GTTCTTCCCTCGAAGGCTCAAGATAGCCACAAGATATCTAAGGTTTCAACACCAGGCA | : 120 |
| AB271488.1 : | GTTCTTCCCTCGAAGGCTCAAGACAGCCACAAGACTATCTAAGGTTTCAACACCAGGCA | : 120 |
| NM_127025.2 : | CGAGCAGCGGTAGGCGTAGGTCCCATGCAGTGGGACGACAGGGTTGCAGCCTATGCTCGG | : 180 |
| AB271488.1 : | CGAGCAGCGGTAGGCGTTGGCCCCATGCAGTGGGACGACAGGGTTGCAGCCTTCGCTCGG | : 180 |
| NM_127025.2 : | AGCTACGCAGACCACTAAGAGGCACACTGCAGACTCATACTCTGGTGGCCCTTACGGG | : 240 |
| AB271488.1 : | AGCTACGCAGACCAACGAAGAGGCACACTGCAGGCTCATACTCTGGTGGCCCTTACGGC | : 240 |
| NM_127025.2 : | GAAACTTAGCCTGGGGTAGCGGTGACTTGTCTGGCGTCTCCGCCGTGAACATGTGGGTT | : 300 |
| AB271488.1 : | GAGAACTTGGCCTGGGGAGCAGCGACTTATCTGGCATAAGCGCCGTGAACATGTGGGTT | : 300 |
| NM_127025.2 : | AGCGAGAAGGCTAACTACAACCTACGCTCGAACACGTGCAATGGAGTTTGTGGTCACTAC | : 360 |
| AB271488.1 : | AACGAGAAGGCTAACTACAACCTACCTTCGAACACGTGCAATGGAGTTTGTGGTCACTAC | : 360 |
| | R | |
| NM_127025.2 : | ACTCAAGTTGTTTGGAGAACTCAGTGAGACTCGGATGTGCCAAAGTGAGGTGTAAACAAT | : 420 |
| AB271488.1 : | ACTCAGTTGTTTGGAGAACTCGGTTGAGACTCGGATGTGCTAAAGTGAGGTGTAAACAAT | : 420 |
| NM_127025.2 : | GGTGGAAACCATATCAGTTGCAACTATGATCCTCCTGGCAATTATGTGAACGAGAAACCCA | : 480 |
| AB271488.1 : | GGTGGAAACCATATCGTTTCAACTATGATCCTCCTGGCAATTATGTGAACGAGAAACCT | : 480 |
| NM_127025.2 : | TACTAA | : 486 |
| AB271488.1 : | TACTAA | : 486 |

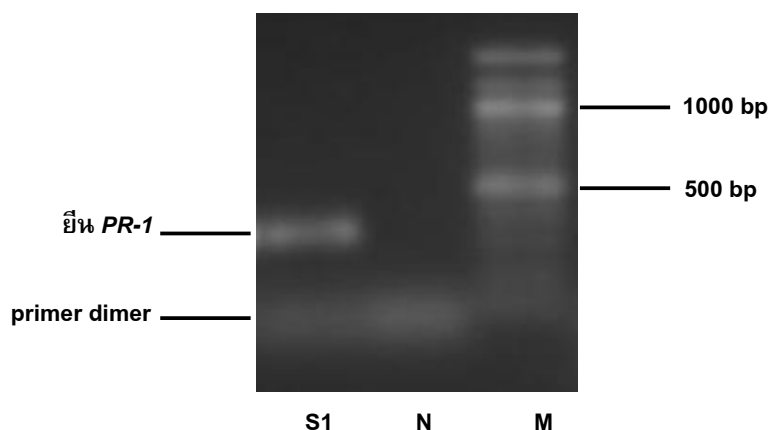
รูปที่ 3.11 ผลการทำ sequence alignment ของยีน PR-1 จาก *Arabidopsis thaliana* (accession no. NM_127025.2) และ *Eutrema wasabi* (accession no. AB271488.1) โดยใช้

โปรแกรม Clustal-X alignment (Thompson *et al.*, 2001) แถบสีดำคือส่วนที่เป็นลำดับอนุรักษ์ 100% ในกรอบสี่เหลี่ยมคือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบเป็น degenerate primers; F: degenerate forward primer (Ara-PR1F) และ R: degenerate reverse primer (Ara-PR1R)

ตารางที่ 3.3 คุณสมบัติของ degenerate primers ที่ออกแบบได้

| primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ | Tm (°C) | MW | No. Bases |
|----------|---|---------|------|-----------|
| Ara-PR1F | 5' TTCACAACCAGGCACGAGSAGCGGT 3' เมื่อ S คือ G, C | 57.5 | 7681 | 26 |
| Ara-PR1R | 5' ATGGTCCACCATTGTTACACCTCAC 3' | 52.9 | 7841 | 25 |

เมื่อนำ degenerate forward primer และ degenerate reverse primer มาใช้ในการทำ PCR โดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้จากใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) ในระยะ B₂-C จากศูนย์วิจัยยางสงขลาเป็น template (cDNA ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.นิอร จิรพงศกรกุล) พบว่าได้แถบของ PCR product จำนวน 1 แถบซึ่งมีขนาดประมาณ 350 bp ดังรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 PCR product ของยีน PR-1 จาก cDNA ของใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 โดยใช้ degenerate primers; ช่องที่ 1: PCR product ขนาดประมาณ 350 bp (S1), ช่องที่ 2: negative control (N) (ทำ PCR โดยไม่ใส่ cDNA), ช่องที่ 3: 100 bp DNA ladder (M)

หลังจากส่ง PCR product ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PR-1 ในรูปที่ 3.12 ซึ่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 315 bp และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์นี้กับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าชิ้นยีนที่ได้คล้ายคลึงกับยีน PR-1 ในพืชอื่นได้แก่ สาลี่ 99%

(*Pyrus pyrifolia* strain *Whangkeumbae* accession no. AF195237.1), แพร้ 94% (*Pyrus x bretschneideri* accession no. FJ59448 3.1), แอปเปิ้ล 92% (*Malus x domestica* accession no. AF507974.1), สาลี่ 89% (*Pyrus communis* accession no. AF498321.1), *Betula pendula* partial cds 87% (accession no. AF245497.1), สาลี่ 80% (*Pyrus pyrifolia* partial cds accession no. AY338252.1), *Vitis pseudoreticulata* 91% (accession no. GU269634.1), *Vitis hybrid* cultivar *Tamnara Tam* 89% (accession no. AB372568.1), ราสเบอร์รี่ 72% (*Rubus arcticus* accession no. EU528030.1) และสตรอเบอร์รี่ 65% (*Fragaria x ananassa* partial cds accession no. AB462752.1) ในขณะที่ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนอื่นๆ ในพืช

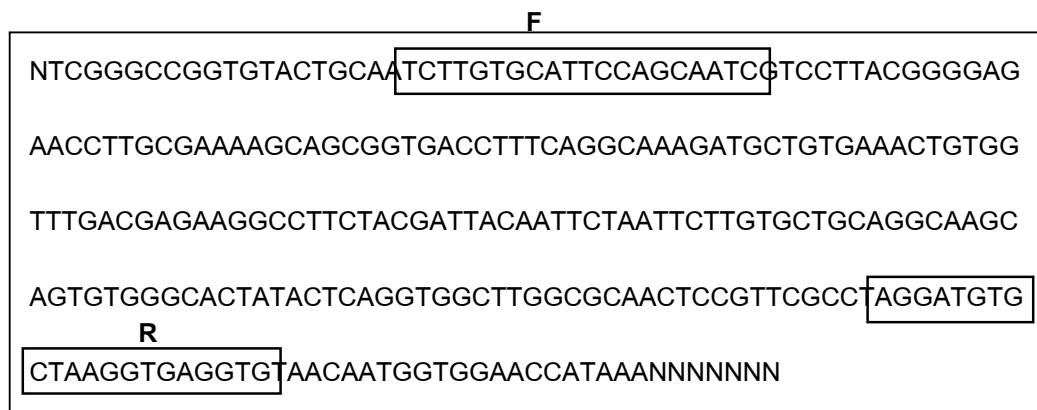
ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-1* จากยางพาราจริง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PR-1* ที่ได้นี้ จัดเป็นยีน *PR-1* ในกลุ่มใด เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* หลายกลุ่ม เช่น *PR-1a*, *PR-1b* และ *PR-1c* อาจเป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ผู้วิจัยใช้ในการออกแบบ primers นั้นเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงในทุกกลุ่มของยีน *PR-1* และยังเป็น degenerate primers ซึ่งออกแบบมาจากพืชอื่นซึ่งอาจยังไม่มี ความจำเพาะกับยีน *PR-1* ในยางพารา 100% ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไป

จากนั้นจึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 315 bp นี้เพื่อออกแบบ specific primers ของยางพาราเพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน *PR-1* ในยางพารา รวมทั้งใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

3.2.2 ผลการออกแบบ specific primers

ออกแบบ specific primers จากโปรแกรม primer3 และพิจารณาบริเวณที่มีความอนุรักษ์ รวมทั้งเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของ primers ที่ออกแบบได้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn เพื่อหาว่า primers ที่ออกแบบมีความคล้ายคลึงกับยีนอื่นๆ ในพืชหรือไม่ ผู้วิจัยได้ออกแบบ primers เพื่อใช้เป็น specific primers ของยางพาราและมีขนาดของ PCR product 210 bp โดยตั้งชื่อ primers นี้ว่า HbPR-1F สำหรับ specific forward primer และ HbPR-1R สำหรับ specific reverse primer ดังแสดงในรูปที่ 3.13 และมีคุณสมบัติดังตารางที่

3.4

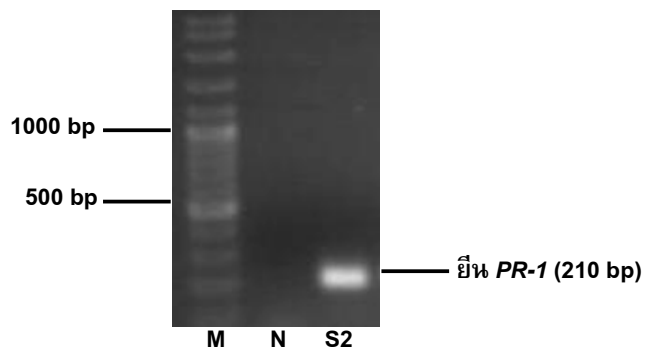


รูปที่ 3.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PR-1* ในยางพาราที่อ่านได้จาก degenerate primers ขนาด 210 bp บริเวณในกรอบสี่เหลี่ยมคือบริเวณที่ออกแบบเป็น specific primers F: specific forward primer (Hb-PR1F) และ R: specific reverse primer (Hb-PR1R)

ตารางที่ 3.4 คุณสมบัติ specific primers ที่ออกแบบได้

| primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ | Tm (°C) | MW | No. Bases |
|---------|-----------------------------|---------|------|-----------|
| Hb-PR1F | 5' TCTTGTGCATTCCAGCAATC 3' | 44.6 | 7681 | 20 |
| Hb-PR1R | 5' CACCTCACCTTAGCACATCCT 3' | 49.2 | 6246 | 21 |

นำ specific primers ที่ออกแบบได้มาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA พบว่าได้แถบของยีน 1 แถบ ที่มีขนาด 210 bp ดังรูปที่ 3.14 ซึ่งตรงกับขนาดของชิ้นยีนที่ออกแบบไว้ ผู้วิจัยจึงนำ PCR product นี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองว่าชิ้นยีนที่ได้เป็นยีน *PR-1* ที่ได้จากยางพาราจริงเพื่อใช้ specific primers ดังกล่าวในการศึกษาขั้นต่อไป



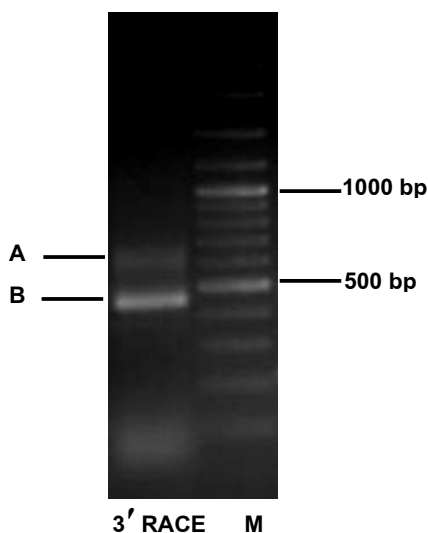
รูปที่ 3.14 PCR product ของยีน *PR-1* จาก cDNA ของใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ซึ่งผ่านการฉีดพ่นด้วย SA เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยใช้ specific primers; ช่องที่ 1: 100 bp DNA ladder (M), ช่องที่ 2: negative control (N), ช่องที่ 3: PCR product (S2)

หลังจากส่ง PCR product เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนได้จาก specific primers และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank อีกครั้ง โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่าชิ้นยีนที่ได้นี้มีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นๆ อยู่ในช่วง 60-97% ได้แก่ *Vitis pseudoreticulata* 97% (accession no. GU269634.1), *Vitis hybrid cultivar Tamnara Tam* 95% (accession no. AB372568.1), ถั่วลิสงเตา 90% (*Pisum sativum* accession no. AJ586324.1), แตงกวา 89% (*Cucumis sativus* accession no. AF475286.1), พริกเชอร์รี่ 65% (*Capsicum annuum* accession no. AF053343.2), ราชเบอร์รี่ 65% (*Rubus articus* accession no. EU528030.1) และ *Betula pendula* 60% (accession no. AJ279696.1) และไม่พบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีนอื่นๆ ในพืชเลย ดังนั้นจากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PR-1* จริง (ความยาว 210 bp) และ specific primers ที่ออกแบบได้จะสามารถนำไปใช้ได้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในยางพารารวมทั้งใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *PR-1* ในยางพาราด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

3.2.3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน *PR-1* ใน ยางพาราด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

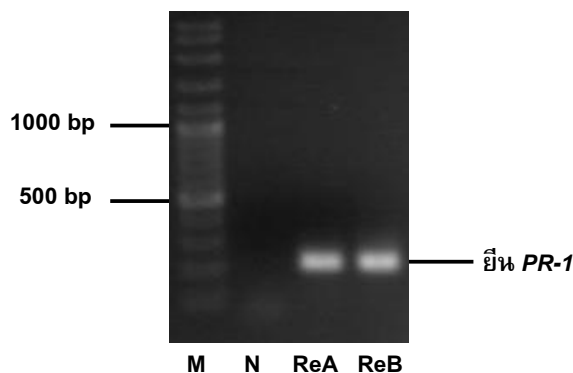
3.2.3.1 ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มขึ้นส่วน DNA ด้านปลาย 3'

สร้างสาย first-strand cDNA โดยการใช้นิวคลีโอไทด์ reverse transcriptase และใช้ oligo dT- anchor primers ตามขั้นตอนของบริษัท จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific forward primer (HbPR-1F) และ PCR anchor primer เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 3' หลังจากตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis ปรากฏ 2 แถบของ DNA บน agarose gel ดังรูปที่ 3.15 ขนาดประมาณ 600 bp (แถบ A) และ 450 bp (แถบ B)



รูปที่ 3.15 PCR product ที่ได้จากการทำ 3' RACE; ช่องที่ 1: PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ HbPR-1F และ PCR anchor primer (3' RACE), ช่องที่ 2: 100 bp plus DNA ladder (M) โดยใช้ cDNA จากใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ซึ่งผ่านการฉีดพ่นด้วย SA

หลังจากทำบริสุทธิ์แถบ A และแถบ B ได้นำไปทำ reamplification โดยใช้ specific primers (Hb-PR1R/Hb-PR1F) ซึ่งออกแบบไว้ก่อนหน้าพบว่าแถบ A และ B ประกอบด้วยบางส่วนของยีน *PR-1* อยู่จริงเพราะยังคงได้ PCR product ขนาด 210 bp (ดูรูปที่ 3.16) จึงส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ DNA ทั้ง 2 แถบ



รูปที่ 3.16 การตรวจสอบแถบ A และ B ที่ได้จากการทำ 3' RACE; ช่องที่1: 100 bp plus DNA ladder (M), ช่องที่ 2: negative control (N), ช่องที่ 3, 4: PCR product จากการทำ reamplification แถบ A และ B (ReA และ ReB ตามลำดับ) โดยใช้ specific primers ของยีน *PR-1* (Hb-PR1R/Hb-PR1F)

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA จากการส่ง PCR product พบว่าทั้ง 2 แถบมีขนาดใหญ่กว่าที่คาดคะเนจาก agarose gel กล่าวคือที่คาดคะเนไว้มีขนาดประมาณ 600 bp และ 450 bp แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาดถึง 655 bp และ 521 bp (แถบ A และ B ตามลำดับ) ซึ่งอาจเกิดจากการม้วนพับของ DNA ดังกล่าวจึงทำให้เคลื่อนที่เร็วกว่า DNA marker ซึ่งเป็นเส้นตรงและเมื่อเทียบหาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งแถบ A และแถบ B มีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นๆ หลายชนิด อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ primers จำเพาะนั้นไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ hybridize กับ primers ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้โดยการ insert ยีนเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์และที่พลาสมิดเวกเตอร์จะมีบริเวณจำเพาะที่เป็นตำแหน่งจับของ primers ซึ่งจะทำให้อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการได้ทั้งหมด ประกอบกับพลาสมิดเวกเตอร์สามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียจึงทำให้ insert ยีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย

การโคลนยีนผ่านทางพลาสมิดเวกเตอร์ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนหลัก คือ 1) การเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการ insert ด้วยเทคนิค PCR, 2) การเชื่อมระหว่างพลาสมิดเวกเตอร์และยีนที่ต้องการ insert ด้วยเอนไซม์ ligase, 3) การถ่ายโอน ligated product เข้าสู่แบคทีเรีย และ 4) ทดสอบหาโคโลนีที่มีพลาสมิดเวกเตอร์พร้อมยีนที่ต้องการ insert ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยทำการโคลน DNA จากแถบ A และแถบ B ผ่านระบบเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega)

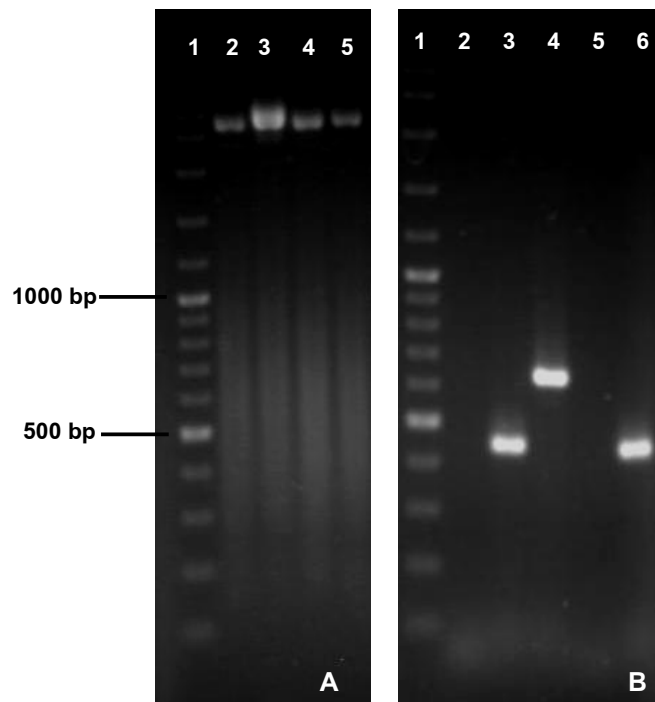
3.2.3.2 ผลการโคลนยีน *PR-1* ของยางพาราทางด้าน 3'

เพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 3' อีกครั้งด้วยวิธี PCR โดยใช้ HbPR-1F และ PCR anchor primer จะได้แถบ A และ B เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นทำบริสุทธิ์แถบ A และ B จาก agarose gel แล้วเชื่อมต่อกับ DNA ทั้งสองกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega) พลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้มียีน *lacZ* และยีนที่ต่อต่อยา ampicillin เป็นตัวติดตาม

หลังจากเชื่อมต่อกับ DNA ทั้งสองกับพลาสมิดเวกเตอร์แล้วจะได้เวกเตอร์ลูกผสมซึ่งจะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (competent cell) ในที่นี้ใช้ *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10 (Invitrogen) โดยวิธี heat shock transformation จากนั้นเลี้ยงให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตในอาหาร LB broth แล้ว spread แบคทีเรียลงบนอาหาร LB agar ที่มี ampicillin, Isopropylthio- β -galactoside (IPTG) และ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) บ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าเป็นโคโลนีที่มียีนที่เราต้องการ

จากนั้นนำโคโลนีที่คัดเลือกมาทำการสกัดพลาสมิดของแบคทีเรียโดยใช้ STET (ประกอบด้วย 8% sucrose, 5% Triton-X 100, 50 มิลลิโมลาร์ EDTA, 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8) เพื่อตรวจหาเวกเตอร์ลูกผสม แล้วทำ PCR โดยใช้ HbPR-1F และ PCR anchor primer พบว่าการโคลนแถบ A และแถบ B มียีน insert ขนาด 650 bp และ 450 bp ตามลำดับ แล้วตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primers เพื่อเป็นการยืนยันว่าในชิ้นยีน insert นั้นมียีน *PR-1* เป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองพบว่าโคโลนีสีขาวซึ่งคัดเลือกมามีชิ้นยีน *PR-1* อยู่จริง จากการทดลองนี้ทำให้ผู้วิจัยมั่นใจว่าโคโลนีที่คัดเลือกมานั้นได้รับการ insert ยีนที่ถูกต้อง

ทำการคัดเลือกบางโคโลนีไปสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ รูปที่ 3.17A แสดงขนาดของพลาสมิดจากโคโลนี C1 และ C2 ของการโคลนแถบ A และโคโลนี C'1 และ C'2 ของการโคลนแถบ B จะเห็นว่าพลาสมิดที่สกัดได้มีขนาดประมาณ 2.7 kbp (pGEM[®]-T Easy มีขนาด 3.015 kbp) เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA ladder ทั้งนี้เพราะมีรูปร่างเป็น supercoil จึงทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ladder ทั้งที่มีการ insert ยีน *PR-1* เข้าไปแล้วและเมื่อตรวจสอบยีน insert อีกครั้งด้วยวิธี PCR โดยใช้ HbPR-1F และ PCR anchor primer ดังรูปที่ 3.17B พบว่าโคโลนี C1 มียีน insert ขนาดประมาณ 450 bp ซึ่งไม่ตรงกับขนาดของแถบ A ที่ได้ insert เข้าไป, โคโลนีที่ C2 มียีน insert ขนาด 650 bp ซึ่งตรงกับขนาดของแถบ A, โคโลนี C'1 ของการโคลนแถบ B ไม่พบยีน insert และโคโลนีที่ C'2 พบยีน insert ขนาดประมาณ 450 bp ซึ่งตรงกับขนาดของแถบ B ดังนั้นโคโลนีที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์คือ C1, C2 และ C'2



รูปที่ 3.17 พลาสมิดลูกผสมที่สกัดโดยใช้ชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) **A:** การตรวจสอบพลาสมิด; ช่องที่ 1: 100 bp plus DNA ladder, ช่องที่ 2-3: โคลนีที่ 1-2 ของการโคลนแถบ A (C1-C2), ช่องที่ 4-5: โคลนีที่ 1-2 ของการโคลนแถบ B (C'1-C'2) **B:** ผลการตรวจสอบยีน insert ในพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี PCR; ช่องที่ 1: 100 bp plus DNA ladder, ช่องที่ 2: negative control, ช่องที่ 3-6: ผลการตรวจสอบยีน insert ในรูป A เรียงตามลำดับ

3.2.3.3 ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-1* ของยางพาราทางด้านปลาย 3'

หลังจากส่งพลาสมิดเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน insert แล้วพบว่าแถบ A มีขนาด 603 bp เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในฐานข้อมูลของ GenBank มีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นอยู่ในช่วง 33-43% และแถบ B มีขนาด 404 bp มีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นในระดับปานกลางอยู่ในช่วง 58-72% จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน *PR-1* จากยางพาราที่ได้นั้นอยู่ในระดับปานกลางจนถึงต่ำซึ่งน้อยกว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ได้มาจากการทดลองก่อนหน้านี้ที่มีขนาด 210 bp ซึ่งได้ค่าความคล้ายคลึงอยู่ในระดับปานกลางถึงสูงคือ 60-97% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่ที่ได้จากทั้งสองแถบ (แถบ A และแถบ B) มีความยาวมากกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ specific primers ประมาณ 400 และ 200 bp ตามลำดับ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบทั้งสองมีความยาวจนถึงส่วนของ poly A tail (ดังรูปที่ 3.18) ซึ่งรวม

เอาส่วนที่เป็น non-coding sequences (ตั้งแต่ stop codon จนถึง poly A tail) เข้าไปด้วยจึงทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงโดยรวมลดลง

จากนั้นผู้วิจัยทำการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาบริเวณที่เป็น coding sequences ผ่านทางโปรแกรมในเว็บไซต์ <http://au.expasy.org/tools/dna.html> (โปรแกรมซึ่งใช้สำหรับการคาดคะเนคุณสมบัติของโปรตีน) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบ A และแถบ B มีตำแหน่ง codon ที่เริ่มแปลรหัสได้และตำแหน่ง stop codon อยู่ในตำแหน่งเดียวกันดังรูปที่ 3.18 นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่ง codon ที่เริ่มแปลรหัสได้และ stop codon ของ DNA ทั้ง 2 ชั้นมีความอนุรักษ์สูงและเมื่อนำบริเวณดังกล่าวไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นสูงชันเป็นอย่างมากคืออยู่ในช่วง 70-92% จึงกล่าวได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-1* ในยางพาราจริง ลำดับกรดอะมิโนของแถบ A และแถบ B ที่ได้จากการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังรูปที่ 3.19

codon ที่เริ่มแปลรหัสได้

```

band_A : TCTTGTGCATTCCAGCAATCGTCCTTACGGGGAGAACCTTGCGAAAAGCAGCGGGACCT : 60
band_B : TCTTGTGCATTCCAGCAATCGTCCTTACGGGGAGAACCTTGCGAAAAGCAGCGGTGACCT : 60

band_A : TTCAGGCAAAGATGCTGTGAAACTGTGGGTTGACGAGAAGGCCTTCTACGATTACAATTC : 120
band_B : TTCAGGCAAAGATGCTGTGAAACTGTGGGTTGACGAGAAGGCCTTCTACGATTACAATTC : 120

band_A : TAATTCCTGTGCTGCAGGCAAGCAGTGTGGGCACCTATACTCAGGTGGTTTGGCGCAACTC : 180
band_B : TAATTCCTGTGCTGCAGGCAAGCAGTGTGGGCACCTATACTCAGGTGGTTTGGCGCAACTC : 180

band_A : AGTTTCGCTAGGATGTGCTAAGGTGAAGTGCAACAATGGAGGAACCTTCATTGGATGCAA : 240
band_B : GGTTCGCTAGGATGTGCTAAGGTGAAGTGCAACAATGGAGGAACCTTCATTGGATGCAA : 240

                                stop codon
band_A : CTATGACCTCCTGGCAACTTTGTTGGGCAGCGACCTTATAAATAAAAATCGTCGTGGTA : 300
band_B : CTACGACCTCCTGGCAACTTTGTTGGGCAGAAACCTTATAAATGAAA-----AATC : 293

band_A : TTCAAGTTGTCTGTAGCTTGTTCATTTTCAGTAATAAGTGAAACAAGCTTGTTCG---G : 357
band_B : TTCA-----TGGTATCGTGTTTCTGTTCATTAATAAGTGAAACAAGCTTGTTCATATATG : 346

band_A : TGGTCTCAACTCTG-TGTCAAAGCTGTTTGTTCAGCTGTCTTCCTGCAGTATTAGTAT : 416
band_B : TATTATCAAGCATAACAATAAAACAGTTAATT---AGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA : 403

                                poly A tail
band_A : GTTTGTGCTGGGAATAATTTTGTGGCTGATCATCTGCTTGCCGTAAGAGCTCTTGATGTT : 476
band_B : A----- : 404

band_A : CATGAGTGTGAATTTTCTATTGCAGTCTTCCTTTGAATGTTGCTTGGGTTATTTCTAAG : 536
band_B : ----- : -

band_A : GATATATTGTTGTTTAAATTGTTGTTTCAGTTCTAATGAAATTGTTATTATAAAAAAAAA : 596
band_B : ----- : -

                                poly A tail
band_A : AAAAAAA : 603
band_B : ----- : -

```

รูปที่ 3.18 ผลการทำ sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal-X alignment (Thompson *et al.*, 2001) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-1* ที่อ่านได้จากการโคลนแถบ A และแถบ B แถบสีดำแสดงบริเวณที่มีความอนุรักษ์ 100% ในกรอบสี่เหลี่ยมคือบริเวณ stop codon และ poly A tail ของลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบ A และแถบ B ในรูปที่ 3.20 พบว่าได้จำนวนของกรดอะมิโนเท่ากันทั้ง 2 แถบ โดยมีความยาวนับจาก codon ที่เริ่มแปลรหัสได้ จนถึง stop codon (ดังรูปที่ 3.19) เท่ากับ 93 กรดอะมิโน ซึ่งแถบโปรตีนที่ได้ทั้ง 2 แถบนี้มีความเหมือนกันร้อยละ 98.9 กล่าวคือมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน 1 ตำแหน่งคือตำแหน่งที่ 91 อย่างไรก็ตามตำแหน่งดังกล่าวไม่ใช่ตำแหน่งสำคัญในการทำงานของโปรตีนนี้หรือเป็นตำแหน่งที่ใช้เพื่อบ่งบอกความแตกต่างของโปรตีน 2 ชนิดนี้ได้ จึงต้องศึกษา

ด้านปลาย 5' ต่อไป และเมื่อพิจารณาความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้กับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนี้มีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 91-100% กับโปรตีน PR-1 ในพืชอื่นๆ หลายชนิด ดังนั้นสรุปได้ว่าประสบความสำเร็จในการได้มาซึ่งบางส่วนของโปรตีน PR-1 (93 กรดอะมิโน) จากยางพาราชื่อ HeveaPR-1_A (protein_A) และ HeveaPR-1_B (protein_B)

```

Protein_B : LVHSSNRPYGENLAKSSGDLGKDAVKLWVDEKAFYDYNNSNSCAAGKQCGHYTQVWVRNS : 60
Protein_A : LVHSSNRPYGENLAKSSGDLGKDAVKLWVDEKAFYDYNNSNSCAAGKQCGHYTQVWVRNS : 60

```

↓

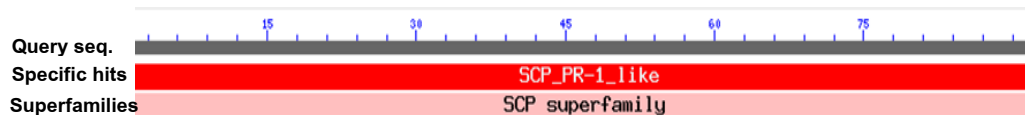
```

Protein_B : VRLGCAKVKCNNGGTFIGCNYDPPGNFVGQKPY : 93
Protein_A : VRLGCAKVKCNNGGTFIGCNYDPPGNFVGQRPY : 93

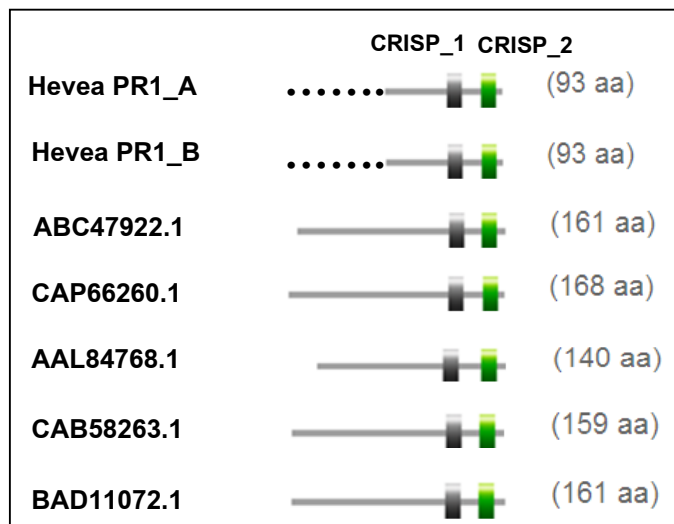
```

รูปที่ 3.19 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบ A และแถบ B แถบสีดำแสดงส่วนที่มีความอนุรักษ์ ตำแหน่งลูกศรชี้เป็นตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันของ protein_A และ protein_B โดยใช้โปรแกรม Clustal-X alignment (Thompson *et al.*, 2001)

หลังจากการ blast กับฐานข้อมูลของ GenBank พบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโนคือ SCP (rodent sperm-coating glycoprotein) _PR-1 like domain (รูปที่ 3.20) ซึ่งเป็น domain หลักของโปรตีนกลุ่มที่ถูกขนส่งออกนอกเซลล์ (extracellular protein) และจัดอยู่ในกลุ่ม cysteine-rich secretory proteins (CRISP) โดยลักษณะเหล่านี้จัดเป็นลักษณะเด่นของโปรตีน PR-1 (Van Loon and Van Strien, 1999) domain ที่พบประกอบไปด้วย 2 บริเวณ ได้แก่ CRISP1 บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 50-60 (GHYTQVWVRNS) และ CRISP2 ตำแหน่งที่ 76-87 (FIGCNYDPPGNF) (รูปที่ 3.21) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และโปรตีน PR-1 ในพืชอื่นพบตำแหน่ง CRISP1 มีความอนุรักษ์ 100% ระหว่างโปรตีนดังกล่าว ในขณะที่ตำแหน่ง CRISP2 แม้ว่าจะไม่เป็นลำดับอนุรักษ์ 100% แต่จัดว่ามีลำดับอนุรักษ์สูง (รูปที่ 3.22)



รูปที่ 3.20 ผลการ blast ลำดับกรดอะมิโน (protein_A และ protein_B) ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank พบตำแหน่ง SCP_PR-1 like domain โดยใช้โปรแกรม Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)



รูปที่ 3.21 เปรียบเทียบ domain สำคัญของโปรตีนที่ได้ กับโปรตีน PR-1 จากพืชอื่น ได้แก่ แอปเปิ้ล, บีทรูท, แตงกวา, มันฝรั่งและพริก (accession no. ABC47922.1, CAP66260.1, AAL84768.1, CAB58263.1 และ BAD11072.1 ตามลำดับ) (<http://ca.expasy.org/prosite/>)

จากการศึกษาของ Van Loon และ Van Strien (1999) พบว่า โปรตีน PR-1 มีโครงสร้างจำเพาะคือ มี hydrophobic signal sequence จึงเป็น extracellular protein นอกจากนี้ยังประกอบด้วย cysteine 6 residues เพื่อเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และมี 4 α -helixes และ 4 β -strands ซึ่งโครงสร้างนี้จะทำให้การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของ cysteine ทั้ง 6 residues มีความเสถียรมากขึ้น (Hoegen *et al.*, 2002) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับโปรตีน P14a (PR-1b ของมะเขือเทศ) (Fernández *et al.*, 1997) พบว่า HeveaPR-1_A และ HeveaPR-1_B ประกอบด้วย 2 α -helixes และ 3 β -strands

นอกจากนั้นผู้วิจัยนำลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน PR-1 (HeveaPR-1_A และ HeveaPR-1_B) (93 กรดอะมิโน) ที่ได้ข้างต้นมาเปรียบเทียบกับโปรตีน PR-1 จากพืชชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 3.22 ซึ่งพบว่าประกอบด้วย cysteine 5 residues (บริเวณที่ลูกศรชี้) สำหรับ cysteine 1 residues ที่เหลือจะอยู่บริเวณก่อนหน้าลำดับกรดอะมิโนที่ได้ (ลูกศรเส้นประชี้) เมื่อพิจารณาจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 ส่วนใหญ่ซึ่งมีความยาวประมาณ 160 กรดอะมิโน ดังนั้นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 จากยางพาราที่ได้ยังขาดอีกประมาณ 70 กรดอะมิโน ซึ่งควรจะทำการศึกษาในโอกาสต่อไปและยังพบบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงติดต่อกันถึง 8 residues คือ GHYTVVW ซึ่งตรงกับ CRISP1 และพบในทุกโปรตีน PR-1 ที่นำมาเปรียบเทียบ เนื่องจากเป็น domain ที่สำคัญของโปรตีนชนิดนี้ (ดังที่อภิปรายไว้ข้างต้น) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณนี้มีความอนุรักษ์ระหว่างโปรตีน PR-1 ในพืชและโปรตีน homologous PR-1 ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วย เช่น human glioma pathogenesis-related proteins (GliPR) (Hoegen *et al.*, 2002)

```

HeveaPR1_A : ----- : -
HeveaPR1_B : ----- : -
ABC47922.1 : MGLCN--ISLALLFILGSLVIQSSHAQDTPQDYLKSHNDARAAVGVGPLT : 48
CAP66260.1 : MNLPKNLASYLCFFATLALAQMCHAQNSPQDYVNAHNDARAAGVGNIQ : 50
AAL84768.1 : -----AQDSPQDFVGVHNVARAQVGVGPIE : 25
CAB58263.1 : MGLFN--ISLLLTCMLVLAI FHSCDAQNSPQDYLVHNDARAQVGVGPM : 48
BAD11072.1 : TGLFN--ISLLLVSMLILAI FHSCDAQNSPQDYLEVHNNARAQVGVGPMT : 48

HeveaPR1_A : -----LVHSSNR-PYGENLAKSSGD---LSGKDA : 25
HeveaPR1_B : -----LVHSSNR-PYGENLAKSSGD---LSGKDA : 25
ABC47922.1 : WDDKVAGYAQNYANQHVGDCLVHSGG--PYGENLAMSTGD---MSGTAA : 93
CAP66260.1 : WDDQVAFAAQYADQRKGDCLVHSGGGGRYGENLAGGSGPGLVLTATTA : 100
AAL84768.1 : WDKTVAFAAQYANRRLNDCRLVNSGG--PYGENIANGSPD---LSAKDA : 70
CAB58263.1 : WDAGLASRAQNYANSRTGDCNLIHSGA---GENLAKGSGD---FTGRAA : 91
BAD11072.1 : WDAGLASRAQNYANSRTGDCNLIHSGP---GENLAKGGSD---FTGRAA : 91

HeveaPR1_A : VKLWVDEKAFYDYNMSCAAGKQCCHYTVVWRISVRLGCAKVKCENN--G : 73
HeveaPR1_B : VKLWVDEKAFYDYNMSCAAGKQCCHYTVVWRISVRLGCAKVKCENN--G : 73
ABC47922.1 : VDMWVAEKADYSYESMSCADGKVCGHYTVVWRISARVGCARVVCSS--G : 141
CAP66260.1 : VQMWVAEKADYDYNSTCASGKVCGHYTVVWRISVRLGCARVQCDN--G : 148
AAL84768.1 : VQLWVDEKPFYNYETNTCAAGELCGHYTVVWRISVRLGCAKVRCTDNIG : 120
CAB58263.1 : VQLWVGEKPNYNYGTNQCASGQVCGHYTVVWRISVRLGCGRARCENN--G : 139
BAD11072.1 : VELWVGEKPNYNHGTNQCASGKVCGHYTVVWRISVRLGCGRARCENN--G : 139

↓ CRISP2
HeveaPR1_A : GTFVGCNYDPEGNFVGRPY-- : 93
HeveaPR1_B : GTFVGCNYDPEGNFVGRPY-- : 93
ABC47922.1 : GTFVGCNYDPEGNFVGRPY-- : 161
CAP66260.1 : GTFVGCNYDPEGNFVGRPY-- : 168
AAL84768.1 : GTFVGCNYDPEGNFVGRPY-- : 140
CAB58263.1 : WVFVGCNYDPEGNFVGRPY-- : 159
BAD11072.1 : WVFVGCNYDPEGNFVGRPY-- : 161

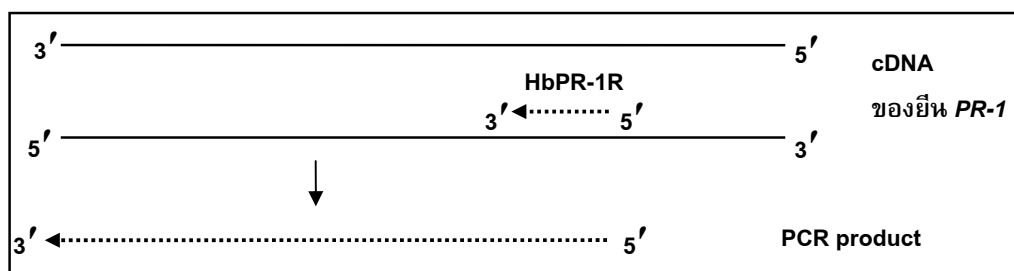
```

รูปที่ 3.22 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบ A และ B (HeveaPR-1_A และ HeveaPR-1_B ตามลำดับ) กับโปรตีน PR-1 จากพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ แอปเปิ้ล, บัทรูท, แตงกวา, มันฝรั่งและพริก (accession no. ABC47922.1, CAP66260.1, AAL84768.1, CAB58263.1 และ BAD11072.1 ตามลำดับ) ใช้โปรแกรม Clustal-X alignment (Thompson *et al.*, 2001) บริเวณแถบสีดำแสดงส่วนที่มีความอนุรักษ์ 100% และในกรอบสี่เหลี่ยมเป็น sequences ช่วงที่มีความอนุรักษ์ติดต่อกัน 8 residues บริเวณที่ลูกศรชี้ลงแสดงให้เห็นบริเวณ cysteine residue ที่เป็นกรดอะมิโนสำคัญของโปรตีน PR-1

3.2.4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5'

จากการสร้างสาย first-strand cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ตามขั้นตอนของบริษัทโดยใช้ HbPR-1R เป็น primer แล้วนำ first-strand cDNA มาทำ PCR โดยใช้ primers คือ oligo dT-anchor primer และ HbPR-1R เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 5' ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis ผลการทดลองไม่ประสบความสำเร็จในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' เนื่องจากไม่ปรากฏขึ้นในใดๆ

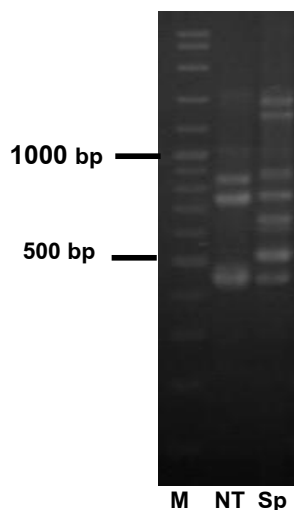
ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้ specific reverse primer (HbPR-1R) เพียงเส้นเดียวเพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' โดยในปฏิกิริยาจะมีการเตรียม reaction mixture เช่นเดียวกับข้อ 2.1.5 โดยมี 10 มิลลิโมลาร์ HbPR-1R (5'-CACCTCACCTTAGCACATCCT-3') ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และใส่ cDNA template จำนวน 100 นาโนกรัม โดยมีหลักการของการทำ PCR วิธีนี้คือ HbPR-1R จะเพิ่มจำนวน DNA เพียงด้านเดียวทางปลาย 5' ตามความสามารถของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และความสามารถในการเข้าจับอย่างจำเพาะกับยีน *PR-1* ของ HbPR-1R ดังรูปที่ 3.23 จากนั้นจะสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไปทางด้านปลาย 5' จนเต็มเส้นโดยการทำให้ DNA walking จนกว่าจะถึง start codon ต่อไปในการทดลองนี้จะใช้ทั้ง cDNA จากใบยางพาราที่ไม่ผ่านและผ่านการทดสอบด้วยเชื้อ *P. palmivora* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3.23 แผนผังสรุปขั้นตอนการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' โดยการใช้ specific reverse primer (HbPR-1R) เพียงเส้นเดียว

ผลการทำ PCR จาก cDNA ของยางพาราที่ไม่ผ่านและผ่านการทดสอบด้วยเชื้อ *P. palmivora* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้ HbPR-1R แล้วตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ปรากฏ 3 แถบ ของชุดควบคุม (ไม่ผ่านการทดสอบด้วยเชื้อ) และปรากฏ 8 แถบ ของชุดทดลอง (ผ่านการทดสอบด้วยเชื้อ *P. palmivora* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง) ดังรูปที่ 3.24 ซึ่งมีความแตกต่างกันของแบบแผนการแสดงออก (expression pattern) ของยีน *PR-1* ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองทั้งจำนวนและขนาดของแถบ DNA ดังนั้นผู้วิจัยจึงจะทำบริสุทธิ์แถบ DNA ที่ได้ทั้งหมดแล้วทดสอบด้วย specific primers (HbPR-

1F และ HbPR-1R) เพื่อวิเคราะห์ว่าแถบ DNA แถบใดเป็นแถบของยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 5' และเพื่อค้นหา form ของยีน *PR-1* ที่ผลิตขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ



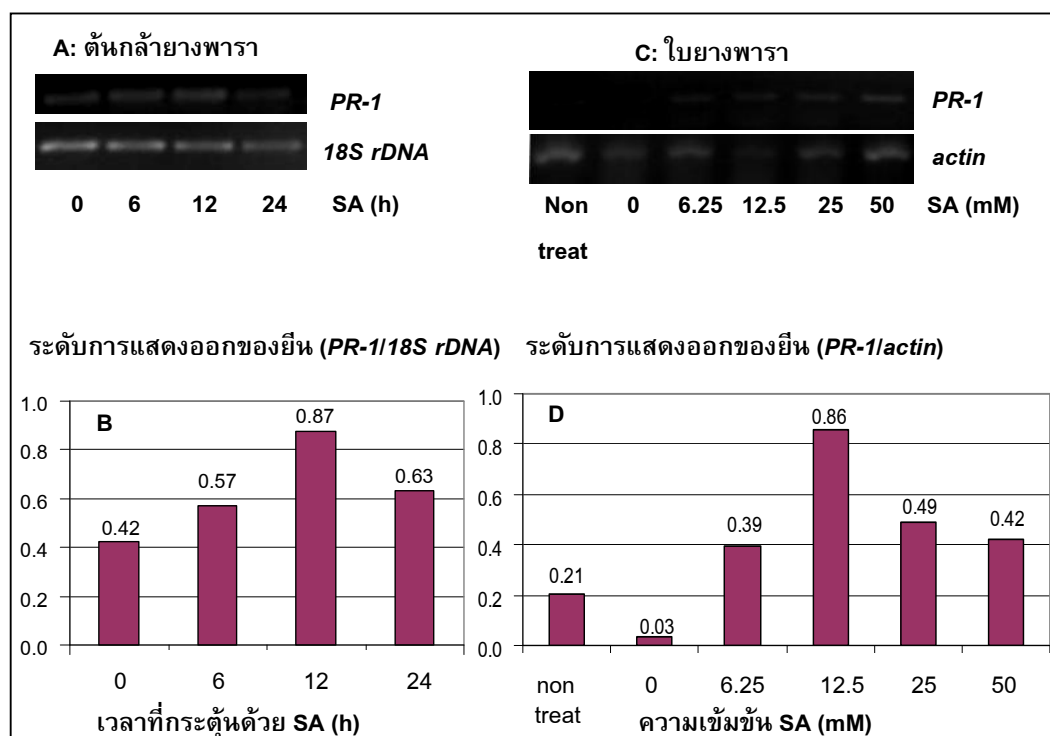
รูปที่ 3.24 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ specific reverse primer เส้นเดียว; ช่องที่ 1: 100 bp plus DNA ladder (M), ช่องที่ 2, 3: PCR product จาก cDNA ของยางพาราที่ไม่ผ่าน (NT) และผ่านการทดสอบด้วยเชื้อ *P. palmivora* (Sp) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

หลังจากทำบริสุทธิ์แถบ DNA ที่ได้ทั้งหมดแล้วทดสอบด้วย specific primers เพื่อวิเคราะห์ว่าแถบใดเป็นแถบของยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 5' พบว่าชุดควบคุมมีเพียงแถบที่ 1 ขนาดประมาณ 850 bp เท่านั้น ที่พบชิ้นยีนบางส่วนของยีน *PR-1* (210 bp) และชุดทดลองพบทั้ง 8 แถบ ซึ่งเป็นไปได้ว่ามียีน *PR-1* หลาย form ในยางพาราหรือมียีน *PR-1* เพียง form เดียวแต่ specific reverse primer สามารถเข้าจับกับชิ้นยีนดังกล่าวได้หลายตำแหน่งจึงทำให้ได้ชิ้นยีนขนาดแตกต่างกัน ดังนั้นอาจจะมี repeated sequences ของยีน *PR-1* ซึ่งควรจะทำการศึกษาโคลนยีนดังกล่าวเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องในโอกาสต่อไป

3.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยรวมด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

3.3.1 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* หลังกระตุ้นยางพาราด้วย SA

การกระตุ้นยางพาราด้วย SA จะใช้ทั้งใบบนต้นกล้ายางพารา (ผลการทดลองนี้ได้จากการศึกษาของนางสาวฐิติกร จันทร์วุ่น ซึ่งฉีดพ่นต้นกล้ายางพาราอายุประมาณ 1 เดือนด้วย SA ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ที่เวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง) และ detached leaves จากศูนย์วิจัยยางสงขลาเพื่อศึกษาผลของ SA ต่อยีน *PR-1* ในยางพารา



รูปที่ 3.25 ผลการแสดงออกของยีน *PR-1* หลังจากกระตุ้นต้นกล้ายางพารา (A, B) และ ใบยางพารา (C, D) ด้วย SA (h คือ ชั่วโมง, mM คือ มิลลิโมลาร์) (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

รูปที่ 3.25A, B เป็นการแสดงออกของยีน *PR-1* ของใบยางจากต้นกล้าซึ่งถูกกระตุ้นด้วย SA (ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์) พบว่าการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง

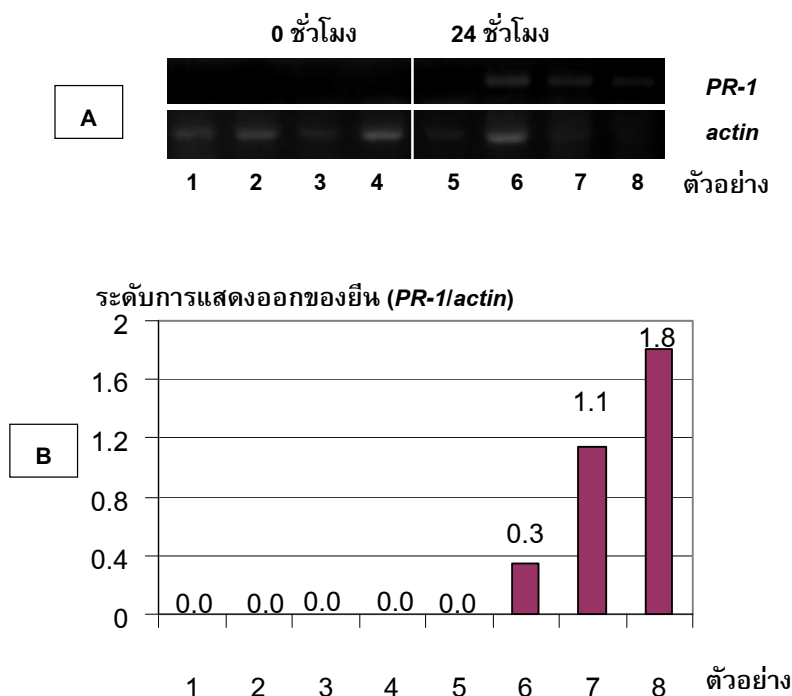
รูปที่ 3.25C, D หลังจากทดสอบ detached leaves โดยการแช่ใบยางพาราทั้งใบใน SA ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยใช้ยีน *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ พบว่า SA มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 มิลลิโมลาร์ SA) และมีการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงสุดที่ 12.5 มิลลิโมลาร์ SA

จากการทดลองตอนต้นซึ่งแสดงให้เห็นความสามารถของ SA ในการชักนำการต้านทานโรคใน detached leaves (รูปที่ 3.3) SA อาจกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ในพืช การสังเคราะห์ลิแกินหรืออาจกระตุ้นการผลิต PRs ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัด จากการทดลองนี้จะเป็นผลจากการทดลองเบื้องต้นที่สามารถชี้ให้เห็นว่า SA มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* ซึ่งเป็น marker ของระบบ SAR ในยางพาราทั้งใบ detached leaves และใบบนต้นกล้วยพารา

3.3.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* จากตัวอย่างใบยางพาราที่บ่มด้วยเชื้อ *P. palmivora*

การศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ตั้งแต่การทดลองนี้เป็นต้นไปจะใช้ยีน *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ (internal control) เนื่องจาก primer ของยีน *18S rDNA* ที่ใช้ก่อนหน้านี้สามารถจับกับยีน *18S rDNA* ของเชื้อ *P. palmivora* ได้ด้วยทำให้ผลการแสดงออกของยีนไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้ยีน *actin* ซึ่ง primer ที่ออกแบบไว้มีความจำเพาะกับยีน *actin* ในยางพาราเท่านั้นใช้ในการทดลองต่อไป

นำตัวอย่างจากการทดลองข้อ 3.1.1 สกัด RNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* รูป 3.26 แสดงระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยมียีน *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ จะเห็นว่าก่อนการทดลอง (เวลา 0 ชั่วโมง) ไม่มีการแสดงออกของยีน *PR-1* แต่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังจากถูกเจาะโดยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (3 ชุดการทดลองจาก 4 ชุดการทดลอง) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *PR-1* ถูกกระตุ้นได้ด้วยเชื้อ *P. palmivora* ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า specific primers ที่ผู้วิจัยออกแบบไว้เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาผลการแสดงออกของยีน *PR-1*



รูปที่ 3.26 ผลการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (จาก 4 ชุดการทดลอง) **A:** การแสดงออกของยีน *PR-1* โดยมียีน *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ ช่องที่ 1-4: การแสดงออกของยีน *PR-1* เวลา 0 ชั่วโมง, ช่องที่ 5-8: การแสดงออกของยีน *PR-1* เวลา 24 ชั่วโมง **B:** ระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* คำนวณจากภาพ A

พิจารณาลักษณะรอยไหม้ของเชื้อในแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าในชุดการทดลองที่ 1 มีรอยไหม้ที่มากกว่าและมีการเปลี่ยนสีของใบยางพาราจากสีเขียวไปเป็นสีเขียวมเหลืองซึ่งแตกต่างจากใบยางพาราในชุดการทดลองที่ 2-4 ซึ่งมีรอยไหม้ขนาดเล็กและมีขอบเขตชัดเจนนั้นคือสามารถกักบริเวณไม่ให้เชื้อแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้เรียกรอยไหม้ใหม่นี้ว่า hypersensitive cell death อีกทั้งเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ยังพบการลุกลามของเชื้อในชุดการทดลองที่ 2-4 น้อยกว่าชุดการทดลองที่ 1 อย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน ดังนั้นใบยางในชุดการทดลองที่ 2-4 น่าจะเคยผ่านการติดเชื้อในธรรมชาติเมื่อมีการกระตุ้นจากเชื้ออีกครั้งจึงมีการกระตุ้นระบบการป้องกันตนเองอย่างรวดเร็วกว่าพืชที่ไม่ได้ผ่านการกระตุ้นมาก่อนทำให้มีการผลิตโปรตีน *PR-1* ซึ่งเป็นโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ในการต้านเชื้อ (Van Loon and Van Strien, 1999) อย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน เป็นผลให้ใบยางจากชุดการทดลองที่ 2-4 ติดเชื่อน้อยลงขณะที่ใบจากชุดการทดลองที่ 1 มีการแสดงออกของยีน *PR-1* ช้ากว่าจึงติดเชื้อมากกว่า

3.3.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกัน

ผลการทดลองพบว่าในชุดควบคุมที่มีความแตกต่างกันเฉพาะอายุของใบยางพาราเท่านั้น จะมีระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงสุด ในใบระยะที่อ่อนที่สุดและลดลงเรื่อยๆ เมื่อใบยางพารามีอายุมากขึ้นตามลำดับดังรูปที่ 3.27

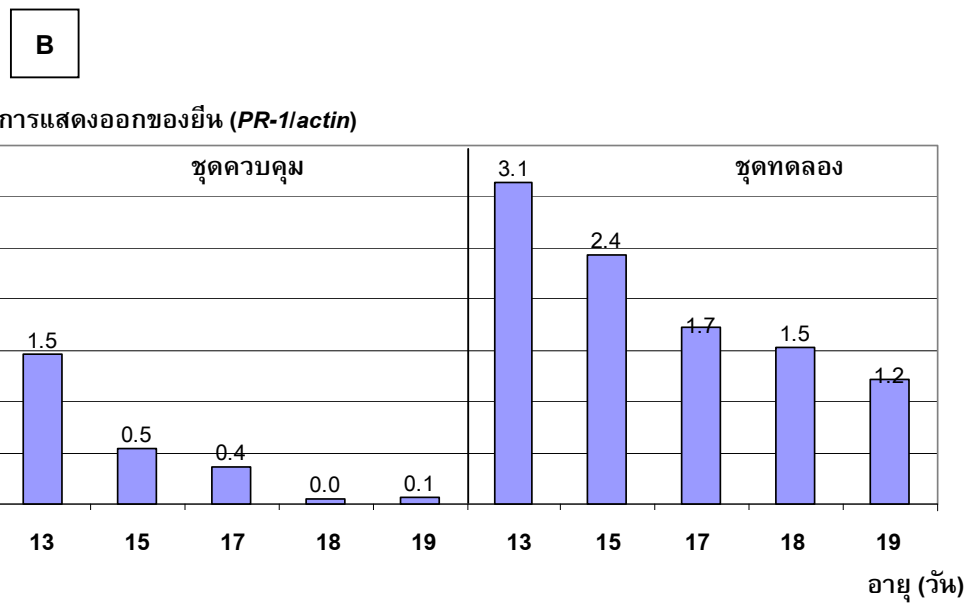
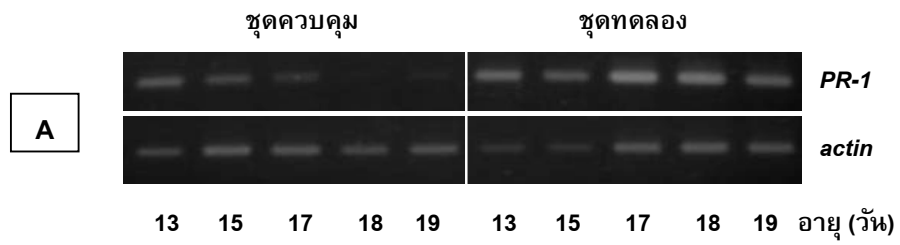
เมื่อพิจารณาในชุดทดลองที่นำใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) ที่มีอายุแตกต่างกันมาบ่มในเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซุโสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบรอยไหม้สีน้ำตาลโดยใบอ่อนมีรอยไหม้รุนแรงมากที่สุดอาจเนื่องมาจากใบมีความอ่อนและบางกว่าจึงโดนเชื้อเจาะมากที่สุด บริเวณที่มีความรุนแรงของรอยไหม้มากที่สุดคือก้านใบซึ่งเป็นบริเวณท่อน้ำเลี้ยงที่เชื้อจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ดังรูปที่ 3.28

หลังจากนำชุดทดลองส่งดูการเรียงแสงของสคอปอลิตินภายใต้แสง UV พบว่ามีการเรียงแสงในทุกอายุของใบยางซึ่งจะมีการเรียงแสงมากที่สุดในใบช่วงอายุ 17 วัน เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* ในชุดที่บ่มด้วยเชื้อพบว่าทุกอายุของใบยางพารามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุมเมื่อเปรียบเทียบกับใบที่มีอายุเท่ากัน เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Hoegen และคณะ 2002 ซึ่งพบว่าจะมีการแสดงออกของยีน *PR-1b* ขึ้นบริเวณที่ติดเชื้อของใบมันฝรั่งเมื่อถูกทำให้ติดเชื้อ *P. infestans* อย่างไรก็ตามจากการทดลองของผู้วิจัยการเจาะเข้าไปในเนื้อใบของใบในแต่ละอายุจะไม่เท่ากัน เนื่องจากความหนาของคิวตินของใบดังกล่าวไม่เท่ากัน การทดลองครั้งต่อไปควรตัดใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมให้มีบริเวณขอบนอกของใบยางพาราที่สัมผัสกับซุโสปอร์เท่าๆ กัน

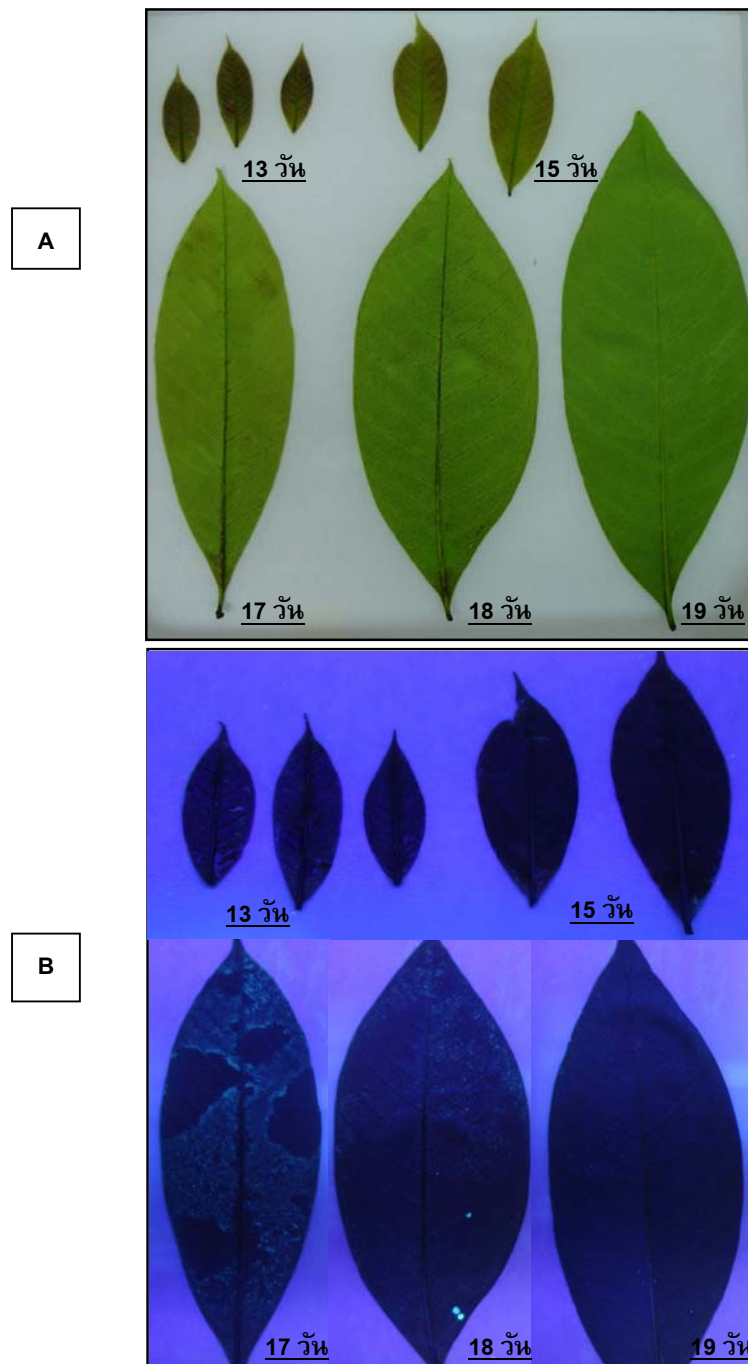
จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* ในใบยางพารา ดังรูปที่ 3.29 เพื่อวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *PR-1* ว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณเชื้อที่เจาะเข้าไปในพืชหรือไม่ ชุดควบคุมไม่มีการแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* เลย ในทุกอายุของใบยางพาราแสดงว่าชุดควบคุมไม่มีการติดเชื้อ *P. palmivora* ดังนั้นผลการแสดงออกของยีน *PR-1* ที่แตกต่างกันในชุดควบคุมเกิดจากความแตกต่างของอายุของใบจริงๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะใบอ่อนมีการป้องกันทางโครงสร้าง (structural defenses) ที่ยังน้อยอยู่เช่นการมีผนังเซลล์ที่บางกว่าหรือมีการสะสมของคิวตินที่น้อยกว่า (Jarvis and Wardrop, 1974) จึงจำเป็นต้องมีการป้องกันตนเองทางชีวเคมี (biochemical defenses) ได้แก่ การผลิต PRs ต่างๆ เช่นเดียวกับการศึกษาของ อรรวรรณ (2551) ที่รายงานว่า PIs (protease inhibitors) ซึ่งเป็น PRs ในกลุ่ม PR-6 (Van Loon and Van Strien, 1999) มีการสะสมในใบอ่อนของยางพาราพันธุ์ BPM-24 มากกว่าใบที่มีอายุมากขึ้น

นอกจากนี้ในชุดทดลองยังพบว่าใบยางพาราช่วงอายุ 15 วัน มีการแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* มากที่สุด นั่นคือมีการติดเชื้อมากที่สุดและใบยางพาราช่วงอายุ 13, 17 และ 18 วัน มีการติดเชื้อรองลงมาและติดเชื้อน้อยที่สุดในใบอายุ 19 วัน ซึ่งตรงกับผลการวิเคราะห์ข้างต้นว่าในใบยางพาราระยะแก่จะมีสิ่งกีดขวางทางกายภาพ ได้แก่ ความหนาของใบมากที่สุดจึงติดเชื้อน้อยที่สุด ความสามารถในการเข้าเจาะของเชื้อที่ไม่เท่ากันนี้เองทำให้ยังไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างชัดเจนว่าการแสดงออกของยีน *PR-1* ที่แตกต่างกันในชุดทดลอง เกิดขึ้นจากปัจจัยใด

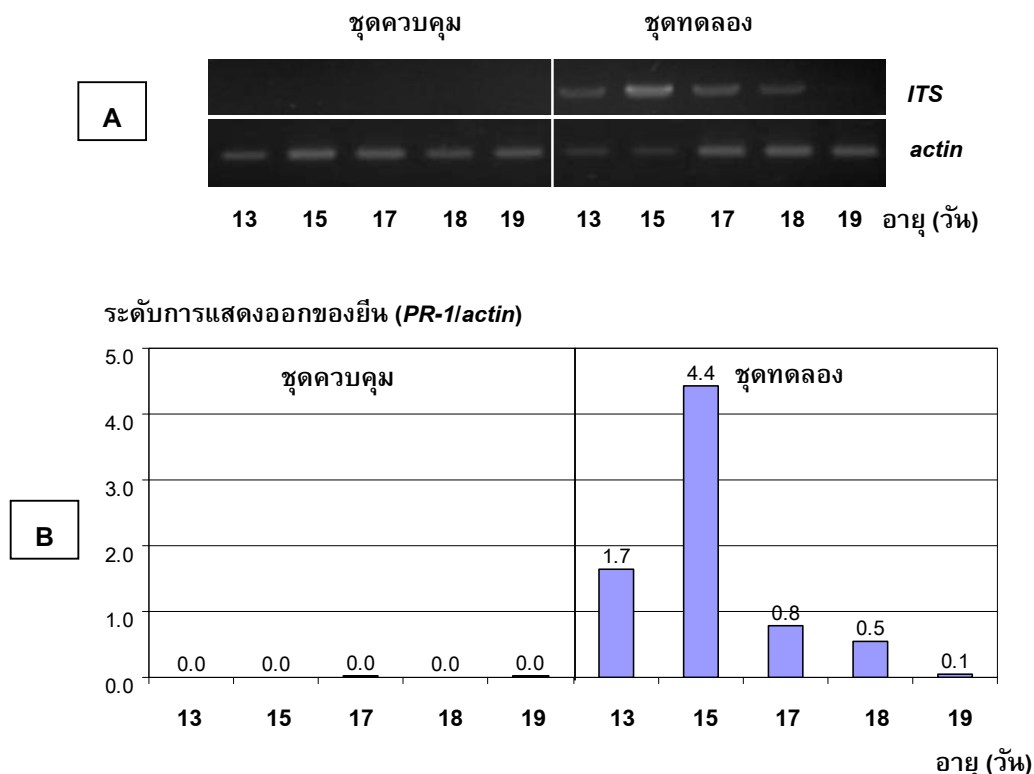
หากพิจารณาเฉพาะใบที่มีอายุ 13-15 วัน พบว่ามีการเจาะของเชื้อในใบอายุ 15 วัน มากกว่า แต่มีการแสดงออกของยีน *PR-1* น้อยกว่า ดังนั้นใบที่มีอายุ 13 วัน มีการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงกว่าอย่างแน่นอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใบอายุ 13 วัน ยังมีคิวตินที่บางมาก จึงจำเป็นต้องมีการป้องกันภายในที่ดีกว่า ส่วนใบที่มีอายุ 15, 17, 18 และ 19 วัน เริ่มมีคิวตินที่หนาขึ้นจึงไม่จำเป็นต้องมีการแสดงออกของยีน *PR-1* ที่สูงนัก Zeier (2005) ได้รายงานไว้ว่าใน *Arabidopsis* จะมีการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของ SA จากใบแก่ไปยังใบอ่อนภายหลังจากติดเชื้อซึ่งโมเลกุลของ SA นี้เองที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณของระบบ SAR ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีน *PR-1* โดยตรง (Gozzo, 2003)



รูปที่ 3.27 การแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกัน **A:** การแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกันโดยมี *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ **B:** ระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยคำนวณจากภาพ A (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)



รูปที่ 3.28 ใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 อายุต่างกันหลังบ่มด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง **A:** เปรียบเทียบการเกิดรอยไหม้ **B:** การเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ภายใต้แสง UV

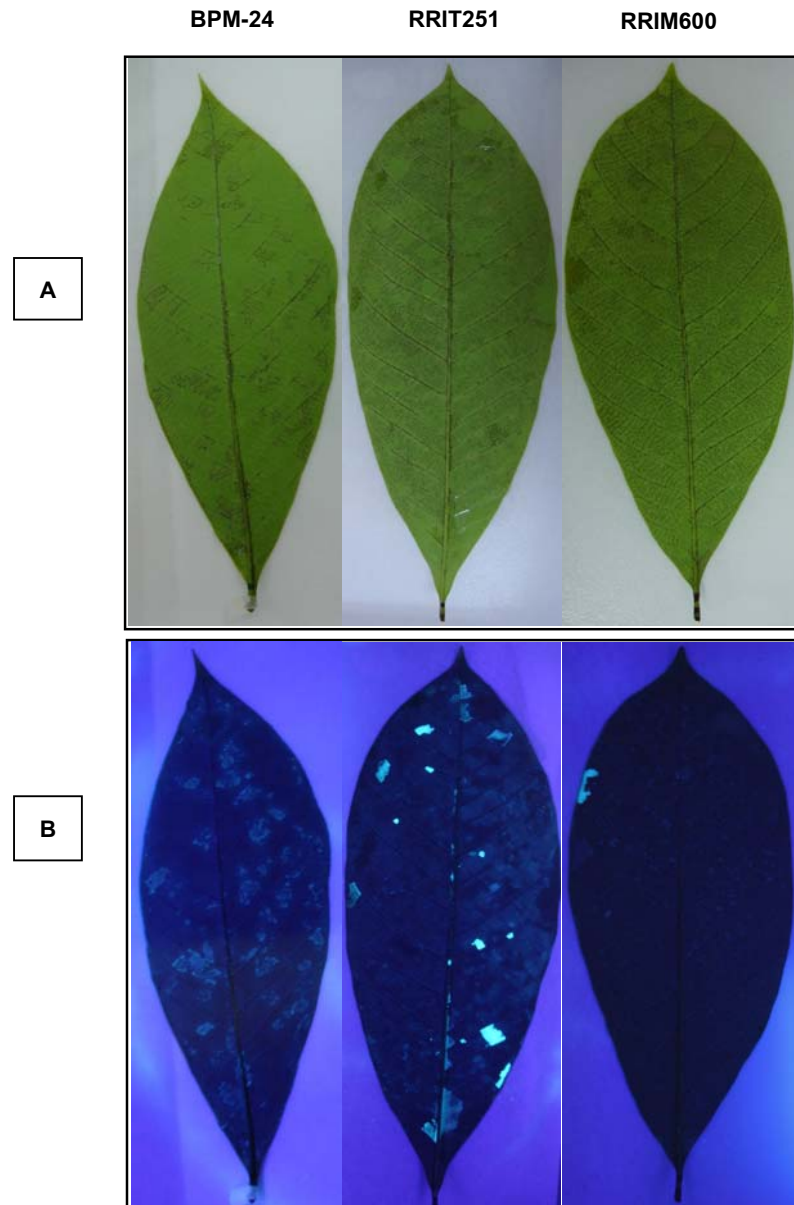


รูปที่ 3.29 การแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* ในใบยางพาราที่มีอายุแตกต่างกัน
A: การแสดงออกของยีน *ITS* ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกันโดยมี *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ
B: ระดับการแสดงออกของยีน *ITS* โดยคำนวณจากภาพ A (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำ การทดลอง)

3.2.4 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ

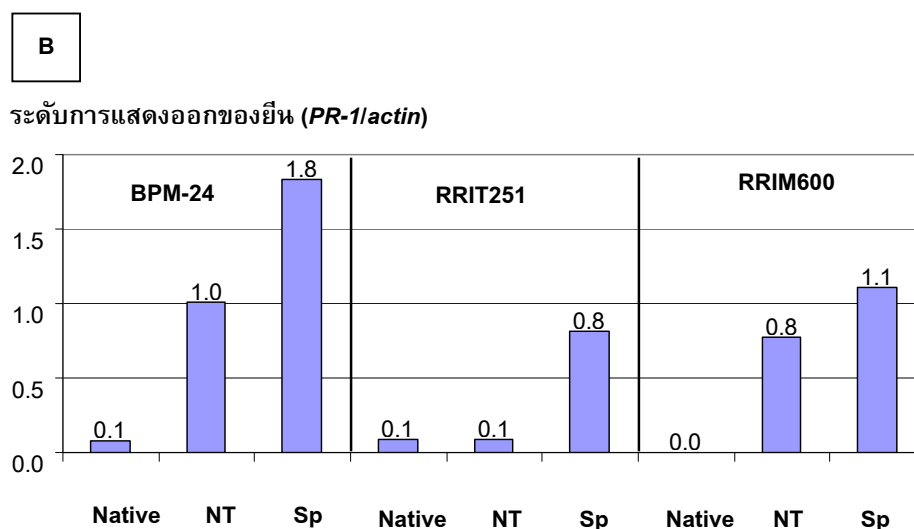
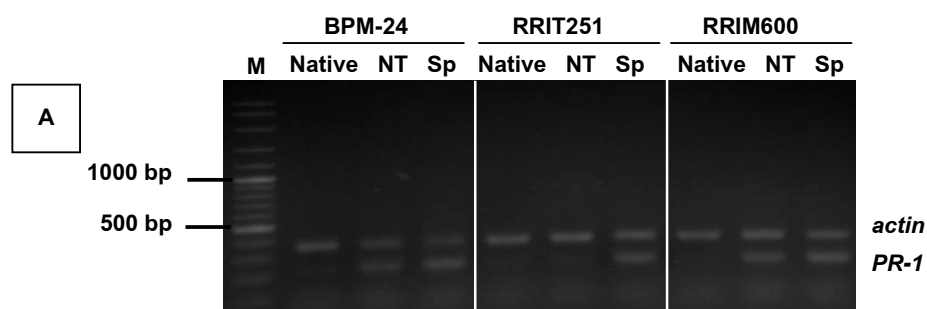
นำใบยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ มาแช่ในเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 เกิดการติดเชื้อมากที่สุดนั่นคือ เกิดรอยไหม้สีน้ำตาลกระจายทั่วเต็มใบ มีลักษณะแผ่กว้างอย่างไม่มีขอบเขตมากกว่าใบยางพาราพันธุ์ RRIT251 และ BPM-24 เมื่อสังเกตในชุดทดลองของทั้ง 3 สายพันธุ์ พบการเรียงแสงของสคอพอลิดีนแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ โดยใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 มีการเรียงแสงของสคอพอลิดีนกระจายอยู่ทั่วไปแตกต่างจากใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 ที่พบว่าการเกิดรอยไหม้สีน้ำตาลน้อยที่สุดและมีการเรียงแสงของสคอพอลิดีนที่มีขอบเขตชัดเจน แสดงให้เห็นถึงความสามารถของยางพาราพันธุ์ต้านทานที่สามารถจำกัดขอบเขตไม่ให้เชื้อแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียง รองลงมาคือพันธุ์ RRIT251 ที่มีการติดเชื้อในระดับปานกลางคือสามารถกักเชื้อไม่ให้แพร่กระจายได้ดีกว่าพันธุ์อ่อนแอแต่ยังไม่สามารถกักบริเวณได้มากเท่ากับพันธุ์ต้านทาน

เมื่อสังเกตการเรืองแสงของสคอพอลิตินจะมีขอบเขตให้เห็นได้แต่ไม่ชัดเจนเท่ากับใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 ดังรูปที่ 3.30 สำหรับผลการทดลองในชุดควบคุมไม่พบการเกิดรอยไหม้และการเรืองแสงหลังจากแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.30 ใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ (BPM-24, RRIT251 และ RRIM600) หลังป่มด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 1×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง **A:** เปรียบเทียบการเกิดรอยไหม้ **B:** การเรืองแสงของสคอพอลิตินภายใต้แสง UV

เมื่อวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *PR-1* พบว่ามีความแตกต่างกันในใบยางพาราแต่ละสายพันธุ์ดังรูปที่ 3.31 จะเห็นได้ว่าใบยางพาราที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นใบยางที่สะอาดและปลอดเชื้อ โดยสังเกตจากใบก่อนการทดลองของทั้ง 3 สายพันธุ์ว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพียงเล็กน้อยแต่ภายหลังจากการกระตุ้นโดยเชื้อในซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นอย่างชัดเจน พันธุ์ BPM-24 มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ รองลงมาคือพันธุ์ RRIT251 ถึงแม้ว่าระดับการแสดงออกของพันธุ์ RRIT251 จะไม่มากเท่ากับพันธุ์ RRIM600 แต่เมื่อเทียบกับชุดควบคุมแล้วถือว่ามีความการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากกว่า

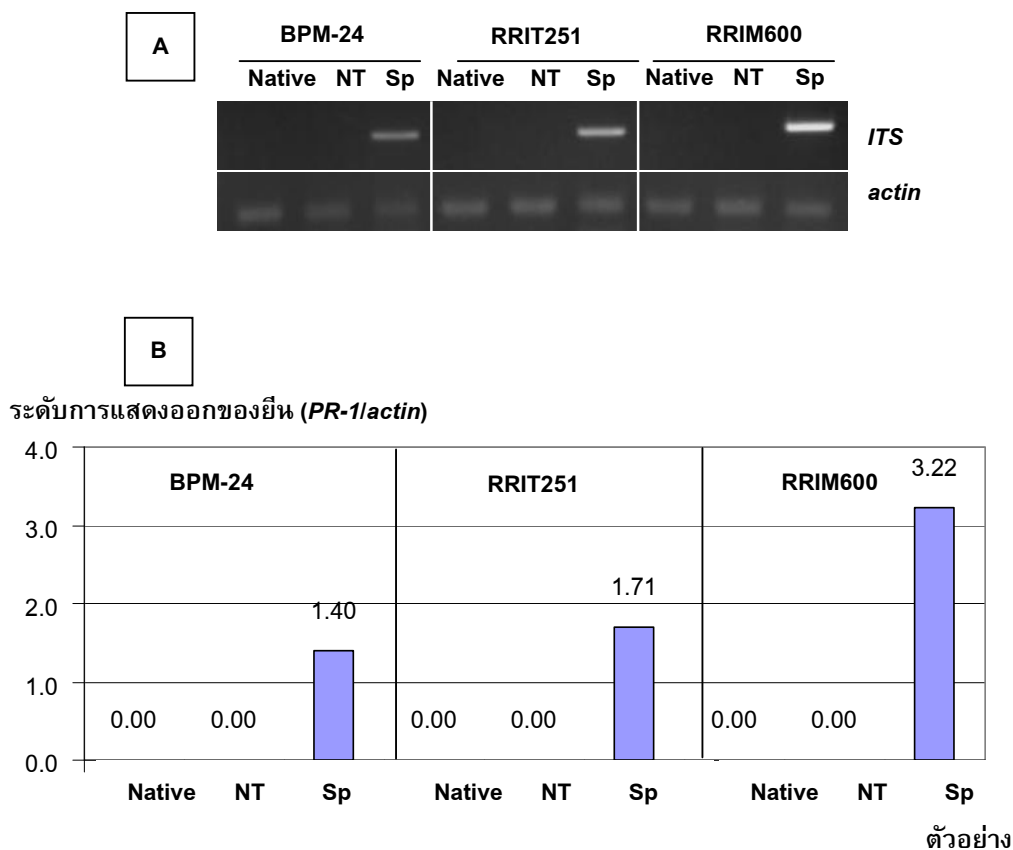


ตัวอย่าง

รูปที่ 3.31 ผลการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราสายพันธุ์ต่างๆ **A:** เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PR-1* ในแต่ละสายพันธุ์มี *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ; 100 bp plus DNA ladder (M), ใบก่อนการทดลอง (Native), ใบชุดควบคุม (NT) และใบชุดทดลอง (Sp) **B:** ระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยคำนวณจากภาพ A (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

นอกจากนี้เมื่อสังเกตชุดควบคุมซึ่งแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับใบก่อนการทดลองจะเห็นว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นทั้งในพันธุ์ BPM-24 และพันธุ์ RRIM600 แสดงให้เห็นว่าการตัดก้านใบเพียงอย่างเดียวก็มีผลต่อการแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Sasaki และคณะ (2002) ซึ่งตัดใบยาสูบและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาต่างๆ แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ รวมทั้งยีน *PR-1* ด้วย พบว่ายีน *PR-1* จะมีการแสดงออกหลังจากตัดใบทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามการตัดใบยาสูบดังกล่าวเป็นการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ ย่อมทำให้เกิดความเครียดแก่ใบไม่มากกว่าการตัดเฉพาะก้านใบดังที่ผู้วิจัยได้ทำการทดลอง ผลการทดลองจึงอาจเกิดจากใบยางพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ยังอยู่ในช่วง SAR จึงถูกกระตุ้นได้ง่ายกว่าแต่เมื่อถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้นด้วยเชื้อจึงเห็นผลไม่ชัดเจนเท่ากับการทดลองในใบยางพันธุ์ RRIT251 ซึ่งการเกิดบาดแผล (wounding) มีผลในการกระตุ้นต่ำที่สุด

อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* ที่สามารถบ่งบอกการลุกลามของเชื้อเข้าไปในใบยางพาราได้ พบว่าในชุดทดลองซึ่งแช่เชื้อ *P. palmivora* เชื้อสามารถลุกลามเข้าไปในใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ได้มากที่สุด กล่าวคือมีการแสดงออกของยีน *ITS* สูงที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ปานกลาง (RRIT251) และพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.32 แสดงว่าพันธุ์ BPM-24 มีจำนวนเซลล์ที่ถูกเจาะน้อยที่สุด ดังนั้นหากคิดต่อเซลล์ที่เท่ากันพันธุ์ BPM-24 จะมีระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงกว่าที่คำนวณได้ในรูปที่ 3.31B และเมื่อพืชถูกเจาะด้วยเชื้อจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่างๆ รวมทั้งยีน *PR-1* ด้วย ซึ่งโปรตีนของยีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อจึงทำให้พืชพันธุ์ต้านทานติดเชื่อน้อยกว่า



รูปที่ 3.32 การแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* ในใบยางแต่ละสายพันธุ์ **A:** การแสดงออกของยีน *ITS* ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกันโดยมี *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ; 100 bp DNA ladder (M), ใบก่อนการทดลอง (Native), ใบชุดควบคุม (NT) และใบชุดทดลอง (Sp) **B:** ระดับการแสดงออกของยีน *ITS* โดยคำนวณจากภาพ A (เป็นผลการทดลอง 1 ซ้ำจาก 3 ซ้ำการทดลอง)

การศึกษาของนารธิตา (2546) สามารถจัดลำดับพันธุ์ยางพาราตามความต้านทานโดยการบ่มใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* แล้วจำแนกความแตกต่างโดยดูจากปริมาณสคอพอลิตินที่ผลิตขึ้น พบว่าในหนึ่งตำแหน่งที่ถูกเจาะของใบยางพาราจะมีความสามารถในการสร้างสคอพอลิตินแปรผันตรงตามระดับความต้านทาน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงนำใบยางพาราสายพันธุ์ที่ได้จัดจำแนกไว้แล้วว่าเป็นพันธุ์ต้านทาน ปานกลาง และอ่อนแอ ดังกล่าว เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *PR-1* ว่ามีผลไปในทิศทางเดียวกับระดับความต้านทานหรือไม่ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. palmivora* มีการแสดงออกสูงขึ้นตามลำดับความต้านทานของพันธุ์ยางพารา ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าแสดงออกของยีน *PR-1* น่าจะเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการ

สร้างสคอพอลิติน รวมทั้งจากการทดลองจะเห็นการเรืองแสงของสคอพอลิติน (ส่องดูภายใต้แสง UV) ในใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่เวลา 6-8 ชั่วโมง หลังปมด้วยเชื้อ *P. palmivora* ในขณะที่มีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นหลังจากปมด้วยเชื้อด้วยเช่นเดียวกัน (ที่เวลา 24 ชั่วโมง) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสคอพอลิตินที่ผลิตขึ้นมาสามารถชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้ การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Kim และคณะ (2000) พบว่าเมื่อ infiltrate สคอพอลิตินเข้าไปในใบยางสูบแล้วพบว่าการแสดงออกของยีน *PR-1* ในระดับสูงมาก แต่ก็ยังไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสคอพอลิตินกับระบบ SAR ได้ อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวส่งผลให้ยางสูบต้านทานต่อเชื้อ TMV ได้

จากผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Dorey และคณะ (1997) ซึ่งอธิบายวิถีของการป้องกันตนเองได้ดังนี้ เมื่อพืชถูกกระตุ้นโดยเชื้อบริเวณที่ถูกกระตุ้นจะตอบสนอง เช่น เกิด HR รวมทั้งการสะสม defense metabolites ต่างๆ แล้วมีการส่งสัญญาณภายในพืช (cell-to-cell signaling) ไปยังบริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อพืช จะมีการผลิต SA ภายใน (endogenous SA) และผลิตสคอพอลิตินแล้วทำให้มีการแสดงออกของ SAR genes แต่จากผลการทดลองของผู้วิจัยไม่ได้มีการวัดปริมาณ SA ที่ผลิตขึ้นภายในแต่ทำการวัดการแสดงออกของยีน *PR-1* ซึ่งตอบสนองโดยตรงต่อ SA ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* แปรผันตรงกับระดับความต้านทานของใบยางที่สัมพันธ์กับการสร้างสคอพอลิติน ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าวิถีของการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* ผ่านทางวิถีของการสังเคราะห์สคอพอลิตินโดยมี SA เป็นตัวกลาง

นอกจากนี้จากผลการทดลองข้อ 3.2.2 พบว่าการกระตุ้นด้วย exogenous SA ในใบยางพาราจะมีการเรืองแสงของสคอพอลิตินและมีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้น จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้สรุปได้ว่าการแสดงออกของยีน *PR-1* ในยางพาราถูกกระตุ้นโดยผ่านวิถีซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการผลิตสคอพอลิตินด้วย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

4.1 ผลการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพารา

การกระตุ้นใบยางพาราด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1% สามารถชักนำการต้านทานโรคได้ดีที่สุด นั่นคือมีการลุกลามของเชื้อ *P. palmivora* น้อยที่สุด สังเกตเห็นผลได้ชัดเจนหลังวางเชื้อ 24-48 ชั่วโมง การกระตุ้นด้วย SA ก็สามารถชักนำการต้านทานโรคของยางพาราได้เช่นเดียวกัน แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ SA จะต้องเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการผลิตสคอพอลิติน (ไฟโตอิเล็กซินชนิดหนึ่ง) ในปริมาณที่เหมาะสมคือมีการเรืองแสงเล็กน้อยเฉพาะบริเวณก้านใบ จากการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของ SA ที่เหมาะสมคือ 12.5 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ (25 มิลลิโมลาร์) จะมีการเรืองแสงของสคอพอลิตินทั่วทั้งใบ ซึ่งอาจเป็นสัญญาณของสภาพใบยางพาราที่บอบช้ำเกินไปและทำให้ไม่สามารถต้านทานโรคได้ ปุ๋ย N-P-K ก็เป็นตัวกระตุ้นที่สามารถทำให้ใบยางพารามีการผลิตสคอพอลิตินได้เช่นเดียวกับ SA แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถชักนำการต้านทานโรคได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความเข้มข้นของปุ๋ย N-P-K ที่เลือกใช้และเวลาที่เริ่มวางเชื้อยังไม่เหมาะสม

นอกจากนี้ผลการทดลองยืนยันว่าตัวกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด ที่สามารถต้านทานการรุกรานจากเชื้อได้ (SA และไคโตซาน) ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบบนใบ ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* โดยตรง (direct inhibition) ดังนั้นการต้านทานการรุกรานจากเชื้อที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากการกระตุ้นระบบความต้านทานของยางพารารวมทั้งระบบ SAR ด้วย

จากการชักนำการต้านทานโรคในใบยางพาราโดยใช้ตัวกระตุ้น ได้แก่ SA ปุ๋ย N-P-K และไคโตซาน พบว่า SA และปุ๋ย N-P-K กระตุ้นให้ใบยางพารามีการผลิตสคอพอลิตินขึ้นในช่วงเวลาที่ศึกษา (12 ชั่วโมง) ในขณะที่ไคโตซานไม่มีการกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิติน แสดงว่า exogenous SA และปุ๋ย N-P-K มีการชักนำการต้านทานผ่านทางวิธีเดียวกันคือการสังเคราะห์สคอพอลิตินซึ่งการเพิ่มขึ้นของไฟโตอิเล็กซินดังกล่าวจะถูกชักนำผ่านทาง internal SA (โมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR) แม้ว่ายังไม่มีการยืนยันว่าการผลิตสคอพอลิตินมีความเกี่ยวข้องกับระบบ SAR โดยตรง แต่การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า SA จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มีการผลิตไฟโตอิเล็กซินต่างๆ ดังนั้นการสังเคราะห์สคอพอลิตินจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถดูผลการตอบสนองของพืชเบื้องต้นได้ จากที่กล่าวข้างต้นว่าสคอพอลิตินไม่ใช้การตอบสนองของระบบ SAR โดยตรง ดังนั้นการกระตุ้นใบยางพาราด้วยไคโตซานซึ่งไม่มีการผลิตสคอพอลิตินจึงยังสรุปไม่ได้ว่าการต้านทานที่เกิดขึ้นนั้น

ผ่านทาง pathway ใด จากรายงานก่อนหน้าพบว่ามีโคโตซานสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืชได้หลายทาง ได้แก่ การกระตุ้นให้เกิดการสร้าง secondary metabolite ต่างๆ เช่น แคลโลส และยังสามารถกระตุ้นระบบ SAR และระบบที่เกี่ยวข้องกับการผลิต abscisic acid ได้ด้วย ดังนั้นจึงควรศึกษาต่อไปว่าเมื่อกระตุ้นด้วยโคโตซานแล้วมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในเซลล์อย่างไร โดยดูการแสดงออกของ marker gene สำหรับการกระตุ้นด้วย SA ซึ่งผู้วิจัยเลือกศึกษาในขณะนี้จะใช้ยีน *PR-1* เป็น marker gene

4.2 ผลการศึกษา ยีน *PR-1* ในใบยางพารา

ผลการออกแบบ degenerate primers จากบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequence) ของยีน *PR-1* ของ *Arabidopsis thaliana* และ *Eutrema wasabi* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มได้จาก degenerate primers ดังกล่าวมีขนาดของ PCR product เท่ากับ 350 bp โดยมีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่น 65-99% และไม่มี ความคล้ายคลึงกับยีนอื่นๆ ในพืช ผลการออกแบบ specific primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจำนวนได้ พบว่ามีขนาดของ PCR product เท่ากับ 210 bp และมีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นๆ อยู่ในช่วง 60-97% และไม่พบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีนอื่นๆ ในพืช

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ของยีน *PR-1* ด้วยวิธี 3'- Rapid Amplification of cDNA Ends (3'- RACE) ปรากฏ 2 แถบของยีน *PR-1* ขนาด 603 และ 404 bp ที่มีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ในพืชอื่นในช่วง 33-43% และ 58-72% ตามลำดับ เมื่อแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาบริเวณที่เป็น coding sequences พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่เป็น coding sequences มีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ของพืชอื่นสูงเพิ่มขึ้นเป็น 70-92% จึงกล่าวได้ว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' ของยีน *PR-1* ในยางพาราจริง ลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน *PR-1* ในพืชอื่นหลายชนิดอยู่ในช่วง 91-100% จึงสรุปได้ว่าประสบความสำเร็จในการได้มาซึ่งลำดับกรดอะมิโนบางส่วน ของโปรตีน *PR-1* ซึ่งประกอบด้วย cysteine 5 residues จากทั้งหมด 6 residues และพบบริเวณที่มี conserved สูงติดต่อกัน คือบริเวณ GHYTVVW ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็นองค์ประกอบของ SCP_*PR-1* like domain ในโปรตีน *PR-1* นอกจากนี้ยังเป็นการยืนยันว่า specific primer ที่ออกแบบไว้จำเพาะกับยีน *PR-1* ในยางพารา

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ยังไม่ประสบความสำเร็จแต่หลังจากการทำ PCR โดยการใส่ specific reverse primer เพียงเส้นเดียว พบว่ามีแถบ DNA จำนวน 8 แถบ ที่คาดว่าเป็นยีน *PR-1* ทางด้านปลาย 5' ซึ่งอาจเป็นเพราะในยางพารามียีน *PR-1* หลาย form หรืออาจมี repeated sequences ของยีน *PR-1*

4.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยรวมด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

นำ specific primers ของยีน *PR-1* ที่ออกแบบได้มาศึกษาการแสดงออกของยีนเมื่อพบไบอยางพาราด้วยเชื้อ *P. palmivora* พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้น นั่นคือการแสดงออกของยีน *PR-1* สามารถบ่งบอกผลการติดเชื้อ *P. palmivora* ของไบอยางพาราได้ รวมทั้งเมื่อกระตุ้นใบและต้นกล้ายางพาราด้วย SA ทำให้มีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1* ในไบอยางพาราที่มีอายุแตกต่างกันพบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงสุดในใบระยะที่อ่อนที่สุดและการแสดงออกจะลดลงเมื่อไบอยางพารามีอายุเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เมื่อพบด้วยเชื้อ *P. palmivora* พบว่าทุกอายุของไบอยางพารามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้น แต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างชัดเจนเนื่องจากความสามารถในการเข้าเจาะของเชื้อไม่เท่ากัน การทดลองครั้งต่อไปควรตัดใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมให้มีบริเวณขอบนอกของไบอยางพาราที่สัมผัสกับเชื้อ *P. palmivora* เท่าๆ กัน

เมื่อกระตุ้นไบอยางพาราแต่ละสายพันธุ์ด้วยเชื้อ *P. palmivora* พบว่า ยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) มีระดับการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงที่สุด รองลงมาคือ พันธุ์ต้านทานปานกลาง (RRIT251) และน้อยที่สุดคือพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ซึ่งการแสดงออกของยีน *PR-1* จะเพิ่มขึ้นตามระดับความต้านทานของพันธุ์ยางซึ่งจะสอดคล้องกับปริมาณการสร้างสคอพอลิติน ดังนั้นการแสดงออกของยีน *PR-1* อาจเกี่ยวข้องกับการสร้างสคอพอลิตินด้วย

ผลการศึกษาสรุปได้ว่าเชื้อ *P. palmivora* และ exogenous SA สามารถกระตุ้นให้ยางพารามีระดับ SA ภายใน (endogenous SA) สูงขึ้น เนื่องจากสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยรวมได้ โดยคาดว่า endogenous SA จะทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณให้กับระบบ SAR ที่มียีน *PR-1* เป็นเครื่องหมาย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า SA เป็นตัวกระตุ้นชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นระบบ SAR ในยางพาราได้

เอกสารอ้างอิง

- กมลศิริ พันธนียะ. 2546. ไคติน-ไคโตซาน. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: http://www.nicaonline.com/articles9/site/view_article.asp?idarticle=158. (วันที่สืบค้น 29 ธันวาคม 2553).
- จิระภา ชัยวงศ์. 2551. เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและการสลายสคอพอลิทินในใบและเซลล์แขวนลอยของพาราที่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- ฐานข้อมูลยางพารา. 2551. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://ait.nisit.kps.ku.ac.th/dbfieldcrop/maincrop/pararubber/mainpararubber1.htm>. (วันที่สืบค้น 2 ธันวาคม 2553).
- จิตติกร จันทร์วุ่น. Personal communication.
- ดร. นีอร จีรพงศธรกุล. Personal communication.
- พันธุ์วศรี แสงสุวรรณ. 2547. ปฏิกริยาตอบสนองของแคลลัสยางพาราต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ไพโรจน์ จ้วงพานิช. 2525. หลักวิชาโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 386 หน้า.
- นารถธิดา รอดโพธิ์ทอง. 2546. การคัดเลือกยางพันธุ์ต้านทานจากเชื้อพันธุ์ (germplasm) โดยใช้ซูโอสปอร์และท็อกซินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- นิลุล บัญห้วงช่วย. 2545. ผลของอิลิซิดินและซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ต่อใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- ยงยุทธ โอสถโสภา. 2553. ข้อมูลของปุ๋ยเคมีที่ไม่มีไนโตรเจน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2553. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2553. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. โรคยางพาราที่พบในประเทศไทย. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://www.rubberthai.com/rubberthai/> (วันที่สืบค้น 1 ธันวาคม 2553).

- ศูนย์วัสดุชีวภาพไคติน-ไคโตซาน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2551. สารความรู้เกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://www.material.chula.ac.th/CCB/Home.htm> (วันที่สืบค้น 1 พฤศจิกายน 2553).
- อรรวรรณ บุญยะแต่ง. 2551. โปรตีนเอสอินฮิบิเตอร์จากเซลล์แขวนลอยของพาราหลังถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A. and Saji, H. 2002. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 1061-1069.
- Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. 4th. Ed. San Diego Academic Press. New York. pp 93-115.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. and Ryals, J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing *pathogenesis-related protein 1a*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 7327-7331.
- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S. and Van Loon, L.C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology*. 47: 79-87.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. and Vernet, G. 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*. 96: 1188-1194.
- Botany laboratory. 2553. Introduction to fungi, Oomycota. <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/bot201/oomycota/oomycota.htm>. (accessed November 1, 10).
- Breton, F., Gacia, D., Sanier, C., Eschbach, J.M. and d' Auzac, J. 1997. The interaction between *Corynespora cassiicola* and *Hevea brasiliensis*. *Plantations Research Development*. 4: 322-335.
- Buchel, A.S. and Linthorst, H.J.M. 1999. PR-1: group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton: CRC Press. pp 21-47.
- Churngchow, N. and Rattarasarn, M. 2001. Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Physiology*. 158: 875-882.

- Chirapongsatonkul, N. 2008. The occurrence of oxidative burst in *Hevea brasiliensis* leaves induced by *Phytophthora* spp. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Chirapongsatonkul, N., Nak-odom, P. and Churngchow, N. 2008. Defense response of calli and seeds of *Hevea brasiliensis* to zoospores and the elicitor of *Phytophthora palmivora*. *Journal of Phytopathology*. 156: 732-741.
- Cornelissen, B.J.C., Horowitz, J., Van Kan, J.A.L., Goldberg, R.B. and Bol, J.F. 1987. Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucleic Acids Research*. 15: 6799-6811.
- Dorey, S., Baillieux, F., Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. 1997. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 646-655.
- Durner, J., Shah, J. and Klessig, D.F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in plant science*. 2: 266-274.
- Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*. 31: 105-124.
- Fernández, C., Szyperski, T., Bruyère, T., Ramage, P., Mösinger, E. and Wüthrich, K. 1997. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *Journal of Molecular Biology*. 266: 576-593.
- Giesemann, A., Biehland, B. and Lieberei, R. 1968. Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Journal Phytopathology*. 117: 373-376.
- Gozzo, F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4487-4503.
- He, C.Y. and Wolyn, D.J. 2005. Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f.sp.*asparagi*. *Plant Pathology*. 54: 227-232.
- Hoegen, E., Stromberg, A., Pihlgen, U. and Kombrink, E. 2002. Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular plant pathology*. 3: 329-345.

- Hong, J.K. and Hwang, B.K. 2002. Temporal and subcellular localization of PR-1 proteins in tomato stem tissues infected by virulent and avirulent isolates of *Phytophthora capsici*. *Protoplasma*. 219: 131-139.
- Hooft Van Huijsduijnen, R.A.M., Van Loon, L.C. and Bol, J.F. 1986. cDNA cloning of six mRNAs induced by TMV infection of tobacco and a characterization of their translation products. *The EMBO Journal*. 5: 2057-2061.
- Hopkins, W.G. and Hüner, N.P. 2004. Introduction to plant physiology, 3rd Ed. John Wiley and Sons Inc. USA. pp 479-491.
- Iriti, M. and Faoro, F. 2008. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 1106-1111.
- Iriti, M. and Faoro, F. 2009. Chitosan as a MAMP, searching for PRR. *Plant Signaling and Behavior*. 4: 66-68.
- Iriti, M., Castorina, G., Vitalini, S., Mignani, I., Soave, C., Fico, G. and Faoro, F. 2010. Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. *Biological Control*. 54: 241-247.
- Jarvis, L.R. and Wardrop, A.B. 1974. The development of the cuticle in *Phormium tenax*. *Planta*. 119: 101-112.
- Kim, S., Ahn H.P., Park, C.H., Park, S.G., Park, S.Y., Jwa, N.S. and Lee, Y.H. 2001. Molecular characterization of the cDNA encoding an acidic isoform of PR-1 protein in rice. *Molecules and Cells*. 11: 115-121.
- Kim, Y.H., Choi, D., Yeo, W.H., Kim, Y.S., Chae, S.Y., Park, E.K. and Kim, S.S. 2000. Scopoletin production related to induced resistance of tobacco plants against tobacco mosaic virus. *Plant Pathology Journal*. 16: 264-268.
- Kim, Y.J. and Hwang, B.K. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum*. 108: 51-60.
- Kohler, A., Schwindling, S. and Conrath, U. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 128: 1046-1056.
- Loake, G. and Grant, M. 2007. Salicylic acid in plant defense; the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 466-472.

- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A.J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell*. 8: 203-212.
- Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Ocampo-Velazquez, R.V., Herrera-Ruiz, G., Chapa-Oliver, A.M. and Guevara-González, R.G. 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*. 9: 9155-9162.
- Molina, A., Gorch, J., Volrath, S. and Ryals, J. 1999. Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *The American Phytopathological Society*. 12: 53-58.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S. and Uknes, S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Plant-Microbe Interactions*. 11: 643-658.
- Muradov, A., Petrasovits, L., Davidson, A. and Scott, K.J. 1993. A cDNA clone for a pathogenesis-related protein1 from barley. *Plant Molecular Biology*. 23: 439-442.
- Niderman, T., Genetet, L., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A. and Legrand, M. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*. 108: 17-27.
- Nieto, V.M. and Rodriguez, J. 2003. *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. tropical tree seed manual, section species: 505-507. Descriptions. <http://old.rngr.net/Publications/ttsm/Folder>. (accessed December 1, 09).
- Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Plant Biology*. 7: 456-464.
- Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C. 2006. Signalling cascades involved in induced resistance. Chapter 4. Induced resistance for plant defence: A Sustainable Approach to Crop Protection. pp 65-88.
- Rabea, E.I., Badaey, E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G. and Steurbaut, W. 2003. Chitosan an antimicrobial agent: applications and mode of action. *The American Chemical Society*. 4: 1457-1463.

- Rauscher, M., Ádám, A.L., Wietz, S., Goggenheim, R., Mendgen, K. and Deising, H.B. 1999. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *The Plant Journal*. 19: 625-633.
- Reuveni, R. 1994. Foliar spray of phosphates induces growth increase and systemic resistance to *Puccinia sorghi* in maize. *Plant Pathology*. 43: 245-250.
- Reuveni, R., Reuveni, M. and Agapov, V. 1996. Foliar sprays of NPK fertilizers induce systemic protection against *Puccinia sorghi* and *Exserohilum turcicum* and growth response in maize. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 339-348.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K. and Islam, R. 2005. Overexpression of a pepper basic *pathogenesis-related protein 1* gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports*. 24: 216-224.
- Sasaki, K., Hiraga, S., Ito, H., Seo, S., Matsui, H. and Ohashi, Y. 2002. A wound-inducible tobacco peroxidase gene expresses preferentially in the vascular system. *Plant and Cell Physiology*. 43: 108-117.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A. and De Bolle, M.F.C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 941-990.
- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 365-371.
- Tan, A.M. and Low, F.C. 1975. Phytoalexin production by *Hevea brasiliensis* in response to infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on other fungi. *Proceeding of International Rubber Conference*. RRIM600. Kuala Lumpur, Malaysia. 3: 217-227.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 2001. ClustalX. Computer program available at <http://ftp-igbmc.ustrasbg.fr/pub/clustal>. (accessed December 1, 09).
- Tornero, P., Conejero, V. and Vera, P. 1994. A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Molecular Genetics and Genomics*. 243: 47-53.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. and Aziz, A. 2006. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 114: 405-413.

- Tsai, H.L., Huang, L.C., Ann, P.J., and Liou, R.F. 2006. Detection of orchid *Phytophthora* disease by nested PCR. *Botanical Studies*. 47: 379-387.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D. 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 4: 645-656.
- Uthairatanakij, A., Teixeira da Silva, J.A., Obsuwan, K. 2007. Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotechnology*. 1: 1-5.
- Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55: 85-97.
- Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 135-162.
- Vasyukova, N.L., Zin'eva, S.V., Il'inskaya, L.I., Perekhod, E.A., Chalenko, G.I., Gerasimova, N.G., Il'ina, A.V., Varlamov, V.P. and Ozeretskivskaya, O.L. 2001. Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 37: 103-109.
- Verhagen, B.W.M., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. 2006. Induced resistance signaling in plant. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. 3: 334-343.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L. and Alexander, D.C. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. 3: 1085-1094.
- White, R.F., Rybicki, E.P., Von Wechmer, M.B., Dekker, J.L. and Antoniw, J.F. 1987. Detection of PR-1 type proteins in *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Graminae* and *Solanaceae* by immunoelectroblotting. *Journal of General Virology*. 68: 2043-2048.
- Wong, C.E., Carson, R.A.J., and Carr, J.P. 2002. Chemically induced virus resistance in *Arabidopsis thaliana* is independent of pathogenesis-related protein expression and the *NPR-1* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15: 75-81.
- Xu, J., Zhao, X., Han, X. and Du, Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 87: 220-228.
- Zeier, J. 2005. Age-dependent variation of local and systemic defense response in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66: 30-39.

Zhanga, Z.G., Wanga, Y.C., lia, J., Jia, R., Shena, G., Wangb, S.C., Zhou, X. and Zhenga, X.B. 2004. The role of SA in the hypersensitive response and systemic acquired resistance induced by elicitor PB90 from *Phytophthora boehmeriae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65: 31-38.

<http://au.expasy.org/tools/dna.html>. (accessed November 1, 10).

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed November 1, 09).

<http://ca.expasy.org/prosite>. (accessed January 1, 11).

http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09_14.html (accessed November 2, 10).

<http://www.en.wikipedia.org/phytophthora> (accessed November 2, 10).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed November 1, 09).

<http://www.pravitgroup.co.th/2577.htm>. (accessed November 17, 10).

<http://www.school.net.th/library/snet6/envi2/subsoil/puy.htm> (accessed November 7, 10).

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา **Potato Dextrose Agar (PDA)**

นำ PDA 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 มิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา **V₈**

นำ V₈ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ CaCO₃ 1.5 กรัม เติมน้ำ 10 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมไคโตซาน

เตรียม stock ไคโตซานความเข้มข้น 1% w/v โดยค่อยๆ ละลายไคโตซาน (Sigma, $\geq 75\%$ deacetylated) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ กวนสารละลายด้วยเครื่องผสม จากนั้นเตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.5% และ 0.25% จาก stock ไคโตซาน จากนั้นปรับ pH 5.6 ด้วย 0.1 โมลาร์ NaOH แล้วนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้งาน

4. การเตรียมปุ๋ย **N-P-K**

เตรียมปุ๋ย N-P-K (%w/v) โดยการชั่งปุ๋ย N-P-K (สูตร 25-7-7) ตราเรือใบไวคิง ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ บดปุ๋ยให้ละเอียด แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นกรองตะกอนปุ๋ยด้วย suction flask จนได้สารละลายใสของปุ๋ย N-P-K เตรียมความเข้มข้นที่ต้องการโดยเจือจางในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้งาน

5. การเตรียมอาหารเหลว **Luria Bertaini (LB)**

ชั่ง LB 20 กรัม ปรับปริมาตรใน deionized water 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7.2-7.6 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้งาน

สำหรับอาหารแข็ง LB จะเติมน้ำ 1.5% ซึ่งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบต่างๆ ให้เสร็จก่อนจึงเติมน้ำ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนนำไปเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหาร LB ที่มีการเติม ampicillin เตรียมโดยผสมสารละลาย ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย ampicillin มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (อาหารที่มีการเติม IPTG และ X-gal ทำเช่นเดียวกับการเติม ampicillin)

6. การเตรียม ampicillin stock solution

ชั่ง ampicillin 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอนเมตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

7. การเตรียม 10X loading dye

ผสม glycerol 5 มิลลิลิตร และ 1XTAE 5 มิลลิลิตร ให้เข้ากันแล้วเติม bromophenol blue ลงไปผสมเล็กน้อย เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8. การเตรียม 50X TAE buffer

Tris-base 242 กรัม

acetic acid 57.1 มิลลิลิตร

0.5 โมลาร์ EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้งาน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียม STET buffer

เตรียมสารต่างๆ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 8% sucrose, 5% Triton-X 100, 50 มิลลิโมลาร์ EDTA ใน Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้งาน

ประวัติผู้เขียน

| | | |
|--|--------------------------|---------------------|
| ชื่อ สกุล | นางสาวยุรฉัตร ยอดโยธี | |
| รหัสประจำตัวนักศึกษา | 5110220062 | |
| วุฒิการศึกษา | ชื่อสถาบัน | ปีที่สำเร็จการศึกษา |
| วุฒิปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | 2550 |

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1. ทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) พ.ศ. 2551
2. ทุนโครงการสร้างความเข้มแข็งทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2551

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Yurachat Yodyotee, Nion Chirapongsatonkul and Nunta Churngchow. 2010. Expression of *PR-1* Gene in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Leaves at Various Stages. The proceeding of the 5th conference on science and technology for youths: 2010. Bangkok international trade and exhibition centre (BITEC). Bangkok. Thailand.