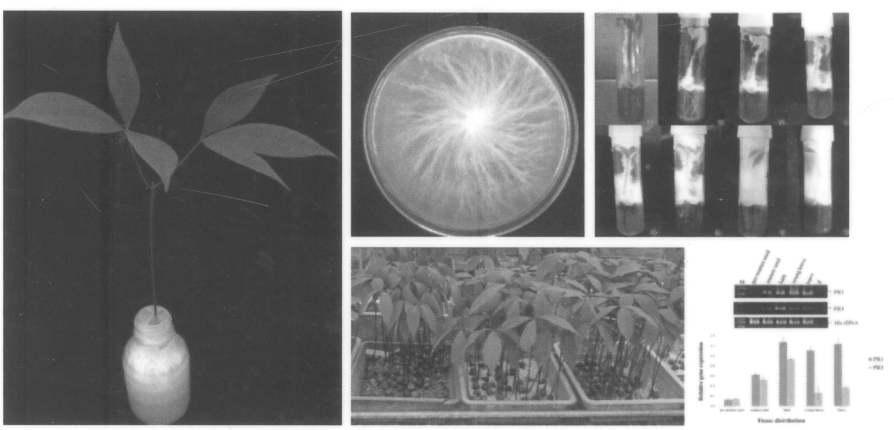
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความต้านทานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครากขาวในยางพารา

Expression of white root resistance related genes in rubber tree



คณะนักวิจัย

ดร.กรกช นาคคนอง

รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

Rigidoporus microporus เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในยางพาราที่เป็นสาเหตุของโรครากขาวและทำให้ต้นยางที่เป็นโรคยืนต้นตาย การศึกษากลไกการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อราและเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในระบบ SAR เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกต้นตอยางพาราจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา (*HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5*) พบว่า ยีน *HbPR-1* มี Open reading frame 492 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 163 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 17.69 kDa และมีค่า pI 8.57 ในขณะที่ยีน *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* สามารถโคลนได้เพียงบางส่วนของยีน โดยมีขนาด 1,120, 390, 233 และ 517 คู่เบส ตามลำดับ การศึกษาความจำเพาะของยีน *HbPR-1* และ *HbPR-3* ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อของพืช พบว่า มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา โดยมีการแสดงออกสูงสุดในเปลือก เมล็ดอ่อน เมล็ดแก่ ใบอ่อน และใบแก่ ตามลำดับ เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในยางพารา 5 พันธุ์ ได้แก่ PB5/51 (ผ่านการทดสอบว่าทนทานต่อโรครากขาว) BPM 24, RRIM600, Bangrak และ PSU1 หลังจากการปลูกถ่ายเชื้อ *R. microporus* เป็นเวลา 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) พบว่าต้นกล้ายางพาราพันธุ์ PB5/51 มีแนวโน้มในการแสดงออกของยีนทั้ง 5 กลุ่มสูงที่สุด โดยเฉพาะยีน *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ BPM 24 มีการแแสดงออกของยีนในกลุ่ม *HbPR-1*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* เพิ่มมากขึ้นในช่วงต้น และค่อยๆ ลดลงหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 48 ชม. ในขณะที่ยีน *HbPR-2* และ *HbPR-3* มีการแสดงออกค่อนข้างต่ำ สำหรับยางพาราพันธุ์ RRIM600 พบว่ามีการแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-3* และ *HbPR-5* เพิ่มขึ้นมากในช่วง 24 ชม.หลังปลูกเชื้อและค่อยๆลดลงหลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง ส่วนการแสดงออกของอีกสองยีน คือ *HbPR-2* และ *HbPR-4* ลดลง การแสดงออกของยีนทั้ง 5 ยีนในยางพาราพันธุ์พื้นเมือง Bangrak และ PSU1 พบว่ามีการแสดงออกน้อยกว่าในพันธุ์อื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับต้านทานโรครากขาวในยางพารา และการตอบสนองต่อกลไกการป้องกันตนเองของยางพาราในพันธุ์ทนทานต่อโรครากขาว PB5/51 มีการแสดงออกของกลุ่มยีน *PRs* สูง โดยเฉพาะยีน *HbPR-4 และ HbPR-5*

คำหลัก: *Rigidoporus microporus*, โรครากขาว ยางพารา, PR genes, การแสดงออกของยีน, ต้นตอยาง

Abstract

Rigidoporus microporus is an important fungal pathogen of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (rubber tree) which is the causative agent of white root disease and kills rubber trees. Study on the molecular mechanism of antifunfal genes and defend machanism involved in systemic aquire resestance (SAR) are important for selection rubber rootstock tolerant to the white root disease. In the present study, cDNA of antifungal genes (*HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5*) was isolated from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg and their properties were investigated. It was found that the ORF is 492 bp with a deduced amino acid sequence of 163 residues and encodes a 163-amino acid protein with a deduced molecular weight of 17.69 kDa and an isoelectronic point (pI) is 8.57. The partial gene of *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* were isolated with 1120, 390, 233 and 517 bp, respectively. Gene expression levels of pathogenesis-related proteins (*HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5*) were compared in five *Hevea brasiliensis* seedlings from various clones including PB5/51 (tolerate to 'the white root disease), BPM 24, RRIM600, Bangrak and PSU1 after inoculation at 0, 12, 24, 48, 72 and 96 hr with the white rot fungus, *Rigidoporus microporus* using Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Five genes were found at the highest up-regulated after inoculation in seedlings of PB5/51, particular *HbPR-4* and *HbPR-5* in response to the pathogen when compared with other clones. *HbPR-1*, *HbPR-4* and *HbPR-5* were upregulated in BPM 24 but slow down at 48 hr. after inoculation. In RRIM600, high expression level of *HBPR-1*, *HbPR-3* and *HbPR-5* genes was observed initially and gradually decrease post-inoculation 48 hr. The expression level of antifungal genes in seedlings from Bangrak and PSU1 clones was downregulated when compared with other clones. The results demonstrated the variability in gene expression profiles in different clones of rubber tree. The candidate defense genes to the white root disease were observed in PB5/51 seedlings, particular *HBPR-4* and *HBPR-5*.

Key words: *Rigidoporus microporus*, white root disease, rubber tree, PR genes, gene expression, rubber rootstock

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(2)
สารบัญตาราง	(4)
สารบัญรูป	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	(7)
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
2. การตรวจเอกสาร	4
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	22
4. ผลการทดลอง	35
5. วิจารณ์ผลการทดลอง	65
6. สรุปผลการทดลอง	70
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก	81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่	1 กลุ่มของโปรตีน PRs	12
ตารางที่	2 กลุ่มของโปรตีน PR-2	16
ตารางที่	3 ชื่อสารเคมีเกรดวิเคราะห์และบริษัทผู้ผลิต	22
ตารางที่	4 ชื่อสารเคมีเกรดอณูชีววิทยาและบริษัทผู้ผลิต	23
ตารางที่	5 สารที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย cDNA	26
ตารางที่	6 สารที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย cDNA	26
ตารางที่	7 การออกแบบ Degenerate primers	27
ตารางที่	8 specific primers ที่ใช้ในการทำ qRT-PCR	34

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะใบ ผล ช่อดอกของยางพารา	4
รูปที่ 2 วงจรการเกิดโรครากขาวในยางพารา	7
รูปที่ 3 ลักษณะของเชื้อรา *R. microporus*	9
รูปที่ 4 เชื้อ *R. microporus* บนอาหาร PDA	32
รูปที่ 5 แสดงตัวอย่างต้นกล้ายางพาราที่ปลูกถ่ายเชื้อ *R. microporus*	33
รูปที่ 6 Total RNA ที่สกัดด้วย Extraction buffer	35
รูปที่ 7 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR-1*	36
รูปที่ 8 PCR product ที่ได้จากการทำ 5'และ 3'RACE ของยีน *HbPR-1*	37
รูปที่ 9 การวิเคราะห์ยีนเส้นสมบูรณ์ของยีน *HbPR-1*	38
รูปที่ 10 การ alignment โดยใช้ ClustalX ของยีน *HbPR-1* ในยางพารา	39
รูปที่ 11 conserved domain ของโปรตีน HbPR-1	40
รูปที่ 12 การ alignment ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *HbPR-1*	41
รูปที่ 13 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน *HbPR-2*	42
รูปที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *HbPR-2*	43
รูปที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *HbPR-2* ที่เริ่มแปลรหัสได้	44
รูปที่ 16 ผลการทำ sequence alignment โดยใช้ Clustal-X alignment ของยีน *HbPR-2*	45
รูปที่ 17 conserved domain ของโปรตีน *HbPR-1*	46
รูปที่ 18 ผลการทำ sequence alignment ของโปรตีน *HbPR-2* จากยางพารา	47
รูปที่ 19 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน *HbPR-3*	48
รูปที่ 20 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR-3*	49
รูปที่ 21 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน *HbPR-3*	50
รูปที่ 22 conserved domain ของโปรตีน *HbPR-1*	51
รูปที่ 23 ผลการทำ sequence alignment ของโปรตีน *HbPR-3* จากยางพารา	51
รูปที่ 24 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน *HbPR-4*	52

รูปที่ **หน้า**

รูปที่ 25 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR-4* 53
รูปที่ 26 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน *HbPR-4* 54
รูปที่ 27 ตำแหน่งของ Barwin domain ที่ได้จากการ blastp ของโปรตีน HbPR-4 54
รูปที่ 28 ผลการทำ sequence alignment ของโปรตีน HbPR-4 55
รูปที่ 29 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน *HbPR-5* 56
รูปที่ 30 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR-5* 57
รูปที่ 31 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน *HbPR-5* 58
รูปที่ 32 ตำแหน่งของ GHG4-TLP-SF domain ที่ได้จากการ blastp ของโปรตีน PR-5 58
รูปที่ 33 ผลการทำ sequence alignment ของโปรตีน *HbPR-5* 59
รูปที่ 34 การแสดงออกของยีน *HbPR-1* และ *HbPR-3* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของยางพารา 60
รูปที่ 35 การแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในยางพาราโคลน PSU1, Bangrak, PB5/51, RRIM600 และ BPM24 ด้วยเทคนิค qRT-PCR โดยใช้ specific primer และ *18S rRNA* เป็น internal control หลังจากปลูกถ่ายเชื้อ *R.microporus* ที่เวลา 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดย ก: การแสดงออกของยีน *HbPR-1*, ข: การแสดงออกของยีน *HbPR-2*, ค: การแสดงออกของยีน *HbPR-3*, ง: การแสดงออกของยีน *HbPR-4* และ จ: การแสดงออกของยีน *HbPR-5* 63
รูปที่ 36 แนวโน้มการแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในต้นกล้ายางพาราอายุ 2 เดือนหลังจากปลูกถ่ายเชื้อราก่อโรครากขาว (*R. microporus*) เป็นเวลา 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง 64

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

α	= alpha
bp	= base pairs
β	= beta
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
h	= hour
kDa	= kilodalton
pH	= -log hydrogen ion concentration
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

บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) เป็นพืชที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศจำนวนมากจึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรไทยเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามประเทศไทยมีลักษณะภูมิอากาศเป็นแบบร้อนชื้น ซึ่งเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่างๆ ทำให้เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคต่างๆ ได้ง่าย โรคสำคัญในยางพาราได้แก่ โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟท็อปธอร่า โรคใบจุดก้างปลา โรคเส้นดำ และโรครากขาว เป็นต้น โดยเฉพาะโรครากขาวในปัจจุบันพบว่ามีการระบาดเพิ่มขึ้นมาก ทำให้เกษตรกรต้องสูญเสียทั้งผลผลิตและรายได้ อีกทั้งมีการใช้สารป้องกันในการแก้ปัญหาเป็นผลให้เกิดภาวะสารตกค้างในสภาพแวดล้อม โรครากขาวมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เชื้อราโรครากขาวสามารถเข้าทำลายรากยางพาราได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่อายุ 1 ปีขึ้นไป ในระยะเริ่มแรกจะไม่เห็นลักษณะผิดปกติของต้นยางพาราส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน เมื่อส่วนรากถูกทำลายเสียหายจนไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารได้ จึงแสดงอาการใบเหลืองและใบร่วง สำหรับต้นยางเล็กที่เป็นโรค พุ่มใบทั้งหมดจะมีสีเหลืองผิดปกติ ถ้าเป็นต้นยางใหญ่พุ่มใบบางส่วนจะดูเสมือนว่าแก่จัดและเหลือง ซึ่งจะแตกต่างกับสีเขียวเข้มของพุ่มใบต้นยางที่สมบูรณ์อย่างเห็นได้ชัด ข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตรพบว่าหากรวมความเสียหายจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางภาคใต้ของประเทศไทยทั้งหมดในปี 2551-2553 คาดว่ามีความเสียหายเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 1,600 ล้านบาท และภายใน 10 ปีคาดว่าประเทศไทยจะสูญเสียรายได้จากยางพาราไม่ต่ำกว่า 50,000 ล้านบาท (อารมณ์, 2553)

เมื่อพืชสัมผัสกับเชื้อรา แม้ว่าพืชไม่มีระบบสร้างภูมิคุ้มกันแบบเดียวกับมนุษย์ แต่พืชก็สามารถสร้างกลไกการป้องกันตัวเองโดยการสร้างสารชีวโมลกุลน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งเรียกว่าไฟโตอเล็กซิน (Phytoalexins) เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) และโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก (small proteins) เช่น thionins, defensins , hevein-like proteins และ knottin-like peptides (Bloch et al., 1998; Broekaert et al., 1995; Florack and Stiekema, 1994; Segura et al., 1993) รวมทั้งมีการแสดงออกของโปรตีนต้านจุลชีพเพิ่มสูงขึ้นด้วย (antimicrobial proteins) เรียกโปรตีนในกลุ่มนี้ว่า pathogenesis-related (PR) proteins ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้เมื่อจำแนกตามซีรั่มวิทยาและลำดับกรดอะมิโนสามารถแยกออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 และ PR-5 (Segura *et al.*, 1993; Selitrennikoff, 2001) โดยโปรตีนเหล่านี้มีสมบัติในการต้านเชื้อรา (Antifungal protein) (Gun Lee *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999; Wnendt *et al.*, 1994)

โดยทั่วไปพืชสามารถชักนำระบบการป้องกันตนเองให้มีการต้านทานโรคเพิ่มขึ้นได้ โดยการใช้ตัวกระตุ้นที่เป็นสิ่งมีชีวิต หรือสารที่มาจากเชื้อโรค หรือมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อ

โรค และสิ่งไม่มีชีวิต ในขั้นต้นพืชมีระบบป้องกันตัวเองเชิงกายภาพ นั่นก็คือมีชั้นคิวติเคิลป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้ามารุกราน โดยมีสารคิวติน (Cutin) แวกซ์ (Wax)และซูเบอริน (Suberin) เคลือบอยู่

นอกจากนี้พืชยังมีการป้องกันตนเองทางชีวเคมี เรียกว่า hypersensitive response (HR) เมื่อการรุกรานของเชื้อประสบความสำเร็จ พืชจะมีการตอบสนองโดย receptor ที่รับรู้ถึงการบุกรุก และกระตุ้นให้มีการสร้าง reactive oxygen species ซึ่งได้แก่ O_2 radical hydrogenperoxide และ hydroxyl radicle ส่งผลให้บริเวณที่มีการตอบสนองมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ช่วยในการทำลายแหล่งอาหาร และยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ เรียกกระบวนการนี้ว่า programmed cell death กระบวนการดังกล่าวยังต้องอาศัยสารสัญญาณอีกชนิดหนึ่งคือ NO (nitric oxide) เมื่อภายในเซลล์มี NO และ reactive oxygen species เกิดขึ้น (Gao *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2006) จะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์สารปกป้อง เช่น ลิกนิน ไฟโตอเล็กซิน และกรดซาลิไซลิกซึ่งช่วยป้องกันและทำลายเชื้อโรค กระบวนการทางชีวเคมีที่ชักนำให้พืชเกิดการต้านทานโรคได้ส่วนหนึ่งเกิดจากการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนหรือสารเคมีที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้โดยผ่านกระบวนการสำคัญที่เรียกว่า Systemic Acquired Resistance (SAR) (Conrath, 2006; Ryals *et al.*, 1995)

ระบบ SAR เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังจากที่ได้รับสารสัญญาณที่มาจาก hypersensitive response ซึ่งมีโมเลกุลส่งสัญญาณคือ salicylic acid สัญญาณดังกล่าวจะไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นหลังกระบวนการติดเชื้อ และพืชสามารถรอดตายจากการติดเชื้อนั้นการควบคุมกลไกต่าง ๆ นั้นถูกกำหนดโดยยีนที่เรียกว่า PR genes ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดควบคุมความตอบสนองต่อเชื้อ และกระบวนการต่อต้านเชื้อ PR genes นั้นพบได้หลายชนิดในต้นเดียว และมักจะอยู่เป็นชุด ๆ ผลผลิตของ PR genes ส่วนหนึ่งจะกระจายไปอยู่ตาม membrane เพื่อเป็น receptor เมื่อมีการเกาะของเชื้อ หรือกระจายอยู่ใน cytoplasm เพื่อตอบสนองต่อโมเลกุลของเชื้อที่เกิดมาจากการรุกราน ระบบ SAR นี้สามารถชักนำให้เกิดการต้านทานโรคของพืชบางชนิดโดยไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง และมีความต้านทานทั้งบริเวณที่ถูกบุกรุกโดยตรงและบริเวณที่ไกลออกไปที่ไม่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค ระบบ SAR สามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้พืชนั้นมีความทนทานต่อเชื้อบุกรุกหลายๆ ชนิดได้ในระยะหนึ่ง (Van Loon *et al.*, 2006) โปรตีน PRS มักถูกใช้เป็นเครื่องหมายบ่งบอกภาวะการเกิดระบบ SAR เนื่องจาก SA ที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ SAR จะส่งสัญญาณกระตุ้นโปรตีน NPR1/NIM1 ที่ควบคุม transcription factor ของยีน PR-1 แล้วเกิดการสร้างโปรตีน PR-1 เป็นจำนวนมาก (Fu and Dong, 2013; Van Loon and Van Strien, 1999)

ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านทานเชื้อราและเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในระบบ SAR เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการชักนำการต้านทานโรคในต้น

กล้ายางพาราและการคัดเลือกต้นตอยางพาราจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ โดยศึกษายีน *PRs* ซึ่งเป็นเครื่องหมายสำหรับบ่งบอกการเกิดระบบ SAR ในยางพารา ทั้งในแง่ของการศึกษาการแสดงออกของยีน PRs เมื่อผ่านการกระตุ้นโดยเชื้อก่อโรครากขาวของยางพารา และการแสดงออกของยีน PRs ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของยางพารา เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน PRs และความสามารถในการต้านทานโรคของยางพาราแต่ละพันธุ์ สำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อ และเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาสำคัญที่พบในการผลิตยางพาราต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม pathogenesis-related proteins (PRs) ในรากยางพาราที่ทนทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากขาว เมื่อถูกปลูกเชื้อด้วยเชื้อ *R. microporus*

การตรวจเอกสาร

1. ยางพารา

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพาราทั้งหมดประมาณ 16.89 ล้านไร่โดยกระจายอยู่ในภาคใต้ร้อยละ 90 ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 10 กระจายอยู่ในภาคตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ในพื้นที่ปลูกจำนวนดังกล่าวเป็นพื้นที่ที่เปิดกรีดแล้วประมาณ 10.53 ล้านไร่ สามารถสร้างอาชีพที่มั่นคงให้เกษตรกรมากกว่า 6 ล้านคน หรือประมาณ 1 ล้านครัวเรือน (กรมวิชาการเกษตร, 2553) ดังนั้นการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยางพาราจึงเป็นประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก

ยางพารามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. เป็นพืชใบเลี้ยงคู่มีลักษณะใบ ผล ช่อดอกและต้นกล้าดังรูปที่ 1 ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่มีอายุยืนยาวหลายสิบปีมีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณลุ่มน้ำอเมซอนประเทศบราซิลและประเทศเปรูในทวีปอเมริกาใต้ จัดอยู่ในสกุล *Hevea* วงศ์ Euphorbiaceae มีโครโมโซม 2n = 2x = 36 โดยพืชสกุล (Genus) *Hevea* มีจำนวนทั้งหมด 10 ชนิด ด้วยกัน (Wycherley, 1992 อ้างโดย อารมณ์, 2541) โดย *H. brasiliensis* มีคุณสมบัติให้ผลผลิตน้ำยางสูง และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวด ล้อมได้ดีที่สุด จึงมีการนำมาปลูกและแพร่กระจายเข้ามายังทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นต้น ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ยางพาราดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 ลักษณะใบ ผล ช่อดอกของยางพารา

2. โรคยางพาราที่พบในประเทศไทย

ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นที่เกษตรกรมักประสบปัญหาเรื่องโรคระบาดในระยะใดระยะหนึ่งของการทำสวนยางพารา ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตและพบได้ในทุกส่วนของยางพารา โรคยางพาราที่ระบาดในประเทศไทยส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา สามารถจำแนกได้ตามส่วนต่างๆ ของยางพาราที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายได้แก่ใบ กิ่งก้าน ลำต้นและราก โดยเชื้อราดังกล่าวสามารถอาศัยอยู่ข้ามฤดูและปนอยู่กับซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรียวัตถุในดิน หรืออยู่บนพืชอาศัยบางชนิดตัวอย่างโรคที่เกิดในยางพารา (สถาบันวิจัยยาง, 2553) ตัวอย่างโรคในยางพารามีดังต่อไปนี้

2.1 โรคใบจุดตานก (bird's eye spot)

มักพบในแปลงกล้ายางพาราที่ปลูกไว้เป็นต้นตอ มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Drechslera heveae*

2.2 โรคราแป้ง (powdery mildew)

ระบาดบนใบยางพาราอ่อนที่แตกออกมาใหม่ภายหลังจากการผลัดใบประจำปีจึงเป็นสาเหตุให้ใบยางพาราร่วงและกิ่งแขนงบางส่วนอาจแห้งตายไป โรคราแป้งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Oidium heveae*

2.3 โรคเส้นดำ (black stripe)

เป็นโรคทางลำต้นที่มีความสำคัญมากโรคหนึ่ง เนื่องจากเชื้อจะเข้าทำลายหน้ากรีดยางพาราซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยวผลผลิต จึงไม่สามารถกรีดยางพาราซ้ำบนเปลือกที่งอกใหม่ทำให้ระยะเวลาการให้ผลผลิตสั้นลงและได้น้ำยางพาราที่น้อยลง ซึ่งโรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora*

2.4 โรคใบร่วงจากเชื้อไฟทอปธอร่า (Phytophthora leaf fall)

มักระบาดในช่วงฤดูฝนเชื้อ *Phytophthora* จะเข้าทำลายส่วนต่างๆ ของต้นยางพาราทั้งใบ ฝัก กิ่งก้านและหน้ากรีดยางพารา ฝักที่ถูกทำลายจะเน่าและเป็นสีดำค้างอยู่บนต้นยางพารา ไม่แตกและร่วงหล่นตามธรรมชาติกลายเป็นแหล่งพักของเชื้อที่สำคัญ โรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Phytophthora botryosa*, *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

2.5 โรคใบจุดนูน (Colletotrichum leaf spot)

เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. ใบอ่อนที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย ปลายใบจะบิดงอ เหี่ยวเน่าดำและหลุดล่วง ในระยะใบเพสลาด ใบบางส่วนอาจบิดงอและพบจุดแผลสีน้ำตาล ขอบแผลสีเหลือง ขนาดประมาณ 1-2 มม. เมื่อใบมีอายุมากขึ้น เนื้อตรงกลางแผลอาจทะลุเป็นรู ถ้าระบาดรุนแรงอาจพบแผลบนกิ่งอ่อนหรือยอดอ่อน และทำให้เกิดอาการตายจาก

ยอดได้ ระบาดรุนแรงกับยางที่แตกใบอ่อน ในช่วงที่ฝนตกชุก ความชื้นสูง เชื้อแพร่ระบาดโดยน้ำฝน ลมและแมลง

2.6 โรคใบจุดก้างปลา (Corynespora leaf)

เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* ใบอ่อนแสดงอาการเป็นแผลจุดกลม ขอบแผลสีน้ำตาลดำ กลางแผลสีซีดหรือเทา ถ้ารุนแรงใบจะบิดงอและร่วง ระยะใบเพสลาดแผลจะกลมทึบสีน้ำตาลหรือดำ ขอบแผลสีเหลืองและขยายลุกลามเข้าไปตามเส้นใบ ทำให้แผลมีลักษณะคล้ายก้างปลา เนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลมีสีเหลืองถึงน้ำตาลและใบร่วงในที่สุด ถ้าเชื้อเข้าทำลายส่วนของก้านใบ กิ่งแขนงและลำต้นที่เป็นสีเขียวจะเป็นแผลสีดำมีลักษณะยาวรี เนื้อเยื่อตรงกลางแผลบุ๋มลง ถ้าอากาศเหมาะสมจะขยายขนาดและลุกลาม ทำให้กิ่งหรือยอดที่เป็นโรคแห้งตาย

2.7 โรครากขาว (White root disease)

โรครากขาวยางพารา (White root disease) เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) เชื้อราโรครากขาวสามารถเข้าทำลายรากยางพาราได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่อายุ 1 ปีขึ้นไป ในระยะเริ่มแรกจะไม่เห็นลักษณะผิดปกติของต้นยางพาราส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน เมื่อส่วนรากถูกทำลายเสียหายจนไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารได้ จึงแสดงอาการใบเหลืองและใบร่วง สำหรับต้นยางเล็กที่เป็นโรค พุ่มใบทั้งหมดจะมีสีเหลืองผิดกติ ถ้าเป็นต้นยางใหญ่ พุ่มใบบางส่วนจะดูเสมือนว่าแก่จัดและเหลือง ซึ่งจะแตกต่างกับสีเขียวเข้มของพุ่มใบต้นยางที่สมบูรณ์อย่างเห็นได้ชัด

2.7.1 ลักษณะอาการของโรครากขาว

เมื่อระบบรากถูกทำลายมากขึ้น จะแสดงอาการให้เห็นที่ทรงพุ่ม ซึ่งเป็นระยะที่รุนแรงและไม่สามารถรักษาได้ บริเวณรากที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะปรากฏกลุ่มเส้นใยสีขาวเจริญแตกสาขาปกคลุม และเกาะติดแน่นกับผิวราก เมื่อเส้นใยอายุมากขึ้นจะกลายเป็นเส้นกลมนูนสีเหลืองซีด เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคในระยะแรกจะแข็งกระด้างเป็นสีน้ำตาลซีด ในระยะรุนแรงจะกลายเป็นสีครีม ถ้าอยู่ในที่ชื้นแฉะจะอ่อนนิ่ม ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นแผ่นครึ่งวงกลมแผ่นเดียวหรือซ้อนกันเป็นชั้นๆ ผิวด้านบนเป็นสีเหลืองส้ม โดยมีสีเข้มอ่อนเรียงสลับกันเป็นวง ผิวด้านล่างเป็นสีส้มแดงหรือสีน้ำตาล ขอบดอกเห็ดเป็นสีขาว (Louanchi *et al.*, 1996) แต่ในพืชที่ยังเป็นต้นอ่อนหรืออายุน้อยต้องใช้ความเชี่ยวชาญพิเศษในการตรวจพบ (Guyot and Flori, 2002)

2.7.2 การแพร่ระบาดของโรครากขาว

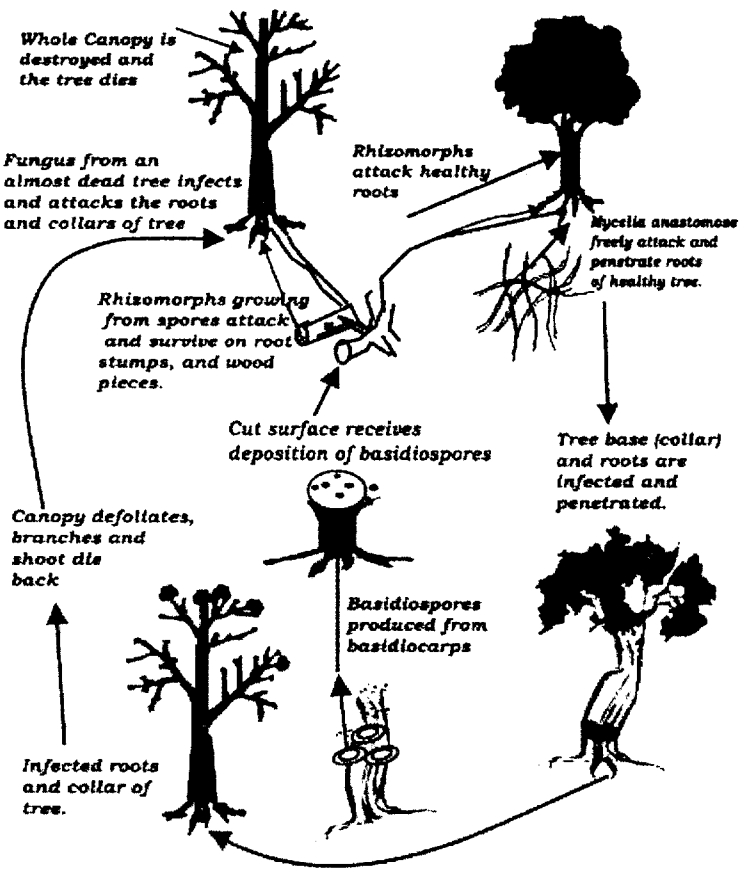
เชื้อราเจริญเติบโตและระบาดอย่างรวดเร็วในช่วงฤดูฝน อากาศมีความชื้นสูง และสามารถแพร่กระจายได้ 2 ทาง คือ

1. โดยการสัมผัสกันระหว่างรากที่เป็นโรคกับรากจากต้นปกติ ทำให้เชื้อเจริญลุกลามต่อไป

2. โดยสปอร์ของเชื้อราปลิวไปตามลม ติดไปกับขาแมลง หรือลอยไปตามน้ำ แล้วไปตกบนบาดแผลของตอยางใหม่ เมื่อมีความชื้นเพียงพอจะเจริญลุกลามไปยังระบบรากกลายเป็นแหล่งเชื้อโรคแหล่งใหม่ต่อไป

2.7.3 วงจรการเกิดโรครากขาวในยางพารา

การเข้าทำลายต้นยางพาราของโรครากขาวเริ่มต้นจากต้นตอของยางพาราที่เคยเป็นโรคแพร่กระจายโรคไปยังต้นยางพาราต้นอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยเมื่อเชื้อแพร่กระจายไปยังต้นยางต้นอื่นๆ จะเกิดกลไกการเข้าทำลายต้นยางด้วยกระบวนการที่สำคัญ 3 กระบวนการ ได้แก่ Penetration, Colonization และ Degradation (Omorusi, 2012)



รูปที่ 2 วงจรการเกิดโรครากขาวในยางพารา

ที่มา: Omorusi (2012)

2.7.3 พืชอาศัยของเชื้อโรครากขาว

พืชอาศัยของเชื้อรา *R. microporus* มีหลายชนิด ได้แก่ ทุเรียน ขนุน จำปาดะ มังคุด มะพร้าว ไผ่ ส้ม โกโก้ ชา กาแฟ เนียงนก พริกไทย พริกขี้หนู น้อยหน่า มันสำปะหลัง สะเดาบ้าน สะเดาเทียม ทัง มะเขือเปราะ กระทกรก มันเทศ น้อยหน่า ลองกอง (เสมอใจ, 2552)

3. เชื้อรา *Rigidoporus microporus*

เชื้อรา *Rigidoporus microporus* เป็นเชื้อราจำพวกเห็ดชั้นสูง มักระบาดในช่วงฤดูฝน เมื่อรากยางปลูกใหม่ไปสัมผัสกับแหล่งแพร่เชื้อดังกล่าว จะทำให้รากติดเชื้อและลุกลามเข้าสู่รากแก้ว ทำให้ต้นยางเป็นโรคตาย สามารถจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อได้ ดังนี้

Kingdom: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Class: Basidiomycetes

Subclass: Agaricomycetidae

Order: Polyporales

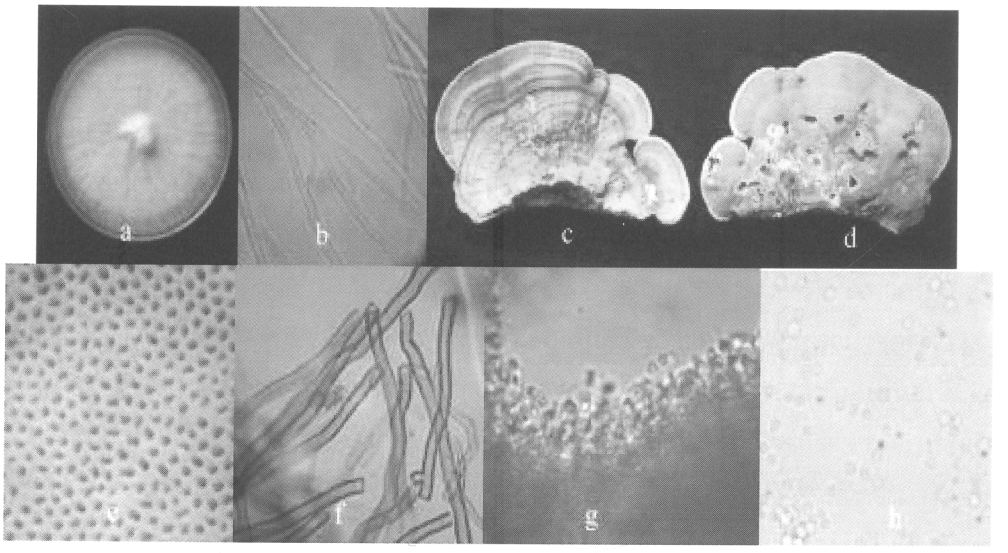
Family: Meripilaceae

Genus: Rigidoporus

Species: *R. microporus*

เส้นใยของเชื้อราสาเหตุของโรคนี้จะแตกสาขา เป็นร่างแหจับติดแน่น และแผ่คลุมทั่วผิวรากที่เป็นโรค เส้นใยจะมีสีขาว และปลายแบน (แต่ถ้าเส้นใยสีขาวสานกัน และหลวมจะไม่ใช่เส้นใยของเชื้อสาเหตุ) เมื่อเส้นใยแก่จะนูนกลม และมีสีเหลืองจนถึงน้ำตาลแดงซีด (Kaewchai *et al.*, 2010) เนื้อไม้ที่เป็นโรคจะมี สีขาวหรือครีม และแข็งกระด้าง ดังแสดงในรูปที่ 3 แต่ถ้าอยู่ในดินที่ชื้นแฉะจะเหลวเละ ดอกเห็ดจะเกิดในระยะที่มีฝนตกตรงบริเวณโคนต้นที่เป็นโรค หรือส่วนรากที่โผล่พ้นผิวดิน และเกิดซ้อนกันหลายชั้น ผิวบนของ ดอกเห็ดจะมีสีเหลืองส้ม ขอบขาว ผิวล่างมีสีส้มแดงหรือสีน้ำตาล เมื่อตัดดอกเห็ดตามขวางจะเห็นชั้นบนเป็นสีขาว และชั้นล่างเป็นสีน้ำตาลแดงอย่างชัดเจน เชื้อโรคสามารถแพร่กระจาย

ได้ด้วยการสัมผัสระหว่างรากที่เป็นโรคกับรากของต้นข้างเคียงลุกลามต่อไป ทั้งในระหว่างต้นและระหว่างแถวยาง นอกจากนี้สปอร์เชื้อรายังแพร่กระจายได้โดยน้ำ ลม และแมลง สามารถเข้าทำลายต้นยางทางบาดแผล ทำให้ต้นยางเป็นโรคและเป็นแหล่งแพร่เชื้อใหม่



รูปที่ 3 ลักษณะของเชื้อรา *R. microporus* Colony on PDA at 6 days (a): โคโลนีที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 6 วัน , (b): เส้นใย (hypha), (c): ผิวด้านบนของดอกเห็ด (fruiting body), (d): ผิวด้านล่างของดอกเห็ด, (e): ลักษณะรูบริเวณผิวด้านล่างของดอกเห็ดซึ่งเป็นที่อยู่ของสปอร์, (f): การสร้างเส้นใย, (g): hymenium และ (h): basidiospores

ที่มา: (Kaewchai *et al.*, 2010))

4. กลไกการตอบสนองของพืชต่อเชื้อก่อโรค

ความต้านทานโรคที่เกิดขึ้นในพืช สามารถจำแนกได้ 2 ประเภท ขึ้นอยู่กับการเหนี่ยวนำ และกลไกของความต้านทานของพืช ได้แก่ ความต้านทานที่มีอยู่แล้วในพืช (constitutive resistance) และความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น (induced resistance) เมื่อพืชถูกรุกรานจากเชื้อโรค พืชสามารถตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยมีกลไกการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคได้ 2 ทางได้แก่ กลไกการป้องกันตนเองทางโครงสร้างของพืช และทางชีวเคมี (Marques *et al.*, 2015) ดังนี้

4.1 กลไกทางโครงสร้างของพืช (Structural or morphological defense mechanism)

เป็นกลไลทางโครงสร้างของพืชที่มีตามธรรมชาติที่จะป้องกันไม่ให้เชื้อผ่านเข้าสู่พืชได้อย่างง่ายดาย เกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อ โครงสร้างของพืชที่มีก่อนการติดเชื้อ เช่นการที่พืชสร้างแว็กซ์ที่เคลือบผิวไว้ซึ่งจะป้องกันการเกาะติดของน้ำที่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อ การมีชั้นคิวติเคิลหนาจะช่วยให้พืชทนต่อการถูกเชื้อเจาะได้ นอกจากนี้ขนาด ตำแหน่งที่อยู่ และรูปร่างของปากใบ มีความสำคัญต่อเชื้อที่สามารถทำให้พืชติดโรคผ่านทางปากใบ รวมทั้งความหนาของผนังเซลล์ที่จะป้องกันการงอกของสปอร์ของเชื้อราซึ่งจะเป็นเกราะป้องกันของพืชทางโครงสร้างอีกชั้นหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อ ซึ่งจะมีการผลิตขึ้นหลังจากพืชถูกกระตุ้นด้วยเชื้อโรค เนื่องจากเชื้อโรคหลายชนิดจะมีการปล่อยสารเคมีที่ไม่จำเพาะ เช่น การผลิตสารพิษต่างๆ สารพวกไกลโคโปรตีน รวมทั้งเอนไซม์ของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่เอนไซม์โปรติเอส เป็นต้น ซึ่งสารเคมีดังกล่าวนี้จะถูกพืชจดจำและทำให้มีการส่งสัญญาณไปยังตัวรับเพื่อให้พืชเกิดการสร้างระบบการป้องกันตนเองขึ้น เช่น การที่พืชผลิตเซลลูโลสเพื่อสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการแพร่กระจายของเชื้อมากขึ้น รวมทั้งการสะสมแคลโลสบริเวณผนังเซลล์ชั้นในของพืช เชื้อโรคจึงไม่สามารถแทรกตัวเข้ามาภายในเซลล์ได้ การสร้าง cork layers หรือเซลล์ที่เจริญเป็นชั้นๆ สามารถยับยั้งการบุกรุกของเชื้อและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้ การปริแตกของเนื้อเยื่อ (abscission regions) เพื่อป้องกันการกระจายเป็นวงกว้างของเชื้อ การสะสมยางเหนียว (gums) ทำให้เชื้อโรคบางชนิดหยุดการเจริญเติบโตและตายไปในที่สุด รวมทั้งการเกิด hypersensitive cell death ซึ่งเป็นการตอบสนองโดยการตายอย่างรวดเร็วของพืชบริเวณที่ติดเชื้อทำให้เชื้อไม่สามารถแพร่กระจายไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ โดยจะสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาลอย่างชัดเจน (Marques *et al.*, 2015; Meyers, 1995)

4.2 กลไกทางชีวเคมี (Biochemical defense mechanism)

แม้ว่าพืชจะมีการป้องกันตัวเองโดยโครงสร้างของพืชเองแล้ว แต่เชื้อโรคต่างๆ ก็ยังสามารถรุกรานเข้าไปในพืชได้อย่างไรก็ตามพืชยังมีการป้องกันทางชีวเคมีอีกทางหนึ่ง นั่นคือการผลิตสารที่มีความเป็นพิษต่อเชื้อ และยับยั้งไม่ให้เชื้อแพร่กระจายลุกลามในต้นพืชได้ สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อเช่นเดียวกับการป้องกันทางโครงสร้าง สารเคมีที่พืชผลิตขึ้นก่อนการติดเชื้อ เช่น ในมะเขือเทศและบีทรูทจะมีการผลิตสารหลั่งที่เป็นพิษต่อเชื้อโรค ซึ่งจะสามารถยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อโรคได้หรือในพืชบางชนิดจะมีการผลิต phytoanticipins ก่อนที่พืชจะมีการติดเชื้อ รวมทั้งยังผลิตสารประกอบฟีนอลิกต่างๆ ด้วย (Agrios, 1997) หรือในบางกรณีสารที่พืชหลั่งออกมาเป็นปกติอยู่แล้ว ก็อาจมีความเป็นพิษต่อเชื้อโรคได้เช่นเดียวกัน เช่น ไดอีน (dienes) เป็นสารประกอบที่คล้ายกรดไขมันชนิดหนึ่งจะมีการผลิตในปริมาณสูงในเซลล์ของใบ และผลอ่อนส่งผลให้ใบและผลอ่อนนั้นมีความต้านทานต่อ

เชื้อมากกว่าเซลล์ที่แก่กว่า ส่วนสารเคมีที่พืชผลิตขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อ เช่น ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexins) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่เป็นพิษต่อเชื้อก่อโรค ในยางพารามีการศึกษากลไกการตอบสนองต่อเชื้อเป็นครั้งแรกโดย Tan และ Low (1975) โดยพบการเกิดสารเรืองแสงภายใต้แสง UV ในเนื้อเยื่อใบภายใต้การตอบสนองต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สารประกอบดังกล่าวยังถูกชักนำให้มีการผลิตขึ้นในยางพาราหลังจากติดเชื้อ *Microcyclus ulei* ด้วย และพบว่าสารเรืองแสงดังกล่าวคือ hydroxycoumarin ให้ชื่อว่า สคอพอลิติน (Giesemann *et al.*, 1986) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินชนิดหนึ่ง พันธุ์วศรี (2547) บ่มแคลลัสยางพาราพันธุ์ GT1 (ค่อนข้างต้านทาน) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* พบว่าซูโอสปอร์สามารถกระตุ้นแคลลัสให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในพันธุ์ GT1 มากกว่าพันธุ์ RRIM600 โดยปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินแปรผันตรงกับระดับความต้านทานโรคของยางพารา นอกจากนี้ยังมีการเกิด hypersensitive cell death ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของกลไกป้องกันโรคที่สำคัญมากที่สุดแบบหนึ่ง ในทางชีวเคมีการเกิด hypersensitive cell death จะมีการปล่อยสารพิษที่จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้เชื้อตายลงเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีการปล่อยสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ เช่น pathogenesis-related proteins (PRs) เพื่อป้องกันการแพร่ขยายเป็นวงกว้างของเชื้ออีกด้วย

5. Pathogenesis-related proteins (PRs)

PR protein เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีขนาดมวลโมเลกุล 10–40 กิโลดาลตัน ซึ่งพืชผลิตขึ้นภายหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อโรค หรือภาวะเครียดต่างๆ (Antoniw et al., 1980) เช่น ความเครียดจากสารเคมีและฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมทั้งการเกิดบาดแผลและการกระตุ้นจากอิลิซิเตอร์ต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายให้กับตนเอง ซึ่งเมื่อพืชผลิตโปรตีนชนิดนี้แล้ว จะมีความเป็นพิษต่อเชื้อโรคที่มารุกราน PR proteins จะถูกสะสมนอกเซลล์ในขณะที่พืชติดเชื้อ โดยโปรตีนนี้จะทนทานต่อ proteolytic degradation ได้ดี และโปรตีนนี้มักจะมีค่า isoelectric point สูง การผลิต PRs ในพืชนั้นไม่ใช่เพียงแต่จะผลิตเพื่อป้องกันเชื้อโรคบริเวณที่ถูกรุกรานโดยตรงเท่านั้น แต่ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดระบบ SAR อีกด้วย (Van Loon and Van Strien, 1999) ดังนั้นโปรตีนกลุ่มนี้จึงมีบทบาทสำคัญต่อพืชในการป้องกันตนเองจากเชื้อโรค รวมทั้งมีความสำคัญต่อการปรับตัวเพื่อการดำรงชีวิตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Edreva, 2005) สำหรับโปรตีน PRs นั้น พบได้ทุกส่วนของต้นพืช ทั้ง ใบ ลำต้น ผล และดอก (Van Loon, 1999) แต่ที่ใบจะมีการสะสมมากกว่า ส่วนอื่นๆ โดยจะพบ PR-proteins ประมาณ 5-10% ของโปรตีนที่พบที่ใบ

โปรตีน PRs มักถูกแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ ลำดับกรดอะมิโน ความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยา (serological relationship) รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆ ในปัจจุบันสามารถจัดแบ่ง PRs ออกเป็น 17 กลุ่มดังแสดงในตารางที่ 1 และได้มีการระบุคุณสมบัติต่างๆ โดยพบว่า PR1-PR5 นั้น

เกี่ยวข้องกับการผลิต antifungal protein (Antoniw *et al.*, 1980; Sels *et al.*, 2008; Van Loon and Van Strien, 1999)

ตารางที่ 1 กลุ่มของโปรตีน PRs

Family	Type member	Typical size (kDa)	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	15	Antifungal
PR-2	Tobacco PR-2	30	b-1,3-Glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	25-30	Chitinase (class I,II, IV,V,VI,VI)
PR-4	Tobacco 'R'	15-20	Chitinase class I,II
PR-5	Tobacco S	25	Thaumatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	8	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P69	75	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	28	Chitinase class III
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	35	Peroxidase
PR-10	Parsley 'PR1	17	'Ribonuclease-like'
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	40	Chitinase class I
PR-12	Radish Rs-AFP3	5	Defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	5	Thionin
PR-14	Barley LTP4	9	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	20	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	20	'Oxalate oxidase-like
PR-17	Tobacco PRp27	27	Unknown

5.1 PR-1 proteins

โปรตีน PR-1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15-17 kDa และมีความคล้ายคลึงกับ superfamily ของ cysteine-rich proteins เป็นชนิดแรกที่มีการค้นพบในใบยาสูบที่ติดเชื้อไวรัสใบยาสูบด่าง (Tobacco Mosaic Virus) มีการสะสมสูงขึ้นภายหลังที่พืชติดเชื้อและมีสมบัติเป็น antifungal protein โดยได้มีการศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ที่แยกได้จากใบมะเขือเทศหลังติดเชื้อ *Phytophthora infestans* พบว่าโปรตีน P14a, P14b และ P14c ซึ่งเป็นโปรตีน PR-1 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *P. infestans* โดยยับยั้งการงอกของ zoospore ในหลอดทดลอง (in vitro) และ ยังทำให้การติดเชื้อในใบมะเขือเทศ (*in vivo*) ลดลงอีกด้วย (Niderman et al., 1995; Tahiri-Alaoui et al., 1993) โปรตีน PR-1 มีการสะสมอยู่ในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ยาสูบ ข้าวบาร์เลย์ และ อะราบิดอพซิส (Selitrennikoff, 2001) และมีฤทธิ์ต้านทานเชื้อราในระดับไมโครโมลาร์ซึ่งสามารถต้านทานจำนวนของเชื้อราที่ก่อโรคในพืชโดยรวมถึงเชื้อรา *Uromyces fabae*, *P. infestans*, และ *Erysiphe graminis* ด้วย (Niderman *et al.*, 1995) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ยังไม่สามารถระบุบทบาทและหน้าที่ของโปรตีน PR-1 ต่อการทำงานในเซลล์และโมเลกุลเป้าหมาย และยังไม่สามารถหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PR-1 กับโปรตีนชนิดอื่นๆ ได้ ทราบแต่เพียงว่ามีการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน PR-1 เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากเมื่อพืชติดเชื้อ เกิดบาดแผลหรือได้รับการกดดันจากสิ่งแวดล้อม 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 จากพิษของแตนชนิดหนึ่งแล้วมีความคล้ายคลึงกับยีน PR-1a ในยาสูบ

การศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ในพริกไทยหลังจากทดลอบด้วย SA และ BABA โดยการฉีดพ่นลงบนต้นอ่อนของพริกไทย ผลการทดลองพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ในระดับสูงเพิ่มขึ้น (Jin Kim and Kook Hwang, 2000) Hong และ Hwang (2002) ศึกษาการตอบสนองของโปรตีน PR-1 ในมะเขือเทศเมื่อมีการกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. capsici* และวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Western blot พบการแสดงออกของโปรตีน PR-1 (น้ำหนักโมเลกุล 17 กิโลดาลตัน) ในปริมาณสูงหลังจากการติดเชื้อไปแล้ว 12-24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน PR-1 ในมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) พบว่าโครงสร้างของโปรตีน PR-1 มีลักษณะจำเพาะซึ่งประกอบด้วย 4 α-helixes และ 4 β-strands เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ของกรดอะมิโนซิสเตอีน (conserved cysteine) จำนวน 6 residues เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน PR-1 จากพืชหลายๆ ชนิด โครงสร้าง 4α-helixes และ 4 β-strands มีการจัดเรียงแบบ antiparallel ระหว่างเกลียวของ α-helix ส่วนที่เป็น α-helix จะอัดตัวแน่นอยู่ทั้ง 2 ด้านของ β-strand เป็นโครงรูป α- β-α sandwich ทำให้มองเห็นเป็นโครงรูปที่อัดแน่น มีลักษณะเป็น 2 โมเลกุล ที่มีแกนตรงกลาง โครงรูปนี้เสถียรได้ด้วยพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) และพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก ด้วยเหตุนี้โครงสร้างของโปรตีน PR-1 จึงน่าจะทำให้โปรตีนชนิดนี้มีความเสถียรสูงและสามารถทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ proteases ได้ (Fernández et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่มีความอนุรักษ์ระหว่างโปรตีน PR-1 ในพืชและโปรตีน homologous PR-1 ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วย โดยมีบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น CGHYTQVVW[R/K]X[S/T][V/T][R/S]XGC (Van Loon and Van Strien, 1999)

จากการศึกษายีน *PR-1* ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN) ที่ติดเชื้อไวรัส สามารถจำแนกโปรตีน PR-1 ได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่ม acidic และ basic โดยมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่แตกต่างกัน

1) โปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic

โปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14-16 kDa มีการค้นพบเป็นครั้งแรกในใบยาสูบ และพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ผักชีฝรั่ง และอะราบิด็อพซิส (Gordon-Weeks *et al.*, 1997) จากการศึกษาในใบยาสูบพบว่าประกอบด้วยโปรตีน 3 กลุ่ม ได้แก่ PR-1a, PR-1b และ PR-1c แบ่งเป็นกลุ่ม a b และ c ได้ตามการเคลื่อนที่ของประจุในสนามไฟฟ้า 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 กรดอะมิโนซึ่งประกอบด้วย N-terminal amino acid signal peptide สามารถตรวจพบโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic ได้บริเวณ extracellular space ของท่อลำเลียงน้ำและแร่ธาตุ (xylem) ของใบยาสูบที่ติดเชื้อ TMV และจะมีการสะสมโปรตีน PR-1a และ PR-1b กลุ่ม acidic นี้ไว้ใน vacuole 15 (crystal idioblast) ของใบยาสูบเพิ่มขึ้นถึง 10,000 เท่า หรือคิดเป็น 1-2% ของโปรตีนที่ผลิตขึ้นทั้งหมดภายในใบ (Cornelissen *et al.*, 1986b) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผลจากการทำบริสุทธิ์โปรตีน PR-1a จากถั่ว

ลันเตา ทดสอบกับเชื้อ *Uromyces fabae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคใบสนิม โปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดนี้ได้ (Rauscher *et al.*, 1999)

2) โปรตีน PR-1 กลุ่ม basic

โปรตีน PR-1 กลุ่ม basic มีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 10.7 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic มี open reading frame 177 กรดอะมิโน ประกอบด้วย N-terminal ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) 30 กรดอะมิโน ซึ่งทำหน้าที่เป็น signal peptide เพื่อนำโปรตีน PR-1 ไปยัง endoplasmic reticulum และด้าน C-terminal ประกอบด้วย 18 กรดอะมิโนที่มี vacuolar targeting signals (Eyal *et al.*, 1992) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 ของใบยาสูบกลุ่ม basic พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-1 กลุ่ม acidic 67% Van Loon และ Van Strien (1999) ได้รายงานว่าโปรตีน P14 ที่สกัดจากมะเขือเทศมีคุณสมบัติเหมือนกับโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ที่สกัดได้จากยาสูบ และยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งการทดลองแบบ *in vitro* โดยยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์และการเจริญของ mycelium ของเชื้อ *P. infestans* และแบบ *in vivo* โดยสามารถลดการติดเชื้อบริเวณใบของมะเขือเทศได้ นอกจากนี้ Niderman และคณะ (1995) พบว่ามี isoform ของ โปรตีน PR-1 กลุ่ม basic อื่นๆ อีกหลายชนิดที่มีสมบัติในการต้านเชื้อราอีกด้วย

5.2 PR-2 proteins (β-glucanses)

โปรตีน PR-2 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อรา มีสมบัติเป็นเอนไซม์ β-1,3 glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic enzyme ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการย่อยสายโพลิเมอร์ของโปรตีน β-1,3 glucans แบบ endo-type โดยอาศัยปฏิกิยา hydrolytic cleavage ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะของ 1,3 β-D-glucosidic linkages ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเชื้อราชั้นสูง (Simmons, 1994) ยกตัวอย่างเช่น ในเชื้อรา *P. infestans* ซึ่งเป็นราในคลาส oomycete เชื้อสาเหตุของโรคใบไหม้ (late blight) ในมะละกอและมันฝรั่ง เชื้อราในกลุ่มนี้มี β-1,3-glucan เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ประมาณร้อยละ 80-90 ซึ่ง β-1,3-glucan นี้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ของเอนไซม์ β-1,3 glucanases ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีบาทบาทหน้าที่ในการป้องกันการเขาทำลายจากเชื้อราได้โดยการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา การสังเคราะห์เอนไซม์ β-1,3 glucanases สามารถถูกชักนำจากเชื้อโรคและสิ่งกระตุ้นอื่นๆ พบมากในเนื้อเยื่อพืชและการสร้างเซลลูโลส ใบ และระบบราก

เอนไซม์ β-1,3 glucanases พบในพืชหลายชนิดและมีหลายไอโซฟอร์ม มีความแตกต่างกันของขนาด ค่า isoelectric point โครงสร้างปฐมภูมิ และตำแหน่งที่ตั้งในเซลล์ (Gerhard and Frederick, 1999) ซึ่งขึ้นอยู่กับการตอบสนองของพืชเมื่อมีเชื้อโรคเข้าทำลาย ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซฟอร์มเหล่านี้ได้มาจากการโคลน cDNA และ Genomic ในใบยาสูบ ซึ่งมีรูปแบบเป็น

multigene family สามารถจำแนกโปรตีน PR-2 ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโน

ตารางที่ 2 กลุ่มของโปรตีน PR-2

β-1,3 glucanase Class	Subgroup	Source	Molecular weight (KDa)	PI	Localization
I	PR-2e	*Nicotiana plumbifola*	33	Basic	Vacuolar
II	PR-2a,b,c	*Nicotiana tonentisofrmis*	35	Acidic	Secreted
III	PR-Q	*Nicotiana tonentisofrmis*	35	Acidic	Secreted
IV	Tag I	*Nicotiana tonentisofrmis*	35	Acidic	Secreted

ที่มา: Sudisha และคณะ (2012)

class I glucanase เป็น basic proteins มีน้ำหนักประมาณ 33 kDa ถูกผลิตขึ้นเป็น preproprotein มี signal peptide ทางด้านปลาย N-terminal ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งจะถูกเคลื่อนย้ายออกไปด้วยวิธี co-translation และด้านปลาย C-terminal จะเกิดกระบวนการ Glycosylation ซึ่งเป็นการเติมคาร์โบไฮเดรตในตำแหน่ง N ของกรดอะมิโน asparagine 1 ตำแหน่ง โดย C-terminal มีสัญญาณส่งต่อโปรตีนจาก endoplasmic reticulum ผ่าน Golgi compartment ไปยัง vacuole ของเซลล์พืช (Gerhard and Frederick, 1999) โปรตีน β-1,3 glucans class I, II, III และ IV ไม่มี C-terminal extension มีเพียง single site สำหรับส่งต่อโปรตีนไปยัง vacuole เท่านั้น สำหรับโปรตีนชนิดนี้ใน class II, III และ IV เป็น acidic proteins (extracellular proteins) มีขนาดประมาณ 35 kDa นอกจากนี้ β-1,3 glucanase isoforms ยังจำแนกได้จากพืชอื่นอีกหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวสาลี ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และข้าวโพด (Sudisha *et al.*, 2012)

ในภาวะปกติปริมาณเอนไซม β-1,3 glucanase จะมีการสะสมอยู่ในระดับที่ต่ำในเนื้อเยื่อพืชทั่วไป และถูกชักนำไดถูกเชื้อก่อโรคเชื้อรา ไวรัส แบคทีเรียเข้าทำลาย หรือเมื่อไดรับสิ่งกระตุ้น (elicitors) (Jin Kim and Kook Hwang, 1994) ในปี 1994 Van Kan และคณะรายงานว่า β-1, 3-glucanase ในมะเขือเทศซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม acidic มีการแสดงออกในระดับสูงมากขึ้นในใบมะเขือเทศที่ได้รับเชื้อรา *Cladosporium fulvum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคราดำมะหยี่ (Leaf mold) (Beerhues and Kombrink, 1994) จากนั้นในปี 1995 Alonso และคณะ ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของเอนไซม์ β-1, 3-glucanase ในใบยาสูบหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv *syringae* พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวถูกชักนำให้แสดงออกเพิ่มขึ้นเป็น 21 เท่าเมื่อเปรียบเทียบ

กับชุดควบคุม ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ของ Castresana และคณะ (Alonso et al., 1995; Castresana *et al.*, 1990)

การชักนำการแสดงออกของโปรตีน PR-2 จากเชื้อโรคมีความแปรปรวนในโคลนที่แตกต่างกันของพืชชนิดเดียวกัน กล่าวคือเมื่อ β-1, 3-glucanase ถูกกระตุ้นให้ผลิตขึ้นจากเชื้อ *Corynespora cassiicola* โดยเปรียบเทียบการแสดงออกในโคลนที่แตกต่างกันของยางพารา และสังเกตความแปรปรวนของเอนโปรตีนดังกล่าวพบว่ามีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการเกิดโรค โดยโปรตีนชนิดนี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในโคลนที่มีความทนทานในขณะที่โคลนที่อ่อนแอมีการแสดงออกของโปรตีนลดต่ำลง (Philip *et al.*, 2001)

5.3 PR-3 proteins (chitinases)

PR-3 proteins (chitinases) มีสมบัติเป็นเอนไซม์ chitinases มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 26-44 kDa (Nielsen *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1999) เอนไซม์ chitinases สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ได้แก่

- class I chitinases ประกอบด้วย N-terminal cysteine-rich domain ประมาณ 40 กรดอะมิโนซึ่งมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า chitin-binding hevein-like domain โปรตีนในกลุมนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 kDa ซึ่งมีการค้นพบ class I chitinases ในพริกไทย (Young and Byung, 1996)

- Class II chitinases เป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันกับ class I chitinases แต่ขาดส่วนของ N-terminal cysteine-rich domain และมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 27-28 kDa (Porat *et al.*, 2001)

- Class III chitinases เป็นโปรตีนที่ไม่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกลุ่มอื่นๆ มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 28-30 kDa พบเอนไซม์ชนิดนี้ในตำแย (*Utrica doica*)

- Class IV chitinases เป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันกับ class I chitinases และ Class II chitinases แต่โปรตีนชนิดนี้มีน้ำหนักน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากมีการขาดหายไปกรดอะมิโน 4 ชนิด (Porat *et al.*, 2001)

- Class V chitinases มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันกับ exochitinases ในแบคทีเรียและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41-43 kDa (Velazhahan *et al.*, 2000)

เอนไซม์ chitinases สามารถแยกได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และพืชหลายๆ ชนิด เอนไซม์เหล่านี้เมื่อผลิตขึ้นแล้วจะมีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคทั้งในมนุษย์และพืช โปรตีน PR-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ endochitinases มีความสามารถในการแยกสายพอลิเมอร์ของไคตินในผนังเซลล์ของเชื้อราได้ ดังนั้นจากหลายๆ งานทดลองจึงเห็นได้ว่าโปรตีน PR-2 (β-glucanases) และ PR-3 (chitinases) บทบาทหน้าที่และการทำงานร่วมกันในการยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Jach *et al.*, 1995)

5.4 PR-4 proteins (chitin-binding)

โปรตีน PR-4 เป็นโปรตีนประเภท chitin-binding proteins มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9-30 kDa และมีค่า pI เป็นเบส (Borad and Sriram, 2008) โปรตีนชนิดนี้สามารถแยกได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

- Class I PR-4 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันกับโปรตีน hevein และ Win ในน้ำยาง (Friedrich *et al.*, 1991; Koo *et al.*, 1998; Sudisha *et al.*, 2012) และจัดอยู่ใน superfamily ของ chitin-binding lectins

- Class II PR-4 เป็นกลุ่มที่พบในใบยาสูบซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช

โปรตีน PR-4 มีการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ยาสูบ ข้าวบาร์เล่ย์ มะเขือเทศ เป็นต้น (Friedrich *et al.*, 1991; Hejgaard *et al.*, 1992; Koo *et al.*, 1998; Van Damme *et al.*, 1999) การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้พบว่าโปรตีนทั้ง 2 class มีสมบัติในการต้านทานเชื้อราทั้งในพืชและในสัตว์ เช่น ต้านทานต่อเชื้อ *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *B. cinerea* การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน PR-4 ในพริก (*Capsicum annuum* L.) พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อพริกถูกเข้าทำลายจากเชื้อ *Xanthomonas euvesicatoria* โดยมีปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ซึ่งเป็นปฏิสัมพันธ์ที่เกิดการรับรู้จดจำระหว่าง *avr* gene และ *R* gene ลักษณะฟโนไทปของปฏิสัมพันธ์นี้คือปฏิกริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response: HR) ทำให้พืชไม่เกิดโรค และยังพบว่าโปรตีนในกลุ่มนี้สามารถถูกกระตุ้นได้จาก abiotic ได้แก่ เอทีฟอน (ethephon) เมทิลแจสโมเนท (methyl jasmonate) และการเกิดบาดแผล (wounding) อีกทั้งยังพบว่าโปรตีนชนิดนี้มีการแสดงออกอย่างความจำเพาะในเนื้อเยื่อพืชโดยพบการแสดงออกของโปรตีน PR-4 ในท่อลำเลียงอาหารของใบพริกไทย (Lee *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2008) นอกจากนี้ในปี 2014 Hwang และคณะ ได้ทำการศึกษาโปรตีน PR4b ในพริก (*Capsicum annuum*) เพื่อศึกษากลไกการป้องกันตนเองของพืชและการส่งสัญญาณการตายของเซลล์พืชมี receptor ที่เป็นตำแหน่งจดจำการเข้าทำลายจากเชื้อโรคได้ เช่น leucine-rich repeat (LRR) proteins (Hwang *et al.*, 2014) เช่นเดียวกับพริก LRR1 สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน PR4b ใน plasma membrane การจับกันของโปรตีน PR4b และ LRR1 อาศัย domain ที่สำคัญของ PB4b นั่นก็คือ chitin-binding domain ซึ่งโปรตีน PR4b ถูกสังเคราะห์ใน endoplasmic reticulum และยังพบว่าการทำบริสุทธิ์โปรตีน PR4b สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราและการเจริญเติบโตของ mycelial ได้ นอกจากนี้ Hwang และคณะ ยังได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR4b* แบบ Transient expression พบว่า ยีน *PR4b* สามารถกระตุ้นการเกิด hypersensitive cell death ใน

พริกไทย และยังพบว่าการทำยีน *PR4b* ให้เกิดการกลายพันธุ์ในอะราบิด็อพซิส ส่งผลให้อะราบิด็อพซิสอ่อนแอ่ต่อการติดเชื้อ *Hyaloperonospora arabidopsidis*

5.5 PR-5 protein

โปรตีน PR-5 มีความคล้ายกันกับโปรตีน thaumatin ที่ได้มาจาก *Thaumatococcus danielli* (Bennett) Benth อย่างมีนัยสำคัญ โปรตีนชนิดนี้จึงถูกเรียกว่า Thaumatin-like proteins (TL proteins) (Borad and Sriram, 2008; Cornelissen et al., 1986a) TL protein มีการศึกษาในพืชมากมายหลายชนิด โดยสามารถตรวจพบโปรตีนชนิดนี้ในใบอ่อนของมะเขือเทศ ยาสูบ มันฝรั่ง พืชตระกูลกระหล่ำ ข้าว พาร์สเลย์ (Parsley) ข้าวโพด และถั่ว TL proteins มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อพืชหลายส่วนด้วยกันได้แก่ ราก เปลือกชั้นนอก (epidermis peel) วงกลีบดอก (Corolla) ตาดอก (flower bud) เมล็ดธัญพืชต่างๆ ส่วนใหญ่เป็น soluble proteins มีการสะสมอยู่ทั้ง subcellular และ extracellular (Borad and Sriram, 2008; Sudisha *et al.*, 2012; Velazhahan *et al.*, 1999) และมีน้ำหนักโปรตีนประมาณ 16-26 KDa TL proteins มีการแบ่งกลุ่มทั้ง acidic และ basic ค่า pI ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่อยู่ของโปรตีน โดยหากโปรตีนชนิดนี้มีตำแหน่งอยู่ใน extracellular จัดอยู่ในประเภทของ acidic สำหรับกลุ่ม basic ตำแหน่งของโปรตีนอยู่ใน vacuole โปรตีนชนิดนี้ไม่มีกระบวนการ glycosylation เหมือนกลุ่มอื่นๆ และทนทานต่อการถูกย่อยจากเอนไซม์โปรติเอส (proteases) เนื่องจากมี 16-cysteines (Capelli *et al.*, 1997; Roberts and Selitrennikoff, 1990) โครงสร้างของ TL proteins ที่ได้มาจากเมล็กข้าวโพดมีโครงสร้างแบบ β-pleated sheet ประกอบด้วย 2 โดเมนยึดเกาะกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) นอกจากนี้โปรตีน osmotins และ osmotin like proteins จัดอยู่ในโปรตีนกลุ่มนี้ด้วย โดยมีค่าความเหมือนกันของกรดอะมิโน 76%

แม้ว่าบทบาทหน้าที่ของ TL proteins จะยังไม่ทราบแน่ชัดแต่โปรตีนในกลุ่มนี้ก็เกี่ยวข้องกับระบบ Acquired systemic resistance ซึ่งมีการตอบสนองต่อ biotic stress ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราและการงอกของสปอร์ (Thompson *et al.*, 2007) การศึกษาบทบาทการทำงานของ TL proteins ที่แยกได้จากเมล็ดป่าน (flax seeds) พบว่า TL proteins แสดงฤทธิ์ต้านทานต่อเชื้อรา *Alternaria alternata* โดยกลไกความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอก (membrane permeabilization) ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนและไขมันที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรามีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ (Anzlovar *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา TL proteins ในเชอรี่ แอปเปิ้ล และกล้วย ซึ่งพบว่าโปรตีนดังกล่าวนี้มีกลไกออกฤทธิ์ต้านทานต่อเชื้อรา *Verticillium alboatrum* เช่นเดียวกัน และยังทำงานร่วมกันกับ endo- â1,3-glucanase อีกด้วย (Borad and Sriram, 2008)

การศึกษาการแสดงออกของยีน *PRs* (*PR1*, *PR3*, *PR5*, *PR8* และ *PR9*) ในยางพาราโคลน RRIM612 และ PR107 ภายหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อ *R.microporus* โดย Oghenekaro

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

และคณะ (2016) พบว่าหลังจากปลูกถ่ายเชื้อราดังกล่าวผ่านไป 5 สัปดาห์ PR3 class I chitinase มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในโคลน RRIM612 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม PR9 class IV peroxidase มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในโคลน PR107 สำหรับ PR1 และ PR8 มีการแสดงออกสูงในชุดควบคุมสูงกว่าชุดการทดลองที่มีการปลูกถ่ายเชื้อลงไป ซึ่งผลการทดลองของเขาแสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมแต่ละโคลนของยางพารามีบทบาทสำคัญต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (defence gene expression) (Oghenekaro *et al.*, 2016)

6. โปรตีน PRs ที่เกี่ยวข้องกับระบบ Systemic Acquired Resistance (SAR)

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PRs และความต้านทานในพืชเป็นกลไกที่ซับซ้อนและเข้าใจได้ยาก ปัจจุบัน Edreva (2005) ได้สรุปความสัมพันธ์ดังกล่าวไว้ว่า ระหว่างที่พืชพันธุ์ต้านทานติดเชื้อโรคจะมีการสะสมโปรตีน PRs ในปริมาณมากกว่าพืชพันธุ์ที่อ่อนแอหลายเท่า ดังนั้นในพืชที่มีความต้านทานสูงอยู่แล้วในธรรมชาติ (พืชพันธุ์ต้านทาน) จึงมักจะมีการแสดงออกของ PRs ในระดับสูง สำหรับพืชที่มีการดัดแต่งพันธุกรรมให้มียีน *PRs* แสดงออกมากเกินพอ จะมีความต้านทานต่อโรคเพิ่มมากขึ้นเช่นยาสูบที่มียีน *PR-1a* จะทนต่อเชื้อ *Peronospora tabacina* และ *P. parasitica var. nicotianae* และการสะสมโปรตีน PRs ในพืชจะทำให้เกิดความต้านทานในพืชทั้งบริเวณที่ติดเชื้อ (local resistance) และบริเวณอื่นที่ไกลออกไป (systemical resistance) ยีน *PRs* จึงมักถูกใช้เป็นเครื่องหมาย (marker) สำหรับการเกิดภาวะ systemic acquired resistance หรือ ภาวะ SAR และเรียกยีน *PR* (*PR*-genes) ที่เกี่ยวข้องกับระบบ SAR ว่า *SAR-genes*

SAR เป็นระบบป้องกันตนเองที่พืชสามารถชักนำให้เกิดการต้านทานต่อโรคได้โดยไม่จำเพาะเจาะจงและมีความต้านทานทั้งบริเวณที่ถูกบุกรุกโดยตรงและบริเวณที่ไกลออกไปที่ไม่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค ระบบป้องกันตัวของพืชเริ่มต้นจากกระบวนการจดจำ (recognition) ระหว่างพืชกับเชื้อโรคซึ่งทำให้การต่อต้านเฉพาะที่ในขั้นที่ 1 เริ่มทำงาน เมื่อเกิด HR ขึ้น หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอย่างรุนแรง (oxidative birst) เซลล์พืชในบริเวณนั้นจะสังเคราะห์กรดซาลิไซลิค (salicylic acid; SA) ขึ้นมาซึ่ง SA นี้จะไปกระตุ้นให้ *PR gene* สร้าง mRNA ขึ้นมาปริมาณมากเพื่อนำไปสังเคราะห์ PR-protein (Silverman *et al.*, 2005) ระบบ SAR จะเกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ ภายหลังจากการติดเชื้อโรคแต่จะ

สามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้พืชนั้นมีความทนทานต่อเชื้อบุกรุกหลายๆ ชนิดในเวลาต่อมาได้ (Cameron *et al.*, 1994; Dempsey, 1993; Yalpani, 1993) โดยพืชที่มีระบบ SAR จะสามารถต้านทานต่อเชื้อบุกรุกครั้งต่อไป ซึ่งอาจเป็นเชื้อชนิดเดิมหรือเป็นเชื้อที่แตกต่างจากเดิมก็ได้ พื้นฐานของระบบ SAR แตกต่างจากความจำเพาะระหว่างแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody) ที่เป็นตัวกลางในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพราะการเกิด

SAR ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่งและมีช่วงเวลาในการแสดงที่สั้นกว่าระบบภูมิคุ้มกัน การเกิด SAR ทำให้เกิดการแผ่ขยายออกของนีโครซีสอย่างช้าๆ ซึ่งในพืชที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิด SAR ทำให้เกิดการตอบสนองในการป้องกันตัวเองที่เร็วและมากกว่าในพืชที่ไม่เคยได้รับการกระตุ้น ระบบ SAR มีโมเลกุลส่งสัญญาณคือ SA และเกี่ยวข้องกับการสะสม PRs โดยเฉพาะโปรตีน PR-1 (Alexander *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1991)

การเกิด SAR จำเป็นต้องมี SA ทำหน้าที่เป็นสัญญาณลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชเพื่อกระตุ้นการทำงานของยีน ซึ่ง 69% ของ SA ที่พบทั้งหมดถูกสร้างและลำเลียงจากส่วนของพืชที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายพืช (Shulaev *et al.*, 1994) Gaffney และคณะ (1993) ทำการทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่าง SA และ SAR โดยการถ่ายยีน nahG เข้าสู่ต้นยาสูบและ Arabidopsis ซึ่ง nahG นี้ทำหน้าที่สร้างสาร salicylate hydroxylase โดยสารนี้จะไปทำลาย SA และเมื่อปลูกเชื้อโรคพืชให้แก่ต้นพืชทั้งสองชนิด พบว่าพืชมีการสร้าง SA ในปริมาณที่น้อยมาก และไม่พบการแสดงออกของ *PRs* gene

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ/อุปกรณ์การทำวิจัย

วัสดุ

1. เคมีภัณฑ์

1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

ตารางที่ 3 ชื่อสารเคมีเกรดวิเคราะห์และบริษัทผู้ผลิต

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Boric acid	BDH
Tris-base	BDH
Calcium carbonate	Fluka
Chloroform	Merck
Ethyl alcohol	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	BDH
Formamind	Sigma
Glycerol	Merck
Hydrochloric acid	Fluka
Isopropyl alcohol	Sigma
Phenol, Saturated, pH 6.6/7.9	Amresco
Potato dextrose agar	Difco
Sodium chloride (NaCl)	BDH
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck
Sodium thiosulfate	Merck
Tryptone	Difco
Urea	BDH
Yeast extraction Sigma	Difco

2.2 สารเคมีชนิดเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

ตารางที่ 4 ชื่อสารเคมีเกรดอณูชีววิทยาและบริษัทผู้ผลิต

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
100bp DNA Ladder	Promega
Agarose	Merck
Ampicillin	Sigma
*Pst*I	Promega
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Sigma
*Eco*RI	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Ribonuclease A (RNase A)	Merck
QIA prep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIA quick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIA quick PCR Purification Kit	QIAGEN
T4 DNA ligase	Promega
Taq DNA polymerase	Invitrogen
TRIzol®LS Reagent	GIBCO BRL®

2. ตัวอย่างพืช

ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ยางพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วว่าทนทานต่อการเข้าทำลายจากโรครากขาวโดย Wattanasilakorn และคณะ (2012) จำนวน 2 โคลน ได้แก่ โคลน PSU1 ในพื้นที่มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และ โคลนบางรัก อ.กันตัง จ.ตรัง จากสถานที่ต่างๆ โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทย รวมทั้งยางพาราพันธุ์ PB5/51 และสายพันธุ์ยางพาราที่มีการรายงานว่าอ่อนแอต่อโรครากขาว ได้แก่ พันธุ์ RRIM600 และ BPM 24 (จรัสศรี และคณะ, 2558) ทำการเพาะเมล็ดยาง จนต้นกล้ายางมีอายุ 3 เดือน จึงทำการปลูกถ่ายเชื้อรา *R. microporus*

3.จุลินทรีย์

3.1 แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 (Invitrogen)

3.2 เชื้อ *Rigidoporus microporus* ซึ่งได้รับมาจากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

อุปกรณ์

1. หลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 และ 0.5 มิลลิเมตร
2. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 และ 2.0 มิลลิเมตร
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้
7. เครื่องวัดพีเอช
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง
9. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้
10. กล้องจุลทรรศน์
11. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
12. ตู้เก็บเชื้อ -20 องศาเซลเซียส
13. ตู้บ่มเชื้อ -80 องศาเซลเซียส
14. หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA-300 M II
15. ตู้อบเครื่องแก้ว
16. เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis system)
17. ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow

18. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction
19. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
20. เครื่องบันทึกแผนภาพดีเอ็นเอ
21. ไมโครออโตปิเปต พร้อมทิป ขนาด 0.1-2, 2-20, 10-100 และ 200-1000
22. Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
23. Nanodrop Spectrofluorometer
24. ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร
25. จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
26. โกร่งบดตัวอย่าง
27. เครื่องแก้วพื้นฐาน (กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร บีกเกอร์ และหลอดทดลอง)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ยางพันธุ์ดั้งเดิมที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วว่าทนทานต่อการเข้าทำลายจากโรครากขาวโดย วัฒนาศิลากร และคณะ (2012) จำนวน 2 โคลน ได้แก่ โคลน PSU1 ในพื้นที่มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และ โคลนบางรัก อ.กันตัง จ.ตรัง จากสถานที่ต่างๆ โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทย รวมทั้งยางพาราพันธุ์ PB5/51 และสายพันธุ์ยางพาราที่มีการรายงานว่าอ่อนแอต่อโรครากขาว ได้แก่ พันธุ์ RRIM600 และ BPM 24 ทำการเพาะเมล็ดยาง จนต้นกล้ายางมีอายุ 3 เดือน จึงทำการปลูกถ่ายเชื้อรา *R. microporus*

2. โคลนและศึกษาสมบัติของ*ยีน PRs*

2.1 การทำ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.1.1 การสังเคราะห์สาย cDNA

นำ RNA จากใบยางพารามาทำการสร้างสาย cDNA โดยใช้วิธีการตามบริษัท Thermo sciencetific โดยเริ่มจากทำการผสมสารต่างๆ ดังนี้ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 สารที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย cDNA

สารเคมี	ปริมาตร (หน่วยเป็น ไมโครลิตร)
Total RNA (ปริมาณสุดท้าย 2.0ไมโครกรัม)	X
Oligo dT primer	1
10 mM dNTP mix	1
DI-DEPC	Y
ปริมาตรทั้งหมด	15

นำสารละลายผสมข้างต้น บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ต่อมานำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที หลังจากนั้นทำการเติมสารดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 สารที่ใช้ในการสังเคราะห์สาย cDNA

สารเคมี	ปริมาตร (หน่วยเป็น ไมโครลิตร)
5x RT buffer	4
Maxima H Minus Enzyme Mix	1
ปริมาตรทั้งหมดจากเริ่มต้น	20

นำสารละลายผสมบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยนำสารละลายผสมบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ต่อมาทำการย่อยอาร์เอ็นเอต้นแบบโดยใช้ 2U RNase H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำ cDNA ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ที่ได้จากข้อ 2.1 มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Degenerate primer (ตารางที่ 5) กับยีน *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4* และ *PR5* ดังแสดงในตารางที่ ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ antifungal gene และกำหนดโปรแกรม PCR ดังนี้

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 ที่ได้กับ100 bp DNA ladder plus

ตารางที่ 7 การออกแบบ Degenerate primers

Gene	Direction	Sequence (5'→ 3')
PR1	Forward	TCTTGTGCATTCCAGCAATC
	Reverse	CACCTCACCTTAGCACATCCT
PR2	Forward	GTGGAGYWGGAACCATCAAG
	Reverse	ATTTGCWAKAAGRTARGCCTCAA
PR3	Forward	ATGGGCWACWGCACCAGACGG
	Reverse	CCACCGTTRATGATGTTYGT
PR4	Forward	GAGCAACWTACMATWWCTACAA
	Reverse	GCAYTGATCMACKATTCTCAC
PR5	Forward	AACAACTGCCCCWACMCKRTCT
	Reverse	TTAGGGTARCTRTAAGCATC

2.2 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ตัดเจลส่วนที่เป็นแถบดีเอ็นเอ เติมสารละลาย QG 10 ไมโครลิตรต่อเจลน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ผสมให้สารละลายเข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจนเจลละลายหมด จากนั้นถ่ายโอนสารจากหลอดทดลองมาใส่หลอดที่เป็นคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายล้างคอลัมน์ (ซึ่งมี 95% ethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส นำมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้น้ำปราศจาก Nuclease ชะส่วนกลางของคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย 1.5 % Agarose gel electrophoresis และเก็บสารละลายที่ 4 องศาเซลเซียส

2.3 การโคลน DNA ของยีน *PRs* กับ RBC TA cloning vector

ทำการเชื่อมดีเอ็นเอของ PRs ที่ได้จากการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์กับเวคเตอร์ TA cloning vector โดยมีส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้ ดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม, TA cloning vector 25 นาโนกรัม, 10X ligation buffer 1 ไมโครลิตร และ 0.3 U T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน E.coli Top 10 F' โดยนำเซลล์เจ้าบ้าน 200 ไมโครลิตร แช่บนน้ำแข็งให้ละลาย เติมดีเอ็นเอที่ ligate แล้วแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วแช่บนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที นำมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง LB ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

สุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวแบบสุ่มมาจำนวน 10 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย STET buffer (8% (w/v)glucose, 5%(v/v)Triton X-100, 50 mM EDTA และ 50 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เขย่าเพื่อให้ตะกอนละลายด้วยการ Vortex วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 40 วินาที วางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที นำไป

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเขี่ยตะกอนออกโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของ STET buffer ผสมให้เข้ากัน นำไปตกตะกอนที่ –70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบผลว่ามีดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านหรือไม่ โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis คาดคะเนจากการเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอกับแถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่มียีน PRs ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดควรมีแถวดีเอ็นเอเหนือแถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่มียีน PRs จากนั้นเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่คาดว่ามียีน PRs มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร มีดังนี้ ดีเอ็นเอ 8 ไมโครลิตร, 10X bufferH 2 ไมโครลิตร, RNaseA 1 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ EcoRI (5,000U) 0.5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลที่ได้ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis

2.4 การทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์เพื่อหาลำดับเบสของยีน PRs

นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAprep® Spin Miniprep Kit โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB (ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วละลายตะกอนด้วยสารละลาย P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา 4-6 ครั้ง นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสมาผ่านคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างคอลัมน์อีกครั้งด้วยสารละลาย PE buffer 750 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัด เอทานอลออกให้หมด แล้วย้ายคอลัมน์มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วย

ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ด้วย 1.0% Agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิด เก็บพลาสมิดที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2.5 การศึกษาลำดับเบส (sequencing)

ศึกษาลำดับเบสของโคลนที่ได้จากข้อ 1.5 โดยใช้เครื่อง ABI PRISM 377 DNA sequencer (Version 3.2) และ ABI PRISMTM BigDyeTM Termination kit ของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อศึกษาลำดับเบสของยีนที่มีการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะและสามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ถูกต้องได้

3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน *PRs* ในยางพาราด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)

3.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5′

สร้างสาย first-strand cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ตามขั้นตอนของบริษัท Thermo sciencetific ต่อสายปลาย 3′ ด้วย dCTP โดยใช้เอนไซม์ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) เพื่อเป็นตำแหน่งในการจับของ oligo dC-anchor primer จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ oligo dC-anchor primer และ specific reverse primer 1 (5′AAGGTTCTCCCCGTAAGGAC 3′) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PR1* ทางด้านปลาย 5′ และสร้างทำปฏิกริยา PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้ specific reverse primer 2 เพื่อให้มีความจำเพาะต่อยีน *PRs* มากยิ่งขึ้น จากนั้นจึงจะเข้าสู่ปฏิกิริยาทั่วไปของวิธี PCR ตรวจสอบแถบ DNA ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% (w/v) agarose gel และทำบริสุทธิ์แถบ DNA ที่ได้ตามวิธีการในข้อ 2.2-2.5 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank

3.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3′

สร้างสาย first-strand cDNA ด้วย Oligo dT primer ตามด้วยปฏิกิริยาทั่วไปของวิธี PCR ครั้งที่ 1 โดยใช้ B26 primer (5′GACTCTAGACGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTT3′) ซึ่งเป็น primer ที่ complementary กับ oligo dT และ specific forward primer 1 และ PCR anchor primer (-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 จากนั้นทำ

บริสุทธิ์แถบ DNA ที่ได้ตามวิธีการในข้อ 2.2-2.5 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วตรวจสอบกับฐานข้อมูลใน GenBank

4. ศึกษาการแสดงออกของยีน PRs ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของยางพารา

ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR1* และยีน *PR3* เพื่อดูการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อที่จำเพาะของยางพาราโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PR1* ซึ่งมีลำดับเบสคือ forward 5' TCTTGTGCATTCCAGCAATC 3', reverse 5' CACTTCACCTTAGCACATCCT 3' และยีน *PR3* forward 5' ATGGGCTACTGCACCAGACGGA 3', reverse 5' CCACCGTTRATGATGTTYGT ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของยางพารา ได้แก่ เมล็ดอ่อน เมล็ดแก่ ใบอ่อน ใบแก่ เปลือก โดยการนำชิ้นส่วนต่างๆ ดังกล่าวมาสกัด RNA ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.1 และดูการแสดงออกของยีน *PRs* ด้วยเทคนิค RT-PCR

5. การสกัด Total RNA

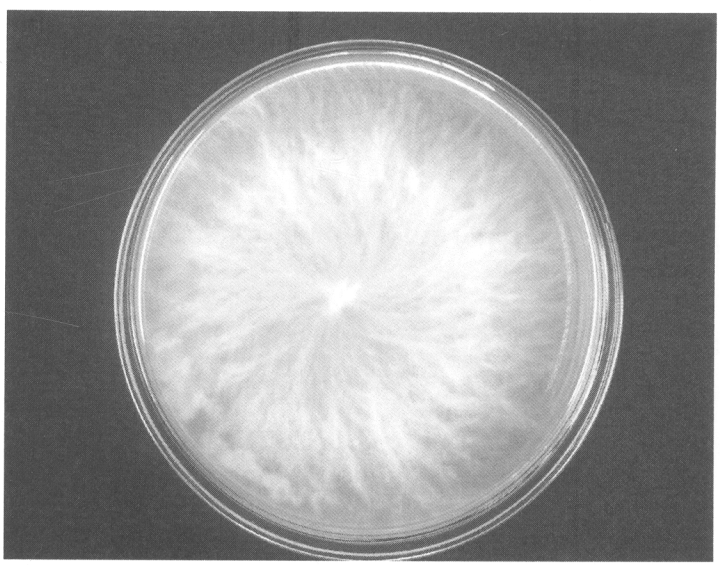
สกัด Total RNA จากใบยางพารา ประมาณ 0.1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบด เติมสารละลาย Extraction buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Phenol-Chloroform-isoamyl ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,200 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาเติม Phenol-Chloroform-isoamyl ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,200 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาเติม Chloroform-isoamyl ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,200 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย และ Sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่าของส่วนใสที่ได้ ตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,200 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอล นำตะกอนไปทำให้แห้ง ละลายด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยการเติม extraction buffer 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Phenol-Chloroform-isoamyl ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาเติม Chloroform-isoamyl ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนมาตกตะกอนด้วย 8 M $LiCl_2$ ตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนด้วย 2 M $LiCl_2$ ตากตะกอนให้

แห้ง ละลายด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TAE buffer (ประกอบด้วย 40 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) และวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บสารละลาย อาร์เอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. เตรียมเชื้อ *R. microporus* เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs ในต้นกล้ายางพารา

6.1 การเตรียมเชื้อ *R. microporus*

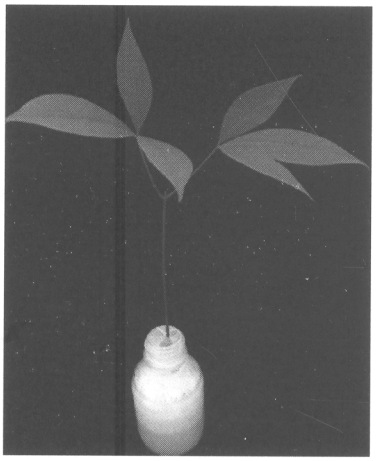
นำเชื้อ *R. microporus* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ ม.สงขลานครินทร์ มาแยกอีกครั้งโดยการเกลี่ย Basidiospore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA, ดูภาคผนวก) จากนั้นย้ายใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ย้ายเชื้อที่ได้ลงบนอาหาร PDA ถาดใหม่ เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปใช้งาน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 เชื้อ *R. microporus* บนอาหาร PDA เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

6.2 การปลูกเชื้อ *R. microporus*

นำต้นกล้ายางพาราโคลนต่างๆ มาปลูกถ่ายเชื้อ *R. microporus* (รูปที่ 5) และทำการเก็บใบยางพาราที่เวลา 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อสกัด total RNA



รูปที่ 5 ตัวอย่างต้นกล้ายางพาราที่ปลูกถ่ายเชื้อ *R. microporus*

7. ศึกษาการแสดงออกของยีนในยางพาราสายพันธุ์ต่างๆ

ศึกษาการแสดงออกของยีนในยางพาราสายพันธุ์ดั้งเดิมจากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรครากขาวเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ปลอดเชื้อ) รายละเอียดดังนี้

7.1 ศึกษาการแสดงออกของยีน PRs ในยางพาราสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เทคนิค qRT-PCR

โดยนำ RNA ที่สกัดได้จากหัวข้อ 4.1 มาสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีการในหัวข้อย่อย 2.1.1 และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4* และ *PR5* โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่6 ใช้ Ssoadvanced SYBR Green Universal Supermix ของบริษัท Thermo sciencetific ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้

Ssoadvanced SYBR Green Universal Supermix	5	ไมโครลิตร
Forward primer (500 nM)	1	ไมโครลิตร
Reverse primer (500 nM)	1	ไมโครลิตร
cDNA template (100 ng/µl)	1	ไมโครลิตร
DEPC water	2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมมั้งหมด	10	ไมโครลิตร

และกำหนดโปรแกรม PCR โดยใช้เครื่อง Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System ดังนี้

Initial denaturation	95°C	10 นาที	
Denaturation	95°C	15 วินาที	35 รอบ
Annealing และ Polymerization	60°C	1 นาที	

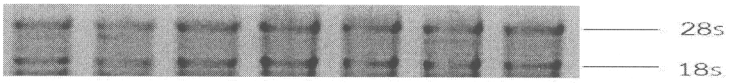
ตารางที่ 8 specific primers ที่ใช้ในการทำ qRT-PCR

Gene	Direction	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)
PR1	Forward	GCCTGCTTAACCCTACCCTT	190
	Reverse	CCGTAAGGACGATTGCTGGA	
PR2	Forward	AGCCCTTAGAGGCTCAAACA	119
	Reverse	ACCAGAAGCCACGAACATTT	
PR3	Forward	TACGGTAGAGGTCCCATCCAA	269
	Reverse	CCACCGTTGATGATGTTCGT	
PR4	Forward	GAGCAACTTACCATTTCTACAA	233
	Reverse	GCATTGATCACCGATTCTCAC	
PR5	Forward	CTTGGCCGAATATGCACTAA	174
	Reverse	TCCAGGGACCTTCAATTCAT	

ผลการทดลอง

ผลการโคลนและศึกษาสมบัติของยีน PRs

เมื่อสกัด RNA จากใบยางพาราด้วย Extraction buffer ผลของ total RNA ที่สกัดได้ พบว่า Total RNA มีความบริสุทธิ์สูง ดังแสดงในรูปที่ 6 จากการสกัดด้วยวิธีดังกล่าวนี้ ได้ปริมาณ Total RNA ที่มีคุณภาพและมีปริมาณเยอะ อีกทั้งวิธีการสกัดก็ไม่ยุ่งยากซับซ้อน



รูปที่ 6 Total RNA ที่สกัดด้วย Extraction buffer

เมื่อนำ RNA ได้สกัดได้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์สาย cDNA เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการโคลนยีน ผลโคลนและศึกษาสมบัติของยีน PRs สามารถโคลนยีนในกลุ่ม Pathogenesis related proteins ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต antifungal protein ได้ทั้ง 5 ยีน ได้แก่ ยีน PR1, PR2, PR3, PR4 และ PR5 โดยมีรายละเอียดต่างๆ ดังนี้

1. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PR1*

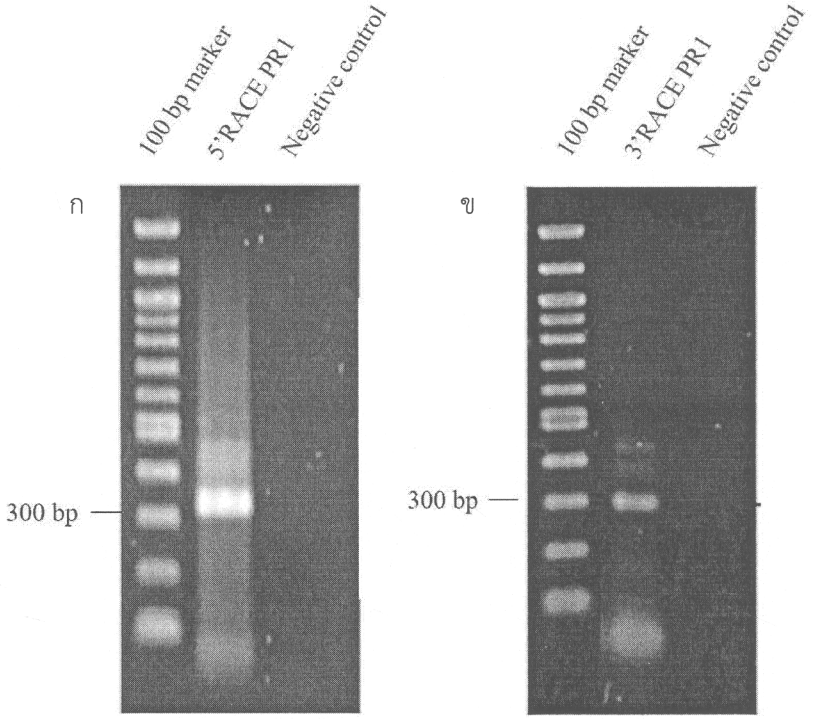
การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *PR-1* โดยใช้ specific forward primer (Hb-PR1F) (5' TCTTGTGCATTCCAGCAATC 3') และ specific reverse primer (Hb-PR1R) (5' CACCTCACCTTAGCACATCCT 3') ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้จากยุรฉัตร (2554) เรื่องการชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน *PR-1* ในยางพาราโดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ สามารถโคลนบางส่วนของยีน *PR1* โดยมีลำดับเบส 205 bp ดังแสดงในรูปที่ 7 จึงทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้กับพืชชนิดอื่นๆ บนฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ผลการ blast พบว่า ยีน *PR1* ในยางพารามีส่วนคล้ายกับพืชอื่นๆ ค่อนข้างสูง ได้แก่ *Populus euphratica* Accession number XM_011004299 86% ,*Populus trichocarpa* Accession number XM_00637909485%, *Citrus sinensis* Accession number XM_006486757 82% และ *Ricinus communis* Accession number XM_002522020 81%

TCTTGTGCATTCCAGCAATCGTCCTTACGGGGAGAACCTTG
CGAAAAGCAGCGGTGACCTTTCAGGCAAAGATGCTGTGAAA
CTGTGGGTTGACGAGAAGGCCTTCTACGATTACAATTCTAA
TTCTTGTGCTGCAGGCAAGCAGTGTGGGCACTATACTCAGG
TGGTTTGGCGCAACTCAGTTCGCCTAGGATGTGCTAAGGTG

รูปที่ 7 แสดงลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR-1* โดยตัวอักษรสีแดงแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ Hb-PR1F และ Hb-PR1R

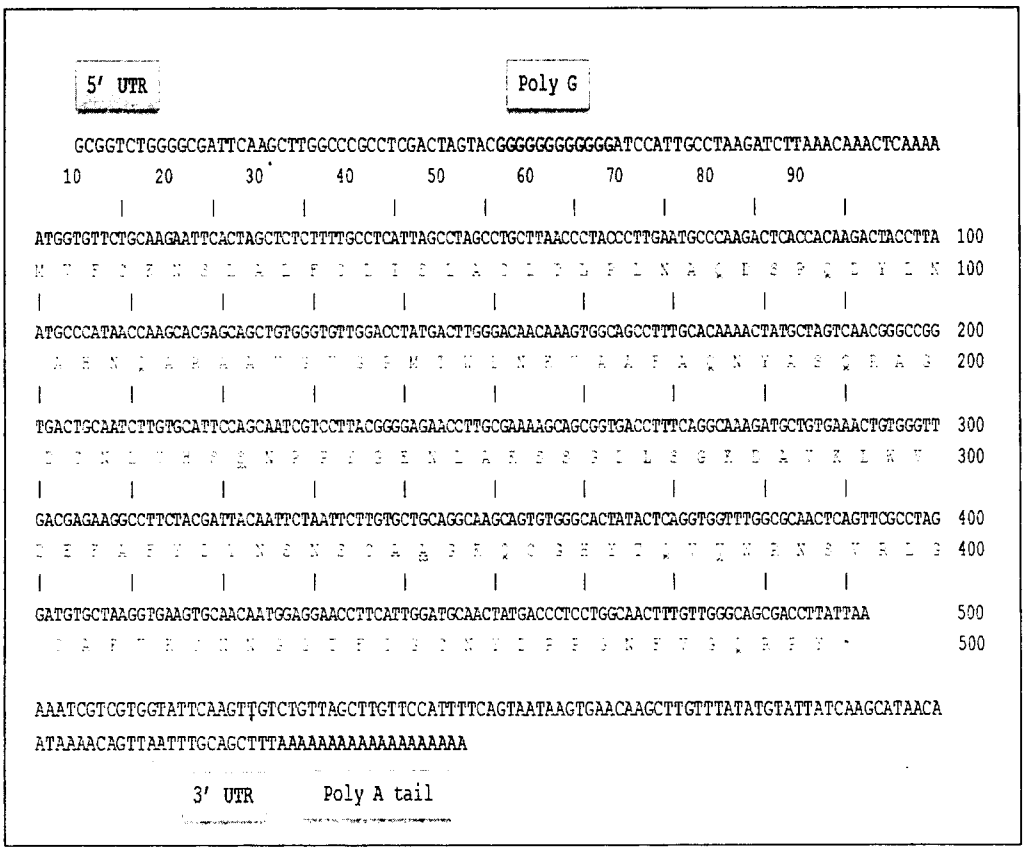
1.1 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน *PR1* ในยางพาราด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *PR1* บางส่วนแล้ว จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อโคลนยีนเส้นสมบูรณ์โดยใช้เทคนิค 5' - 3'RACE โดยใช้ gene specific primer ผลจากการทำ 5' และ 3'RACE ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 350 และ 300 bp ดังรูปที่ 8ก และ 8ข ตามลำดับ จึงทำการโคลนและวิเคราะห์ลำดับเบส



รูปที่ 8 PCR product ที่ได้จากการทำ 5'และ 3'RACE ของยีน *HbPR-1* โดยรูป ก แสดงผลการทำ 5'RACE และรูป ข แสดงผลการทำ 3'RACE โดยใช้ cDNA จากใบยางพาราพันธุ์ RRIM600

หลังจากการทำบริสุทธิ์เจลและโคลนยีนเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสจากการทำ 5'- 3' Rapid Amplification of cDNA Ends พบว่า ได้เส้นสมบูรณ์ของยีน *PR1* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 492 bp สามารถแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 163 amino acid มีน้ำหนักโมเลกุล 17.69 กิโลดาลตัน และ pI 8.57 โดยทางด้านปลาย 5'RACE ค้นพบบริเวณ poly G ก่อนถึงจุด start codon สำหรับด้านปลาย 3'RACE ค้นพบบริเวณ poly A tail และจุด stop codon ดังแสดงในรูปที่ 9

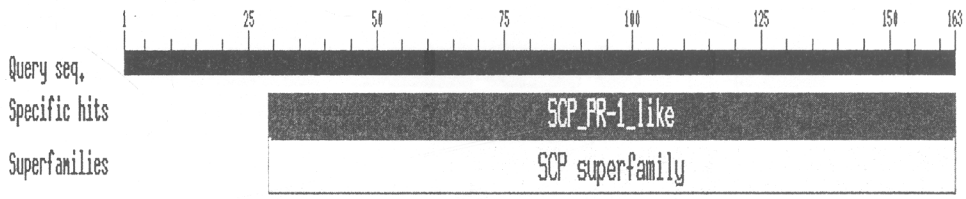


รูปที่ 9 การวิเคราะห์ยีนเส้นสมบูรณ์ของยีน *HbPR-1*

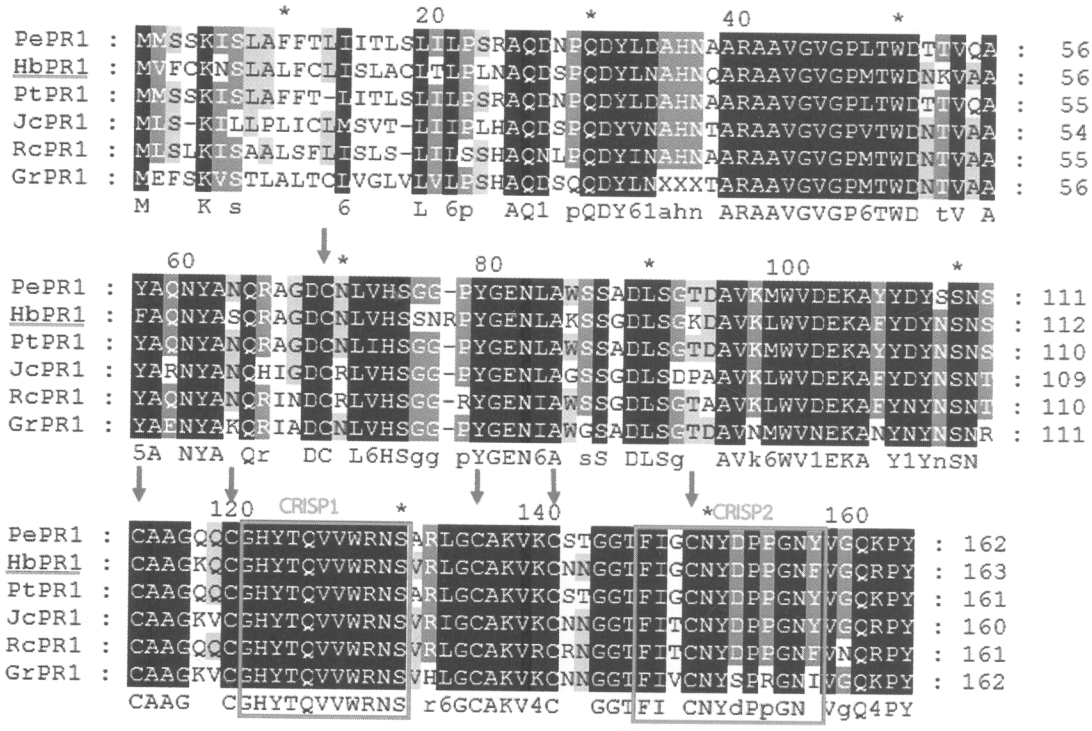
เมื่อนำเส้นสมบูรณ์ของยีน *HbPR-1* ไปบลาส และ alignment โดยใช้ ClustalX (รูปที่ 10) พบว่ามีความคล้ายกันกับพืชต่างๆ ดังนี้ *Populus trichocarpa* (accession number XP_006379156.1) 78%, *Citrus sinensis* (accession number XP_006486820.1) 75% และ *Nicotiana sylvestris* (accession number XP_009787159.1) 74%

รูปที่ 10 การ alignment โดยใช้ ClustalX ของยีน *HbPR-1* ในยางพาราเปรียบเทียบกับพืชอื่นๆ ได้แก่ *Populus trichocarpa* (accession number XP_006379156.1), *Citrus sinensis* (accession number XP_006486820.1) และ *Nicotiana sylvestris* (accession number XP_009787159.1)

หลังจากการ blast กับฐานข้อมูลของ GenBank พบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโนคือ SCP (rodent sperm-coating glycoprotein) _PR-1 like domain (รูปที่ 11) ซึ่งเป็น domain หลักของโปรตีนกลุ่มที่ถูกขนส่งออกนอกเซลล์ (extracellular protein) และจัดอยู่ในกลุ่ม cysteine-rich secretory proteins (CRISP) family ประกอบด้วย cysteine 6 residues โดยลักษณะเหล่านี้จัดเป็นลักษณะเด่นของโปรตีน PR1 สำหรับ domain ที่พบประกอบไปด้วย 2 บริเวณ ได้แก่ CRISP1 บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 120-130 (GHYTQVVWrnS) และยังเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงติดต่อกันถึง 8 residues คือ GHYTQVVW ซึ่งตรงกับ CRISP1 และพบในทุกโปรตีน HbPR-1 ที่นำมาเปรียบเทียบ เนื่องจากเป็น domain ที่สำคัญของโปรตีนชนิดนี้ และ CRISP2 ตำแหน่งที่ 146-157 (FIgCNYdPpGNF) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และโปรตีน HbPR-1 ในพืชอื่นพบตำแหน่ง CRISP1 มีความอนุรักษ์ 100% ระหว่างโปรตีนดังกล่าว ในขณะที่ตำแหน่ง CRISP2 แม้ว่าจะไม่เป็นลำดับอนุรักษ์ 100% แต่จัดว่ามีลำดับอนุรักษ์สูง (รูปที่ 12)



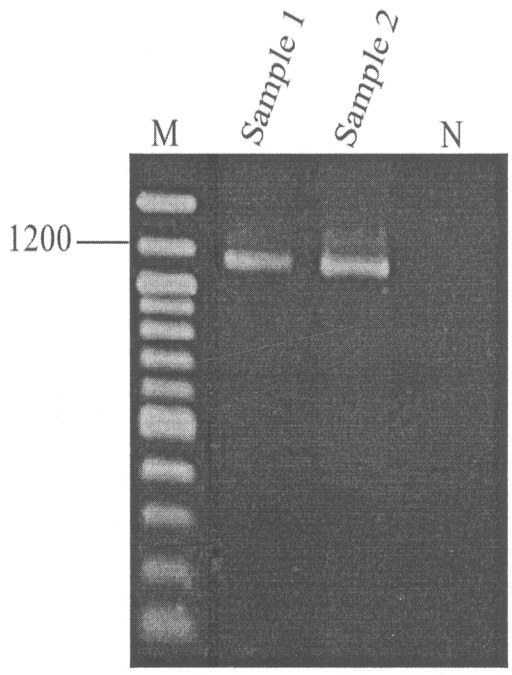
รูปที่ 11 conserved domain ของโปรตีน HbPR-1 ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank พบตำแหน่ง SCP_PR-1 like domain โดยใช้โปรแกรม Blastp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)



รูปที่ 12 การ alignment ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR1 โดยใช้ ClustalX เปรียบเทียบกับโปรตีน HbPR-1 จากพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Populus trichocarpa* (PtPR1) Accession number: XP_006379156, *Populus euphratica* (PePR1) Accession number: XP_011002601, *Jatropha curcas* (JcPR1) Accession number: XP_012072756, *Ricinus communis* (RcPR1) Accession number: XP_002522065 และ *Gossypium raimondii* (GrPR1) Accession number: XP_012436490 บริเวณแถบสีดำแสดงส่วนที่มีความอนุรักษ์ 100% และในกรอบสี่เหลี่ยมเป็น Domain ที่มีความสำคัญของโปรตีน HbPR-1 ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ CRISP1 และ CRISP2 บริเวณที่ลูกศรชี้ลงแสดงให้เห็นบริเวณ cysteine residue ที่เป็นกรดอะมิโนสำคัญของโปรตีน PR-1

2. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *HbPR-2*

การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *HbPR-2* หรือ ยีน *beta-1,3-glucanase* โดยใช้ degenerate primer ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,120 bp ออกแบบจากพืช *Vigna angularis* accession no. EU046566, *Hevea brasiliensis* accession no และ *Arabidopsis thaliana* accession no. NM_115586.2 U22147.1 ผลผลิต PCR (รูปที่ 13) จากตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ โดยใช้ไพรเมอร์ *HbPR-2* พบว่าผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์คู่ดังกล่าว ได้ขนาดชิ้นยีน *HbPR-2* ใกล้เคียงกับขนาดที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นจึงทำการโคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับเบส

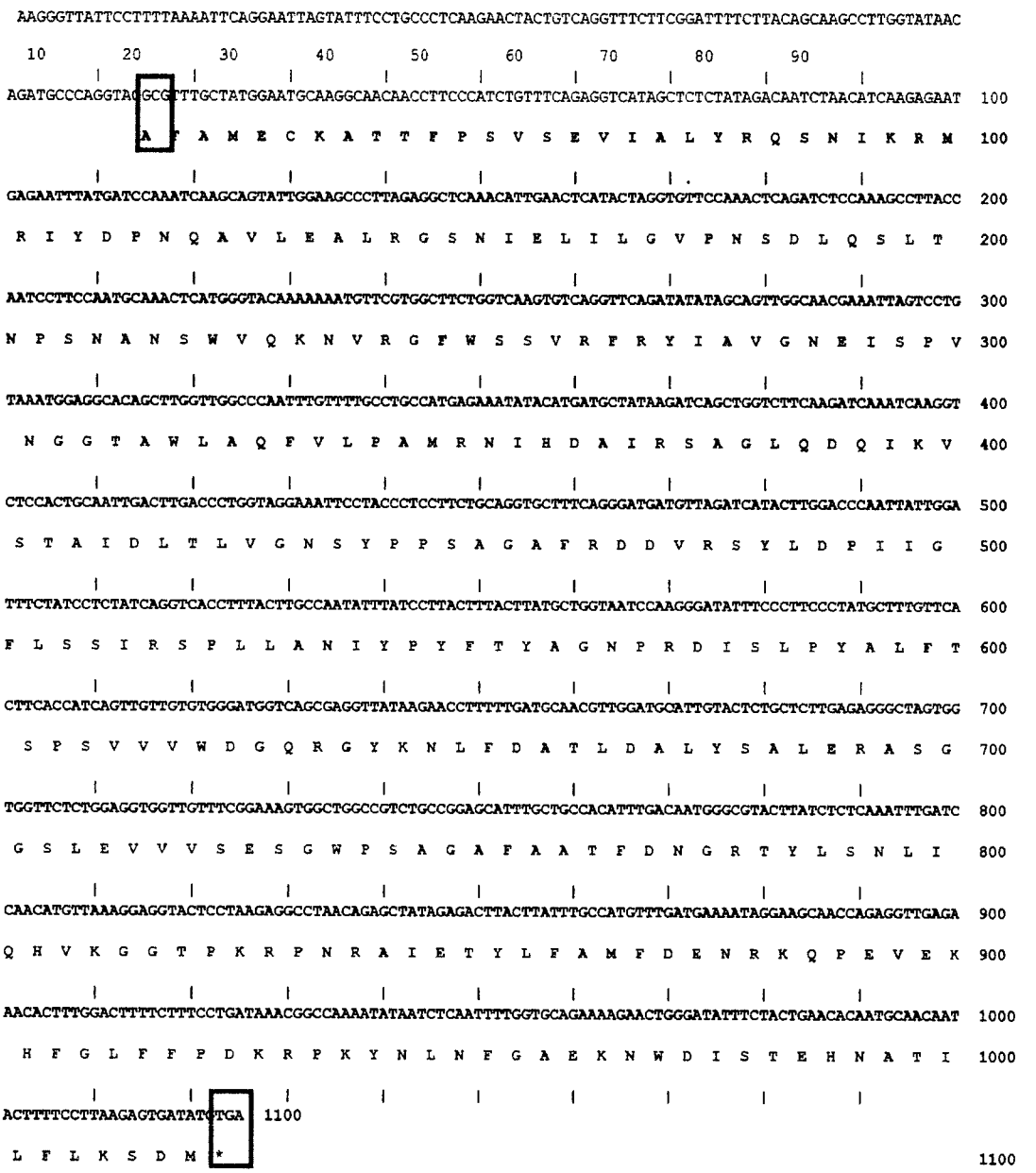


รูปที่ 13 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ denenerate primer PR-2 ขนาด 1200 bp; เลน M: 100 bp plus DNA ladder, เลน 2 และ 3: PCR product จาก cDNA ของใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และเลน 4: Negative control

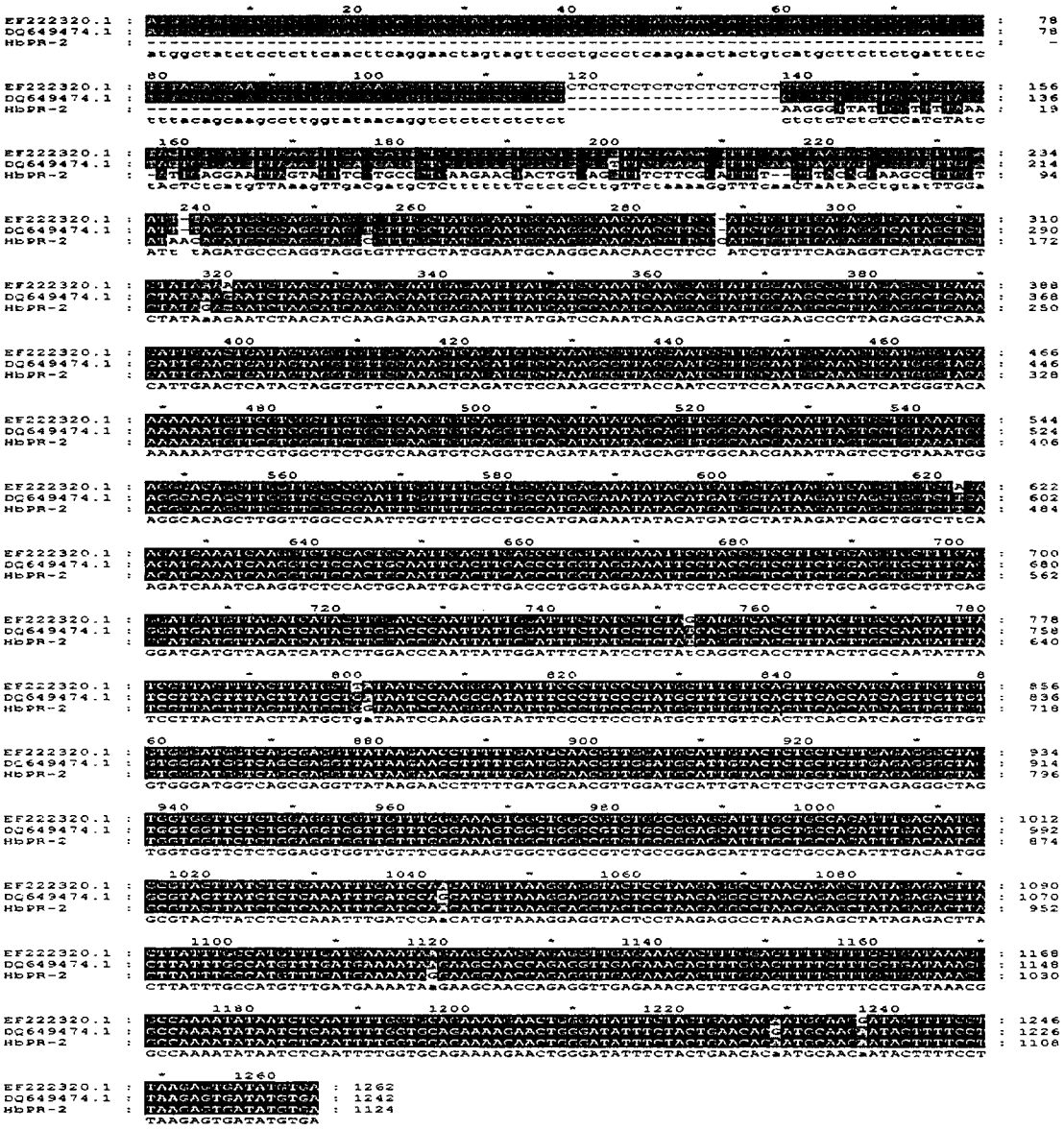
ผลจากการโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าได้ยีน *HbPR-2* มาบางส่วน ดังแสดงในรูปที่ 14 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐาน NCBI พบว่า ยีน *HbPR-2* มีความคล้ายคลึงกันกับยีน *beta-1,3-glucanase* ใน *Hevea brasiliensis* clone GT 1 99% (accession no. EF222320.1) และ *Hevea brasiliensis* clone PB86 (accession no. DQ649474.1) 99% จากนั้นทำการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาบริเวณที่เป็น coding sequences ผ่านทางโปรแกรมในเว็บไซต์http://au.expasy.org/tools/dna.html และโปรแกรม http://reverse-complement.com/translate_protein/ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เริ่มแปลรหัสได้เริ่มจากตำแหน่ง GCG ซึ่งเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนอะลานีน (Alanine; A) ได้ และมีตำแหน่ง stop codon คือ TGA รูปที่ 15 ซึ่งตำแหน่ง stop codon นี้เป็นตำแหน่งเดียวกันกับยีน *PR-2* ในยางพาราพันธุ์ GT 1 และยางพาราพันธุ์ PB86 (รูปที่ 16)

AAGGGTTATTCCTTTTAAAATTCAGGAATTAGTATTTCCTGCCCTCAAGAACTACTG
TCAGGTTTCTTCGGATTTTCTTACAGCAAGCCTTGGTATAACAGATGCCCAGGTAGG
CGTTTGCTATGGAATGCAAGGCAACAACCTTCCCATCTGTTTCAGAGGTCATAGCTC
TCTATAGACAATCTAACATCAAGAGAATGAGAATTTATGATCCAAATCAAGCAGTAT
TGGAAGCCCTTAGAGGCTCAAACATTGAACTCATACTAGGTGTTCCAAACTCAGATC
TCCAAAGCCTTACCAATCCTTCCAATGCAAACTCATGGGTACAAAAAAATGTTCGTG
GCTTCTGGTCAAGTGTCAGGTTCAGATATATAGCAGTTGGCAACGAAATTAGTCCTG
TAAATGGAGGCACAGCTTGGTTGGCCCAATTTGTTTTGCCTGCCATGAGAAATATAC
ATGATGCTATAAGATCAGCTGGTCTTCAAGATCAAATCAAGGTCTCCACTGCAATTG
ACTTGACCCTGGTAGGAAATTCCTACCCTCCTTCTGCAGGTGCTTTCAGGGATGATG
TTAGATCATACTTGGACCCAATTATTGGATTTCTATCCTCTATCAGGTCACCTTTAC
TTGCCAATATTTATCCTTACTTTACTTATGCTGGTAATCCAAGGGATATTTCCCTTC
CCTATGCTTTGTTCACTTCACCATCAGTTGTTGTGTGGGATGGTCAGCGAGGTTATA
AGAACCTTTTTGATGCAACGTTGGATGCATTGTACTCTGCTCTTGAGAGGGCTAGTG
GTGGTTCTCTGGAGGTGGTTGTTTCGGAAAGTGGCTGGCCGTCTGCCGGAGCATTTG
CTGCCACATTTGACAATGGGCGTACTTATCTCTCAAATTTGATCCAACATGTTAAAG
GAGGTACTCCTAAGAGGCCTAACAGAGCTATAGAGACTTACTTATTTGCCATGTTTG
ATGAAAATAGGAAGCAACCAGAGGTTGAGAAACACTTTGGACTTTTCTTTCCTGATA
AACGGCCAAAATATAATCTCAATTTTGGTGCAGAAAAGAACTGGGATATTTCTACTG
AACACAATGCAACAATACTTTTCCTTAAGAGTGATATGTGA

รูปที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *HbPR-2*

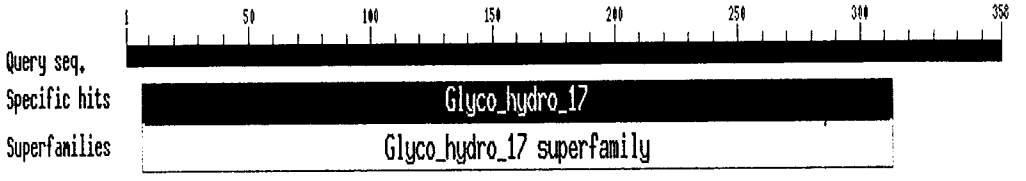


รูปที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *HbPR-2* ที่เริ่มแปลรหัสได้และตำแหน่ง stop codon โดยตำแหน่งแรกที่สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้คือ GCG แปลรหัสเป็น Alanine (A) และตำแหน่ง stop codon คือ TGA

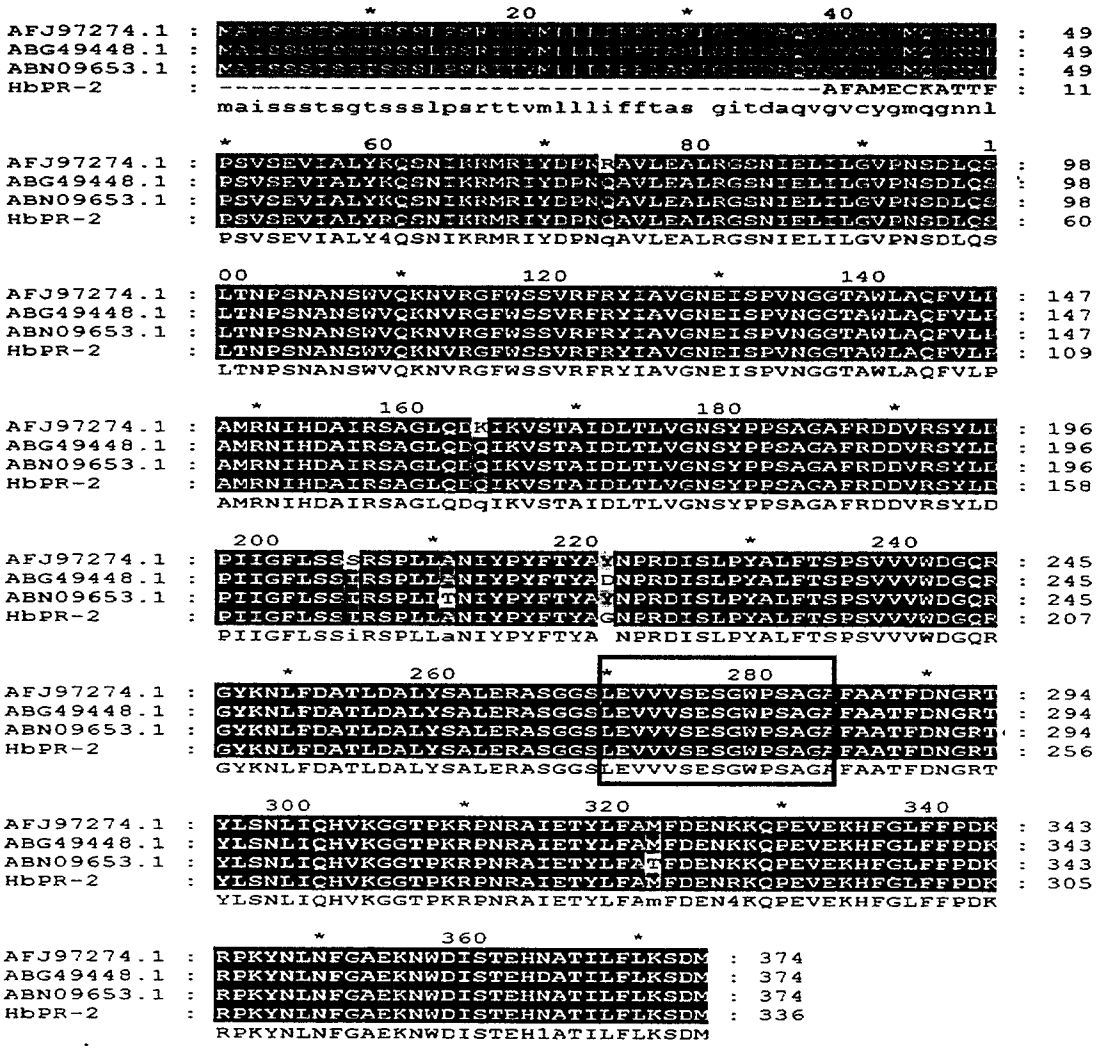


รูปที่ 16 ผลการทำ sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal-X alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-2* เปรียบเทียบกับ *Hevea brasiliensis* clone GT 1 99% (accession no. EF222320.1) และ *Hevea brasiliensis* clone PB86

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-2 โดยใช้โปรแกรม Blastp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) กับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนี้มีความคล้ายคลึงกับยีน *beta-1,3-glucanase* (ABG49448.1, ABN09653.1 และ AFJ97274.1) ของยางพาราซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ในช่วง 96-97% นอกจากนี้ยังพบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโน คือ Glyco_hydro_17 (Glycosyl hydrolases family 17) (รูปที่ 17) ซึ่งเอนไซม์ Glycosyl hydrolases เป็นเอนไซม์สำคัญที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและสลายคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate metabolism) Glyco_hydro_17 เป็นโดเมนหลักที่ใช้ในการจำแนกประเภทของกลุ่มโปรตีน โดยพบว่า Glycosyl hydrolases family 17 signature จัดอยู่ในกลุ่ม basic มีสัญญาณเป็นกรดอะมิโน 14 ตัว คือ LeVVVSESGWPSaG (รูปที่ 18) บริเวณอนุรักษ์ลำดับเบสของโปรตีนชนิดนี้ประกอบไปด้วย tryptophan residue ซ้ำๆ กัน ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากันของ glucan substrates



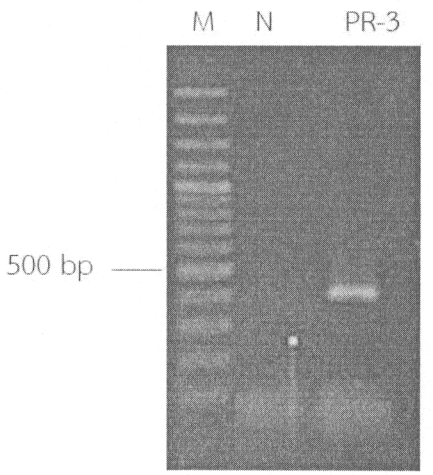
รูปที่ 17 โดเมน Glyco_hydro_17 ของโปรตีน HbPR-2 โดยใช้โปรแกรม Blastp (http://blast.ncbi. nlm.nih.gov/Blast.cgi)



รูปที่ 18 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ กับโปรตีน HbPR-2 จากยางพารา (ABG49448.1, ABN09653.1 และ AFJ97274.1) บนฐานข้อมูล NCBI ใช้โปรแกรม Clustal-X alignment

3. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *HbPR-3*

ผลการทำ PCR (รูปที่ 16) โดยใช้ cDNA เป็นแม่แบบจากใบยางพารา โดยใช้ Degenerate primer ของยีน *HbPR-3* ซึ่งไพรเมอร์ (Forwars: 5' ATGGGCWACWGCACCAGACGG 3', Reverse: 5' CCACCGTTRATGATGTTYGT 3') ซึ่งออกแบบมาจาก *Bupleurum kaoi* (Accession no. FN667836.1), *Vigna unguiculata* (Accession no. AB027154.1), และ *Bupleurum kaoi* (Accession no. FN667836.1) ยีน *PR-3* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและสะสมโปรตีนในพืชที่ถูกรุกรานจากเชื้อโรค โปรตีนดังกล่าวมีบทบาทต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา (antifungal protein) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *HbPR-3* มีขนาดประมาณ 400 bp หลังการเพิ่มปริมาณ PCR พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 400 คู่เบส (รูปที่ 19) ซึ่งใกล้เคียงกันกับขนาดไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ จึงได้ทำการโคลนยีนและส่งตัวอย่างวิเคราะก์ลำดับเบส



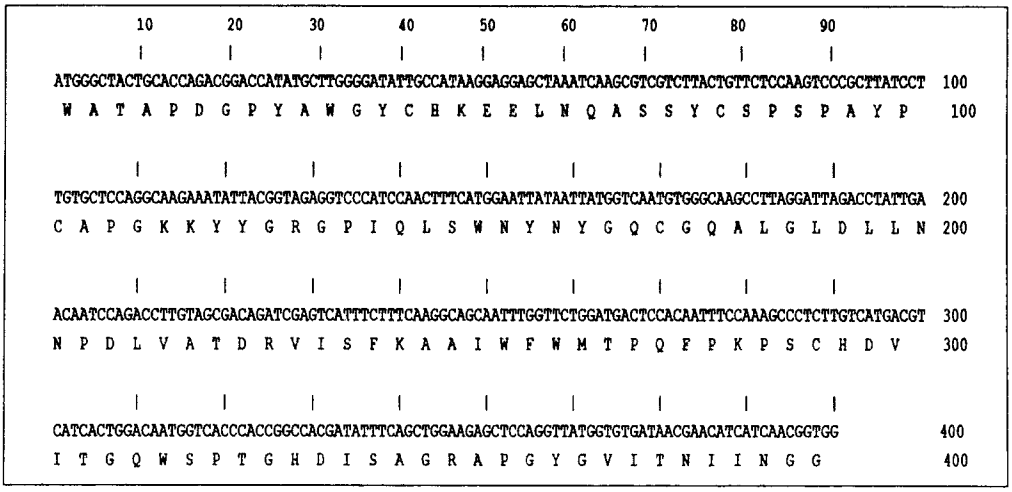
รูปที่ 19 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ denenerate primer ของยีน *HbPR-3* ขนาดประมาณ 400 bp; เลน M: 100 bp plus DNA ladder, เลน 2: Negative control และเลน 3: PCR product ของยีน *HbPR-3* จาก cDNA ของใบยางพาราพันธุ์ RRIM600

หลังจากส่ง PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-3* ดังแสดงในรูปที่ 20 ซึ่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 390 คู่เบส ผลจากการบลาสนิวคลีโอไทด์ (Blastn) ของยีน *HbPR-3* พบว่ายีนดังกล่าวมีส่วนคล้ายกับยีน *class I chitinase* ในยางพารา (Accession no. AJ431363.1, AJ238579.1, KF648872.1, และ KF648873.1) 98-99%

ATGGGCTACTGCACCAGACGGACCATATGCTTGGGGATATTGCCATAAG
GAGGAGCTAAATCAAGCGTCGTCTTACTGTTCTCCAAGTCCCGCTTATCC
TTGTGCTCCAGGCAAGAAATATTACGGTAGAGGTCCCATCCAACTTTCAT
GGAATTATAATTATGGTCAATGTGGGCAAGCCTTAGGATTAGACCTATTG
AACAATCCAGACCTTGTAGCGACAGATCGAGTCATTTCTTTCAAGGCAGC
AATTTGGTTCTGGATGACTCCACAATTTCCAAAGCCCTCTTGTCATGACG
TCATCACTGGACAATGGTCACCCACCGGCCACGATATTTCAGCTGGAAG
AGCTCCAGGTTATGGTGTGATAACGAACATCATCAACGGTGG

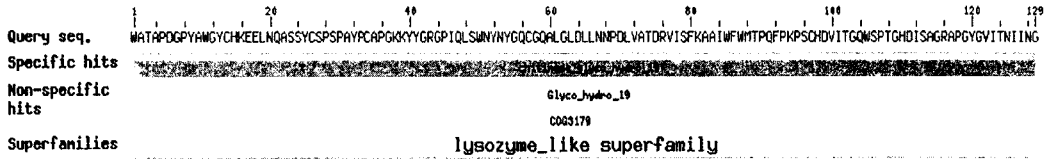
รูปที่ 20 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR-3* ที่ได้จากการออบแบบ Degenerate primer จาก *Bupleurum kaoi* (Accession no. FN667836.1), *Vigna unguiculata* (Accession no. AB027154.1), และ *Bupleurum kaoi* (Accession no. FN667836.1)

จากนั้นทำการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาบริเวณที่เป็น coding sequences ผ่านทางโปรแกรมในเว็บไซต์http://au.expasy.org/tools/dna.html และโปรแกรม http://reverse-complement.com/translate_protein/ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เริ่มแปลรหัสได้มีทั้งหมด 129 กรดอะมิโน เริ่มจากตำแหน่ง TGG ซึ่งเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนทริปโตแฟน (Tryptophan; Trp, W) (รูปที่ 21)

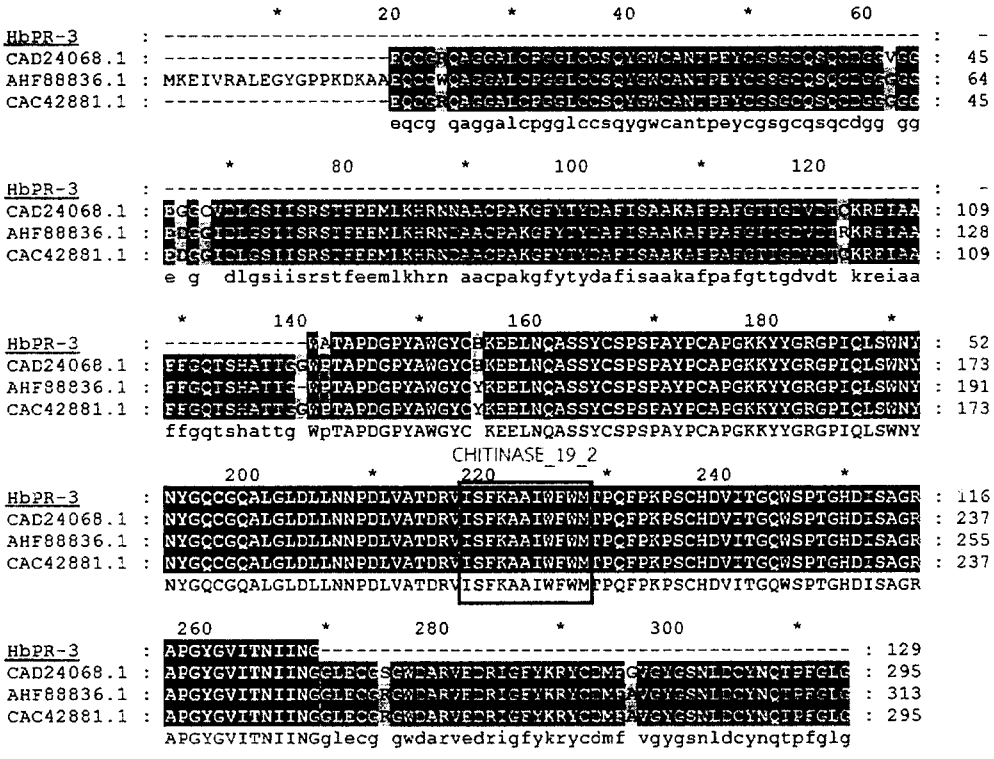


รูปที่ 21 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน HbPR-3 โดยรหัสแรกที่เริ่มต้นแปลรหัสได้คือ TGG (Tryptophan; Trp, W)

Chitinases เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิด hydrolysis ของ β-1,4-N-acetyl-D-glucosamine linkages ในสายพอลิเมอร์ของ chitin และเป็นหนึ่งในสมาชิกของ glycosyl hydrolases หลังจากการ blast ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-3 กับฐานข้อมูล GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) พบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโน คือ chitinase_glyco_hydro_19 หรือ CHITINASE_19_2 ดังแสดงในรูปที่ 22 Chitinases family 19 เป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากพืช ทำหน้าที่ในการป้องกันตัวเองจากเชื้อราและแมลงด้วยการย่อยทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราและแมลงที่มี chitin เป็นองค์ประกอบ Chitinases family 19 มี Domain ที่สำคัญเรียกว่า chitinase_glyco_hydro_19 หรือ CHITINASE_19_2 โดยมีลำดับกรดอะมิโนคือ ISFkAAIWFWM (รูปที่ 23) ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณ



รูปที่ 22 แสดงตำแหน่งของโดเมน chitinase_glyco_hydro_19 ที่ได้จากการ blastp ของโปรตีน HbPR-3

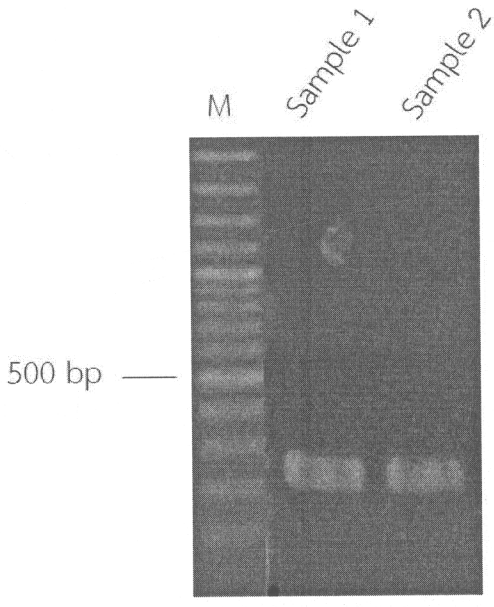


รูปที่ 23 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ กับโปรตีน HbPR-3 จากยางพารา (Accession no. CAD24068.1, CAC42881.1, และ AHF88836.1) บนฐานข้อมูล NCBI ใช้โปรแกรม Clustal-X alignment

4. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *HbPR-4*

HbPR-4 เป็นกลุ่มของยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของพืชเมื่อถูกรุกราน จากเชื้อราเช่นเดียวกับ *HbPR-1*, *HbPR-2* และ *HbPR-3* ทำการออกแบบ Degenerate primer (Forward: 5' GAGCAACWTACMATWWCTACAA 3', Reverse: 5' GCAYTGATCMACKATTCTCAC 3') เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยใช้ cDNA จากใบยางพาราเป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา PCR

ผลการทำ PCR (รูปที่ 24) จากตัวอย่าง cDNA โดยใช้ Degenerate primer *PR-4* (PR4_F1, PR4_R1) และ ซึ่งมีขนาดประมาณ 200 bp ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์คู่ดังกล่าว พบว่าได้ยีนขนาดใกล้เคียงกับที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นจึงทำการโคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับเบส



รูปที่ 24 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ denenerate primer ของยีน *HbPR-4* ขนาดประมาณ 200 bp; เลน M: 100 bp plus DNA ladder, เลน 2 และ เลน 3: PCR product ของยีน *PR-4* จาก cDNA ของใบยางพาราพันธุ์ RRIM600

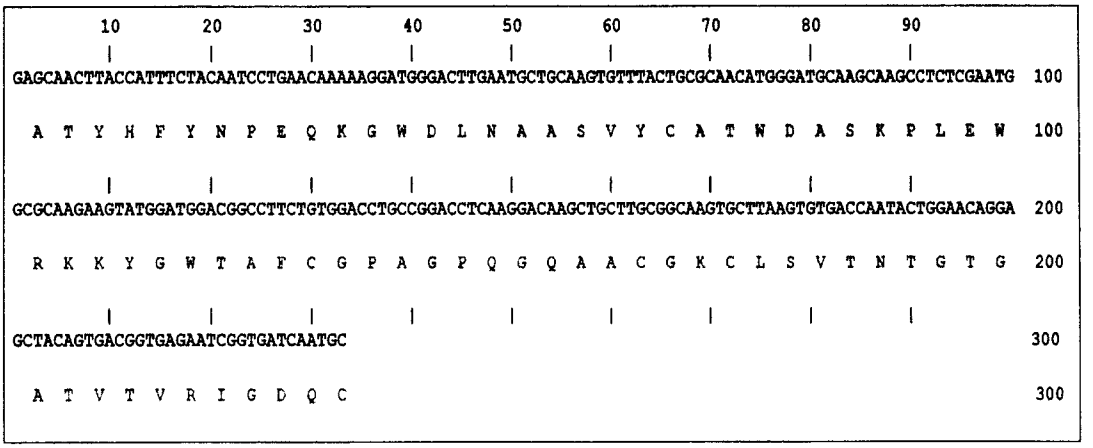
สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *HbPR-4* จากไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบพบว่านิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-4* มีขนาด 233 bp ดังแสดงในรูปที่ 25 ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีน *PR-4* ที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้ และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสยีน *HbPR-4* กับฐานข้อมูล

ใน Genbank พบว่ายีน *HbPR-4* ส่วนคล้ายกับโปรตีน PR4 ในพืชอื่นๆ ได้แก่ *Vitis vinifera* (Accession no. AAC33732.1) 81%, *Vaccinium virgatum* (Accession no. AIE39008.1) 81%, และ *Populus euphratica* (Accession no. XP_011038567.1) 79%

GAGCAACTTACCATTTCTACAATCCTGAACAAAAA
GGATGGGACTTGAATGCTGCAAGTGTTTACTGCGC
AACATGGGATGCAAGCAAGCCTCTCGAATGGCGCA
AGAAGTATGGATGGACGGCCTTCTGTGGACCTGCC
GGACCTCAAGGACAAGCTGCTTGCGGCAAGTGCTT
AAGTGTGACCAATACTGGAACAGGAGCTACAGTGA
CGGTGAGAATCGGTGATCAATGCGATCAATGC

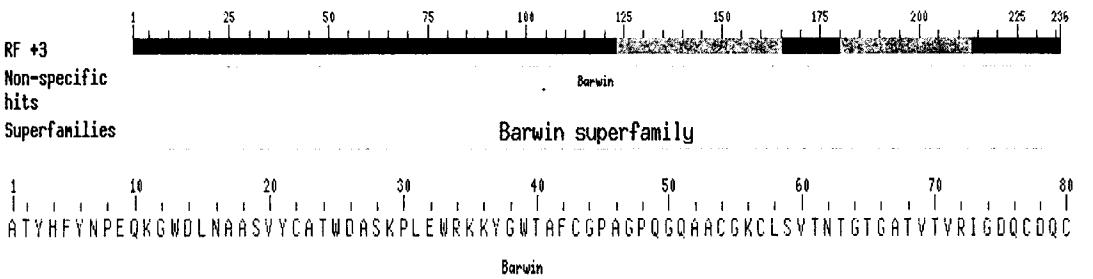
รูปที่ 25 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR-4* ที่ได้จากการออบแบบ Degenerate primer จาก *Vitis vinifera* (Accession no AF061329.1), *Vitis pseudoreticulata* (Accession no. JN977472.1), และ *Vaccinium virgatum* (Accession no. KJ746904.1)

การแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาบริเวณที่เป็น coding sequences ของยีน *HbPR-4* พบว่าสามารถแปลรหัสได้ 80 กรดอะมิโน โดยเริ่มต้นแปลรหัสได้ที่รหัส GCA แปลรหัสได้กรดอะมิโนอะลานีน (Alanine; A) (รูปที่ 26)



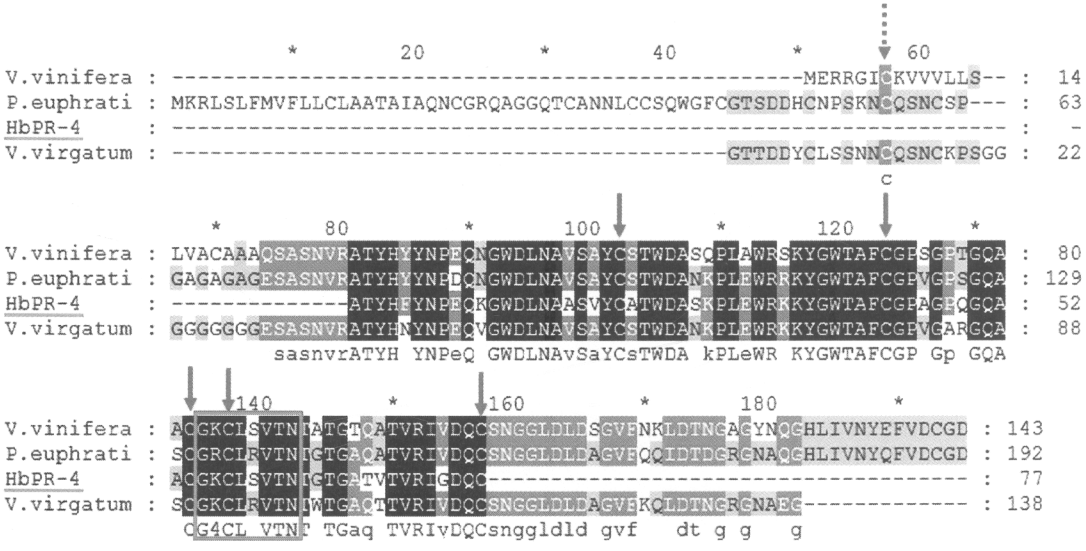
รูปที่ 26 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน HbPR-4 โดยรหัสแรกที่เริ่มต้นแปลรหัสได้คือกรดอะมิโนอะลานีน (Alanine; A (CGA))

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-4 มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blastp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) กับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน HbPR-4 ในพืชอื่นๆ ดังนี้ *Populus trichocarpa* (XP_002319077.1) 81%, *Vitis vinifera* (ABN09653.1) 81% และ *Populus euphratica* (AFJ97274.1) 79%



รูปที่ 27 ตำแหน่งของ Barwin domain ที่ได้จากการ blastp ของโปรตีน HbPR-4 โดยใช้ฐานข้อมูลใน GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

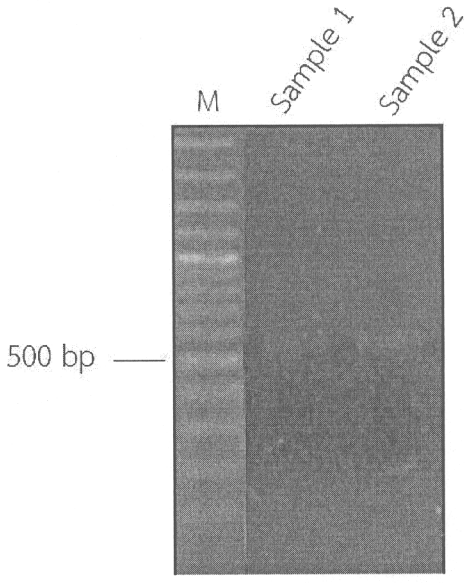
นอกจากนี้ยังพบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโน คือ Barwin ซึ่งเป็นโดเมนที่ใช้ในการจำแนกประเภทของกลุ่มโปรตีนชนิดนี้ จัดอยู่ในกลุ่ม Barwin superfamily (รูปที่ 27) โดเมนดังกล่าวนี้มีบริเวณ Consensus pattern เป็น C-G-[KR]-C-L-x-V-x-N ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-4 พบว่ามีบริเวณ Consensus pattern ในตำแหน่งที่ 54-62 โดยมีลำดับกรดอะมิโนคือ CGKCLsVtN ยิ่งไปกว่านั้น Barwin domain signature ยังเป็นตำแหน่งสำคัญในการจับกับ chitin ซึ่งเป็นผนังเซลล์ของเชื้อรา Barwin superfamily ประกอบด้วย 6 cysteines ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน (รูปที่ 28) จากรูปแสดงตำแหน่งของ cysteine เพียง 5 ตำแหน่งเท่านั้น (ลูกศรเส้นทึบ) ซึ่งยังขาด cysteine อีก 1 ตำแหน่ง (ลูกศรเส้นประ)



รูปที่ 28 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์กับโปรตีน HbPR-4 จากพืชอื่นๆ ได้แก่ *Vitis vinifera* (Accession no. AAC33732.1), *Populus euphratica* (Accession no. XP_011032398.1) และ *Vaccinium virgatum* (Accession no. AIE39008.1) บนฐานข้อมูล NCBI ใช้โปรแกรม Clustal-X alignment โดยกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงตำแหน่ง Consensus pattern ลูกศรเส้นทึบสีเขียวแสดงตำแหน่ง cysteine 5 ตำแหน่ง ที่สามารถแปลรหัสได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์และลูกศรเส้นประสีเขียนแสดงตำแหน่งของ cysteine ที่ขาดหายไป

5. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *HbPR-5*

โปรตีน PR-5 มีความคล้ายกันกับโปรตีน thaumatin จึงถูกเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Thaumatin-like proteins (TL proteins) โปรตีนในกลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องกับระบบ Acquired systemic resistance ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราและการงอกของสปอร์ จากการออกแบบ Degenerate primer (PR5_F1, PR5_R2) สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR5* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นยีนของยีนดังกล่าวได้ประมาณ 500 คู่เบส ดังแดงในรูปที่ 29 ซึ่งขนาดใกล้เคียงกับที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นจึงทำการโคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับเบส



รูปที่ 29 PCR product ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ denenerate primer ของยีน *HbPR5* ขนาดประมาณ 500 bp; เลน M: 100 bp plus DNA ladder, เลน 2 และ เลน 3: PCR product ของยีน *PR-5* จาก cDNA ของใบยางพาราพันธุ์ RRIM600

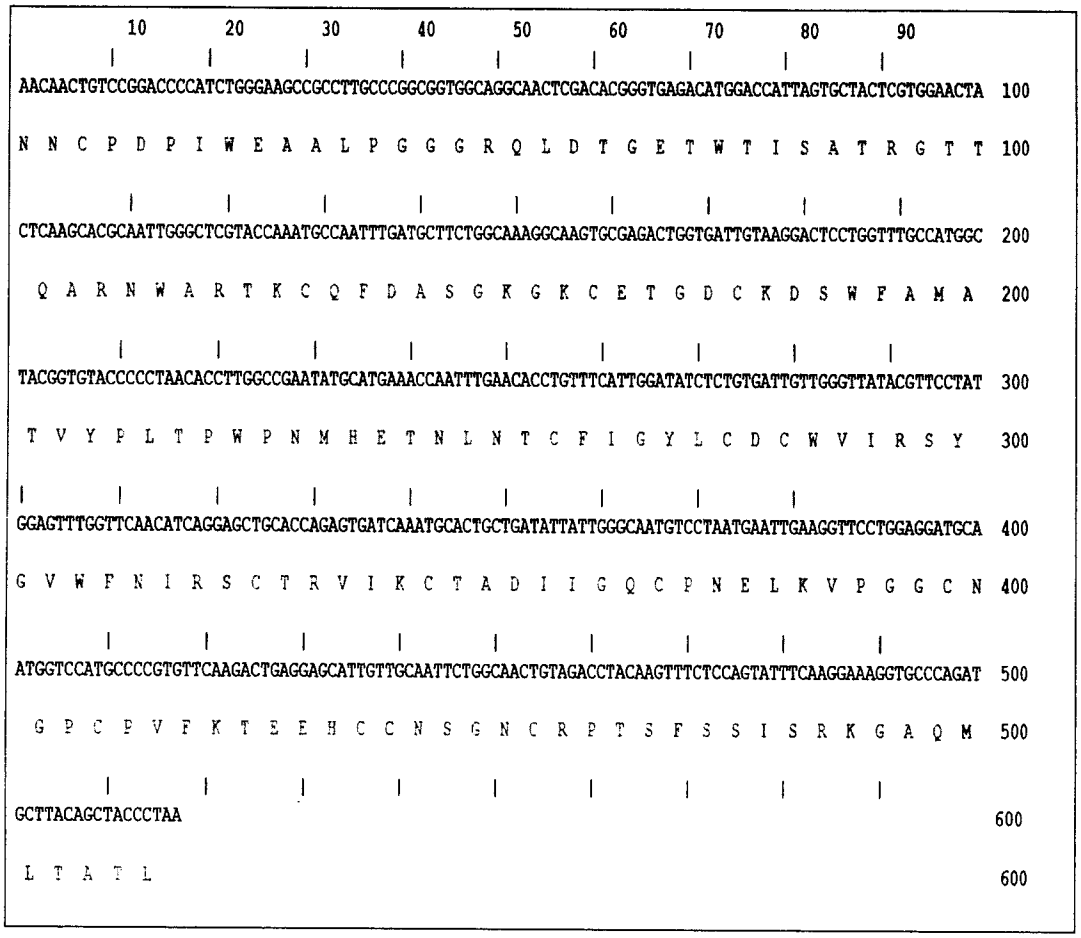
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *HbPR5*พบว่ามีขนาด 517 คู่เบส (รูปที่ 30) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีน *HbPR5*ที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้ และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR5*กับพืชชนิดอื่นๆ โดยใช้ฐานข้อมูลใน Genbank พบว่ายีน *HbPR5*มีส่วนคล้ายเคียงกับพืชอื่นๆ ได้แก่ *Ricinus communis* (Accession no. XM_002509704.2) 60%, *Citrus sinensis* (Accession no. XM_006477370.2) 59% และ *Gossypium raimondii* (Accession no. XM_012616383.1) 58%

AACAACTGTCCGGACCCCATCTGGGAAGCCGCCTTGCCCGGCGG
TGGCAGGCAACTCGACACGGGTGAGACATGGACCATTAGTGCTA
CTCGTGGAACTACTCAAGCACGCAATTGGGCTCGTACCAAATGC
CAATTTGATGCTTCTGGCAAAGGCAAGTGCGAGACTGGTGATTG
TAAGGACTCCTGGTTTGCCAaGTGCACGGTGTACCCCCTAACAC
CTTGGCCGAATATGCATGAAACCAATTTGAACACCTGTTTCATT
GGATATCTCTGTGATTGTTGGGTTATACGTTCCTATGGAGTTTG
GTTCAACATCAGGAGCTGCACCAGAGTGATCAAATGCACTGCTG
ATATTATTGGGCAATGTCCTAATGAATTGAAGGTTCCTGGAGGA
TGCAATGGTCCATGCCCCGTGTTCAAGACTGAGGAGCATTGTTG
CAATTCTGGCAACTGTAGACCTACAAGTTTCTCCAGTATTTCAA
GGAAAGGTGCCCAGATGCTTACAGCTACCCTAA

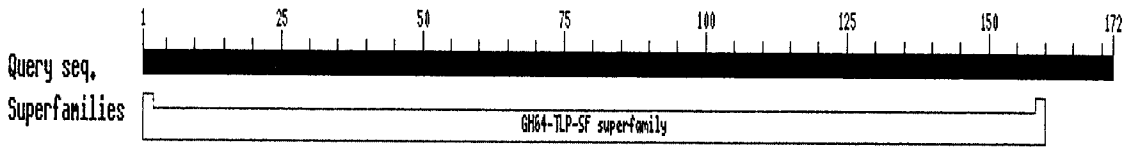
รูปที่ 30 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *HbPR5*ที่ได้จากการออบแบบ Degenerate primer ขนาด 517 คู่เบส

การแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาบริเวณที่เป็น coding sequences ของยีน *PR-5* พบว่าสามารถแปลรหัสได้ 172 กรดอะมิโน โดยเริ่มต้นแปลรหัสได้ที่รหัส AAC แปลรหัสได้กรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asparagine; N) (รูปที่ 31) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PR-5 มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blastp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) กับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวนี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน HbPR-5 ในพืชอื่นๆ ได้แก่ *Ricinus communis* (Accession No. XP_002509750.1), *Citrus sinensis* (Accession No. XP_006477433.1) และ *Theobroma cacao* (Accession No. XP_007040164.1)

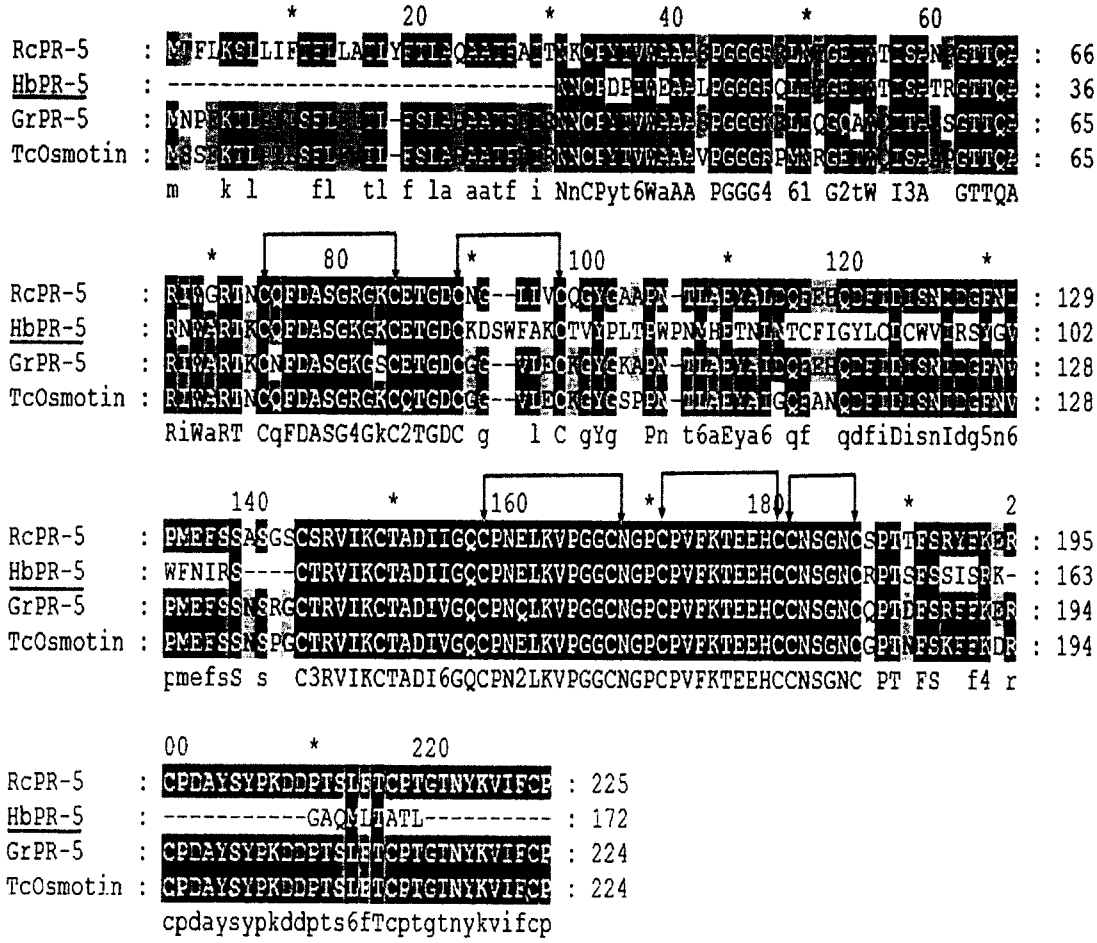
นอกจากนี้ผลจากการบลาสยังพบโดเมน ที่สำคัญ คือ GHG4-TLP-SF domain (รูปที่ 32) ซึ่งเป็นโดเมนที่มีความสำคัญในกลุ่ม Thaumatin family และมีความเกี่ยวข้องกับ pathogenesis-related group 5 (PR-5), เนื่องจาก TL proteins ทีสะสมอยู่ในพืชสามารถตอบสนองต่อการเข้าทำลายจากเชื้อโรคของพืชผ่านกิจกรรม antifungal activity โดเมน GHG4-TLP-SF มีรูปแบบการส่งสัญญาณและบริเวณอนุรักษ์ 16 cysteine residues จากรูปที่ 33 (ลูกศร) สามารถพบเพียง 10 cysteine residues เท่านั้น ซึ่งยังขาดอีก 6 cysteine residues



รูปที่ 31 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน HbPR-5 โดยรหัสแรกที่เริ่มต้นแปลรหัสได้คือกรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asparagine; N (ACC))



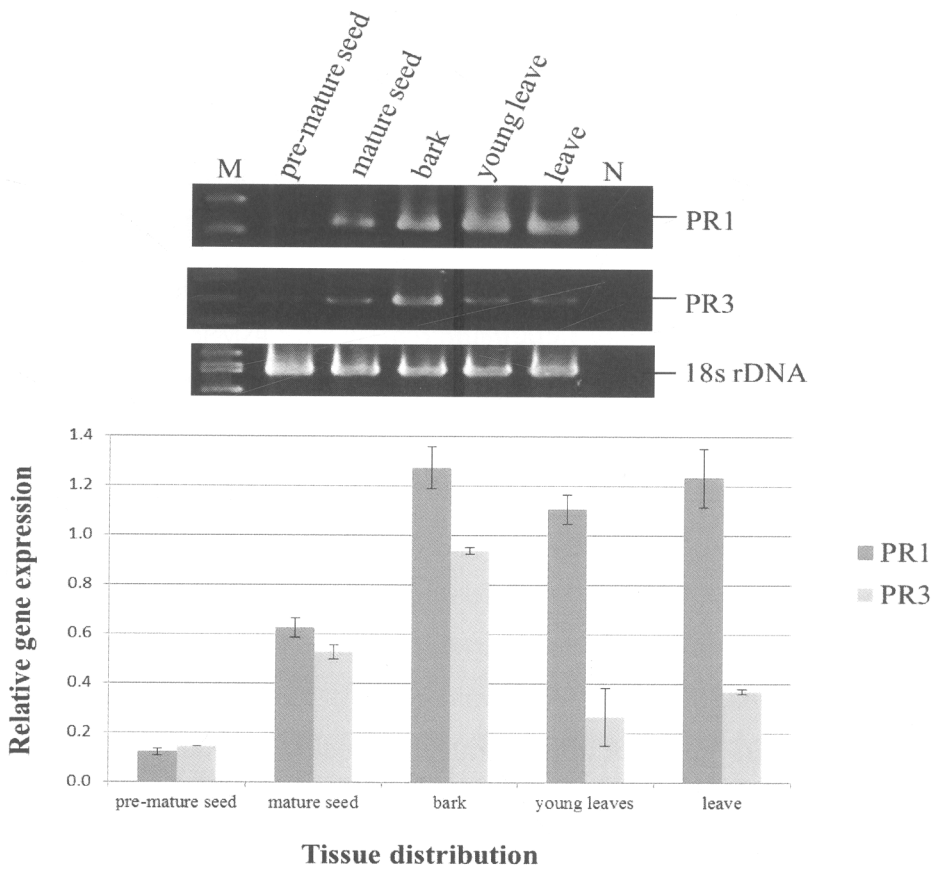
รูปที่ 32 ตำแหน่งของ GHG4-TLP-SF domain ที่ได้จากการ blastp ของโปรตีน HbPR-5 โดยใช้ฐานข้อมูลใน GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)



รูปที่ 33 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์กับโปรตีน HbPR-5 จากพืชอื่นๆ ได้แก่ *Ricinus communis* (RcPR-5; XM_002509704.2), *Gossypium raimondii* (GrPR-5; XP_012471837.1) และ Theobroma cacao (TcOsmotin; XP_007040164.1)

6. ผลการแสดงออกของยีน PRs ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของยางพารา

ศึกษาการแสดงออกของยีน *HbPR-1* และ *HbPR-3* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของยางพาราพันธุ์ RRIM600 ได้แก่ เมล็ดอ่อน เมล็ดแก่ เปลือก ใบอ่อน ใบแก่ โดยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจง (tissue specific gene) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *HbPR-1* และ *HbPR-3* และใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนเปรียบเทียบมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่ายีน *HbPR-1* และ *HbPR-3* มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา โดยมีการแสดงออกสูงสุดในเปลือกยาง เมล็ดแก่สูงกว่าเมล็ดอ่อน และใบแก่สูงกว่าใบอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 34



รูปที่ 34 การแสดงออกของยีน *HbPR-1* และ *HbPR-3* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของยางพารา

7. ผลการแสดงออกของยีนในยางพาราสายพันธุ์ต่างๆ

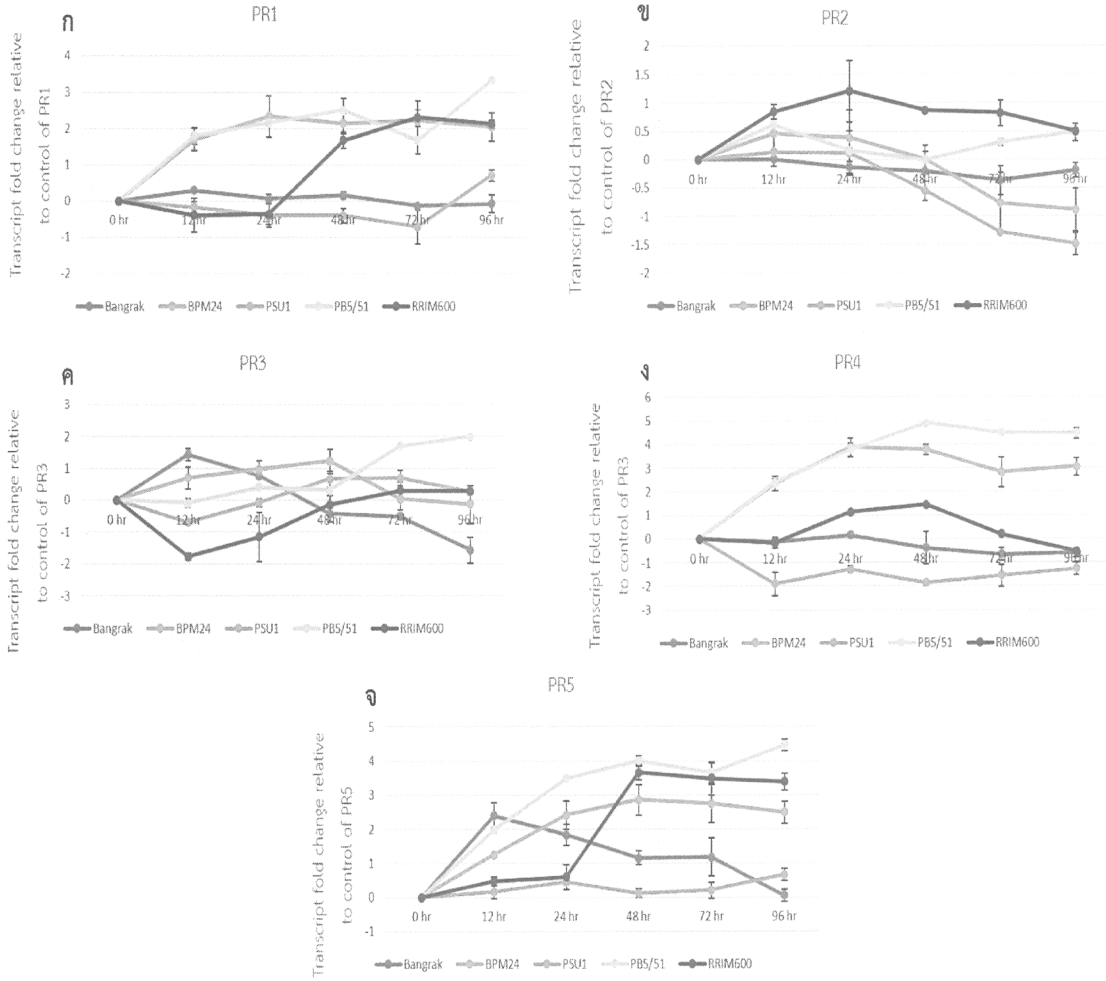
การศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs (*HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5*) โดยเทคนิค Quantitative real time PCR ใช้วิธีการในการปลูกเชื้อต้นกล้ายางพาราในห้องทดลอง โดยใช้ยางพาราพันธุ์ PB5/51, RRIM600 และ BPM24 ซึ่งผ่านการทดสอบความทนทานต่อโรครากขาวแล้วจากการทดลองของ จรัสศรีและคณะ (2558) โดยพบว่า จากการนำเมล็ดยางพาราที่เพาะไว้ในกระบะทราย จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ BPM24, GT1, JVP80, PB235, PB5/51, RRIM600, RRIM623, RRIT251, และสงขลา36 สำหรับใช้เป็นต้นกล้าในการทดสอบโรครากขาว เมื่อต้นกล้ามีอายุ 5 เดือน สามารถตั้งตัวได้ และมีการเจริญเติบโตที่ดี จึงทำการปลูกเชื้อบริเวณรากยาง โดยเตรียม inoculum บนเปลือกหุ้มเมล็ดยางพาราที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 15 วัน และปลูกเชื้อโดยวางเปลือกหุ้มเมล็ดยางพาราที่ติดเชื้อราให้สัมผัสกับราก และคลุมด้วยใบยางพารา จากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคในต้นยางพาราพันธุ์ต่างๆ พบว่า ยางพาราพันธุ์ PB5/51 และ PB235 มีความทนทานต่อโรครากขาวมากที่สุด โดยมีดัชนีการเกิดโรค 44.25 และ 52.75% ตามลำดับ และมีจำนวนต้นที่รอดตายจากการเข้าทำลายของเชื้อรากขาวมากกว่า 80.00% รองลงมาคือ ยางพาราพันธุ์ RRIM600, RRIM623, สงขลา 36 และ RRIT251 ตามลำดับ โดยยางพาราพันธุ์ BPM24 อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคมากที่สุดทั้งระดับการเกิดโรคและจำนวนต้นที่ตาย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือกต้นกล้าของยางพาราพันธุ์ PB5/51, RRIM600 และ BPM24 รวมทั้งยางพาราพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ PSU1 และ Bangruk มาใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ทำการตรวจสอบที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อราโรครากขาว เนื่องจากชั่วโมงที่ 3 และ 6 ที่ทำการตรวจสอบเบื้องต้นโดยเทคนิค RT-PCR ให้ผลการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันมากนัก

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค Quantitative real time PCR ในยางพาราทั้ง 5 พันธุ์ พบว่ายีน *HbPR4* และ *HbPR5* มีการแสดงออกสูงกว่ายีน *PR* อื่นๆ ในยางพาราพันธุ์ BPM24 และ PB5/51 รองลงมาได้แก่ ยีน *HbPR1*, *HbPR3* และ *HbPR2* ตามลำดับ โดยเฉพาะยีน *HbPR2* และ *HbPR3* ที่มีการแสดงออกค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับยีน PR อื่นๆ ซึ่งมีแนวโน้มเหมือนกันในยางพาราทั้ง 3 พันธุ์ที่ทำการศึกษา (รูปที่ 35) เมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีน *HbPR1*, *HbPR4* และ *HbPR5* ในยางพาราพันธุ์ PB5/51 ซึ่งจัดอยู่กลุ่มทนทานต่อโรครากขาว พบว่ายีนทั้ง 3 มีแนวโน้มการแสดงออกที่สูงขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ โดยมีการแสดงออกของยีนสูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยและจะเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 96 หลังการปลูกเชื้อ ส่วนยีน *PR2* และ *PR3* มีการแสดงออกคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-48 หลังการปลูกเชื้อ และมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นตามลำดับจากชั่วโมงที่ 48 จนถึงชั่วโมงที่ 96 หลังการปลูกเชื้อ

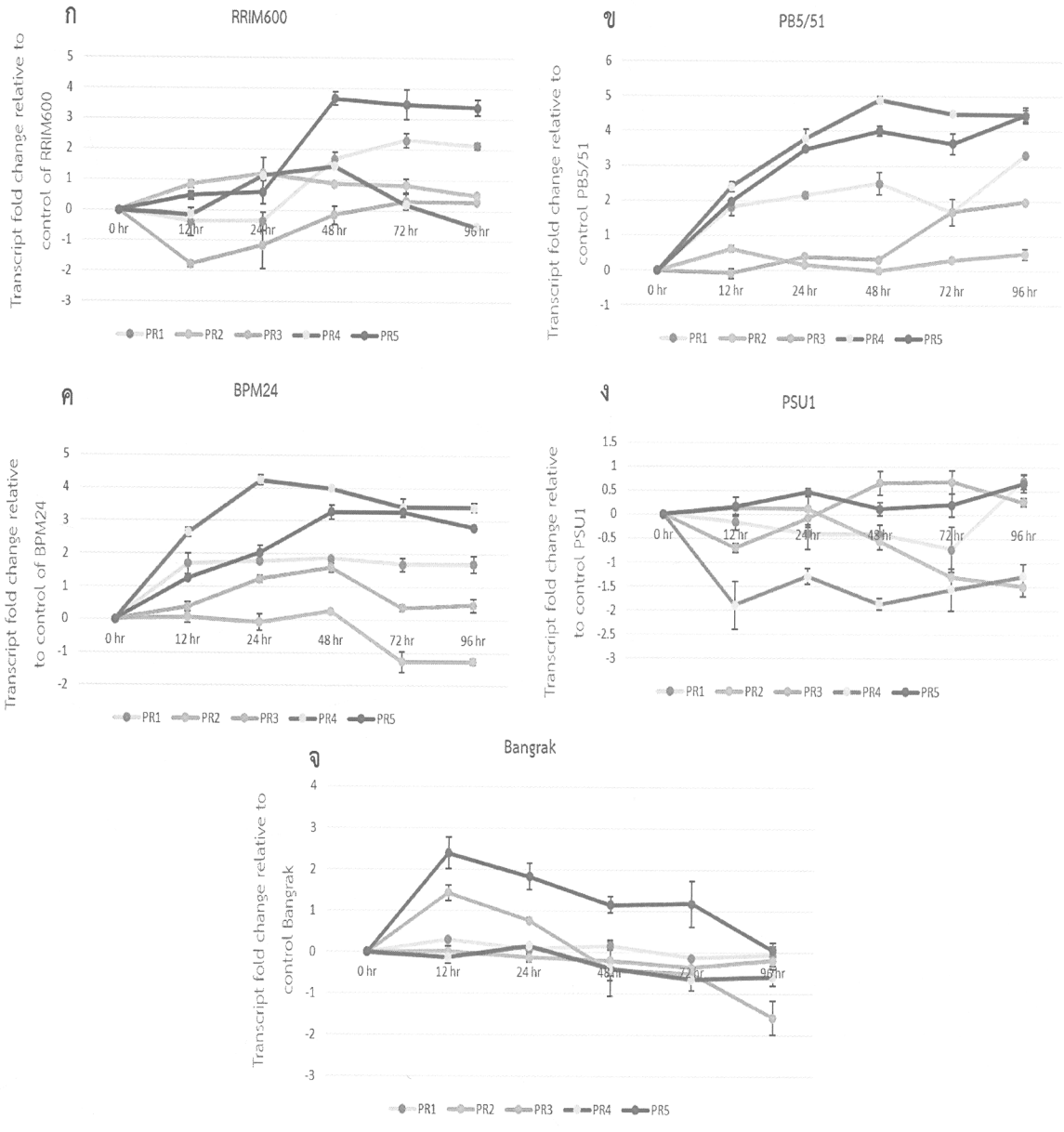
ส่วนยางพาราพันธุ์ RRIM600 ซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่มของยางพาราที่ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรครากขาว มีรูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs ที่แตกต่างจากยางพาราพันธุ์ PB5/51 คือ ในชั่วโมงที่ 0-24 หลังจากการปลูกเชื้อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs มีแนวโน้มคงที่ ยกเว้นยีน *HbPR3* ที่มีการแสดงออกลดลง และยีน *HbPR2* ที่มีการแสดงออกสูงขึ้นมากกว่ายางพาราพันธุ์อื่นๆ หลังจากชั่วโมงที่ 24 ยีนในกลุ่ม PRs มีแนวโน้มของการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะยีน *PR5* และ *PR1* ที่มีการแสดงออกสูงที่ชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นมีแนวโน้มคงที่ ส่วนยีน *PR4* มีการแสดงออกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ยางพาราพันธุ์ BPM24 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากขาว มีรูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs ที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกับยางพาราพันธุ์ PB5/51 แต่มีการแสดงออกของยีนน้อยกว่า โดยพบว่าการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 12-48 หลังการปลูกเชื้อ หลังจากนั้นการแสดงออกยีนจะคงที่ในยีน *HbPR1* และ *HbPR5* และมีการแสดงออกลดลงในยีน *HbPR2*, *HbPR3*, และ *HbPR4* (รูปที่ 36)

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs และความสามารถในการทนทานต่อโรครากขาว พบว่า ยีนที่มีศักยภาพสามารถนำมาใช้เพื่อคัดเลือกยางพาราที่มีความทนทานต่อโรครากขาว น่าจะเป็นยีน *PR4* และ *PR5* โดยยีนดังกล่าวมีการแสดงออกสูงในยางพาราพันธุ์ PB5/51 ซึ่งมีความทนทานต่อโรครากขาว ยางพาราพันธุ์ PB5/51 มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนเป็นไปในทางบวก กล่าวคือ มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นในทุกยีนที่ทำการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญ ตรงข้ามกับกลุ่มยางพาราที่อ่อนแอต่อโรครากขาวที่มีการแสดงออกของยีน *PR4* และ *PR5* น้อยกว่า โดย RRIM600 มีการแสดงออกของยีนลดต่ำลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48-96 ซึ่งแนวโน้มการแสดงออกของยีนในโคลน RRIM600 นี้คล้ายกันกับแนวโน้มการแสดงออกของยีนในยางพาราพันธุ์ BPM24 ในส่วนของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองทั้งสองพันธุ์ คือ PSU1 และ Bangruk มีการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs ค่อนข้างต่ำตลอดระยะของการปลูกเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับยางพาราพันธุ์อื่นๆ จึงคาดว่าน่าจะมีแนวโน้มที่จะไม่ทนทานต่อโรครากขาว อย่างไรก็ตามควรการทดสอบการทนทานต่อโรคในโรงเรือนเพื่อนำข้อมูลมาประกอบการตัดสินใจ



รูปที่ 35 การแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในยางพาราโคลน PSU1, Bangrak, PB5/51, RRIM600 และ BPM24 ด้วยเทคนิค qRT-PCR โดยใช้ specific primer และ *18S rRNA* เป็น internal control หลังจากปลูกถ่ายเชื้อ *R.microporus* ที่เวลา 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดย ก: การแสดงออกของยีน *HbPR-1*, ข: การแสดงออกของยีน *HbPR-2*, ค: การแสดงออกของยีน *HbPR-3*, ง: การแสดงออกของยีน *HbPR-4* และ จ: การแสดงออกของยีน *HbPR-5*



รูปที่ 36 แนวโน้มการแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในต้นกล้ายางพาราอายุ 2 เดือนหลังจากปลูกถ่ายเชื้อราก่อโรครากขาว (*R. microporus*) เป็นเวลา 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

วิจารณ์ผลการทดลอง

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

ระดับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ นับว่าอยู่ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับระดับการแสดงออกของโปรตีน PR-1 ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 10^3 -10^4 เท่าภายหลังจากการกระตุ้นโดย TMV และอาจเพิ่มมากขึ้นถึง 10% ของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในใบยาสูบ (Hooft Van Huijsduijnen et al., 1986) จนอาจกล่าวได้ว่าโปรตีน PR-1 เป็น PRs กลุ่มที่เพิ่มมากที่สุดหลังจากการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถพบโปรตีน PR-1 ได้ทั้งบริเวณที่ติดเชื้อ บริเวณข้างเคียงรวมทั้งบริเวณที่ห่างไกลออกไปด้วยมีงานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน 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* ในถั่วลันเตา 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* แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* ในระดับสูงในขณะที่มีการติดเชื้อดังกล่าวลดลง

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสะสมโปรตีน PR-1 ในปริมาณที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันของพืชด้วย จากการศึกษาของ Kim และ Hwang (2000) ซึ่งศึกษาโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic ในพริกไทย พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน PR-1 กลุ่ม basic มากที่สุดในใบที่ผ่านการทดสอบด้วย SA และ

methyl jasmonate (MeJA) แต่ในเนื้อเยื่อชุดควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบใดๆ กลับพบว่ามีการแสดงออกสูงที่สุดในเนื้อเยื่อรากและดอก โดยไม่พบการแสดงออกเลยในส่วน ใบ ลำต้นและผลสุก ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความต้องการการปกป้องจากเชื้อโรคที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *PRs* นี้ยังเกี่ยวข้องกับระบบการส่งสัญญาณของกลไกการป้องกันตนเองของพืชด้วย โดยพืชสามารถส่งสัญญาณการป้องกันตนเองได้ทั้งจากบริเวณถูกรุกรานจากเชื้อโรคและบริเวณที่ไกลออกไป สำหรับการแสดงออกของยีน *PR-1* และ *PR-3* ในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจง (tissue specific gene) ของยางพาราที่ไม่เป็นโรคโดยใช้ยีน 18S rDNA เป็นยีนเปรียบเทียบมาตรฐาน พบว่ายีน *PR-1* และ *PR-3* มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา โดยมีการแสดงออกสูงสุดในเปลือกยาง เมล็ดแก่สูงกว่าเมล็ดอ่อน และใบแก่สูงกว่าใบอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับ Edreva (2005) ที่ได้กล่าวไว้ว่าในธรรมชาติของพืชนั้นพบว่ามีการแสดงออกของยีน *PRs* แต่การแสดงออกของยีนจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืชต้นนั้นๆ โดยในพืชที่มีความต้านทานสูงอยู่แล้วในธรรมชาติ (พืชพันธุ์ต้านทาน) มักจะมีการแสดงออกของ PRs ในระดับสูง (Edreva, 2005)

การศึกษาการแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในยางพาราพันธุ์ PSU1, Bangrak, PB5/51, RRIM600 และ BPM24 หลังจากปลูกถ่ายเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรครากขาวในต้นกล้ายางพาราอายุ 2 เดือน จากรูปที่ 35 ก เป็นการแสดงออกของยีน *HbPR-1* ในยางพาราพันธุ์ PSU1, Bangrak, PB5/51, RRIM600 และ BPM24 โดยจากรูปพบว่ายางพาราพันธุ์ PB5/51 มีการแสดงออกของยีน *HbPR-1* เพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมง และมีการแสดงออกลดลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 72 แต่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มอีกครั้งในช่วงเวลาที่ 96 ชั่วโมง และที่ช่วงเวลานี้ยังเป็นช่วงเวลาที่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงที่สุดด้วย สำหรับยางพาราพันธุ์ BPM24 มีการแสดงออกของยีน *HbPR-1* เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วง 0-24 ชั่วโมง และที่ชั่วโมงที่ 24 นี้ยีนยังมีการแสดงออกสูงสุดด้วย หลังจากชั่วโมงที่ 24 ยีนมีการแสดงออกลดลงเพียงเล็กน้อยและมีการแสดงออกคงที่ซึ่งคล้ายกันกับการแสดงออกของยีน *HbPR-1* ในโคลน Bangrak ที่มีการแสดงออกของยีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 แต่หลังจากช่วงโมงที่ 12 ยีนมีการแสดงออกลดลงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ สำหรับยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ PSU1 มีการแสดงออกของยีนไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือในช่วงแรกที่มีการปลูกถ่ายเชื้อ (0-24 ชั่วโมง) ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกลดต่ำลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุมแต่กลับมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อผ่านช่วงเวลาดังกล่าวไปแล้ว (ชั่วโมงที่ 96)

การแสดงออกของยีน *HbPR-2* และ *HbPR-3* จากรูปที่ 35 ข และ 35 ค มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 กลุ่มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ จากรูปแสดงให้เห็นว่ายางพาราพันธุ์ PB5/51 มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น แม้ว่าในชั่วโมงที่ 24-48 มีการแสดงออกลดลงแต่หลังจากชั่วโมงที่ 48 ยีน *HbPR-2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่พันธุ์ RRIM600 แม้ว่าในช่วงแรกจะมีการ

แสดงออกเพิ่มขึ้นแต่เมื่อเวลาผ่านไปจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 96 ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกลดลงเรื่อยๆ เช่นเดียวกับโคลน BPM24, Bangrak และ PSU1

สำหรับการแสดงออกของยีน *HbPR-4* พบว่ายางพาราพันธุ์ PB5/51 มีการแสดงออกสูงขึ้นเรื่อยๆ และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 หลังจากชั่วโมงที่ 48 มีการแสดงออกของยีนค่อนข้างคงที่ สำหรับการแสดงออกของยางพาราพันธุ์ BPM24 มีรูปแบบคล้ายกันกับพันธุ์ PB5/51 กล่าวคือมีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นในช่วงแรก และค่อนข้างคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่ยางพาราโคลน Bangrak, PSU1 และ RRIM600 มีการแสดงออกของยีนลดต่ำลงมากอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 (รูปที่ 35 ง)

ผลการทดลองในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Oghenekaro และคณะในปี 2016 ที่ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PRs* (*PR1*, *PR3*, *PR5*, *PR8* และ *PR9*) ในยางพารา (*Hevea brasiliensis*) พันธุ์RRIM612 ซึ่งจัดเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอมาก (highly susceptible) และ PR107 ซึ่งจัดเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอน้อย (least susceptible) ภายหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อ *R. microporus* พบว่าหลังจากปลูกถ่ายเชื้อราดังกล่าวผ่านไป 5 สัปดาห์ ยางพาราพันธุ์ PR107 มีการแสดงออกของยีน *PR1* มากกว่ายางพาราพันธุ์ RRIM612 แต่การแสดงออกลดลง (down regulation) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกถ่ายเชื้อ ส่วนยีน *PR3* class I chitinase มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในพันธุ์ RRIM612 นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *PR 5* ระหว่างยางพาราทั้งสองพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ยีน *PR9* (class IV peroxidase) มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในโคลน PR107 สำหรับ *PR8* ให้ผลเช่นเดียวกับยีน *PR1* คือมีการแสดงออกสูงในชุดควบคุม ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีการปลูกถ่ายเชื้อลงไป จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีน *PRs* มีการแสดงออกในระดับที่หลากหลายในยางพาราทั้ง 2 พันธุ์ที่ทำการศึกษาซึ่งผลการทดลองของเขาชี้ให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยางพาราและพันธุ์ มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (defence gene expression) Oghenekaro *et al.* (2016) ทั้งนี้ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังการปลูกเชื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่สนใจอาจทำให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกันด้วย

นอกจากนี้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs ในพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด และพบว่าให้ผลที่แตกต่างกันออกไป เช่น ในมะเขือเทศที่มีการปลูกถ่ายเชื้อ Verticilium พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PR1*, *PR4* และ *PR5* ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (van Esse et al., 2009) อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PR ได้แก่ *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5* และ *PR8* ใน *Humulus lupulus* (Hop) ใน hop 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ทนทาน (Wye Target) และพันธุ์อ่อนแอ (Celeia) หลังปลูกเชื้อรา *Verticilium albo-atrum* ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน

หลังการปลูกเชื้อ พบว่าในพันธุ์ที่อ่อนแอมีการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs ที่สูงกว่าพันธุ์ต้านทาน (Cregeen *et al.*, 2015)

จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่ายีนที่มีบทบาทมากในการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรครากขาวในยางพารา ได้แก่ *HbPR4* และ *HbPR5* ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับ การทดลองของ Prasath *et al.* (2011) ที่เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PR5* ในพืชตระกูลขิง หลังถูกปลูกเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว พบว่าขิงที่มีความทนทานต่อเชื้อดังกล่าวจะมีการแสดงออกของยีน *PR5* เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และสูงสุดที่ 4 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนจะคงที่ ตรงข้ามกับขิงที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุดังกล่าวที่มีการแสดงออกของยีน *PR5* ต่ำกว่า และคงที่ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา เช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของยีน *PR5* หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *OSM-1g* ที่สามารถผลิตโปรตีน Osmotin มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับ osmo-permeabilization ใน plasma membranes ของเชื้อรา การศึกษาการแสดงออกของยีน *PR5* หลังปลูกถ่ายเชื้อรา *Phytophthora infestans* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคใบไหม้ในมันฝรั่ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Hanna ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานโรค และสายพันธุ์ Lady-Rosetta เป็นสายพันธุ์อ่อนแอ หลังจากการปลูกถ่ายเชื้อเป็นเวลา 6, 9, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ยีน *PR5* มีการแสดงออกแตกต่างกันในมันฝรั่งทั้ง 2 สายพันธุ์หลังจากปลูกถ่ายเชื้อ โดยสายพันธุ์ Hanna มีการแสดงออกที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังปลูกถ่ายเชื้อ และการแสดงออกนี้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 9, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมงหลังปลูกถ่ายเชื้อ ในขณะที่สายพันธุ์ Lady-Rosetta มีการแสดงออกเริ่มต้นที่เวลา 12 hpi และเพิ่มขึ้นต่อเนื่องจนถึง 30 ชั่วโมงหลังปลูกถ่ายเชื้อ การแสดงออกอย่างรวดเร็วและเพิ่มมากขึ้นของยีน *PR5* ในสายพันธุ์ต้านทานโรคของมันฝรั่งนี้ชี้ให้เห็นว่า ยีน *PR5* มีความสัมพันธุ์กับกลไกการป้องกันตนเองของมันฝรั่งต่อเชื้อ *Phytophthora infestans* (*El-Komy et al.*, 2010)

นอกจากนี้การศึกษาการแสดงออกของยีน *LcPR4a* ในถั่วเลนทิล (*Lens culinaris*) สายพันธุ์ที่อ่อนแอและต้านทานต่อเชื้อ *Ascochyta lentis* ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *LcPR4a* มีการแสดงออกแตกต่างกันในถั่วเลนทิลทั้งสองสายพันธุ์ โดยในช่วง 2 ชั่วโมงแรกหลังการปลูกถ่ายเชื้อ *A. lentis* การแสดงออกของยีนทั้งสองสายพันธุ์มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากนั้น 6 ชั่วโมงหลังการปลูกถ่ายเชื้อ ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกลดลงเล็กน้อยซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน จนกระทั่ง 12 ชั่วโมงหลังการปลูกถ่ายเชื้อระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในถั่วเลนทิลทั้งสองสายพันธุ์โดยมีการแสดงออกในสายพันธุ์ที่อ่อนแอสูงกว่าสายพันธุ์ต้านทาน แต่อย่างไรก็ตามหลังจากชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีเพียงสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคเท่านั้นที่มีการแสดงออกของยีน *LcPR4a* เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Vaghefi *et al.*, 2013) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการ

แสดงออกของยีน PRs ในยางพาราโคลน PB5/51 ที่มีการแสดงอย่างต่อเนื่องภายหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อ

ในการทดลองของ ElMorsi *et al.* (2015) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4* และ *PR5* ในหัวหอมที่ปลูกถ่ายเชื้อ Iris yellow spot virus ยีน *PR1* มีการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในกลุ่ม PRs อื่นๆ โดยมีการแสดงออกขึ้นลงตลอดระยะเวลาการศึกษา ตั้งแต่ 1 วันหลังปลูกถ่ายเชื้อ และแสดงออกสูงสุดในวันที่ 8; ยีน *PR2* มีการแสดงออกน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีน PRs อื่นๆ แต่การแสดงออกจะค่อนข้างคงที่ตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา คือ ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง วันที่ 15 ของการปลูกถ่ายเชื้อ; ยีน *PR3* มีการแสดงออกสูงรองลงมาจาก *PR1* โดยมีการแสดงออกสูง 2 ช่วง คือ ช่วงแรกของการปลูกถ่ายเชื้อ (วันที่ 2; 20.19 เท่า) หลังจากนั้นการแสดงออกลดลง และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 7-9 ของการปลูกถ่ายเชื้อ (25.90-46.99 เท่า); ยีน *PR4* มีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 1 ของการปลูกถ่ายเชื้อ (15.46 เท่า) และรองลงมาในวันที่ 2 คือ 12.73 เท่า หลังจากนั้นการแสดงลดลงตลอดช่วงระยะเวลาศึกษา สำหรับการแสดงออกของยีน *PR5* มีการแสดงออกปานกลาง และมีรูปแบบการแสดงออกที่ขึ้นลงตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา โดยมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 1 หลังการปลูกถ่ายเชื้อ (5.38 เท่า) หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนลดลงและเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ในวันที่ 5 ของการปลูกถ่ายเชื้อ (4.72) ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังปลูกถ่ายเชื้อมีผลอย่างมากต่อการศึกษาการแสดงออกของยีน เนื่องจากยีนในกลุ่ม PRs อาจมีการแสดงออกของยีนที่ลดลง หรือเพิ่มขึ้นในบางระยะเวลาที่ทำการศึกษา และมีความแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เช่นเดียวกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ยีนในกลุ่ม PRs มีการแสดงออกขึ้นลงตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ควรเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาการแสดงออกของยีนหลังปลูกถ่ายเชื้อให้นานขึ้น เนื่องจากจะสังเกตเห็นว่า การแสดงออกของยีนในกลุ่ม PRs ยังคงมีการแสดงออกต่อไปมิได้ลดลงดังเช่นในงานทดลองอื่นๆ

สรุปผลการทดลอง

การโคลนและศึกษาสมบัติของยีนที่มีฤทธิ์ต้านทานต่อเชื้อรา (antifungal protein) ในยางพารา

Pathogenesis related genes ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มได้แก่ *PR-1, PR-2, PR-3, PR-4* และ *PR-5* โดยยีนกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันตัวเองของพืชเมื่อถูกรุกรานจากเชื้อรา สำหรับในยางพาราสามารถโคลนยีนทั้ง 5 กลุ่มนี้ได้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ยีน PR-1 มีขนาดเส้นสมบูรณ์ของยีน (coding sequences) 492 คู่เบส โดยผลจากการบลาสพบว่ายีนชนิดนี้มีส่วนคล้ายกันกับพืช Populus trichocarpa (accession number XP_006379156.1) 78%, Citrus sinensis (accession number XP_006486820.1) 75% และ Nicotiana sylvestris (accession number XP_009787159.1) 74% สามารถแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 163 amino acid มีน้ำหนักโมเลกุล 17.69 กิโลดาลตัน และ pI 8.57 โดยทางด้านปลาย 5'RACE ค้นพบบริเวณ poly G ก่อนถึงจุด start codon สำหรับด้านปลาย 3'RACE ค้นพบบริเวณ poly A tail และ stop codon คือ TAA การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบโนเมนที่สำคัญคือ SCP_PR-1 like domain ซึ่งเป็น domain หลักของโปรตีนกลุ่มที่ถูกขนส่งออกนอกเซลล์และจัดอยู่ในกลุ่ม cysteine-rich secretory proteins (CRISP) family ประกอบด้วย cysteine 6 residues โดยลักษณะเหล่านี้จัดเป็นลักษณะเด่นของโปรตีน PR-1 สำหรับ domain ที่พบประกอบไปด้วย 2 บริเวณ ได้แก่ CRISP1 บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 120-130 (GHYTQVVWrnS) และยังเป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงติดต่อกันถึง 8 residues คือ GHYTQVVW และ CRISP2 ตำแหน่งที่ 146-157 (FIgCNYdPpGNF)

ยีน *PR-2 PR-3, PR-4* และ *PR-5* สามารถโคลนยีนเหล่านี้ได้เพียงบางส่วน โดยสามารถโคลนยีน PR-2 ได้เพียง 1120 คู่เบส ยีน *PR-2* มีความคล้ายคลึงกันกับยีน *beta-1,3-glucanase* ใน *Hevea brasiliensis* clone GT 1 99% (accession no. EF222320.1) และ *Hevea brasiliensis* clone PB86 (accession no. DQ649474.1) 99% ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เริ่มแปลรหัสได้เริ่มจากตำแหน่ง GCG ซึ่งเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนอะลานีน (Alanine; A) และมีตำแหน่ง stop codon คือ TGA ซึ่งตำแหน่ง stop codon นี้เป็นตำแหน่งเดียวกันกับยีน *PR-2* ใน *Hevea brasiliensis* clone GT 1 ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโน คือ Glyco_hydro_17 (Glycosyl hydrolases family 17) ซึ่งเป็นโดเมนที่มีความสำคัญของโปรตีนชนิดนี้

สำหรับยีน *PR-3* นิวคลีโอไทด์ที่สามารถโคลนได้มีเพียง 390 คู่เบส ผลจากการบลาสนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-3* พบว่ายีนดังกล่าวมีส่วนคล้ายกับยีน *class I chitinase* ในยางพารา (Accession no. AJ431363.1, AJ238579.1, KF648872.1, และ KF648873.1) 98-99% ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เริ่มแปล

รหัสได้มีทั้งหมด 129 กรดอะมิโน เริ่มจากตำแหน่ง TGG ซึ่งเป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนทริปโตแฟน ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโนคือ chitinase_glyco_hydro_19 ซึ่งเป็นโดเมนสำคัญของเอนไซม์ชนิดนี้ที่มีความอนุรักษ์สูงในพืช

ยีน *PR-4* ที่สามารถโคลนได้มีขนาด 233 คู่เบส ยีน *PR4* ส่วนคล้ายกับพืชอื่นๆ ได้แก่ *Vitis vinifera* (Accession no. AAC33732.1) 81%, *Vaccinium virgatum* (Accession no. AIE39008.1) 81%, *และ Populus euphratica* (Accession no. XP_011038567.1) 79% สามารถแปลรหัสได้ 80 กรดอะมิโน โดยเริ่มต้นแปลรหัสได้ที่รหัส GCA แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนอะลานีน ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบบริเวณสำคัญของลำดับกรดอะมิโน คือ Barwin ซึ่งเป็นโดเมนที่ใช้ในการจำแนกประเภทของกลุ่มโปรตีนชนิดนี้ เป็นตำแหน่งสำคัญในการจับกับ chitin ซึ่งเป็นผนังเซลล์ของเชื้อรา Barwin superfamily ประกอบด้วย 6 cysteines ซึ่งเกียวข้องกับการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PR-5* พบว่ามีขนาด 517 คู่เบส และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-5* กับพืชชนิดอื่นๆ พบว่ายีน *PR-5* มีส่วนคล้ายเคียงกับพืชอื่นๆ ได้แก่ *Ricinus communis* (Accession no. XM_002509704.2) 60%, *Citrus sinensis* (Accession no. XM_006477370.2) 59% และ *Gossypium raimondii* (Accession no. XM_012616383.1) 58% สามารถแปลรหัสได้ 172 กรดอะมิโน โดยเริ่มต้นแปลรหัสได้ที่รหัส AAC แปลรหัสได้กรดอะมิโนแอสพาราจีน ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบโดเมน GHG4-TLP-SF domain ซึ่งเป็นโดเมนที่มีความสำคัญในกลุ่ม Thaumatin family และมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีน PR-5 เนื่องจาก TL proteins ทีสะสมอยู่ในพืชสามารถตอบสนองต่อการเข้าทำลายจากเชื้อโรคของพืชผ่านกิจกรรม antifungal activity โดเมน GHG4-TLP-SF มีรูปแบบการส่งสัญญาณและบริเวณอนุรักษ์ 16 cysteine residues แต่ผลจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ได้จากการโคลนสามารถพบเพียง 10 cysteine residues เท่านั้น ซึ่งยังขาดอีก 6 cysteine residues

การแสดงออกของยีน *PRs* โปรตีนในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา

การแสดงออกของยีน *PR-1* และ *PR-3* ในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจง (tissue specific gene) ของยางพาราโดยใช้ยีน 18S rDNA เป็นยีนเปรียบเทียบมาตรฐาน พบว่ายีน *PR-1* และ *PR-3* มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา โดยมีการแสดงออกสูงสุดในเปลือกยาง เมล็ดแก่สูงกว่าเมล็ดอ่อน และใบแก่สูงกว่าใบอ่อน โดยการแสดงออกของยีน *PRs* นี้ เกี่ยวข้องกับระบบการส่งสัญญาณของกลการการป้องกันตนเองของพืช โดยพืชสามารถส่งสัญญาณการป้องกันตนเองได้ทั้งจากบริเวณถูกรุกรานจากเชื้อโรคและบริเวณที่ไกลออกไป

การศึกษาการแสดงออกของยีน *HbPR-1*, *HbPR-2*, *HbPR-3*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* ในยางพาราโคลน PSU1, Bangrak, PB5/51, RRIM600 และ BPM24 ด้วยเทคนิค qRT-PCR พบว่า

ยางพาราทั้ง 5 โคลนที่ทำการศึกษามีการแสดงออกของยีนแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน โดยยางพาราโคลน PB5/51 มีแนวโน้มในการแสดงออกของยีนทั้ง 5 กลุ่มเพิ่มมากขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อและยังสูงกว่ายางพาราโคลนอื่นๆ สำหรับยางพาราโคลน RRIM600 พบว่ามีการแสดงออกของยีน *HBPR-1*, *HbPR-3* และ *HbPR-5* เพิ่มมากขึ้นแม้ภายหลังการแสดงออกของยีนในกลุ่มดังกล่าวจะลดลงแต่ก็ยังมีการแสดงออกมากกว่าที่เวลาเริ่มต้น ซึ่งตรงกันข้ามกับการแสดงออกของยีน *HbPR-2* และ *HbPR-4* ที่มีการแสดงออกของยีนลดลงแม้ว่าในภายหลัง *HbPR-3* เริ่มมีการแสดงออกที่สูงขึ้นอีกครั้งแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง สำหรับในโคลน BPM 24 พบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม *HbPR-1*, *HbPR-4* และ *HbPR-5* เพิ่มมากขึ้นในขณะที่ยีน *HbPR-2* และ *HbPR-3* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 การแสดงออกของยีนทั้ง 5 กลุ่มในยางพาราพันธุ์ Bangrak พบว่ายีนทั้ง 5 มีการแสดงออกต่ำอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับยางพาราโคลนอื่นๆ คล้ายกันกับ PSU1 ที่มีการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่ลดต่ำลงภายหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อรากขาวแม้ว่าจะมีกลุ่มของยีน *HbPR-1* แสดงออกมากขึ้นในภายหลัง จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่ากลไกการป้องกันตนเองของยางพาราเกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนในกลุ่มที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราซึ่งภายหลังที่มีการติดเชื้อก่อโรคจะมีการส่งสัญญาณให้มีการผลิตโปรตีนในกลุ่มเหล่านี้ โดยยีนในกลุ่มนี้มีการแสดงออกร่วมกันมากกว่า 1 กลุ่ม ทั้งนี้การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ของต้นกล้ายางพาราอาจขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของต้นกล้ายางพาราแต่ละต้นด้วยเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

จรัสศรี นวลศรี, กรกช นาคคนอง และปฏิมาพร ปลอดภัย. 2558. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: การคัดเลือกต้นตอยางพาราที่มีความทนทานต่อโรครากขาว. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พันธุ์วศรี แสงสุวรรณ. 2547. ปฏิกิริยาตอบสนองของแคลลัสยางพาราต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพโรจน์ จ่วงพานิช. 2525. หลักวิชาโรคพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 386 หน้า.

ยุรฉัตร ยอดโยธี. 2554. การชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน *PR-1* ในยางพาราโดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา. กรมวิชาการเกษตร. [Online] Available: http://www.rubber thai.com. [เข้าถึงเมื่อ 29 เมษายน 2555].

สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2553. ข้อมูลวิชาการยางพารา. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สถาบันวิจัยยาง. 2553. โรคและศัตรูยางพารา. กรมวิชาการเกษตร. [Online] Available: http://124.109.2.78/about/pdf/all.pdf. [เข้าถึงเมื่อ 13 กรกฎาคม 2555].

เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2552. โรครากขาวในยางพารา. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. [Online] Available: http://share.psu.ac.th/blog/fnr-service/14126. [เข้าถึงเมื่อ 9 สิงหาคม 2555].

อารมณ์ โรจน์สุจิตร. 2541. โรครากขาว [*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.] ของยางพาราและแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร. 2553. ประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพาราสาเหตุจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางของประเทศไทย. [Online] Available: http:// www. it.doa.go.th/refs/show.php?record=1527 [เข้าถึงเมื่อ 29 มิถุนายน 2555]

Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. New york : San Diego Academic Press. pp. 93-115.

Alexander, D.; Stinson, J.; Pear, J.; Glascock, C.; Ward, E.; Goodman, R.M.; Ryals, J. 1992. A new multigene family inducible by tobacco mosaic virus or salicylic acid in tobacco. Molecular plant-microbe interactions: MPMI. 5(6): 513-515.

Alonso, E.; De Carvalho Niebel, F.; Obregón, P.; Gheysen, G.; Inzé, D.; Van Montagu, M.; Castresana, C. 1995. Differential in vitro DNA binding activity to a promoter element of the gn1β-1,3-glucanase gene in hypersensitively reacting tobacco plants. The Plant Journal. 7(2): 309-320.

Antoniw, J.F.; Ritter, C.E.; Pierpoint, W.S.; 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(1): 79-87.

Anzlovar, S.; Serra, M.D.; Dermastia, M.; Menestrina, G. 1998. Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. Molecular plant-microbe interactions. 11(7): 610-617.

Beerhues, L.; Kombrink, E. 1994. Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3-β-glucanase in potato. Plant Molecular Biology. 24(2): 353-367.

Bloch, C.; Patel, S.U.; Baud, F.; Zvelebil, M.J.J.M.; Carr, M.D.; Sadler, P.J.; Thornton, J.M. 1998. 1H NMR structure of an antifungal γ-thionin protein SIα1: Similarity to scorpion toxins. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 32(3):334-349.

Borad, V.; Sriram, S. 2008. Pathogenesis-related proteins for the plant protection. Asian J Exp Sci. 22: 189-196.

Broekaert, W.F.; Terras, F.R.; Cammue, B.P.; Osborn, R.W. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiology. 108(4): 1353-1358.

Cameron, R.K.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J. 1994. Biologically induced systemic acquired resistance in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal. 5(5): 715-725.

Capelli, N.; Diogon, T.; Greppin, H.; Simon, P. 1997. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. Gene. 191(1): 51-56.

Castresana, C.; de Carvalho, F.; Gheysen, G.; Habets, M.; Inzé, D.; Van Montagu, M. 1990. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a Nicotiana plumbaginifolia beta-1,3-glucanase gene. The Plant Cell. 2(12): 1131-1143.

Conrath, U. 2006. Systemic Acquired Resistance. Plant Signaling & Behavior. 1(4):179-184.

Cornelissen, B.J.C.; Hooft van Huijsduijnen, R.A.M.; Bol, J.F. 1986. A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. Nature. 321(6069): 531-532.

Cornelissen, B.J.C.; van Huijsduijnen, R.A.M.H.; Van Loon, L.C.; Bol, J.F. 1986. Molecular characterization of messenger RNAs for 'pathogenesis-related' proteins 1a, 1b and 1c, induced by TMV infection of tobacco. The EMBO Journal. 5(1): 37-40.

Cregeen, S.; Radisek, S.; Mandelc, S.; Turk, B.; Stajner, N.; Jakse, J.; Javornik, B. 2015. Different Gene Expressions of Resistant and Susceptible Hop Cultivars in Response to Infection with a Highly Aggressive Strain of *Verticillium albo-atrum*. Plant Molecular Biology Reporter / Ispmb. 33(3): 689-704.

Dempsey, D.M.A. 1993. Resistance and Susceptible Responses of *Arabidopsis thaliana* to Turnip Crinkle Virus. Phytopathology. 83(10): 1021-1021.

Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. General and Applied Plant Physiology. 31(2): 105-124.

El-Komy, M.H.; Abou-Taleb, E.M.; Aboshosha, S.M.; El-Sherif, E.M. 2010. Differential expression of potato pathogenesis-related proteins upon infection with late blight pathogen: a case study expression of potato osmotin-like protein. Int J Agric Biol. 12(2): 179-186.

ElMorsi, A.; Abdelkhalek, A.; AlShehaby, O.; Hafez, E.E. 2015. Pathogenesis-related genes as tools for discovering the response of onion defence system against Iris yellow spot virus infection. Botany. 93(11): 735-744.

Eyal, Y.; Sagee, O.; Fluhr, R. 1992. Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene. Plant Molecular Biology. 19(4): 589-599.

Fernández, C.; Szyperski, T.; Bruyère, T.; Ramage, P.; Mösinger, E.; Wüthrich, K. 1997. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a1. Journal of Molecular Biology. 266(3): 576-593.

Florack, D.E.A.; Stiekema, W.J. 1994. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. Plant Molecular Biology. 26(1): 25-37.

Friedrich, L.; Moyer, M.; Ward, E.; Ryals, J. 1991. Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxy-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2. Molecular and General Genetics MGG. 230(1): 113-119.

Fu, Z.Q.; Dong, X. 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. Annual Review of Plant Biology. 64(1): 839-863.

Gao, Q.-M.; Zhu, S.; Kachroo, P.; Kachroo, A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. Frontiers in Plant Science. 6:228.

Gerhard, L.-M.; Frederick, M. 1999. Functions and Regulation of Plant Beta-1,3-Glucanases (PR-2). In: Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC Press. doi:10.1201/9781420049299.ch3.

Giesemann, A.; Biehl, B.; Lieberei, R. 1986. Identification of Scopoletin as a Phytoalexin of the Rubber Tree Hevea brasiliensis1. Journal of Phytopathology. 117(4): 373-376.

Gordon-Weeks, R.; Sugars, J.; Antoniw, J.; White, R. 1997. Accumulation of a novel PR1 protein in *Nicotiana langsdorfii* leaves in response to virus infection or treatment with salicylic acid. Physiological and molecular plant pathology. 50(4): 263-273.

Gun Lee, D.; Yub Shin, S.; Maeng, C.-Y.; Zhu Jin, Z.; Lyong Kim, K.; Hahm, K.-S. 1999. Isolation and Characterization of a Novel Antifungal Peptide from *Aspergillus niger*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 263(3): 646-651.

Guo, B.; Cleveland, T.; Brown, R.; Widstrom, N.; Lynch, R.; Russin, J. 1999. Distribution of antifungal proteins in maize kernel tissues using immunochemistry. Journal of Food Protection®. 62(3): 295-301.

Guyot, J.; Flori, A. 2002. Comparative study for detecting Rigidoporus lignosus on rubber trees. Crop Protection. 21(6): 461-466.

Hejgaard, J.; Jacobsen, S.; Bjørn, S.E.; Kragh, K.M. 1992. Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf. FEBS Letters. 307(3): 389-392.

Hwang, I.S.; Choi, D.S.; Kim, N.H.; Kim, D.S.; Hwang, B.K. 2014. Pathogenesis-related protein 4b interacts with leucine-rich repeat protein 1 to suppress PR4b-triggered cell death and defense response in pepper. The Plant Journal. 77(4): 521-533.

Jach, G.; Görnhardt, B.; Mundy, J.; Logemann, J.; Pinsdorf, E.; Leah, R.; Schell, J.; Maas, C. 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. The Plant Journal. 8(1): 97-109.

Kim, J. Y.; Hwang, K. B. 1994. Differential accumulation of β-1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 45(3): 195-209.

Kim, J. Y.; Hwang, K. B. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. Physiologia Plantarum. 108(1):51-60.

Kaewchai, S.; Lin, F.C.; Wang, H.K.; Soytong, K. 2010. Characterization of *Rigidoporus microporus* isolated from rubber trees based on morphology and ITS sequencing. Journal of Agricultural Technology 6(2): 10.

Koo, J.C., et al.,. 1998. Two hevein homologs isolated from the seed of Pharbitis nil L. exhibit potent antifungal activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 1382(1): 80-90.

Lee, S.C.; Kim, Y.J.; Hwang, B.K. 2001. A Pathogen-Induced Chitin-Binding Protein Gene from Pepper: Its Isolation and Differential Expression in Pepper Tissues Treated with Pathogens, Ethephon, Methyl Jasmonate or Wounding. Plant and Cell Physiology. 42(12): 1321-1330.

Louanchi, M.; Robin, P.; Michels, T.; Balesdent, M.H.; Despréaux, D. 1996. In vitro characterization and in vivo detection of *Rigidoporus lignosus*, the causal agent of white root disease in *Hevea brasiliensis*, by ELISA techniques. European Journal of Plant Pathology. 102(1): 33-44.

Marques, J.P.R.; Amorim, L.; Silva-Junior, G.J.; Spósito, M.B.; Appezzato-da Gloria, B. 2015. Structural and biochemical characteristics of citrus flowers associated with defence against a fungal pathogen. AoB Plants. 7.

Meyers, R.A. 1995. Molecular biology and biotechnology: a comprehensive desk reference. John Wiley & Sons.

Niderman, T.; Genetet, I.; Bruyère, T.; Gees, R.; Stintzi, A.; Legrand, M.; Fritig, B.; Mösinger, E. 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(1): 17-27.

Nielsen, K.K.; Nielsen, J.E.; Madrid, S.M.; Mikkelsen, J.D. 1997. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. Plant Physiology. 113(1): 83-91.

Oghenekaro, A.O.; Omorusi, V.I.; Asiegbu, F.O. 2016. Defence-related gene expression of *Hevea brasiliensis* clones in response to the white rot pathogen, *Rigidoporus microporus*. Forest Pathology.n/a-n/a.

Omorusi, V.I. 2012. Effects of white root rot disease on *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.)-Challenges and control approach. INTECH Open Access Publisher.

Philip, S.; Joseph, A.; Kumar, A.; Jacob, C.K.; Kothandaraman, R. 2001. Detection of beta -1,3-glucanase isoforms against Corynespora leaf disease of rubber (*Hevea brasiliensis*). Indian Journal of Natural Rubber Research. 14(1): 1-6.

Porat, R.o.n.; Vinokur, V.; Holland, D.; Gregory McCollum, T.; Droby, S. 2001. Isolation of a citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. Journal of Plant Physiology. 158(12): 1585-1590.

Prasath, D.; El-Sharkawy, I.; Sherif, S.; Tiwary, K.S.; Jayasankar, S. 2011. Cloning and characterization of *PR5* gene from Curcuma amada and *Zingiber officinale* in response to *Ralstonia solanacearum* infection. Plant Cell Reports. 30(10): 1799-1809.

Rauscher, M.; Ádám, A.L.; Wirtz, S.; Guggenheim, R.; Mendgen, K.; 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(6): 625-633.

Roberts, W.K.; Selitrennikoff, C.P. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. Microbiology. 136(9): 1771-1778.

Ryals, J.; Lawton, K.A.; Delaney, T.P.; Friedrich, L.; Kessmann, H.; Neuenschwander, U.; Uknes, S.; Vernooij, B.; Weymann, K. 1995. Signal transduction in systemic acquired resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 92(10): 4202-4205.

Segura, A.; Moreno, M.; García-Olmedo, F. 1993. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of Arabidopsis and spinach. FEBS Letters. 332(3): 243-246.

Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. Applied and environmental microbiology. 67(7): 2883-2894.

Sels, J.; Mathys, J.; De Coninck, B.M.A.; Cammue, B.P.A.; De Bolle, M.F.C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry. 46(11): 941-950.

Silverman, F.P.; Petracek, P.D.; Heiman, D.F.; Fledderman, C.M.; Warrior, P. 2005. Salicylate Activity. 3. Structure Relationship to Systemic Acquired Resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(25): 9775-9780.

Simmons, C.R. 1994. The Physiology and Molecular Biology of Plant 1,3-β-D-Glucanases and 1,3;1,4-β-D-Glucanases. Critical Reviews in Plant Sciences. 13(4): 325-387.

Sudisha, J.; Sharathchandra, R.G.; Amruthesh, K.N.; Kumar, A.; Shetty, H.S. 2012. Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. In: Plant Defence: Biological Control. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 379-403.

Tahiri-Alaoui, A.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S. 1993. Immunocytochemical localization of pathogenesis-related PR-1 proteins in tobacco root tissues infected in vitro by

the black root rot fungus Chalara elegans. Physiological and Molecular Plant Pathology. 42(1): 69-82.

Thompson, C.E.; Fernandes, C.L.; Souza, O.N.; Salzano, F.M.; Bonatto, S.L.; Freitas, L.B. 2007. Molecular modeling of pathogenesis-related proteins of family 5. Cell Biochemistry and Biophysics. 44(3): 385-394.

Torres, M.A.; Jones, J.D.G.; Dangl, J.L. 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. Plant Physiology. 141(2): 373-378.

Vaghefi, N.; Mustafa, B.M.; Dulal, N.; Selby-Pham, J.; Taylor, P.W.; Ford, R. 2013. A novel pathogenesis-related protein (*LcPR4a*) from lentil, and its involvement in defence against Ascochyta lentis. Phytopathologia Mediterranea. 52(1): 192.

Van Damme, E.J.M., et al.,. 1999. A Gene Encoding a Hevein-Like Protein from Elderberry Fruits Is Homologous to PR-4 and Class V Chitinase Genes. Plant Physiology. 119(4): 1547-1556.

van Esse, H.P.; Fradin, E.F.; de Groot, P.J.; de Wit, P.J.G.M.; Thomma, B.P.H.J. 2009. Tomato Transcriptional Responses to a Foliar and a Vascular Fungal Pathogen Are Distinct. Molecular Plant-Microbe Interactions. 22(3): 245-258.

Van Loon, L.C.; 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(2): 85-97.

Van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol. 44: 135-162.

Velazhahan, R.; Datta, S.K.; Muthukrishnan, S. 1999. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. Pathogenesis-related proteins in plants Kluwer Academic CRC Presss, Dordrecht. 303.

Velazhahan, R.; Samiyappan, R.; Vidhyasekaran, P. 2000. Purification of an Elicitor-Inducible Antifungal Chitinase from Suspension-Cultured Rice Cells. Phytoparasitica. 28(2): 131-139.

Wan, J.; Zhang, X.-C.; Neece, D.; Ramonell, K.M.; Clough, S.; Kim, S.-y.; Stacey, M.G.; Stacey, G. 2008. A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. The Plant Cell. 20(2): 471-481.

Ward, E.R.; Uknes, S.J.; Williams, S.C.; Dincher, S.S.; Wiederhold, D.L.; Alexander, D.C.; Ahl-Goy, P.; Metraux, J.P.; Ryals, J.A. 1991. Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. The Plant Cell. 3(10): 1085-1094.

Watanabe, T.; Kanai, R.; Kawase, T.; Tanabe, T.; Mitsutomi, M.; Sakuda, S.; Miyashita, K. 1999. Family 19 chitinases of Streptomyces species: characterization and distribution. Microbiology. 145(12): 3353-3363.

Wattanasilakorn, S., Sadoodee, S., Nualsri, C. and Chuenchit, S. 2012. Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) rootstocks for the white root disease resistance. Journal of Agricultural Technology. 8(7): 2385-2395.

Wnendt, S.; Ulbrich, N.; Stahl, U. 1994. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. Current genetics. 25(6): 519-523.

Yalpani, N. 1993. Endogenous Salicylic Acid Levels Correlate with Accumulation of Pathogenesis-Related Proteins and Virus Resistance in Tobacco. Phytopathology. 83(9): 702-702.

Young, J.K.; Byung, K.H. 1996. Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride. Physiological and Molecular Plant Pathology. 48(6): 417-432.

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. 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 เติมผงวุ้น 1.8% ซึ่งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบต่างๆ ให้เสร็จก่อนจึงเติมผงวุ้น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ก่อนนำไปเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหาร LB ที่มีการเติม ampicillin เตรียมโดยผสมสารละลาย ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย ampicillin มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียม ampicillin stock solution

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

4. 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

5. การเตรียม 3M Sodium acetate pH 5.2

ชั่ง Sodium acetate 408.1 กรัม ละลายน้ำให้ได้ปริมาตรประมาณ 750 มิลลิลิตร เติม Glacial acetic acid จนได้ pH 5.2 ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที