บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพาราเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทยโดยมีปริมาณการส่งออกปี 2549 ถึง 3,056,770 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 205,361.45 ล้านบาท (http://www.moac.go.th/builder/moac06/information/view_index.php?id=2652) ซึ่งทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมาก โดยพบว่านอกจากน้ำยาง (Latex) จากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) จะให้ natural rubber (cis-1,4-polyisoprene) เพื่อใช้ในการทำยางแผ่น ถุงมือยาง และอุปกรณ์ยางต่างๆ แล้วยังมีส่วนที่เป็นน้ำซึ่งมีสารชีวโมเลกุลอีกหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีนที่เกี่ยวกับกระบวนการเมทาบอลิสมของเซลล์ รวมถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างยาง ซึ่งจะอยู่ในชั้นซี-ซีรัม (C-serum) ของน้ำยางพารา (Yeang *et al.*, 2002) และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางแพทย์และอุตสาหกรรมได้ มีการศึกษาโปรตีนน้ำยางเช่น การสกัดเอนไซม์นิวทรอลไซโทพลาสมิกฟอสฟาเทส (Neutral cytoplsmic phosphatase) จากส่วน ซี-ซีรัมของน้ำยางพารามาประยุกต์ใช้ในการติดฉลากแอนติบอดี แล้วนำไปใช้ในการทำ ELISA และ immunoblotting (เสาวลักษณ์, 2540) นอกจากนี้พบว่าในชั้นซี-ซีรัม (C-serum) ยังมีดีเอ็นเอ (DNA) และ อาร์เอ็นเอ (RNA) อยู่ด้วย (วราภรณ์, 2524) จึงมีการสนใจศึกษาการแสดงออกของยีนในน้ำยางพารา Han และคณะ (2000) ได้ทำการค้นหายีนในน้ำยางพารา โดยการใช้เทคนิค Expressed Sequence Tag (EST) ค้นพบยีนเกี่ยวกับการสร้างน้ำยาง (rubber biosynthesis) ถึง 16% ของยีนที่ได้จากการทำ cDNA library และ พบรองลงมาคือยีนเกี่ยวกับระบบป้องกันตัวเอง (defense related gene) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ko และคณะ (2003) ที่มีการทดลองโดยการใช้เทคนิค cDNA-AFLP (amplified restriction fragment length polymorphism) อาจกล่าวได้ว่าการป้องกันตัวเองของต้นยางพาราอาจเป็นหน้าที่หนึ่งของเซลล์ laticifers ในน้ำยางพารา

จากรายงานต่างๆ ถึงแม้จะมีการทำคลังยีนของน้ำยางพารามาบ้างแล้ว แต่การทำคลังยีนในสิ่งมีชีวิตในแต่ละครั้งจะให้องค์ประกอบของคลังยีนแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาวะของความสดของตัวอย่างในการทำการทดลอง ประสิทธิภาพในการทำการทดลอง งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบของน้ำยางในระดับยีนโดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tag (EST) เป็นเทคนิคที่ใช้การค้นหายีนจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว โดยสามารถใช้

ค้นหายีนที่คาดว่าจะมีการแสดงออกขณะนั้นได้ปริมาณมากได้ เพื่อความเข้าใจในกระบวนการ plant defense mechanism ในต้นยางพารามากขึ้น และค้นหายีนชนิดใหม่ๆ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปสู่การทราบประเภทและหน้าที่ของสารที่คาดว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมปรับปรุงต้นยางพาราให้มีความสามารถต้านทานต่อโรคได้

บทตรวจเอกสาร

1. ยางพารา

พืชที่ให้น้ำยาง (rubber-bearing plant) มีอยู่ด้วยกันมากกว่า 900 สกุลในธรรมชาติ แต่ยางพาราซึ่งอยู่ในสกุล *Hevea* นับว่าสำคัญที่สุดเพราะให้น้ำยางในปริมาณที่มากกว่าและสามารถปลูกเพื่อนำมาใช้เชิงพาณิชย์ได้ ยางในสกุล *Hevea* มีหลายชนิด (species) อาศัยความแตกต่างทางสัณฐานและสรีระวิทยา เช่น *Hevea similis Hevea sproceana Hevea minor Hevea nitida Hevea discolor Hevea lutea* และ *Hevea brasiliensis* โดยที่ *H. brasiliensis* นับว่าสำคัญทางเศรษฐกิจที่สุด เนื่องจากให้ผลผลิตสูง ตลอดจนคุณภาพของน้ำยางที่ดีเหมาะแก่การผลิตเพื่ออุตสาหกรรม มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางทวีปเอเชียและแอฟริกาได้เป็นอย่างดี ยางสกุล *Hevea* ชนิดนี้ที่รู้จักกันทั่วไปว่า ยางพารา (Para-rubber) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์เต็มๆว่า *Hevea brasiliensis* Mull. Arg ตั้งขึ้นโดย Dr.Jean Mueller นักพฤษศาสตร์ชาวสวิส (สมพงศ์, 2536)

การจำแนกอนุกรมวิธานของยางพาราเป็นดังนี้

Division	Spermatophyta
Sub-division	Pteropsida
Class	Angiospermae
Sub-class	Dicotyledoneae
Order	Euphorbiales
Family	Euphorbiaceae
Genus	*Hevea*
Species	*brasiliensis*

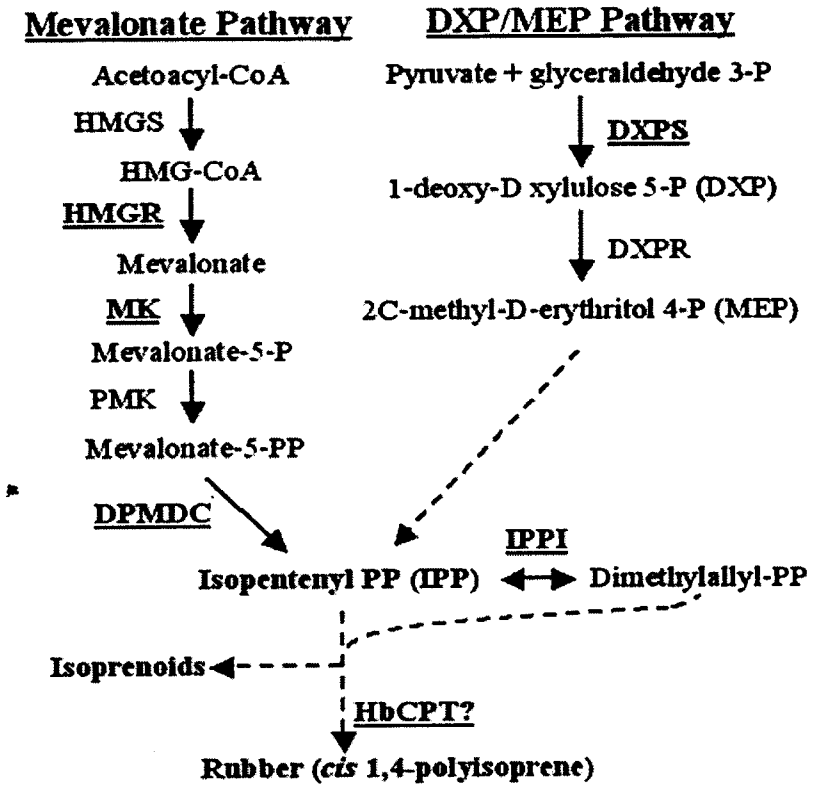
1.1 น้ำยางพารา (Latex)

น้ำยางพารามีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมมี pH อยู่ระหว่าง 6.5-7.0 (วราภรณ์, 2524) นอกจากมีหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารแล้ว ยังเป็นแหล่งป้องกันเชื้อโรคให้กับต้นยางพาราเนื่องจากพบว่าภายในของเหลวดังกล่าวมีเอนไซม์หลายชนิดสามารถทำลายผนังเซลล์ของราและแบคทีเรียต่างๆได้ (Martin, 1991) โดยเป็นส่วนไซโตพลาสซึมของ lactiferous cell ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิดรวมถึงโปรตีน (Yeang *et al.*, 2002) เมื่อศึกษา

โครงสร้างภายในท่อน้ำยางพารา นอกจากพบอนุภาคของลูทอยด์ และอนุภาคฟรีย์วิสลิง (Frey-Wyssling particle) ที่แขวนลอยปะปนอยู่ภายในของเหลวในท่อแล้วยังพบออร์แกเนลล์ของเซลล์ เช่น เอนโดพลาสมิคเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum) ไรโบโซม (ribosome) พลาสติด (plastid) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) รวมทั้งนิวเคลียส (nucleus) เป็นจำนวนมาก โดยสองชนิดหลังมักเรียงตัวชิดกับผนังด้านในของท่อเนื่องจากถูกเบียดด้วยอนุภาคยาง (Dickenson, 1965) อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่พบนิวเคลียสและไมโทคอนเดรียในน้ำยางสดที่กรีดจากต้นยางพารา (นพรัตน์, 2525) การปั่นน้ำยางสดด้วย high speed centrifugation ที่ความเร็ว 44,000xg เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้แยกน้ำยางออกเป็น 3 ชั้นหลักๆ เรียงลำดับจากชั้นบนลงล่าง คือ ชั้นที่เป็นเนื้อยาง (rubber cream) ชั้นของซี-ซีรัม (C-serum) และชั้นของลูทอยด์ (lutoids) (Yeang *et. al.*, 2002)

1.2 ชั้นของเนื้อยาง

พบว่าในน้ำยางมีเนื้อยางประมาณ 30-45% โดยน้ำหนักทั้งนี้ปริมาณของเนื้อยางจะมากน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น พันธุ์ยาง อายุของต้นยาง วิธีการกรีด ฤดูกาล เป็นต้น (สมพร, 2529) โดยยาง (rubber) มีสูตรโครงสร้างเป็น cis-1,4 polyisoprene มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 10^5-$2X10^6$ ดาลตัน การสร้างน้ำยางใน laticifer โดยใช้ Isoprenyl pyrophosphate(IPP) และ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจะพบว่าส่วนใหญ่ใช้ IPP (Cornish, 2001) มีกระบวนการสังเคราะห์ได้ 2 กระบวนการคือ mevalonate pathway เกิดจากการรวมตัวของ acetyl CoA ดังรูปที่ 1 เพื่อให้ได้โมเลกุลของ isopentenyl pyrophosphate (IPP) และ mevalonate-independent pathway เพื่อสังเคราะห์ IPP หรือเรียกว่า the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythreitol 4-phosphate (DXP/MEP) pathway (Rohmer *et al.*, 1993; Eisenreich *et al.*, 1998) โดยใช้ pyruvate และ glyceraldehydes-3-phosphate เป็นสารตั้งต้น หลังจากได้ IPP แล้วเข้าสู่ isoprenoid pathway โดยใช้เอนไซม์ cis-prenyltransferase (Singh *et al.*, 2003)



รูปที่ 1 แสดงกระบวนการสร้างยาง (Mevalonate and DXP/MEP pathway) (Ko *et al.*, 2003)

1.3 **ชั้นของซี-ซีรัม**

เป็นส่วนของของเหลวที่ได้จากการปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแรงสูง เรียกย่อๆ ว่า ซี-ซีรัม เป็นชื่อที่ตั้งโดย Cook และ Sekhar ในปี คศ. 1953 (อ้างโดยสมพร, 2529) เพื่อใช้เรียกส่วนที่เป็นน้ำ (aqueous phase) ภายในน้ำยางประกอบด้วยส่วนที่เป็นของเหลวใสปกติอยู่ประมาณ 55-60% โดยน้ำหนักของน้ำยางพารา (วราภรณ์, 2524) ประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญหลายชนิด เช่น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการภายในเซลล์ (cellular metabolism) กระบวนการหายใจ (respiratory pathway) และเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ยาง (Yeang *et al.*, 2002) นอกจากนี้ในซี-ซีรัมยังพบส่วนประกอบอื่นๆ เช่น กรดอะมิโน (amino acid) สารประกอบไนโตรเจนอิสระบางชนิด เช่น โคลีน (choline) เมทธิลเอมีน (methylamine) เป็นต้น รวมทั้ง ดีเอ็นเอ (DNA) และ อาร์เอ็นเอ (RNA) อยู่ด้วย (วราภรณ์, 2524)

1.4 **ชั้นของลูทอยด์**

เป็นส่วนของตะกอนของก้นหลอดปั่น มีลักษณะคล้ายเต้าหู้สีเหลืองปนเทาพบประมาณ 10-20% โดยปริมาตรของน้ำยางสด (สมพร, 2529) เป็นส่วนของแวคิวโอลชนิด tonoplast มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-3 ไมโครเมตร (Kekwish, 2001) ภายในบรรจุของเหลวที่เรียกว่า ของเหลวส่วนล่าง (Bottom fraction serum) หรือ บี-ซีรัม (B-serum) ซึ่งเป็นสารละลายใสสีเหลืองมี pH ประมาณ 5.2-5.8 ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน สำหรับโปรตีนที่มีอยู่มากที่สุดของเหลวนี้ได้แก่ Hevein มีรายงานว่าเฮวิอีนสามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด และเป็นโปรตีนที่เป็นสาเหตุให้เกิดการแพ้ (allergenic protein) และพบเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) อยู่หลายชนิด เช่น ไคติเนส (chitinase) กลูคาเนส (glucanase) นิวรามิเนส(neuraminase) บีตา-กาแลกโตซิเดส (β-galactosidase) และ acid phosphatase เป็นต้น (Jacob *et al.*, 1989) ดังนั้นจึงมีผู้เปรียบเทียบอนุภาคลูทอยด์ได้กับไลโซโซม (lysosome) ของเซลล์สัตว์นั่นเอง

2. โรคที่พบในยางพารา

โรคพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และผลผลิตทางการเกษตร โดยเกิดจากพืชถูกรบกวนโดยเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช หรือปัจจัยต่างๆ เกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน เป็นเหตุทำให้กิจกรรมต่างๆในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป หรือถูกยับยั้งจนทำให้เซลล์ตาย ส่งผลให้พืชแสดงอาการของโรคเมื่อขยายมากยิ่งขึ้น จนสังเกตได้ด้วยตาเปล่า เช่น ใบจุด ใบไหม้ ผลจุด ผลเน่า เป็นต้น (วรรณวิไล, 2547)

2.1 สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

2.1.1 สาเหตุที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต (Infectious plant diseases)

โรคพืชชนิดนี้มีการติดต่อจากต้นที่เป็นโรคสู่ต้นปกติได้ โดยอาศัยการขยายพันธุ์ของเชื้อโรคเองหรือโดยอาศัยแมลงเป็นพาหะ ต้องอาศัยสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อเจริญ เช่น ความอ่อนแอของพืช ความรุนแรงและปริมาณของเชื้อ รวมถึงสภาพแวดล้อมและเวลาในการเกิดโรคได้ เชื้อที่ทำให้เกิดโรคมีหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไฟโตพลาสมา รวมถึงไส้เดือนฝอย พืชชั้นสูงและสาหร่าย สำหรับในยางพารา ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora spp.* ซึ่งส่งผลให้เกิด โรคใบร่วง (Abnormal leaf fall) และผลเน่า (Mouldy rot) อาการคือ ผลที่ถูกทำลาย

จะเน่าดำค้างอยู่บนต้น ส่วนอาการที่ใบจะพบว่าใบร่วงทั้งๆ ที่ยังมีสีเขียวมีรอยช้ำสีดำอยู่ที่ก้านใบ และตรงกลางรอยช้ำมีหยดน้ำยางเกาะติดอยู่ด้วย โรคนี้จะสัมพันธ์กับโรคเส้นดำด้วย เนื่องจากเกิดจากเชื้อชนิดเดียวกัน เมื่อเกิดโรคนี้จะทำให้ใบร่วงหมดทั้งสวน ผลผลิตยางจะลดลงแต่ก็ไม่ทำให้ต้นยางตาย โดยเชื้อสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา คือ *P. palmivora P. botryosa P. hevea P. meadii* และ *P. parasitica* แต่ที่ทำให้เกิดโรคใบร่วงในประเทศไทยมากคือ *P. palmivora* และ *P. botryosa* (Butler, 1996)

2.1.2 สาเหตุที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต

อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม ทั้งแบบที่เกิดอย่างต่อเนื่องอย่างช้าๆ และแบบที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน รวมถึงมลพิษทั้งทางดินและทางน้ำ จนถึงระดับที่พืชไม่สามารถทนได้ โดยโรคพืชประเภทนี้ไม่สามารถถ่ายทอดไปยังต้นปกติได้ แต่จะมีผลกระทบต่อพืชทั้งตั้งแต่เมล็ด ต้นกล้า ต้นที่เจริญเต็มที่ สำหรับในยางพาราที่พบคืออาการตายจากยอดมักเกิดกับยางอายุระหว่าง 1-6 ปี หลังจากประสบกับปัญหาสภาพอากาศแห้งแล้งจัดเป็นเวลานานติดต่อกัน นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากความร้อนของพื้นดิน ตลอดจนพิษตกค้างของสารเคมีในดิน เช่น สารเคมีปราบวัชพืช สารกำจัดตอ หรือใส่ปุ๋ยมากเกินไป ฯลฯ ในพื้นที่ที่มีหน้าดินตื้น มีชั้นของหินแข็งหรือดินดานอยู่ใต้ดินอาการตายจากยอดจะปรากฏให้เห็นได้ชัดเจนหลังจากปลูกยางไปแล้ว 3 ปี เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chartzoulakis และคณะ (2002) พบว่าภาวะขาดน้ำของอโวกาโด จะทำให้เปลี่ยนแปลงลักษณะของใบ โดยปากใบจะปิด การสังเคราะห์แสงถูกยับยั้งเนื่องจากปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ แพร่ผ่านต่ำ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตลดลง

2.2 กลไกการตอบสนองของพืชต่อเชื้อก่อโรค

โดยทั่วไปพืชมีกลไกการป้องกันตัวเอง โดยต่อต้านเชื้อโรคที่ทำให้พืชได้รับความเสียหายน้อยลง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูง การป้องกันโรคของพืชอาจเกิดเนื่องจาก ลักษณะโครงสร้างของพืชเอง ทำให้ยับยั้งการเจริญลุกลามของเชื้อเข้าสู่พืช ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางชีวเคมีในเซลล์และเนื้อเยื่อพืช โดยการสร้างสารที่เป็นพิษต่อเชื้อโรคหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค ในยางพารามีกลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเช่นเดียวกับพืชทั่วไป โดยพบปฏิกิริยาต่อต้านต่อเชื้อโรคครั้งแรกโดย Tan และ Low ในปี 1975

2.2.1 **การป้องกันของพืชโดยโครงสร้าง** (structure defense)

ชั้นผิวเป็นส่วนแรกที่เป็นเกราะป้องกันการเจาะผ่านของเชื้อ ลักษณะของโครงสร้าง รวมถึงคุณสมบัติและปริมาณส่วนประกอบ เช่น การที่ใบพืชมีขี้ผึ้งปกคลุม ทำให้ป้องกันหยดน้ำเกาะติดผิวของพืช ทำให้สปอร์ของเชื้อราที่อยู่ที่ผิวไม่งอกหรือไม่มีความชื้นเพียงพอที่จะเพิ่มจำนวนได้ การมี cuticle ที่หนาทำให้พืชต้านทานต่อโรคมากขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เชื้อต้องเจาะเข้าสู่พืชโดยตรง ความเหนียวและความหนาของผนังด้านนอกของเซลล์ epidermis ทำให้เชื้อราเจาะผ่านสู่พืชทางตรงไม่ได้หรือยากขึ้น ความเหนียวและความหนาของผนังของเซลล์เนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำและอาหารของพืช เนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์ sclerenchyma จะกีดกันการลุกลามจากเชื้อรา, ชนิดและโครงสร้างของปากใบ การที่มีปากใบแคบอาจทำให้ป้องกันเชื้อราที่เข้าทางปากใบได้ตลอดจนเวลาการเปิด-ปิดของปากใบ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของพืชได้

เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่เซลล์พืชโดยผ่านโครงสร้างป้องกันของพืชที่อยู่ผิวนอกหรือภายในพืชแล้วก็ตาม พืชจะแสดงปฏิกิริยาตอบโต้ทางโครงสร้างและลักษณะต่างๆ ออกมาเป็นระดับความต้านทานในการป้องกันการลุกลามของเชื้อ ปฏิกิริยาดังกล่าวมีดังนี้

2.2.1.1 การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อ โดยเกิดเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์ที่จะเจริญเป็นคอร์ก (cork layer) ชั้นนี้จะช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อและสารพิษที่เชื้อขับออกมาขยายกว้างออกไปอีก และยับยั้งการไหลเวียนของน้ำและอาหารจากเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ทำให้เชื้อและเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วอยู่ในบริเวณแผลที่เห็นเป็นจุดหรือพอกพูนแยกส่วนออกมาจากเนื้อเยื่อปกติ

2.2.1.2 การเกิดการแตกปริของเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อส่วนที่ปกติถูกตัดขาดออกจากบริเวณของเชื้อหรือบาดแผลที่เป็นโรค ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคและสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นลุกลามไปยังเนื้อเยื่อปกติ การเกิด tylose ในท่อ xylem ในระหว่างที่เชื้อโรคเข้าทำลายท่อลำเลียง พันธุ์พืชที่ต้านทานต่อโรคจะเกิด tylose ได้มากมายอย่างรวดเร็วก่อนที่เชื้อจะลุกลามไปถึง โดยเชื้อยังเจริญไปถึงส่วนราก หากเป็นพันธุ์ก่อโรค เชื้อจะเจริญไปก่อนแล้วจึงเกิด tylose ภายหลัง ทำให้ไม่สามารถกีดขวางการลุกลามของเชื้อโรคได้ พืชจึงเป็นโรครุนแรง

2.2.1.3 การสะสมยางเหนียวของเนื้อเยื่อ ทำให้เชื้อบางชนิดชะงักการขยายขอบเขตออกไปไม่ได้จะถูกจำกัดอยู่เฉพาะในแผลและตายในที่สุด

2.2.2 **การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเซลล์** (cellular defense structure)

ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์ โดยเกิดขึ้น 2 แบบคือ เกิดการป่องออกของเซลล์ epidermis และเซลล์ที่อยู่ใต้ epidermis ในระหว่างที่เชื้อแทงผ่านพืช โดยตรงซึ่งอาจยับยั้งการแทงผ่านและการตั้งรกรากของเชื้อได้ และการเกิดเป็นเปลือกห่อหุ้มเส้นใยของเชื้อราที่เริ่มแทงผ่านเซลล์

2.2.3 **การป้องกันที่เกิดจากปฏิกิริยาของ** cytoplasm (cytoplamic defense reaction)

โดยที่ ไซโตพาสซึมไปคุมกลุ่มของเส้นใยและนิวเคลียสของพืชจะเคลื่อนตามไปด้วยแล้ว โพรโตพลาส (protoplasm) ของเซลล์จะเริ่มจางหายไปในขณะที่เชื้อเจริญเพิ่มขึ้น บางครั้งเซลล์ที่เชื้อเข้าไปทำลายไซโตพลาสซึม นิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้นและไซโตพลาสซึมจะกลายเป็นเม็ดเด่นชัด เส้นใยของเชื้อจะสลายตัวเห็นเป็นส่วนๆ แล้วการเข้าไปทำลายก็หยุดลงในที่สุด (ไพโรจน์, 2525)

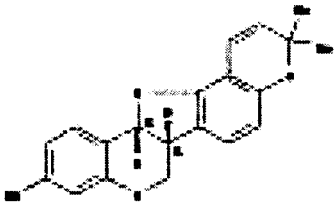
2.2.4 **รอยไหม้** (necrosis) **และการตายอย่างว่องไวของเซลล์** (hypersensitive cell death)

การเกิดรอยไหม้เป็นลักษณะที่เกิดจากการตายของเซลล์ตรงตำแหน่งที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อและสารพิษต่างๆ โดยสังเกตเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล มักเป็นแบบแห้ง หรือเป็นแผลเป็นหย่อมๆ ถ้าพืชเกิดรอยไหม้อย่างรวดเร็วเมื่อถูกบุกรุกจากเชื้อก่อโรคจะเรียกการตอบสนองนี้ว่า "hypersensitive" อาการรอยไหม้พบทั่วไปตามบริเวณส่วนต่างๆของพืชที่เป็นโรค เช่น ขน ใบ ต้น โคน ราก หัว ฝัก ผล เป็นต้น ขนาดของของรอยไหม้จะกว้างหรือแคบ เกิดเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น ส่วนของพืช ชนิดของพืชที่ถูกบุกรุก เชื้อที่บุกรุก สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมต่างๆ อาการของรอยไหม้ที่พบทั่วไป เช่น อาการเป็นจุดมักเกิดบนใบหรือผลตามปกติ มีขนาดแผลประมาณ 1 หรือ 2 มิลลิเมตรจนถึง 1 เซนติเมตรขึ้นไป (ไพโรจน์, 2525) มีรูปร่างกลม เนื้อเยื่อตรงกลางผลซึ่งตายแล้วจะทำให้เห็นโซนรอบๆแผล อาจเป็นสีแดงหรือสีเหลือง เช่น โรคแอนแทรคโนสของถั่วฝักยาว แตงโม แตงกวา เป็นต้น necrosis มีขนาดใหญ่กว่า 1 เซนติเมตร โรคใบจุดนูน (*Colletotrichum* leaf spot) หรือลักษณะรอยไหม้ที่เป็นจุดนูนสีน้ำตาล ขอบแผลมีสีเหลืองคล้ายรอยไหม้ แผลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตรซึ่งเกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

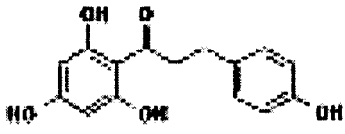
2.2.5 **การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน** (Phytoalexin synthesis)

ไฟโตอเล็กซินเป็นปฏิชีวนะสารที่พืชสร้างขึ้นและมีพิษต่อเชื้อโรค (antimicrobial) มีมวลโมเลกุลต่ำและมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบที่พบสะสมเฉพาะในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้น (stress) จากอิลิซิเตอร์ (elicitor) ชนิดต่างๆ ทั้งจากสิ่งมีชีวิต (biotic) และสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic) พบในตำแหน่งที่มีการบุกรุกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย

ไฟโตอเล็กซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะ ขึ้นอยู่กับพืชที่สร้างขึ้นจากการกระตุ้นของเชื้อ โดยไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อที่มีเชื้อและในเนื้อเยื่อของเซลล์ข้างเคียง อัตราการเกิดไฟโตอเล็กซินขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และเกิดในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ไฟโตอเล็กซินสามารถแยกมาจากลำต้น ราก ผล และใบ ที่เกิดจากการติดเชื้อมีโครงสร้างที่แตกต่างกันมากกว่า 350 แบบ จากวงศ์ Leguminosae พบทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledons) และพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledon) มีชื่อเฉพาะที่เรียกแตกต่างกัน (Kuc', 1995) เช่น phaseollin พบในถั่วเมล็ดแบนต่างๆ และ phloretin ในแอปเปิ้ล (ไพโรจน์, 2525) โครงสร้างของ phaseollin และ phloretin แสดงในรูปที่ 2



Phaseollin



phloretin

(www.mobot.org/.../top/chemicals/phaseollin.gif) (www.chemblink.com/structures/60-82-2.gif)

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ phaseollin และ phloretin

ในปี 1975 Tan และ Low พบการตอบสนองในการป้องกันตัวเองของยางพารา โดยพบว่าให้เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนยางพารา จะทำให้เกิดการกระตุ้นให้เซลล์บริเวณที่กำลังจะติดเชื้อสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งไฟโตอเล็กซินที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตได้

2.2.6 **การสังเคราะห์** Pathogenesis-related protein (PR-protein)

PR-protein เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายจากการรุกรานจากเชื้อโรคหรือจากการได้รับสารเคมี (chemical treatment) หรือถูกกระตุ้นจากการเกิดบาดแผล (wounding) และอิลิซิเตอร์ชนิดต่างๆ ในพืชชั้นสูงโดยทั่วไปจะสร้าง PR-protein เพื่อทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อและไวรัส (Kitajima and Sato, 1999)

PR-protein ที่พืชสร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์จะเกิดขึ้นเฉพาะเมื่อมีการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้นเท่านั้น ส่วนใหญ่ป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์ต่ำถึงปานกลางและไม่จำเพาะต่อเชื้อใดๆ (Legrand *et al.*, 1987)

จากการทดลองของ Chumgchow และคณะ (1995) พบว่าในน้ำยางพารามีเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส ซึ่งเป็น PR-protein ชนิดหนึ่ง อาจเนื่องมาจากต้นยางพาราถูกกรีดเป็นประจำ หน้ายางถูกเปิดทำให้เชื้อราผ่านเข้าท่อน้ำยางได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ตลอดเวลา ทำให้สร้างได้สูงกว่าในพืชชนิดอื่น การเกิดบาดแผลก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสร้างเอนไซม์สูงด้วย

2.2.7 **การสังเคราะห์เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส** (peroxidase)

เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นฮีโมโปรตีน (haemoprotein) สามารถใช้ H_2O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและออกซิไดส์สารประกอบอินทรีย์ที่ให้อิเล็กตรอนกลายเป็นผลผลิตที่มีสีและน้ำออกมา สามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พืชชั้นสูง เพื่อประโยชน์ในการซ่อมแซมผนังเซลล์โดยการช่วยเร่งการสร้างองค์ประกอบของผนังเซลล์ และการป้องตัวเองของพืช พบว่ายางพาราที่ถูกรุกรานด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* ทำให้เกิดโรคใบร่วงและใบจุดในยางพารา หลังจากนำมาวิเคราะห์โปรตีนด้วย isoelectric focusing พบว่าเปอร์ออกซิเดสมีปริมาณสูงขึ้น (Breton *et al.*, 1997)

3. การป้องกันโรคพืช

3.1 การใช้วิธีทางเคมีหรือใช้สารเคมี เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดเนื่องจากได้ผลรวดเร็ว เห็นผลได้ทันที เช่นการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อโรคในดินหรือที่อยู่บนต้นพืช รวมทั้งในการเก็บรักษาผลผลิต ทำให้มีปัญหาเรื่องสารตกค้าง แต่นับว่าเป็นวิธีที่อันตรายมาก โดยจะทำลายสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะบริเวณที่มีการใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน (สืบศักดิ์, 2540)

3.2 การใช้วิธีทางกายภาพ เป็นการนำความรู้ทางฟิสิกส์มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชเช่น การใช้ไอหรือความร้อนในการฆ่าเชื้อโรค เหมาะกับการปลูกในแปลงขนาดเล็ก

3.3 การใช้ชีววิธี (biocontrol) เป็นการใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส รวมถึงไส้เดือนฝอยมาควบคุมเชื้อที่ทำให้เกิดสาเหตุของโรคพืชด้วยกันเอง เป็นวิธีที่ปลอดภัย เช่น แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *Penicillium digitatum* (Obaywn, 2003)

3.4 การใช้พันธุ์ต้านทาน นับว่าเป็นวิธีที่ดี ประหยัดและปลอดภัยที่สุด โดยพยายามคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค เช่น การผสมข้ามสายพันธุ์ แต่พบว่าใช้เวลาในการคัดเลือกนานและไม่มีความแน่นอน ปัจจุบันจึงหันมาสนใจการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อป้องกันโรคพืช โดยทำให้พืชต้านทานต่อโรครวมทั้งป้องกันตัวเองการการเปลี่ยนแปลงของสภาพสิ่งแวดล้อม

4. ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเองของพืช (plant defense or stress-related gene)

กระบวนการป้องกันตนเองของพืชเพื่อให้พืชต้านทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมที่กดดัน แต่ละกระบวนการในการป้องกันตนเองมียีนที่เกี่ยวข้องต่างกัน จึงมีผู้สนใจศึกษายีนในกระบวนการต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.1 การศึกษายีนในกระบวนการ signal transduction ของพืช คือเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อม เช่น แสง ฮอร์โมน ภาวะกดดัน และสารเคมีผ่าน ตัวกลาง (signal agent) เช่น Ca^{2+}, inositol phospholipids และรวมถึงโปรตีน พวก G protein, protein kinase และ phosphatase จะมีผลต่อแมทาบอลิซึมภายในเซลล์ (Clark *et al.*, 2001) จากการทดลองโดยเพิ่มการแสดงออกของยีน mitogen-activated protein kinase (MAPK) ในยาสูบ พบว่ากระตุ้นระบบป้องกันตัวเองของพืช และ HR-like cell death (Zhang and Liu, 2001)

4.2. Resistance gene (R-gene) ซึ่งเป็นยีนที่ใช้จดจำเชื้อโรคที่เข้ามาและส่งผลกระตุ้นระบบป้องกันตัวเองของพืช ก็เป็นยีนอีกกลุ่มหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษาโดยมี 4 กลุ่มหลักๆ คือ NB-LRR (nucleotide binding leucine rich repeat) genes, Ser/Thr kinases, receptor like kinases (RLKs) และกลุ่มสุดท้ายคือ receptor-like proteins (RLPs) (Tor, *et al.*, 2004) เมื่อมีเชื้อก่อโรคเข้ามาจะกระตุ้นให้พืชสร้าง reactive oxygen species (ROS) และ nitric oxide(NO) (Bollwell, 1999) รวมถึงการสร้าง pathogenesis-related (PR) proteins (Van, 1999) การปรับปรุงพืชด้วย R-gene มีผู้ให้ความสนใจศึกษา เช่น การนำ Bs2 gene ซึ่งเป็น R-gene กลุ่ม nucleotide binding site–leucine-rich repeat (NBS-LRR) ของพริกไทยเข้าในมะเขือเทศทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรค bacterial spot disease (Tai *et al.*, 1999) รวมถึงการผลิตข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อ *Xanthomonas oryzae* โดยการใช้ R-gene ทั้ง 4 ชนิดรวมกันมาปรับปรุง (Li *et al.*, 2001)

5. ผนังเซลล์ของพืชและกระบวนการที่เกี่ยวข้อง

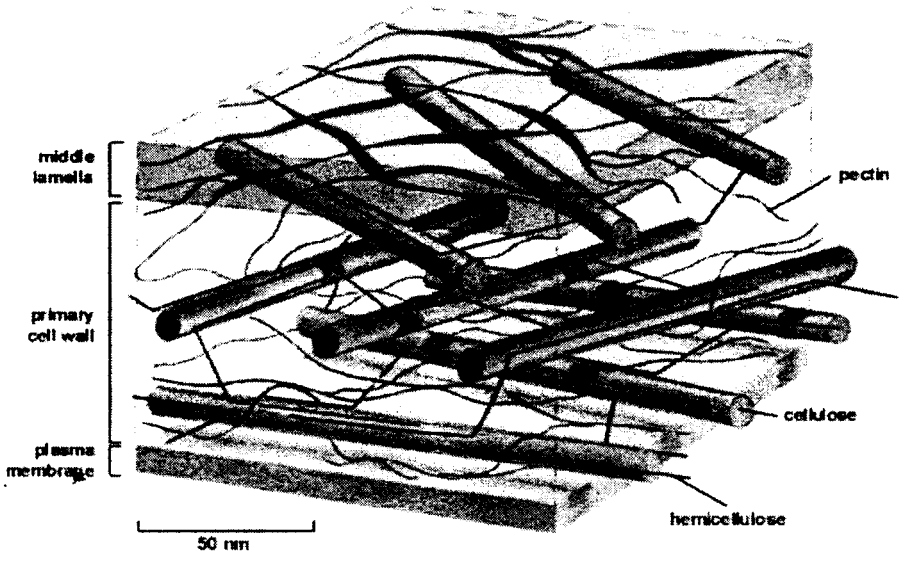
ผนังเซลล์ของพืช เป็นโครงสร้างที่อยู่ชั้นนอกสุดทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่พืช และทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เซลล์พืช สาหร่าย แบคทีเรีย และรา โดยที่ผนังเซลล์เป็นส่วนที่ไม่มีชีวิตของเซลล์ผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยชั้นต่างๆ 3 ชั้น แสดงในรูปที่ 3

1. ผนังเชื่อมยึดระหว่างเซลล์ (middle lamella) เป็นชั้นที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์พืชแบ่งตัว และเป็นชั้นที่เชื่อมระหว่างเซลล์ให้อยู่ติดกัน

2. ผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary wall) เป็นชั้นที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์เริ่มเจริญเติบโต ประกอบด้วยสารพวก เซลลูโลส และเพคตินเป็นส่วนใหญ่

3. ผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary wall) เป็นชั้นที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์หยุดขยายขนาดแล้ว โดยมีสารพวก เซลลูโลส คิวทิน ซูเบอริน ลิกนิน มาเกาะ

*ผนังเซลล์เป็นสิ่งป้องกันเชื้อโรคผ่านเข้าสู่เจ้าบ้านได้ ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการ*ย่อยสลายผนังเซลล์จึงเป็นสิ่งที่จะพัฒนานำไปสู่การป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคได้

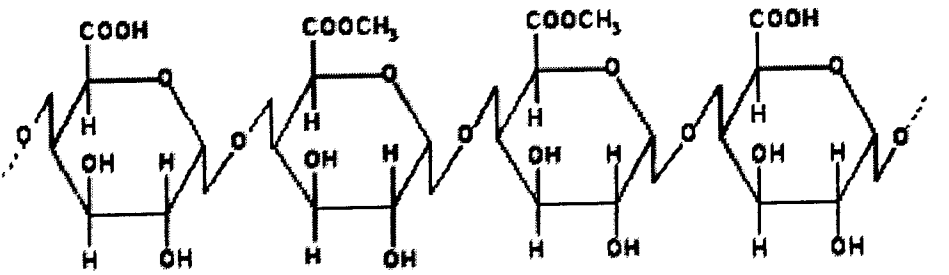


รูปที่ 3 การแบ่งชั้นของผนังเซลล์พืชและองค์ประกอบที่สำคัญในแต่ละชั้น

(http://www.daviddarling.info/images/plant_cell_wall.gif)

5.1 **เพคติน** (Pectin)

เพคตินเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่พบได้ใน middle lamella และ primary cell wall ของพืชหลายชนิด และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อพาเรนไคมา (Parenchyma) ซึ่งพบในบริเวณที่มีการขยายขนาดของเซลล์ ได้แก่ เนื้อเยื่อผักและผลไม้ที่มีลักษณะอุ้มน้ำ เพคตินประกอบด้วยแกนหลักคือ rhamnogalacturonan ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของ α-1,4-galacturonic acid ที่มีน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) หรือ น้ำตาลกาแลคทูโรแนน (Galacturonan) เพียงอย่างเดียว แสดงโครงสร้างในรูปที่ 4 นอกจากนี้สารประกอบเพคตินยังมีโครงสร้างที่แตกเป็นแขนง ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดการแตกแขนงที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของน้ำตาลแรมโนส หรือคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของกรดกาแลคทูโรนิค เรียกโครงสร้างส่วนที่แตกแขนงนี้ว่า hairy region ในส่วนที่แตกแขนงนี้จะพบน้ำตาลประเภท neutral sugar ชนิด D-galactose และ L-arabinose เป็นส่วนมาก นอกจากนี้อาจพบน้ำตาลชนิดอื่นๆ ที่หมู่ (OH) ของกรดกาแลคทูโรนิคในสารประกอบเพคตินจะเกิดการแทนที่ด้วยโมเลกุลอื่นๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแทนที่ด้วยโมเลกุลของหมู่เมทิล ซึ่งเข้าแทนที่ไฮโดรเจนไอออนของหมู่คาร์บอกซิลตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 การแทนที่หมู่คาร์บอกซิลหรือไฮดรอกซิลด้วยหมู่เมทิลนี้ ทำให้โครงสร้างของสารประกอบเพคตินมีสมบัติเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า เอสเทอริฟิเคชัน (Esterification)



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของเพคติน (http://food.oregonstate.edu/images/learni/55.gif)

5.2 เพคติเนส (Pectinase)

การย่อยสลายเพคติน ต้องใช้การทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกันโดย เอนไซม์เพคติเนส (pectinase) จะประกอบด้วยสองส่วนใหญ่ๆ คือ กลุ่มแรกทำหน้าที่ดึงหมู่เมทิลออกจากสายเพคติน คือ Pectin esterase และ กลุ่มที่สองทำหน้าที่สลายพันธะภายในสายเพคตินโดยปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และไลเอส (lyase) คือ โพลีกาแลคทูโรเนส (Polygalacturonase) และเพคเตตไลเอส (Pectate lyase) ตามลำดับ (Soriano *et al.*, 2006)

5.2.1 เพคตินเอสเทอเรส (Pectin esterase, EC 3.1.1.11)

เอนไซม์เพคตินเอสเทอเรสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์เพื่อกำจัดหมู่เมทิลออกจากโมเลกุลของ galacturonan ทำให้เกิดหมู่คาร์บอกซิลอิสระ เพื่อทำให้เอนไซม์โพลีกาแลคทูโรเนสสามารถย่อยต่อได้ โดยปฏิกิริยาจะเป็นการแยกหมู่เมทิลจากสารประกอบเพคตินที่ตำแหน่งคาร์บอกซิลที่ถูกเติมเมทิล ดังนั้นจึงไม่มีการสลายพันธะไกลโคซิดิก แต่เอนไซม์เพคตินเอสเทอเรสก็ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลสที่เร่งการสลายพันธะเอสเทอร์อยู่ จึงทำให้มันมีชื่อสามัญหลายชื่อ เช่น เพคตินเมทิลเอสเทอเรส (Pectin methylesterase) เพคตินดีเมธอกซีเลส (Pectin demethyoxylase) เพคเตส (Pectase) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กรดเพคติก (Pectic acid) และเมทานอล (Methanol)

5.2.2 **โพลีกาแลคทูโรเนส** (Polygalacturonase, EC 3.2.1.15)

เอนไซม์โพลีกาแลคทูโรเนสมีชื่อตามระบบ IUPAC ว่า poly-α-1,4–galacturonide glyconohydrolase ทำหน้าที่ไฮโดรไลส์พันธะไกลโคซิดิกที่อยู่ต่อกับหมู่คาร์บอกซิลในสารประกอบเพคติน สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามลักษณะการย่อยสลาย คือ ย่อยแบบไม่เป็นระเบียบในสายโพลีเมอร์ (Endo-splitting) และย่อยแบบเป็นระเบียบจากปลายสายโพลีเมอร์ (Exo-splitting) กลุ่มโพลีกาแลคทูโรเนสที่มีการย่อยแบบไม่เป็นระเบียบในสายโพลีเมอร์จะไฮโดรไลส์สับสเตรทโพลีเมอร์สายยาวได้ด้วยอัตราเร็วสูง

5.2.3 **เพ็คเตตไลเอส** (Pectate lyase, EC 4.2.2.2)

Pectate lyase หรือ pectate transeliminases เพคเตทไลเอสมีชื่อตาม IUPAC ว่า poly -α- 1,4 galacturonide lyase พบทั่วไปใน จุลินทรีย์ และพืชชั้นสูงชนิดอื่นๆ ที่มีลักษณะของปฏิกิริยาเป็นการกระตุ้นการตัดพันธะ α-1,4 glycosidic ใน pectin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ primary cell wall ของพืชชั้นสูง (Carpita and Gibeuut, 1993) ได้เป็นโพลีเมอร์สายสั้นๆ ที่สายหนึ่งมีปลายรีดิวซ์ และอีกสายหนึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่มีพันธะคู่ การทำงานของ Pectate lyase ต้องใช้แคลเซียมช่วย

พบครั้งแรกในปี 1962 ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Erwinia carotovora* และ *Bacillus* spp. (Starr and Moran, 1962) Pectate lyase จาก plant pathogen bacteria ไม่เพียงแต่ทำหน้าที่ย่อยสลายเพคติน (pectin) เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชเท่านั้น แต่ยังมีผลต่อระบบป้องกันตัวเองของพืชด้วย โดยหลังจากการทำงานของเอนไซม์แล้วจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น unsaturated oligogalacturonates (OG) ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตัวเองของพืชโดยทำหน้าที่เป็น defense elicitors (De Lorenzo *et al.*, 1991) เช่น กระตุ้นการสังเคราะห์ phytoalexins หรือ proteinase inhibitors

มีการศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ pectate lyase อย่างหลากหลายในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ แต่ที่มีการศึกษากันมากในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Erwinia chrysanthemi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค soft rot ของพืชหลายชนิด โดยค้นพบยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ pectate lyase 5 ชนิด ประกอบด้วย pelA pelB pelC pelD และ pelE (Shevchik *et al.*, 1997) ส่วนโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ pectate lyase ได้มีการศึกษาในหลายๆ ไอโซไซม์ เช่น Pel C (Yoder and Jurnak, 1995) และ PelE (Lietzke *et al.*, 1994) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Erwinia chrysanthemi* ซึ่งมีทั้งหมดจะมีลักษณะโครงสร้างที่เหมือนกันคือ parallel-β-helix (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002)

5.2.3.1 Pectate lyase ในพืช

มีการรายงาน Pectate lyase ที่พบในพืชชั้นสูงครั้งแรกจากส่วนเกสร (pollen) ของมะเขือเทศ (Wing *et al.*, 1989) และพบการแสดงออกของยีนในหลายๆ ชิ้นส่วนของพืชชั้นสูง การศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน pectate lyase ในพืชชั้นสูงยังมีการศึกษาน้อย จึงยังไม่สามารถบ่งบอกหน้าที่ของยีนในพืชแน่นอนได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน pectate lyase มีบทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงช่วยในการหลุดร่วงของเกสรของพืชเพื่อช่วยในการผสมพันธุ์ของพืชได้ และจากการศึกษาใน Arabidopsis genome มีประมาณ 27 ยีน และมีบางชนิดมีลำดับเบสคล้ายกับยีน pectate lyase ของแบคทีเรียสกุล *Erwinia* ซึ่งส่วนใหญ่มีบทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของพืช ในพืชชั้นสูงพบในหลายเนื้อเยื่อ เช่น ในเซลล์ mesophyll ของใบบานชื่น (*Zinnia elegans*) พบว่ายีน pectate lyase มีการแสดงออกสูงในระยะ elongation และ differentiation (Domingo *et al.*, 1998) และยังได้มีการศึกษายีนกลุ่ม cell wall degrading enzyme ในน้ำยางของดอกฝิ่น (*Papaver somniferum* L.) โดยใช้เทคนิค RNA gel blot วิเคราะห์การแสดงออกของยีนกลุ่มดังกล่าวในชิ้นส่วนต่างๆ ของต้น พบว่า ยีน pectate lyase เป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงที่จำเพาะในส่วนน้ำยางและยืนยันผลด้วยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาง ส่วนการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสุกของผลไม้หลายชนิด เช่น ในผลกล้วยสุกจะมีการแสดงออกของยีนมากกว่าผลดิบ รวมทั้งยังสามารถถูกกระตุ้นด้วยเอทีลีนซึ่งเป็นสารเร่งการสุกของผลไม้ (Pua *et al.*, 2001)

สำหรับการศึกษายีน pectate lyase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชเพื่อให้พืชสามารถต้านทานโรคได้ยังมีอยู่น้อย เช่น Wegener และ Olsen (2004) พบว่าเมื่อนำยีน Pectate lyase 2 isofrom จากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* เข้าสู่มันฝรั่งโดยใช้ Agrobacterium ทำให้ได้ต้นมันฝรั่งที่เป็น transgenic plant สามารถต้านทานโรค soft rot disease จาก *Erwinia carotovora* ได้ เมื่อเทียบกับมันฝรั่งที่ไม่มีการตัดต่อยีน โดยวัดจากการทำงานที่เพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ polyphenol oxidase phenylalanine ammonia-lyase และ peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในระบบป้องกันของพืช เป็นไปได้ว่ายีน pectate lyase ที่ตัดต่อเข้าไปอาจช่วยกระตุ้นการตอบสนองของพืชเมื่อได้รับการบุกรุกจากเชื้อโรค

การศึกษา pectate lyase ในพืชเกี่ยวกับการต้านโรค Powdery mildew ใน *Arabidopsis thaliana* ซึ่งเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไม่ใช่พวก saprophytic pathogen ดังนั้นต้องอาศัยในเจ้าบ้านที่ยังมีชีวิตเท่านั้น ซึ่งต้องใช้ปัจจัยจากพืชเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต จากการศึกษาของ Vogel และคณะ (2002) พบว่า pmr-6 gene เป็นยีนที่สังเคราะห์โปรตีน PMR-6 ได้จากการ

คัดเลือกยีนจากต้น *Arabidopsis thaliana* ที่เป็นโรค Powdery mildew จากเชื้อ *Erysiphe cichoracearum* พบว่ามีคุณสมบัติเป็น pectate lyase like protein ที่ทำหน้าที่เป็น susceptibility factor อาจทำหน้าที่ย่อยเพคตินใน extrahaustorial matrix ของพืชเพื่อเป็นช่องว่างให้เชื้อราเจริญเติบโต เมื่อทำการกลายพันธุ์ของ pmr-6 gene ทำให้ทนทานต่อโรค Powdery mildew ได้มากขึ้นเป็นไปได้ว่า เมื่อ PMR-6 ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้มีการสะสมของเพคตินและเพิ่มพันธะไฮโดรเจนใน extrahaustorial matrix และเป็นผลให้เชื้อขาดอาหารรวมถึงมีส่วน GPI anchor เพื่อทำให้ PMR-6 จาก plasma membrane มาจับกับเพคตินในผนังเซลล์ได้ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วย SA หรือ JA/ethylene pathway จึงน่าสนใจในการศึกษา pectate lyase เพื่อทำให้พืชต้านทานต่อโรคได้

6. Expressed Sequence Tag (EST)

เทคนิค Expressed Sequence Tag หรือเรียกย่อๆว่า อีเอสที (EST) เป็นวิธีการค้นหายีนจำนวนมากและรวดเร็ว โดยสามารถค้นหายีนที่สนใจจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่คาดว่าจะมีการแสดงออกในปริมาณมากๆ จากประโยชน์ที่กล่าวมา จึงมีผู้สนใจที่จะนำเทคนิคนี้มาใช้ในการค้นหายีนในหลายๆ สิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบจีโนม โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งในพืชและในสัตว์ เช่น การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งสกุลพีเนียส (Penaeus) โดยเทคนิค EST เช่น ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (Supunkul *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีกุ้งคุรุมา (*P. japonicus*) (Rojtinnakorn *et al.*, 2002) ส่วนในพืช เช่นการค้นหายีนที่สำคัญต่อการทนต่อสภาวะเครียดใน *Suaeda salsa* (Zhang *et al.*, 2001) รวมทั้งการใช้เทคนิคนี้ในการค้นหายีนในยางพารา เช่น Han และคณะ (2000) ได้ทำการค้นหายีนในน้ำยางพาราเกี่ยวกับการสร้างน้ำยาง (rubber biosynthesis) ถึง 16% ของการทำ cDNA library เช่น HMG CoA reductase Elongation factor และ ยีนเกี่ยวกับระบบป้องกันตัวเองของพืช (defense related gene) รองลงมา เช่น cold-regulate gene เช่นเดียวกับการทดลองของ Ko และคณะ (2003) ที่มีการทดลองโดยการใช้เทคนิค EST ในการค้นหายีนในน้ำยางพาราพบว่า มียีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์น้ำยางมากที่สุด เช่น 1-deoxy-D-xylulose 5-phosephate synthase (DXPX) rubber elongation factor รองลงมาคือยีนที่เกี่ยวกับการป้องกันตัวเอง (defense-stress related gene) เช่น low-temperature/salt responsive protein LTI6B, disease resistance protein และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการป้องกันตัวเองของพืชในน้ำยางพาราพบว่าสูงกว่าในใบ 10-50 เท่า (Chye and Cheung, 1995) ดังนั้นการใช้เทคนิค EST ในการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีนในน้ำยางพาราจึงเหมาะกับการทำการศึกษาในครั้งนี้

วัตถุประสงค์

1. เตรียม EST library จากน้ำยางพารา
2. โคลนยีน pectate lyase จากยางพาราและศึกษาสมบัติของโปรตีนเมื่อถูกชักนำให้แสดงออกในแบคทีเรีย