

การชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* และกิจกรรมของเอนไซม์  
ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส การสะสมของกรดซาลิไซลิกและ  
สโคพออลิตินในยางพาราหลังการปลูกเชื้อ *Phytophthora palmivora*  
**Induction of *PR-1* Gene Expression and Activity of Phenylalanine  
ammonia lyase, Accumulations of Salicylic Acid and Scopoletin in  
Rubber Tree After Infection with *Phytophthora palmivora***

อุไรวรรณ ขุนจันทร์<sup>1</sup> เขมมิการ์ โขมพัตร<sup>1</sup> กิติยา เอกเชวง<sup>1</sup> และ นันทา เชิงเช่า<sup>1\*</sup>

Uraiwan Khunjan<sup>1</sup>, Khemmikar Khomapatara<sup>1</sup>, Kitiya Ekchaweng<sup>1</sup> and Nunta Churngchow<sup>1\*</sup>

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *pathogenesis-related-1 (PR-1)* การสร้างเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส กรดซาลิไซลิกและสโคพออลิติน ซึ่งเป็นสารสำคัญในระบบการป้องกันตนเองของพืช เมื่อใบยางพาราได้รับเชื้อ *Phytophthora palmivora* ทั้งนี้เพื่อชักนำให้ยางพาราด้านทานต่อเชื้อดังกล่าว จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อฉีดพ่นใบยางพาราด้วยเชื้อ *P. Palmivora* ความเข้มข้น  $2 \times 10^4$  ชูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร มีผลให้การแสดงออกของยีน *PR-1* กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ปริมาณของกรดซาลิไซลิกและสโคพออลิตินเพิ่มสูงขึ้น 3.86, 1.78, 23.53 และ 2.71 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับใบยางพาราก่อนได้รับเชื้อโดยยีน *PR-1* มีการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสและปริมาณของกรดซาลิไซลิกมีการสร้างสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนสโคพออลิตินมีการสะสมมากขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง 12-24 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อจากผลการวิจัยสรุปได้ว่าเชื้อ *P. palmivora* มีผลชักนำให้ยางพาราผลิต mRNA ของยีน *PR-1* เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส กรดซาลิไซลิกและสโคพออลิตินเพิ่มขึ้น เพื่อสร้างระบบป้องกันตนเองจากการรุกรานโดยเชื้อดังกล่าว

**คำสำคัญ:** ยางพารา, *Phytophthora palmivora*, ยีน *Pathogenesis-related-1 (PR-1)*, ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส, กรดซาลิไซลิก, สโคพออลิติน

<sup>1</sup> ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ประเทศไทย 90112

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

\* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): nunta.c@psu.ac.th Tel: 0 7428 8261

## ABSTRACT

In this study, rubber tree leaves were inoculated with *Phytophthora palmivora* in order to investigate an expression of *pathogenesis-related-1 (PR-1)* gene and syntheses of phenylalanine ammonia lyase, salicylic acid, and scopoletin which are important substances in plant defence. The experimental results showed that, after spraying rubber tree leaves with  $2 \times 10^4$  zoospores/mL, the *PR-1* expression was increased 3.86 folds and reached a peak at 24 hours. The activity of phenylalanine ammonia lyase and the amount of salicylic acid were enhanced 1.78 and 23.53 folds, respectively and both reached the highest levels at 12 hours. The scopoletin was also obviously accumulated with 2.71 fold increased, at 12-24 hours. These studies demonstrated that inoculation rubber leaves with *P. palmivora* induced the productions of mRNA from the *PR-1* gene, the activity of phenylalanine ammonia lyase, the levels of salicylic acid and scopoletin, which indicated that the rubber trees developed defence responses to against the pathogen.

**Key words:** rubber tree, *Phytophthora palmivora*, *Pathogenesis-related-1 (PR-1)* gene, phenylalanine ammonia lyase (PAL), salicylic acid, scopoletin

## บทนำ

ยางพารา(rubbertree)มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* Muell. Arg เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ในแต่ละปีสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศหลายแสนล้านบาท และจากการรายงานของคณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ (2553) ประเทศไทยมีการส่งออกยางพาราทั้งยางดิบ ผลิตภัณฑ์ยาง และไม้ยางพารามากเป็นอันดับหนึ่งของโลกนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 จนถึงปัจจุบันส่งผลให้พื้นที่การปลูกยางพาราขยายตัวและมีเกษตรกรที่ประกอบอาชีพสวนยางพาราเป็นอาชีพหลักจำนวนมาก โดยเฉพาะเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย การเกิดโรคในต้นยางพาราจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรเจ้าของสวนและรายได้ของประเทศเป็นอย่างมาก โรคในยางพาราที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อกลุ่ม *Phytophthora* ซึ่ง *Phytophthora*

*palmivora* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในกลุ่มนี้และถูกจัดให้อยู่ใน class oomycete (Cooke *et al.*, 2000) โดยก่อให้เกิดโรคเส้นดำ (black stripe) ใบร่วงและฝักเน่า (leaf fall and pod rot) โรคเหล่านี้มีผลต่อการร่วงและการผลิใบใหม่ขึ้นมาทดแทน และถ้าเชื้อเข้าไปทำลายหน้ายาง ทำให้หน้ายางมีรอยขีดสีดำในระยะเริ่มต้น จากนั้นรอยขีดดังกล่าวจะเปลี่ยนเป็นรอยนูนสีดำ ถ้ามีอากาศชื้นรุนแรงจะมีน้ำยางไหลออกมาบริเวณหน้ายางตลอดเวลา และในที่สุดเปลือกจะเน่าหลุดออกหมด ส่งผลต่อการให้ผลผลิต (น้ำยาง) ลดลง และยังทำให้อายุการให้ผลผลิตสั้นลงอีกด้วยโดยปกติโรคนี้อาจเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและรุนแรงในระยะที่มีฝนตกหนักติดต่อกันเป็นเวลาหลายๆ วัน ทำให้การแพร่ระบาดของโรคนี้อาจรวดเร็วมากโดยน้ำจะพัดพาเชื้อสปอร์ของเชื้อไปทำลายบริเวณอื่นของต้น รวมทั้งต้นอื่นที่อยู่ใกล้เคียง (สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร, 2554; Chinnapun and Churngchow, 2008;

Chinnapun *et al.*, 2009) เมื่อพืชถูกรุกรานจากเชื้อก่อโรค พืชมีการสร้างระบบป้องกันตนเองได้ทั้งทางโครงสร้าง (physical barrier) และทางเคมี (chemical barrier) (Adie *et al.*, 2007) โดยพืชมีการปรับโครงสร้างเพื่อต้านทานจากการถูกทำลาย เช่น การปิดของปากใบ การสร้างลิกนินและแคลโลส ( $\beta$ -1,3-glucan) การมีแว็กซ์เคลือบผิว และชั้นคิวติเคิลที่หนา (Vorwerk *et al.*, 2004; Iriti *et al.*, 2009; Flors *et al.*, 2005; Vogt, 2010) นอกจากนี้ยังมีการสร้างเอนไซม์และสารที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตนเองของพืชได้แก่ เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส โมเลกุลส่งสัญญาณเช่น กรดซาลิไซลิก Pathogenesis-related proteins (PR proteins) กลุ่มต่างๆ รวมถึงสาร phytoalexin เช่น สคอพอลิติน (Rabea *et al.*, 2003)

ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase, PAL) (EC 4.3.1.5) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในระบบป้องกันตนเองของพืช มีรายงานจำนวนมากที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ตัวนี้เพื่อป้องกันเกี่ยวกับ การเกิดระบบการป้องกันตนเองหรือการสร้างสารชนิดอื่นที่เกี่ยวข้อง PAL เป็นเอนไซม์ตัวแรกใน phenylpropanoid pathway ทำหน้าที่เปลี่ยน phenylalanine ไปเป็น cinnamic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิกนิน กรดซาลิไซลิกและสคอพอลิติน เป็นต้น (Shah, 2003; Bourgaud *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2012) กิจกรรมของเอนไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต และเมื่อได้รับสภาวะเครียดต่างๆ เช่น เชื้อก่อโรค ความร้อน การเกิดบาดแผล และฮอร์โมน (Rodríguez *et al.*, 2007)

กรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA) เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณชนิดหนึ่งในพืช ซึ่งชักนำให้

พืชเกิดระบบป้องกันตนเองโดยผ่านทาง การแสดงออกของยีนและการสร้างสารที่เกี่ยวข้อง หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้ออิลิซิเตอร์และสภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อม SA มีบทบาทหลักในระบบป้องกันตนเองของพืชแบบ systemic acquired resistance (SAR) (Pieterse and Van Loon, 2004) โดยระดับของ SA ภายในเนื้อเยื่อจะสูงขึ้นเมื่อพืชถูกเชื้อเข้าทำลาย ซึ่งมีผลให้พืชต่อต้านเชื้อได้หลายชนิด SA จะส่งสัญญาณอย่างรวดเร็วไปยังยีนที่เกี่ยวข้องเพื่อชักนำพืชให้เกิดระบบ SAR โดยทั่วไป *Pathogenesis-related genes* (PR genes) มักแสดงออกโดยผ่านทางการทำงานของ SA เพื่อสร้างสารและโปรตีนที่มีสมบัติต่อต้านเชื้อโรคได้ (Glazebrook, 2005; Yasuda *et al.*, 2008) SA ในพืชถูกสังเคราะห์ผ่าน phenylpropanoid pathway จากสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ 1) chorismate โดยการทำงานของเอนไซม์ iso chorismate synthase และ iso chorismate pyruvate lyase และ 2) กรดอะมิโน phenylalanine โดยเอนไซม์ PAL และ benzoic acid-2-hydroxylase (Shah, 2003) การแสดงออกของยีน *PR-1* เกิดจากการกระตุ้นด้วยโมเลกุลส่งสัญญาณ SA ผ่านโปรตีน non-expressor of pathogenesis-related 1 (NPR1) ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมการแสดงออกของยีนกลุ่ม *PR* ที่ต้องการ SA ในการกระตุ้น รวมถึงยีน *Pathogenesis-related-1 (PR-1)* (Shah, 2003; Pieterse and Van Loon, 2004)

โปรตีน PR-1 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ของ PR proteins ซึ่งมีทั้งหมด 17 กลุ่ม PR-1 ถูกสร้างมาจากยีน *PR-1* โปรตีนกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นในด้านการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และถูกใช้เป็นเครื่องหมายเพื่อบ่งบอกสภาวะการเกิดระบบ SAR ในพืช (Hong *et al.*, 2005) จากรายงานที่ผ่านมา ยีน *PR-1*

มีการสร้างทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและคู่เป็นปกติ และมากขึ้นหลังถูกเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือเชื้อใน class oomycete เข้าทำลาย หรือได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ รวมทั้งระหว่างที่พืชมีการพัฒนาโครงสร้างเพื่อการเจริญเติบโต (Kim and Hwang, 2000; Rivière *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับยีนและโปรตีนกลุ่มนี้ยังมีอยู่น้อยเมื่อเทียบกับยีนและโปรตีน PR กลุ่มอื่น ซึ่งจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาศึกษากันมากในต้นยาสูบและ *Arabidopsis* สำหรับพืชใบเลี้ยงคู่และในข้าวสำหรับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ทำให้มีข้อมูลเกี่ยวกับยีน *PR-1* และโปรตีน PR-1 ก่อนข้างน้อยในพืชชนิดอื่น (Mitsuhashi *et al.*, 2008) สำหรับการศึกษาการสร้างโปรตีน PR-1 ของพืชทั้งในสภาวะปกติและถูกกระตุ้นด้วยสภาวะต่างๆ มักจะเลือกศึกษาในรูปแบบการแสดงออกของยีน *PR-1* เนื่องจากโปรตีน PR-1 ไม่มีกิจกรรม เช่น เอนไซม์ทั่วไป จึงทำให้ยากในการติดตามผล

สกอพอลิติน (scopoletin, Scp) มีชื่อทางเคมีว่า 7-hydroxy-6-methoxychromen-2-one และมีชื่อเรียกอื่น เช่น 7-hydroxy-5-methoxycoumarin (Vogt, 2010) เป็นสารในกลุ่ม phytoalexin มีโมเลกุลขนาดเล็ก ละลายน้ำ และเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Darvill and Albersheim, 1984) Scp ถูกกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ขึ้นหลังจากพืชได้รับเชื้อหรืออิทธิพลอื่นชนิดต่างๆ Scp สังเคราะห์ได้จากสารตั้งต้น feruloyl CoA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ cinnamic acid ใน phenylpropanoid pathway (Vogt, 2010) Scp เป็นโมเลกุลสำคัญในระบบการป้องกันตนเองของพืชเมื่อได้รับสิ่งรบกวนจากภายนอก เช่น สารเคมี การเกิดบาดแผล เชื้อก่อโรคทั้งแบคทีเรียและรา (Bourgau *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2012)

นอกจากถูกสร้างขึ้นมาสำหรับป้องกันตนเองโดยมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้โดยตรงแล้ว Scp ยังมีคุณสมบัติเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ peroxidase จึงสามารถต้านอนุมูลอิสระ คือกำจัด hydrogen peroxide ได้ (Breton *et al.*, 1997; Churngchow and Rattarasam, 2001; Chong *et al.*, 2002)

โปรตีน PR-1 เอนไซม์ PAL โมเลกุลส่งสัญญาณ SA และ Scp จัดเป็นโปรตีนและสารสำคัญที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากการถูกรุกรานด้วยเชื้อต่างๆ ผู้วิจัยได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการสร้างโปรตีน PR-1 เอนไซม์ PAL SA และ Scp ในยางพาราหลังจากได้รับเชื้อ *P. palmivora* เพื่อให้เข้าใจระบบการป้องกันตนเองในสภาวะติดเชื้อของยางพาราและการใช้ปริมาณสารต่างๆ เหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ นอกจากนี้โปรตีน PR-1 และ Scp มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์การกระตุ้นสร้างสารดังกล่าวให้เพิ่มขึ้นจึงอาจใช้เป็นแนวทางในการเตรียมสารดังกล่าวในปริมาณสูงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการค้าและด้านอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรม การเกษตร หรือเภสัชกรรมต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียมซุสเปอร์ของเชื้อ *P. palmivora*

นำเชื้อ *P. palmivora* ที่แยกมาจากต้นยางพาราที่เกิดโรค ซึ่งเลี้ยงอยู่บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร V8 agar เป็นเวลา 7 วัน เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงบนเส้นใยแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ซูสเปอร์ที่อยู่ในสเปอร์แรงเจียมจะว่ายออกมาอยู่ในน้ำกลั่น หยดซูสเปอร์ลงบน Petroff Hauser

counting chamber แล้วนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ ปริมาณ  $2 \times 10^4$  ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

## 2. การเตรียมตัวอย่างใบยางพาราและการปลูกเชื้อ

นำต้นอ่อนยางพาราติดตาเขียวยางพารา พันธุ์ RRIM600 อายุ 21 วัน จากแปลงของเกษตรกร มาเลี้ยงภายในห้องที่มีการให้แสงความเข้ม 12 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 12 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  °ซ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น ปลูกเชื้อ *P. palmivora* บนใบยางพาราโดยการ ฉีดพ่นใบยางพาราด้วยซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น  $2 \times 10^4$  ซูโอสปอร์ต่อ มิลลิลิตรปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อต้น ตอนเวลา 08.00 น. จำนวน 10 ต้นต่อ 1 ซ้ำของการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างใบยางพารา ก่อนการฉีดพ่นด้วยซุโอสปอร์ของเชื้อ (ที่เวลา 0 ชั่วโมง) และหลังได้รับเชื้อที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ เพื่อเตรียมตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ปริมาณของ SA และ Scp ต่อไป

## 3. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

### 3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ first-strand cDNA

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) จาก ตัวอย่างใบยางพาราโดยใช้ชุดสกัด RNeasy® Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen ด้วยขั้นตอนตาม คำแนะนำของบริษัท จากนั้นนำ total RNA ที่เตรียมได้ไปกำจัด genomic DNA ออกโดยการ เติม RNase-free DNaseI (Qiagen) แล้วนำไปบ่ม

ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °ซ นาน 10 นาที ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอจากค่า อัตราส่วนในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หาปริมาณของ อาร์เอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer จากนั้นเตรียม first-strand cDNA โดยใช้ SuperScript III reverse transcriptase RT-PCR system (Invitrogen) โดยการผสม total RNA 1 ไมโครกรัมกับ 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร และ 10  $\mu$ M Oligo (dT)<sub>20</sub> 1 ไมโครลิตร จากนั้น นำสารผสมไป บ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าวนำตัวอย่างเข้า อ่างน้ำแข็งทันที แล้วเติม first-strand buffer 4 ไมโครลิตร 0.1 M dithiothreitol (DTT) 1 ไมโครลิตร RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตรและ SuperScript III reverse transcriptase 1 ไมโครลิตร แล้วนำหลอด ตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าวหยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่าง first-strand cDNA ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อนำไปใช้เป็น DNA template สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วย เทคนิค Real-Time PCR ต่อไป

### 3.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

สำหรับการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออก ของยีน *PR-1* ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ใช้วิธี absolute quantification method โดยนำค่า threshold cycle (CT) ที่ได้จากการวิเคราะห์

มาคำนวณหาค่า copy number จากกราฟมาตรฐานของพลาสมิดยีน *PR-1* และ *Mitosis protein YLS8* (*YLS8*) ซึ่งใช้เป็น reference gene ในการศึกษานี้ แล้ววิเคราะห์ค่า relative expression ของยีน *PR-1* โดยการนำค่า copy number ของยีน *PR-1* เทียบกับค่าของ reference gene สำหรับวิธีการวิเคราะห์การแสดงผลของยีนด้วยเทคนิค Real-Time PCR ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PR-1* และ *YLS8* โดยไพรเมอร์ของยีน *PR-1* ออกแบบมาจากเส้นเต็ม (full-length cDNA) ของยีน *PR-1* (accession number KM514666) ซึ่งแยกได้จากใบยางพาราที่ได้รับ SA โดย Khunjan *et al.* (2016) และไพรเมอร์ของยีน *YLS8* ออกแบบมาจาก full-length cDNA ของยีน *Hevea brasiliensis mitosis protein YLS8* (accession number HQ323250.1) ด้วยโปรแกรม PRIMER3 (<http://simgene.com/Primer3>) (Rozen and Skatesky, 2000) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน *PR-1* ที่ใช้คือ Forward primer: 5'-CCCATAACCAAGCACGAGCAGC-3' และ Reverse primer: 5'-GCTGGAATGCA CAAGATTGCAGTC-3' สำหรับไพรเมอร์ของยีน *YLS8* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ Forward primer: 5' -CAAGCAAGAGTTCATTGACA TTATTGAGACTGTC-3' และ Reverse primer: 5' -ATCACAGGTTCTTACATAGTC GGATAGTCC-3' จากนั้นวิเคราะห์การแสดงผลของยีนทั้งสองโดยการเตรียมสารผสมของ cDNA ที่ได้จากตัวอย่างใบยางพารา ไพรเมอร์ และ Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) ตามคำแนะนำของบริษัทแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Stratagene Mx3005P (Agilent Technology) โดยตั้งค่าโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา

PCR ดังนี้ denaturing 95 °ซ เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่ 60 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่า CT ที่ได้จากการวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่า copy number ที่ได้มาคำนวณ relative expression ของยีน *PR-1* เทียบกับ reference gene *YLS8*

#### 4. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL

##### 4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extraction)

บดตัวอย่างใบยางพาราในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัดตัวอย่างที่บดละเอียด 0.5 กรัมด้วยสารละลาย 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) ที่มี 0.25% (v/v) Triton-X และ 3% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้วนำสารละลายใสตอนบน (supernatant) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

##### 4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL คัดแปลงมาจากวิธีของ Zucker (1968) และ Liu *et al.* (2005) โดยการเตรียมสารผสมปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 0.1 M L-phenylalanine, 0.001 M  $\beta$ -mercaptoethanol และ crude extraction 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 6 M HCl ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรแล้วนำสารผสม

ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ลบกับค่าการดูดกลืนของสารละลายก่อนบ่ม แล้วคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยยูนิตต่อน้ำหนักสดของตัวอย่าง 1 กรัม (Unit/g FW) โดย 1 ยูนิตของกิจกรรมของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของ cinnamic acid ที่เพิ่มขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อ 1 ชั่วโมง

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณของ SA และ Scp

### 5.1 การเตรียมสารสกัดใบยางพาราเพื่อวิเคราะห์ปริมาณของ SA และ Scp

บดใบยางพาราในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด จากนั้นผสมตัวอย่างที่บดละเอียด 0.5 กรัม กับ 89.8% (v/v) ethanol 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เก็บส่วนสารละลายใสหลอดใหม่ จากนั้นเติม 99.8 % (v/v) ethanol 500 ไมโครลิตร ลงในส่วนของตะกอนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เก็บส่วนสารละลายร่วมกับสารละลายที่แยกได้ในครั้งที่หนึ่ง จากนั้นสกัดตะกอนซ้ำอีกครั้งด้วย 99.8 % (v/v) ethanol 250 ไมโครลิตร แล้วเติม trichloroacetic acid ลงในสารละลายส่วนใสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 % (w/v) กรองผ่านเมมเบรนชนิดไนลอน 0.45 ไมโครเมตร ใส่ขวดสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ SA และ Scp ด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป

### 5.2 การวิเคราะห์ปริมาณของ SA และ Scp ด้วยเทคนิค HPLC

ปริมาณ SA และ Scp ในสารสกัดใบยางพาราถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Agilent 1100 Series HPLC โดยฉีดตัวอย่างสารสกัดใบยางพารา 20 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ด้วยสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ คอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6×150 มิลลิเมตร และ particle size 5 ไมโครเมตร, Agilent Technology) คือเทกเตอร์ฟลูออเรสเซนต์ วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 337 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย 425 นาโนเมตร ตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ 0.1 % (w/v) formic acid และ acetonitrile ะด้วยโปรแกรมแบบ gradient โดยกำหนดปริมาณของ 0.1% (w/v) formic acid คือ ที่ช่วงเวลาของการวิเคราะห์ 0-12 นาที ใช้ 80 เปอร์เซ็นต์ และ 13-20 นาที ใช้ 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิเมตรต่อนาที และเปรียบเทียบปริมาณจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน SA และ Scp ( $\geq 99\%$  (w/v), Sigma) กำหนดปริมาณ SA และ Scp เป็นหน่วยไมโครกรัมต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัม

## 6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PR-I* กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ปริมาณของ SA และ Scp ในใบยางพาราที่เวลาต่างๆ หลังจากได้รับเชื้อ *P. palmivora* โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance, ANOVA) แบบ one way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0 software ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## ผลการวิจัย

จากการศึกษาการชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* กิจกรรมของเอนไซม์ PAL การสะสมของ SA และ Scp ในใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ก่อนและหลังการปลูกเชื้อ *P. palmivora* ได้ผลการศึกษาดังนี้

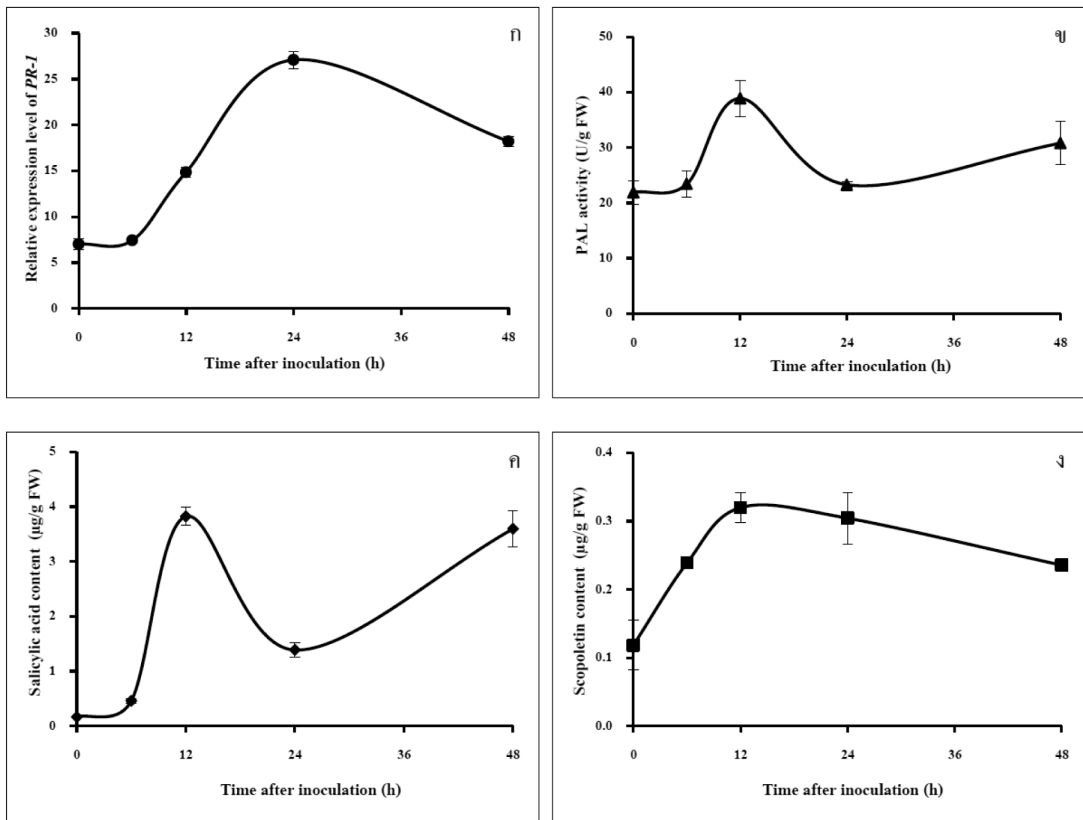
จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *PR-1* ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ในใบยางพาราก่อน (0 ชั่วโมง) และหลังได้รับเชื้อ *P. palmivora* ที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน *PR-1* เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อดังกล่าวยีน *PR-1* มีการแสดงออกสูงสุด ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้น 3.86 เท่าจากที่เวลา 0 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่าการแสดงออกของยีนลดลงตามเวลาที่ได้รับเชื้อเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 1(ก)

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในใบยางพาราที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใบยางพาราได้รับเชื้อ *P. palmivora* โดยที่เวลา 12 ชั่วโมง พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงสุด คือ มีค่าเท่ากับ 38.86 ยูนิตต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัมซึ่งเพิ่มขึ้นจากใบยางพาราก่อนได้รับเชื้อ 1.78 เท่า หลังจากนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเท่ากับ 23.26 ยูนิตต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัมซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่เวลา 0 และ 6 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ PAL เพิ่มขึ้นอีกครั้ง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30.79 ยูนิตต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัม ดังภาพที่ 1(ข)

จากการวิเคราะห์ปริมาณโมเลกุลสังสัญญาณ SA ในใบยางพาราก่อนและหลังการได้รับเชื้อที่เวลาต่างๆ ให้ผลดังภาพที่ 1(ค) จากกราฟเห็นได้ว่า ปริมาณของ SA ในใบยางพาราเริ่มต้นมีค่าต่ำ (0.1624 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัม) และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับเชื้อ *P. palmivora* โดยปริมาณสูงสุดที่ตรวจพบในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษาคือที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มขึ้นสูงอีกครั้งที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณของ SA มีค่าเท่ากับ 3.82, 1.39 และ 3.59 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของ SA ที่เวลา 12 และ 48 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็น 23.53 และ 22.12 เท่าเมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น

และจากการวิเคราะห์ปริมาณของ Scp ในใบยางพาราที่เวลาต่างๆ ทั้งก่อนและหลังได้รับเชื้อ *P. palmivora* ให้ผลการศึกษาดังกราฟในภาพที่ 1(ง) ซึ่งเห็นได้ว่าปริมาณของ Scp ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามเวลาของการได้รับเชื้อที่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งที่เวลา 12 ชั่วโมง ตรวจพบปริมาณของ Scp สูงที่สุดในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.32 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัม หลังจากนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณของ Scp ลดลงเล็กน้อยซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.30 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัมซึ่งคิดเป็น 2.71 และ 2.58 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณของ Scp ในใบยางพาราก่อนได้รับเชื้อ ตามลำดับ จากนั้นปริมาณของสารดังกล่าวลดลงเหลือ 0.24 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักใบยางสด 1 กรัม ที่เวลา 48 ชั่วโมง





**ภาพที่ 1** การเปลี่ยนแปลงปริมาณของการ แสดงออกของยีน *PR-1* กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลิกลานินแอมโมเนียไลเอส กรดซาลิไซลิก และสคอพอลิดินในใบยางพาราที่เวลาต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการได้รับเชื้อ *P. palmivora* (ก) การแสดงออกของยีน *PR-1* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR (ข) กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลิกลานินแอมโมเนียไลเอส (ค) ปริมาณของกรดซาลิไซลิก และ (ง) ปริมาณของสคอพอลิดินในใบยางพาราที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ *P. palmivora*

## วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการวิจัยเห็นได้ว่ายางพารามีการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ปริมาณของ SA และ Scp มีค่าสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ซึ่งมีค่าแตกต่างจากใบยางพาราที่ก่อนได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยการแสดงออกของยีน *PR-1* กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ปริมาณของ SA และ Scp เพิ่มขึ้นสูงสุดคิดเป็น 3.86, 1.78, 23.53 และ 2.71 เท่า เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนได้รับเชื้อ แสดงให้เห็นว่า เมื่อยางพาราถูกเชื้อ *P. palmivora* เข้าทำลายระบบการป้องกันตนเองของยางพารา จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ PAL และ SA

ก่อนแล้วจึงมีผลให้เกิดการสังเคราะห์ Scp และ โปรตีน PR-1 (ผ่านการแสดงออกของยีน *PR-1*) เพื่อส่งผลให้ใบยางพารามีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรครดดังกล่าว

จากการทบทวนรายงานวิจัยที่ผ่านมารวมกับผลการทดลองที่ได้สามารถสร้างความสัมพันธ์ของยีน *PR-1* เอนไซม์ PAL ปริมาณของ SA และ Scp ได้ดังนี้ เมื่อถูกเชื้อ *P. palmivora* บุกรุกยางพาราสร้างระบบการป้องกันตนเองขึ้นบริเวณเซลล์ที่ถูกเชื้อเข้าทำลายโดย phenylalanine ถูกเปลี่ยนไปเป็น cinnamic acid ด้วยเอนไซม์ PAL ใน phenylpropanoid pathway ซึ่งเป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหลายชนิดในพืชจากนั้น cinnamic acid ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอื่นๆ หลายชนิด ในที่นี้ได้แก่ benzoic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ SA โดยเอนไซม์ benzoic acid-2-hydroxylase (Shah, 2003) จากนั้น SA ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในเซลล์พืชจะส่งสัญญาณผ่านโปรตีน NPR1 ไปยังยีน *PR-1* ให้มีการแสดงออกเพื่อสร้างโปรตีน PR-1 (Pieterse and Van Loon, 2004) จากรายงานที่ผ่านมา PR-1 เป็นโปรตีนชนิดปล่อยออกนอกเซลล์ (Rivière *et al.*, 2008) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น *P. nicotianae*, *Ralstonia solanacearum* และ *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* ในใบยาสูบ (Sarowar *et al.*, 2005; Zhijian *et al.*, 2011) นอกจากนี้ Khunjan *et al.* (2016) ได้นำยีน *PR-1* จากยางพารา (*HbPR-1*) ไปผลิต recombinant protein โดยใช้ระบบ *Agrobacterium*-mediated transient gene expression ใน *Nicotiana benthamiana* พบว่าโปรตีน HbPR-1 สามารถยับยั้งการออกของซุโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* PP3-3 ที่แยกได้จากต้นมะละกอที่เกิดโรค และจาก

รายงานวิจัยดังกล่าวยังแสดงให้เห็นบทบาทของยีน *PR-1* ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* PP3-3 ต่อ *N. benthamiana* โดยใบยาสูบส่วนที่ได้รับการฉีด (infiltrated) ด้วย *agrobacterium* carrying *HbPR-1* gene เกิด necrosis น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบใบส่วนที่ไม่ได้รับยีนดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าโปรตีน PR-1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้โดยตรง จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเองต่อเชื้อที่เข้าทำลาย cinnamic acid นอกจากใช้ในการสังเคราะห์ SA แล้วยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ feruloyl CoA ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น Scp (Vogt, 2010) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า Scp มีบทบาทหลายชนิดในพืชได้แก่ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้โดยตรง โดย Scp สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Breton *et al.*, 1997), *P. palmivora*, *P. botryose* และ *Corynespora cassicola* (Churngchow and Rattarasarn, 2001) นอกจากนี้ Scp ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการกำจัดพิษของ reactive oxygen species ได้ด้วย (Chong *et al.*, 2002)

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า เมื่อยางพาราได้รับเชื้อ *P. palmivora* จะมีการสร้างโมเลกุลส่งสัญญาณ SA ขึ้นมาอย่างรวดเร็วโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ PAL เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และปริมาณของ SA เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง แล้วลดลงที่ 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงการสังเคราะห์สารทั้งสองอย่างต่อเนื่องเพื่อกระตุ้นให้มีการป้องกันทั้งเซลล์ที่ถูกเชื้อรุกราน และเซลล์ข้างเคียงที่ยังไม่ถูกเข้าทำลายขณะเดียวกัน Scp จะถูกสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อเอนไซม์ PAL ทำให้เกิดสาร

ตั้งต้นในการสังเคราะห์ Scp ต่อมา SA ที่เพิ่มขึ้นจะส่งสัญญาณให้ยีน *PR-1* มีการแสดงออกสูงขึ้นเพื่อสร้างโปรตีน *PR-1* แสดงให้เห็นว่าทั้งยีน *PR-1* เอนไซม์ PAL โมเลกุลส่งสัญญาณ SA และ phytoalexin Scp มีบทบาทสำคัญในการสร้างระบบป้องกันตนเองของยางพาราเพื่อยับยั้งและป้องกันการเข้าทำลายหรือการลามของเชื้อก่อโรค *P. palmivora*

### สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *P. palmivora* มีผลชักนำให้ยางพารามีการสร้างเอนไซม์ PAL เพื่อใช้ในการสังเคราะห์โมเลกุลส่งสัญญาณ SA และ antimicrobial Scp เพิ่มขึ้น จากนั้น SA จะกระตุ้นการสร้าง mRNA ของยีน *PR-1* เพื่อเพิ่มปริมาณของโปรตีน *PR-1* ทั้ง Scp และโปรตีน *PR-1* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *P. palmivora* จึงส่งผลให้ความรุนแรงของโรคลดลง และเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ SA มีความชัดเจนมาก จึงอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้สถานะการติดเชื้อได้

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนโครงการความเป็นเลิศภาควิชาชีพเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกภายใต้โครงการพัฒนาอาจารย์และบุคลากรสำหรับสถาบันอุดมศึกษาในเขตพัฒนาเฉพาะกิจจังหวัดชายแดนภาคใต้ ประจำปี 2553 ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิธานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ. 2553. ยุทธศาสตร์พัฒนายางพารา พ.ศ. 2552-2556. แผนยุทธศาสตร์. แหล่งที่มา: <http://thailandtireacademy.com/index.php/plan.com>, 25 เมษายน 2559.
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2554. โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อราไฟทอปโทรา. ศัตรูของยางพาราและการป้องกัน. แหล่งที่มา: <http://www.rubberthai.com/information/suggestion/5.htm>, 25 เมษายน 2559.
- Adie, B.A.T., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A. and Salano, R. 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 19: 1665-1681.
- Bourgau, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellerand, S. and Matern, U. 2006. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unraveled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews** 5: 293-308.
- Breton, F., Sanier, C. and D'Auzac, J. 1997. Scopletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassicola*. **Journal of Plant Physiology** 151: 595-602.
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Belfa, R., Fritigand, B. and Saindrenan, P. 2002. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin-glucoside accumulation, enhances oxidative stress, weakens virus resistance. **Plant Cell** 14: 1093-1107.

- Chinnapun, D. and Churngchow, N. 2008. Induction of peroxidase, scopoletin, phenolic compounds and resistance in *Hevea brasiliensis* by elicitor and a novel protein elicitor purified from *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 72: 179-187.
- Chinnapun, D., Tian, M., Brad, D. and Churngchow, N. 2009. Inhibition of a *Hevea brasiliensis* protease by a Kazal-like serine protease inhibitor from *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 74: 27-33.
- Churngchow, N. and Rattanasarn, M. 2001. Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. **Journal of Plant Physiology** 158: 875-882.
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. and Brasier, C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genetics and Biology** 30: 17-32.
- Darvill, G.A. and Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology** 35: 243-275.
- Flors, V., Ton, J., Jakab, G. and Mauch-Mani, B. 2005. Abscisic acid and callose: team players in defense against pathogens?. **Journal Phytopathology** 153: 377-383.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review Phytopathology** 43: 205-227.
- Hong, J.K., Lee, S.C. and Hwang, B.K. 2005. Activation of pepper basic *PR-1* gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. **Gene** 356: 169-180.
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomarasca, S., Ludwig, N., Gargano, M. and Faoro, F. 2009. Chitosan anti transpirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany** 66: 493-500.
- Khunjan, U., Ekchaweng, K., Panrat, T., Tian, M. and Churngchow, N. 2016. Molecular Cloning of *HbPR-1* Gene from Rubber Tree, Expression of *HbPR-1* Gene in *Nicotiana benthamiana* and Its Inhibition of *Phytophthora palmivora*. **Public Library of Science One** 11(6): 1-20.
- Kim, Y.J. and Hwang, B.K. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. **Physiologia Plantarum** 108: 51-60.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y. and Luo, Y. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology** 35: 263-269.
- Matsumoto, S., Mizutani, M., Sakata, K. and Shimizu, B.I. 2012. Molecular cloning and functional analysis of the *ortho*-hydroxylases of *p*-coumaroyl coenzyme feruloyl coenzyme a involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. **Phytochemistry** 74: 49-57.

- Mitsuhashi, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y. and Ohashi, Y. 2008. Characteristic expression of twelve rice *PR-1* family genes in response to pathogen infection, wounding and defense-related signal compounds (121/180). **Molecular Genetic Genomics** 279: 415-427.
- Pieterse, C.M.J. and Van Loon, L.C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology** 7: 456-464.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Steven, C.V., Smaghe, G.S. and Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **American Chemistry Society** 4(6): 1457-1465.
- Rivière, M.P., Marais, A., Ponchet, M., Willats, W. and Galiana, E. 2008. Silencing of acidic pathogenesis-related *PR-1* genes increases extracellular  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanase activity at the onset of tobacco defense reactions. **Journal of Experimental Botany** 4: 1-15.
- Rodríguez, A.T., Ramírez, M.A., Cárdenas, R.M., Hernández, A.N., Velázquez, M.G. and Bautista, S. 2007. Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating with chitosan and hydrolyzed chitosan. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 89: 206-215.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K., Islam, R. and Shin, J.S. 2005. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. **Plant Cell Reports** 24: 216-224.
- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 365-371.
- Rozen, S. and Skatesky, H. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers, pp. 365-386. In Misener, S. and Krawetz, S., eds. **Bioinformatics Methods and Protocols**. Humana Press, New Jersey.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant** 3(1): 2-20.
- Vorwerk, S., Shauna, S. and Somerville, C. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science** 9(4): 203-209.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S. and Nakashita, H. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 20: 1678-1692.
- Zhijian, T.L., Sadanand, A.D. and Gray, D.J. 2011. *PR-1* gene family of grapevine: a uniquely duplicated *PR-1* gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. **Plant Cell Reports** 30: 1-11.
- Zucker, M. 1968. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase-inactivating system in potato tuber disks. **Plant Physiology** 43: 365-374.