



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการคุณสมบัติและการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ระหว่าง  
การสุกของผลทุเรียน  
Characterization and expression of cell wall hydrolase genes  
during fruit ripening of durian fruit

ดร. ยศพล ผลาผล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256108A1080002

สัญญาเลขที่ 38/2559

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการคุณสมบัติและการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ระหว่าง

การสุกของผลทุเรียน

Characterization and expression of cell wall hydrolase genes

during fruit ripening of durian fruit

ดร. ยศพล ผลาผล

คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

กันยายน 2561

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 38/2559

### Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 38/2559).

### บทคัดย่อ

การกระตุ้นและชะลอการสุกของทุเรียนพันธุ์หมอนทองโดยการไม่ใช้และใช้เอทิลพอนความเข้มข้น 48% ป้ายที่ขั้วผล และการรวมผลทุเรียนด้วย 1-MCP (1-methylcyclopropene) ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °C ทำการบันทึกความแข็งของเนื้อ อัตราการผลิตเอทิลิน การแตกของผล ทำการจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของยีน cell wall hydrolases ผลการทดลองพบว่า ผลทุเรียนของชุดควบคุมมีความแน่นเนื้อของผลทุเรียนลดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 5 วัน การลดลงของความแน่นเนื้อเกิดขึ้นได้โดยการให้เอทิลิน ในขณะที่สารยับยั้งการทำงานของเอทิลิน 1-MCP ชะลอการอ่อนนุ่มของเนื้อ การโคลนยีน expansin ในเนื้อผลทุเรียนสามารถโคลนยีน alpha expansin ได้ 3 ยีน ได้แก่ *DzEXP1*, *DzEXP2* และ *DzEXP3* การแสดงออกของยีน *DzEXP1* และ *DzEXP2* เพิ่มสูงขึ้นชัดเจนระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อผล ผลการให้เอทิลินและสารยับยั้งการทำงานของ 1-MCP แสดงให้เห็นว่า *DzEXP1* และ *DzEXP2* เกี่ยวกับการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียน ในการจำแนกยีน cell wall-degrading enzymes พบว่า สามารถโคลนยีนได้ 5 ยีน ได้แก่ *DzPME* (pectin methylesterase), *DzPL* (pectate lyase), *DzPG* (polygalacturonase), *DzGAL* ( $\beta$ -galactosidase) และ *DzEG* (endo- $\beta$ -1,4-glucanase) ในเนื้อผล ระดับการแสดงออกของยีน *DzPG* ในเนื้อผลเพิ่มสูงขึ้นและการให้เอทิลพอนชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้น การใช้สาร 1-MCP สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DzPG* อย่างไรก็ตามลักษณะการแสดงออกของยีน *DzPL* เหมือนกับการแสดงออกของ *DzPG* การแสดงออกของยีน *DzPG* สอดคล้องกับการลดลงของความแน่นเนื้อเนื้อผลทุเรียนอย่างเด่นชัด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน *DzPG* มีบทบาทสำคัญในการอ่อนนุ่มของเนื้อผลทุเรียน

## Abstract

Stimulation and delay of 'Mon Thong' durian (*Durio zibethinus* Murray) ripening was carried out using ethephon and 1-MCP (1-methylecyclopropene). Solution of 48% ethephon was applied to the cut surface of durian fruit while 1-MCP was applied as fumigation to durian fruit in the closed container after harvest, and they were kept at 25 °C after treatments. Changes in firmness, ethylene production and dehiscence of non-treated and treated fruit were monitored. Expansin and cell wall hydrolase genes were also characterized. In control fruit, Pulp firmness sharply decreased within five days and fruit dehiscence of durian increased rapidly a week after harvest. Changes in pulp firmness and fruit dehiscence of durian were hastened by ethylene treatment, whereas 1-MCP application retained pulp firmness and inhibited fruit dehiscence. Three genes encoding alpha expansins (*DzEXP1*, *DzEXP2* and *DzEXP3*) were isolated from pulp during ripening. *DzEXP1* and *DzEXP2* mRNA accumulated abundantly in the pulp during ripening, while the expression of *DzEXP3* mRNA slightly increased in the pulp. Results of ethylene and 1-MCP treatment indicated that *DzEXP1* and *DzEXP2* involved in the pulp softening during durian ripening. Regarding cell wall-degrading enzymes genes, five genes encoding cell wall hydrolase called *DzPME* (pectin methylesterase, *DzPL* (pectate lyase, *DzPG* (polygalacturonase), *DzGAL* ( $\beta$ -galactosidase) and *DzEG* (endo- $\beta$ -1,4- glucanase) were isolated. *DzPG* mRNA accumulated abundantly in the pulp and up-regulated by ethephon. 1-MCP delayed accumulation of *DzPG* mRNA. However, expression pattern of *DzPL* was similar to *DzPG*. The expression of *DzPG* was well correlated with the decrease of pulp firmness throughout the study period. The result showed that *DzPG* plays an important role in pulp softening.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฅ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฎ
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	2
วิธีดำเนินการวิจัย	11
ผลการทดลอง	17
วิจารณ์	39
สรุป	42
รายงานสรุปการเงิน	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	51
ประวัติผู้เขียน	54

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาของ PCR	13
2	องค์ประกอบของการทำปฏิกิริยา 3' RACE	14
3	ปฏิกิริยาของการทำ PCR 3' RACE	14
4	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน expansin ที่พบในทุเรียน	21
ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	ไพรเมอร์ชนิดไม่เฉพาะเจาะจงที่ใช้ในการทำ PCR	52
ก2	ไพรเมอร์ชนิดเฉพาะเจาะจงที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	องค์ประกอบของผนังเซลล์	7
2	การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของทุเรียนพันธุ์หมอนที่ไม่ได้รับและได้รับเอทีลีน (เอทีฟอน) และได้รับ 1-MCP แล้ววางไว้ที่ 25 °C	17
3	การสังเคราะห์เอทีลีนของทุเรียนพันธุ์หมอนที่ไม่ได้รับและได้รับเอทีลีน (เอทีฟอน) และได้รับสาร 1-MCP แล้ววางไว้ที่ 25°C	18
4	การแตกของผลทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ไม่ได้รับและได้รับเอทีลีน (เอทีฟอน) และที่ได้รับสาร 1-MCP แล้ววางไว้ที่ 25 °C	19
5	แถบ DNA และ RNA 2 subunit ประกอบด้วย 18sRNA และ 28sRNA ใน 1% agarose gel electrophoresis	20
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzEXPs กับ expansin ของพืชชนิดต่างๆ โดยเครื่องหมาย “+” แสดง Trp residues และสัญลักษณ์ “*” แสดง HFD motif	22
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzPME กับ PME ของพืชชนิดต่างๆ โดยสัญลักษณ์ “*” แสดง catalytic residues Asp (D)	23
8	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzPL กับ PL ของพืชชนิดต่างๆ โดยสัญลักษณ์ “+” แสดง catalytic residues Asp (D) และบริเวณที่ขีดเส้นกำกับ แสดง conserved motif domain	25
9	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzPG กับ PG ของพืชชนิดต่างๆ โดยบริเวณที่ขีดเส้นกำกับแสดง putative conserved polygalacturonase active site	27
10	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzGAL กับ GAL ของพืชชนิดต่างๆ โดยบริเวณที่ขีดเส้นกำกับแสดง putative active site ของ glycoside hydrolase family 35 และ galactose binding lectin domain บริเวณ N-terminal	29
11	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzEG กับ EGase ของพืชชนิดต่างๆ โดยบริเวณที่ขีดเส้นกำกับแสดง putative glycosyl hydrolase active sites และจุดที่มีเครื่องหมาย ‘#’ แสดง Cys residues	32



## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การแสดงออกของยีน <i>DzEXP1</i> (a), <i>DzEXP2</i> (b) และ <i>DzEXP3</i> (c) ในระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนที่ได้รับเอทิลีน สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยใช้ยีน <i>DzACT</i> เป็น internal control	35
13	การแสดงออกของยีน <i>DzPME</i> (a) <i>DzPL</i> (b) และ <i>DzPG</i> (c) ในระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนที่ได้รับเอทิลีน สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยใช้ยีน <i>DzACT</i> เป็น internal control	37
14	การแสดงออกของยีน <i>DzGAL</i> (a) และ <i>DzEG</i> (b) ในระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนที่ได้รับเอทิลีน สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยใช้ยีน <i>DzACT</i> เป็น internal control	38

## อักษรย่อและสัญลักษณ์

EXP	=	Expansin
PME	=	Pectin methylesterase
PL	=	Pectate lyase
PG	=	Polygalacturonase
GAL	=	$\beta$ -galactosidase
EG	=	endo- $\beta$ -1,4-glucanase, EGase
$\mu$ L	=	Microlitre

## บทนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murray) เป็นไม้ผลเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ในปี พ.ศ. 2559 มีปริมาณการส่งออก 402,660 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 17,469 ล้านบาท แหล่งผลิตที่สำคัญได้แก่ จันทบุรี ระยอง ตราด ชุมพร สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช โดยมีตลาดต่างประเทศที่สำคัญ ได้แก่ จีน ฮองกง อินโดนีเซีย ไต้หวัน สหรัฐอเมริกา (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) และพันธุ์การค้าที่มีการส่งออก ได้แก่ พันธุ์หมอนทอง ชะนี ก้านยาว และกระดุม

ทุเรียนจัดเป็นผลไม้ประเภท climacteric ภายหลังจากเก็บเกี่ยวผลทุเรียนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและองค์ประกอบเคมีอย่างรวดเร็ว เช่น การอ่อนนุ่มของเนื้อและการการแตกของผล ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับอายุการวางจำหน่ายและการบริโภค จากอดีตถึงปัจจุบันได้มีนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวเช่น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ การเก็บรักษาภายใต้บรรยากาศดัดแปลงและการใช้สารเคมี เช่น สาร 1-methylcyclopropene (1-MCP) รวมถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเคมีและด้านชีวเคมี พบว่า การอ่อนนุ่มของเนื้อเกิดจากการเปลี่ยนรูปของเพคตินจากรูปที่ไม่ละลายน้ำมาอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ ทำให้ผนังเซลล์แยกออกจากกัน เนื้อจึงอ่อนนุ่มลง โดยน่าจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ pectin methylesterase (PME) และ polygalacturonase (PG) (Ketsa, 1997; Ketsa and Daengkanit, 1999a; 1999b) แต่ในภายหลัง Imsabai *et. al.* (2003) พบว่า การอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนน่าจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ PG มากกว่า PME จากการศึกษาโดยใช้อุณหภูมิสูงกับผลทุเรียนซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PG ประมาณ 50% พบว่า การอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนไม่ได้ถูกชะลอหรือถูกยับยั้ง นอกจากนี้การศึกษาเพื่ออธิบายการแตกของผลทุเรียน โดยศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase (PG), pectin methylesterase (PME),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) และ endo-(1,4)  $\beta$ -glucanase (EGase) พบว่า เอนไซม์ EGase และ PG เพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกของการแตกของผลทุเรียน ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PME และ  $\beta$ -gal ไม่ได้สอดคล้องกับการแตกของผล แต่ยังมีบทบาทในขบวนการการแตกของผลทุเรียน (Khumpoon, 2007) จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบข้อมูลที่สำคัญบางส่วน แต่ไม่เพียงพอต่อการอธิบายกลไกการเสื่อมสภาพของผนังเซลล์อันนำมาสู่การเข้าใจกระบวนการอ่อนนุ่มของเนื้อและการแตกของผลทุเรียน เนื่องจากการศึกษาด้วยเทคนิคการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์สามารถศึกษาได้เพียงบางเอนไซม์ ปัจจุบันการศึกษาระดับชีวโมเลกุล (molecular biology) เจริญก้าวหน้าเป็นอย่างมาก สามารถนำมาใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก ปัจจุบันที่วิจัยสามารถโคลนและทราบลำดับ นิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องในขบวนการเสื่อมสภาพของผนังเซลล์ในผลทุเรียน ได้แก่ expasin, PG, PME,  $\beta$ -gal, EGase, pectate lyase (PL) และ xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolases (XTHs) ด้วยผลการทดลองในเบื้องต้น ที่วิจัยจึงมุ่งศึกษาและทดลองเพื่อให้ทราบถึงลักษณะและกลไกการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวในทุเรียน อันนำไปสู่การควบคุมและเพิ่มคุณภาพทุเรียนของประเทศไทยในอนาคต

## ตรวจเอกสาร

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นไม้ผลเขตร้อนในวงศ์ Bombacaceae (Nakasone and Paull, 1998) เป็นที่รู้จักกันในนาม “ราชาแห่งผลไม้” พบได้ในกลุ่มประเทศแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ketsa, 1997) โดยเฉพาะในประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย บรูไน ฟิลิปปินส์ (Nanthachai, 1994) กัมพูชา เวียดนาม พม่า อินเดีย ศรีลังกาและนิวกินี (Ketsa, 1997) สำหรับในประเทศไทยนั้นมีแหล่งปลูกทุเรียนที่สำคัญอยู่ทางภาคตะวันออกและภาคใต้ได้แก่ ระยอง จันทบุรี ตราด ชุมพร และ สุราษฎร์ธานี

### องค์ประกอบของผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของพืชประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 90-95% และโปรตีน 5% องค์ประกอบย่อยของคาร์โบไฮเดรตที่จำแนกตามการละลาย (จริงแท้, 2549; Fischer and Bennett, 1991) คือ

**1. เพคติน (pectin) 35%** เพคตินเป็นกลุ่มของ polymer ของทั้ง neutral sugar เช่น arabinan, galactan และ acidic sugar ได้แก่ rhamnogalacturonan ซึ่งเป็นโมเลกุลค่อนข้างซับซ้อน แกนหลักของโมเลกุลประกอบด้วยกรดของน้ำตาล ซึ่ง galacturonic acid จับกันอยู่ด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 และมีโมเลกุลของ rhamnose แทรกเป็นระยะ และเชื่อมโยงกับ neutral sugar อื่นๆ ด้วย covalent bond บนโมเลกุลของ galacturonic acid หมู่ของ carboxyl ที่ตำแหน่ง C-6 อาจมีหมู่ของ methyl มาเกาะ (esterified) หรือว่างอยู่ก็ได้ ซึ่งทำให้โมเลกุลของ pectin เชื่อมต่อกันได้โดยมี calcium ion เป็นตัวกลาง pectin มีสะสมอยู่มากในบริเวณ middle lamella ทำหน้าที่จับยึดเซลล์เข้าด้วยกัน

**2. เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 30%** เฮมิเซลลูโลสเป็นกลุ่ม polymer ของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งประกอบด้วย chain ของ neutral sugar มากกว่าหนึ่งชนิด ที่พบมากในพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ xyloglucan หมายถึง โซ่ของน้ำตาล glucose ยึดเกาะกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 และมีแขนงประกอบด้วยน้ำตาล xylose เป็นระยะๆ หรืออาจประกอบด้วยน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น galactose ซึ่ง hemicellulose ทำหน้าที่เชื่อมโยง microfibril ของ cellulose เข้าด้วยกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและเชื่อมโยงกับ pectin ด้วย มีสะสมอยู่บริเวณผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิ (primary cell wall)

**3. เซลลูโลส (cellulose) 30%** เป็น linear polymer ของน้ำตาล glucose ซึ่งแต่ละโมเลกุลยึดเกาะกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง  $\beta$ -1,4 จึงเรียกโมเลกุลของ cellulose ว่า  $\beta$ -1,4 glucan โมเลกุลของ cellulose จับเรียงตัวกันเป็นคู่และยึดเกาะกับคู่อื่นๆ ประมาณ 40 คู่ ด้วยพันธะไฮโดรเจน (H-bond) รวมเป็นเส้นใยเรียกว่า microfibril และให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ในเซลล์ชั้นปฐมภูมิ (primary cell wall)

### เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเซลล์

การเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ในผลไม้เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของผลไม้เป็นอย่างมาก เช่น การขยายขนาดของผล การอ่อนนุ่มของเนื้อ และการแตกของผลและเมล็ด การอ่อนนุ่มซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการสุกของผลไม้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูป การละลายขององค์ประกอบของผนังเซลล์ และการสูญเสียองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นจากเอนไซม์และปัจจัยที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Brummell and Harpster, 2001; Dumville and Fry, 2003; Brummell, 2006) การย่อยสลายของผนังเซลล์ที่สัมพันธ์กับการสุกของผล พบว่ามีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น pectin methylesterase (PME), endo-polygalacturonase และ exo-polygalacturonase (PG),  $\beta$ -galactosidase และ  $\beta$ -1,4-glucanase (van Doorn and Stead, 1997) โดยบทบาทของเอนไซม์ PME จะย่อยหมู่ methyl บน pectin polymer ออก จากนั้นเอนไซม์ PG ย่อยสลายโมเลกุลของ pectin โดยย่อยพันธะ  $\alpha$ -1,4 ทำให้โมเลกุลถูกย่อยออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ อย่างรวดเร็ว (Hadfield and Bennett, 1998) เอนไซม์  $\beta$ -galactosidase ทำหน้าที่ย่อย galactose ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโซ่ข้างหรือแขนงของโมเลกุล pectin ทำให้ pectin มีขนาดเล็กลง และละลายน้ำได้ ส่วนเอนไซม์  $\beta$ -1,4-glucanase จะย่อยพันธะ  $\beta$ -1,4-D-glucosyl bond ที่เกิดขึ้นทั้งในส่วน of xyloglucan และ glucan อื่นๆ ซึ่งพบในส่วน of hemicellulose และ cellulose (จริงแท้, 2549) จากกระบวนการย่อยสลายของผนังเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาพบว่า เอนไซม์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการย่อยสลายผนังเซลล์ การอธิบายกระบวนการสุกและการแตกของผลโดยอาศัยข้อมูลจากเอนไซม์อย่างเดียวยังมีข้อจำกัดในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ในปัจจุบันเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ถูกพัฒนาขึ้นทำให้สามารถหาข้อมูลระดับลึกถึงยีนที่ควบคุมเอนไซม์เอนไซม์นั้นๆ โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลนี้ทำให้ทราบลักษณะ หน้าทีของยีน การควบคุมการแสดงออกของยีนที่เป็นยีนที่ควบคุมการสุกและการแตกอย่างเฉพาะเจาะจง

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ถูกจำแนกในการสุกของผลไม้ ได้แก่ pectin esterase (PE), endo-polygalacturonase, exo-polygalacturonase, rhamnogalacturonidase,  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase, hemicellulases, and  $\beta$ -1,4-glucanase (van Doorn and Stead, 1997), glucanases, xyloglucan hydrolases (Hadfield and Bennett, 1998; Roberts *et al.*, 2000) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกันดังนี้

#### 1. $\beta$ -1,4-glucanase, cellulase หรือ EGase

กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,4-glucanase เกี่ยวข้องกับการหลวมของผนังเซลล์ (Sexton and Robert, 1982) และมีเพิ่มมากขึ้นระหว่างการร่วงของใบถั่ว (*Phaseolus vulgaris*) (Lewis and Varner, 1970; Tucker *et al.*, 1988) ใบของ *Sambucus nigra* (Taylor *et al.*, 1994) ใบและดอกพริก (Ferrarese *et al.*, 1995) และ ดอกส้ม (Burns, 2004) แต่บางรายงานกล่าวว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้นอย่างมากในระยะแรกก่อนการแยกตัวของเซลล์ และลดลงก่อนการร่วงจะเกิดขึ้นจริงในกรณีของชิ้นส่วนถั่ว (bean explant) การทดลองในผลสุกมะเขือเทศ พบว่าระหว่างการสุกของผลมีการแสดงออก

ของยีน *Cel1* และ *Cel2* แต่เมื่อทำ antisense RNA ให้กับผลมะเขือเทศพบว่าไม่สามารถยับยั้งหรือชะลอการอ่อนนุ่มในผลได้ แสดงว่ายีน *Cel1* และ *Cel2* ที่พบในดอกและผลเป็นคนละยีนกัน และแสดงออกในกระบวนการร่วงเท่านั้น (Brummell *et al.*, 1999a) เช่นเดียวกันการทำ antisense RNA ของยีน cellulase ในสตอร์เบอร์ไม่ส่งผลต่อการอ่อนนุ่มได้ (Palomer *et al.*, 2006)

## 2. Pectin methylesterase (PME)

Sexton and Roberts (1982) รายงานว่า PME เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่มีการศึกษาและคาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของผนังเซลล์ บทบาทของเอนไซม์ตัวนี้คือ ย่อยหมู่ methyl ออกจากโมเลกุลของกรด galacturonic ใน polymer ของ pectin ทำให้ PG เข้าทำงานย่อยสลาย pectin ได้ง่ายขึ้น (Fischer and Bennett, 1991) แต่การศึกษาต่อๆ มาพบกิจกรรมของเอนไซม์ PME ในผลส้ม และมีการโคลนยีน PME จำนวน 2 ยีน พบว่ายีนทั้งสองถูกควบคุมด้วยเอทิลีน โดยยีนตัวหนึ่งจะมีการแสดงออกมากระหว่างการร่วงของผล ในขณะที่อีกยีนหนึ่งมีการแสดงออกทั่วไปในทุกเนื้อเยื่อ (Narin *et al.*, 1998) ในมะเขือเทศ การยับยั้งการแสดงออกของยีน PME ไม่ส่งผลต่อการอ่อนนุ่ม (Tieman *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1993) แต่พบว่าการยับยั้งการทำงานของยีน *Pmeu1* ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของยีน PME1 ในมะเขือเทศ สามารถเพิ่มอัตราการอ่อนนุ่มในระหว่างการสุกของมะเขือเทศได้ (Phan *et al.*, 2007)

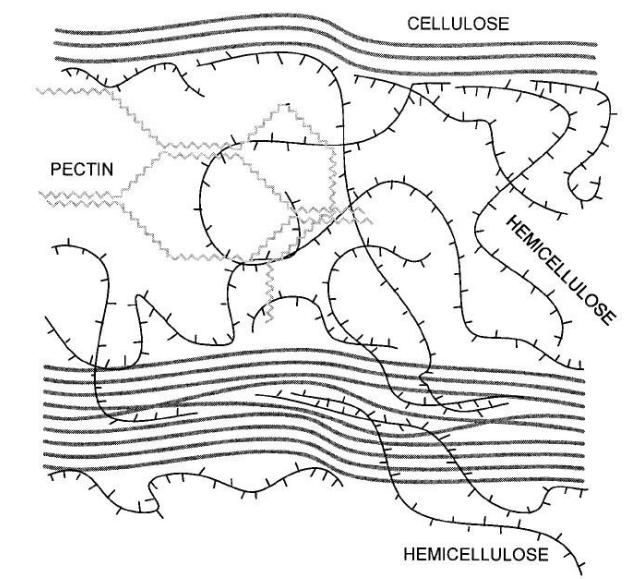
## 3. Polygalacturonase (PG)

กิจกรรมของ PG เป็นเอนไซม์หลักในการส่งเสริมการละลายของเพคติน ในการสุกของผลไม้ พบว่าการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ PG ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมสลายของผนังเซลล์ คุณสมบัติของเอนไซม์ PG สามารถจำแนกออกเป็น endo-PG และ exo-PG โดยพบว่า endo-PG มีบทบาทสำคัญในการอ่อนนุ่มของผลไม้ โดยในมะละกอ ท้อ แพร่ สตอร์เบอร์และมะเขือเทศพบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง endo และ exo-PG และในอะโวคาโด มะม่วง ราสเบอร์รี่ กีวี lemon และ muskmelon พบเพียงกิจกรรมของ end-PG ส่วนกิจกรรมของ exo-PG พบเพียงในผลพลับ (Lang and D'ornenburg, 2000) ในละมุด Kunyamee *et al.* (2010) การแสดงออกของยีนรวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ PG มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนนุ่มของละมุดและสามารถถูกกระตุ้นจากเอทิลีน ในทุเรียน Imsabai *et al.* (2003) พบว่า การอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนน่าจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ PG มากกว่า PME จากการศึกษาโดยใช้อุณหภูมิสูงกับผลทุเรียนซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PG ประมาณ 50% พบว่า การอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนไม่ได้ถูกชะลอหรือถูกยับยั้ง นอกจากนี้การศึกษาเพื่ออธิบายการแตกของผลทุเรียนพบว่า เอนไซม์ PG เพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการแตกของผล (Khurmpoon, 2008)

เอนไซม์อื่นๆ เช่น  $\beta$ -galactosidase, pectate lyases, Xyloglucan Endotransglycosylase (XET) พบว่ามีบทบาทในการอ่อนนุ่มในผลไม้หลายชนิด เช่น องุ่น (Ishimaru and Kobayashi, 2002) สตอร์เบอร์รี่ (Jiménez-Bermúdez *et al.*, 2002; Santiago-Domínech *et al.*, 2008) โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ

#### 4. Expansins

Expansins เป็นโปรตีนซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ การค้นพบและมีการจำแนกโปรตีนชนิดนี้ เริ่มต้นจากตรวจพบในหลอดทดลองว่ามันมีความสามารถเป็นเหตุหนึ่งของการเกิดการคลายและหลวมของผนังเซลล์ได้ (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994) เนื่องด้วยผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิ มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น polysaccharides (90%) ซึ่งในผนังเซลล์ของพืชส่วนใหญ่จะหมายถึง 3 องค์ประกอบหลัก คือ cellulose hemicellulose และ pectic polysaccharides (pectins) มาประสานกันเป็นโครงข่ายของผนังเซลล์ (ภาพที่ 1) โดย cellulose เป็นเส้นใยที่เกิดจาก glucose ต่อกันด้วยพันธะ  $\beta(1\rightarrow4)$  เรียกว่า linear  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucan แล้ว cellulose แต่ละเส้นก็จะมาจับประสานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน จนเกิดโครงสร้างที่เรียกว่าเส้น microfibril สำหรับ hemicellulose ในพืชชั้นสูงส่วนใหญ่จะเป็น xyloglucan มีแกนกลางของเส้นใยเป็น  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucan เช่นเดียวกับ cellulose แต่มีแขนงข้างเป็นน้ำตาล xylose และอาจมีโมเลกุลของ galactosyl หรือ fucosyl มาเกาะต่อ ซึ่งเส้นใยของ xyloglucan นี้จะเข้าไปจับกับเส้น microfibril ของ cellulose ด้วยพันธะไฮโดรเจน จึงเกิดโครงสร้างที่เรียกว่า cellulose-xyloglucan network ขึ้นในผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิ ส่วน pectins ส่วนใหญ่ที่พบในพืชมี 3 ชนิด คือ homogalacturonan rhamnogalacturonan-I และ rhamnogalacturonan-II อันส่วนเป็น polymer ที่มีกรด galacturonic acid เป็นส่วนประกอบ และเส้นใยเหล่านี้จะเกาะประสานกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (Reiter, 1998) โดย pectins จะรวมตัวกันเป็นเจลล้อมรอบ cellulose-xyloglucan network เอาไว้ (Cosgrove, 1997)



ภาพที่ 1 องค์ประกอบของผนัง เซลล์ (ที่มา: Cosgrove, 1997)

โปรตีน expansin ถูกควบคุมการสร้างโดยกลุ่มยีน (superfamily of genes) ประกอบด้วย 4 กลุ่มย่อย (subfamilies) คือ  $\alpha$ -expansin (EXPA),  $\beta$ -expansin (EXPB), expansin-like A (EXLA), and expansin-like B (EXLB) (Sampedro and Cosgrove, 2005) โดย expansin ทุกกลุ่มย่อย ประกอบด้วย 2 domain คือ domain I เป็นส่วนที่มีความเหมือนกับส่วนเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนในกลุ่ม glycoside hydrolase family 45 (GH45) และ domain II เป็นส่วนที่มีความเหมือนกับ group-2 grass pollen allergens ซึ่งเป็นส่วนที่ยังไม่ทราบบทบาทหน้าที่ที่ชัดเจน (Sampedro and Cosgrove, 2005) สำหรับ  $\alpha$ -expansin ถูกพบครั้งแรกใน hypocotyl ของแตงกวา ส่วน  $\beta$ -expansins ค้นพบในละอองเรณูของพืชในกลุ่มหญ้า ซึ่งเป็น expansin กลุ่มแรกที่ถูกค้นพบ (Kende *et al.*, 2004) จากผลการทดลองพบว่า โปรตีน  $\alpha$ -expansins และ  $\beta$ -expansins มีกิจกรรมที่สามารถทำให้เกิดการหลวมหรือการคลายตัวของผนังเซลล์ได้ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องถึงการขยายขนาดของเซลล์ ตลอดจนกระบวนการเจริญพัฒนาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ โดยกิจกรรมของโปรตีนในกลุ่ม  $\alpha$ -expansin และบางส่วนของกลุ่ม  $\beta$ -expansin สามารถเข้าไปเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ในสภาพกรด (acid growth) ซึ่งกระบวนการนี้เซลล์จะเกิดการขยายขนาดอย่างมากในสภาพที่มี pH ต่ำ (Sampedro and Cosgrove, 2005) โดยสภาพที่เป็นกรดในบริเวณผนังเซลล์นั้น เกิดจากการทำงานของเอนไซม์  $H^+$ -ATPases ที่ฝังตัวอยู่ที่ plasma membrane จะปลดปล่อย  $H^+$  เข้ามายังผนังเซลล์ (Cosgrove, 1998) งานทดลองที่วิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีน expansin พบว่าโปรตีนนี้มีกิจกรรมที่สูงที่ pH 4.5 (Cosgrove, 2000b) อย่างไรก็ตาม สำหรับโปรตีน expansin-like A และ expansin-like B ยังไม่ทราบบทบาทการทำงาน มีเพียงข้อมูลลำดับเบสของยีนเท่านั้น (Sampedro and Cosgrove, 2005)

สำหรับบทบาทของ expansin ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการสุกนั้น อาจเนื่องจากกลไกที่ expansin เข้าไปทำให้เกิดการแยกตัวของเส้นใยต่างๆ ที่ผนังเซลล์ จึงเป็นการเปิดช่องว่างให้เอนไซม์อื่นๆ สามารถย่อยองค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์แต่ละตัวได้ง่ายขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolase จึงนำไปสู่กระบวนการอ่อนนุ่มขึ้นในระหว่างการสุกได้ (Rose and Bennett, 1999) ตัวอย่างเช่น การศึกษาในผลแอปเปิ้ล พบว่า การแสดงออกของยีน *MdEXPA3* สูงในระยะผลบริบูรณ์แล้วค่อยลดลงในระยะผลสุก ซึ่งมีความสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน polygalacturonase (*pGDPG-1*) ยีน  $\beta$ -galactosidase (*pABG1*) และยีน xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases (*Md-XTH2*) ที่มีการแสดงออกของยีนทั้งสามเพิ่มมากในระยะผลบริบูรณ์และยังคงระดับสูงต่อไปในระยะผลสุก (Goulao *et al.*, 2008)

การแสดงออกของยีน *MdEXPA3* ในผลแอปเปิ้ล (*Malus x domestica*) พบว่าการแสดงออกเริ่มตั้งแต่ผลอ่อนระยะติดผล และยีนก็แสดงออกมากขึ้นจนสูงสุดในระยะผลบริบูรณ์ หลังจากนั้น การแสดงออกก็ลดลงในผลที่เริ่มอ่อนนุ่มและคงระดับต่ำจนถึงระยะผลสุกมากเกินไป (Goulao *et al.*, 2008) ยีน *EjEXPA1* และ *EjEXPA4* มีการแสดงออกที่สัมพันธ์กับการเกิดความอ่อนนุ่มของผล loquat ภายหลังจากการเก็บเกี่ยว (Yang *et al.*, 2008) สำหรับยีน expansin ในผลองุ่น (*Vitis labruscana* cv. Kyoho) พบการแสดงออกของยีน *Vlexp1* และ *Vlexp2* ในระหว่างที่ผลมีการขยายขนาด และการ



แสดงออกนั้นก็เพิ่มมากขึ้นเมื่อผลเข้าสู่กระบวนการสุก แต่การแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ไม่ได้จำเพาะแต่ ส่วนของผลเท่านั้น ยังพบการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นๆด้วย เช่น ใบ ดอก และ tendril ซึ่งต่างจากการ แสดงออกของยีน *Vlexp3* ที่มีความจำเพาะต่อส่วนของผลเท่านั้น และการแสดงออกนั้นก็สัมพันธ์กับ กระบวนการอ่อนนุ่มอย่างมาก เนื่องจากยีนเริ่มแสดงออกในระยะก่อน veraison แล้วเพิ่มสูงในระยะ veraison ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มเกิดการอ่อนนุ่มขึ้น (Ishimaru *et al.*, 2007)

ในผลมะเขือเทศ พบว่า ยีน *LeExp1* แสดงออกในระดับสูงและมีความเฉพาะเจาะจงในผลที่ กำลังสุก นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *LeExp1* ถูกควบคุมโดยเอทิลีน (Rose *et al.*, 1997) และพบว่า การให้ สาร 1-methylcyclopropene (1-MCP) ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลง (Hoeberichts *et al.*, 2002) ภายหลังจากได้มีการสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *LeExp1* พบว่าผลมะเขือเทศที่ได้มีค่าความแน่นเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งยังสามารถเพิ่มอายุการวางจำหน่าย ออกไปได้ 5-10 วัน ขึ้นอยู่กับภาชนะบรรจุ และยังเพิ่มความหนืดสำหรับกระบวนการแปรรูปมะเขือเทศ ด้วย (Brummell *et al.*, 2002) ส่วนยีน *LeExp2* แสดงออกในระหว่างที่มีการเจริญเติบโตของผลสูง ซึ่ง ยีน *LeExp2* นี้จะไม่พบการแสดงออกเลยในระยะการสุกของผล จึงบ่งชี้ได้ว่าการแสดงออกของยีนนี้มี ความจำเพาะกับการที่เกดผนังเซลล์คลายตัวในช่วงของกระบวนการเจริญเติบโต โดยไม่ได้เกี่ยวข้องกับ การแยกตัวของผนังเซลล์ในกระบวนการสุกเลย (Catala *et al.*, 2000) ยีน *Exp3* แสดงออกตลอด ระยะเวลาทั้งในกระบวนการเจริญเติบโต และการสุกของผล โดยแสดงออกมากที่สุดในช่วงที่ผลเกิดการ ขยายขนาดและเข้าสู่ระยะบริบูรณ์ หลังจากนั้นก็มีการแสดงออกลดลงในระยะการสุก ยีน *Exp4* แสดงออกเฉพาะช่วงที่มีการขยายขนาดของผลเท่านั้น ในขณะที่ยีน *Exp5* แสดงออกในช่วงที่ผลเกิดการ ขยายขนาด แล้วจึงแสดงออกมากที่สุดเมื่อผลเข้าสู่ระยะบริบูรณ์ แล้วลดลงในช่วงแรกของการสุก การแสดงออกของยีน *Exp3* *Exp4* และ *Exp5* นี้ นอกจากพบได้ในผลแล้ว ยังพบในเนื้อเยื่อของส่วนใบ ลำต้น และดอกด้วย นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของยีน *Exp6* and *Exp7* ในระหว่างผลมีการขยาย ขนาดและผลบริบูรณ์ แต่เป็นการแสดงออกในระดับที่ต่ำเมื่อเทียบกับยีน expansin อื่นๆ (Brummell *et al.*, 1999b and c)

การศึกษาในผลสตรอเบอร์รี่ ยีน expansin (*FaExp2*) ในผลสตรอเบอร์รี่มีความจำเพาะกับ เนื้อเยื่อที่ผลเช่นเดียวกับยีน *LeExp1* ที่พบในมะเขือเทศ (Rose *et al.*, 1997) เนื่องจากการแสดงออก ของยีน *FaExp2* นี้ ไม่พบเลยในส่วนของราก ลำต้น ใบ และกลีบเลี้ยงของดอก (Civello *et al.*, 1999) โดย *FaExp2* จะแสดงออกระดับต่ำในผลสีขาวแล้วจะมีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อผลเข้าสู่ระยะการสุก ถึงแม้การแสดงออกของ *FaExp2* จะมีความสัมพันธ์กับกระบวนการสุก แต่ยีนนี้การแสดงออกไม่ได้ ตอบสนองต่อเอทิลีน (ethylene insensitive) ไม่เหมือนดังเช่น *LeExp1* ในมะเขือเทศ ผลการศึกษานี้จึง แสดงให้เห็นว่า ต้องมีสัญญาณอื่นใดนอกเหนือจากเอทิลีนที่เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการสุกในผลไม้ ประเภท non-climacteric ดังเช่นที่เกิดขึ้นในผลสตรอเบอร์รี่นี้ (Civello *et al.*, 1999) การศึกษายีน *FaExp3* พบการแสดงออกในสองช่วง คือทั้งในกระบวนการเจริญเติบโตระยะผลสีเขียวและในผลสุก แต่ ยีน *FaExp4*, *FaExp6* และ *FaExp7* ทั้งสามยีนแสดงออกตลอดช่วงการพัฒนาของผล ตั้งแต่ผลขนาดเล็ก

จนกระทั่งผลสุก ในขณะที่การแสดงออกของยีน *FaExp5* มีความจำเพาะต่อกระบวนการสุกเท่านั้น (Harrison *et al.*, 2001) นอกจากนี้ ตามการศึกษาของ Dotto *et. al.* (2006) ที่ใช้ผลสตรอเบอร์รี่สามพันธุ์คือ Toyonaka (พันธุ์ที่อ่อนนุ่มมาก) Selva และ Camarosa (ทั้งสองพันธุ์มีค่าความแน่นเนื้อมากกว่า) การศึกษาการแสดงออกของยีน expansin ในทั้งสามพันธุ์ พบว่า *FaEXP1*, *FaEXP2* และ *FaEXP5* แสดงออกในพันธุ์อ่อนนุ่มมากกว่าในพันธุ์ที่มีความแน่นเนื้อมาก อย่างไรก็ตาม ได้เกิดความขัดแย้งขึ้น โดยปรากฏว่าการแสดงออกของยีน *FaEXP4* และ *FaEXP6* ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับการสูญเสียความแน่นเนื้อในผลสตรอเบอร์รี่ทั้งสามพันธุ์ นั่นคือ พันธุ์ที่มีความแน่นเนื้อมาก กลับพบการแสดงออกของยีนทั้งสองมากกว่าในพันธุ์อ่อนนุ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ยีน *FaEXP4* และ *FaEXP6* ไม่ได้เกี่ยวข้องกับกระบวนการอ่อนนุ่มของผลโดยตรง เพราะสามารถพบการแสดงออกของยีนทั้งสองในเนื้อเยื่ออื่นด้วยนอกเหนือจากส่วนของผล (Dotto *et. al.*, 2006)

การรวมผลกล้วยที่บริบูรณ์ด้วยก๊าซเอทิลีน สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *MaExp1* ได้ในระหว่างที่เกิดกระบวนการสุก แต่ถ้ามผลกล้วยด้วย 1-MCP ก่อนการรวมด้วยเอทิลีน จะสามารถยับยั้งการแสดงออกได้ (Trivedi and Nath, 2004) ในภายหลังได้มีการศึกษายีน expansin ในผลกล้วยเพิ่มอีกสี่ยีน ได้แก่ *MaEXPA2*, *MaEXPA3*, *MaEXPA4* และ *MaEXPA5* พบว่าทั้งสี่ยีนแสดงออกระหว่างกระบวนการสุกของผล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *MaEXPA2* มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อผลและการแสดงออกก็มีความสัมพันธ์กับกระบวนการสุกและการผลิตเอทิลีนเป็นอย่างมาก อีกทั้งนี้พบว่า *MaEXPA4* แสดงออกมากในระยะกระบวนการเจริญเติบโตของผลด้วย อย่างไรก็ตาม พบว่ายีน *MaEXPA3* และ *MaEXPA5* ต่างก็มีการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นๆด้วยนอกเหนือจากส่วนของผล (Asha *et al.*, 2007) และนอกจากนี้ได้มีการศึกษาที่ยืนยันบทบาทของเอทิลีนต่อการแสดงออกของยีน *MaExp1* และ *MaExp2* ในระหว่างกระบวนการสุกของผลกล้วย โดยกล้วยที่รมด้วย propylene (สารอนุพันธ์ของเอทิลีน) 1000  $\mu\text{L}^{-1}$  ก่อนเก็บรักษาที่ 7 °C พบว่าสามารถลดการเกิดอาการ chilling injury ได้ ซึ่งในระหว่างที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่ำ ยีนทั้งสองไม่มีการแสดงออกเลย ต่อเมื่อนำกล้วยออกมาจาก 7 °C แล้วทำการรมด้วยโปรไฟลีนอีกครั้ง แล้ววางไว้ที่ 22 °C ผลกล้วยก็เกิดการสุก และมีการแสดงออกของยีน *MaExp1* และ *MaExp2* (Wang *et. al.*, 2006)

รูปแบบการแสดงออกของยีน expansin ในกล้วยนี้มีรูปแบบเดียวกันกับยีน *MiExpA1* ในผลมะม่วง ซึ่งการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับการอ่อนนุ่มของผล และถูกกระตุ้นโดยการรวมด้วยเอทิลีน ในขณะเดียวกันหากรวมผลมะม่วงด้วย 1-MCP จะสามารถยับยั้งได้ทั้งกระบวนการสุกการอ่อนนุ่มของผล และยับยั้งการแสดงออกของยีน *MiExpA1* ได้ทั้งในระดับของ mRNA และระดับโปรตีน ดังนั้นจึงบ่งชี้ว่าการแสดงออกของยีน *MiExpA1* ในผลมะม่วงขึ้นอยู่กับเอทิลีน (Sane *et al.*, 2005) ทั้งนี้รูปแบบดังกล่าวสอดคล้องกับยีน *Ad-EXP1* และ *Ad-EXP2* ในผล kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Bruno) ซึ่งทั้งสองยีนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสุก และสามารถกระตุ้นการแสดงออกได้ด้วยเอทิลีนเช่นกัน (Yang *et. al.*, 2007)

นอกจากนี้ในผลละมุด Kunyamee *et. al.* (2008) พบว่า ยีน *MzEXP1* มีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาของผล และยีน *MzEXP2* เกี่ยวข้องกับการสุกของผลในระยะแรกและถูกยับยั้งเมื่อได้รับเอทิลีน

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของเอทิลีนและสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) ที่มีผลต่อกระบวนการสุก
2. เพื่อจำแนกและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน cell wall hydrolase ในผลทุเรียน
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ในระหว่างการสุกของผลทุเรียน

### ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

ทำการศึกษาผลของเอทิลีนและสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) ที่มีผลต่อกระบวนการสุกของผลทุเรียน ศึกษาคุณสมบัติและการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ได้แก่ ยีน expansin, PG, PME,  $\beta$ -gal, EGase, pectate lyase (PL) และ xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) ระหว่างการสุกของผลทุเรียนพันธุ์หมอนทอง

### ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบผลของเอทิลีนและสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) ที่มีผลต่อกระบวนการสุกของผลทุเรียน
2. ทำให้ทราบคุณสมบัติและการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ในระหว่างการสุกของผลทุเรียน
3. ทำให้สามารถควบคุมการอ่อนนุ่มของเนื้อผลทุเรียนและการแตกของผลทุเรียนระหว่างการสุกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## วิธีการดำเนินการวิจัย

ทุเรียนที่ใช้ในทดลองคือ ทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ซึ่งเป็นทุเรียนที่ปลูกเป็นการค้าที่จังหวัดจันทบุรี โดยสุ่มและทำเครื่องหมายผลทุเรียนที่มีคอกบานใกล้เคียงกัน เพื่อใช้ในการทดลองต่างๆ ดังต่อไปนี้

### การทดลองที่ 1 ผลเอทิลีนและสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) ที่มีผลต่อกระบวนการสุกของผลทุเรียน

ภายหลังครบกำหนดที่ผลทุเรียนมีอายุประมาณ 106 วันหลังดอกบาน ทำการเก็บเกี่ยวเพื่อนำผลทุเรียนทั้งหมดมาทำการทดลองประกอบด้วย 3 ทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ 1. ผลทุเรียนชุดควบคุม

ทรีตเมนต์ 2. ผลทุเรียนที่ได้รับเอทิลีนความเข้มข้น 48% โดยป้ายเอทิลีนบริเวณขั้วของผลทุเรียน

ทรีตเมนต์ 3. ผลทุเรียนที่ได้รับ 1-MCP ความเข้มข้น 1 ppm โดยรมด้วย 1-MCP เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ทำการบันทึกข้อมูลภายหลังการเก็บเกี่ยวและหลังการทดลอง นำผลทุเรียนทั้ง 3 กรรมวิธี วิธีการละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ผล ทำการสุ่มเก็บข้อมูลทุกวัน จนกว่าผลทุเรียนแตก ทำการบันทึกผลต่างๆ ได้แก่

#### 1. ความแน่นเนื้อ

วัดด้วยเครื่อง Fruit firmness tester (Effegi, Italy) ใช้หัวกดทรงกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรสำหรับผลดิบ และ 1.1 เซนติเมตรสำหรับผลสุก กดลงบนเนื้อผล (pulp) 0.5 เซนติเมตร แปลงค่าแรงกดที่ได้จากกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นนิวตันต่อตารางเซนติเมตร โดยการคูณด้วย 9.807

#### 2. การผลิตเอทิลีน

ทำการวัดปริมาณการผลิตเอทิลีนด้วยเครื่อง Gas chromatograph (GC) โดยนำผลทุเรียนจาก 3 กรรมวิธี บรรจุในโหลพลาสติกขนาด 18.5 ลิตร จัดสิ่งทดลองวิธีการละ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ลูก แล้วปิดฝาเมื่อต้องการวัดอัตราการผลิตเอทิลีน ปิดฝานาน 30 นาทีหลังจากนั้นใช้เข็มฉีดยาแทงผ่านสายยางที่ปิดสนิท ก่อนแล้วดูดปั๊มเข้าออก 10-15 ครั้ง เก็บตัวอย่างของอากาศภายในโหลปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำก๊าซตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยเครื่อง gas chromatograph ของ Shimadzu รุ่น GC-8A (Shimadzu, Japan) ผ่าน column porapak Q 80/100 และ detector ชนิด flame ionization detector (FID) นำค่าที่ได้มาคำนวณเทียบกับน้ำหนักสดเป็นหน่วยนาโนลิตรต่อกิโลกรัมของทุเรียนต่อชั่วโมง ( $\text{nl C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) ทำการวัดปริมาณเอทิลีนทุกวัน หลังจากนั้นเก็บก๊าซต่อในวันที่ 5 7 9 12 และ 15 การดูอากาศสำหรับตรวจวัดเอทิลีน มีการเปิดฝาโหลพลาสติกเพื่อระบายอากาศทุกครั้ง

## การทดลองที่ 2 คุณสมบัติและการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ระหว่างการสุกของผลทุเรียน

### 1. การสกัด total RNA

ทำจากเนื้อและสาแหรกของผลทุเรียน โดยดัดแปลงวิธีของ Chang *et al.* (1993) สกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 100mM Tris-HCl pH 8, 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), 2% PVP (polyvinyl pyrrolidone) 25 mM EDTA pH 8, 2M NaCl และ 0.5 g/L spermidine นำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ผสมกับบัฟเฟอร์ และเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม SEVAG (chloroform: isoamyl alcohol (24:1)) ด้วยปริมาตรที่เท่ากับบัฟเฟอร์ แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่เติม SEVAG ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C อีกครั้ง แล้วดูดเอาส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม LiCl ความเข้มข้น 8 โมลาร์ 0.3 เท่า ของปริมาตรส่วนใสที่เก็บไว้ ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 4 °C ที่งาช้ำมคืน

จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้งเติมสารละลาย SSTE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 1M NaCl, 0.5% SDS 10mM Tris-HCl pH 8 และ 1mM EDTA pH 8) แล้วดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ เติม SEVAG ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 100% เอทานอล ผสมให้เข้ากันก่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอน RNA จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วเทเอทานอลทิ้ง ตั้งไว้ให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนโดยเติมน้ำ DEPC ตรวจสอบคุณภาพโดยทำ gel electrophoresis และตรวจสอบปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ RNA ที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสง A260/A280 มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

### 2. การออกแบบ degenerate primer ของยีน

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับของ amino acid sequence ของยีนต่างๆ ในพืชสกุลต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำข้อมูลมา alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>) วิเคราะห์หาส่วน amino acid sequences ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) 2 ช่วงเพื่อออกแบบ primer ขนาดความยาว 18-30 เบส (ตารางภาคผนวกที่ 1)

### 3. การเพิ่มปริมาณของยีนโดยวิธี RT-PCR ด้วย degenerate primer

ทำการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกด้วยชุดสำเร็จรูป Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, Germany) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตรโดยใช้ total RNA ที่สกัดได้ปริมาตร 2  $\mu$ g เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ Oligo dT<sub>18</sub> ความเข้มข้น 1  $\mu$ M, 1X buffer RT, dNTP ความเข้มข้น 0.5 mM,

เอนไซม์ Omicript RT 4 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยใช้ความร้อน 93 °C นาน 5 นาทีและวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ cDNA เส้นแรกที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25  $\mu$ L ใช้ cDNA 1  $\mu$ L, ไพรมเมอร์ที่ออกแบบไว้ ความเข้มข้น 2  $\mu$ M, dNTP ความเข้มข้น 0.2  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 2.5  $\mu$ M เอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.625 ยูนิต (QIAGEN, Germany) โดยมีปฏิกิริยาดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ปฏิกิริยาของ PCR

อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
94	3 min	1
94	30 s	
50-55	30 s	35
72	1 min	
72	10 min	1

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้ UV transilluminator และถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene Bio Imaging System) ทำการแยกชิ้น DNA ของยีนโดยตัดเจลตำแหน่งที่มีผลิตภัณฑ์ตามต้องการภายใต้แสงยูวี นำเจลที่ตัดไว้สกัด DNA ให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

หากพบปัญหาการเพิ่มปริมาณของยีน โดยวิธี RT-PCR ด้วย degenerate primer จึงใช้เทคนิค 3' RACE เพื่อโคลนยีนบางส่วน โดยนำ RNA มาทำการสังเคราะห์ cDNA ที่มีการต่อ adaptor ตามวิธีของ GeneRacer (Invitrogen, USA) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรมเมอร์ของ GeneRacer ร่วมกับ degenerate primer ทำการเตรียมปฏิกิริยาดังตารางที่ 2 และทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

GeneRacer 5' primer 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

GeneRacer 5' Nested primer 5'GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'

GeneRacer 5' primer 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'

GeneRacer 5' Nested primer 5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'

**ตารางที่ 2** องค์ประกอบของการทำปฏิกิริยา 3' RACE

สาร	ปริมาณ (□L)	ปริมาณ (□L)
GeneRacer 3' primer	3	3
Degenerate primer	10	
Specific primer		1
cDNA (GeneRacer)	1	1
10x PCR Buffer	5	5
10 mM dNTPs	1	1
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	1.5
Platinum Taq	0.5	0.5
Water	28	37

**ตารางที่ 3** ปฏิกิริยาของการทำ PCR 3' RACE

อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
94	3 min	1
94	30 s	5
72	1.5 min	
94	30 s	5
70	1.5 min	
94	30 s	
57, 61	30 s	32
72	1.5 min	
72	10 min	1

ภายหลังทราบบางส่วนของยีน ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง หลังจากนั้นเตรียมและทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค 3' RACE

#### 4. การโคลนยีน

นำ DNA ของยีนต่างๆ ที่สกัดได้จากเจลหรือจากปฏิกิริยามาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเพื่อเข้าไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย โดยทำการเชื่อมต่อ DNA ที่ได้จากการทำ PCR จากยีนต่างๆ เข้าสู่



เวกเตอร์สำเร็จรูป pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega, USA) ในปฏิกิริยา 10  $\mu$ L ประกอบด้วย 10X ligation buffer ปริมาตร 2  $\mu$ L pGEM<sup>®</sup>-T easy vector ปริมาตร 2  $\mu$ L DNA ที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 7  $\mu$ L เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2  $\mu$ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 16 ชั่วโมง

ทำการผสม ligation mixture ปริมาตร 10  $\mu$ L กับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 $\alpha$  ปริมาตร 100  $\mu$ L วางบนน้ำแข็งนาน 30 นาที ชักนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 1 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที เติมน้ำอาหารเหลว SOC แล้วนำไปต้มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียและนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB แข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g L<sup>-1</sup> และเติม X-gal (20 mg $\mu$ L<sup>-1</sup>) ปริมาตร 40  $\mu$ L บนผิวอาหารแข็ง เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีเดี่ยวสีขาวที่คาดว่าจะมี DNA สายผสม นำมาแยกเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวไว้เป็น master plate นำโคโลนีที่มีสีขาวจาก master plate เพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100  $\mu$ g L<sup>-1</sup> ปริมาตร 1 mL เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยชุดสำเร็จรูป QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

นำ DNA สายผสมที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียมาตรวจสอบว่ามี DNA ของยีนหรือไม่ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Fermentas, USA) ในปฏิกิริยา 20  $\mu$ L ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10X buffer (Fermentas, USA) ปริมาตร 2  $\mu$ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีนต่างๆ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้บริการจากบริษัทต่างประเทศ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม AlignX (Vector NTI v11.0; Invitrogen, USA) เปรียบเทียบ amino acid ของยีนนั้นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

#### 5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน quantitative RT-PCR

นำ RNA ที่สกัดจากเปลือกชั้นนอกจำนวน 2  $\mu$ g ในการทดลองต่างๆ ที่ผ่านการกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) แล้ว เจือจางด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) ปริมาตร 50 เท่า ทำการสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีของ SuperscriptIII kit (Invitrogen, USA) ทำการทดสอบคุณภาพของไพรเมอร์ด้วย plasmid DNA ของยีนแต่ละยีน ตรวจสอบผลด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ภายหลังจากทดสอบ

ไพรเมอร์และพบว่าเกิด PCR product เพียงหนึ่งแถบจึงสามารถทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR ได้ โดยตรวจสอบและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Light Cycler 480 system และใช้ชุดทดสอบ Light Cycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Germany) ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  ในปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA (50x) 3  $\mu\text{L}$  , ไพรเมอร์แต่ละชนิด (ตารางภาคผนวกที่ 1) ปริมาตร 1  $\mu\text{L}$  (2.5  $\mu\text{M}$ ) และ Master mix สำเร็จรูป 5  $\mu\text{L}$  ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 วินาที, 60 °C นาน 5 วินาที และ 72 °C นาน 10 วินาที จำนวนทั้งหมด 40 รอบ ทำการวิเคราะห์ melting peak และ dissociation curve เพื่อตรวจการเกิดการจับตัวกันระหว่างไพรเมอร์ ทำการคำนวณโดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *DuACT* เพื่อควบคุมประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาให้ได้เท่ากับ 1.893-1.999 และทำการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนทั้งหมดเปรียบเทียบกับระยะการพัฒนาระยะที่ 1 หรือวันที่ 0 หลังการทดลอง ตามสูตร

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{Ref}})^{C_{\text{P sample}}}}{(E_{\text{target}})^{C_{\text{P sample}}}} \div \frac{(E_{\text{Ref}})^{C_{\text{P calibrator}}}}{(E_{\text{target}})^{C_{\text{P calibrator}}}}$$

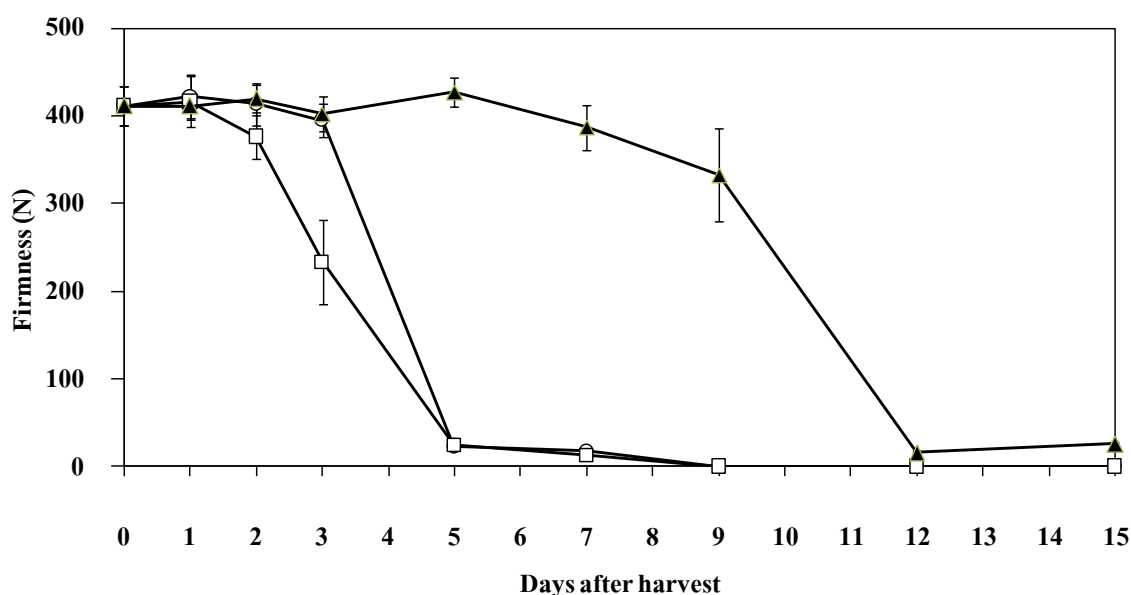
โดย  $E_{\text{ref}}$  และ  $E_{\text{target}}$  หมายถึง ประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับยีนอ้างอิง (ELF) และยีนเป้าหมาย นอกจากนี้  $C_{\text{P ref}}$  และ  $C_{\text{P target}}$  หมายถึง ค่าเฉลี่ยของ  $C_{\text{p}}$  สำหรับยีนอ้างอิง (ELF หรือ *Actin*) และยีนเป้าหมาย

## ผลการทดลอง

### 1. ผลของเอทิลีนและสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) ที่มีผลต่อกระบวนการสุกและการแตกของผลทุเรียน

#### 1. การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของเนื้อทุเรียน

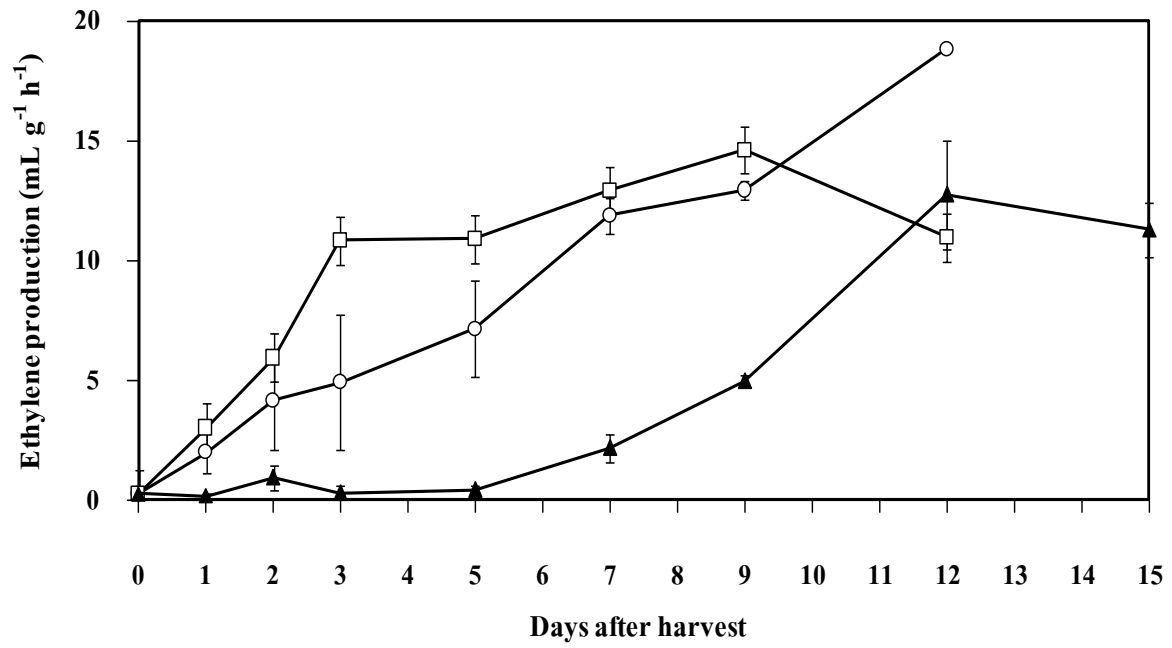
ความแน่นเนื้อของเนื้อทุเรียนที่ได้รับเอทิลีนลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ภายหลังจากเก็บเกี่ยว และลดลงอย่างมากในวันที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับทริทเมนต์ควบคุมที่ลดลงอย่างช้าๆ ส่วนเนื้อผลทุเรียนที่ได้รับ 1-MCP นั้น มีความแน่นเนื้อค่อนข้างคงที่ไปจนถึงวันที่ 9 ภายหลังจากเก็บเกี่ยว และลดลงอย่างรวดเร็วต่อเนื่องจนถึงวันที่ 12 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของทุเรียนพันธุ์หมอนที่ไม่ได้รับและได้รับเอทิลีน (เอทิลีน) และได้รับ 1-MCP แล้ววางไว้ที่ 25 °C (—○— control, —□— ethylene, —△— 1-MCP)

#### 2. การเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์เอทิลีนของทุเรียน

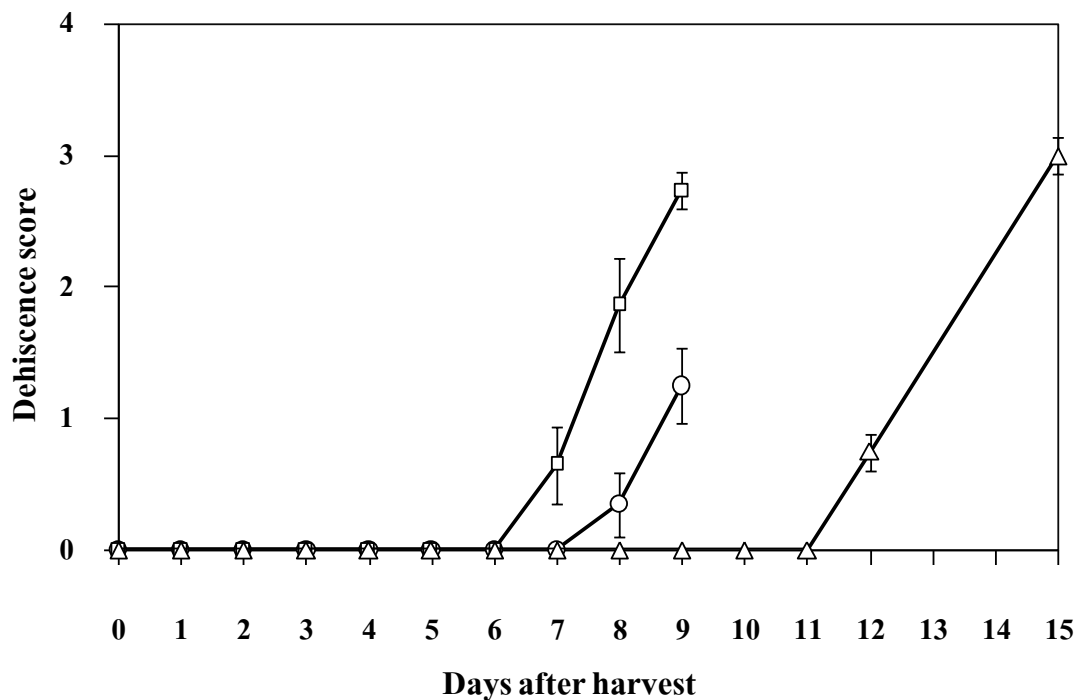
ทุเรียนมีการสังเคราะห์เอทิลีนสูงขึ้นหลังการป้ายเอทิลีน โดยการสังเคราะห์เอทิลีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและค่อยๆ ลดลง แต่ในเนื้อทุเรียนที่ได้รับ 1-MCP มีการสังเคราะห์ที่ต่ำ และค่อนข้างคงที่ในระยะ 5 วันภายหลังจากเก็บเกี่ยว จากนั้นเพิ่มสูงสุดในวันที่ 12 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์เอทิลีนของทุเรียนพันธุ์หมอนที่ไม่ได้รับและได้รับเอทิลีน (เอทีฟอน) และได้รับสาร 1-MCP แล้ววางไว้ที่ 25°C (—○— control, —□— ethylene, —△— 1-MCP)

### 3. การแตกของของทุเรียน (คะแนน)

ทุเรียนมีการแตกมากขึ้นหลังจากผลทุเรียนสุกเต็มที่แล้ว (over ripening) โดยทุเรียนที่ได้รับเอทิลฟอนแตกเร็วที่สุดในวันที่ 7 หลังเก็บเกี่ยว และแตกมากขึ้นเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่ในทุเรียนที่ได้รับ 1-MCP นั้นการแตกเริ่มขึ้นในวันที่ 12 ภายหลังจากการเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4)



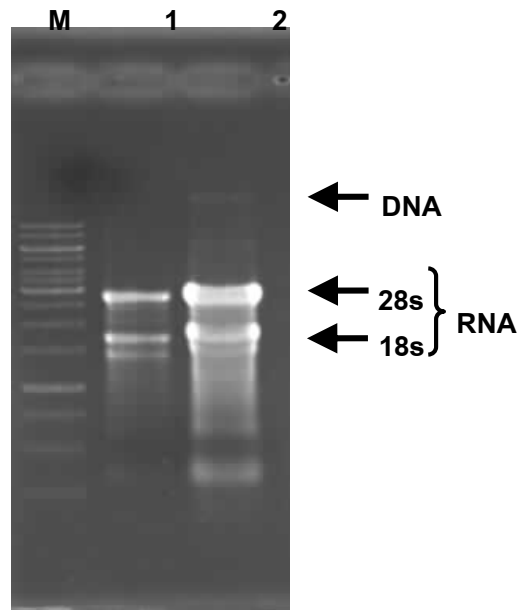
ภาพที่ 4 การแตกของผลทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ไม่ได้รับและได้รับเอทิลีน (เอทิลฟอน) และที่ได้รับสาร 1-MCP แล้ววางไว้ที่ 25 °C ( ○—control, □— ethylene, △— 1-MCP)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าทุเรียนมีอายุการเก็บรักษาสั้น โดยผลทุเรียนเกิดกระบวนการสุกอย่างรวดเร็วและเกิดผลแตก การป้ายเอทิลฟอน 48% ที่ซั้วผล พบว่าความแน่นเนื้อลดลง แต่การผลิตเอทิลีนและการแตกของผลเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน โดยทำการรม 1-MCP ความเข้มข้น 500 ppb ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่า 1-MCP สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ การผลิตเอทิลีน ลดการแตกของผล และชะลอการสุกของผลทุเรียนได้ 4 วันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

## 2. การสกัด RNA และจำแนกยีน expansins และ cell wall hydrolases ระหว่างการสุกและการแตกของผลทุเรียน

### 1. การสกัด RNA

ผลการสกัด RNA จากสาหร่ายและเนื้อของทุเรียนพันธุ์หมอนทอง โดยดัดแปลงวิธีของ Chang *et al.* (1993) ได้คุณภาพ RNA ที่ดี โดยมีแถบ RNA ที่ 28S และ 18S ชัดเจน (ภาพที่ 5) เหมาะสมสำหรับการนำไปทำการจำแนกยีนต่อไป



ภาพที่ 5 แถบ DNA และ RNA 2 subunit ประกอบด้วย 18sRNA และ 28sRNA ใน 1% agarose gel electrophoresis

ช่อง M: 1kb DNA ladder (Fermentas)

ช่อง 1 : แถบ RNA ที่สกัดจากเปลือกทุเรียน

ช่อง 2 : แถบ RNA ที่สกัดจากเนื้อทุเรียน

## 2. การจำแนกยีน

การทำ RT-PCR เพื่อทดสอบการเพิ่มปริมาณยีน พบขนาดแถบ DNA ที่สนใจและเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน expansins และ cell wall hydrolases ต่างๆ ได้ผลดังนี้

### 1) ยีน Expansin

การจำแนกยีนพบยีน expansin 3 ยีน ได้แก่ DzEXP1 มีความยาว 998 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 150 residue DzEXP2 มีความยาว 1004 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 174 residue และ DzEXP3 มีความยาว 734 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 149 residue โดยผลการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความเหมือนกับยีน expansin ที่พบในพืชต่างๆ รวมถึงผลไม้ 82-91% (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน DzEXPs พบว่าเป็น alpha expansin โดยมีส่วนประกอบสำคัญต่างๆ ที่พบได้แก่ tryptophan (W) 4 ตำแหน่ง และ HFD motif (ภาพที่ 6)

**ตารางที่ 4** การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน expansin ที่พบในทุเรียน

ชื่อ	ชนิดพืช	ความเหมือน(%)	รหัส.
DzEXP1	<i>Fragaria ananassa</i> (EXP4)	84	ABA62612
	<i>Dimocarpus longan</i> (EXP2)	83	ACA05165
	<i>Pyrus communis</i> (EXP5)	82	BAC67192
DzEXP2	<i>Dimocarpus longan</i> (EXP2)	91	ACA05165
	<i>Fragaria ananassa</i> (EXP4)	89	ABA62612
	<i>Pyrus communis</i> (EXP5)	88	BAC67192
DzEXP3	<i>Pyrus communis</i> (EXP3)	91	BAC67190
	<i>Citrus sinensis</i> (EXP2)	91	ACN87961
	<i>Annona cherimola</i> (EXP1)	88	ACK36942





## 2) ยีน pectin methylesterase (PME)

การจำแนกยีนพบยีน PME 1 ยีน คือ DzPME มีความยาว 1,019 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 270 residue โดยผลการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความเหมือนกับยีน PME ที่พบในพืชต่างๆ รวมถึงผลไม้ 68-94% นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน DzPME พบส่วนประกอบสำคัญต่างๆ ได้แก่ catalytic residues Asp (D) (ภาพที่ 7)

DzPME	(1)	-----
CsPME	(1)	-----MALRILITVSLVLFSLSHTSFG
GhPME5	(1)	-----MALARIQIIVALSLVFPVFLFPVTLG
MaPME	(1)	MITVPTLRRTSSSRSKLLLSCVAFSSLFLLLTLSNVSKPVPYHHRHLHVH
PcPME3	(1)	-----MASKFFHLVKVSSFLIIFHFSSRSLADVPL
DzPME	(1)	-----
CsPME	(23)	YSPEEVKSWCGKTPNQPCYFLTQKTDVT--SIKQDTDFYKISLQLALE
GhPME5	(26)	YRANDVRSWCRKTPNQPCYFLSHDPKKT--PIKDFQFQKISTHLALE
MaPME	(51)	SHLQVATXHC DGTLYFDLCASTLSTIPDLHKSILPEVICATINASEXAVI
PcPME3	(32)	NTPLPPEITICKSTPHFSYCTSVLPHNNE SVY-----DFGRFSVORALSSES
DzPME	(1)	-----
CsPME	(71)	RATTAQSRTYTLGSKCRNEREKAAWEDCRELYELTVLKLNQTS-----
GhPME5	(74)	RAARAESNTHSLGTKCRNEREKAAWSDCVNLYELTILRLNKIV-----
MaPME	(101)	KSAKNCKYLLHHHNYTLDTFQRYALTDCLDLFSQTDDELLDATSDL----
PcPME3	(77)	HKLLDLYEKYLQKGSSTLNPAIQALEDCQQLALNIDFISSSLETVNKAS
DzPME	(1)	-----
CsPME	(114)	NSSEGGCTKVDKOTWLS SALTNLETCRASLEDLGVP----EYVLPPLSNNV
GhPME5	(117)	DSGTNHNKDDAOTWLS TALTNLETCRTGFME LGVP----DYLLPMSNNV
MaPME	(147)	TANFGSHVDHVQTL LSAITNQYTCLDGFAYV GKDG--GYRSVIEQPLYHV
PcPME3	(127)	EVLPILDADDVQTL LSAITLNHQTCSDGIASLPSSAGSVLGDLSVPLSNN
DzPME	(1)	-----
CsPME	(160)	TKLISNALSINKVPEYNEPS-----YKDGFL
GhPME5	(163)	SQILISNTLAINKAPYKEPT-----YKDGFL
MaPME	(196)	SHLVSNLSLMMKKIQRQKXPXHP-----REALEGYGEVAEGFL
PcPME3	(177)	TKLYSTSLALFTKGWVPKDKNGVPKQPKRQFKFGKGRLLNLMSTHARAIY

ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzPME กับ PME ของพืชชนิดต่างๆ โดยสัญลักษณ์ “\*” แสดง catalytic residues Asp (D)



## 3) ยีน pectate lyase (PL)

การจำแนกยีนพบยีน PL 1 ยีน คือ DzPL มีความยาว 964 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 212 residue โดยผลการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความเหมือนกับยีน PL ที่พบในพืชต่างๆ รวมถึงผลไม้ 85-87% นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน DzPL พบส่วนประกอบสำคัญต่างๆ ได้แก่ conserved motif domain และ catalytic aspartate residue (D) (ภาพที่ 8)

DzPL	(1)	-----
DcPL	(1)	-----MSFITVLLLCFVVACTTTLVLSAPAIHPDPELVVNQVHR
MaPL	(1)	MPKMPRPSSGPSLLSPLLLIPLLSLLSPTLISRPIHLQDPELVVQEVQR
PmPL	(1)	---MARPSSGPSPLSLLSFL-I-FSLLTPTLIASRPI-QQNPELVVQDVQR
PpPL	(1)	---MARPSLGPSPLSLLSFL-I-FCLLTPTLIASRPI-QQNPELVVQDVQR
DzPL	(1)	-----
DcPL	(40)	AINE SVARRNLGYLSCGTGNPIDDCWRCDP DWE SNRQRLADCAIGFGKNA
MaPL	(51)	NI SDSVSRRLGYLSCGTGNPIDDCWRCDPNWEKNRQS LADCAIGFGKNA
PmPL	(46)	SINDSVSRRLGYLSCGTGNPIDDCWRCDPNWEQNRERLADCAIGFGKNA
PpPL	(46)	SINDSVSRRLGYLSCGTGNPIDDCWRCDPNWEQNRQRLADCAIGFGKNA
DzPL	(1)	-----
DcPL	(90)	IGGKNGRIYVVTDS SDNDPVT PKPGTLRHAVIQDEPLWIFQRDMVIRLK
MaPL	(101)	IGGRDGGKIYVVTDSGDDDPVNPKPGTLRHAVIQDEPLWIFQRDMTIQLK
PmPL	(96)	VGGRDGGKIYVVTDSGLSDDPVNPKPGTLRHAVIQDEPLWIFQRDMTIQLK
PpPL	(96)	IGGRDGGKIYVVTDSGDDNDPVNPKPGTLRHAVIQDEPLWIFQRDMTIQLK
DzPL	(1)	-----
DcPL	(140)	EELIMNSFKTIDGRGASVHISGGPCITIQYVTNIIIHGINVHDCKPGGNA
MaPL	(151)	EELIMNSFKTIDGRGASVHIAGGPCITIQFVTNIIIHGLHIHDCKQGGNA
PmPL	(146)	EELIMNSFKTIDGRGASVHIAGGPCITIQFVTNIIIHGLHIHDCKQGGNA
PpPL	(146)	EELIMNSFKTIDGRGASVHIAGGPCNHRPFVTNIIIHGLHIHDCKPGGNA
		+ + + +
DzPL	(1)	-----GHYGWRTLSDGDGVSIFGCSHVVDHCSLSNCRDGLVDALRGST
DcPL	(190)	MVRSSPRHYGWRTLSDGDGVSIFGASQVVDHVLSLNCADGLVDALMGST
MaPL	(201)	MVRSSPRHYGWRTLSDGDGVSIFGCSHVVDHCSLSNCKDGLVDALYGST
PmPL	(196)	MVRSSPEHYGWRTLSDGDGVSIFGCSHVVDHCSLSNCKDGLVDALHGST
PpPL	(196)	MVRSSPEHYGWRTLSDGDGVSIFGCSHVVDHCSLSNCKDGLVDALHGST

ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzPL กับ PL ของพืชชนิดต่างๆ โดยสัญลักษณ์ “+” แสดง catalytic residues Asp (D) และบริเวณที่ขีดเส้นกำกับแสดง conserved motif domain

DzPL	(45)	AITISNNYMTHHDKVMLLGHSD	EMV	DKNMQ	TIAFNHFGEGLVQRM	PRC
DcPL	(240)	AITISNNYMTHHDKVMLLGHSD	SYS	PDKNMQ	A	TIAFNHFGEGLVQRM
MaPL	(251)	AITISNNYMTHHDKVMLLGHSD	SYT	NDKNMQ	TIAFNHFGEGLVQRM	PRC
PmPL	(246)	AITISNNYMTHHDKVMLLGHSD	SYTE	DKNMQ	V	TIAFNHFGEGLVQRM
PpPL	(246)	AITISNNYMTHHDKVMLLGHSD	SYTE	DKNMQ	V	TIAFNHFGEGLVQRM
<hr/>						
DzPL	(95)	RLGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSA	A	PTINSQGNRE	LAP	DRFSKEVTERE
DcPL	(290)	RHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSA	S	PTINSQGNRE	LAP	NDRFKKEVTKHE
MaPL	(301)	RHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSA	D	PTINSQGNRE	AAP	DIRSSKEVTKHE
PmPL	(296)	RHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSA	N	PTINSQGNRE	AAP	DIRFSKEVTKHE
PpPL	(296)	RHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSA	N	PTINSQGNRE	AAP	DIRFSKEVTKHE
<hr/>						
DzPL	(145)	DAPAS	EWKNWNWRSEGLM	NGAFFT	PSGAGASSSYARASSL	GARS
DcPL	(340)	DAP	GEWKNWNWRSEGLM	NGAFFT	PSGAGASSSYARASSL	GARP
MaPL	(351)	DAP	SEWKNWNWRSEGLM	NGAFFT	ASGAGASSSYARASSL	GAKP
PmPL	(346)	DAP	SEWKNWNWRSEGLM	NGAFFT	ASGAGASSSYARASSL	GAKP
PpPL	(346)	DAP	SEWKNWNWRSEGLM	NGAFFT	ASGAGASSSYARASSL	GAKP
<hr/>						
DzPL	(195)	GAI	TSSAG	ALV	CKKGR	SRC
DcPL	(390)	GTL	TGSAG	SLV	CRKGR	SRC
MaPL	(401)	GAI	TTAS	GALS	CRKGR	SRC
PmPL	(396)	GS	ITTA	S	GALS	CRKGR
PpPL	(396)	GS	ITTA	S	GALS	CRKGR

ภาพที่ 8 (ต่อ)

## 4) ยีน polygalacturonase (PG)

การจำแนกยีนพบยีน PG 1 ยีน คือ DzPG มีความยาว 920 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 178 residue โดยผลการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความเหมือนกับยีน PG ที่พบในผลไม้ 66-73% นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน DzPG พบส่วนประกอบสำคัญต่างๆ ได้แก่ putative conserved polygalacturonase active site (ภาพที่ 9)

DuPG	(1)	-----
AcPG	(1)	----MALQRHFFQFVITLLIPSFILGYTSAVHEDPPHDYHLEF--YGYD
CpPG	(1)	----MPMGKEHIFCRHYLLLFSLIIMCLLQSGFGSYQDEQSPV--NDYH
MdPG	(1)	MALKTQLLWSFVVVFVVSFSTTSCSGTSFQEVNALHSYVDHVDKESGYN
PpPG	(1)	---MALQKHLVLFYVVSFCAASCYSSGFQEVNSLHSFVDEHEF--SGYN
DuPG	(1)	-----
AcPG	(45)	FKAYPSYITTI GDNDFGSSMSHENGIFGLRKVDYGM---DRVLDASKTVN
CpPG	(45)	HPQYQP-----HDHKGIVMVMRRFSRAHPPQ-----PSPRIVN
MdPG	(51)	SRAYPSYTDTIEGLKFMELIRPRTQLFSSRKINNTIIGGIATSSAPAKTIS
PpPG	(46)	SRAHPSNMNTIEGVKFMELIKPRAQLFSSRKIERAG---SKSSSVKTTIS
DuPG	(1)	-----
AcPG	(92)	VDDFGAKGDGSDDTKAF EKAWKAVCSSTSSAVLLVPQ-KNYLVRPIEFSG
CpPG	(78)	VDRY GAKANGRDDSQAFKAWRAACLASNGAVLVVPRNKIYHLKPLIFSG
MdPG	(101)	VDDFGAKGNADDTQAFV KAWKAACSSSGAMVLVVPQ-KNYLVRPIEFSG
PpPG	(93)	VANFGAKGNADDTRAFEKAWKAACSSNGAIVLVVPQ-KTYLVRPIEFSG
DuPG	(1)	-----
AcPG	(141)	PCKSDLTMQIYGTIEASDDRSDYSKLGRHWLVFDSVQNI RVEGGTINGN
CpPG	(128)	PCKSTLTFKIYGTIKAWVKQSEYR-ERRHWLRFDNVHNI RVTGGIINGN
MdPG	(150)	PCKSQLTLQIYGTIEASEDRSIYK-DIDHWLRFDNVQNL L VVGPGTINGN
PpPG	(142)	PCKSHLTMQIYGTIEASDDRSVYK-DVTHWLRFDNVQSILLVVGPGTINGN
DuPG	(1)	-----
AcPG	(191)	GQIWWQNSCKTNKTLPCKDAPT-ALTFYKSKHVI VKNLKIENAQQI HVSF
CpPG	(177)	GRKWWLNSCKINKKLVCLIKN--AVTFYECSNLI VSNLWFQNSQKMHISF
MdPG	(199)	GNIWWKNSCKIKPQPFCGTYAPTAVTFNRCNNLVKNLNIQDAQQI HVIF
PpPG	(191)	GNRWWENSCKRKPQPCNEQAPTAVTFNRCNNLVKNLNIQDAQQMHVRF

ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzPG กับ PG ของพืชชนิดต่างๆ โดยบริเวณที่ขีดเส้นกำกับแสดง putative conserved polygalacturonase active site

DuPG (1) -----I GTGDDCISIV  
 AcPG (240) DNCVNVQASNIMVTTPENS PNTDGIHVTGTQNIHISSCVIETGDDCISIV  
 CpPG (225) QSCIYVKALNIVVTAPENS PNTDGIHVTGTQNICIIRTGIELGDDCISIV  
 MdPG (249) QNCINVQASCLITVTAPEDSPNTDGIHVTNTQNI TISSVIGTGDDCISIV  
 PpPG (241) QNCKNVEASHLITVTAPEDSPNTDGIHVTNTKNI TISSVIGTGDDCISIV

DuPG (12) SGSKNVHAMDITCGPGHGISIGSLGSGNSKAYVSGVTVVDGAKLSGTTNGM  
 AcPG (290) SGGQKVRVNDITCGPGHGISIGSLGYGNSEAHVSDVVVNGAKLCGTTNGV  
 CpPG (275) SGSKNVRATGITCGPGHGISIGSLGADNSEAYVSNVEVTNSKLTGTTNGV  
 MdPG (299) SGSQRVQATDITCGPGHGISIGSLGEDGSEDHVSGVFFVNGAKLSGTSNGL  
 PpPG (291) SGSQRVQATDITCGPGHGISIGSLGEDNANDHVSQVFFVNGAKLSGTSNGV

DuPG (62) RIKTWQ-GGSGSASNIIFQNIEMYNVSNPIIIDQNYCDQD-KPCNKQSSA  
 AcPG (340) RIKTWQ-GGSGSASNIKFNVEMHVVENPIIIDQNYCDQD-KPCQEQSSA  
 CpPG (325) RIKTWQQGGSGFAKNIIFHNIEKNTNPIIIDQNYCDQD-DPCPQQASA  
 MdPG (349) RIKTWK-GGSGSATNIVEQNVQMNVDVTPNPIIIDQNYCDHKTCKDCKQKSA  
 PpPG (341) RIKTWQ-GGSGSASNIVEQNVEMNDVTPNPIIIDQNYCDHKNKDCTRQSA

DuPG (110) VQVKNVVYKNIKGTSASEVAIKFDCSSSHPCQGIILLQNVNLQEQRDKTTK  
 AcPG (388) VQVKNIFYKNIKGT CASNVAITFDCSKRFPQCGIVLEDVDLEIEGGAAAK  
 CpPG (374) VKVSNVLYRNLIKGTSA SKVAI NFDCS EIVPCQGIILLQDVAIASKHEEPTK  
 MdPG (398) VQVKNVLYQIIFGTSA S GDAITLNCSQSVPCQGIIVLQSVQLQN-----GR  
 PpPG (390) VQVKNVLYQNIIFGTSA S TDAITFNCSQSVPCQGIIVLQNLQLQN-----AR

DuPG (160) AICNYVKLSEGKAVSPQCP-----  
 AcPG (438) ALCNNVELSETGVVSPHCPEGEEEEAS  
 CpPG (424) ASCANVILDTRGDMFPYCFNN-----  
 MdPG (443) AECNNVQPAYKGVVSPRC-----  
 PpPG (435) AKCNNVKPAYKGA VSPRC SWGLVN-

ภาพที่ 9 (ต่อ)

5) ยีน  $\beta$ -galactosidase (GAL)

การจำแนกยีนพบยีน GAL 1 ยีน คือ DzGAL มีความยาว 2,516 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 178 residue โดยผลการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความเหมือนกับยีน GAL ที่พบในพืชรวมถึงผลไม้ 73-82% นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน DzGAL พบส่วนประกอบสำคัญต่างๆ ได้แก่ putative active site ของ glycoside hydrolase family 35 และ galactose binding lectin domain บริเวณ N-terminal (ภาพที่ 10)

DzGal	(1)	-----
FaGal	(1)	-----MGI <sup>R</sup> RLV <sup>M</sup> WNV <sup>V</sup> VAAA <sup>L</sup> VV <sup>L</sup> CS <sup>C</sup> FAS <sup>V</sup> VR <sup>A</sup> SVSYDSKAI <sup>V</sup> ING
PaGal3	(1)	MGLILEITTSSNSNRSL <sup>L</sup> SLITIS <sup>L</sup> LL <sup>L</sup> TYLS <sup>P</sup> ATC <sup>S</sup> SVSYDHKAI <sup>I</sup> ING
PhGal	(1)	-----MMV <sup>T</sup> NM <sup>V</sup> SRL <sup>V</sup> MWNV <sup>L</sup> LV <sup>L</sup> LSS <sup>C</sup> VFS <sup>G</sup> LASVSYDHKAI <sup>I</sup> ING
PpGal	(1)	-----MWN <sup>V</sup> LRGNNTLLS <sup>L</sup> LL <sup>L</sup> FSWLA <sup>S</sup> AAT <sup>A</sup> SVSYDHKAI <sup>I</sup> ING
DzGal	(1)	-----DGG <sup>L</sup> DVIQTYVFWNGHEP <sup>S</sup> SPGK
FaGal	(42)	QRRILISGSIHYPRSTPEMWPDLIQ <sup>R</sup> AKDGG <sup>L</sup> DVIQTYVFWNGHEP <sup>S</sup> SPGK
PaGal3	(51)	QRRILISGSIHYPRSTPEMWPDLIQ <sup>K</sup> AKDGG <sup>L</sup> DVIQTYVFWNGHEP <sup>S</sup> SPGE
PhGal	(43)	QRRILISGSIHYPRSTPEMWPDLIQ <sup>K</sup> AKEGG <sup>V</sup> DVIQTYVFWNGHEP <sup>E</sup> QGK
PpGal	(40)	Q <sup>K</sup> RILISGSIHYPRSTPEMWPDLIQ <sup>S</sup> KDGG <sup>L</sup> DVIQTYVFWNGHEP <sup>S</sup> SPGK
DzGal	(23)	YYFED <sup>R</sup> YDLV <sup>R</sup> FIKLV <sup>Q</sup> AGLYVHLR <sup>I</sup> GPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGI
FaGal	(92)	YYFED <sup>N</sup> YDLV <sup>K</sup> FIKLV <sup>Q</sup> AGLYVHLR <sup>I</sup> GPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGI
PaGal3	(101)	YYFEG <sup>R</sup> YDLV <sup>K</sup> FIKLV <sup>K</sup> EAGLYVHLR <sup>I</sup> GPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGI
PhGal	(93)	YYFEE <sup>R</sup> YDLV <sup>K</sup> FIKLV <sup>H</sup> QAGLYV <sup>N</sup> LRV <sup>G</sup> PYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGI
PpGal	(90)	YYFED <sup>R</sup> YDLV <sup>K</sup> FIKLV <sup>H</sup> QAGLYV <sup>N</sup> LR <sup>I</sup> GPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGI
DzGal	(73)	A <sup>F</sup> R <sup>T</sup> D <sup>N</sup> G <sup>P</sup> F <sup>K</sup> A <sup>A</sup> M <sup>Q</sup> K <sup>F</sup> T <sup>E</sup> K <sup>I</sup> V <sup>N</sup> M <sup>M</sup> K <sup>A</sup> E <sup>R</sup> L <sup>F</sup> E <sup>T</sup> Q <sup>G</sup> G <sup>P</sup> I <sup>I</sup> L <sup>S</sup> Q <sup>I</sup> E <sup>N</sup> E <sup>F</sup> G <sup>P</sup> V <sup>E</sup>
FaGal	(142)	Q <sup>F</sup> R <sup>T</sup> D <sup>N</sup> G <sup>P</sup> F <sup>K</sup> D <sup>Q</sup> M <sup>Q</sup> R <sup>F</sup> T <sup>T</sup> K <sup>I</sup> V <sup>N</sup> M <sup>M</sup> K <sup>A</sup> E <sup>R</sup> L <sup>F</sup> E <sup>S</sup> H <sup>G</sup> G <sup>P</sup> I <sup>I</sup> L <sup>S</sup> Q <sup>I</sup> E <sup>N</sup> E <sup>Y</sup> G <sup>P</sup> M <sup>E</sup>
PaGal3	(151)	S <sup>F</sup> R <sup>T</sup> D <sup>N</sup> E <sup>P</sup> F <sup>K</sup> T <sup>A</sup> M <sup>A</sup> G <sup>F</sup> T <sup>T</sup> K <sup>I</sup> V <sup>D</sup> M <sup>M</sup> K <sup>E</sup> E <sup>E</sup> L <sup>F</sup> E <sup>T</sup> Q <sup>G</sup> G <sup>P</sup> I <sup>I</sup> L <sup>S</sup> Q <sup>I</sup> E <sup>N</sup> E <sup>Y</sup> G <sup>P</sup> V <sup>E</sup>
PhGal	(143)	S <sup>F</sup> R <sup>T</sup> D <sup>N</sup> E <sup>P</sup> F <sup>K</sup> A <sup>A</sup> M <sup>Q</sup> K <sup>F</sup> T <sup>T</sup> K <sup>I</sup> V <sup>N</sup> M <sup>M</sup> K <sup>A</sup> E <sup>R</sup> L <sup>Y</sup> E <sup>S</sup> Q <sup>G</sup> G <sup>P</sup> I <sup>I</sup> L <sup>S</sup> Q <sup>I</sup> E <sup>N</sup> E <sup>Y</sup> G <sup>P</sup> L <sup>E</sup>
PpGal	(140)	V <sup>F</sup> R <sup>T</sup> D <sup>N</sup> E <sup>P</sup> F <sup>K</sup> A <sup>A</sup> M <sup>Q</sup> K <sup>F</sup> T <sup>E</sup> K <sup>I</sup> V <sup>S</sup> M <sup>M</sup> K <sup>A</sup> E <sup>Q</sup> L <sup>F</sup> Q <sup>S</sup> Q <sup>G</sup> G <sup>P</sup> I <sup>I</sup> L <sup>S</sup> Q <sup>I</sup> E <sup>N</sup> E <sup>F</sup> G <sup>P</sup> V <sup>E</sup>
DzGal	(123)	WEI <sup>G</sup> AP <sup>G</sup> K <sup>A</sup> Y <sup>T</sup> K <sup>W</sup> AA <sup>Q</sup> MA <sup>V</sup> GL <sup>G</sup> TG <sup>V</sup> PW <sup>M</sup> CK <sup>Q</sup> DDAPDPV <sup>I</sup> INTC <sup>N</sup> GFY <sup>C</sup> EN
FaGal	(192)	YEI <sup>G</sup> AP <sup>G</sup> K <sup>A</sup> Y <sup>T</sup> D <sup>W</sup> AA <sup>Q</sup> MA <sup>V</sup> GL <sup>G</sup> TG <sup>V</sup> PW <sup>M</sup> CK <sup>Q</sup> DDAPDPV <sup>I</sup> NAC <sup>N</sup> GFY <sup>C</sup> D <sup>Y</sup>
PaGal3	(201)	WEI <sup>G</sup> AP <sup>G</sup> Q <sup>A</sup> Y <sup>T</sup> K <sup>W</sup> AA <sup>N</sup> MA <sup>V</sup> GL <sup>G</sup> TG <sup>V</sup> PW <sup>M</sup> CK <sup>Q</sup> DDAPDP <sup>I</sup> INTC <sup>N</sup> DH <sup>Y</sup> CD <sup>W</sup>
PhGal	(193)	VRF <sup>G</sup> E <sup>Q</sup> G <sup>K</sup> S <sup>Y</sup> A <sup>E</sup> W <sup>A</sup> A <sup>K</sup> M <sup>A</sup> L <sup>D</sup> L <sup>G</sup> TG <sup>V</sup> PW <sup>M</sup> CK <sup>Q</sup> DDAPDPV <sup>I</sup> INTC <sup>N</sup> GFY <sup>C</sup> D <sup>Y</sup>
PpGal	(190)	WEI <sup>G</sup> AP <sup>G</sup> K <sup>A</sup> Y <sup>T</sup> K <sup>W</sup> AA <sup>Q</sup> MA <sup>V</sup> GL <sup>N</sup> TG <sup>V</sup> PW <sup>M</sup> CK <sup>Q</sup> E <sup>D</sup> APDPV <sup>I</sup> D <sup>T</sup> C <sup>N</sup> GFY <sup>C</sup> EN

ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzGAL กับ GAL ของพืชชนิดต่างๆ โดยบริเวณที่ขีดเส้นกำกับแสดง putative active site ของ glycoside hydrolase family 35 และ galactose binding lectin domain บริเวณ N-terminal

DzGal	(173)	FITPNAKYKPKMWTEENWTGWYTEFGGAVPTRPAEDLAFSVAREFIQNGGSFV
FaGal	(242)	FSPNKAYKPKMWTEAWTGWYTEFGGAVPYRPAEDLAFSVAKFLQKGGAFI
PaGal3	(251)	FSPNKNYKPTMWTEAWTGWYTEFGGAVPYRPAEDMAFAIAKFIQKGGSFV
PhGal	(243)	FYPNKAYKPKIWTTEAWTAWYTEFGSPVYRVEDLAFGVANFIQTGGSFV
PpGal	(240)	FITPNKAYKPKMWTEVWTGWYTEFGGAVPTRPAEDLAFSVAKFLQKGGSFV
DzGal	(223)	NYYMYHGGTNFGRTAGGPFVATSVDYDAPLDEFGLPREPKWGHRLDLHKA
FaGal	(292)	NYYMYHGGTNFGRTAGGPFVATSVDYDAPLDEFGLRQPKWGHRLDLHRA
PaGal3	(301)	NYYMYHGGTNFGRTAGGPFVATSVDYDAPLDEFGLRQPKWGHRLDLHKA
PhGal	(293)	NYYMYHGGTNFGRTAGGPFVATSVDYDAPLDEFGLRQPKWGHRLDLHRA
PpGal	(290)	NYYMYHGGTNFGRTAGGPFVATSVDYDAPLDEFGLPREPKWGHRLDLHKA
DzGal	(273)	IKLSEFALVSAEFSVTSLSGNSQEAHVFRSKSGCAAFLANYDTRYSVKVT
FaGal	(342)	IKLSEFALVSSDPTVTPPLGTYSQEAHVFKNSGCAAFLANYNRKSFAKVA
PaGal3	(351)	IKMCEAALVSGDFIVTSLGSSQESHVFKSESGDCAAFLANYDEKSFAKVA
PhGal	(343)	IKLSEFALVSGDPTVTALGNYQKAHVFRSTSGCAAFLANNPNPNSFATVA
PpGal	(340)	IKSSESAALVSAEFSVTSLSNGQEAHVFKSKSGCAAFLANYDTRYSKAKVS
DzGal	(323)	FGNAQYDLPRWSSISILPDCKTAVENTARLGAQSSQKRM--VSNSEAFPWQ
FaGal	(392)	FGNMHYNLPPWSSISILPDCKNIVYNTARLGAQTARMKMPRVPLHGGFSWQ
PaGal3	(401)	FQGMHYNLPPWSSISILPDCVNTVYNTARVGAQTSSMTT--SVNPDGFSWE
PhGal	(393)	FGNKHYNLPPWSSISILPDCKHIVYNTARVGAQSALMKM--TPANEKYSWQ
PpGal	(389)	FGNGQYELPPWPIISILPDCKTAVYNTARLGSQSSQMKM--TPVKSALPWQ
DzGal	(371)	SYNEESPSADDQDATVNNGLWEQIYVTRDASDYLWYMTDVQIDPTEERFLT
FaGal	(442)	AYNDETATYSDTSTFTT-AGLLEQINLTRDADYLWYMTDVKIDPSEDFLR
PaGal3	(450)	TYNEETASYDDASITM-EGLLEQINLTRDVIDYLWYMTDITIDPNEGFLK
PhGal	(441)	SYNDQTAFYDDNAFTV-VGLLEQINLTRDVS DYLWYMTDVKIDPSEGF LR
PpGal	(437)	SFVEESASSDTSTLTDGLWEQINLTRDTPDYLWYMTDITIDPDEGF LR
DzGal	(421)	SGQNPLLTIVSAGHALHVEFINGQLSGTVYGGLENPKLTFSSNVKLRAGIN
FaGal	(491)	SGNYPVLTIVLSAGHALRVEFINGQLAGTAYGSLETPKLTFKQGVNLRAGIN
PaGal3	(499)	NGEYPVLTIVMSAGHALHVEFINGELSGTVYGSVDNPKLTYTGSVKLLAGNN
PhGal	(490)	SGNWPVLTIVSSAGDALHVEFINGQLAGTVYGSIKKQKLTFSKAVNLRAGIN
PpGal	(487)	RGESPLLTIVSAGHALHVEFINGQLSGTVYGALENPKLTFSSNVKPRSGIN
DzGal	(471)	KISLLSVAVGLPNVGFHFETWNTGVLGPVILKGLNEGARDLSKQKWSYKI
FaGal	(541)	QIALLSIAVGLPNVGFPHFETWNTAGVILGPVILNGLNEGRDLQKWSYKI
PaGal3	(549)	KISVLSIAVGLPNIGAHFETWNTGVLGPVILNGLNEGRDLQKWSYKI
PhGal	(540)	KISLLSIAVGLPNIGPHFETWNTGVLGPVLSGLDEGKRDLTQKWSYKV
PpGal	(537)	KLALLSISVGLPNVGLHFETWNTAGVILGPVILKGLNSGTWDMSRWKWTYKI

ภาพที่ 10 (ต่อ)



DzGal	(521)	GLKGEALNLHIVTGSSSVVEVSGSQTIVKKQPMTWYKTFNAPGGNEPLAL
FaGal	(591)	GLKGEALSLHSLTGSSSVVEVTEGSFVAQRQPLTWYKTFNRPAGNSPLAL
PaGal3	(599)	GLKGEALQLHSLTGSSSVVEVSS--SLIAQKQPLTWYKTFNAPGGNGPFAL
PhGal	(590)	GLKGEALNLHSLTGSSSVVEVSGSLVAQRQPLTWYKTFNAPAGNEPLAL
PpGal	(587)	GLKGEALGLHIVTGSSSVVEVAVGSPSMAQRQPLTWYKATFNAPPNGPLAL
DzGal	(571)	DMSSMGKGLVWINGQNIGRHWPGYIAHCGCCAWDYAGTYTDKKCRINCGE
FaGal	(641)	DMGSMGKGQVWINDRSIGRYWPAYKASGTCCGECNYAGTFSEKKCLSNCGE
PaGal3	(647)	DMSMMGKGQIWINQSIIGRYWPAYKAYCNCGECSTGRYNEKKCLANCGE
PhGal	(640)	DMNSMGKGQVWINGQSIIGRYWPAYKASGTCDACNYAGPTNEKKCLSNCGD
PpGal	(637)	DMSSMGKGQIWINQSIIGRHWPAYTARGNCCNYAGTYDDKKCRTHCGE
DzGal	(621)	PSQRWYHVFRSWLKPSCGNLLVVFEEWGGDPSGIALVLRRTTGSVCADIFEG
FaGal	(691)	ASQRWYHVFRSWLNPTGNLLVVFLEEWGGDPNGIFLVRREVDSSVCADIEVW
PaGal3	(697)	ASQRWYHVFRSSWLYPTANLLVVFEEWGGDPTGISLVRRTTGSACAFISEW
PhGal	(690)	ASQRWYHVFRSWLHPTGNLLVVFEEWGGDPNGISLVKRELASVCADINEW
PpGal	(687)	PSQRWYHVFRSWLTPSGNLLVVFEEWGGDPTKISLVERRTSSVCADIFEG
DzGal	(671)	QPTMKNWGM LASGKIN---RPKAHLWCPPGQIISKIN FAS YGMPEGT CGS
FaGal	(741)	QPNLMSWQM QVSGRVNKPLRPKAHLSCGPGQKISSIKFASFGTPEGVCGS
PaGal3	(747)	HPTLRKWHIKDYGRAERFRPKAHLSCADGQKISSIKFASFGTPOGVCGN
PhGal	(740)	QPQLVNWQLQASGKVDKPLRPKAHLSCTSGQKISSIKFASFGTPOGVCGS
PpGal	(737)	QPTLTNSQKLASGKLN---RPKAHLWCPPGQVLSDIK FASYGLPQGT CGS
DzGal	(718)	FREGSCHAHKSHDAFQKNCIGKQSCWVTVAPEVFGGDPCPNMCKLSVEA
FaGal	(791)	FREGGCHAHKSYNAFERSCIGQNSCSVTVSPENFGGDPCPNVMCKLSVEA
PaGal3	(797)	FTEGSCCHAHKSYDIFKNCVGGQWCSTVLSPEVFGGDPCPNVMKNLAVEA
PhGal	(790)	FSEGSCCHAHHSYDAFEKYCIGQESCTVPTPEVFGGDPCPSVMCKLSVEA
PpGal	(784)	FQEGSCCHAHKSYDAPKNCIGKQSCSWAVAPEVFGGDPCPGSTKCKLSVEA
DzGal	(768)	ACN
FaGal	(841)	ICS
PaGal3	(847)	ICQ
PhGal	(840)	VCS
PpGal	(834)	VCS

ภาพที่ 10 (ต่อ)

6) ยีน  $\beta$ -1,4-glucanase หรือ cellulase หรือ EGase

การจำแนกยีนพบยีน EGase 1 ยีน คือ DzEG มีความยาว 908 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 263 residue โดยผลการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความเหมือนกับยีน EGase ที่พบในพืชรวมถึงผลไม้ 47-67% นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน DzEG พบส่วนประกอบสำคัญต่างๆ ได้แก่ Cys residues และ putative glycosyl hydrolase active sites (ภาพที่ 11)

DzEG	(1)	-----MACSTNIVVVFLLCLLAGPIIAQDYKDALGKSIL
CaEG	(1)	-----MACSTNIVVVFLLCLLAGPIIAQDYKDALGKSIL
CsEG	(1)	MVLSILRKMDPVTKFSLTITQILGLTICALSLLCSAFTFQDYSDALGKSIL
MdEG	(1)	-----MAMRLSLSIFITSLIFVILGSSISSSVQVLAAGNPNYREALAKSVL
DzEG	(1)	-----
CaEG	(36)	FFEGQRSGRLP V--SQRVWVRGDSALIDGKIEHVNLI GGYDAGDGNVKFG
CsEG	(51)	FFEGQRSGRLP P--NQQLTWRGNSGLSDGSSYHVDLVGGYDAGDGNVKFG
MdEG	(45)	FFQQRSGRLPAGAAQQITWRNSGLSDGRQAVVDLITGGYDAGDGNVKFN
DzEG	(1)	-----
CaEG	(84)	WPMASLITLLSWAAIEYPTQISANQLPHLQRAIRWGTNFLIRAHTST-
CsEG	(99)	LPMFTTTLLSWSVIEEG--SSMQNHLENAAAIRWGTDYLLKASTATPG
MdEG	(95)	FPMFTTTMLSWGAEIYG--KRMGPQLPETRAAIRWATDYLLKCARQTPG
DzEG	(1)	-----
CaEG	(133)	TLYTQVGDGNADHQCWERPEDMDTPRTLYKITSNSPGSEVAAEVAAAF
CsEG	(147)	ALYVQVGDPNMDHHCWERPEDMDTPRN VYKVSQNPGSDVAAETAALAA
MdEG	(143)	RLYVGVDPNVDHKCWERPEDMDTTRTVYSVSPSNPGSDVAGETAALAA
DzEG	(1)	-----
CaEG	(183)	ASIVFKNLIDSNYSAKLLRFSQSLFAFADKYRGSY-----QASCPFYCSYS
CsEG	(197)	ASVVFKDSDFSYSTKLLKATAMKVFDFADKYRGSYSDSINSVVCPIYCSYS
MdEG	(193)	ASLVFRRVDPKYSKLLLNATARNVMOFAIQYRGAYSDSIGSAVCPFYCSYS
DzEG	(1)	-----WLYMASGDKKYYNYVLSN---OGWSQAVSEFSWDNKFAG
CaEG	(228)	GYQDELLWAAAWLYKAGGNNYLNIALNN---OGWSQCPSEFSWDNKFAG
CsEG	(247)	GYLDELLWGASWLHRAEQNSSYLAYTQSNGHILGADDDYSFSWDDKRAG
MdEG	(243)	GYNDELLWGAAWLFRAINELYYNEIKSL---GASDSTDIFSWDNKFAG

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ DzEG กับ EGase ของพืชชนิดต่างๆ โดย บริเวณที่ขีดเส้นกำกับแสดง putative glycosyl hydrolase active sites และจุดที่มีเครื่องหมาย '#' แสดง Cys residues

DzEG (86) RDAANLQYVTS<sup>CMV</sup>LAVY<sup>SET</sup>LKAS<sup>NI</sup>DGI<sup>Q</sup>CG<sup>S</sup>AHF<sup>SAS</sup>QIK<sup>DFI</sup>KL<sup>Q</sup>  
 CaEG (324) RDSSNLQYVSGATMVL<sup>FM</sup>Y<sup>SK</sup>VLD<sup>AA</sup>GK<sup>EG</sup>ITCG<sup>S</sup>VNF<sup>ST</sup>SK<sup>IK</sup>AFA<sup>K</sup>S<sup>Q</sup>  
 CsEG (347) ASESNLQYVTTTAF<sup>LL</sup>LLTY<sup>AK</sup>YLSS<sup>NG</sup>-GVAT<sup>CG</sup>SS<sup>T</sup>VKA<sup>EN</sup>LI<sup>AL</sup>AK<sup>K</sup>Q<sup>Q</sup>  
 MdEG (339) LPGSNLQYVTSIT<sup>FL</sup>LLTY<sup>SK</sup>YMA<sup>AR</sup>K-LTFD<sup>CG</sup>NL<sup>V</sup>VT<sup>PM</sup>AL<sup>R</sup>NL<sup>AK</sup>Q<sup>Q</sup>

#

DzEG (136) VNYILGN<sup>N</sup>PM<sup>K</sup>MSY<sup>M</sup>VG<sup>F</sup>GI<sup>K</sup>Y<sup>P</sup>M<sup>Q</sup>IH<sup>H</sup>RC<sup>S</sup>SI<sup>P</sup>SI<sup>R</sup>SH<sup>P</sup>SK<sup>V</sup>GC<sup>N</sup>DG<sup>F</sup>S<sup>S</sup>  
 CaEG (374) VDYILGN<sup>N</sup>PL<sup>Q</sup>MSY<sup>M</sup>VG<sup>F</sup>GN<sup>K</sup>Y<sup>P</sup>T<sup>Q</sup>IH<sup>H</sup>R<sup>A</sup>SSI<sup>P</sup>SI<sup>I</sup>N<sup>H</sup>PAR<sup>V</sup>GC<sup>N</sup>DG<sup>F</sup>S<sup>S</sup>  
 CsEG (396) VDYILG<sup>D</sup>N<sup>P</sup>AK<sup>M</sup>SY<sup>M</sup>VG<sup>F</sup>GE<sup>R</sup>Y<sup>P</sup>Q<sup>H</sup>V<sup>H</sup>H<sup>R</sup>CS<sup>S</sup>L<sup>P</sup>SI<sup>I</sup>HA<sup>H</sup>P<sup>DH</sup>L<sup>A</sup>C<sup>N</sup>DG<sup>F</sup>Q<sup>Q</sup>  
 MdEG (388) VDYILG<sup>V</sup>N<sup>P</sup>L<sup>K</sup>MSY<sup>M</sup>VG<sup>F</sup>GP<sup>Y</sup>Y<sup>P</sup>K<sup>R</sup>I<sup>H</sup>H<sup>R</sup>CS<sup>S</sup>L<sup>P</sup>SI<sup>I</sup>T<sup>S</sup>H<sup>R</sup>QS<sup>I</sup>GC<sup>D</sup>GG<sup>F</sup>Q<sup>Q</sup>

DzEG (186) SYFSS<sup>N</sup>PN<sup>P</sup>PN<sup>Q</sup>H<sup>V</sup>GAI<sup>V</sup>GG<sup>E</sup>DP<sup>N</sup>D<sup>H</sup>EN<sup>D</sup>LR<sup>S</sup>DY<sup>S</sup>HSE<sup>P</sup>TY<sup>I</sup>NA<sup>A</sup>FV<sup>G</sup>A<sup>A</sup>  
 CaEG (424) SWYS<sup>I</sup>NN<sup>P</sup>PN<sup>P</sup>TH<sup>V</sup>GAI<sup>V</sup>GG<sup>E</sup>NS<sup>G</sup>D<sup>Q</sup>E<sup>V</sup>DS<sup>R</sup>SDY<sup>S</sup>HSE<sup>P</sup>TY<sup>I</sup>M<sup>N</sup>AA<sup>F</sup>V<sup>G</sup>S<sup>S</sup>  
 CsEG (446) YLYS<sup>-</sup>RS<sup>P</sup>PN<sup>P</sup>N<sup>V</sup>L<sup>T</sup>GAI<sup>L</sup>GG<sup>E</sup>DN<sup>R</sup>D<sup>N</sup>E<sup>A</sup>DR<sup>N</sup>NY<sup>Q</sup>Q<sup>S</sup>E<sup>P</sup>A<sup>T</sup>Y<sup>I</sup>NA<sup>P</sup>F<sup>V</sup>G<sup>A</sup>  
 MdEG (438) PFFYS<sup>L</sup>N<sup>P</sup>PN<sup>I</sup>L<sup>V</sup>GAI<sup>V</sup>GG<sup>E</sup>N<sup>Q</sup>D<sup>G</sup>FP<sup>D</sup>DR<sup>G</sup>DY<sup>S</sup>HSE<sup>P</sup>A<sup>T</sup>Y<sup>I</sup>NG<sup>A</sup>I<sup>V</sup>GP

DzEG (236) VA<sup>A</sup>IL<sup>L</sup>DE<sup>S</sup>K<sup>Q</sup>E<sup>P</sup>L<sup>Q</sup>LL<sup>R</sup>M<sup>N</sup>R<sup>T</sup>T<sup>N</sup>TR<sup>D</sup>Y<sup>M</sup>-----  
 CaEG (474) VA<sup>A</sup>IL<sup>Q</sup>N<sup>R</sup>R<sup>Q</sup>INS<sup>Q</sup>F<sup>N</sup>E<sup>P</sup>IL<sup>C</sup>DK<sup>Q</sup>IST<sup>K</sup>N<sup>V</sup>S<sup>Q</sup>  
 CsEG (495) VA<sup>A</sup>FF<sup>S</sup>SK<sup>I</sup>TT<sup>N</sup>-----  
 MdEG (488) LA<sup>A</sup>FF<sup>A</sup>GS<sup>Y</sup>RS-----

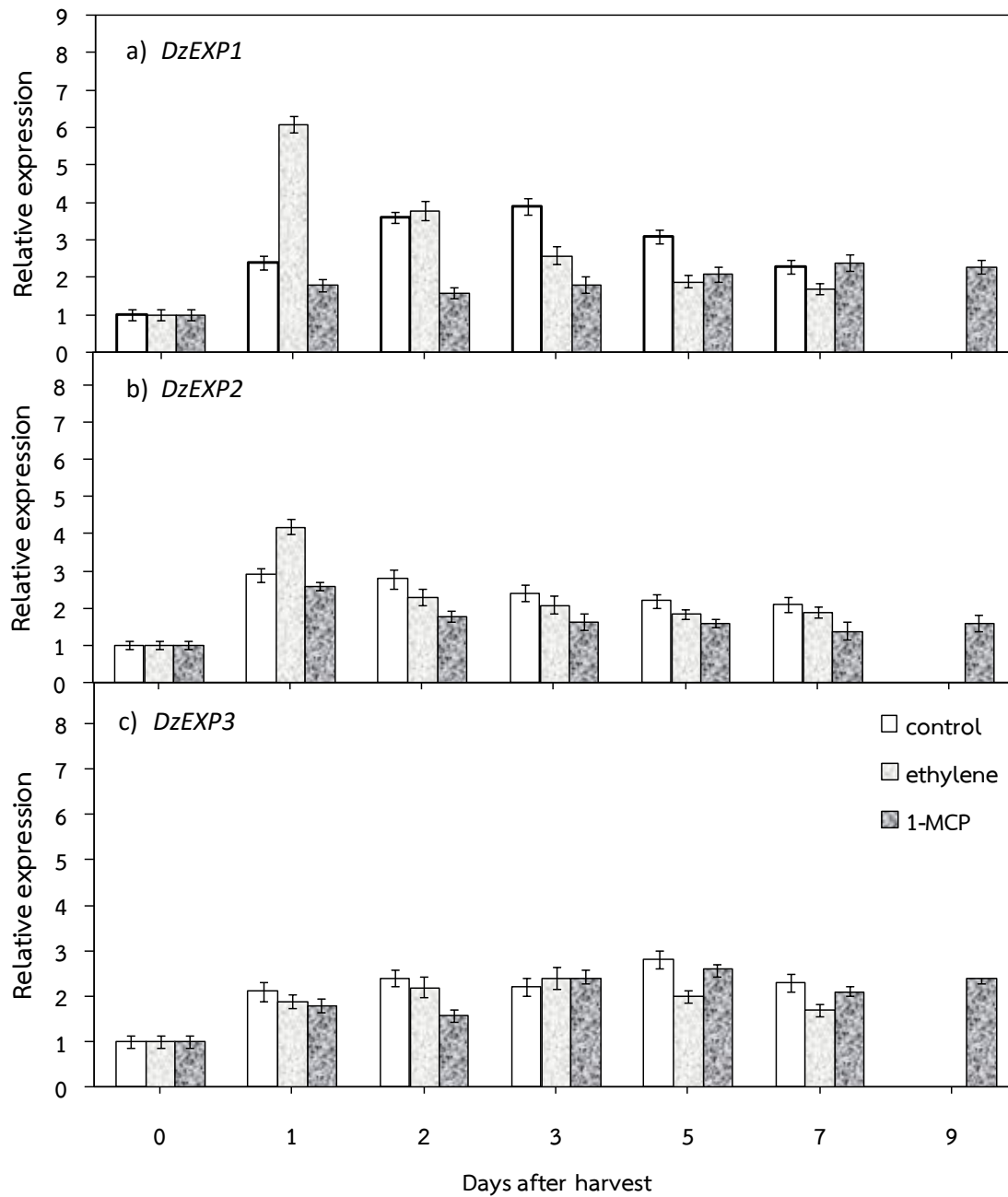
ภาพที่ 11 (ต่อ)

### 3 การแสดงออกของยีน

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย realtime PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเฉพาะเจาะจงที่ ออกแบบให้บางส่วนของผลิตภัณฑ์ (PCR product) อยู่ในบริเวณของ 3' UTR ผลการทดลองพบว่า สามารถ วัดระดับการแสดงออกของยีน *DzEXPs*, *DzPME*, *DzPL*, *DzPG*, *DzGAL* และ *DzEG* ได้ แต่พบว่า ไพรเมอร์ที่ ออกแบบไม่สามารถวัดการแสดงออกของยีน *DzXET* ได้ เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์ (PCR product) มากกว่า 1 ผลิตภัณฑ์

#### 1) การแสดงออกของยีน expansin ในระหว่างการสุกของผลทุเรียน

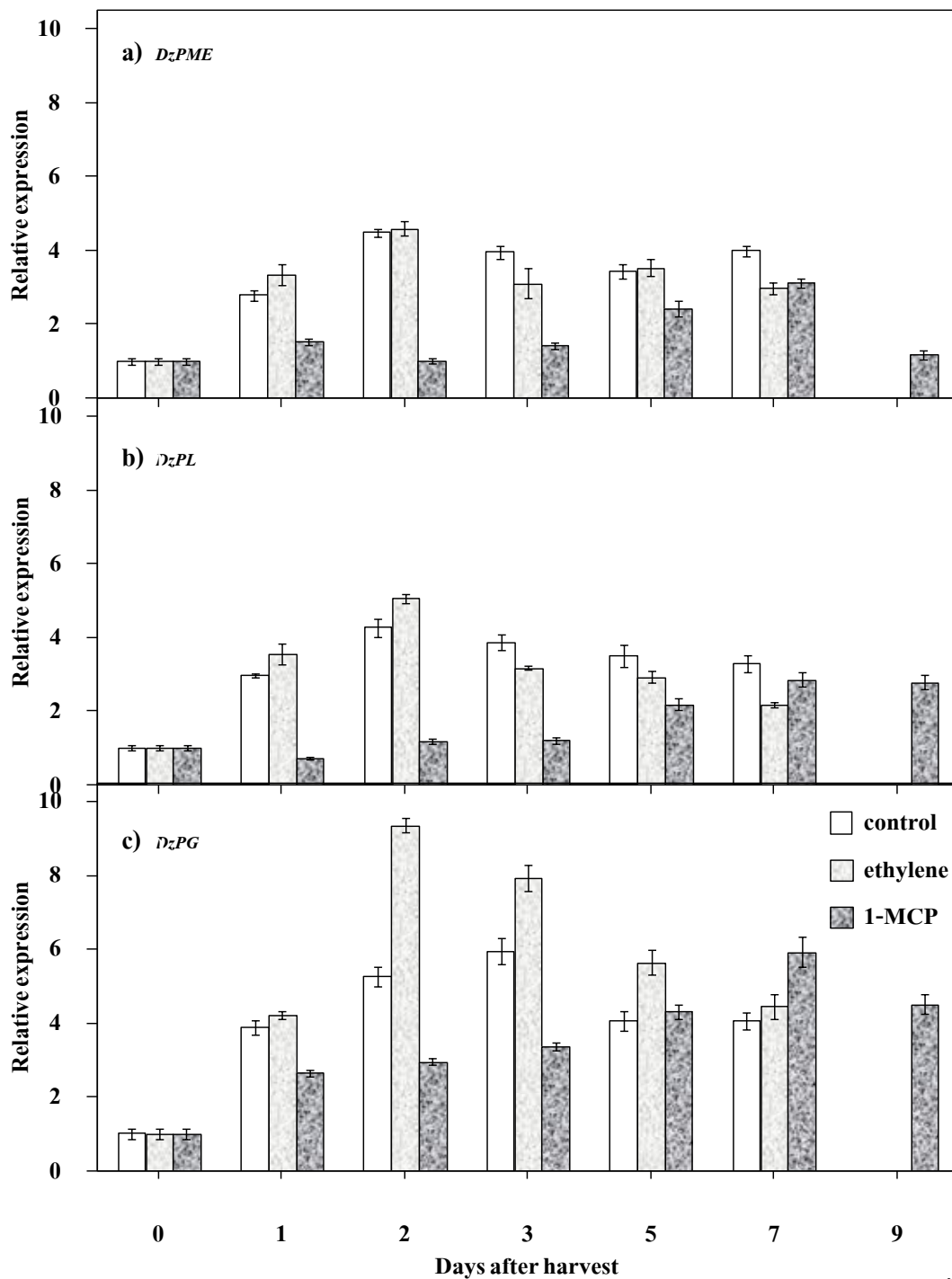
จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน expansin ในระหว่างการสุกพบว่า ระดับการแสดงออกของ ยีน *DzEXP1* and *DzEXP2* สอดคล้องกับการอ่อนนุ่มของของเนื้อทุเรียน การให้เอทิลีนโดยการป้ายเอทิลฟอนที่ก้าน ผลทุเรียนชักนำให้ยีน *DzEXP1* มีระดับการแสดงออกมากขึ้น (ภาพที่ 12) และส่งผลน้อยต่อการแสดงออกของ ยีน *DzEXP2* (ภาพที่ 12b) การแสดงออกของยีน *DzEXP1* เพิ่มสูงขึ้นโดยสูงที่สุดในวันที่ 1 และลดลงในระยะต่อมา การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP ชักนำให้ยีน *DzEXP2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแบบชั่วคราว (ภาพ ที่ 12b) นอกจากนี้พบว่า การแสดงออกของยีน *DzEXP3* มีระดับต่ำในระหว่างการอ่อนนุ่มของทุเรียน (ภาพที่ 12c)



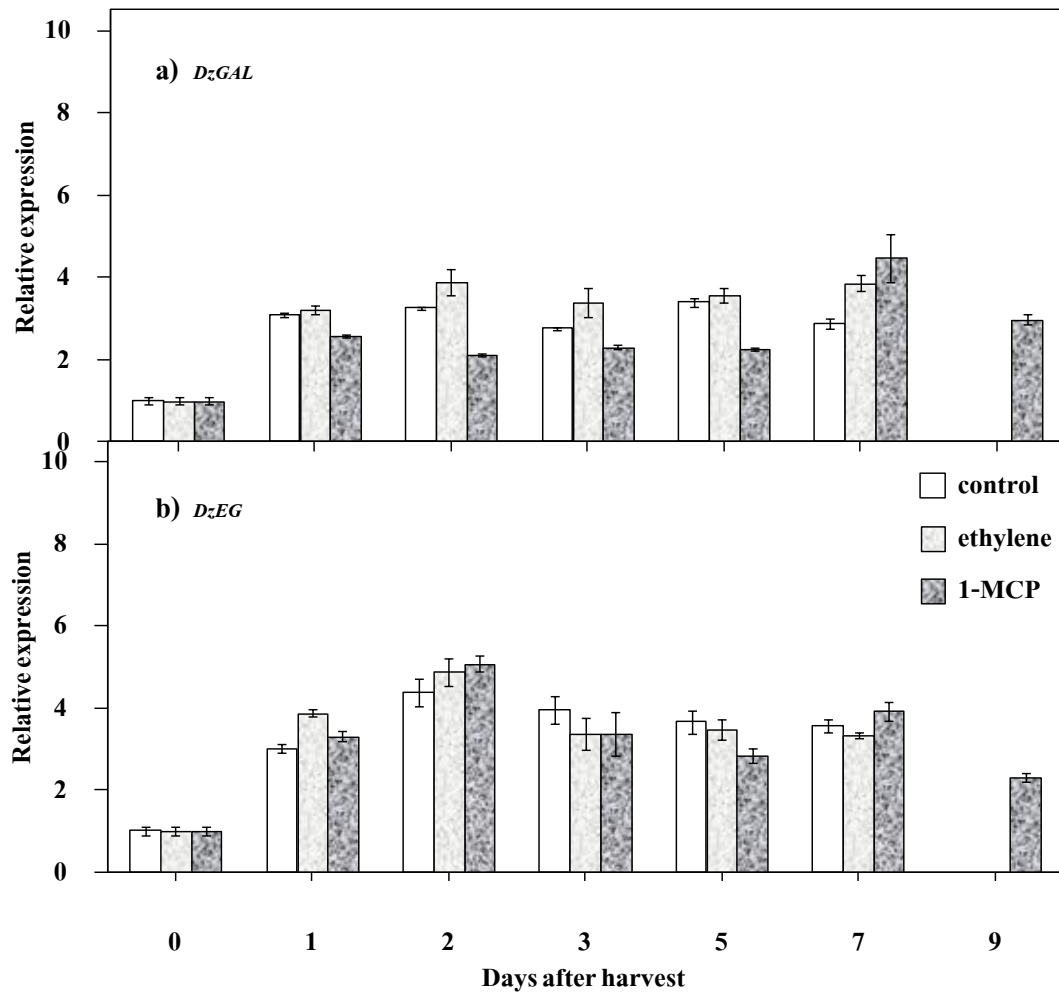
ภาพที่ 12 การแสดงออกของยีน *DzEXP1* (a), *DzEXP2* (b) และ *DzEXP3* (c) ในระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนที่ได้รับเอทิลีน สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยใช้ยีน *DzACT* เป็น internal control

## 2) การแสดงออกของยีน cell wall modifying enzymes ในระหว่างการสุกของผลทุเรียน

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน cell wall hydrolases ในระหว่างการสุกพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *DzPG* and *DzPL* สอดคล้องกับการสุกของทุเรียน การให้เอทิลีนโดยการป้ายเอทิลฟอนที่ก้านผลทุเรียนชักนำให้ยีน *DzPG* and *DzPL* มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นถึง 9.3 และ 5.1 เท่า โดยสูงที่สุดในวันที่ 2 ตามลำดับ การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DzPG* and *DzPL* และพบว่าการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงท้ายของการสุกของผลทุเรียน (ภาพที่ 13b-c) อย่างไรก็ตามพบว่า การแสดงออกของยีน *DzPME*, *DzGAL* และ *DzEG* ไม่สอดคล้องกับการสุกและการให้สารเอทิลีนหรือสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP (ภาพที่ 13 และ 14)



ภาพที่ 13 การแสดงออกของยีน *DzpME* (a) *DzpPL* (b) และ *DzpPG* (c) ในระหว่างการอ่อนของเนื้อทุเรียนที่ได้รับเอทิลีน สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยใช้ยีน *DzACT* เป็น internal control



ภาพที่ 14 การแสดงออกของยีน *DzGAL* (a) และ *DzEG* (b) ในระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนที่ได้รับเอทิลีน สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยใช้ยีน *DzACT* เป็น internal control



## วิจารณ์

การอ่อนนุ่มเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพและการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวของทุเรียน ภายหลังจากเก็บเกี่ยวผลทุเรียนการผลิตเอทิลีนของผลทุเรียนเพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นรูปแบบของผลไม้ชนิด climacteric (ภาพที่ 3) และพบว่า การอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 3 วันหลังการเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 2) การป้ายข้าวผลด้วยเอทิลีนสามารถชักนำให้ทุเรียนสุกโดยทำให้เนื้อทุเรียนอ่อนตัวอย่างรวดเร็ว (Sriyook *et al.*, 1994; Ketsa and Pangkool, 1996; Maninang *et al.*, 2011; Siriphanich *et al.*, 2011) ในทางตรงข้ามการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP สามารถชะลอการสุกได้ (Maninang *et al.*, 2011) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในละมุด (Arevalo-Galarza *et al.*, 2007; Kunyamee *et al.*, 2008) แอปเปิ้ล (Harb *et al.*, 2012) กลั้ว (Trivedi and Nath, 2004; Asha *et al.*, 2007) มะม่วง (Sane *et al.*, 2005) ผลกีวี (Yang *et al.*, 2007) และสตอร์เบอร์รี่ (Figuroa *et al.*, 2009)

ยีน expansin เป็นยีนกลุ่มใหญ่ (multigene family) จากผลการจำแนกยีน expansin พบว่ามี 3 ยีน ซึ่งเป็นชนิดแอลฟา (alpha expansin) ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบส่วนของ Trp residues บริเวณ C-terminal และพบส่วนของ HFD motif บริเวณตอนกลางของยีน ซึ่งส่วนประกอบเหล่านี้พบในยีน ezpansin (Shcherban *et al.* 1995; Cosgrove 2000a) และเมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่า *DzEXP1* มีระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกของการอ่อนตัวของเนื้อของผลทุเรียนและสอดคล้องกับผลของการให้เอทิลีน ซึ่งแสดงว่ายีน *DzEXP1* มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนตัวของเนื้อ นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า ยีน *DzEXP2* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสาร 1-MCP แสดงว่ายีน *DzEXP2* อาจส่งผลทางอ้อมต่อการอ่อนนุ่มที่รวดเร็วของเนื้อทุเรียนโดยทำการเปลี่ยนแปลงโครงข่าย cellulose-xyloglucan ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ hydrolase และ/หรือ transglycosylase ทำงานซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทที่สำคัญทำให้ผลไม้เกิดการอ่อนนุ่ม (Rose and Bennett, 1999) นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *DzEXP2* มีระดับต่ำ และการให้เอทิลีนชักนำการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นในเนื้อทุเรียนเท่านั้น และไม่มีการตอบสนองต่อการให้สาร 1-MCP ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *DzEXP2* เกี่ยวข้องกับการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในมะเขือเทศ (Rose *et al.*, 1997, Brummell *et al.*, 1999b) และสาลี (Hiwasa *et al.*, 2003)

นอกจากยีน expansin แล้ว ในระหว่างการสุกผลไม้บทบาทของ cell wall modifying enzymes มีความสำคัญต่อการอ่อนนุ่มและการเสื่อมสลายของเซลล์ จากการจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของยีน *DzEXPs*, *DzPME*, *DzPL*, *DzPG*, *DzGAL* และ *DzEG* พบว่ายีนที่สามารถจำแนกได้เป็นยีนที่ทำงานและส่งผลต่อการเสื่อมสภาพของเซลล์พืช ภายหลังจากเปรียบเทียบและวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า ยีนที่พบมีส่วนอนุรักษ์ที่สำคัญ ได้แก่ ยีน *DzPME* มีส่วนประกอบของ catalytic residues aspartate (ภาพที่ 7) (Lui *et al.*, 2013) ยีน *DzPL* มีส่วนประกอบของ conserved motifs 3 ส่วนที่สำคัญ คือ motif 1 (WVDH) motif 2 (DGLIDAIMGSTAITISN NYF) และ motif 3 (LIQRMPRCRHGYFHVNNNDY) รวมถึง aspartate (D) ซึ่งทำงานร่วมกับแคลเซียม (ภาพที่ 8) (Singh *et al.*, 2011) ยีน *DzPG* พบส่วนของ putative conserved

polygalacturonase active site (ภาพที่ 9) (Fabi *et. al.*, 2009) ยีน *DzGAL* พบส่วนของ putative active site of the glycoside hydrolase family 35 (G-G-P-[LIVM](2)-x(2)-Q-X-E-N-E-[FY]) บริเวณด้าน N-terminal และพบ galactose binding lectin domain บริเวณด้าน C-terminal (ภาพที่ 10) (Tateishi *et. al.*, 2007) และยีน *DzEG* พบส่วนของ Cystein residues และส่วนของ glycosyl hydrolase active site motif (SYMVGYGNNYPRQVHHR และ FADERDNYEQTEPATYNNA) (ภาพที่ 11) (Xiao *et. al.*, 2009)

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ในระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *DzPG* เพิ่มสูงขึ้นระหว่างการลดลงของความแข็งของเนื้อทุเรียน โดยระดับการแสดงออกของยีนสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 5.9 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อทุเรียนภายหลังการเก็บเกี่ยว และลดลงในเวลาต่อมา (ภาพที่ 14c) อย่างไรก็ตามเมื่อได้รับเอทิลีน โดยการป้ายข้าวผลด้วยเอทิลฟอนสามารถชักนำให้ยีนมีการแสดงออกในระดับสูงสุดในวันที่ 2 เท่ากับ 9.3 เท่า นอกจากนี้การใช้สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DzPG* ผลการทดลองดังกล่าวสนับสนุนรายงานกิจกรรมของเอนไซม์ PG ในเนื้อทุเรียนที่สูงขึ้นต่อเนื่องในระหว่างการสุกซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเสื่อมสภาพของเพคติน (Ketsa and Daengkanit, 1999; Imsabai *et. al.*, 2002) และสอดคล้องกับ บทบาทของยีน PG ที่มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนนุ่มของผลละมุด (Kunyamee *et. al.*, 2010) นอกจากนี้ผลของตอบสนองของการให้สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP สามารถยับยั้งการอ่อนนุ่มของเนื้อและยับยั้งการแสดงออกของยีน *DzPG* สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ PG ในกล้วยที่มีระดับต่ำ (Lohani *et al.*, 2004) ในระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *DzPL* สูงขึ้นทั้งในชุดควบคุมและเมื่อได้รับเอทิลีนมีระดับการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 2 เท่ากับ 5.1 เท่า ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าบทบาทของ PL ส่งผลต่อการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนเช่นเดียวกับผลการทดลองในมะม่วง (Chourasia *et. al.*, 2006) และกล้วย (Marín-Rodríguez *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามพบว่า การแสดงออกของยีน *DzPME*, *DzGAL* และ *DzEG* ไม่สอดคล้องกับการอ่อนนุ่มของเนื้อและผลการให้สารเอทิลีนหรือสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP (ภาพที่ 14-15) อย่างไรก็ตามการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเพคติน (Imsabai *et. al.*, 2002) ดังนั้นกิจกรรมของยีน *DzPME*, *DzGAL* และ *DzEG* อาจยังมีส่วนช่วยในการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนซึ่งยีนเหล่านี้ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่น hydrolase enzymes (polygalacturonase, pectin methylesterase,  $\beta$ -galactosidase, and endo- (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-glucanase or EGase) และ transferase enzyme (xyloglucan endotransglycosylase) (Brummell and Harpster, 2001)

## สรุป

การศึกษาผลของเอทิลีนและสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) ที่มีผลต่อกระบวนการสุกของผลทุเรียนศึกษาคุณสมบัติและการแสดงออกของยีน cellwall hydrolase ได้แก่ ยีน *Exp*, *PG*, *PME*,  $\alpha$ -*gal*, *EGase* และ *PL* ระหว่างการสุกของผลทุเรียนพันธุ์หมอนทอง สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. การใช้เอทิลีนสามารถกระตุ้นให้ผลทุเรียนสุกเร็วขึ้น เกิดการอ่อนนุ่มของผลทุเรียนรวดเร็วและการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP สามารถชะลอการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียนได้
2. ในระหว่างการสุกของผลพบการแสดงออกของยีน expansin คือ *DzEXP1* *DzEXP2* *DzEXP3* ในเนื้อผลระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อ แต่ยีน *DzEXP1* และ *DzEXP2* มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนนุ่มของทุเรียน
3. ในระหว่างการสุกของผลพบการแสดงออกของยีน cell wall modifying enzymes คือ *DzPG*, *DzPME*, *DzGAL*, *DzEG*, และ *DzPL* ในเนื้อระหว่างการอ่อนนุ่มของเนื้อทุเรียน แต่ยีน *DzPG* เท่านั้นที่มีบทบาทในการควบคุมการอ่อนนุ่มของเนื้อ

### ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)  
อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับ
2. การยื่นจดสิทธิบัตร
3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดย ภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)
4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)  
มีการจดทะเบียนยีน Expansin ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 256108A1080002 สัญญาเลขที่ 38/2559  
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ คุณสมบัติและการแสดงออกของยีน cell wall hydrolase ระหว่างการสุกของผล  
ทุเรียน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. ยศพล ผลาผล

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 21 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	215,550 บาท	เมื่อ 31 มีนาคม 2559
งวดที่ 2 (40%)	172,440 บาท	เมื่อ 19 ธันวาคม 2560
งวดที่ 3 (10%)	43,110 บาท	
	รวม 431,110 บาท	

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	30,000	30,000	
2. ค่าจ้าง	50,000	50,000	
3. ค่าวัสดุ	210,000.	210,000.	
4. ค่าใช้สอย	97,990	97,990	
5. ค่าครุภัณฑ์			
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน)	43,110	43,110	
รวม	431,110		

(.....)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

### เอกสารอ้างอิง

- จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการหายใจของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- Arevalo-Galarza, L., Bautista-Reyes, B., Saucedo-Veloz, C. and Martinez-Damian, T. 2007. Cold storage and 1-methylcyclopropene (1-MCP) applications on sapodilla fruits (*Manilkara sapota* (L.) P. Royen). *Agrociencia* 41, 469-477.
- Asha, V., Sane, A., Sane, A.P. and Nath, P. 2007. Multiple of  $\alpha$ - expansin genes are expressed during banana fruit ripening and development. *Postharvest Biol. Technol.* 45: 184-192.
- Blankenship, S.M. and Dole, J.M. 2003. 1-Methylcyclopropene: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1-25.
- Brummell, D. A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* **33**: 103–119.
- Brummell, D.A. and Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47: 311–340.
- Brummell, D.A., Hall B.D. and Bennett, A. 1999a. Antisense suppression of tomato endo-1, 4- $\beta$ -glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zone but does not affect fruit softening. *Plant Mol. Biol.* 40: 615-622.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., Civello, P.M., Palys, J.M., Bennett, A.B. and Dunsmuir, P. 1999b. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11, 2203–2216.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H. and Dunsmuir, P. 1999c. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Mol. Biol.* 39: 161-169.
- Brummell, D.A., Howie, W.J., Ma. C. and Dunsmuir, P. 2002. Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin. *Postharvest Biol. Technol.* 25: 209-220.
- Burns, J. 2004. Abscission in citrus fruit, leaves and flowers: Physiology, molecular biology and possible points of control. In *Proceedings of the Citrus Abscission Workshop 1998*. Citrus Research and Education Centre, Lake Alfred, Florida. 28-34.

- Catala, C., Rose, J.K.C. and Bennett, A.B., 2000. Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 122:527-534.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11(2), 113-116.
- Choi, D., Cho, H. and Lee, Y. 2006. Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiol. Plant.* 126(4): 511-518.
- Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A. and Bennett, A.B. 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* 121, 1273-1279.
- Cosgrove, D.J. 1997. Creeping wall, softening fruit, and penetrating pollen tubes: the growing roles of expansins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5504-5505.
- Cosgrove, D.J. 1998. Update on cell growth: cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol.* 118: 333-339.
- Cosgrove, D.J. 2000a. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 109-124.
- Cosgrove, D.J. 2000b. Loosening of plant cell wall by expansins. *Nature* 407: 321-326.
- Dotto, M.C., Martinez, G.A. and Civello, P.M. 2006. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiol and Biochem.* 44: 301-307.
- Dumville, J. C., and Fry, S. C. 2003. Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymatic mechanism of fruit softening. *Planta* **217**: 951–961.
- Fabi, J.P., Cordenunsi, B.R., Seymour, G.B., Lajolo, F.M. and do Nascimento, J.R. 2009. Molecular cloning and characterization of a ripening-induced polygalacturonase related to papaya fruit softening. *Plant Physiol. Biochem.* 47 (11-12), 1075-1081
- Ferrarese, L., Trainotti, P. Moretto, P. de Laureto, N.R. Polverino and G. Casadoro. 1995. Differential ethylene-inducible expression of cellulase in pepper plants. *Plant Mol. Biol.* 29: 735-747.
- Figueroa, C.R., Pimentel, P., Dotto, M.C., Civello, P.M., Martinez, G.A., Herrera, R. and Moya-Leon, M.A. 2009. Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: Effect of auxin treatment. *Postharvest. Biol. Technol.* 53 : 51–57.
- Fischer, R.L. and Bennett. A.B. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 42: 675-703.
- Gaete-Eastman, C., Figueroa, C.R., Balbontin, C., Moya, M., Atkinson, R.G., Herrera, R. and Moya-Leon, M.A. 2009. Expression of an ethylene-related expansin gene

- during softening of mountain papaya fruit (*Vasconcellea pubescens*).  
*Postharvest. Biol. Technol.* 53:58–65
- Goulao, L.F., Cosgrove, D.J. and Oliveira, C.M. 2008. Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples. *Postharvest Biol. Technol.* 48: 37-51.
- Hadfield, K.A. and Bennett, A.B. 1998. Polygalacturonase: many genes in search of a function. *Plant Physiol.* 117: 337-343.
- Hall, L.N., Tucker, G.A., Smith, C.J.S., Watson, C.F. Seymour, G.B., Bundick, Y., Boniwell, J.M., Fletcher, J.D. Ray, J.A. Schuch, W. Bird C.R. and Grierson, D. 1993. Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant J.* 3: 121–129.
- Harb, J., Gapper, N.E., Giovannoni, J.J. and Watkins, C.B. 2012. Molecular analysis of softening and ethylene synthesis and signaling pathways in a non-softening apple cultivar, ‘Honeycrisp’ and a rapidly softening cultivar, ‘McIntosh’.  
*Postharvest. Biol. Technol.* 64: 94–103.
- Hiwasa, K., Rose, J.K.C., Nakano, R., Inaba, A. and Kubo, Y. 2003. Differential expression of seven  $\alpha$ -expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiol. Plant.* 117, 564-572.
- Hoeberichts, F.A., Van Der Plas L.H.W. and Woltering, E.J. 2002. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 26: 125-133.
- Imsabai, W., Ketsa, S. and Doorn, W. G. 2002. Effect of temperature on softening and the activities of polygalacturonase and pectinesterase in durian fruit.  
*Postharvest Biol. Technol.* 26: 347–351.
- Ishimaru, M., D.L. Smith, K.C. Gross and S. Kobayashi. 2007. Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries. *J. Plant Physiol.* 164: 1675-1682.
- Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevaldo, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J. L., López-Aranda, J. M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A., and Mercado, J. A. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* 128: 751–759.
- Ketsa, S. 1997. Durian, pp. 323-334. S. Mitra (ed.). In *Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits*. CAB International, Oxon.



- Ketsa, S. and Daengkanit, T. 1999a. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase,  $\beta$ -galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. *Scientia Hortic.* 80: 181-188.
- Ketsa, S. and Daengkanit, T. 1999b. Softening of durian cultivars. *J. Plant Physiol.* 154: 408-411.
- Ketsa, S. and Pangkool, S. 1996. Effect of maturity stages and ethylene treatment on ripening of durian fruits. Proceedings of the Australasian postharvest horticulture conference Science and technology for the fresh food revolution', Melbourne, Australia, 18-22 September, 1995: 67-72.
- Khurnpoon, L., Siriphanich, J. and Labavitch, J.M. 2008. Cell wall metabolism during durian fruit dehiscence, *Postharvest Biology and Technology*, 48(30): 391-401,
- Khurnpoon. 2007. Change in cell wall composition and enzyme activities in husk dehiscence of 'Mongthong' durian. *Ph.D. thesis*, Kasetsart University. Bangkok
- Kunyamee, S., Ketsa, S., Imsabai, W. and van Doorn, W.G. 2008. The transcript abundance of an expansin gene in ripe sapodilla (*Manilkara zapota*) fruit is negatively regulated by ethylene. *Funct. Plant Biol.* 35, 1205–1211
- Kunyamee, S., Ketsa, W. and van Doorn, W.G. 2010. Gene expression of cell-wall degrading enzymes in sapodilla (*Manilkara zapota*) fruit. *ScienceAsia*: 36: 18-25.
- Lang, C. and D'ornenburg, H. 2000. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 366–375.
- Lewis, L.N. and Varner. J.E. 1970. Synthesis of cellulase during abscission of *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Plant Physiol.* 46:194-199
- Liu, Q., Talbot, M. and Llewellyn D.J. 2013 Pectin Methyltransferase and pectin remodelling differ in the fibre walls of two *Gossypium* species with very different fibre properties. *PLoS ONE* 8(6): e65131
- Lohani, S., Trivedi, P.K. and Nath P. 2004. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biol. Technol.* 1:1-8.
- Maninang, J. S., Wongs-Aree, C., Kanlayanarat, S., Sugaya, S. and Gemma, H. 2011. Influence of maturity and postharvest treatment on the volatile profile and physiological properties of the durian (*Durio zibethinus* Murray) fruit. *Inter. Food Res. J.* 18(3): 1067-1075.
- Marin-Rodriguez, M.C., Orchard, J. and Seymour, G.B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53(377), 2115-2119.

- Mbenguie-A-Mbenguie, D., Gouble, B., Gomez, R.M., Audergon, J.M., Albagnac, G. and Fils-Lycaon, B. 2002. Two expansin cDNAs from *Prunus armeniaca* expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 445-452.
- McQueen-Mason, S. and Cosgrove, D.J. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6574-6578.
- Meakin, P.J. and Roberts, J.A. 1990. Dehiscence of fruit in oilseed rape (*Brassica napus*, L.). II. The role of cell wall degrading enzymes. *J. Exp. Bot.* 41:1003-1011
- Narin, C.J., Lewandowski D.J. and Burns, J.K. 1998. Genetics and expression of two pectinesterase gene in Valencia orange. *Physiol. Plant.* 102: 226-235.
- Phan, T.D., Bo, W., West, G., Lycett G.W. and Tucker, G.A. 2007. Silencing of the major salt-dependent isoform of pectinesterase in tomato alters fruit softening. *Plant Physiol.* 144: 1960-1967.
- Prasanna, V., Prabha, T.N. and Tharanathan, R.N. 2007. Fruit ripening phenomena-An overview. *Crit.Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 1-19.
- Reiter., W. 1998. *Arabidopsis thaliana* as a model system to study synthesis, structure, and function of the plant cell wall. *Plant Physiol. Biochem.* 36:167-176.
- Rose, J.K.C. and Bennett, A.B. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell wall: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 4: 176-183.
- Rose, J.K.C., Lee, H.H. and Bennett, A.B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5955-5960.
- Sampedro, J. and D.J. Cosgrove. 2005. The expansin superfamily. *Gen. Biol.* 6: 242.
- Sane, V.A., Chourasia, A. and Nath,.P. 2005. Softening in mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) is correlated with the expression of an early ethylene responsive, ripening related expansin gene, MiExpA1. *Postharvest Biol. Technol.* 38: 223-230.
- Santiago-Domínech, N., Jiménez-Bemúdez, S., Matas, A.J., Rose, J.K., Muñoz-Blanco, J., Mercado J.A. and Quesada, M.A. 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *J. Exp. Bot.* 59: 2769-2779.
- Sexton, R. and Roberts, J.A. 1982. Cell biology of abscission. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 133-162.

- Shcherban, T.Y., Shi, J., Durachko, D.M., Gultinan, M.J., McQueen-Mason, S.J., Shieh, M. and Cosgrove, D.J. 1995. Molecular-cloning and sequence-analysis of expansins: a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell-wall extension in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:9245–9249.
- Singh, A.P., Pandey, S.P., Rajluxmi, Pandey, S., Nath, P. and Sane, A.P. 2011. Transcriptional activation of a pectate lyase gene, RbPel1, during petal abscission in rose. *Postharvest Biol. Technol.* 60 (2), 143-148
- Siriphanich, J., Pakcharoen, A., Mohpraman, K. and Tisarum, R. 2011. The effect of shading and leaf flushing on the ripening pattern of durians. *J. Jpn Soc Horti Sci.* 80(3): 365-371.
- Sriyoot, S. Siriatiwat, S. and Siriphanich, J. 1994. Durian fruit dehiscence-water status and ethylene. *HortSci.* 29 (10): 1195-1198.
- Subhadrabanhu, S. and Ketsa., S. 2001. *Durian: King of Tropical Fruit*. CAB International, Wellington. 178 p.
- Tateishi, A., Shiba, H., Ogihara, J., Isobe, K., Nomura, K., Watanabe, K. and Inoue, H. 2007. Differential expression and ethylene regulation of beta-galactosidase genes and isozymes isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 45, 56-65
- Tieman, D.M., Harriman, R.W., Ramamohan, G. and Handa, A.K. 1992. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* 4: 667–679.
- Tongdee, S.C, Suwanagul, A. and Neamprem, S. 1990. Durian fruit ripening and effect of variety, maturity stage at harvest and atmosphere gases. *Acta Horti.* 269: 323-334.
- Trivedi, P.K. and Nath, P. 2004. MaExp1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit. *Plant Sci.* 167: 1351-1358.
- Tucker, M.L., Sexton, R. del Campillo E. and Lewis. L.N. 1988. Bean abscission cellulase: characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin. *Plant Physiol.* 88: 1257-1262.
- van Doorn, W.G. and A.D. Stead. 1997. Abscission of flowers and floral parts. *J. Exp. Bot* 48: 821-837.
- Wang, Y., Lu, W., Jiang, Y., Luo, Y., Jiang W. and Joyce, D. 2006. Expression of ethylene-related expansin genes in cool-stored ripening banana fruit. *Plant Sci.* 170: 962-967.

- Xiao, R., Chen, J.Y., Chen, J-W., Ou, M. Jiang, Y-M., Lin, H.-T. and Lu, WJ. 2009. Expression analysis of endo-1,4- $\beta$ -glucanase genes during aril breakdown of harvested longan fruit *J.Sci.Food Agri.* 89(7): 1129-1136
- Yang, S., Sun, C., Wang, P., Shan, L., Cai, C., Zhang, B., Zhang, W., Li, X., Ferguson, I.B. and Chen, K. 2008. Expression of expansin genes during postharvest lignification and softening of 'Luoyangqing' and 'Baisha' loquat fruit under different storage conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 46-53.
- Yang, S., Xu, C., Zhang, B., Li, X. and Chen, K. 2007. Involvement of both subgroups A and B of expansin genes in kiwifruit fruit ripening. *HortSci.* 42(2): 315-319.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 โพรเมอร์ชนิดไม่เฉพาะเจาะจงที่ใช้ในการทำ PCR

Gene name	Nucleotide primer
<i>DzEXP1</i>	F- GYDATYTTYGCWGARGTBATG R- AGATTNGAHGGYAABCCRTTGTTG
<i>DzEXP2</i>	F-CAGCCCAARTCCAARATCAC R-ATCCAGAARAKBGARTTCCA
<i>DzEXP3</i>	F-AAGTTCACRGSSATMGGMGTRTACTTGG R- 3' GeneRacer primer
<i>DzPME</i>	F-TTGCTGCTYTTGGRRATWGGYTC R-3' GeneRacer primer
<i>DzPL</i>	F- AYTGYTGGMGDTGYGACC R- NCCYTCHGAYCKCCARTTCC
<i>DzPG</i>	F-TTWGGAGCYARAGSDRATGG R- CCAATRCTRATTCCRTGGCC
<i>DzGAL</i>	F-TCTCAYGRAGKTCCYATTARTC R-3' GeneRacer primer
<i>DzEG</i>	F-TAYTAYGAYGCNNGNGAYAA R-AANCCNACCATRTANCWCAT

ตารางผนวกที่ 2 โพรเมอร์ชนิดเฉพาะเจาะจงที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

Gene name	Nucleotide primer
<i>DzEXP1</i>	F-ATGGCTCGGCCACCTATTGA R- CTGGAAGTTGCCACCGTGAATG
<i>DzEXP2</i>	F-GGCCTTCTGATACCCACTTGGACT R- GGATGGTTTGGGCCGAGATA
<i>DzEXP3</i>	F-GAAGAGGAGGAAGAGGCGTTGGA R- GGCAGTGGGTGAAGTTACTGGGAA
<i>DzPME</i>	F-CTTTCACCTCTGGCCTTTAATTTG R- GCATTTTTGGTGCTATTGTTCAATTT
<i>DzPL</i>	F-TGCTGATCATTAGCAGAATTCCTACA R- CCTTACAGGCGATTTTCATACACG
<i>DzPG</i>	F-CTATGTAAATTGAGTGAAGGGAAAGC R- CTCCTGAACAAATAATCTGGATTGTG
<i>DzGAL</i>	F-GTGCAGCCCATTTAGTGTATGCTTTTCC R- CAAATGAGCCACCATTCTGTATGAATCG
<i>DzEG</i>	F-TGATGAAAGCAAACAGGAACCTCT R- CGTAATCCCATGAATGGAAATCC
<i>DzACT</i>	F-ACCTGCCATGTATGTTGCCATC R-CTTCATAGATTGGCACAGTGTGAGA