บทบาทของไทอะมีน (วิตามินบี 1) ในพืช

The Role of Thiamine (Vitamin B1) in Plants

ภาคภูมิ พระประเสริฐ*

Phakpoom Phraprasert*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

วันที่ได้รับบทความ 25 มิถุนายน พ.ศ. 2558

วันที่ตอบรับตีพิมพ์ 17 กันยายน พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

Thiamine หรือ วิตามินบี 1 เป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์และสัตว์ และจำเป็นต้องได้รับวิตามินนี้จากจุลินทรีย์หรือพืช โดยพืชสามารถสร้าง thiamine ได้จาก thiazole (4-methyl-5-β-hydroxyethiazolium) และ pyrimidine (4-amino-2-methyl-5-pyrimidyl) ได้ thiamine ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์เกิดขึ้นในพลาสติค การสังเคราะห์ thiamine ถูกควบคุมโดยไรโบสวิทช์ (ribostwitch) บน thiC mRNA พืชสร้าง thiamine ได้หลายรูป แต่รูปที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ thiamine pyrophosphate ที่มีบทบาทในการเป็น cofactor สำหรับเอนไซม์ที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน นอกจากนี้ thiamine ช่วยให้พืชสามารถต้านทานความเครียดที่เกิดจาก NaCl ภาวะแล้ง oxidative molecules และเชื้อก่อโรคได้

คำสำคัญ : ไทอะมีน การสังเคราะห์ไทอะมีน วิตามินบี 1 การตอบสนองของพืช

Abstract

Thiamine or vitamin B1 is an essential vitamin for animals and human beings which have to intake this vitamin produced from microorganisms or plants. The biosynthesis of thiamine from plants is carried by the condensation between thiazole (4-methyl-5-β-hydroxyethiazolium) and pyrimidine (4-amino-2-methyl-5-pyrimidyl) in plastids. Thiamine biosynthesis is mainly regulated by the riboswitch on the thiC mRNA. There are several forms of thiamine found in plants but the active one is thiamine pyrophosphate (TPP). TPP is an important cofactor for several enzymes involved in carbohydrate metabolism, photosynthesis and nitrogen metabolism. In addition, thiamine can increase plant resistance to stresses from NaCl, drought, oxidative molecules, and diseases.

Keywords : Thiamine, Thiamine Biosynthesis, vitamin B, plant responses

*Corresponding author. E-mail: phakpoompp@yahoo.com

บทนำ

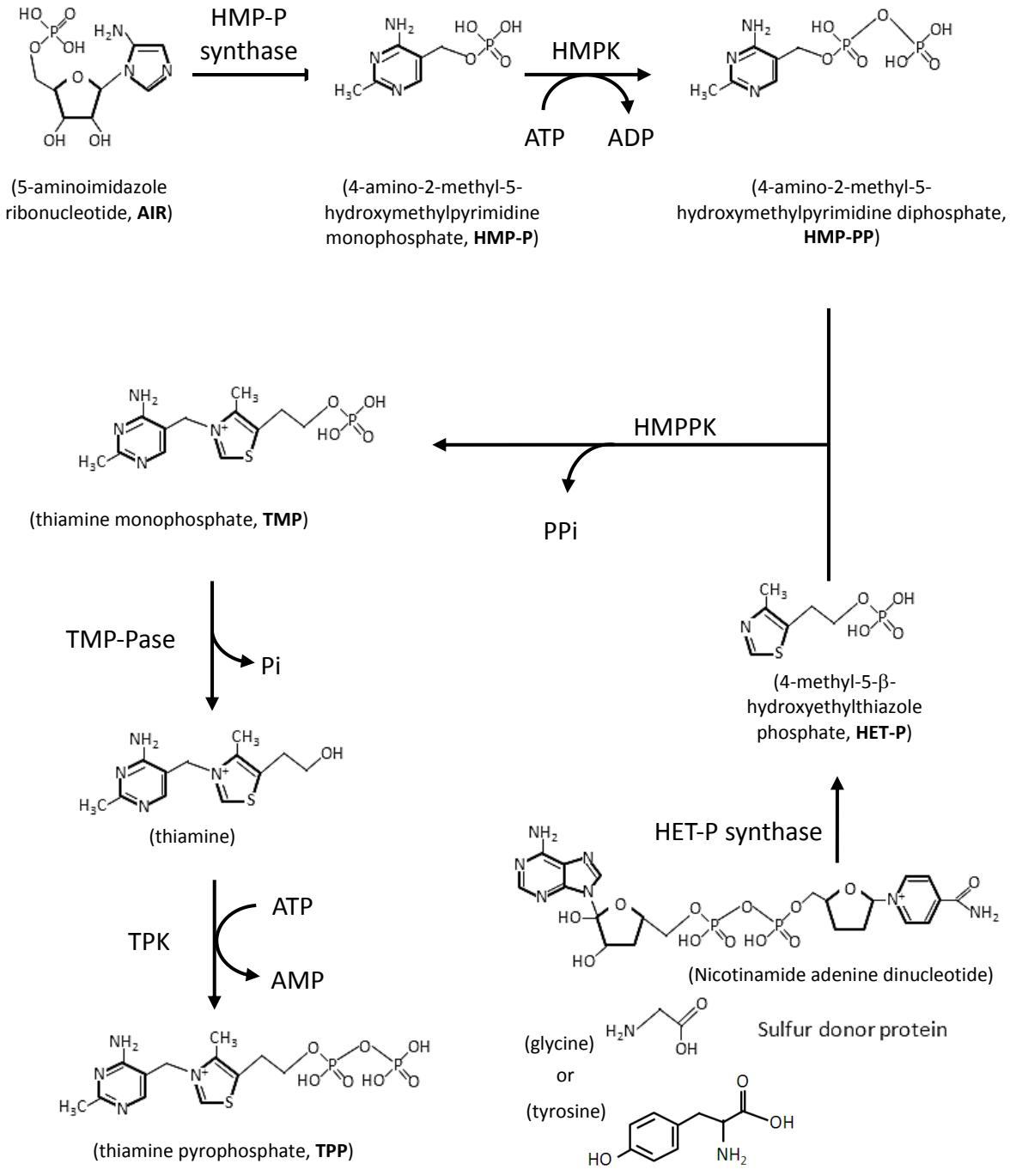
Thiamine หรือวิตามินบี 1 เป็นวิตามินที่จำเป็นสำหรับมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้างวิตามินชนิดนี้ได้ (Sriram *et al*., 2012) และหากขาด thiamine แล้วทำให้เป็นโรคเหน็บชา (Beriberi) การทำงานของเนื้อเยื่อและระบบประสาทผิดปกติ (Roje, 2007; Ba, 2008) ดังนั้นมนุษย์และสัตว์จำเป็นต้องได้รับ thiamine จากอาหารที่มาจากจุลินทรีย์และพืช (Ba, 2008) อย่างไรก็ตาม thiamine เป็นสารที่มีความสำคัญต่อพืชด้วยเช่นกัน โดยมีบทบาทในการเป็น cofactor สำหรับเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Sriram *et al*., 2012) การสังเคราะห์ด้วยแสง (Bi *et al*., 2013) และเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน (Araujo *et al.,* 2008) ซึ่งเป็น thiamine ที่อยู่ในรูป thiamine pyrophosphate นอกจากนี้ thiamine ยังมีบทบาททางสรีรวิทยาของพืช โดยมีผลให้พืชที่อยู่ในภาวะเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น เกลือ ภาวะแล้งและเชื้อก่อโรคพืช สามารถมีความต้านทานต่อภาวะเหล่านี้ได้ดีขึ้น ดังนั้นจึงได้ทำการรวบรวมความรู้จากบทความวิจัยและวิชาการ ต่าง ๆ โดยมุ่งเน้นที่กระบวนการสังเคราะห์ thiamine และการควบคุม รวมทั้งบทบาทของ thiamine ที่มีต่อพืช ซึ่งการเข้าใจกระบวนการสร้างและบทบาทของ thiamine ในพืชอาจก่อให้เกิดการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารของธัญพืช หรือนำไปใช้เพื่อเพิ่มความต้านทานของพืชต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เพื่อลดความเสียหายและเพิ่มผลผลิตจากธัญพืชหรือพืชอาหารกลุ่มอื่น ๆ เป็นการสร้างความมั่งคงทางอาหารของประเทศและโลกต่อไป

การสังเคราะห์ thiamine ในพืช

thiamine มีโครงสร้างประกอบด้วย pyrimidine (4-amino-2-methyl-5-pyrimidyl) และ thiazole (4-methyl-5-β-hydroxyethiazolium) ที่ต่อกันด้วย methylene bridge โดย thiamine ที่ได้นี้อาจได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตเป็น thiamine monophosphate (TMP) thiamine diphosphate (หรือ thiamine pyrophosphate, TPP) และ thiamine triphosphate ตามลำดับ ในการสังเคราะห์ thiamine ประกอบด้วย การสังเคราะห์ pyrimidine การสังเคราะห์ thiazole และ การสังเคราะห์ TPP

<u>การสังเคราะห์ pyrimidine</u>

การสังเคราะห์ pyrimidine มี 5-aminoimidazole ribonucleotide (AIR) เป็นสารตั้งต้น (Chatterjee *et al.,* 2007; Goyer, 2010) จากนั้น AIR จะเปลี่ยนเป็น 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine monophosphate (HMP-P) โดยเอนไซม์ HMP-P synthase สร้างมาจากยีน *ThiC* (Rapala-Kozik *et al*., 2008) มีรายงานการแสดงออกของยีน *ThiC* และมีความสัมพันธ์กับปริมาณการสร้าง HMP-P ใน *Arabidopsis* (Raschke *et al*., 2007) จากนั้นเมื่อ HMP-P ได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตจาก ATP โดย HMP-P kinase (HMPK) ได้ 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine diphosphate (HMP-PP) (Rapala-Kozik *et al*., 2008; Goyer, 2010) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์ thiamine ในพืช

การสังเคราะห์ thiazole

การศึกษาการสังเคราะห์ thiazole มีการศึกษาอย่างมากในยีสต์ ซึ่งยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) สังเคราะห์ thiazole จาก deoxy-D-xylulose-5-phosphate และ glycine/tyrosine โดยมี cysteine เป็นโมเลกุลที่ให้ซัลเฟอร์ ได้ 4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole phosphate (HET-P) โดยการทำงานของโปรตีน THI4 (Chatterjee *et al*., 2007; Yazdani *et al*., 2013) อย่างไรก็ตาม Julliard *et al*. (1991) พบว่า พืชสามารถใช้ glyceroldehyde-3-phosphate และ pyruvate ในการสร้าง 1-deoxy-D-threo-2-pentulose และใช้เป็นสารตั้งต้นแทนการใช้ deoxy-D-xylulose-5-phosphate สำหรับการสร้าง thiazole ได้ ทั้งนี้ยังพบด้วยว่าในคลอโรพลาสต์ของผักขม (*Spinacia oleracea*) มีการใช้กรดอะมิโน tyrosine ในการสร้าง HET-P Belanger *et al*. (1995) ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสบนยีน *thi1* ที่พบในพลาสติด (plastid) ของต้นข้าวโพดและยีสต์ พบว่ามีลำดับเบสและการทำงานของโปรตีนคล้ายคลึงกัน และการศึกษาด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoblot analysis) พบว่าโปรตีน thi1 อยู่ที่เมมเบรนของพลาสติด เป็นผลผลิตของยีน *THI1* และมีความสัมพันธ์ต่อการสร้าง HET-P ใน *Arabidopsis thaliana* (Smith *et al*., 2007) สำหรับในข้าว (*Oryza sativa* L.) พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *OsDr8* ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นยีนสำหรับสร้าง HET-P synthase มีผลต่อปริมาณการสังเคราะห์ thiazole และ thiamine (Wang *et al*., 2006) (ภาพที่ 1)

การสังเคราะห์ TPP

การสังเคราะห์ TMP เป็นขั้นตอนที่พืชใช้ pyrimidine จาก HMP-PP รวมกับ HET-P ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ HMPP kinase (HMPPK) (Moore, 2004) การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์จากยีน *BTHI* ของ *Brassica napus* พบว่าเอนไซม์นี้สามารถทำหน้าที่ได้ 2 แบบ คือ ที่ด้าน N-terminal ของโปรตีนมีคุณสมบัติในการทำงานแบบ HMPP kinase ส่วนด้าน C-terminal ของโปรตีนมีคุณสมบัติในการทำงานแบบ TMP-Pase (thiamin-phosphate pyrophosphorylase) (Kim *et al*., 1998) ซึ่งโปรตีนนี้มีกิจกรรมอยู่ในพลาสติด (Belanger *et al*., 1995) เช่นเดียวกับการศึกษาใน *A. thaliana* พบว่า เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาได้ 2 แบบ และมีกิจกรรมอยู่ในคลอโรพลาสต์ (Ajjawi *et al*., 2007b) TMP นี้จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูป thiamine ก่อนที่จะได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตเป็น TPP ซึ่งเป็นรูปที่มีผลทางสรีรวิทยาต่อพืช เช่น การทำหน้าที่เป็น โคแฟคเตอร์ (cofactor) การเติมฟอสเฟตให้กับ thiamine อาศัยการทำงานของเอนไซม์ thiamine pyrophosphokinase (TPK) (Rapala-Kozik *et al*., 2009) ซึ่งมีรายงานว่ามีการแสดงออกในไซโทพลาสซึมของ *Arabidopsis* (Ajjawi *et al*., 2007a) (ภาพที่ 1)

การควบคุมการสังเคราะห์ thiamine

การควบคุมโดยไรโบสวิตช์

ไรโบสวิตช์ (riboswitch) เป็นการควบคุมโดยที่ mRNA จับกับโมเลกุลขนาดเล็ก และมีผลในการลดหรือเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนจากลำดับเบสบน mRNA (Mauger *et al*., 2013) ในการสังเคราะห์ thiamine พบว่ามีการควบคุมโดยไรโบสวิตช์ในแบคทีเรีย โดย thiM mRNA สามารถจับกับ TPP (Serganov *et al*., 2006; Thore *et al*., 2006) โดยอาจไปมีผลให้หยุดการถอดรหัสของ mRNA หรืออาจไปมีผลป้องกันการเกาะของไรโบโซม ทำให้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ thiamine ลดลง (Li & Breaker, 2013) การควบคุมการสร้าง thiamine โดยไรโบสวิตช์นี้ยังมีรายงานการพบในรา

และพืชด้วย (Tokui *et al*., 2011; Li & Breaker, 2013) การควบคุมการสังเคราะห์ thiamine ผ่านการควบคุมโดยไรโบสวิตช์ของยีน *thiC* ใน *A. thaliana* ทำงานโดยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) เข้าจับกับหมู่ฟอสเฟตของ TPP จากนั้นส่วนนี้จะเข้าจับที่ TPP binding site ซึ่งอยู่ที่ส่วน intron ของ mRNA และที่ pyrimidine ของ TPP จะจับกับ mRNA มีผลให้โครงสร้างของ mRNA เปลี่ยนไปอยู่ในภาวะ "OFF" และไม่มีการแสดงออกของยีนนี้ (Thore *et al*., 2006) ต่อมา Wachter *et al*. (2007) พบว่าเมื่อ TPP จับกับ mRNA ของยีน *THIC* ที่บริเวณปลาย 3' ทำให้เกิด RNA folding และขัดขวาง RNA splicing ทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีน THIC ได้ การศึกษาในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* และ *Volvox carteri* พบว่ามีการควบคุมแบบไรโบสวิตช์ที่ยีน *THI4* และ *THIC* ซึ่งเป็นยีนสำหรับการสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาแรกของการสร้าง thiazole และ pyrimidine ตามลำดับ พบว่าสาหร่ายที่ได้รับ TPP มีการแสดงออกของยีน *THI4* และ *THIC* ลดลง การทดลองโดยทำให้เกิดมิวเทชัน (mutation) ของยีน *THIC* ที่บริเวณอนุรักษ์ (conserve region) มีผลทำให้การแสดงออกของยีนนี้ไม่ขึ้นกับปริมาณ TPP ทั้งนี้พบว่าบริเวณที่ TPP มาจับและเกิดการควบคุมแบบไรโบสวิตช์เป็นบริเวณอินทรอน (intron) มีผลให้ไม่สามารถอ่านรหัสหยุดได้จึงได้โปรตีนที่ไม่สมบูรณ์และไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ thiamine (Croft *et al*., 2007) หรืออาจมีผลให้ mRNA ที่ได้มีการสลายตัวเร็วกว่าปกติ โดยพบว่ามีอัตราการสลายตัวเป็น 63% ต่อชั่วโมง ในขณะที่ THIC-mRNA ปกติไม่พบการสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลาการศึกษา 2 ชั่วโมง (Bocobza *et al*., 2007)

<u>การควบคุมปริมาณ TPP</u>

TPP เป็น thiamine รูปที่ใช้เป็น cofactor ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์นั้นจะสังเคราะห์ได้ thiamine จากนั้นจึงจะได้รับการเติมฟอสเฟตจาก ATP โดยการทำงานของเอนไซม์ TPK อย่างไรก็ตามในการควบคุมปริมาณเกิดจากการสร้างและสลาย TPP เพื่อรักษาสมดุลของ TPP ภายในเซลล์ ซึ่ง จากการศึกษาของ Raschke *et al*. (2007) พบว่า *A. thaliana* ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *THIC* จำเป็นต้องได้รับ TPP จากอาหาร และพบอีกว่าปริมาณ thiamine ภายในเซลล์ลดปริมาณลงถึงร้อยละ 30 เมื่อเวลาผ่านไป 6 วัน ทั้งนี้กระบวนการสลายของ thiamine ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่าเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์หรือกลไกใด

<u>การสังเคราะห์ thiamine เกิดในพลาสติด</u>

รายงานการศึกษาของ Raschke *et al*. (2007) ที่พบว่าโปรตีน THIC มีการทำงานในพลาสติด ทั้งนี้ศึกษาโดยการติดตามด้วย YFP (yellow fluorescence protein) ที่นำไปติดกับยีน *THIC* และพบว่ามีการแสดงออกในบริเวณเดียวกันกับที่พบคลอโรพลาสต์ รวมทั้งการรายงานถึงการทำงานของโปรตีนต่าง ๆ ได้แก่ THI1 THI4 และ HMPPK ที่พบในคลอโรพลาสต์ (Belanger *et al*., 1995; Smith *et al*., 2007) ซึ่งก่อนหน้านี้ Julliard & Douce (1991) ได้รายงานว่า การสังเคราะห์ thiazole เกิดขึ้นในพลาสติด สอดคล้องกับรายงานของ Roje (2007) และ Gerdes *et al.* (2012) จากการศึกษาของ Shimizu *et al*. (1990) ที่ศึกษาการสะสม thiamine ในระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าว และพบว่าการสะสมจะมีมากในช่วงที่ผลข้าวมีสีเขียว ดังนั้นจึงทำให้เชื่อได้ว่าการสังเคราะห์ thiamine เกิดในพลาสติด อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ TPK มีการแสดงออกในไซโทพลาซึม ดังนั้นเมื่อคลอโรพลาสต์สังเคราะห์ Thiamine แล้วจำเป็นต้องส่งออกสู่ไซโทพลาซึมผ่านทาง transporter และนำไปสร้างเป็น TPP ต่อไป (Ajjawi *et al*., 2007a)

บทบาทของ thiamine ในพืช

บทบาทในการเป็นโคแฟคเตอร์สำหรับเอนไซม์ต่าง ๆ

thiamine ที่มีบทบาทเป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) เป็น thiamine ที่อยู่ในรูป TPP เป็นโคแฟคเตอร์สำหรับเอนไซม์หลายชนิดในเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวกับคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ pyruvate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, α-ketoglutarate dehydrogenase, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase และ transketolase (Rapala-Kozik *et al*., 2009; Michal & Schomburg, 2012)

เอนไซม์ pyruvate dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น acetyl CoA ปฏิกิริยามีการปล่อยคาร์บอนในรูปคาร์บอนไดออกไซด์ และได้ NADH หนึ่งโมเลกุล โดยใช้ TPP เป็นโคแฟคเตอร์ ซึ่งเอนไซม์นี้พบได้ทั้งในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ มีบทบาททั้งในด้านการสร้างสารตัวกลางใน Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) และการสร้างพลังงานสำหรับเซลล์ (Michal & Schomburg, 2012; Blume *et al*., 2013) เอนไซม์ pyruvate decarboxylase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น ethanol มีความสำคัญในกระบวนการรักษาการสร้างพลังงานในรูป ATP จาก substrate level phosphorylation ในภาวะที่เซลล์ขาดออกซิเจน (Michal & Schomburg, 2012) เอนไซม์ α-ketoglutarate dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่พบใน TCA cycle และต้องการ TPP เป็นโคแฟคเตอร์ เอนไซม์นี้เป็นเอ็นไซม์หนึ่งที่สำคัญในการควบคุม TCA cycle และยังมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการเปลี่ยนไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นไนโตรเจนอินทรีย์ (nitrogen assimilation) (Araujo *et al*., 2008) สำหรับเอ็นไซม์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวกับการสร้าง isoprenoid ในคลอโรพลาสต์ เช่น carotenoid, plastoquinone-9 และ phytol ซึ่งสำคัญต่อการสังเคราะห์ด้วยแสง เป็นต้น (Lichtenthaler, 1999)

เอนไซม์ transketolase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ใน Calvin cycle และ pentose phosphate pathway โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน ribose-5-phosphate และ xylulose-5-phosphate เป็น glyceroldehyde-3-phosphate และ seudoheptulose-7-phosphate ทั้งนี้ต้องการ TPP และ Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ ปฏิกิริยานี้มีส่วนสำคัญในการจำกัดการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (Bi *et al*., 2013) การทดลองในต้นยาสูบที่ถูกทำให้มีการแสดงออกของ เอนไซม์ transketolase มาก (over expression) มีผลให้ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น กลูโคส ฟลุคโตส ซูโคส และแป้งสูงขึ้น แต่จำเป็นต้องได้รับ TPP หรือ thiamine จากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ไม่เช่นนั้นจะแสดงอาการเหลืองและไม่เจริญเติบโต (Khozaei *et al.,* 2015)

บทบาทในการตอบสนองของพืชต่อปัจจัยทางกายภาพ

พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญอยู่กับที่ไม่สามารถเคลื่อนย้ายที่อยู่ได้ ดังนั้นเมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมเปลี่ยน พืชต้องมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถเจริญอยู่ได้ จากการศึกษาของ El-Shintinawy & El-Shourbagy (2001) พบว่าต้นกล้าข้าวสาลี ที่ได้รับการปลูกในสารละลายธาตุอาหารและได้รับ NaCl 100 mM มีการเจริญของรากลดลง แต่เมื่อได้รับเกลือร่วมกับ thiamine ทำให้การเจริญเติบโตของรากมากกว่าต้นปกติ รวมทั้งมีกรดอะมิโนที่ตอบสนองต่อเกลือ เช่น valine, isoleucine, aspartic acid และ proline อยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม สำหรับต้น *A. thaliana* ที่ได้รับ NaCl ความเข้มข้น 200 mM และทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ thiamine ได้แก่ *THI1 THIC TH1 TPK* พบว่ามีการแสดงออกสูงขึ้น 1.5-2.5 เท่า ภายใน 2 ชั่วโมง รวมทั้งเมื่อได้รับ สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ (โดยการให้ sorbitol ในสารละลายที่ใช้ปลูก) ก็มีการแสดงออกของยีนเหล่านี้สูงขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งพบว่ามีการสังเคราะห์ thiamine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญคือ thiamine ที่อยู่ในรูป TPP ซึ่งเป็นรูปที่ใช้เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์ต่าง ๆ ข้างต้น (Rapala-Kozik *et al*., 2009) มีรายงานการใช้

thiamine ฉีดพ่นทางใบให้กับต้นข้าวโพดที่ได้รับ NaCl 125 mM พบว่าสามารถช่วยให้ต้นข้าวโพดมีความต้านทานต่อความเครียดจากเกลือได้ดีขึ้น โดยช่วยในการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, peroxidase, และ polyphenol oxidase (Tuna *et al*., 2013) เมื่อพืชได้รับ NaCl Na^+ จะเข้าสู่เซลล์และสะสมภายในเซลล์ ในขณะที่ K^+ ถูกลำเลียงออก นอกเซลล์ มีผลให้สมดุลของประจุภายในเซลล์เปลี่ยนไปโดย Na^+/K^+ สูงขึ้น และเป็นอันตรายต่อเซลล์ ทั้งนี้มีข้อสันนิษฐานว่าการที่พืชมีการแสดงออกเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือสูงขึ้นโดยการสังเคราะห์ TPP ซึ่งมีรายงานว่าเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NADPH oxidase (Ahn *et al*., 2005) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) NADPH oxidase เป็นโปรตีนที่สำคัญที่ทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ทำหน้าที่เป็นสัญญาณโมเลกุลเพื่อช่วยในการควบคุมสมดุลระหว่าง Na^+/K^+ มีผลทำให้ *A. thaliana* สามารถทนต่อภาวะเครียดจากเกลือได้ (Ma *et al*., 2012) อย่างไรก็ตาม แสงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดในพืช โดยแสงความเข้มสูงสามารถก่อให้เกิด ROS เช่น $O_2^{\cdot-}$ H_2O_2 $^{\cdot}OH$ เป็นต้น ROS ที่มากเกินความสามารถของพืชในการกำจัดมีผลก่อให้เกิด oxidative stress (Demidchik, 2015) ซึ่ง Tunc-Ozdemir *et al*. (2009) ได้เหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress โดยการใช้สารพาราควัท (Paraquat) และพบว่า *A. thaliana* ที่ได้รับ thiamine มีปริมาณ H_2O_2 เกิดขึ้นลดลง และส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าพืชที่ได้รับพาราควัทและไม่ได้รับ thiamine ทั้งนี้จึงอาจมีความเป็นไปได้ว่าการใช้ thiamine อาจช่วยลดภาวะเครียดของพืชเมื่อได้รับแสงความเข้มสูงรวมทั้งภาวะเครียดจากสาเหตุอื่นที่ก่อให้เกิด oxidative stress ซึ่งยังคงต้องทำการพิสูจน์ต่อไป

<u>บทบาทในการตอบสนองของพืชต่อปัจจัยทางชีวภาพ</u>

Bahuguna *et al*. (2012) ได้ทำการทดลอง ให้สารละลาย thiamine โดยการฉีดพ่นใบแก่ต้นกล้าข้าว พบว่า ต้นกล้าข้าวปกติมีอัตราการสังเคราะห์แสงไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่ต้นข้าวที่ติดเชื้อ *Rhizoctonia solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคกาบใบแห้งมีอัตราการสังเคราะห์แสงลดลง แต่เมื่อต้นข้าวที่ติดเชื้อแต่ได้รับ thiamine จะมีอัตราการสังเคราะห์แสงที่สูงกว่าต้นที่ติดเชื้อโดยไม่ได้รับ thiamine ดังนั้น thiamine จึงอาจไม่มีผลในการส่งเสริมการสังเคราะห์แสงของพืชโดยตรงในพืชที่มีความแข็งแรงเป็นปกติ แต่มีผลในการบรรเทาความเสียหายที่เกิดจากเชื้อก่อโรค Ahn *et al*. (2005) ได้ทำการทดลองในข้าว ยาสูบแตงกวาและ *A. thaliana* พบว่า พืชทดลองทั้งหมดที่ได้รับการฉีดพ่น thiamine ทางใบมีความต้านทานต่อราสนิม (*Magnaporthe grisea*) มากขึ้น โดยที่พบว่า thiamine มีผลไปกระตุ้นการแสดงออกของ pathogenesis-related (PR) genes และมีการแสดงออกของ protein kinase C สูงขึ้น ทั้งนี้การศึกษาผลของการกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อพบว่าใน *A. thaliana* ที่ทำให้เกิดมิวเทชันและไม่มีการตอบสนองต่อ ฮอร์โมน jasmonic acid จะไม่มีการต้านทานต่อเชื้อแม้ว่าจะได้รับ thiamine จึงทำให้เชื่อได้ว่า thiamine ไปมีผลเพิ่มความต้านทานเชื้อของพืชผ่านทาง SA-dependent signaling pathway ที่มีผลไปกระตุ้น systemic acquired resistance (SAR) ทั้งนี้ยังมีรายงานด้วยว่า thiamine ไปมีผลกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase ซึ่งทำให้ *A. thaliana* สามารถต้านทานต่อเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ได้ เมื่อพืชติดเชื้อรา *S. sclerotiorum* เชื้อจะปล่อยสาร oxalate มีผลทำให้ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลาย และ Ca^{2+} จากผนังเซลล์จะถูกปล่อยออกมา รวมทั้ง oxalate จะไปยับยั้งกระบวนการเกิด ROS ของเซลล์พืชโดยไปยับยั้งการทำงานของ NADPH oxidase ดังนั้นกลไกการป้องกันของพืชจึงไม่เกิดขึ้น แต่เมื่อพืชได้รับ thiamine จะเกิดกลไกการป้องกันขึ้น โดยไปมีผลกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase และเกิด ROS ซึ่งไปเหนี่ยวนำทำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณที่ติดเชื้อ ทำให้สามารถลดการแพร่กระจายของเชื้อ (Lehmann *et al*., 2015)

บทบาทต่อการงอกของเมล็ด

จากการศึกษาปริมาณ thiamine ในเมล็ดธัญพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ ข้าวบาร์เล่ย์ และธัญพืชลูกผสมระหว่างข้าวสาลีและข้าวไรน์ (Triticosecale) พบว่ามีปริมาณระหว่าง 5.59-13.00 nmole/g DM (Buchholz *et al*., 2012) ทั้งนี้มีรายงานว่า เมล็ดข้าวมีปริมาณ thiamine อยู่ประมาณ 80 ng/grain และมีรายงานด้วยว่า thiamine ที่สะสมอยู่ในเมล็ดส่วนหนึ่งอยู่ในรูปที่จับอยู่กับโปรตีน (thiamine-binding protein) ในระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ด thiamine-binding protein มีปริมาณลดลง เพื่อปลดปล่อย thiamine เพื่อให้เซลล์นำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ (Mitsunaga *et al*., 1986) และหลังจากนั้นจะพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ TPP มีกิจกรรมสูงขึ้น ในขณะเดียวกันมีการทำงานของเอนไซม์ transketolase เพิ่มขึ้น (Golda *et al*., 2004) ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า thiamine จะถูกนำไปใช้ในกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและการสังเคราะห์แสงในระหว่างเริ่มต้นกระบวนการงอกในขณะที่เซลล์ยังไม่สามารถสร้างสารตั้งต้นต่าง ๆ ได้ ทั้งนี้ข้อคิดเห็นนี้คงต้องได้รับการพิสูจน์ต่อไป

สรุป

Thiamine เป็นสารที่สร้างในพลาสติดของเซลล์ กระบวนการสร้างประกอบด้วย การสังเคราะห์ thiazole และ pyrimidine โดย thiamine รูปที่มีบทบาทภายในเซลล์ คือ TPP ที่ทำหน้าที่เป็น cofactor ของเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การสังเคราะห์แสง และเปลี่ยนไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นไนโตรเจนอินทรีย์ thiamine มีบทบาทในการทำให้พืชสามารถต้านทานความเครียดต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Ahn, I.P., Kim, S., & Lee, Y.H. (2005). Vitamin B_1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiology*, *138*, 1505-1515.

Ajjawi, I., Milla, M.A.R., Cushman, J., & Shintani, D.K. (2007a). Thiamin pyrophosphokinase is required for thiamin cofactor activation in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, *65*, 151-162.

Ajjawi, I., Tsegaye, Y., & Shintani, D. (2007b). Determination of the genetic, molecular, and biochemical basis of the *Arabidopsis thaliana* thiamin auxotroph th1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *459*, 107–114.

Araujo, W.L., N., Adriano, T., Sandra, Bunik, V.I., & Fernie, A.R. (2008). Inhibition of 2-oxoglutarate dehydrogenase in potato tuber suggests the enzyme is limiting for respiration and confirms its importance in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, *148*(4), 1782-1796.

Ba, A. (2008). Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Molecular Neurobiology*, *28*, 923-931.

Bahuguna, R.N., Joshi, R., Shukla, A., Pandey, M. & Kumar, J. (2012). Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, *57*, 159-167.

Belanger, F.C., Leustek, T., Chu, B., & Kriz, A.L. (1995). Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. *Plant Molecular Biology*, *29*, 809-821.

Bi, H., Wang, M., Dong, X., & Ai, X. (2013). Cloning and expression analysis of transketolase gene in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *70*, 512-521.

Blume, C., Behrens, C., Eubel, H., Braun, H.P., & Peterhansel, C. (2013). A possible role for the chloroplast pyruvate dehydrogenase complex in plant glycolate and glyoxylate metabolism. *Phytochemistry*, *95*, 168-176.

Buchholz, M., Drotleff, A.M., & Ternes, W. (2012). Thiamin (vitamin B1) and thiamin phosphate esters in five cereal grains during maturation. *Cereal Science, 56*, 109-114.

Bocobza, S., Adato, A., Mandel, T., Shapira, M., & Nudler, E. (2007). Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom. *Gene & Development*, *21*, 2874–2879.

Chatterjee, A., Jurgenson, C.T., Schoeder, F.C., Ealick, S.E., & Begley, T.P. (2007). Biosynthesis of the thiamin thiazole in eukaryotes: the conversion of NAD to an advanced intermediate. *Journal of American Chemistry Society*, *129*(10), 2914-2922.

Croft, M.T., Moulin, M., Webb, M.E., & Smith, A.G. (2007). Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(52), 20770-20775.

Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, *109*, 212–228.

El-Shintinawy, F., & El-Shourbagy, M.N. (2001). Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine. *Biologia Plantarum*, *44*(4), 541-545.

Golda, A., Szyniarowski, P., Ostrowska, K., Kozik, A., & Rapala-Kozik, M. (2004). Thiamine binding and metabolism in germinating seeds of selected cereals and legumes. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*, 187-195.

Goyer, A. (2010). Thiamine in plants: Aspect of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, *71*, 1615-1624.

Gerdes, S., Lerma-Ortiz, C., Frelin, O., Seaver, S.M.D., Henry, C.S., Crecy-Ragard, V., & Hanson, A.D. (2012.) Plant B vitamin pathways and their compartmentation: a guide for the perplexed. *Journal of Experiment Botany*, *63*(15), 5379-5395.

Julliard, J.H., & Douce, R. (1991). Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*, 2042-2045.

Khozaei, M., Fisk, S., Lawson, T., Gibon, Y., Sulpice, R., Stitt, M., Lefebvre, S.C., & Raines, C.A. (2015) Overexpression of plastid transketolase in tobacco results in a thiamine auxotrophic phenotype. *The Plant Cell*, *27*, 432-447.

Kim, Y.S., Nosaka, K., Downs, D.M., Kwak, J.M., Park, D., Chung, I.K., & Nam, H.G. (1998). A Brassica cDNA clone encoding a bifunctional hydroxymethylpyrimidinekinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase involved in thiamin biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, *37*(6), 955-966.

Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S.E., & Metraux, JP. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*, *112*, 54-62.

Li, S., & Breaker, R.R. (2013). Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Research*, *41*(5), 3022–3031.

Lichtenthaler, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*, 47-65.

Ma, L., Zhang, H., Sun, L., Jiao, Y., Zhang, G., Miao, C., & Hao, F. (2012). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na^+/K^+ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Journal of Experimental Botany*, *63*(1), 305-317.

Mauger, D.M., Siegfried, N.A., & Weeks, K.M. (2013). The genetic code as expressed through relationships between mRNA structure and protein function. *FEBS Letters*, *587*, 1180–1188.

Michal, G., & Schomburg, D. (2012). *Biochemical Pathways.* Singapore: John Wiley & Sons, Inc.

Mitsunaga, T.,Shimizu, M., & Iwashima, A. (1986). Occurrence of thiamine-binding proteins in plant seeds. *Journal of Plant Physiology*, *124*(1-2), 177-180.

Moore, B.D. (2004). Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends in Plant Science*, *9*(5), 221-228.

Rapala-Kozik, M., Golda, A., & Kujda, M. (2009). Enzymes that control the thiamine diphosphate pool in plant tissues. Properties of thiamine pyrophosphokinase and thiamine-(di)phosphate phosphatase purified from *Zea mays* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*, 237–242.

Rapala-Kozik, M., Kowalska, E., & Ostrowska, K. (2008). Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, *59*(15), 4133-4143.

Raschke, M., Burkle, L., Muller, N., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. Arigoni, D., Amrhein, N., & Fitzpatrick, T.B. (2007). Vitamin B1 biosynthesis in plants requires the essential iron–sulfur cluster protein, THIC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(49), 19637-19642.

Roje, S. (2007). Vitamin B biosysthesis in plants. *Phytochemistry*, *68*(14), 1904-1921.

Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A.T., Breaker, R.R., & Patel, D.J. (2006). Structure basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature*, *441*, 1167-1171.

Shimizu, M., Mitsunaga, T., Inaba, K., Yoshida, T., & Iwashima, A. (1990). Accumulation of thiamine and thiamine-binding protein during development of rice seeds. *Journal of Plant Physiology*, *137*, 123-124.

Smith, A.G., Croft, M.T., Moulin, M., & Webb, M.E. (2007). Plants need their vitamins too. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*, 266–275.

Sriram, K., Manzanares, W., & Joseph, K. (2012). Thiamine in nutrition therapy. *Nutrition in Clinical Practice*, *27*(1), 41-50.

Thore, S., Leibundgut, M., & Ban, N. (2006). Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulation ligand. *Science*, *312*, 1208-1211.

Tokui, M., Kubodera, T., Gomi, K., Yamashita, N., & Nishimura, A. (2011). Construction of a thiamine pyrophosphate high-producing strain of *Aspergillus oryzae* by overexpression of three genes involved in thiamine biosynthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *111*(4), 388–390.

Tuna, A.L., Kaya, C., Altunlu, H., & Ashraf, M. (2013). Mitigation effects of non-enzymatic antioxidants in maize (*Zea mays* L.) plants under salinity stress. *Australian Journal of Crop Science*, *7(*8), 1181-1188.

Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Misra, A.N., Mittler, R., & Shintani, D. (2009). Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *151*, 421-432.

Wachter, A., Tunc-Ozdemir, M., Grove, B.C., Green, P.J., Shintani, D.K., & Breaker, R.R. (2007). Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *The Plant Cell*, *19*(11), 3437-3450.

Wang, G., Ding, X., Yuan, M., Qiu, D., Li, X., Xu, C., & Wang, S. (2006). Dual function of rice *OsDR8* gene in disease resistance and thiamine accumulation. *Plant Molecular Biology*, *60*, 437-449.

Yazdani, M., Zallot, R., Tunc-Ozdemir, M., & de Crecy-Lagard, V. (2013). Identification of the thiamin salvage enzyme thiazole kinase. *Phytochemistry*, *94*, 68-73.