

บทที่ 3: Photosynthesis Is an Electron Transport Process

การสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ที่เปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมีในรูป NADPH และ ATP โดยเกิดในเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์ พืชและไซยาโนแบคทีเรียใช้ **น้ำเป็นแหล่งอิเล็กตรอน** ทำให้เกิดการปล่อยออกซิเจน เรียกว่า oxygenic photosynthesis ส่วนระบบของแบคทีเรียถูกใช้แบบจำลองเพราะมีโครงสร้างเรียบง่ายกว่า

สารสำคัญคือ พืชใช้ **photosystem II (PS II)** และ **photosystem I (PS I)** ต่อกันเป็นลำดับ หรือ **Z scheme** โดย PS II มีศูนย์ปฏิกิริยา P680 ทำหน้าที่สร้างสารออกซิไดซ์แรงพอที่จะแยกน้ำได้ ส่วน PS I มี P700 ทำหน้าที่สร้างตัวรีดิวซ์แรงเพื่อลด NADP^+ เป็น NADPH อิเล็กตรอนจึงไหลจากน้ำ $\rightarrow$ PS II $\rightarrow$ plastoquinone $\rightarrow$ cytochrome b6/f $\rightarrow$ plastocyanin $\rightarrow$ PS I $\rightarrow$ ferredoxin $\rightarrow$ NADP^+

ใน PS II การแยกน้ำเกิดที่ **Mn cluster หรือ oxygen-evolving complex** ซึ่งสะสมประจุออกซิเดชันเป็นขั้น ๆ ก่อนปล่อย O_2 กระบวนการนี้ลดการเกิดอนุมูลอิสระ แต่ PS II ยังไวต่อความเสียหายจากแสง โดยเฉพาะโปรตีน D1 จึงต้องมีวงจรซ่อมแซม PS II

บทนี้ยังอธิบาย **สารกำจัดวัชพืช** หลายชนิดที่ยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น DCMU และ atrazine จับบริเวณรับ plastoquinone ของโปรตีน D1 ใน PS II ส่วน paraquat รับอิเล็กตรอนจาก PS I แล้วทำให้เกิด superoxide ส่งผลให้เซลล์พืชเสียหายจาก oxidative stress

cytochrome b6/f complex เป็นตัวกลางระหว่าง PS II และ PS I ทำหน้าที่ถ่ายอิเล็กตรอนจาก plastoquinone ไปยัง plastocyanin พร้อมกับช่วยเคลื่อนย้ายโปรตอนเข้าสู่ลูเมนของไทลาคอยด์ การทำงานแบบ **Q-cycle** ช่วยเพิ่มจำนวนโปรตอนที่สะสมในลูเมน ทำให้สร้างแรงขับเคลื่อนสำหรับการสร้าง ATP ได้มากขึ้น

PS I สร้าง NADPH ผ่าน ferredoxin และ ferredoxin- NADP^+ reductase นอกจากนี้ PS I ยังสามารถเกิด **cyclic electron transport** เพื่อสร้าง ATP เพิ่มโดยไม่สร้าง NADPH ซึ่งสำคัญเมื่อพืชต้องการ ATP มากกว่าสัดส่วนที่ได้จากการไหลของอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวงจร

ตอนท้ายบทกล่าวถึงการควบคุมการกระจายพลังงานแสงระหว่าง PS II และ PS I เช่น การแยกตำแหน่ง PS II ใน grana และ PS I/ATP synthase ใน stromal lamellae รวมถึง **state transition** ของ LHC II และการกำจัดพลังงานแสงส่วนเกินเป็นความร้อนผ่าน **non-photochemical quenching (NPQ)**, zeaxanthin cycle และโปรตีน PsbS เพื่อลด photoinhibition

บทที่ 4: Adenosine Triphosphate Is Generated by Photosynthesis

ATP ในการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดจาก **photophosphorylation** โดยอาศัย **โปรตอนกราเดียนต์** ที่สร้างขึ้นจากการขนส่งอิเล็กตรอนในเยื่อไทลาคอยด์ โปรตอนสะสมในลูเมน แล้วไหลกลับสู่สโตรมาผ่าน ATP synthase เพื่อสร้าง ATP จาก ADP และฟอสเฟต

หลักฐานสำคัญมาจากแนวคิด **chemiosmotic hypothesis** ของ Peter Mitchell และการทดลองของ Jagendorf ที่ทำให้ไทลาคอยด์สร้าง ATP ได้ในที่มืด เพียงแค่สร้างความต่าง pH ระหว่างลูเมนกับภายนอก แสดงว่า “แสงไม่ได้สร้าง ATP โดยตรง” แต่แสงสร้างการไหลของอิเล็กตรอนซึ่งสร้างโปรตอนกราเดียนต์ แล้วโปรตอนกราเดียนต์จึงขับ ATP synthase

พลังงานที่ใช้ในการสร้าง ATP ภายในคลอโรพลาสต์โดยประมาณอยู่ราว 50 kJ/mol ส่วนแรงขับโปรตอนหรือ **proton motive force (PMF)** เกิดจากทั้งความต่าง pH และศักย์ไฟฟ้าของเยื่อ แต่ในคลอโรพลาสต์ PMF ส่วนใหญ่เกิดจาก ΔpH มากกว่า ศักย์ไฟฟ้า โดยค่า ΔpH ประมาณ 2.5 หน่วยบ่งชี้ว่าต้องใช้โปรตอนอย่างน้อยประมาณ 4 ตัวต่อ ATP 1 โมเลกุล

บทนี้อธิบาย **uncouplers** เช่น FCCP และ SF6847 ซึ่งทำลายโปรตอนกราเดียนต์ ทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนยังเกิดได้ แต่ไม่สามารถสร้าง ATP ได้ พลังงานจึงสูญเสียเป็นความร้อน ส่วน ionophores เช่น valinomycin ทำลาย membrane potential โดยขนส่งไอออนผ่านเยื่อ

ATP synthase ของคลอโรพลาสต์ แบคทีเรีย และไมโทคอนเดรียมีโครงสร้างพื้นฐานคล้ายกัน คือมีส่วน F_o อยู่ในเยื่อ ทำหน้าที่เป็นทางผ่านโปรตอนและ rotor และส่วน F_1 ยื่นออกสู่สโตรมา ทำหน้าที่เร่งการสร้าง ATP โครงสร้าง F_1 มีหน่วย $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ โดยตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาอยู่ที่ β -subunits

กลไกการสร้าง ATP อธิบายด้วย **binding change mechanism** ของ Paul Boyer: ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยามี 3 สถานะ คือ L จับ $ADP + P_i$ อย่างหลวม, T จับแน่นและสร้าง ATP, และ O เปิดเพื่อปล่อย ATP การไหลของโปรตอนผ่าน F_o ทำให้ rotor หมุน ส่งผลให้ γ -subunit เปลี่ยนรูปร่างของ F_1 เป็นรอบ ๆ หนึ่งรอบสร้าง ATP ได้ 3 โมเลกุล

ในคลอโรพลาสต์ ATP synthase ถูกควบคุมด้วยแสง เมื่อมีแสง โปรตอนกราเดียนต์สูงและระบบ ferredoxin-thioredoxin จะรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ใน γ -subunit ทำให้เอนไซม์ทำงาน เมื่ออยู่ในที่มืด เอนไซม์ถูกปิดเพื่อป้องกันไม่ให้ ATP ถูกสลายย้อนกลับโดยไม่จำเป็น

ใจความรวมของทั้งสองบท

บทที่ 3 อธิบายว่าแสงทำให้อิเล็กตรอนไหลจากน้ำไปยัง $NADP^+$ พร้อมสร้างโปรตอนกราเดียนต์ ส่วนบทที่ 4 อธิบายว่าโปรตอนกราเดียนต์นั้นถูกใช้โดย ATP synthase เพื่อสร้าง ATP ดังนั้นสองบทนี้เชื่อมกันเป็นแกนหลักของ **light reaction**:

แสง $\rightarrow$ การขนส่งอิเล็กตรอน $\rightarrow NADPH +$ โปรตอนกราเดียนต์ $\rightarrow ATP$

Overexpression of a cytochrome P450 gene, CYP81Q32, endows resistance to HPPD-inhibiting herbicides in *Leptochloa chinensis*

บทความนี้ศึกษาผลกระทบของการดื้อสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม HPPD inhibitors ในหญ้า *Leptochloa chinensis* ซึ่งเป็นวัชพืชสำคัญในนาข้าวของจีน โดยเฉพาะสายพันธุ์ TC53-R ที่พบว่าดื้อต่อสาร tripyrasulfone และมีการดื้อข้ามต่อสาร HPPD ชนิดใหม่อีก 2 ชนิด คือ pyraquinate และ flusulfenam

ประเด็นสำคัญ

ผู้วิจัยคัดกรอง *L. chinensis* จำนวน 124 accession และพบว่ามีเพียงสายพันธุ์ TC53-R ที่รอดชีวิต 100% เมื่อฉีดพ่น tripyrasulfone ในอัตราแนะนำ จึงจัดเป็นสายพันธุ์ดื้อยา

จากการทดสอบ dose-response พบว่า TC53-R มีระดับการดื้อดังนี้

สารกำจัดวัชพืช ระดับการดื้อของ TC53-R

tripyrasulfone	4.2 เท่า
pyraquinate	4.6 เท่า
flusulfenam	2.6 เท่า

ผลการหาลำดับยีน HPPD ไม่พบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในสายพันธุ์ดื้อ จึงสรุปได้ว่าการดื้อไม่ได้เกิดจาก target-site resistance หรือการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของสารกำจัดวัชพืช

เมื่อนำสารยับยั้งเอนไซม์ P450 คือ piperonyl butoxide หรือ PBO มาทดสอบร่วมกับ tripyrasulfone พบว่า TC53-R กลับไวต่อสารมากขึ้น ค่า GR50 ลดจาก 103.21 เหลือ 50.05 g a.i. ha⁻¹ แสดงว่าเอนไซม์กลุ่ม cytochrome P450 มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยา

การวิเคราะห์ RNA-Seq และ qRT-PCR พบว่ายีน LcCYP81Q32 มีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างชัดเจนในสายพันธุ์ดื้อ TC53-R โดย RNA-Seq พบว่าเพิ่มขึ้นประมาณ 14.4 เท่า และ qRT-PCR ยืนยันว่าเพิ่มขึ้นประมาณ 10.1 เท่า

เพื่อพิสูจน์หน้าที่ของยีนนี้ ผู้วิจัยนำยีน LcCYP81Q32 ไป overexpress ในข้าวอินดิกา ซึ่งปกติไวต่อ tripyrasulfone ผลพบว่าข้าวดัดแปลงที่มียีนนี้ทนต่อ tripyrasulfone ได้มากกว่าข้าวปกติ โดยที่ความเข้มข้น 360 และ 720 g a.i. ha⁻¹ ข้าวปกติมีอัตราการยับยั้งน้ำหนักสด 70.3% และ 82.4% ส่วนข้าวที่ overexpress ยีนนี้ถูกยับยั้งเพียง 41.0% และ 66.3%

สรุปกลไก

การดื้อ tripyrasulfone ใน *Leptochloa chinensis* สายพันธุ์ TC53-R เกิดจาก non-target-site resistance โดยมีสาเหตุหลักจากการแสดงออกมากเกินไปของยีน LcCYP81Q32 ซึ่งเข้ารหัสเอนไซม์ cytochrome P450 ทำให้พืชสามารถเมแทบอลิซึมหรือกำจัดพิษของสารกำจัดวัชพืชได้ดีขึ้น

ความสำคัญของงานวิจัย

งานนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้สาร HPPD inhibitors ซ้ำ ๆ ในการควบคุมวัชพืชในนาข้าวอาจเร่งให้เกิดสายพันธุ์ดื้อยาเพิ่มขึ้น แม้ว่ากลุ่ม HPPD inhibitors เคยถูกมองว่ามีความเสี่ยงต่อการดื้อต่ำ นอกจากนี้ ยีน **LcCYP81Q32** อาจเป็นยีนเป้าหมายที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาพืชปลูกให้ทนต่อสารกำจัดวัชพืชบางชนิดได้

ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยระบุว่า PBO ไม่สามารถทำให้ความดื้อหายไปทั้งหมด แปลว่าอาจมีเอนไซม์หรือระบบเมแทบอลิซึมอื่นร่วมด้วย เช่น **GST**, **UGT** หรือ **AKR** จึงควรศึกษาว่ายีนเหล่านี้มีบทบาทต่อการดื้อยาเพียงใด รวมทั้งควรทดสอบว่า **LcCYP81Q32** ทำให้เกิดการดื้อข้ามต่อสารกำจัดวัชพืชกลุ่มอื่นด้วยหรือไม่

โดยรวม บทความนี้แสดงหลักฐานชัดเจนว่า การ **overexpression** ของยีน **LcCYP81Q32** เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้หญ้า *Leptochloa chinensis* ดื้อต่อสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม HPPD inhibitors และสนับสนุนให้ใช้การจัดการวัชพืชแบบผสมผสานแทนการพึ่งพาสารกำจัดวัชพืชเพียงอย่างเดียว.