รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ 33 01 0072

เรื่อง "บทบาทของไฮโดรไลติกเอนไซม์ในข้าวต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อรา"

Roles of Hydrolytic Enzymes in Inducible Defense Responses of Rice against Fungal Pathogens

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. นลินี จาริกภากร ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
กรมวิชาการเกษตร

สมอ
SB608.R5
ว62
2544

สนับสนุนโดย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทคัดย่อ

โครงการนี้มุ่งศึกษาบทบาทของเอนไซม์ไฮโดรไลติกในด้านกลไกการต้านทานโรคของข้าวโดยใช้เทคนิคการตรวจหาเอนไซม์และอณูชีววิทยา วัดระดับการแสดงออกของยีนในระดับทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นและการกระจายตัวของเอนไซม์กลุ่มนี้ในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวในระหว่างการรุกรานของโรคที่เกิดจากเชื้อรา พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาเป็นพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ที่ไวต่อโรคซึ่งนิยมปลูกในภาคใต้ของประเทศไทยและโรคที่ศึกษาเป็นโรคที่ก่อปัญหาหลัก ศึกษาจลนศาสตร์ของการเหนี่ยวนำระดับ เอ็ม อาร์ เอ็น เอ ของเอนไซม์ไฮโดรไลติก และแอคติวิตีของเอนไซม์ในข้าวระยะต้นอ่อนที่ทำให้เกิดการติดโรคใบวง ระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ เบตา 1,3-กลูคาเนสและไคติเนส พบว่าสูงขึ้นในใบข้าวที่ติดโรคมากกว่าในใบข้าวที่เป็นตัวอย่างควบคุมอย่างชัดเจนตั้งแต่ระยะเวลา 3 วัน จนกระทั่ง 15 วัน จึงมีระดับสูงสุด แอคติตี้ของเอนไซม์ทั้งสองที่สูงขึ้นนี้สัมพันธ์สอดคล้องกับระดับของแบบแผนไอโซไซม์ของเบต้า 1,3-กลูคาเนสและไคติเนสเมื่อแสดงด้วยวิธีเวสเทอร์น เมื่อมีการติดโรคพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในต้นข้าวพันธุ์ที่ต้านทานโรคมีระดับสูงกว่าในต้นข้าวพันธุ์ที่อ่อนแออย่างชัดเจน ไอโซไซม์บางกลุ่มของเอนไซม์ไคติเนสมีระดับสูงขึ้นอย่างจำเพาะในใบ หน่อและรากของต้นข้าว โดยเฉพาะไอโซไซม์ชนิดแอซิดิกของทั้งสองเอนไซม์ ระดับ เอ็ม อาร์เอ็น เอ ของเอนไซม์กลูคาเนสในใบข้าวที่ติดเชื้อเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จนถึงจุดสูงสุดเมื่อ 24 ชั่วโมง ขณะที่ในเซลล์ข้าวแขวนลอยหลังจากเติมสารเหนี่ยวนำซึ่งเตรียมจากผนังเซลล์ของเชื้อราโรคใบวงพบการเหนี่ยวนำการสร้างอาร์เอ็น เอ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมง สูงสุดเมื่อ 1.5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามข้าวในภาวะปกติพบว่ามีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสชนิดแอซิดิก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเฉพาะบางไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสและ กลูคาเนสมีบทบาทในการตอบสนองของการต้านทานโรคของพืชต่อเชื้อราที่รุกราน

Abstract

This work aims to clarify the roles of the hydrolytic enzymes in rice defense mechanisms using enzyme assays and recombinant DNA techniques. The investigation of gene expression at transcriptional and translational levels and enzyme distribution in various compartments of plant cells during fungal infection were carried out. Both disease susceptible and resistant rice cultivars which have been grown in southern Thailand, and fungal pathogens causing serious problems of rice in this area were chosen as a model of study. Kinetic of induction of hydrolytic enzyme mRNA levels and activities in rice seedlings following infection by leaf scald fungus was demonstrated. β 1,3-glucanases and chitinases showed higher activities in the infected leaves than those of non infected controls within 3 days after inoculation to a maximum in 15 days. The increase of the activities correlated with the isozyme patterns of β 1,3-glucanases and chitinases, was revealed by Western blot analysis. Activities of both enzymes observed in the resistant rice plants were higher than in the susceptible rice plants after fungal infection. The increase in activities of some chtinase isozymes as well as in their patterns were also demonstrated among infected rice organs. One of both acidic β 1,3-glucanases and acidic chitinases was shown to be a defense related isozyme in leaf tissue. mRNA accumulation of β 1,3-glucanase in the infected leaves started gradually from 2 hours to reach a maximum at 24 hours after inoculation. The mRNA induction of both β 1,3-glucanases and basic chitinase showed rapidly increases within half an hour and reached a maximum in 1.5 hours in the rice cell suspensions treated with elicitors of leaf scald fungus. In contrast, the acidic chitinase was shown to already exist in normal plants. Thus, not all β 1,3-glucanases and chitinases play roles in the response of plants to fungal infection.

สารบาญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ i
บทคัดย่อ ii
Abstract iii
สารบาญ iv
รายการรูป v - vii
ตัวย่อและสัญลักษณ์ viii
บทนำ 1
วัตถุประสงค์ 6
ขอบเขตการวิจัยและพัฒนา 6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6
วิธีการดำเนินงานวิจัย 7
ผลการทดลอง 16
วิจารณ์ 41
สรุป 46
เอกสารอ้างอิง 48
ภาคผนวก 56

รายการรูป

รูปที่ **หน้า**

1. แบบแผนโปรตีนจากใบข้าวเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE 17
2. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 17
3. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 18
4. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4, C5 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 18
5. การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส (C1-C6) ระหว่าง ตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อ และราก เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 21
6. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, c, d, และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE 21
7. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE 22
8. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, d และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE 22
9. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE 23
10. การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส (a-e) ระหว่างตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อ และราก เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE 23
11. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 25
12. การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (G1, G2 แล G3) ในตัวอย่างใบข้าวที่เป็นตัวอย่างควบคุมและในตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 25
13. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 26
14. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 26

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส จากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 27
16. แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส จากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE 27
17. การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (G3) ในตัวอย่างด้วย Native PAGE 29
18. แบบแผน Western blot จากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ 29
19. แบบแผน Western blot ของโปรตีนจากใบของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ 30
20. แบบแผน Western blot โปรตีนจากหน่อของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ 30
21. แบบแผน Western blot ของเอนไซม์ไคติเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ 32
22. แบบแผน Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1, 3- กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ 32
23. แบบแผน Western blot ของ เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ 33
24. แบบแผน Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากหน่อของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ 33
25. แบบแผน Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ 34
26. แบบแผน RNA เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis 34
27. แบบแผน RNA insert เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis 37

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

28. RNA dot blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7 กับ 7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน 37

29. RNA dot blot hybridization ของหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 กับ p7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน 38

30. RNA dot blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7 กับ RCH10-2 genomic DNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน 38

31. Northern blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7 กับ β-1,3-glucanase cDNA (p7-25) ของข้าวบาร์เลย์ ติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP 39

32. Northern blot hybridization ของเซลล์ข้าวแขวนลอยพันธุ์ CR 76 กับ basic chitinase enomic DNA (RCH-10-2) ของข้าวเจ้าติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP เมื่อเติม elicitors ที่เตรียมจากเชื้อราโรคใบวงประเภท (แถบ A) culture filtrate, (แถบ B) low molecular weight wall, (แถบ C) high molecular weight wall 39

33. Northern blot hybridization ของเซลล์ข้าวแขวนลอยพันธุ์ CR 76 กับ basic chitinase (RCH-10-2) genomic DNA ติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP 40

34. Northern blot hybridization ของเซลล์ข้าวแขวนลอยพันธุ์ CR 76 กับ β-1, 3-glucanase cDNA (p7-25) ติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP 40

ตัวย่อและสัญลักษณ์

^{0}C = Degree Celcius
BSA = bovine serum albumin
DNA = deoxyribonucleic acid
RNA = ribonucleic acid
EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid
cm = centrimetre
nm = nanometre
g = gram
M = molar
mg = milligram
ml = millilitre
mM = millimolar
PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis
O.D. = optical density
R_f = relative mobility
SDS = sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE = sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED = N, N, N', N' – tetramethylethylenediamine
Tris = tris (hydroxymethyl) aminomethane
μg = microgram
μl = microlitre
α = alpha
β = beta
SA-AP = streptavidin-alkaline phosphatase
rpm = revolution per minute
kd = kilo daltons
cDNA = complementary deoxyribonucleic acid

บทนำ

ข้าวเจ้า (*oryza sativa*) เป็นธัญพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ ในปัจจุบันผลผลิตที่ได้ยังเกี่ยวข้องอยู่กับปัญหาการระบาดของโรคข้าวทำให้ผลผลิตลดต่ำลง ซึ่งเป็นปัญหาหลักซึ่งเกิดขึ้นกับชาวนาทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นจึงมีการคิดค้นวิธีการที่จะแก้ไขปัญหาเพื่อทำให้ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสาเหตุของเชื้อรา โดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของนักวิชาการเกษตร เพื่อให้ได้พันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคแต่ยังคงประสบปัญหาในด้านการต้านทานที่เกิดขึ้นนั้นไม่ยั่งยืนและคงทนถาวรในทุกภูมิภาคของประเทศ โรคใบวงสีน้ำตาล (leaf scald) เป็นโรคข้าวที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นอย่างรุนแรงและระบาดออกไปอย่างกว้างขวางการระบาดเกิดขึ้นที่ภาคใต้และภาคเหนืออย่างรุนแรง และกำลังขยายเนื้อที่การระบาดออกไปอย่างกว้างขวาง อาการของโรคสามารถพบเห็นได้ตั้งแต่ต้นข้าวในระยะที่เป็นต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว แต่มักพบอาการรุนแรงในระยะที่ข้าวแตกกอเต็มที่แล้ว ต้นข้าวเป็นโรคจะแสดงอาการโดยเกิดแผลซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดบนใบ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคใบวงสีน้ำตาลเกิดจากเชื้อรามีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Rhynchosporium oryzae* ได้มีการศึกษาหายีนต้านทาน (resistance gene) ในพืชแต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ต่อมาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้มีการพัฒนาไปอย่างมากทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้ใช้เทคนิคเหล่านี้มาศึกษาพบว่าการตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันโรคหลายอย่าง อาทิเช่น การหลั่งของ phytoalexins การผลิตสารลิกนินและ calllose เพื่อเสริมความแข็งแกร่งของผนังเซลล์ของพืชหรือการสะสม hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) การสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) เช่น เอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรคที่รุกราน จึงได้มีการศึกษาในเรื่องนี้กันอย่างกว้างขวางเพื่อนำมาสู่การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีการต้านทานโรคที่ยั่งยืนถาวร

โครงการนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนข้าวที่ต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อราใบวง เพื่อศึกษาและตรวจหาชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (pathogenesis- related, PR protein) โดยเน้นในเรื่องของการวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ไฮโดรไลติกคือ เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส การแสดงออกของยีนเหล่านี้ของข้าวในระดับการสร้าง RNA (transcription) และโปรตีน (translation) รวมทั้งหาความไวของการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดในระหว่างข้าวพันธุ์ที่ติดเชื้อง่ายและพันธุ์ที่ต้านทานในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ใบ หน่อและราก โดยอาศัยเทคนิคทางชีวเคมีและ recombinant DNA เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในระดับยีนที่สามารถต้านทานโรค และผลผลิตข้าวที่เพิ่มมากขึ้น

เมื่อมีการรุกรานจากสิ่งแปลกปลอมภายนอกพืชมีวิธีการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมนั้นโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันหรือกลไกอื่นๆ ที่คล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ การป้องกันตนเองอาจเกิดจากกลไกหลายด้านทั้งทางด้านเคมีและกายภาพเพื่อการต้านทานการเกิดโรค (พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2533) การตอบสนองของพืชต่อการป้องกันโรค (Defense responses) (Schonbeck, F. and Schlosser, E.W. 1976) เช่นการหลั่งของ phytoalexins, การผลิตสารลิกนินและคาลโลส (callose) หรือการสะสม hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs), การสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) ในบริเวณที่มีการรุกรานของเชื้อและสามารถกระตุ้นการต้านทานทุกระบบของพืช การตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อโรคดังเช่นที่กล่าวมาไม่เพียงแต่เกิดจากการเหนี่ยวนำจากกลไกการติดเชื้อหรือรุกรานเท่านั้นแต่ยังเกิดขึ้นได้จากสาร elicitors ซึ่งปรากฏอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราและในน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) และบางกรณียังเกิดจากการเกิดบาดแผล การฉายรังสีอุลตราไวโอเลตหรือจากก๊าซเอธิลีน (Darvil and Albersheim, 1984; Bell et al., 1986; Dixon, 1986; Collinge and Slusarenko, 1987)

กลไกการป้องกันโรคของพืชเกิดขึ้นจากการรับสัญญาณจากการรุกรานของเชื้อโรคตอบสนองในพืชเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาต่างๆ (Lamb *et al.*, 1989) เริ่มจากการสัมผัสโดยตรงของเชื้อกับพื้นผิวอวัยวะส่วนต่างๆ ของพืช (Hamer *et al.*, 1988) แล้วแทงเข้าสู่เซลล์และแทรกเนื้อเยื่อพืชที่ถูกรุกราน (Staples *et al.*, 1986) จากนั้นจะเกิดการย่อยสลาย cuticle และผนังเซลล์ของพืชเจ้าบ้าน (Kolattukudy, 1985; Collmer, 1986) และในเชื้อโรคบางชนิดมีการผลิตท็อกซินเพื่อทำลายเซลล์พืช (Panopoulos and Peet, 1985) เมื่อมีการย่อยผนังเซลล์ของพืชเจ้าบ้านก็จะมี elicitor ไปกระตุ้นให้เกิดเหตุการณ์การส่งต่อสัญญาณ (signal transduction) เพื่อการป้องกันโรคของพืชโดย defense genes มีการแสดงออกในรูปแบบที่ตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อ โดยเพิ่มการสะสมและหลั่ง pathogenesis-related proteins (PR-proteins) เช่นการปล่อย hydrolytic enzymes เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์กลูคาเนสโดยสันนิษฐานว่าเอนไซม์ทั้งสองนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อที่มารุกราน ทำให้ได้ oligosaccharides ทำหน้าที่เป็น elicitor กระตุ้นการเกิด signal transduction phytoalexin หรือการเสริมความแข็งแกร่งให้ผนังเซลล์โดยเพิ่มปริมาณ lignin มีการส่งผ่านสัญญาณเกิดขึ้นเพื่อกระตุ้นให้เซลล์อื่นๆ ของพืชเจ้าบ้านเกิดการตอบสนองต่อเชื้อที่รุกราน

โปรตีน PR เป็นโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเพื่อต้านทานการติดเชื้อของพืชในเหตุการณ์ตอบสนองเพื่อการป้องกันโรคซึ่งมีการศึกษาอย่างมากมายด้านความสัมพันธ์กับพืชในแง่กลไกการต้านทานโรคในพืชที่เกิดการติดเชื้อจากเชื้อชนิดต่างๆ เช่นไวรัส (Van Loon and Van Kammen, 1970; Gianinazzi *et al.*, 1970; Camacho-Henriquez and Sanger, 1984) ไวรอยด์ (Conejero and Semancik, 1977) เชื้อรา (Gianinazzi *et al.*, 1970) หรือแบคทีเรีย (Ahl *et al.*, 1981) แหล่งที่พบโปรตีน PR ในพืช Van Loon และ Van Kammen (1970) เป็นผู้ศึกษาครั้งแรกในยาสูบที่ติดเชื้อ TMV (Tobacco Mosaic Virus) ในปัจจุบันพบโปรตีน PR ได้ในพืชชั้นสูงหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ (Kombrink *et al.*, 1988) ข้าวบาร์เลย์ (Jutidamrongphan *et al.*, 1991) พิทูเนีย (Linthorst *et a*l., 1990) และแตงกวา (Boller and Metraux, 1988) เป็นต้น

โปรตีน PR ที่สำคัญมี 2 ชนิดคือ เบต้า-1, 3-กลูคาเนสและไคติเนส โปรตีน PR นี้จะเสถียรที่ pH ต่ำ (Van Loon, 1976; Gianinazzi *et al.*, 1977) สามารถสกัดโปรตีน PR โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH ต่ำ (pH ประมาณ 3) ซึ่งที่ pH ต่ำจะทำให้โปรตีนชนิดอื่นเสียสภาพธรรมชาติ (Jamet and Fritig, 1986; Pierpoint, 1986; Van Loon *et al.*, 1987 ; Kauffmann *et al.*,1990) โปรตีน PR มีความสามารถต้านการย่อยสลายของ

เอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน (Van Loon and Gerritsen, 1989) และสามารถพบโปรตีนนี้บริเวณ intercellular fluid ของใบที่เกิดแผลเน่า (necrotic lesions) (Hogue and Asselin, 1987) เมื่อมีการทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ acidic protease ก็จะถูกปล่อยจาก vacuole ที่บริเวณรอบๆ รอยแผลบนใบยาสูบ ส่วนใหญ่ extracellular PR proteins ของใบยาสูบพบว่าเป็นจำพวก acidic protein ซึ่งแตกต่างจากในพืชอื่น เช่น มะเขือเทศและมันฝรั่งพบว่า extracellular PR proteins เป็นจำพวก basic

จากการศึกษาคุณสมบัติของ cDNA และ genomic clones พบว่ามีโปรตีน 2 กลุ่มที่สะสมอยู่ในใบที่ติดเชื้อ ส่วนใหญ่จะพบมากในเซลล์ (intracellular fluid) ตรงส่วน vacuole และอยู่นอกเซลล์ (extracellular fluid) โดยโปรตีนเหล่านี้จะอยู่ในรูปไอโซฟอร์ม (อ้างถึงโดย Linthorst, 1991) ตัวอย่างเช่น PR-2 จะเกิดการสะสมที่ intracellular หรือ vacuole ในใบยาสูบที่ติดเชื้อ TMV โปรตีนนี้จะเป็นชนิด basic เป็นส่วนใหญ่และพบปริมาณสูงในรากและใบ โปรตีน PR นี้ มักจะรู้จักในชื่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1, 3-glucanase) และเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ซึ่งพบได้ทั้งบริเวณ extracellular spaces และ intracellular spaces ของพืชการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะถูกกระตุ้นโดยการติดเชื้อ

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

มีบทบาทในการต้านทานการเกิดโรคในพืชโดยสามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อโรคด้วยการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส สามารถย่อยสลาย Laminarin (β-1,3-glucan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ของเชื้อราและในสัตว์จำพวกแมลง แหล่งของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืช พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีการติดเชื้อ เช่น ในยาสูบ (Van Loon and Van Kammen, 1970) ข้าวบาร์เลย์ (Jutidamrongphan *et al.*, 1991) และมันฝรั่ง (Kombrink *et al.*, 1988) เป็นต้น นอกจากนั้นในขั้นตอนการเจริญเติบโตของพืช ยังสามารถพบเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เช่นในขั้นตอนการงอกของธัญพืชพวกข้าว (cereal germination) Stuart *et al.*, 1986; Hoj *et al.*, 1989) การเจริญของไฮโปคอทิล (hypocotyl) และโคลีออปไทล์ (coleoptile) (Goldberg, 1980; Huber and Nevins, 1980) การควบคุมการขนส่งอาหารของท่อลำเลียงอาหารและการเคลื่อนย้ายคาลโลส (callose mobilization) (Abeles and Forrence, 1970) การพัฒนาของดอก (Neale *et al.*, 1990; Ori *et al.*, 1990) การเจริญของท่อพอลเลน (pollen tube growth) (Roggen and Stanley, 1969) และการสุกของผล (Hinton and Pressey, 1980) เป็นต้น

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยาสูบ จะอยู่ในรูปของ acidic 3 ไอโซฟอร์ม และ basic 1 ไอโซฟอร์ม และ basic 1 ไอโซฟอร์ม ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 33 kd (Shinshi *et al.*, 1988) ซึ่งปลายด้าน N-terminal ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจะถูก block และไม่มี N-acetylglucosamine จะขาด N-glucopeptide ถูกสร้างขึ้นในรูปของ prepro-β-1,3-glucanase ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 47 Kd (Mohnen *et al* .,1985) จากการศึกษา cDNA และ genomic ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสพบว่าทั้งชนิด basic และ acidic มีส่วนที่เหมือนกันในแต่ละกลุ่มของยาสูบ และพบลักษณะเดียวกันนี้ในพืชชนิดอื่น (Fincher *et al* .,1986: De Loozc*et al*, 1989; Takeuchi *et al* ., 1990) ไอโซไซม์ชนิด basic จะมี

C-terminal extension ที่จะถูกตัดออกในกระบวนการขนส่งออกไปสู่ vacuole (Linthorst *et al*., 1990) เอนไซม์กลูคาเนสชนิด acidic จะมี C-terminal extension และเก็บสะสมใน extracellular fluid (Shinshi *et al*., 1988; Linthorst *et al* ., 1990) cDNAในแต่ละกลุ่มที่เป็น basic หรือ acidic มีระดับของโปรตีนที่เหมือนกันมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ แต่ลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ชนิด acidic และ basic ,มีความเหมือนกันประมาณ 50 เปอร์เซนต์ (Linthorst *et al* ., 1990) สรุปได้ว่ายีนโครงสร้าง (structural gene) ของกลูคาเนสทั้งชนิด acidic และ basic จะมีส่วนที่อนุรักษ์ (conservative) ในบริเวณที่เป็น coding sequences

เอนไซม์ไคติเนส

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย β-1, 4-linkage ของ N-acetyl-D-glucosamine polymer chitin ซึ่งพบได้ในผนังเซลล์ของเชื้อราหลายชนิด (Boller *et al*., 1983) เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในพืชชั้นสูงทั่วไปที่มีการควบคุมการเจริญเติบโตโดยฮอร์โมน (Shinshi *et al*., 1987; Swegle *et al*., 1989) นอกจากนี้จะพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสจะสูงมากในพืชที่มีบาดแผล หรือพืชที่ได้รับก๊าซเอธิลีนหรือ elicitor ที่ปล่อยจากเชื้อโรค (Boller *et al*., 1983; Broglie *et al*., 1986l; Hedrick *et al*., 1988; Parsons *et al*., 1989) รวมทั้งเกี่ยวข้องกับ HR ด้วย (Boller et al., 1983; Metraux and Boller, 1986; Metraux *et al*., 1988a) ทั้งเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์กลูคาเนสจะมีฤทธิ์เสริมกันในการต้านการรุกรานโดยช่วยกันทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Mauch *et al*., 1988b) เอนไซม์ไคติเนสพบได้ในพืชที่มีการติดเชื้อ และไม่ติดเชื้อ อาทิเช่นยาสูบและพิทูเนียที่มีการติดเชื้อจาก TMV (Linthorst *et al*.,1990), ในถั่ว (*Phaseolus vulgaris*) ที่ติดเชื้อ (Roby *et al*.,1991) เมล็ดข้าวโพด (Lin *et al*., 1992), แตงกวา (Boller and Metraux, 1988), มะละกอ ยางพารา พืชประเภทสมุนไพร (Boller *et al*., 1983) รากมะเขือเทศที่มีการติดเชื้อจาก *Fusarium oxysporum* (Benhamou *et al*., 1990)

เอนไซม์ไคติเนสสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลำดับของกรดอะมิโนและบริเวณที่หลั่นเอนไซม์ เมื่อแยกสกัดและหาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนสในพืชใบเลี้ยงคู่เช่น ถั่ว แตงกวา มันฝรั่งและยาสูบ (Broglie *et al*., 1986; Shinshi *et al*., 1987; Metraux *et al*., 1988a; Gaynor and Unkenholz, 1989; Laflamme and Roxby, 1989) พบว่าเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม I เป็นไอโซฟอร์มชนิด basic และ พบที่ central vacuole และพบว่ามี catalytic domain และ cysteine-rich domain ที่เรียกว่า hevein domain ซึ่ง hevein domain นี้มี oligosaccharide-binding site เหมือนกับในยางพาราเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม II เป็นชนิด acidic และมี catalytic domain เหมือนกับเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม I แต่ขาด cysteine-rich domain พบที่บริเวณ extracellular fluid ของใบ ส่วนเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม III ได้มีการศึกษาในแตงกวา พบว่าแตกต่างจากเอนไซม์ไคติเนสทั้งสองกลุ่มที่กล่าวมาแล้วแต่มีแอคติวิตีของไลโซไซม์ (lysozyme) และพบ extracellular fluid

Shinshi *et al*. (1990) ได้ศึกษาโปรตีน PR-3a และ PR-3b ซึ่งจัดอยู่ในเอนไซม์ไคติเนสกลุ่มII ซึ่งก็คือ PR-P และ PR-Q ตามลำดับ มีคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนสชนิด acidic พบในบริเวณ extracellular spaces ทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน (protease) และยังพบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเดียวกันและมีความสัมพันธ์ทาง serology คุณสมบัติของ PR-3a, PR-3b และเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม I คือสามารถย่อยสลายไคติน เอนไซม์ไคติเนสชนิด basic พบว่ามีคุณสมบัติของแอคติวิตีของไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งสามารถย่อยสลาย peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Trudel *et al.*, 1989)

ส่วนเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม III พบได้ในพืช เช่น มะละกอ ยางพารา *Parthenocissus quinquifolia, Arabidopsis thaliana* และแตงกวา (Boller and Metraux, 1988; Samac *et al.*, 1990) เอนไซม์ไคติเนสในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลาย peptidoglycan ของแบคทีเรียได้เหมือนกับไลโซไซม์และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส ในปริมาณสูง เอนไซม์ไคติเนสชนิด acidic ในแตงกวาที่มีการติดเชื้อไวรัสพบว่ามีการสะสมที่ intracellular space Shinshi *et al.* (1987) ได้ศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนส จากยาสูบที่ได้รับฮอร์โมน auxin และ cytokinin พบว่ามีเอนไซม์ไคติเนส 2 ไอโซฟอร์มโดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34 และ 32 kd ส่วนการศึกษาของ Boller (1985) พบว่าเอนไซม์ไคติเนสชนิด basic มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 ถึง 36 kd เมื่อแยกสกัดจากข้าวสาลี มะเขือเทศและถั่วซึ่งมีความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และกรดอะมิโน 67 และ 73 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

วัตถุประสงค์

1 ตรวจหาลักษณะการเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ในข้าวพันธุ์ที่เกิดโรคได้ง่ายและที่ต้านทานโรคทั้งในด้านปริมาณและความว่องไวของการตอบสนอง

2 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะของไฮโดรติกเอนไซม์ของข้าวในระยะต่างๆ เมื่อมีการลุกลามของโรค

3 หาความจำเพาะของการเหนี่ยวนำการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ในข้าวที่ติดเชื้อโรคซึ่งมีความสำคัญต่อผลผลิต (โรคใบวง)

4 ค้นหากลไกการทำงานของไฮโดรไลติกเอนไซม์เพื่อหยุดยั้งการทำลายของเชื้อโรคระยะต่าง ๆ

ขอบเขตการวิจัยและพัฒนา

1 ตรวจหาปริมาณของเอนไซม์ที่หลั่งออกมาเพื่อตอบสนองการติดเชื้อระยะต่าง ๆ กัน

2 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนจากเซลล์ข้าวในระดับ messenger RNA และความไวในการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำของเชื้อโรคและสารจำพวก elicitors

3 ศึกษาความจำเพาะของการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ของยีนในรูปผสมระหว่างข้าวพันธุ์ต่างๆ กับเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด

4 สำรวจการแพร่กระจายของเอนไซม์ตามส่วนต่าง ๆของข้าวในระหว่างที่มีการติดเชื้อ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มขีดความสามารถและการประยุกต์ทางด้านพันธุวิศวกรรม ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานของความสำคัญ และกลไกการทำงานของไฮโดรไลติกเอนไซม์ในปฏิกิริยาการต้านทานโรคของข้าว
2. ได้มาซึ่งชนิดของยีนที่มีความสำคัญต่อการต้านทานโรคของข้าวโดยสามารถป้องกันหรือระงับการลุกลามของโรค และสามารถศึกษาต่อไปถึงขั้นตอนการควบคุมการทำงานของยีนเหล่านี้ในระดับการทดลองกับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
3. นำยีนที่รู้หน้าที่นี้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอย่างมีเป้าหมายให้ได้ทั้งผลผลิตสูงและสามารถต้านทานโรคได้ดี โดยอาศัยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัสดุ

1. ตัวอย่างข้าว

เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 1 และ กข 7 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จ.พัทลุง

เซลล์ข้าวแขวนลอย (Cell suspension CR 76) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Christopher J. Lamb, Salk Institute, Callifornia,U.S.A.

2. เชื้อรา

เชื้อราสาเหตุโรคใบวงคือ *Rhynchosporium oryzae* ที่ใช้ทดลองแยกได้จากแปลงทดลองข้าวของศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

3. Antisera และ DNA probes

Tomato acidic chitinase antisera และ Tomato acidic β-1,3-glucanase ได้รับจาก Professor P.J.G.M., de Wit, Department of Phytopathology, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands

pRCH 10-2 genomic DNA ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Christopher J. Lamb, Salk Institute, Callifornia,U.S.A.

p7-25 cDNA ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Ken Scott, Department of Biochemistry, The University of Queensland, Australia

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมต้นกล้าข้าว

เมล็ดข้าวตัวอย่างที่ใช้คือข้าวพันธุ์ กข 1 และ กข 7 เป็นพันธุ์ข้าวที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ข้าวพันธุ์ กข 1 เป็นข้าวพันธุ์ที่มีลักษณะอ่อนแอ (susceptible) ต่อการเกิดโรคใบวง ส่วนข้าวพันธุ์ กข 7 เป็นข้าวพันธุ์ที่ต้านทานต่อการเกิดโรคใบวงในระดับปานกลาง (moderate resistance) (ข้อมูลได้จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จังหวัดพัทลุง

นำเมล็ดข้าวตัวอย่างจำนวน 100 เมล็ด มาทำการฆ่าเชื้อโรค โดยแช่ลงใน 70% ethanol นาน 5 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษซับที่ชุ่มด้วยน้ำ เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25^0 C เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาเพาะลงกระบะที่มีดินนา วางกระบะข้าวในกรงกันแมลง ที่มีอากาศผ่านได้สะดวก มีน้ำสูงกว่าผิวดินประมาณ 1 cm และมีแสงแดดเพียงพอ เลี้ยงต้นข้าวต่อไปจนมีอายุ 13 วัน จึงนำมาทดลองต่อไป

2. การเตรียมเชื้อรา

ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบวง *(R. oryzae)* จากแปลงทดลองให้บริสุทธิ์โดยทำการตัดใบข้าวในส่วนที่เกิดโรครวมทั้งเนื้อเยื่อของใบข้าวในส่วนที่เป็นปกติขนาดประมาณ 0.5 cm x 0.5 cm ทำการฆ่าเชื้อโดยนำมาล้าง 70% ethanol นาน 5 นาที ต่อจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จึงนำมาวางลงบนอาหารวุ้น potato dextrose agar (PDA) เลี้ยงจนกระทั่งเห็นเส้นใย (mycelium) ของเชื้อรากระจายจนเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัดเอาส่วนของเส้นใยมาวางลงในอาหารวุ้น PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 22° C ในที่มืด นาน 3 วัน จนกระทั่งเห็นเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบวงซึ่งมีสีส้ม นำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาสปอร์เพื่อนำไปทดสอบความรุนแรงของเชื้อ

3. การพ่นเชื้อ

ใช้น้ำกลั่น 10 ml เทลงในจานอาหารวุ้นที่เพาะเชื้อราสาเหตุโรคใบวงที่มีการสร้างสปอร์ เขี่ยสปอร์ให้แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่น กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสปอร์ ปรับให้มีจำนวนสปอร์ 10^5 ต่อ ml นำมาเติม 2% Tween 20 จำนวน 1 หยด ต่อ spore suspension 10 ml จากนั้นนำมาพ่นลงบนใบข้าวตัวอย่าง ทำการคลุมต้นข้าวด้วยถุงพลาสติกทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ในต้นข้าวตัวอย่างใช้น้ำกลั่นพ่นแทน spore suspension เป็นชุดควบคุม

4. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บส่วนใบ หน่อและรากของต้นข้าวตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ตัวอย่างละ 1 g จำนวน 2 ชุด เพื่อนำไปทดลองหาแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนส และทำการเก็บตัวอย่างโดยเก็บส่วนใบและหน่อของข้าวตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ปริมาณ 0.5 g ตัวอย่างละ 2 ชุด เพื่อนำไปทดลองเรื่อง RNA จากนั้นนำตัวอย่างข้าวที่เก็บได้แช่แข็งทันทีในไนโตรเจนเหลวและเก็บที่อุณหภูมิ -70° C จนกระทั่งนำไปทดลอง

5. การหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง

โดยวิธี Lowry *et al* (1951) เจือจางโปรตีนตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 10-200 µg ในปริมาตร 100 µl จากนั้นผสมกับสารละลาย alkaline copper ที่เตรียมขึ้นใหม่ ปริมาตร 3 ml วางทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม Folin phenol reagent 0.3 ml (เตรียมโดยผสม Folin กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1) เสร็จแล้วผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm คำนวณหาปริมาณโปรตีนของตัวอย่าง โดยนำมาเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานซึ่งเตรียมจาก bovine serum albumin ทำควบคู่ด้วยกันกับโปรตีนตัวอย่าง

6. การทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

แผ่นเจล (slab gel) ใช้ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสขนาด 8x10 cm หนา 1 cm ซึ่งประกอบด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล เป็นเจลชั้นบนและเจลชั้นล่าง

6.1 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Native PAGE)

ทำการแยกโปรตีนโดยวิธี Native PAGE ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Davis (1964) นำสารละลายตัวอย่างลงในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลขนาด 8x10 cm ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสที่อุณหภูมิห้องใน electrophoresis buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง

6.2 การทำเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

ทำการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงมาจากวิธี Laemmli (1970) นำสารละลายตัวอย่างใส่ลงในแผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจล ขนาด 8x10 cm ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสที่อุณหภูมิห้อง ใน electrophoresis buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง

ย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจลด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R 250 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย destaining จนกระทั่งเห็นแถบของโปรตีน

7. การศึกษาการเหนี่ยวนำระดับเอนไซม์ในตัวอย่างข้าว

7.1 การสกัดโปรตีนตัวอย่าง

สกัดโปรตีนอย่างหยาบจากส่วนใบ หน่อและรากของตัวอย่างข้าวแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดในขณะเย็นจัดด้วยโกร่งบดยาซึ่งวางอยู่ในกระบะน้ำแข็ง หลังจากนี้ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4^0 C ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วในหลอดทดลอง เติม 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 2 ml ต่อตัวอย่าง 1 g บดด้วยเครื่อง homogenizer นาน 30 นาที กรองด้วยผ้ากรอง (miracloth) นำสารละลายของตัวอย่างที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ 12,500 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายส่วนใส (supernatant) นำไปตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry *etal.* (1951)

7.2 การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และไคติเนสโดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

การหาแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนส สามารถวิเคราะห์โดยวิธี non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ในกรณีเอนไซม์ไคติเนสสามารถวิเคราะห์โดยใช้วิธี SDS-polyacrylamide gel eletrophoresis ได้อีกด้วย ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Trudle and Asselin , 1989

7.2.1 การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส

ประกบแผ่นเจลที่ได้ด้วยแผ่นเจลที่มีอะคริลาไมด์ 7% ซึ่งมี 0.01% glycol chitin ผสมอยู่ด้วย วางแผ่นเจลภายใต้สภาพที่มีความชื้นของ 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) อุ่นที่อุณหภูมิ 40^{0} C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้อมแผ่นเจลที่มี glycol chitin ด้วย 0.01% fluorescent brightener 28 (Calcofluor white M2R) ใน 500 mM Tris-HCl (pH 8.9) ในที่มืด ประมาณ 5-10 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง จนมองเห็นแถบที่ใสที่ไม่ติดสี (lytic zone) เมื่อผ่านแสง ultraviolet ที่ส่องขึ้นมาจากเครื่อง UV transiluminator บันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์โดยใช้ฟิลเตอร์สีแดง

7.2.2 การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

วิธีของ Pan, S.Q., *et al.*, 1989 นำแผ่นเจลส่วนที่เหลือไปล้างและเขย่าเบา ๆ ในน้ำกลั่น ล้างแผ่นเจลด้วย 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) นาน 5 นาที จากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปทำปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรทที่อุณหภูมิ 40^{0} C นาน 30 นาที (สารละลายสับสเตรทมี laminarin 1 g ละลายในน้ำกลั่น 75 ml แล้วจึงนำมาต้มจนเดือด จากนั้นจึงนำมาเติม 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 75 ml) ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น แช่แผ่นเจลลงในสารละลายซึ่งประกอบด้วย methanol: acetic acid: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 5:5:2 นาน 5 นาที หลังจากล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมแผ่นเจลด้วย 0.15% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride ใน 1 M NaOH ต้มและเขย่านาน 10 นาที จนปรากฏแถบสีแดง ซึ่งแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จึงนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย methanol: acetic acid: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 3:1:6

7.3 การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยเจลชั้นล่างมีอะคริลาไมด์ 15% รวมทั้ง 0.01% glycol chitin และ 0.1% SDS ส่วนโพลีอะคริลาไมด์เจลชั้นบนมีอะคริลาไมด์ 5% นำสารละลายตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณโปรตีน 30 μg มาทำแยกด้วยอิเล็กโตรฟอริซิสที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง นำแผ่นเจลตัวอย่างมาแช่ใน 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) เขย่าเบา ๆ นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาเขย่าใน 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ซึ่งมี 1% Triton X-100 ปริมาตร 100 ml ที่ 37^{0} C นาน 2 ชั่วโมง นำแผ่นเจลตัวอย่างไปย้อมด้วย 0.01% fluorescent brightener 28 (Calcofluor white M2R) ใน 500 mM Tris-HCl (pH 8.9) ในที่มืดนาน 10 นาทีแล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องจนมองเห็นแถบใสที่ไม่ติดสี (lytic zone) เมื่อผ่านแสง ultraviolet ที่ส่องขึ้นมาจากเครื่อง UV transilluminator บันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์โดยใช้ฟิลเตอร์สีแดง

7.4 การวิเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธี Western blot

นำสารละลายตัวอย่างใบข้าวที่มีปริมาณโปรตีน 100 μg มาตกตะกอนด้วย methanol (ซึ่งมี 1% acetic acid) ปริมาตร 1.5 เท่า ส่วนในหน่อและรากของตัวอย่างข้าวใช้ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนแล้ว 30 μg มาทำการวิเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยมีอะคริลาไมด์ในเจลชั้นบนและเจลชั้นล่างเป็น 5% และ 15% ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนสในหน่อและรากของตัวอย่างข้าวใช้ปริมาณอะคริลาไมด์และโปรตีนเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ส่วนการวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนสในใบ ใช้ปริมาณอะคริลาไมด์ในเจลชั้นบนและเจลชั้นล่างเป็น 5 % และ 15% ตามลำดับ ใช้ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนแล้ว 100 μg นำโปรตีนที่ตกตะกอนแล้วมาทำให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสที่อุณหภูมิห้องโดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนส โดยเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลเป็น molecular weight marker

7.4.1 การถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลสู่แผ่นเซลลูโลสอะซีเตท

นำแผ่นเจลที่ได้มาทำการถ่ายโปรตีนโดยใช้เครื่องถ่ายโปรตีนแบบใช้กระแสไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 4^0 C โดยวางกระดาษกรองลงบนแผ่นฟองน้ำที่วางอยู่ในถาดที่บรรจุ transfer buffer จากนั้นจึงนำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ที่มีขนาดเท่ากับแผ่นเจลวางทับบนกระดาษกรองแล้วจึงนำแผ่นเจลมาล้างด้วย transfer buffer แล้ววางทับบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท โดยไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นวางกระดาษกรองและแผ่นฟองน้ำทับตามลำดับ นำไปใส่ในเครื่องถ่ายโปรตีนทำการผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยให้แผ่นเจลเป็นขั้วลบและแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทเป็นขั้วบวก ขณะที่มีการถ่ายโปรตีนควรมีการคนบัฟเฟอร์ตลอดเวลา ความต่างศักย์ที่ใช้ในการถ่ายโปรตีนนี้คือ 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ตัดแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทส่วนที่เป็นโปรตีนมาตรฐานมาย้อมด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R 250 ส่วนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทที่เป็นตัวอย่างนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนส

7.4.2 การตรวจหาปฏิกิริยาอิมมูโน

นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย TBST แล้วจุ่มในสารละลาย blocking นาน 1.5 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม primary antibody ในอัตราส่วน 1:1,000 ของสารละลาย blocking นาน 30 นาที primary antibody ที่ใช้คือแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ และแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ (De Wit, P.J.G.M., *et al.*, 1993) ล้างด้วยแผ่นเซลลูโลสอะซีเตท ด้วยสารละลาย TBST นาน 10 นาที 3 ครั้ง ในสารละลาย blocking นาน 30 นาที เติม secondary antibody คือ anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate ในอัตราส่วน 1:30,000 นาน 30 นาที ล้างแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทด้วยสารละลาย TBST 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำมาล้างต่อด้วย AP buffer นำมาทำให้เกิดสีด้วย AP color development เขย่าเบา ๆ ตลอดเวลา เมื่อเกิดปฏิกิริยาเสร็จสิ้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น

8. การเตรียมพลาสมิดดีเอนเอ (plasmid DNA)

8.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอนเอปริมาณน้อย โดยวิธี STET

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. Coli* JM109 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 2-3 ml ที่อุณหภูมิ 37^0 C โดยการเขย่า 250 rpm นาน 6 ชั่วโมงแล้ว นำมาเซนติฟิวจ์ 2 นาที แยกเอาตะกอนที่ได้นำมาละลายในสารละลาย STET เติม 50 µl สารละลาย STET (ซึ่งมี lysozyme 10 mg/ml) หลังจากต้ม 2 นาที นำมาเซนติฟิวจ์นาน 2 นาที เขี่ยตะกอนทิ้ง เติม isopropanol 350 µl ผสมแล้วเซนตริฟิวจ์ 2-3 นาที ล้างตะกอน 3 ครั้ง ด้วย 70% ethanol ทำให้ตะกอนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 20 µl

8.2 การเตรียมพลาสมิดดีเอนเอปริมาณมาก

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. Coli* JM109 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TB 250 ml ที่อุณหภูมิ 37^0 C โดยการเขย่า 250 rpm นาน 10-15 ชั่วโมง จากนั้นเซนตริฟิวจ์ 5,000 rpm นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนที่ได้ในสารละลาย A 8 ml แช่ในน้ำแข็ง 20 นาที เติมสารละลาย B 16 ml ผสมให้เข้ากันดีแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที เติม 3 M potassium acetate (pH 4.6) 12 ml ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็ง 10 นาทีจนเห็นตะกอนขาว เซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm 15-20 นาที ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ไม่ให้มีตะกอนติดมา เติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า เซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 10-20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนใน TE buffer (pH 8.0) 10 ml เติม 7.5 M ammonium acetate ปริมาตร 0.5 เท่า ผสมให้เข้ากัน เซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่ เติม (1 mg/ml) RNase A 50 µl เก็บที่ 37^0 C นาน 20 นาทีเติมสารละลายอิ่มตัวของฟีนอล 7.5 ml และสารละลาย chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 7.5 ml เขย่าผสมแบบกลับไปกลับมา เซนตริฟิวจ์ 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบน (aqueous phase) ลงสู่หลอดใหม่ สกัดตามขั้นตอนที่ใช้สารละลายอิ่มตัวของฟีนอลอีกครั้ง เติม chloroform:isoamyl alcohol 2 เท่า ผสมและเซนตริฟิวจ์ 5 นาที แยก aqueous phase เติม ethanol 2 เท่า เก็บที่ -20^0 C นาน 30 นาทีหรือทิ้งไว้ค้างคืน เซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทำให้แห้งและละลายใน TE buffer (pH8.0) 1-2 ml หาปริมาณดีเอนเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยเทียบจาก OD_{260} = 1 มีปริมาณ DNA 40 µg/ml

8.3 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease)

ย่อยพลาสมิดดีเอนเอด้วย restriction endonuclease ในบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสม ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยเทียบจากการย่อย Lambda DNA ปริมาณ 1 μg ด้วยเอนไซม์ 3-5 ยูนิต ในเวลา 1 ชั่วโมง

8.4 การแยก insert DNA ออกจากดีเอนเอพาหะ

นำพลาสมิดดีเอนเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบจำนวนคู่เบสเป็น marker ทำเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบ submarine โดยใช้ 0.8% agarose ใน buffer ส่วนบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรฟอรีซิสคือ TBE buffer จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอนเอที่ต้องการออกจาก agarose gel โดยวิธีทำให้ agarose gel เย็นจัดและเซนตริฟิวจ์ นำสารละลาย DNA เติม 3 M sodium acetate (pH 4.5) ในปริมาตร 0.1 เท่า เติม absolute ethanol ปริมาณ 2.5 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ -80^0 C นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และละลายใน TE buffer (pH 8.0) 100 μl นำดีเอนเอที่ได้มาทำอิเล็กโตรฟอรีซิส และคำนวณความเข้มข้นโดยเทียบกับดีเอนเอมาตรฐาน

8.5 การติดฉลากดีเอนเอตาม (Probe labelling) ด้วยวิธี nick translation โดยใช้สารไบโอติน

เติมส่วนประกอบข้างล่างนี้ ผสมให้ครบ 50 μl

5 μl 10x dNTP Mix
- μl(1μg) DNA
- μl autoclaved H_2o จนมีปริมาตรเป็น 45μl
5 μl 10X Enzyme Mix

นำไปจุ่มที่อุณหภูมิ 16^{0}C นาน 1 ชั่วโมง เติม stop buffer 5 μl นำไปแยกดีเอนเอที่ติดฉลากและ dNTP mix โดยวิธี column chromatography

8.6 วิธีการแยกดีเอนเอที่ติดฉลากโดย column chromatography

แยกดีเอนเอที่ติดฉลากออกจากดีเอนเอที่เหลือโดยวิธี column chromatography โดยใช้ Sephadex G-50 column เป็นตัวแยกตามวิธีมาตรฐานที่แสดงไว้โดย Maniatis *et al.* (1982)

9. การวิเคราะห์อาร์เอนเอ (RNA)รูปแบบของการทำวิจัยมี 2 แบบ

9.1ใบข้าวจากพันธุ์ที่ต้านทานและติดโรคได้ง่ายโดยการปลูกเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบวง

9.1.1 การสกัดอาร์เอนเอ

นำตัวอย่างข้าวมาบดในโกร่งบดยาให้ละเอียด ขณะเย็นจัดโดยเติมไนโตรเจนเหลว เสร็จแล้วเติมสารละลาย D 5 ml บดด้วยเครื่อง homogenizer 30 วินาที จากนั้นจึงเติม 2 M sodium acetate (pH

4.0) 0.5 ml สารละลายอิ่มตัวของฟีนอล 5 ml สารละลายผสม chloroform ต่อ isoamylalcohol (ในอัตราส่วน 49:1) 1 ml ผสมหลังจากที่เติมสารละลายแต่ละชนิดเขย่าหลอดประมาณ 10 วินาที แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4^0 C นำสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ที่สะอาด เติม isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายที่ได้ เขย่าผสมแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20^0 C นาน 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4^0 C เก็บตะกอนและสารละลายอีกครั้งในสารละลาย D 1.5 ml ตกตะกอนอีกครั้งด้วย isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับสารละลาย D ผสมแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20^0 C นาน 1 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4^0 C ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 75 % ethanol ในน้ำกลั่น (ผสม DEPC) 3 ครั้ง เซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4^0 C ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนในน้ำกลั่นที่ผสม 1% DEPC นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm คำนวณความเข้มข้นของ RNA และตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยนำ ไปทำอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบ submarine โดยใช้ 1% agarose gel และ TBE buffer

9.1.2 การทำ dot blot ของอาร์เอนเอ

นำอาร์เอนเอที่ได้ปริมาณ 20 µg มาตกตะกอนด้วย ethanol จากนั้นเซนตริฟิวจ์และทำให้แห้ง ละลายในน้ำให้มีปริมาตร 10 µl แล้วผสมกับสารละลายดังต่อไปนี้

100% formamide	20 µl
(37%) formaldehyde	7 µl
20xSSC	2 µl

ผสมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 68^0 C นาน 15 นาที แล้วนำไปจุ่มลงในกระบะน้ำแข็งทันที แล้วเติม 20xSSC ปริมาตร 2 เท่า ของแต่ละตัวอย่างนำแผ่นไนลอนเมมเบรน จุ่มลงในน้ำกลั่นแล้วแช่ใน 20xSSC ส่วนชุดอุปกรณ์สำหรับทำ dot blot ให้นำมาล้างด้วย 0.1 N NaOH ล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด นำแผ่นกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย 20xSSC มาวางลงบนชุด dot blot วางแผ่นไนลอนเมมเบรนทับอีกครั้ง ประกอบชุด dot blot ทำการดูดโดยใช้แรงดันอากาศ (vacuum suction) ใส่ 10xSSC ลงในช่องที่ต้องการทำ dot blot ของ อาร์เอนเอ และใส่อาร์เอนเอตัวอย่างลงในแต่ละช่อง หลังจากที่ตัวอย่างผ่านลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนแล้วผ่าน 10xSSC จำนวน 1 ml 2 ครั้ง นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากชุด dot blot แล้วตรึงอาร์เอนเอกับแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแสง UV จาก UV light transilluminator นาน 2-5 นาที โดยเอาเมมเบรนด้านที่มีอาร์เอนเอเข้าหาแสง

9.1.3 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิสและการทำ blot ของอาร์เอนเอ

นำอาร์เอนเอที่ได้ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสด้วย 0.1 % agarose formamide gel ในสารละลาย 1X3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid (MOPS)/EDTA buffer (10x MOPS/EDTA = 0.5 M MOPS, pH 7.0, 0.01 M EDTA, pH 7.5) ถ่ายอาร์เอนเอตัวอย่างผ่านลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วตรึงอาร์เอนเอกับแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแสง UV

9.1.4 การทำไฮบริไดเซชั่น (Hybridization)

วางแผ่นเมมเบรนในถุงไฮบริไดเซชั่น (Hybridization bag) ใส่สารละลาย Hybridization ที่ไม่มีดีเอนเอ ที่อุณหภูมิ 60^0 C นาน 30 นาที ทุกขั้นตอนเขย่าเบา ๆ แล้วเติม DNA probe ซึ่งต้มเพื่อแยกสายดีเอนเอเส้นคู่ออกจากกันแล้วทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 60^0 C ค้างคืน นำมาล้างด้วยสารละลาย 2xSSC นาน 5 นาที 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างต่อด้วย 2xSSC 1% SDS ที่อุณหภูมิ 60^0 C นาน 30-60 นาที 2 ครั้ง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย TBS-Tween 20 ปริมาตร 1 ml ต่อ cm^2 ของแผ่นเมมเบรน นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย blocking ด้วยปริมาตร 750 µl ต่อ cm^2 บนแผ่นเมมเบรน นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60^0 C ย้ายแผ่นเมมเบรนลงในสารละลาย SA-AP/Tween 20 เขย่านาน 10 นาที ล้างแผ่นเมมเบรน 3 ครั้งด้วย TBS-Tween 20 ที่อุณหภูมิห้อง นานครั้งละ 5 นาที ล้างด้วย wash buffer ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที ซับเมมเบรนด้วยกระดาษกรอง 3 MM วางแผ่นเมมเบรนใน Photogene development folder ใส่ detection reagent ในปริมาณ 0.01 ml ต่อ 1 cm^{2}ของแผ่นเมมเบรน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เกลี่ยให้ทั่ว เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25^0 C นาน 3 ชั่วโมง จึงนำแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์วางทับลงบนแผ่นเมมเบรนจนกระทั่งมีสัญญาณเกิดขึ้นบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์

9.2 เนื้อเยื่อข้าว Rice suspension cells กับ สาร elicitors ที่สกัดจากเชื้อรา

การแสดงออกของยีนต้านทานโรคของเซลล์ข้าวเมื่ออยู่ในตัวกลางที่มี elicitors สาร elicitors เตรียมจากเชื้อราที่แยกให้บริสุทธิ์ (ดังอ้างใน Jutidamrongphan *et al.*, 1991)โดยแยกออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือส่วนที่เป็นเส้นผนังเซลล์ และส่วนที่เป็นของเหลวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการสกัดสาร elicitors โดยวิธีตกตะกอนด้วย ethanol หรือ วิธี dialysis ผ่านเมนเบรน ทดสอบคุณภาพของสาร elicitors ที่นำไปโดยการหาเหนี่ยวนำของ แอคติวิตีและระดับ mRNAของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ในเซลล์ข้าว (CR 76) ซึ่งเลี้ยงในอาหาร N6 (Chu *et al.*, 1975) และเมื่อได้ผลที่ดีแล้วจึงทำการวิเคราะห์ต่อไปในเรื่องการเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนส โดยทำวิธี Northern blot hybridization การสกัดอาร์เอนเอโดยวิธี guanidinium isothiocyanate ของ (Chomezymski ans Sacchi, 1989) ทำ RNA agarose gel electrophoresis, blotting, hybridization กับ probe คือ basic genomic DNA (RCH 10-2) จากข้าวเจ้า (Zhu, Q. and Lamb, C.J. 1991) และ β 1,3 glucanase cDNA (p7-25) จากข้าวบาร์เลย์ (Jutidamrongphan *et al.*, 1991) ซึ่งติดฉลากด้วยรังสี ^{32} P-dCTP

ผลการทดลอง

1 การตรวจคุณภาพและแบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างข้าว

เมื่อนำตัวอย่างข้าวจากส่วนใบ หน่อและรากมาสกัดโปรตีนด้วย 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ก่อนวิเคราะห์เอนไซม์แอคติวิตี และทำ Western blot นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้มาทำอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส เพื่อตรวจสอบปริมาณที่ถูกต้องและคุณภาพของโปรตีนที่สกัดได้ (รูปที่ 1) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากใบของข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 มีแถบชัดเจน แต่ลักษณะแบบแผนของโปรตีนที่ได้ไม่แตกต่างกันทั้งในข้าวก่อนและหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่าง 30 μg ถูกแยกออกเป็นหลายแถบ โดยส่วนใหญ่จะมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 30 - 67 kd เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบแบบแผนของโปรตีนเช่นเดียวกันในหน่อและรากของตัวอย่างข้าว

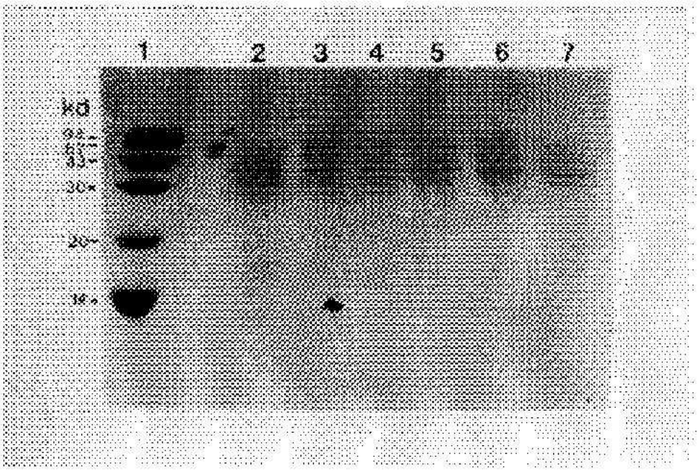
2. การตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

2.1 การตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส

แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบโพลีอะคริลาไมด์เจลไม่แปลงสภาพที่เตรียมได้จากใบ หน่อ และราก ของข้าวตัวอย่างมาทำการตรวจสอบจากตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ กข 7 ทั้งก่อนและหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราใบวงเมื่อนำมาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส (รูปที่ 2) พบว่าเกิดแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส 5 แถบคือ C1, C2, C3, C4 และ C6 โดยที่แถบ C1 และ C2 ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและระดับของแอคติวิตีสูงกว่าแถบ C3, C4 และ C6 เมื่อพิจารณาตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวงไปแล้ว 7 วันขึ้นไป (แถวที่ 4, 5 และ 6) พบว่าความเข้มของแถบ C1, C2, C4 และ C6 เพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแตกต่างจากผลที่ได้เมื่อวิเคราะห์แถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสในตัวอย่างควบคุมคือไม่พ่นด้วยสปอร์รา ถึงแม้ว่าตัวอย่างข้าวอายุต่างกันก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทั้งแบบแผนและปริมาณของไอโซไซม์เหล่านี้ ส่วนแถบ C3 ซึ่งพบในข้าวทั้งก่อนและหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวงมีความเข้มเท่ากันตลอดในทุกตัวอย่าง

แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสจากหน่อของตัวอย่างข้าวทั้งก่อนและหลังพ่นสปอร์เชื้อรา (รูปที่ 3) พบว่าเกิดแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส 5 แถบ คือ C1, C2, C3, C4 และ C6 ในตัวอย่างควบคุมคือก่อนพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อราโรคใบวงมีความเข้มของแถบไอโซไซม์ทุกแถบน้อยกว่าในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง โดยเฉพาะในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราใบวง 4 วันขึ้นไป (แถวที่ 3-6) พบว่าแถบ C1, C2, C3 และ C4 มีความเข้มของแถบแสดงระดับของแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน

แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสจากรากของข้าวตัวอย่างก่อนพ่นสปอร์ของเชื้อราใบวง (รูปที่ 4) พบว่าเกิดแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส 6 แถบ คือ C1, C2, C3, C4, C5 และ C6 โดยความ

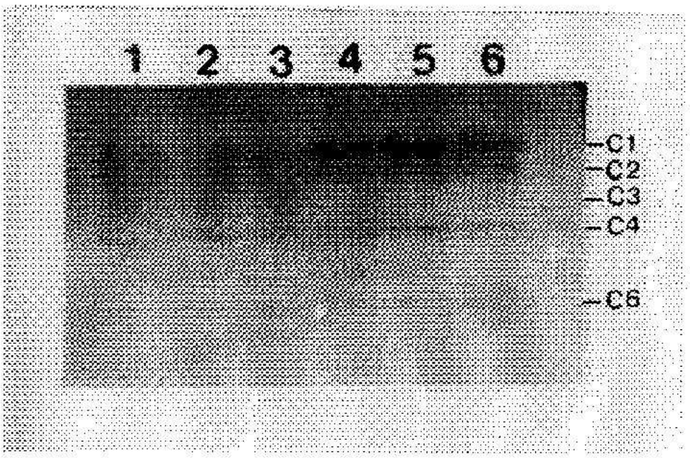


รูปที่ 1 **แบบแผนโปรตีนจากใบข้าวเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE**

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phosphorylase b (94 kd), albumin 67 kd), ovalbumin (43 kd), carbonic anhydrase (30 kd), trypsin inhibitor 20 kd) และ α-lactalbumin (14 kd)

แถวที่ 2 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

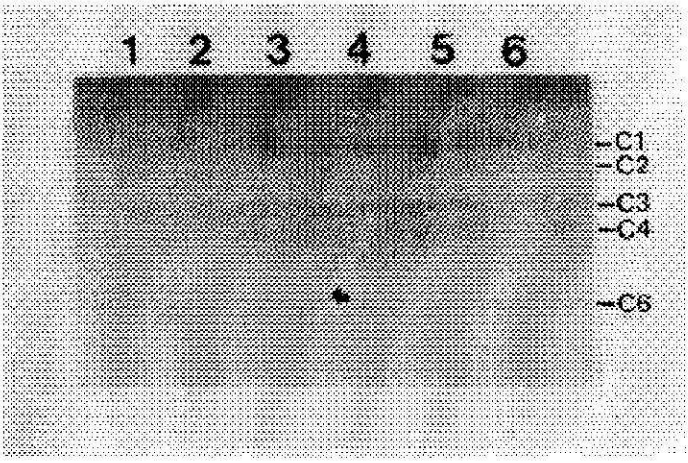
แถวที่ 3-7 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 2 **แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนส จากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE**

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

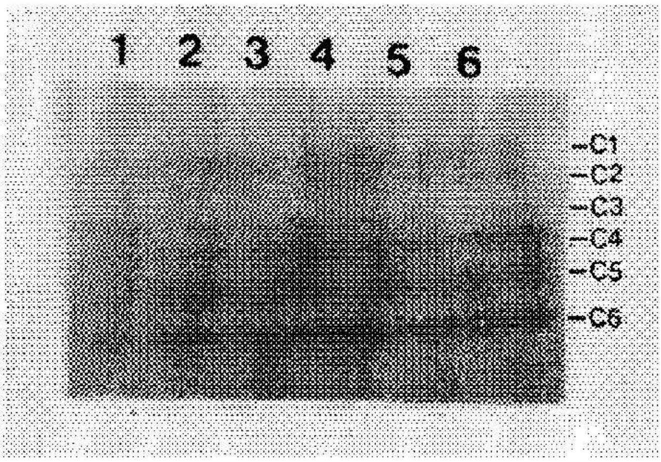
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 3 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 4 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4, C5 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

เข้มของแถบไอโซไซม์เพิ่มขึ้นในตัวอย่างหลังจากพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อราใบวง ไอโซไซม์ของกลุ่ม C1, C2 และกลุ่ม C4, C5, C6 มีความเข้มของแถบแสดงระดับของแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มมากขึ้นในตัวอย่างข้าวที่พ่นสปอร์รา ตั้งแต่ 2 วันขึ้นไป (แถวที่ 2) และมากสุดตั้งแต่ 7 วันขึ้นไปในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา (แถวที่ 4, 5 และ 6)

รูปที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสในตัวอย่างข้าวที่เก็บจากส่วนต่าง ๆ คือ ใบ หน่อและราก ทั้งก่อนและหลังพ่นด้วยสปอร์ราใบวงนาน 15 วัน พบว่าในใบและหน่อของข้าวตัวอย่างมีแบบแผนแสดงแถบของไอโซไซม์ส่วนที่คล้ายคลึงกัน แต่เห็นเฉพาะบางไอโซไซม์ที่แตกต่างกันชัดเจน เช่น ในข้าวตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราซึ่งสกัดจากใบแสดงแถบไอโซไซม์ C1 และ C2 มีแอคติวิตีสูงสุด รากมีแถบไอโซไซม์ C5 ที่ชัดเจนและแตกต่างจากใบและหน่อ ขณะที่แถบไอโซไซม์ C3 ปรากฏชัดเจนที่สุดในตัวอย่างหน่อ เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส ระหว่างตัวอย่างข้าวที่พ่นและไม่พ่นสปอร์รา พบว่าในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน ความเข้มของแถบแสดงแอคติวิตีของแต่ละไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในตัวอย่างข้าวเมื่อพ่นสปอร์รา 15 วันแล้ว (แถวที่ 2, 4 และ 6) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (แถวที่ 1, 3 และ 5)

การตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส นอกจากทำโดยวิธี Native PAGE แล้วยังสามารถทำ SDS-PAGE โดยนำโปรตีนมาทำให้กลับคืนสภาพธรรมชาติจึงตรวจหาแอคติวิตีได้และการทำวิธีนี้ทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของไอโซไซม์ที่ชัดเจน และเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทำ Western blot

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสในตัวอย่างข้าวที่เก็บทุกวันหลังพ่นสปอร์ราในหนึ่งสัปดาห์แรก เมื่อครบสัปดาห์ที่สองพบว่าใบของข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 6) มีแถบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส จำนวน 4 ไอโซไซม์ คือ a c d และ e ซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ (มากกว่า 67) , 23.9, 22.4, และ 19.0 kd ตามลำดับ ทั้งในตัวอย่างที่ก่อนและหลังพ่นสปอร์รา โดยทุกแถบของไอโซไซม์ในตัวอย่างก่อนพ่นสปอร์รา (แถวที่ 1) มีความเข้มน้อยกว่าในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์รา (แถวที่2-10) แถบบนสุด คือ แถบ a เป็นกลุ่มไอโซไซม์ที่อยู่บริเวณเหนือเจลมีความเข้มชัดเจนและไม่เคลื่อนที่ตามกระแสไฟฟ้า ความเข้มของไอโซไซม์ c, d และ e ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนเห็นความแตกต่างชัดเจนระหว่างตัวอย่างที่ไม่พ่นและที่พ่นสปอร์รา และเข้มสุดในตัวอย่าง 15 วัน (แถวที่ 10)

การวิเคราะห์แบบเดียวกันในใบของข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 พบว่าเกิดแถบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส จำนวน 5 ไอโซไซม์ คือ a, b, c, d และ e (รูปที่ 7) โดยมีแถบไอโซไซม์ b ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 30.2 kd ซึ่งเห็นได้ไม่ชัดเจนนักในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 แต่ไม่พบในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 ส่วนความเข้มของแถบไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์รา ซึ่งได้ผลที่คล้ายคลึงกันกับตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 8) แต่ปริมาณของไอโซไซม์ c, d และ e เข้มขึ้นชัดเจนได้ในระยะเวลาที่เร็วกว่าในพันธุ์ กข 1 คือ ในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 ข้าวหลังพ่นสปอร์ราตั้งแต่ 3 วันขึ้นไป (แถวที่ 4-10) โดยใช้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์เท่ากัน

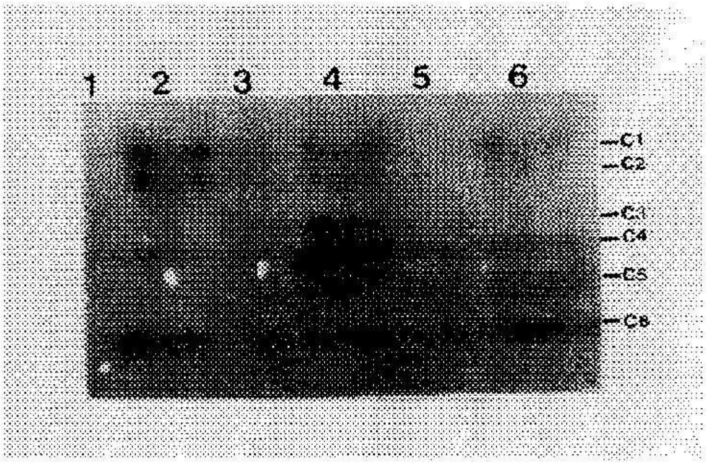
Central Library
Prince of Songkla University

การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสในหน่อของข้าวตัวอย่าง พบว่าเกิดแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสจำนวน 4 แถบ คือ a, b, d และ e ในข้าวที่ก่อนและหลังพ่นด้วยสปอร์รา (รูปที่ 8)

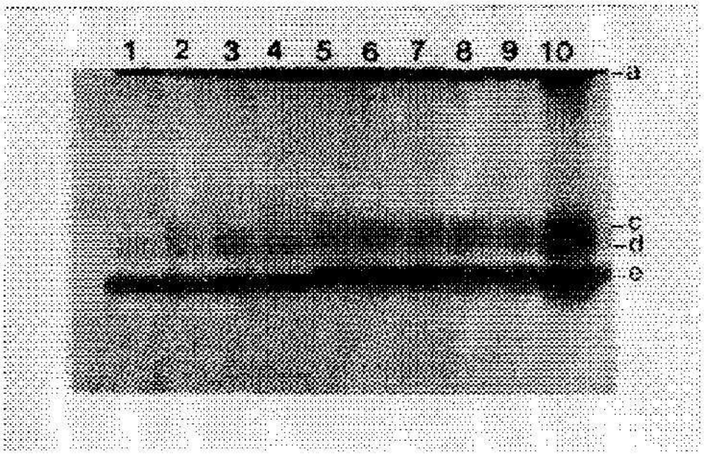
โดยไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสทุกแถบในตัวอย่างก่อนพ่นสปอร์ซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม มีอยู่เล็กน้อยเห็นเป็นแถบจาง แถบ a เป็นกลุ่มไอโซไซม์ที่อยู่บริเวณเหนือเจลในตัวอย่างทุกแถว ดังเช่นที่พบในใบ (รูปที่ 10) เมื่อสังเกตในตัวอย่างข้าวที่พ่นด้วยสปอร์ราพบว่า แถบ b, d และ e เพิ่มขึ้นในตัวอย่างหลังจากการพ่นด้วยสปอร์ราตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป (แถวที่ 4, 5 และ 6) ส่วนแถบ e เป็นไอโซไซม์ ที่มีปริมาณสูงสุด ส่วนไอโซไซม์แถบ b เห็นได้ชัดเจนและมีปริมาณในหน่อสูงมากกว่าในใบของข้าว

แถบแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสในรากของข้าวตัวอย่าง (รูปที่ 9) พบไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส ทั้ง 5 แถบ คือ a, b, c, d และ e เหมือนดังในตัวอย่างใบข้าว (รูปที่ 7) แถบ c, d และ e มีปริมาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างหลังการพ่นสปอร์ราอย่างเห็นได้ชัดและสูงสุดในตัวอย่างวันที่ 15 (แถวที่ 6) ส่วนแถบไอโซไซม์ b พบว่าเป็นแถบที่เห็นได้ชัดเจน และมีความเข้มของแถบของไอโซไซม์สูงขึ้นตามวันที่พ่นด้วยสปอร์รา ดังเช่นในตัวอย่างหน่อ (รูปที่ 8)

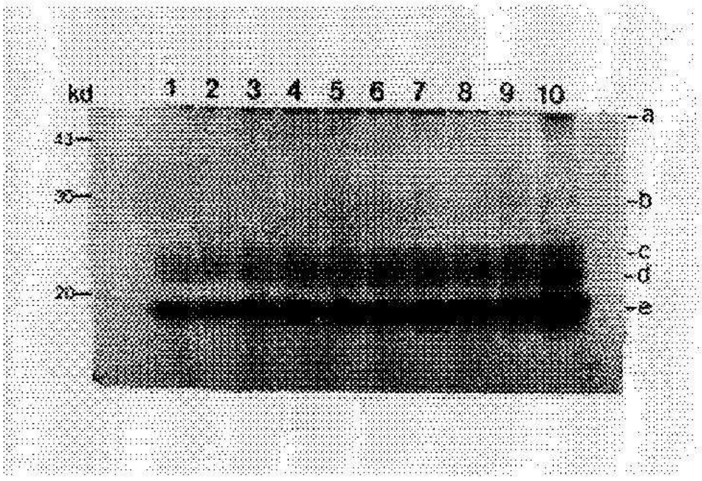
เมื่อนำสารสกัดโปรตีนจากข้าวที่ได้จากตัวอย่างส่วนต่าง ๆ คือ ใบ หน่อและราก ในปริมาณที่เท่ากันมาหาแอคติวิตีเพื่อเปรียบเทียบแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส (รูปที่ 10) เห็นแบบแผนของไอโซไซม์ได้ไม่ชัดเจนนัก แต่สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราและตัวอย่างควบคุมที่เหมือนกันทั้งในใบ หน่อ และราก คือ มีแถบไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นชัดเจนในตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราเป็นเวลา 15 วัน



รูปที่ 5 **การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส (C1-C6) ระหว่างตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อ และราก เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE**
ตัวอย่างข้าวที่เก็บก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง : ใบ (1) , หน่อ (3) ,ราก (5) ,
ตัวอย่างข้าวที่เก็บหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน :ใบ (2) , หน่อ (4) , ราก (6)
ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 μg



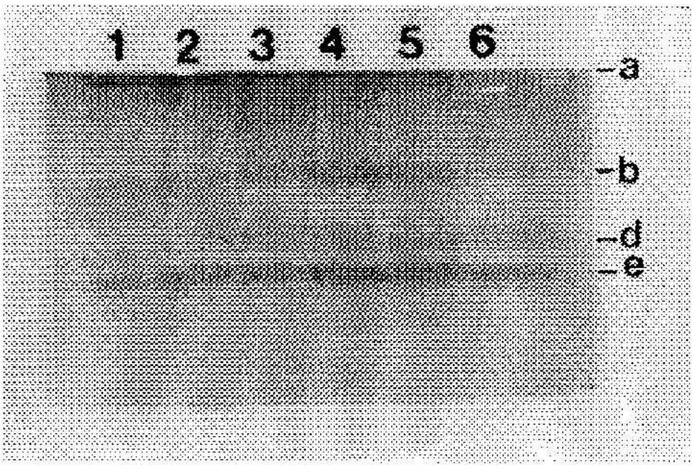
รูปที่ 6 **แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, c, d, และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE**
แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง
แถวที่ 2-10 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 15 วัน



รูปที่ 7 **แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE**

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

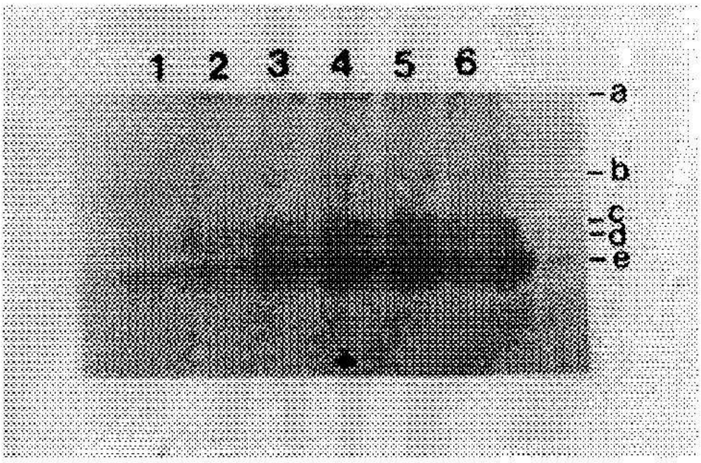
แถวที่ 2-10 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 15 วัน



รูปที่ 8 **แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, d และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE**

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

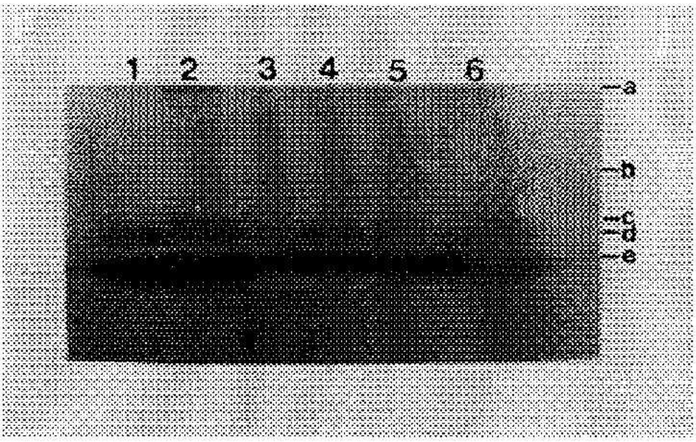
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 9 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของเอนไซม์ไคติเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 10 การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส (a-e) ระหว่างตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อ และราก เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

ตัวอย่างข้าวที่เก็บก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง : ใบ (1) , หน่อ (3) , ราก (5)

ตัวอย่างข้าวที่เก็บหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน : ใบ (2) , หน่อ (4) , ราก (6)

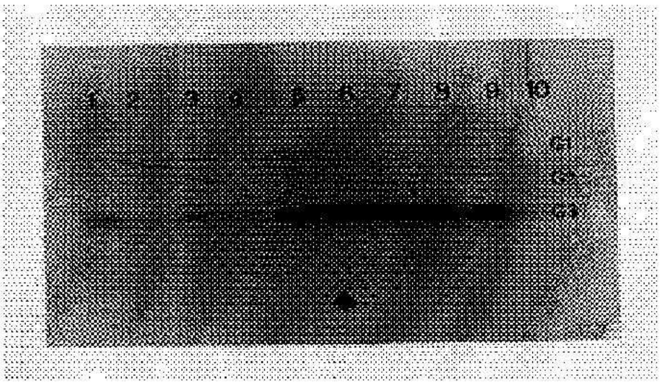
ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 μg

2.2 การตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

แอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสแสดงโดยอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลไม่แปลงสภาพจากสารสกัดโปรตีนที่เตรียมได้จากใบข้าวตัวอย่างที่เก็บทุกวันหลังพ่นสปอร์ราในสัปดาห์แรก และเมื่อครบสัปดาห์ที่สอง (รูปที่ 11) พบว่าในตัวอย่างใบเกิดแถบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้ากลูคาเนส จำนวน 3 ไอโซไซม์ คือ G1, G2 และ G3 โดยแถบไอโซไซม์ G3 เป็นแถบที่เห็นชัดเจนและมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์รา (แถวที่ 5-9) และเพิ่มขึ้นมากที่สุดในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์รา นาน15 วัน (แถวที่ 9) เมื่อวิเคราะห์แบบแผนและปริมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากใบข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 ตัวอย่างควบคุมคือไม่พ่นด้วยสปอร์ราของข้าวอายุต่าง ๆ กัน คือ 13, 28, 32 และ 37 วัน เปรียบเทียบกับข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวงคือ ข้าวอายุ 28 วัน (รูปที่ 12) พบว่าทั้งข้าวที่เป็นตัวอย่างควบคุมและข้าวที่เก็บหลังพ่นด้วยสปอร์รามีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เกิดขึ้น 3 ไอโซไซม์ คือ G1, G2 และ G3 ในทุกตัวอย่างควบคุมที่อายุต่างกัน (แถวที่ 1-4) มีแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่แตกต่างจากตัวอย่างข้าวหลังพ่นเชื้อราโรคใบวง (แถวที่ 5) อย่างชัดเจนโดยเฉพาะไอโซไซม์แถบ G3

แถบของแอคติวิตีของไอโซไซม์ของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE ในข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 13) และในข้าวพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 14) พบว่าไอโซไซม์ 3 แถบ คือ G1, G2 และ G3 โดยแถบ G3 แสดงระดับแอคติวิตีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสูงสุด ตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 มีความเข้มของแถบไอโซไซม์ G3 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนกว่าในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 หลังจากการพ่นเชื้อราโรคใบวง และในตัวอย่างข้าวทั้งสองพันธุ์มีแอคติวิตีสูงสุดในวันที่ 15 หลังพ่นสปอร์รา

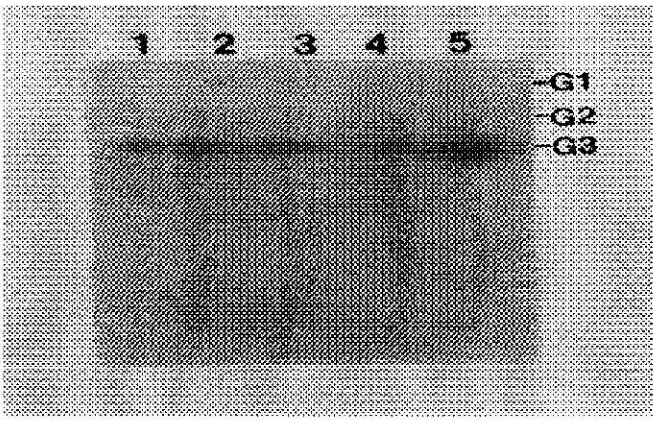
เมื่อตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในหน่อ (รูปที่ 15) และในราก (รูปที่ 16) พบว่าแถบแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่เห็นอย่างชัดเจนมีเพียงแถบเดียว คือ ไอโซไซม์ G3 ซึ่งพบว่ามีความเข้มสูงขึ้นตั้งแต่หลังจากทำการพ่นสปอร์ราโรคใบวงนาน 2 วัน และไม่เปลี่ยนแปลงมากนักในเวลาที่นานขึ้น ผลการเปรียบเทียบแบบแผนและปริมาณของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อและรากแสดงในรูปที่ 17 พบว่าไอโซไซม์ G3 เป็นเพียงไอโซไซม์เดียวที่มีปริมาณที่แตกต่างระหว่างตัวอย่างที่พ่นและไม่พ่นสปอร์รา แต่มีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งในใบหน่อและราก



รูปที่ 11 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส จากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1-9 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 15 วัน

แถวที่ 10 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

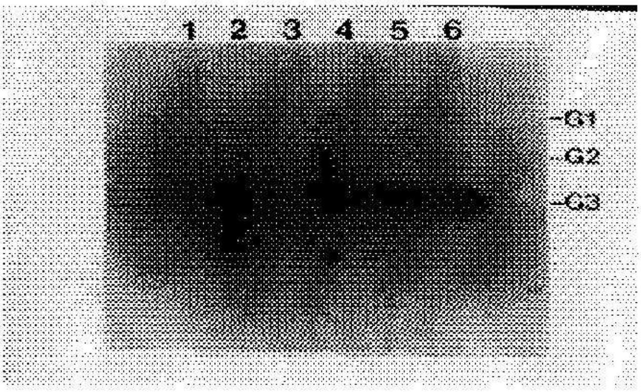


รูปที่ 12 การเปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (G1, G2 และG3) ในตัวอย่างใบข้าวที่เป็นตัวอย่างควบคุมและในตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวงเมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1-4 ตัวอย่างข้าวที่เป็นตัวควบคุมอายุ 28, 32, 37 และ 13 วัน ตามลำดับ

แถวที่ 5 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวงอายุ 28 วัน

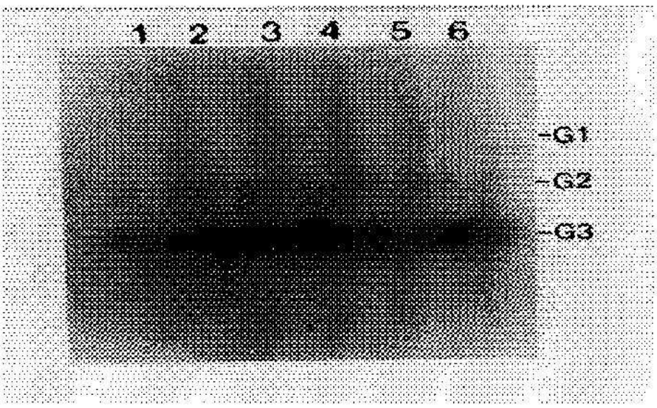
ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 μg



รูปที่ 13 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

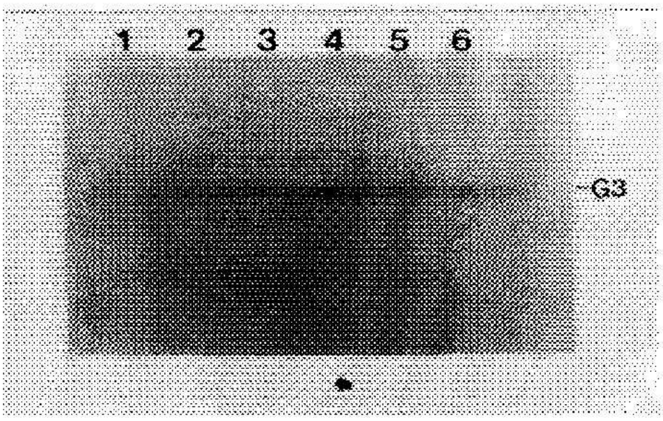
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 14 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

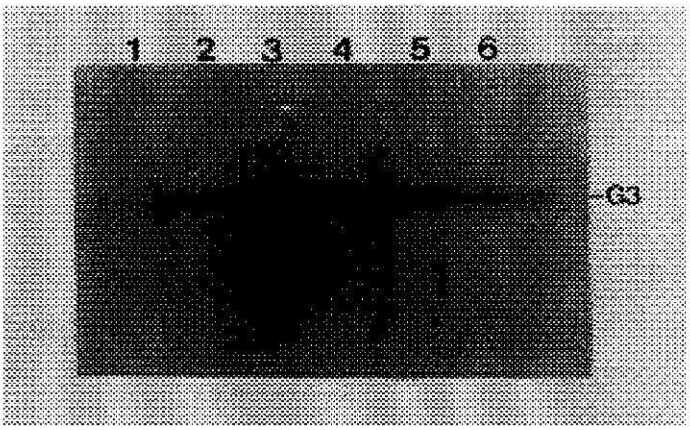
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 15 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาแนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 16 แถบแสดงแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาแนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

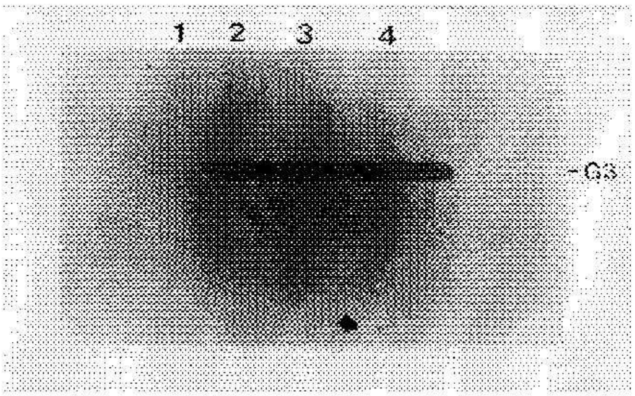
แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

3. การวิเคราะห์ Western blot ของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

3.1 วิเคราะห์ Western blot ของเอนไซม์ไคติเนส

เมื่อนำโปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการสกัดใบ หน่อ และรากของข้าวพันธุ์ กข 1 ทุกตัวอย่างพบว่าการจับ (cross-react) ของแถบโปรตีนกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ มี 10 แถบ แบ่งตามกลุ่มน้ำหนักของโมเลกุลได้ดังนี้คือ กลุ่ม WC1, WC2, WC3, WC4, WC5 กลุ่ม WC6, WC7, WC8, และ WC 9 และกลุ่ม WC10 ดังแสดงผลในรูปที่ 18 แถบ WC9 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.1 kd ในตัวอย่างที่ควบคุมมีอยู่น้อยมาก แต่มีปริมาณเพิ่มขึ้นทีละน้อยจากตัวอย่างที่พ่นสปอร์ราจนกระทั่งสูงสุดจากการพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน กลุ่มแถบ WC1, WC2, WC3, WC4 และ WC5 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 43-94 kd พบได้ในปริมาณที่เท่ากันตลอดในทุกตัวอย่างรวมทั้งกลุ่มแถบ WC6, WC7 และ WC8 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 30-43 kd โดยแถบ WC6 และ WC10 มีปริมาณน้อยมากโดยแถบ WC10 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 20-30 kd ในใบข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 19) พบแบบแผนของแถบโปรตีนที่คล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่โดยมีแถบ WC9 มีความเข้มมากขึ้นสูงสุดอย่างเห็นได้ชัดในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา ส่วนแถบ WC6 จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นในตัวอย่างที่พ่นสปอร์ราและมีความเข้มชัดเจนกว่าในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 18) รูปที่ 20 แสดงผลการทำ Western blot ของตัวอย่างที่ได้จากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 โดยใช้แอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ สังเกตได้ว่าแบบแผนของแถบโปรตีนแตกต่างไปจากที่ได้จากตัวอย่างใบอย่างชัดเจน (รูปที่ 19) โดยในหน่อมีแถบ WC11 ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่อยู่ระหว่าง WC8 และ WC9 มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 30 kd เพิ่มจากที่พบในตัวอย่างที่ได้จากใบ แต่อย่างไรก็ตามแถบ WC9 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 28.1 kd ยังคงเป็นแถบที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดในตัวอย่างข้าวที่พ่นสปอร์ราในวันที่ 7 (แถวที่ 4) นอกจากนี้ลักษณะของแบบแผนโปรตีนที่ต่างกันยังพบได้ในรากของข้าวพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 21) แถบ WC9 เป็นแถบที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดและมีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา 4 และ 7 วัน (แถวที่ 3 และ 4) แต่แบบแผนโปรตีนที่ได้จากในรากก็ยังแตกต่างไปจากในใบและหน่อ โดยมีแถบโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสได้ คือแถบ WC8, WC11, WC9 และ WC10 ซึ่งแถบ WC10 เห็นได้ชัดเจนกว่าในตัวอย่างใบและหน่อ



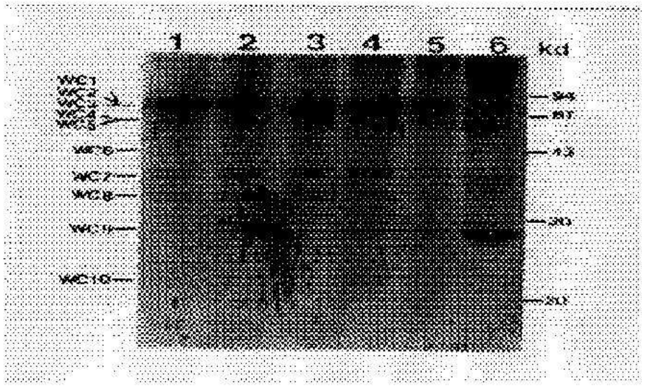
รูปที่ 17 การปรียบเทียบแอคติวิตีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส ในตัวอย่างด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างใบข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2 ตัวอย่างใบข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน

แถวที่ 3 ตัวอย่างหน่อข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน

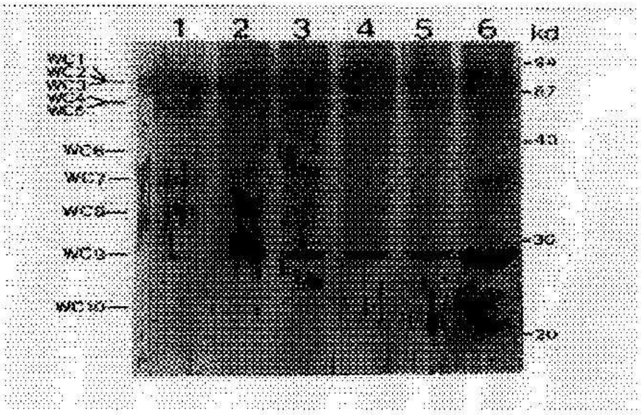
แถวที่ 4 ตัวอย่างรากข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน


1
2
3
4
5
6
Kd
WC1
WC2
WC3
WC4
WC5
WC6
WC7
WC8
WC9
WC10
94
67
43
30
20

รูปที่ 18 แบบแผน Western blot ของโปรตีนจากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

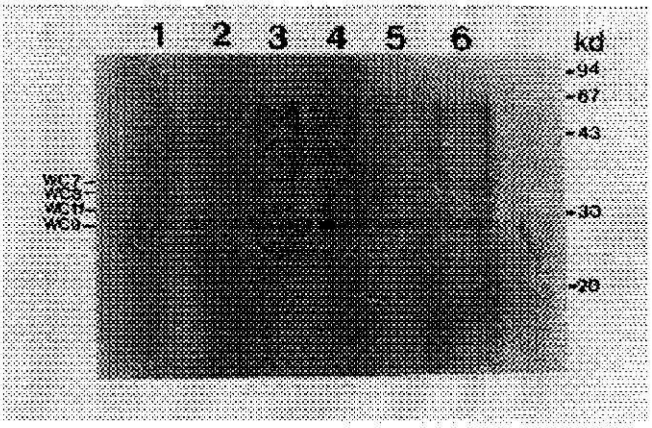
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ


1
2
3
4
5
6
kd
WC1
WC2
WC3
WC4
WC5
WC6
WC7
WC8
WC9
WC10
94
67
43
30
20

รูปที่ 19 แบบแผน Western blot ของโปรตีนจากใบของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ


1
2
3
4
5
6
kd
94
67
43
30
20
WC7
WC8
WC11
WC9

รูปที่ 20 แบบแผน Western blot ของโปรตีนจากหน่อของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

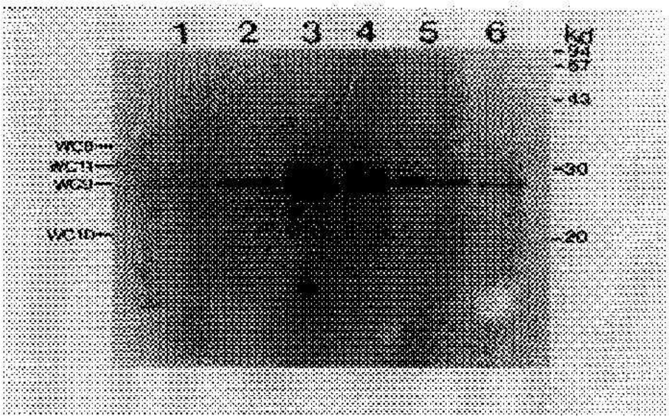
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

3.2 การวิเคราะห์ Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

แบบแผนของโปรตีนจากใบของข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 1 ที่สามารถทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ (รูปที่ 22) คือแถบ WG1, WG2, WG3, WG4, WG5 และ WG6 พบว่าแถบที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ไม่พ่นและพ่นสปอร์ราอย่างชัดเจน คือแถบ WG5 และ WG6 ซึ่งเป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36.5 และ 28.8 kd ตามลำดับ โดยมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างตัวอย่างเป็นสองช่วง คือมีมากขึ้นสูงสุดในช่วงแรกเมื่อเก็บตัวอย่างหลังพ่นสปอร์รา 4 วัน (แถวที่ 3) และระดับลดลงในระยะเวลา 10 วัน (แถวที่ 5) และมีปริมาณสูงขึ้นอีกครั้งโดยมีความเข้มของแถบมากที่สุดในตัวอย่างที่เก็บหลังพ่นสปอร์รา 15 วัน (แถวที่ 6) ส่วนแถบ WG1-WG4 เป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง คือ โดยประมาณ 43 kd ขึ้นไปเห็นได้ไม่ชัดเจน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละตัวอย่าง

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 23) พบว่าแบบแผนของแถบโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศได้ในลักษณะใกล้เคียงอย่างมากกับที่ได้จากข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 22) คือมี แถบ WG1, WG2, WG4, WG5 และ WG6 แต่การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน แถบ WG5 และ WG6 เห็นได้เป็นสองช่วง โดยช่วงแรกมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในตัวอย่างที่เก็บหลังพ่นสปอร์ราตั้งแต่ 2 วัน (แถวที่ 2) และลดลงตามลำดับ และเพิ่มขึ้นสูงสุดอีกครั้งในวันที่ 15 (แถวที่ 6)

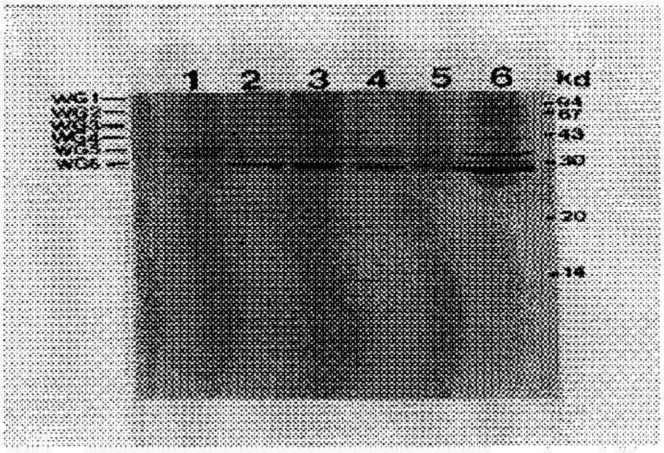
แถบของโปรตีนที่สกัดได้จากหน่อสามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศได้ (รูปที่ 24) คือแถบ WG5, WG7 และ WG6 ตามลำดับ ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 kd มีแบบแผนของโปรตีนที่แตกต่างไปจากผลที่ได้ในตัวอย่างใบ (รูปที่ 23) คือแถบ WG6 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.8 kd เป็นแถบโปรตีนที่พบในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รามีปริมาณเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างเป็นได้ชัดจากตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่พ่นสปอร์รา (แถวที่ 1) การเพิ่มของโปรตีน WG6 จะเห็นเป็นช่วง (peak) ตั้งแต่ 2 วันจนถึง 15 วัน และมีจุดยอดที่ตัวอย่างข้าววันที่ 7 หลังจากการพ่นสปอร์รา (แถวที่ 4) และปริมาณจะลดลงในเวลาต่อมา ส่วนในรากของข้าวตัวอย่าง (รูปที่ 25) มีแบบแผนโปรตีนแสดงแถบของโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศได้แตกต่างไปจากตัวอย่างใบและราก คือ แถบ WG4, WG8, WG5, WG7 และ WG6 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันแถบ WG6 เป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันในตัวอย่างใบและหน่อ คือ 28.8 kd ความเข้มของแถบของโปรตีน WG6 เปลี่ยนแปลงจนเห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่พ่นและไม่พ่นสปอร์รา และมีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ราวันที่ 7 (แถวที่ 4)


1
2
3
4
5
6
kd
94
67
43
30
20
WC8
WC11
WC9
WC10

รูปที่ 21 แบบแผน **Western blot** ของเอนไซม์ไคติเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

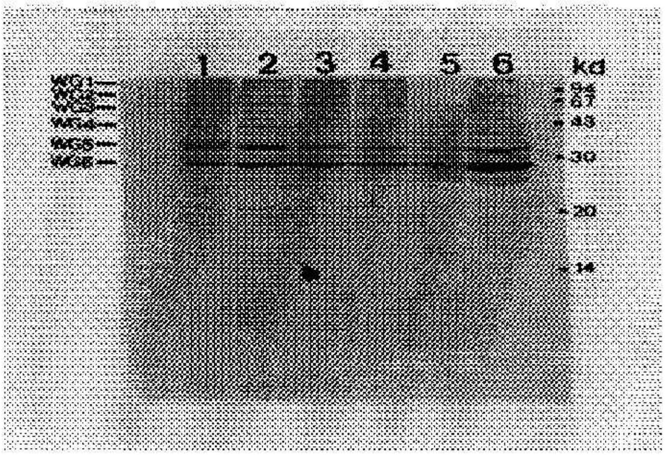
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ


1
2
3
4
5
6
kd
94
67
43
30
20
14
WG1
WG2
WG3
WG4
WG5
WG6

รูปที่ 22 แบบแผน **Western blot** ของเอนไซม์เบต้า-1, 3- กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

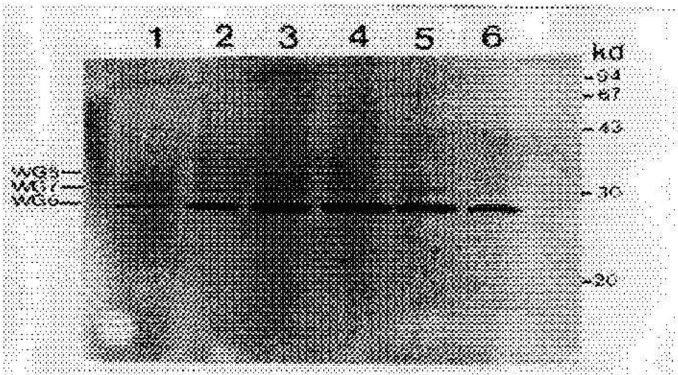
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ


1
2
3
4
5
6
kd
WG1
WG4
WG5
WG6
94
67
43
30
20
14

รูปที่ 23 แบบแผน Western blot ของ เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

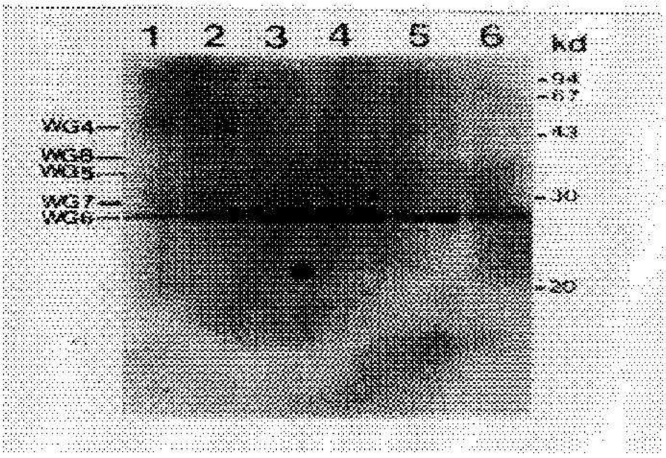
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ


1
2
3
4
5
6
kd
94
67
43
30
20
WG3
WG7
WG6

รูปที่ 24 แบบแผน Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากหน่อของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

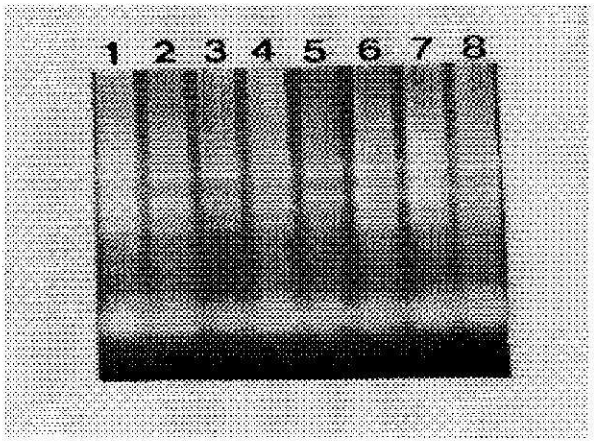
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 25 **แบบแผน Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ**

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 26 **แบบแผน RNA เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis**

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-8 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

4. การเหนี่ยวนำการสร้างอาร์เอนเอ (RNA)

4.1 การเหนี่ยวนำการสร้างอาร์เอนเอในใบข้าวจากพันธุ์ที่ต้านทานและติดโรคได้ง่ายโดยการปลูกเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบวง

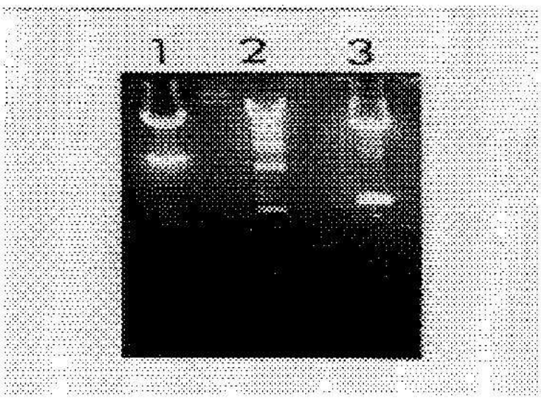
ตรวจสอบคุณภาพ RNA ที่สกัดจากใบข้าวตัวอย่างทั้งก่อนพ่นสปอร์ของเชื้อรา และหลังพ่นสปอร์ของเชื้อรา 2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าในแต่ละตัวอย่างมีแถบ RNA ชัดเจน และมีจำนวน 5 แถบ (รูปที่ 26) จากนั้นนำ RNA ที่ได้จากใบข้าวตัวอย่างมาทำ dot blot hybridization กับ p7-25 cDNA และ pRCH10-2 genomic DNA ซึ่งขนาด 220 และ 1,100 base pair ตามลำดับ ซึ่งแยกชิ้นส่วนจากพลาสมิดดีเอ็นเอ (รูปที่ 27) และติดฉลากด้วยสารไบโอตินแล้ว ดีเอนเอทั้งสองชิ้นนี้เป็นรหัสของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของข้าวบาร์เลย์และเอนไซม์ไคติเนสของข้าวเจ้า ตามลำดับ (รูปที่ 28) พบว่า RNA จากใบของข้าวตัวอย่างสามารถไฮบริไดซ์กับ p7-25 cDNA ของข้าวบาร์เลย์ได้เป็นสองพีค หลังจากการพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวง 2 ชั่วโมง มีสัญญาณแสดงปริมาณ RNA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและลดลงในตัวอย่างข้าวที่เก็บหลังพ่นสปอร์รา 8 ชั่วโมง และหลังจากนั้นเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งจนมีปริมาณสูงตลอดไปจนครบ 72 ชั่วโมง ส่วน RNA จากใบของข้าวตัวอย่างที่จับกับ pRCH10-2 genomic DNA ได้ผลไม่แน่นอน RNA ที่ได้จากหน่อ เมื่อนำมาจับกับ p7-25 cDNA และ pRCH 10-2 genomic DNA ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนสตามลำดับ พบว่าในหน่อของข้าวตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวงสามารถจับกับ p7-25 cDNA ได้ (รูปที่ 29) สัญญาณแสดงปริมาณ RNA ที่จับกับ p7-25 cDNA เพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราตั้งแต่ 24 ชั่วโมง (แถวที่ 2-4) ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนจากที่ไม่พ่นด้วยสปอร์ของเชื้อรา (แถวที่ 1) แต่ผลของ RNA จากตัวอย่างหน่อกับ pRCH10-2 genomic DNA (รูปที่ 30) สังเกตเห็นมีสัญญาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา 48 ชั่วโมง (แถวที่ 3) เมื่อเทียบกับที่ไม่พ่นสปอร์รา (แถวที่ 1) แต่ก็ได้ผลไม่ชัดเจนนัก

การเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของ β-1, 3-glucanase ในใบข้าวด้วยวิธี Northern blot hybridization กับ p7-25 probe จากข้าวบาร์เลย์ (รูปที่ 31) พบว่าในตัวอย่างปกติไม่พบสัญญาณการสร้าง และสัญญาณค่อยๆเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับในตัวอย่างที่ติดเชื้อตั้งแต่ 2, 4, 8, 12 ชั่วโมงและเห็นชัดสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และลดลงในเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง

4.2 การเหนี่ยวนำการสร้างอาร์เอนเอในเนื้อเยื่อข้าว Rice suspension cells โดยสาร elicitors ที่สกัดจากเชื้อรา

การเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของเอนไซม์ไคติเนสในเซลล์ข้าวแขวนลอย (CR 76 cell suspension) เมื่อเติมสาร elicitor ซึ่งเตรียมจากเส้นใยของเชื้อราในลักษณะต่างๆ เช่นได้จาก culture filtrate และผนังเซลล์ที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน รูปที่ 32 แสดงผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร elicitor ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเห็นได้ว่าแตกต่างกันชัดเจน สาร elicitor ประเภท

ผนังเซลล์เชื้อราชนิดขนาดโมเลกุลใหญ่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเหนี่ยวนำนี้ (แถบ C) ทั้งใน 3 แถบพบว่าความเข้มข้นของสาร elicitor จะกระตุ้นให้เห็นสัญญาณชัดเจนนั้นต้องใช้ความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 10 μg/ml สำหรับเติมลงในสารละลายเซลล์แขวนลอย (แถวที่ 2-5) ระดับ mRNA ของยีนไคติเนสและกลูคาเนสในเซลล์ข้าวแขวนลอยเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร elicitor จากผนังเซลล์เชื้อราที่มีขนาดโมเลกุลสูงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าในเนื้อเยื่อที่เป็นใบที่ปลูกเชื้อรา (รูปที่ 33 และ 34) โดยมีสัญญาณตั้งแต่เติม 0.5 ชั่วโมง และเริ่มชัดเจนตั้งแต่ 1 ชั่วโมงขึ้นไปจนกระทั่ง 1.5 ชั่วโมง ก็มีระดับสูงสุดและคงที่ตลอด 4 ชั่วโมง

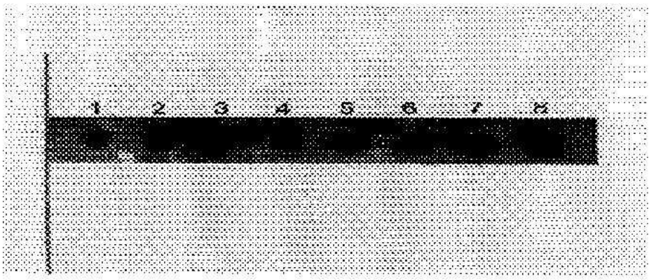


รูปที่ 27 แบบแผน DNA insert เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 pRCH 10-2 ตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn* I และ *Hind* III

แถวที่ 2 Lambda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*E II

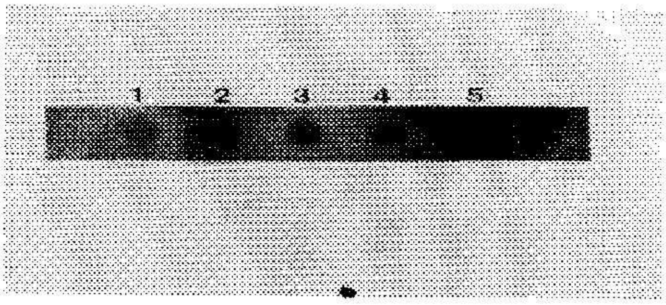
แถวที่ 3 p7-25 ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I และ *Hind* III



รูปที่ 28 RNA dot blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7 กับ p7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-8 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

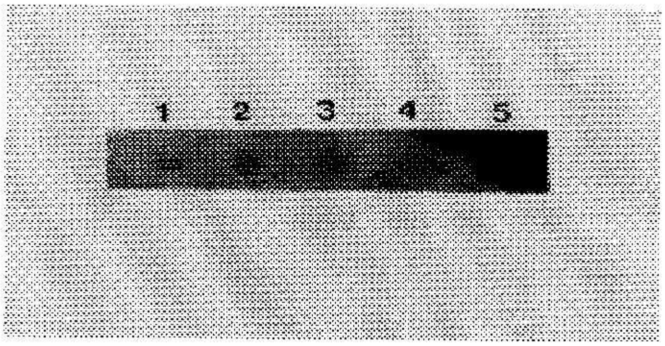


รูปที่ 29 RNA dot blot hybridization ของหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 กับ p7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-4 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

แถวที่ 5 p7-25 cDNA (positive control)

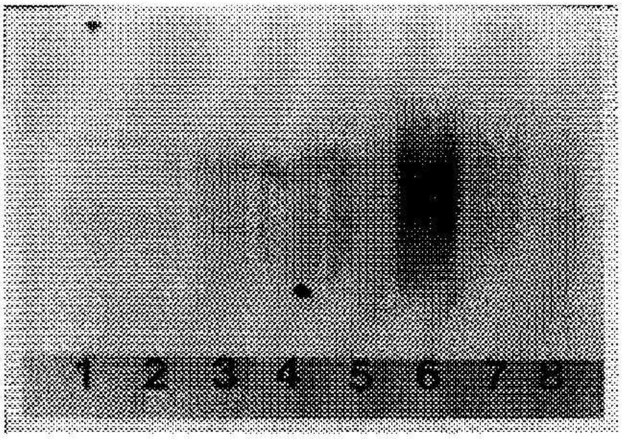


รูปที่ 30 RNA dot blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7 กับ RCH10-2 genomic DNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-4 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

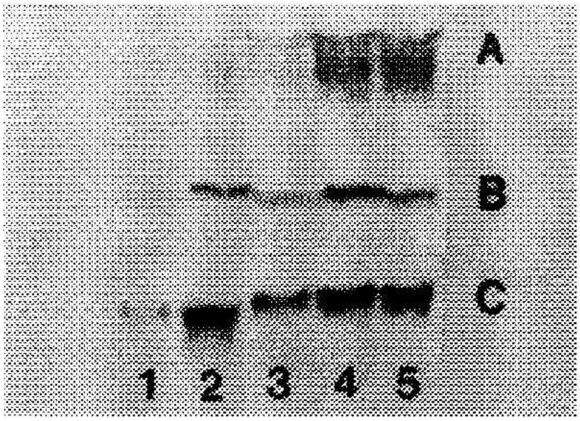
แถวที่ 5 RCH10-2 genomic DNA (positive control)



รูปที่ 31 Northern blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7 กับ β-1,3-glucanase cDNA (p7-25) ของข้าวบาร์เลย์ ติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

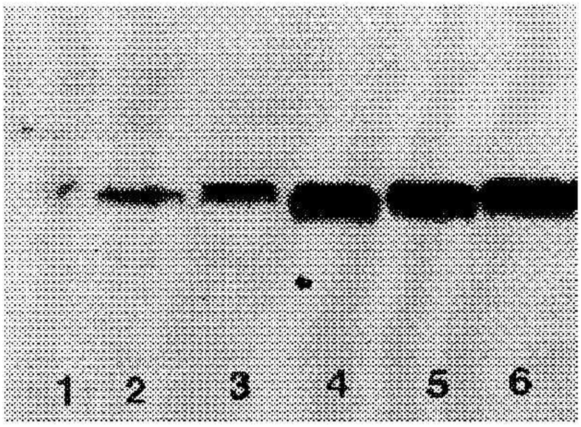
แถวที่ 2-8 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง



รูปที่ 32 Northern blot hybridization ของเซลล์ข้าวแขวนลอยพันธุ์ CR 76 กับ basic chitinase enomic DNA (RCH10-2) ของข้าวเจ้าติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP เมื่อเติม elicitors ที่เตรียมจากเชื้อราโรคใบวงประเภท (แถบ A) culture filtrate, (แถบ B) low molecular weight wall, (แถบ C) high molecular weight wall

แถวที่ 1 ตัวอย่างเซลล์ข้าวปกติ

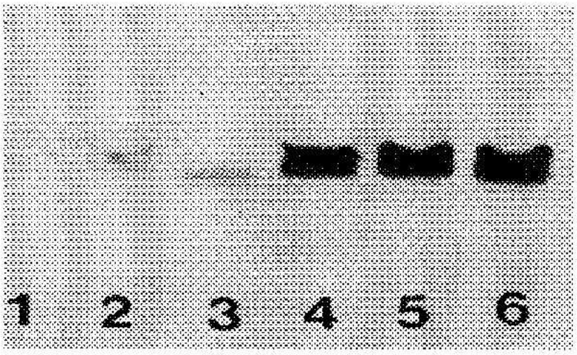
แถวที่ 2-5 ตัวอย่างเซลล์ข้าวเติม elicitors 10, 50, 75 และ 100 μg/ml



รูปที่ 33 Northern blot hybridization ของเซลล์ข้าวแขวนลอยพันธุ์ CR 76 กับ basic chitinase genomic DNA (RCH10-2) ติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP

แถวที่ 1 ตัวอย่างเซลล์ข้าวปกติ

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างเซลล์ข้าวที่เติม high molecular weight wall elicitors นาน 0.5, 1, 1.5, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง



รูปที่ 34 Northern blot hybridization ของเซลล์ข้าวแขวนลอยพันธุ์ CR 76 กับ β-1, 3-glucanase cDNA (p7-25) ติดฉลากด้วย ^{32}P dCTP

แถวที่ 1 ตัวอย่างเซลล์ข้าวปกติ

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างเซลล์ข้าวที่เติม high molecular weight wall elicitors นาน 0.5, 1, 1.5, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

วิจารณ์

1. เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสต่อการตอบสนองของพืชต่อเชื้อโรค

1.1 เอนไซม์ไคนิเนสในข้าวที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ

เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีแอคติวิตีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสสามารถเห็นแบบแผนของไอโซไซม์ทั้งชนิด neutral และ acidic ของเอนไซม์ไคติเนสใน Native PAGE พบจำนวน 6 ไอโซไซม์ ดังแสดงโดยแถบ C1 และ C2, C3, C4, C5 และ C6 ขณะที่ SDS - PAGE แสดงแบบแผนของไอโซไซม์จำนวน 5 แถบ คือ a, b, c, d และ e แต่ลักษณะแบบแผนที่ได้แตกต่างกันระหว่างจำนวนไอโซไซม์ที่พบได้ในเจลทั้งสองแบบ ลักษณะนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไคติเนสของข้าวถูกสร้าง หรือกำหนดจากยีนที่อยู่เป็นกลุ่มที่เรียกว่า multigene families (Shinshi *et al.*, 1987; Huijsduijnen *et al.*, 1987; อ้างถึงโดย Bol 1988; อ้างถึงโดย Boller, 1988; Payne *et al.*, 1990; Memelink *et al.*, 1990) โดยอาจจะมีลำดับกรดอะมิโน หรือชนิดของกรดอะมิโนแตกต่างกันเล็กน้อย จึงทำให้ผลที่ได้จากแบบแผนเมื่อแยกด้วยอิเล็กโตรฟอรีซิสที่คล้ายคลึงดังเช่นที่พบในพืชอื่นๆ เช่น ยาสูบ (Boller and Vogeli, 1984; อ้างถึงโดย Van Loon, 1985; Kauffmann et al., 1987; Legrand *et al.*, 1987) ข้าวบาร์เลย์ (Hoj *et al.*, 1989; Jacobsen *et al.*, 1990; Kragh *et al.*, 1991) เป็นต้น

1.2 เอนไซม์ไคติเนสในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าว

ปริมาณของไอโซไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างพืชที่ถูกติดเชื้อกับที่เป็นตัวอย่างปกติและในตัวอย่างที่ติดเชื้อที่เวลาต่างกัน เมื่อวิเคราะห์จากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าวคือใบ หน่อและรากมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันแต่แตกต่างกันในเรื่องเวลาของการเปลี่ยนแปลงระดับดังที่แสดงด้วยแอคติวิตีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสของใบ หน่อและราก ในใบตรงระดับของไอโซไซม์ C1 และ C2 ซึ่งอยู่บริเวณเหนือเจลมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตั้งแต่ 7 วันหลังจากพ่นเชื้อซึ่งข้าวเริ่มเกิดอาการของโรค ในขณะที่ SDS -PAGE แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างข้าวที่พ่นด้วยสปอร์ราตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป แถบ acidic ไอโซไซม์เหล่านี้จึงจัดเป็นเอนไซม์ไคติเนสที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้สร้างและหลั่งออกมาเพื่อทำลายเชื้อโรคที่มารุกรานพืชซึ่งเห็นได้ว่าในตัวอย่างข้าวที่พ่นเชื้อแล้ว 15 วัน มีระดับแอคติวิตีต่างจากในตัวอย่างที่ไม่ได้พ่นเชื้ออย่างมากมายหลายเท่าในเนื้อเยื่อส่วนอื่นของต้นข้าวที่ถูกพ่นเชื้อก็มีลักษณะแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสที่ใกล้เคียงกัน ดังเช่นที่แสดงในแอคติวิตีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพระหว่างใบหน่อและราก โดยเห็นความแตกต่างของระดับไอโซไซม์ C1, C2, C3 และ C4 ในหน่อของต้นข้าวที่พ่นเชื้อและไม่พ่นเชื้อ ไอโซไซม์ C3 เป็นไอโซไซม์ที่มีลักษณะแถบชัดเจนและมีระดับสูงขึ้นสอดคล้องกับระยะเวลาหลังพ่นเชื้อและเป็นไอโซไซม์เดียวพบได้ในหน่อที่แตกต่างจากส่วนใบและรากขณะเดียวกันแบบแผนของไอโซไซม์ในรากของตัวอย่างข้าวแสดงจำนวนของไอโซไซม์ถึง 6 ชนิด โดยเฉพาะไอโซไซม์ C4, C5 และ C6 ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่แยกได้ในบริเวณใต้เจลมีระดับสูงขึ้นอย่าง

ชัดเจนในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ราตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป โดยไอโซไซม์เหล่านี้มีระดับเพียงเล็กน้อยในตัวอย่างรากที่ไม่พ่นเชื้อและ C5 เป็นไอโซไซม์เดียวที่พบเด่นชัดในตัวอย่างรากเท่านั้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของระดับแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆจึงมีความจำเพาะในระดับหนึ่ง ถึงแม้ว่าใบเป็นส่วนที่สัมผัสกับเชื้อโรคหรือเป็นบริเวณได้รับสัญญาณจากการรุกรานของเชื้อโรคโดยตรง และสัญญาณนี้ก็มีการส่งผ่านต่อไปในเซลล์โดยวิธีการของ signal transduction เพื่อทำให้พืชมีการตอบสนองในด้านต่างๆ รวมทั้งการหลั่งเอนไซม์ไคติเนสเพื่อการทำลายเชื้อโรคการตอบสนองเหล่านี้เกิดขึ้นไม่เฉพาะแต่ในเซลล์บริเวณที่ถูกรุกราน แต่ยังสามารถกระตุ้นเซลล์ในเนื้อเยื่อส่วนอื่นโดยการเหนี่ยวนำเพื่อการต้านทานโรคของพืชเกิดขึ้นในระบบของทั้งต้น (systemic induction) ดังแสดงโดย Ward *et al.* 1991, แต่การตอบสนองโดยเอนไซม์ไคติเนสเกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีนหลายตัวที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และยีนเหล่านี้แสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจงในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน ดังนั้นจึงเห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับไอโซไซม์ที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อนั้นๆ (Felix and Meins, 1986; Keefe *et al.*, 1990; Neale *et al.*, 1990)

การเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ไคติเนส เมื่อตรวจด้วยแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสชนิด acidic (ขนาดโมเลกุล 26 kd) ของมะเขือเทศพบว่าเอนไซม์ไคติเนสของข้าวสามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศได้เป็นอย่างดี โดยสังเกตจากความเข้มของแถบโปรตีน WC9 (ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 28.1 kd โดยประมาณ) ที่ชัดเจนในตัวอย่างใบและราก ไอโซไซม์ชนิด acidic ของเอนไซม์ไคติเนสในข้าวถูกหลั่งออกมาหลังจากการเหนี่ยวนำของเชื้อโรค ดังเห็นได้จากในตัวอย่างของวันที่ 7, 10 และ 15 หลังพ่นเชื้อ ซึ่งไอโซไซม์นี้มีอยู่น้อยมากในตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อแต่ความไวของการเหนี่ยวนำเกิดขึ้นต่างกันระหว่างตัวอย่างใบ หน่อและราก โดยส่วนหน่อและรากของข้าวซึ่งเป็นส่วนที่ได้รับสัญญาณจากการทำลายเซลล์บริเวณใบมีการตอบสนองได้ดีกว่าในใบ ซึ่งเห็นได้จากการเปรียบเทียบระดับโปรตีน WC9 ใน Western blot แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองในใบด้านระดับของเอนไซม์ไคติเนสจะอยู่ได้นานกว่าและคงระดับสูงได้ดังเช่นที่เห็นในตัวอย่างข้าววันที่ 15 หลังพ่นเชื้อแล้ว

1.3 เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสในข้าวที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระดับแอคติวิตีของไอโซไซม์ ชนิด acidic C1 และ C2 หรือ c, d และ e ของเอนไซม์ไคติเนสแสดงโดยแอคติวิตีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพและมีเอสดีเอสตามลำดับในใบของข้าวที่มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อกับการเปลี่ยนแปลงระดับแอคติวิตีของไอโซไซม์ชนิด acidic G3 ของเอนไซม์เบต้า -1, 3-กลูคาเนส ซึ่งเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างข้าวหลังพ่นเชื้อ 15 วัน ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนเหตุการณ์ของการเหนี่ยวนำร่วมกันของเอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนสเมื่อมีการรุกรานของเชื้อโรคหรือได้รับสาร elicitor รวมทั้งก๊าซเอธิลีน (Vogeli *et al.*, 1988; Mauch and staehelin,

1989) โดยเอนไซม์ทั้งสองนี้มีการทำงานแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ในการตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อโรค (Mauch *et al.*,1988b) เป็นต้น

1.4 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าว

ไอโซไซม์ G3 ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งตรวจพบด้วยแอคติวิตีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิลแบบไม่แปลงสภาพเป็นไอโซไซม์ชนิด acidic ชนิดเดียวที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับที่เด่นชัด ดังแสดงในตัวอย่างส่วนต่างๆ ของข้าวที่ติดเชื้อ เช่น ใบ หน่อและรากไม่แตกต่างกันมากนัก ดังเช่นในแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส (C1-C6) ที่มีลักษณะเป็นไอโซไซม์จำเพาะต่อเนื้อเยื่อนั้นๆ แต่ความไวของการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ G3 นั้นเห็นได้ชัดเจนและมีระดับแอคติวิตีสูงสุดในหน่อและรากตั้งแต่วันที่ 7-10 หลังพ่นเชื้อ ในขณะที่ในตัวอย่างใบจะมีระดับแอคติวิตีสูงสุดในวันที่ 15 หลังพ่นเชื้อซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์กลูคาเนสโดยใช้วิธี Western blot โดยใช้แอนติเซราต่อเอนไซม์กลูคาเนสชนิด acidic ของมะเขือเทศซึ่งได้มาจากการผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์กลูคาเนสของมะเขือเทศที่มีขนาดโมเลกุล 35 kd สามารถตรวจหรือเกิดปฏิกิริยาร่วม (cross-react) กับเอนไซม์กลูคาเนสในข้าวได้อย่างดี โดยสังเกตจากความเข้มที่ชัดเจนของแถบโปรตีนที่ได้ WG6 เป็นแถบโปรตีนของข้าวที่สามารถจับกับแอนติเซราของเอนไซม์กลูคาเนสซึ่งแสดงโดย SDS-PAGE โดยมีขนาดโมเลกุล 28.8 kd โดยประมาณ พบว่าระดับโปรตีนเพิ่มมากขึ้นในทุกตัวอย่างทั้งของใบ หน่อและรากที่พ่นเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับที่ปรากฏอยู่เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อ แต่การเปลี่ยนแปลงของ WG6 ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและรวดเร็วในหน่อและรากจนถึงระดับสูงสุดตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 10 ตามลำดับ ขณะที่ในตัวอย่างใบของข้าวการตอบสนองของเอนไซม์กลูคาเนสก็เห็นได้เป็นสองช่วงคือในระยะแรก WG6 พร้อมกับ WG5 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 หลังพ่นเชื้อและลดลง ต่อมาก็มีระดับเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 15 หลังพ่นเชื้อ เหตุการณ์นี้ชี้ให้เห็นว่าในเนื้อเยื่อส่วนใบการตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อในเรื่องของเอนไซม์กลูคาเนสมีรูปแบบลักษณะของการเหนี่ยวนำเกิดขึ้นเป็นสองระยะโดยในระยะแรกเอนไซม์กลูคาเนสถูกหลั่งออกมาย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรคที่มารุกรานบริเวณผิวใบ ผนังเซลล์ของเชื้อโรคที่ถูกย่อยแล้วก็ทำหน้าที่เป็น elicitor ไปเหนี่ยวนำกลไกการป้องกันของพืชในลำดับต่อมาซึ่งการตอบสนองมีระดับสูงขึ้นและไวขึ้นกว่าครั้งแรกดังเช่นที่เห็นการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีและปริมาณเอนไซม์กลูคาเนสในหน่อและรากเกิดขึ้นได้รวดเร็ว และชัดเจนกว่าในใบซึ่งเป็นบริเวณที่สัมผัสกับเชื้อโรคโดยตรง จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์กลูคาเนสมีบทบาทในการเกิดสัญญาณซึ่งนำไปสู่การเกิด Hypersensitive reaction โดยการปล่อย elicitor จากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งทำงานโดยเอนไซม์กลูคาเนส (Mauch and Staehelin, 1989; Lamb *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1990)

1.5 เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์กลูคาเนสในข้าวพันธุ์อ่อนแอและต้านทาน

เมื่อเทียบความไวต่อการตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรค ในส่วนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส c, d และ e เมื่อวิเคราะห์ด้วยเจลแอคติวิตีอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีความแตกต่างกันในเรื่องพันธุกรรมด้านการเกิดปฏิกิริยากับเชื้อโรค พบว่าข้าวพันธุ์ กข 7 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ต้านทานโรค ในส่วนใบที่ได้รับการพ่นเชื้อมีระดับแอคติวิตีของไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นรวดเร็วและมากกว่าในข้าวพันธุ์ กข 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอและเกิดโรคได้ง่าย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน เริ่มขึ้นตั้งแต่ 2-3 วันหลังพ่นสปอร์ในตัวอย่างของข้าวพันธุ์ กข 7 ในขณะที่ตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 ค่อยๆ เปลี่ยนแปลงระดับและเริ่มเห็นชัดขึ้นในวันที่ 4 หลังพ่นสปอร์รา เมื่อเปรียบเทียบกับระดับที่มีอยู่เพียบเล็กน้อยในตัวอย่างที่ไม่พ่นสปอร์รา ข้อสังเกตนี้สอดคล้องกับผลที่แสดงโดยวิธี Western blot ตรงส่วนแบบแผนของโปรตีนจากข้าวที่สามารถทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสชนิด acidic (ขนาด 26 kd) จากมะเขือเทศ (De Wit, P.J.G.M., *et al.*, 1993) เห็นได้ว่าระดับของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28.1 kd (WC9) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนอย่างรวดเร็วในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อเทียบกับในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 ข้อสังเกตเช่นนี้ยังพบได้ในการเปลี่ยนแปลงระดับแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส G3 ซึ่งพบว่าระดับสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและปริมาณสูงกว่าในข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่พ่นเชื้อของข้าวพันธุ์ กข 1 ซึ่งแสดงผลที่สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน WG6 และ WG5 ที่มีขนาดโมเลกุล 28.8 และ 36.5 kd ตามลำดับซึ่งสามารถตรวจพบด้วยแอนติเซราต่อเอนไซม์กลูคาเนสชนิด acidic ของมะเขือเทศในปฏิกิริยาอิมมูโนบนแผ่น Western blot โดยในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 ที่มีการติดเชื้อมีระดับของโปรตีน WG6 และ WG5 สูงกว่าและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 อย่างเห็นได้ชัดเจน ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าความไวต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อของพืชที่อ่อนแอมีน้อยกว่าในพืชที่ต้านทาน ซึ่งเป็นลักษณะที่จะทำให้เกิดโรคขึ้นได้ง่ายกว่าด้วย ข้อมูลเหล่านี้ช่วยบ่งชี้ถึงบทบาทของเอนไซม์ไฮโดรเลสในพืชในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคตรงกับข้อมูลที่ได้จากการสังเกตของระดับแอคติวิตีของไคติเนสและกลูคาเนสในมะเขือเทศที่สูงมากขึ้นหลังจากพ่นเชื้อ *cladosporium fulvum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบเน่าในมะเขือเทศซึ่งมีปริมาณสูงในพันธุ์ที่ต้านมากกว่าในพันธุ์ที่อ่อนแอ (Joosten and De Wit, 1988)

2 การเหนี่ยวนำระดับ RNA ของเอนไซม์กลูคาเนส

ระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่เพิ่มมากขึ้นในข้าวหลังการติดเชื้อ ดังที่ได้กล่าวแล้วนั้นเป็นผลมาจากการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ RNA การควบคุมการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นได้รวดเร็วโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงระดับของ RNA เอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1, 3-กลูคาเนสที่แสดงด้วยสัญญาณของ hybridization กับ probe ไคติเนสจากข้าวเจ้า [basic genomic DNA (RCH 10-2), Zhu, Q. and Lamb, C.J. 1991] และ β 1,3 glucanase cDNA (p7-25) จากข้าวบาร์เลย์ (Jutidamrongphan *et al.*) บนแผ่นเมมเบรน ในตัวอย่างใบเห็นได้ว่าหลังการติด

เชื้อแล้วระดับการสร้าง RNA ของกลูคาเนสถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 ชั่วโมงหลังการพ่นเชื้อและระดับลดลง ต่อมาก็มีระดับสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่งซึ่งแสดงถึงการตอบสนองที่เกิดขึ้นภายหลัง ผลที่ได้นี้ก็สอดคล้องและควบคู่กับแบบแผนการเหนี่ยวนำระดับเอนไซม์กลูคาเนส ที่แสดงด้วย Western blot แต่การเหนี่ยวนำระดับโปรตีนเกิดขึ้นได้ช้ากว่าในระดับ RNA เป็นอย่างมาก ดังแสดงผลโดย Hedrick *et al.* (1988), Vogeli-Lange *et al.* (1988) , Van den Bulcke, M., *et al.* (1989) และ Jutidamrongphan *et al.* (1991)

ในเนื้อเยื่อต่างกันของข้าว เช่นในหน่อ การเหนี่ยวนำระดับ RNA transcripts ของกลูคาเนสเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่ติดเชื้อระยะเวลาที่ต่างจากในใบคือมีระดับสูงขึ้นใน 24 ชั่วโมงหลังพ่นเชื้อและลดต่ำลงซึ่งการตอบสนองของพืชที่ควบคุมระดับยีน ในส่วนของหน่อต้นข้าวเกิดขึ้นเป็นเพียงช่วงเดียวและผลที่ได้ก็ยังพบได้ในระดับของเอนไซม์ด้วย ขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาระดับ RNA transcripts ของเอนไซม์ไคติเนสในหน่อมีปริมาณสูงขึ้นหลังจากพ่นสปอร์ราแล้ว 48 ชั่วโมง ซึ่งดูเหมือนกับว่าตอบสนองได้ช้ากว่ายีนของเอนไซม์กลูคาเนส แต่เนื่องจากผลที่ได้ไม่ชัดเจนนักจึงไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลยืนยันความแตกต่างของการตอบสนองของเอนไซม์ทั้งสองนี้ในพืชต่อการรุกรานของเชื้อ

สรุป

การตอบสนองเพื่อการป้องกันโรคของข้าวต่อการรุกรานของเชื้อราที่เกิดขึ้นหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง (*R. oryzae*) โดยศึกษาส่วนของการสร้างเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและการควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ทั้งสองในระดับโปรตีน และ RNA พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสในตัวอย่างข้าวที่ติดเชื้อมีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยสรุปได้ดังนี้

1. การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีเจลอิเลกโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ แสดงแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสในใบและหน่อพบว่ามี 5 ไอโซไซม์ คือ C1, C2, C3, C4 และ C6 ส่วนในรากมี 6 ไอโซไซม์โดยมี C5 เพิ่มขึ้นจากที่พบในใบและหน่อ

2. แบบแผนของไอโซไซม์ที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาของการติดเชื้อในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของข้าวจะแตกต่างกัน โดยในใบซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับเชื้อโรคโดยตรงพบว่ามีไอโซไซม์ C1 และ C2 เพิ่มขึ้นสูงสุด ในขณะที่ไอโซไซม์ C3, C4, และ C4, C5 และ C6 เพิ่มสูงขึ้นในหน่อและในรากตามลำดับ ซึ่งหน่อและรากเป็นส่วนที่ได้รับการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อที่ใบ

3. แอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส ที่เพิ่มขึ้นอย่างเฉพาะเจาะจงในใบ หน่อและรากก็คือ กลุ่ม C1 และ C2 กลุ่ม C3 และ C5 ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีเจลอิเลกโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสพบว่ามีแบบแผนของไอโซไซม์ชนิดเป็นกลางและ acidic คล้ายคลึงกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเจล แบบไม่แปลงสภาพโดยแสดงไอโซไซม์ 5 ชนิดคือ a, b, c, d และ e เช่นเดียวกันในตัวอย่างใบข้าวที่ติดเชื้อมีไอโซไซม์ c, d และ e สูงขึ้นอย่างชัดเจนและมากที่สุดในวันที่ 15 หลังการพ่นเชื้อซึ่งเกิดขึ้นในส่วนของหน่อและรากด้วยไอโซไซม์ b พบได้ชัดเจนในหน่อและปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าในใบและราก

5. ลักษณะของการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไคติเนสในระดับไอโซไซม์ที่เฉพาะในเนื้อเยื่อนั้นๆ ของพืช และความไวของการเหนี่ยวนำโดยวิธีแอคติวิตีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ด้วย Western blot ของเอนไซม์ไคติเนสในตัวอย่างข้าวที่แสดงแถบโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศได้ตรงแถบ WC9 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.1 kd เป็นแถบที่มีความเข้มสูงสุด ในส่วนใบหลังการติดเชื้อ 15 วัน และในส่วนรากกับหน่อเกิดขึ้นในระยะที่เร็วกว่า 7 วัน

6. ขณะที่พบว่าระดับของเอนไซม์ไคติเนสถูกเหนี่ยวนำให้สูงขึ้นในข้าวที่ติดเชื้อ ก็พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพโดยไอโซไซม์ชนิด acidic มีระดับสูงขึ้นในใบของข้าวตัวอย่างมี 3 ไอโซ

ไซม์คือ G1, G2 และ G3 ไอโซไซม์ G3 จะแสดงระดับแอคติวิตีสูงสุดในตัวอย่างส่วนใบ หน่อและรากที่ติดเชื้อ เช่นเดียวกันในขณะที่มีระดับ G3 เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อ

7. ความไวของการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์กลูคาเนสในการตอบสนองของข้าวต่อการรุกรานของเชื้อราตรงส่วนใบเกิดขึ้นได้ช้ากว่าและอยู่นานกว่าในส่วนหน่อและราก ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วย Western blot ตรงแถบโปรตีนที่เป็นไอโซไซม์ของเอนไซม์กลูคาเนสที่สามารถจับกับแอตติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ของมะเขือเทศ คือ WG6 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 28.8 kd โดยในใบมีการตอบสนองเป็นสองช่วงและมีปริมาณสูงสุดใน 15 วัน หลังพ่นเชื้อ แต่ในส่วนของหน่อและรากพบว่าแถบ WG6 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 และเพิ่มมากสุดในวันที่ 7 และลดลงตามลำดับ นอกจากนี้ในส่วนของไอโซไซม์ของเอนไซม์กลูคาเนสที่แสดงโดย Western blot ตรงแถบ WG5 ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 36.5 kd โดยประมาณ เป็นไอโซไซม์ที่เฉพาะและเด่นชัดในใบที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำของเชื้อรา

8. เมื่อเปรียบเทียบบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองนี้ต่อการต้านทานโรคในตัวอย่างข้าวพันธุ์ที่เกิดโรคได้ง่าย (กข 1) และพันธุ์ที่ต้านทาน (กข 7) พบว่าความไวและระดับของเอนไซม์ทั้งสองในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 มีการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนได้ดีมากกว่าในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1

9. นอกจากการแสดงออกของยีนเอนไซม์ไคติเนส และกลูคาเนสต่อการรุกรานของเชื้อราในระดับโปรตีนแล้วยังพบว่าการควบคุมการแสดงออกในระดับยีนก็เกิดขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA transcripts ที่สามารถจับกับ cDNA ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากข้าวบาร์เลย์ในส่วนใบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมงหลังการพ่นเชื้อ ในขณะที่ส่วนของหน่อพบการเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA ของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์กลูคาเนสโดยมีระดับสูงสุดใน 48 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ในส่วนของเนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์ข้าวเมื่อกระตุ้นด้วยสาร elicitor ที่เตรียมได้จากส่วนต่างๆของเชื้อราโรคใบวง ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนผนังเซลล์ พบว่า elicitor จากผนังเซลล์เชื้อราที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของเอนไซม์ทั้งสองได้รวดเร็วมากภายในครึ่งชั่วโมง และถึงจุดสูงสุดเมื่อเติมนาน 1.5 ชั่วโมง ซึ่งเร็วและชัดเจนกว่าที่พบในข้าวที่เป็นส่วนใบที่ปลูกเชื้อรา

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2533. โรคพืชวิทยาชั้นสูง. โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abeles, F.B. and Forrence, L.E. 1970. Temporal and hormonal control of β-1, 3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 45: 395-400.

Ahl, P., Benjama, A., Samson, R. and Gianinazzi, S.1981. Induction chez le chez le tabac par Pseudomonas syringae de nouvelles proteins (protein "b") associees au developement d'une resistance non specifique a une deuxieme infection. Phytopathol. 102 : 201

Bell, J.N., Ryder, T.B., Wingate, V.P.M., Beiley, J.A. and Lamb, C.J. 1986. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible plant-pathogen interaction. Mol. Cell. Biol. 6 : 1615-1623.

Benhamou, N., Joosten, M.H.A.J. and De Wit, P.J.G.M. 1990. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissue infected by *Fusarium oxysporium* f. sp.*radicis-lycopersici*. Plant Physiol. 92: 1108-1120.

Bol, J.F. 1988. Structure and expression of plant genes encoding pathogenesis -related proteins. In: Temporal and spatial regulation of plant genes. Verma, D.P.S., Goldberg, R.B. (eds.) Springer, Wien, pp. 201-221.

Boller, T. 1985. Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. Cellular Molecular Biology of Plant stress. 494 : 247-262.

Boller, T. 1988. Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. Plant Mol. cell Biol. 5: 145-174.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F.and Vogeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves : Induction by ethylene, purification, properties and possible function. Planta 157 : 22-31

Boller, T. and Metraux, J.P.1988. Extracellular localication of chitinase in cucumber. Physiol. Mol. Plant Pathol. 33 : 11-16.

Boller, T.and Vogeli. U. 1984. Vacuolear localization of ethylene-induced chitinase in bean. Plant Physiol. 74 : 442-444.

Broglie, K.E., Gaynor, J.J. and Broglie, R.M. 1986. Ethylene-regulated gene expression : molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 83 : 6820-6824.

Camacho-Henriquez, A. and Sanger, H.L. 1984. Purification and partial characterization of the major "pathogenesis-related" tobacco leaf protein p14 from potato spidle tuber viroid (PSTV)-infected tomato leaves. Arch. Virol. 81 : 263-268.

Chu C. C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C. and BI, F.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica 5: 659-668.

Chomczynski, P.and Sacchi, N. 1989. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.

Collinge, D.B. and Slusarenko, A.J. 1987. Plant gene expression in response to pathogens. Plant Mol. Biol. 9 : 389-410.

Collmer, A.1986. The molecular biology of pectic enzyme production and bacterial soft-rot pathogenesis. In biology and molecular biology of plant pathogen interaction, J.A. Bailey. (eds.) Berlin: Springer-Verlag, pp. 277-289.

Conejero, V. and Semancik, J.S. 1977. Exocortis viroid. Alteration in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. Virol. 77 : 221-232.

Darvil, A.G. and Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial interfection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35 : 243-275

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. Ann. NY Acad. Sci. 121 : 404-427

De Looze, M., Alliotte, T., Gheysen, G., Genetello, C., Gielen, J., Soetaert, P., Van Montagu, M. and Inze, D. 1989. Primary structure of hormonally regulated β-glucanase of *Nicotiana plumbaginifilia*. Gene 70 : 13-23.

De Wit, P.J.G.M., Marmeisse, R., Van De Naekervcken, G, F.J.M., Goosen, T. and Van den Broek, H.W.J. 1993. Disruption of the avirulence gene *Avr9* in 2 races of the tomato pathogene *Cladosporium fulvum* causes virulence on tomato genotypes with the complementary resistance gene *cf9*. Mol Plant-Microbe Interanct. 6 : 412-417.

Dixon, R.A. 1986. The phytoalexin response : elicitation, signaling and control of host gene expression. Biol. Rev. 61 : 239-291.

Felix, G. and Meins, F. 1986. Developmental and hormonal regulation of β-1, 3-glucanase in tobacco. Planta 167 : 206-211.

Fincher, G.B. Lock, P.A., Morgan, M.M., Lingelbach, K., Wettenhall, R.E.H. Mercer, J.F.B., Brandt, A. and Thomson, K.K. 1986. Primary structure of the (1, 3-1, 4) β-glucan 4-glucanohydrolase from barley aleurone. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 83 : 2081-2085.

Flor, H.H. 1947. Inheritance of reaction to flax .J.Agr.Res. 74 : 241-262.

Gaynor,J.J. and Unkenholz, K.M.1989. Sequence analysis of genomic colne encoding an endochitinase from *Salanum tuberrosum*. Nucleic Acid Res. 17 : 5855-5856.

Gianinazzi, S., Martin, C., and Vallee, J.C. 1970. Hypersensibilite aux virus, temperature et proteins soluble chez le *Nicotiana* Xanthinc. Apparition de nouvelles macromolecules lors de la repression de la synthese virale, C.R. Acad. Sci. Paris(Ser. D). 270 : 2383-2386.

Gianinazzi, S., Pratt, H.M., Shewry, P.R. and Miflin, B.J. 1977. Partial purification and pleliminary characteristic of soluble proteins specific to virus infected tobacco plants. J. Gen. Virol. 34 : 345-351

Goldberg, R. 1980. Cell wall polysaccharidase activities and growth processes : A possible Relationship. Physiol, Plant. 50 : 261-264.

Hamer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G. and Valent, B.1988. A mechanism for surface attachment in spore of a plant pathogenic fungus. Science 239 : 288-290.

Hedrick, S.A., Bell, J.N., Boller, T. and Lamb, C.J. 1988. Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. Plant Physiol. 86 : 182-186.

Hinton D.M.and Pressey, R. 1980. Glucanases in fruits and vegetables. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 : 499-502.

Hogue, R. and Asselin, A. 1987. Detection of 10 additional of pathogenesis-related (b) proteins in intracellular fluid extract from stressed "Xanthi-nc" tobacco leaf tissue. Can. J. Bot. 65 : 476-481.

Hoj, P.B., Hartman, D.J., Morrice, N.A., Doan, D.N.P. and Fincher, G.B. 1989. Purification of (1-3)-β-glucan endohydrolase isoenzyme II from germinating barley and determination of its primary structure of a cDNA clone. Plant Mol. Biol. 13 : 31-42.

Huber, D.J. and Nevins, D.J. 1980. β-D-glucan hydrolase activity in *Zea* coleoptile cell walls. Plant Physiol. 65 : 768-773

Huijsduijnen, R.A.M., Kauffmann, S., Brederode, F.T., Cornelissen, B.J.C., Legrand, M., Fritig, B., and Bol, F. 1987. Homology between chitinase that are induced by TMV infection of tobacco. Plant Mol. 9 : 411-420.

Jacobsen, S., Mikkelsen, J.D. and Hejgaard, J. 1990. Characterization of two antifungal endochitinases from barley grian. Physiol. Plant 79 : 554-562.

Jamet, E. and Fritig, B. 1986. Purification and characterization of 8 of the pathogenesisrelated proteins in tobacco leaves reacting hypersensitively to tobacco mosaic virus. Plant Mol. Biol. 6 : 69-80.

Joosten, M.H.A.J. and De Wit P.J.G.M. 1988.Identification of several pathogenesis-related protein in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (Syn, *Fulvia fulva*) as β-1, 3-glucanases and chitinases. Plant Physiol. 89 : 945-951

Jutidamrongphan, W., Andersen, J.B., Mackinnon, G., Manners, J.M., Simpson R.S. and Scott, K.J. 1991. Induction of β-1, 3-glucanases in barley in response to infection by fungal pathogens. Mol. Plant-Microbe Interact. 4(3) : 234-238.

Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P, and Fritig, B.1990. Isolation and characterization of six pathogenesis-related (PR) protein of Samsun NN tobacco. Plant Mol, 14 : 381-390.

Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B.1987. Biological function of pathogenesis-related proteins Four PR-proteins have β-1, 3-glucanase activity, EMBO J. 6 : 3209-3212.

Keffe, D., Hinz, U. and Meins, F. 1990. The effect of ethylene on the cell-type-specific and inter cellular localization of β-1, 3-glucanase and chitinase in tobacco leaves, Planta 182 : 43-51.

Kolattukudy, P.E. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 23 : 223-250

Kombrink, E., Schroder, M. and Hahlbrock, K. 1988 Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1, 3-glucanases and chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 782-786.

Kragh, K.M., Jacobsen, S., Mikkelsen, J.D. and Nielsen, K.A. 1991. Purification and characterization of three chitinases and one β-1, 3-glucanases accumulating in the medium of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) Plant Science 76 : 65-77.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteria phage T4. Nature (London) 227 : 680-685.

Lamb, C.J. Lawton, M.A., Dron, M. and Dixon, R.A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defences against microbial attack. Cell 56 : 215-224.

Laflamme, D. and Roxby, R. 1989. Isolation and nucleo tide sequence of cDNA clones encoding potato chitinase genes. Plant Mol. Biol. 13 : 249-250.

Legrand, M,. Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B. 1987. Biological function of "pathogenesis-related" protein four PR-protein are chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 : 6750-6754

Lin, Z.F., Wu, D., Luo, A. and Zhang, W. 1992. Chitinase from seeds of *Zea mays* and *Coixlachryma-jobi* L purification and some properties. Process Biochemistry 27 : 83-88.

Linthorst, H.J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plant. Critical Reviews in Plant Science 10 (2) : 123-150.

Linthorst, H.J.M., Melchers, L.S., Mayer, A., Van Roekel, J.S.C., Cornelissen, B.J.C. and Bol, J.F. 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic β-1, 3-glucanase of tobacco. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 87 : 8756-8760.

Linthorst, H.J.M., Van Loon, L.C., Van Rossum, C.M.A., Mayer, A., Bol, J.F., Roekel, J.S.C., Meulenhoff, E.J.S. and Cornelissen, B.J.C. 1990 Analysis of acidic and basic chitinase from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. Mol. Plant-Microbe Interact, 4 : 252-258.

Lowry, P.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Manniatis, T., Fritsch, Z.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning : A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratoory, Cold Spring Harbor, NY.

Mauch, F., Mauch-Manie, B. and Boller, T. 1988b. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combonations of chitinase and β-1, 3-glucanase. Plant Physiol. 88 : 936-942.

Mauch, F. and Staehelin, L.A. 1989. Functional implications of the sub-cellular localization of ethylene-induced chitinase and β-1, 3-glucanase in bean leaves. Plant Cell 1 : 447-457.

Memelink, J., Linthorst, H.J.M., Schilperoort, R.A. and Hoge, H.C. 1990. Tobacco gengs encoding acidid and basic pathogenesis-related proteins display different expression patterns. Plant Mol, Biol. 14 : 119-126.

Metraux, J.P. and Boller, T.H. 1986. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial, and fungal infection, Physiol, Mol. Plant Pathol. 28 : 161-169.

Metraux, J.P., Strett, L. and Staub, T.H. 1988a. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. Physiol. Mol. Plant pathol. 33 : 1-9.

Mohnen, D., Shinshi, H., Felix, G. and Meins, F., Jr. 1985. Hormonal regulation of β-1, 3-glucanase messenger RNA levels in cultured tobacco tissue. EMBO J. 4 : 1631- 1635.

Neale, A.D., Wahleithner, J.A., Lund, M., Bonnett, H.T., Kelly, A., Meeks-Wagner, D.R., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 1990. Chitinase, β-1, 3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. Plant Cell 2: 673-684.

Ori, N. Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S. and Fluhr, R. 1990. A major stylar matrix polypeptide (sp41) isa member of the pathogenesis-related proteins superclass. EMBO J. 9 : 3429-3436.

Pan, S.Q., Ye, X.S. and Kuc, J. 1989. Direct detection of β-1, 3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. Anal. Biochem. 182 : 136-140.

Panopoulos, N.J. and Peet, R.C. 1985. The molecular genetics of plant pathogenic bacteria and their plasmids. Annu. Rev. Phytopathol. 23 : 381-419.

Parsons, T.J., Bradshaw, H.D. and Gordon, M.P. 1989. Systemic accumulation of specific mRNAs in response to wounding in popular trees. proc. Natl.

Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Bech, J., Meins, M.Jr. and Ryals, J. 1990. Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinase from tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:98-102.

Pierpoint, W.S. 1986. The pathogenesis-related protein of tobacco leaves. Phytochemistry 25 : 1595-1601.

Roby, D., Broglie, K., Gaynor, J. and Broglie, R. 1991. Regulation of a chitinase gene promoter by ethylene and elicitors in bean protoplasts. Plant Physiol. 97 : 433-439.

Roggen, H.P.J.R. and Stanley, R.G. 1969. Cell wall hydrolysing enzyme in wall formation as measured by protein-tube extention. Planta 84:295-303.

Samac, D.A., Hironaka, C.M., Yallaly, P.E., and Shah, D.M. 1990. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana.* Plant Physiol. 93 : 907-914

Schonbeck, F. and Schlosser, E.W. 1976. Preformed substances as potential protectants. In Physiology Plant Pathology. R. Heitefuss and P.H. Williams (eds.) Springer-Verlag Press, Berlin.

Shinshi, H., Mohnen, D. and Meins, F. 1987. Regulation of a plant pathogenasis-related enzyme inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 : 89- 93.

Shinshi, H., Wenzler, H., Neuhaus, J.M., Felix, G. and Hofsteenge, J. 1988. Evidence for N- and C-terminal processing of a plant-defence related enzyme, Primary structure of tobacco prepro β-1, 3-glucanase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 5541- 5545.

Staples, R.C., Yoder, O.C., Hach, H.C., Epstein, L. and Bhaiti, S. 1986. Gene expression during infection structure development by germlings of the rust fungi. In biology and molecular biology of plant pathogen interaction, J.A. Bailey, (ed.) Berlin: Springer-Verlag, pp. 331-341.

Stuart, I.M., Loi, L. and Fincher, G.B. 1986. Development of (1-3, 1-4)-β-glucanase endohydrolase isoenzymes in isolated scutella and aleurone layers of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Physiol. 80 : 310-314.

Swegle, M., Huang, J.K., Lee, G., Muthukrishnan, S.1989. Identification of an endochitinase cDNA clone from barley aleurone cells. Plant Mol. Biol. 12 : 403-412.

Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Tanaka, K., Shibata, D. and Horino, O. 1990. Molecular cloning and ethylene induction in mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, β-1, 3-endoglucanase, in soybean. Plant Physiol, 93 : 673-682.

Trudel, J. and Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis, Analyt. Biochem. 178 : 362-366.

Trudel, J., Audy, P. and Asselin, A. 1989. Electro-phoresis forms of chitanase activity in Xanthine tobacco, healthy and infected with tobacco mosaic virus. Mol. Plant-Microbe Interact. 2 : 315-319.

Van den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., Van Montagu, M. and Van de kerchove, J. 1989. Characterization of vacuolar and extracellular β-(1, 3)-glucanase of tobacco: evidence for a strictly compartmentalized plant defence system. Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A 86 : 2673-2677.

Van Loon, L.C., 1976. Systemic acquired resistance, peroxidase activity and lesion size in tobacco recation hypersensitively to tobacco mosaic virus. Physiol. Plant Pathol. 8 : 231-42.

Van Loon, L.C. 1985. Pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. 4 : 111-119.

Van Loon, L.C., Gerritsen, Y.A.M. and Ritter, C.E. 1987. Identification, purification and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN tobacco leaves. Plant Mol. Biol. 9 : 593-609.

Van Loon, L.C. and Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with TMV. Virology 40 : 199-211.

Vogeli, U., Meins, F. and Boller, T. 1988. Co-ordinated regulation of chitinase and β-1, 3-glucanase in bean leaves. Planta 174 : 364-372.

Vegeli-Lange, R., Hansen-Gehri, A., Boller, T. and Meins, F., Jr. 1988. Induction of the defense-related glucanohydrolases, β-(1, 3)-glucanase and chitinase, by tobacco mosaic virus infection of tobacco leaves. Plant Sci. 54 : 171-176.

Ward, E.R., Uknes, S., William, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D., Metraux, J-P. and Ryal, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. Plant Cell 3 : 1085-1094.

Zhu, Q. and Lamb, C.J. 1991. Isolation and characterization of arice gene encoding a basic chitinase. Mol. Gen. Genet. 226 - 289-296

ภาคผนวก

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
แบบสรุปโครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม

รหัสโครงการ 33 01 0072

1. ชื่อโครงการ (ไทย) บทบาทของไฮโดรไลติกเอนไซม์ในข้าวต่อการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อรา
(อังกฤษ) Roles of Hydrolytic Enzymes in Inducible Defense Responses of Rice against Fungal Pathogens.

2. หัวหน้าโครงการ นางวิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์
MRS Wichitra Jutidamrongphan
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
หน่วยงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่
ผู้ร่วมโครงการ นางนลินี จาริกภากร
MRS Nalinee Charigkapakorn ....
หน่วยงาน ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จ..พัทลุง.

3. ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2533 ถึงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2537

4. การใช้เงินตลอดโครงการ ......1,805,250.-............บาท

5. บทคัดย่อ

บทคัดย่อ

โครงการนี้มุ่งศึกษาบทบาทของเอนไซม์ไฮโดรไลติกในด้านกลไกการต้านทานโรคของข้าวโดยใช้เทคนิคการตรวจหาเอนไซม์และอณูชีววิทยา วัดระดับการแสดงออกของยีนในระดับทรานสคริปชั่นและทรานสเลชั่นและการกระจายตัวของเอนไซม์กลุ่มนี้ในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวในระหว่างการรุกรานของโรคที่เกิดจากเชื้อรา พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาเป็นพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ที่ไวต่อโรคซึ่งนิยมปลูกในภาคใต้ของประเทศไทยและโรคที่ศึกษาเป็นโรคที่ก่อปัญหาหลัก ศึกษาจลนศาสตร์ของการเหนี่ยวนำระดับ เอ็ม อาร์ เอ็น เอ ของเอนไซม์ไฮโดรไลติก และแอคติวิตีของเอนไซม์ในข้าวระยะต้นอ่อนที่ทำให้เกิดการติดโรคใบวง ระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ เบตา 1,3-กลูคาเนสและไคติเนส พบว่าสูงขึ้นในใบข้าวที่ติดโรคมากกว่าในใบข้าวที่เป็นตัวอย่างควบคุมอย่างชัดเจนตั้งแต่ระยะเวลา 3 วัน จนกระทั่ง 15 วัน จึงมีระดับสูงสุด แอคติตี้ของเอนไซม์ทั้งสองที่สูงขึ้นนี้สัมพันธ์สอดคล้องกับระดับของแบบแผนไอโซไซม์ของเบต้า 1,3-กลูคาเนสและไคติเนสเมื่อแสดงด้วยวิธีเวสเทอร์น เมื่อมีการติดโรคพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในต้นข้าวพันธุ์ที่ต้านทานโรคมีระดับสูงกว่าในต้นข้าวพันธุ์ที่อ่อนแออย่างชัดเจน ไอโซไซม์บางกลุ่มของเอนไซม์ไคติเนสมีระดับสูงขึ้นอย่างจำเพาะในใบ หน่อและรากของต้นข้าว โดยเฉพาะไอโซไซม์ชนิดแอซิดิกของทั้งสองเอนไซม์ ระดับ เอ็ม อาร์เอ็น เอ ของเอนไซม์กลูคาเนสในใบข้าวที่ติดเชื้อเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง จนถึงจุดสูงสุดเมื่อ 24 ชั่วโมง ขณะที่ในเซลล์ข้าวแขวนลอยหลังจากเติมสารเหนี่ยวนำซึ่งเตรียมจากผนังเซลล์ของเชื้อราโรคใบวงพบการเหนี่ยวนำการสร้างอาร์เอ็น เอ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมง สูงสุดเมื่อ 1.5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามในข้าวภาวะปกติพบว่ามีการสร้างเอนไซม์ไคดิเนสชนิดแอซิดิก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเฉพาะบางไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสและ กลูคาเนสมีบทบาทในการตอบสนองของการต้านทานโรคของพืชต่อเชื้อราที่รุกราน

Abstract

This work aims to clarify the roles of the hydrolytic enzymes in rice defense mechanisms using enzyme assays and recombinant DNA techniques. The investigation of gene expression at transcriptional and translational levels and enzyme distribution in various compartments of plant cells during fungal infection were carried out. Both disease susceptible and resistant rice cultivars which have been grown in southern Thailand, and fungal pathogens causing serious problems of rice in this area were chosen as a model of study. Kinetic of induction of hydrolytic enzyme mRNA levels and activities in rice seedlings following infection by leaf scald fungus was demonstrated. β 1,3-glucanases and chitinases showed higher activities in the infected leaves than those of non infected controls within 3 days after inoculation to a maximum in 15 days. The increase of the activities correlated with the isozyme patterns of β 1,3-glucanases and chitinases, was revealed by Western blot analysis. Activities of both enzymes observed in the resistant rice plants were higher than in the susceptible rice plants after fungal infection. The increase in activities of some chtinase isozymes as well as in their patterns were also demonstrated among infected rice organs. One of both acidic β 1,3-glucanases and acidic chitinases was shown to be a defense related isozyme in leaf tissue. mRNA accumulation of β 1,3-glucanase in the infected leaves started gradually from 2 hours to reach a maximum at 24 hours after inoculation. The mRNA induction of both β 1,3-glucanases and basic chitinase showed rapidly increases within half an hour and reached a maximum in 1.5 hours in the rice cell suspensions treated with elicitors of leaf scald fungus. In contrast, the acidic chitinase was shown to already exist in normal plants. Thus, not all β 1,3-glucanases and chitinases play roles in the response of plants to fungal infection.

6. [illegible]ประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาบทบาทและหน้าที่ของไฮโดรไลติกเอนไซม์ chitinase และ เบต้า 1-3 glucanase ในการต้านทานโรคของข้าวพันธุ์ต่างๆต่อเชื้อราที่ระบาด และสร้างปัญหาเกิดผลกระทบกระเทือนต่อผลผลิตของข้าวที่ปลูกในภาคใต้ โดยอาศัยเทคนิคทางด้านชีวเคมี และ recombinant DNA

7. เป้าหมายของโครงการ

1. เพิ่มขีดความสามารถและการประยุกต์ทางด้านพันธุวิศวกรรม
2. ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานของความสำคัญและกลไกการทำงานของไฮโดรไลติกเอนไซม์ในปฏิกิริยาการต้านทานโรคของข้าว
3. ได้มาซึ่งชนิดของยีนที่มีความสำคัญต่อการต้านทานโรคของข้าว โดยสามารถป้องกันหรือระงับการลุกลามของโรคและสามารถศึกษาต่อไปถึงขั้นตอนการควบคุมการทำงานของยีนเหล่านี้ในระดับการทดลองกับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
4. นำยีนที่รู้หน้าที่นี้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอย่างมีเป้าหมาย ให้ได้ทั้งผลผลิตสูงและสามารถต้านทานโรคได้ดี โดยอาศัยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม

8. รายชื่อครุภัณฑ์ที่ได้รับจากการสนับสนุนของศูนย์ฯ

ไม่มี

9. ผลงานที่ได้รับจากโครงการ

Zhu, Q., Nelson, A., Panbangerd, W ., Jutidamrongphan, W., Beeche, A. and Lamb,C. (1991). Rice Defense Genes: Isolation, Regulation and Manipulation. In the Fifth Annual Meeting of the Rockefeller Foundation's International Program on Rice Biotechnology, Tucson, Arizona, U.S.A. (Oct2-5).

Jutidamrongphan, W. (1993) Induction of a Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene by Fungal Elicitors. In the 19th Congress on Science and Technology of Thailand, Songkla, Thailand, p. 386-387 (Oct 27-29).

Jutidamrongphan, W., Singtabut, S. and Lamb, C.J. (1994). Induction of the Defense Related Induction of the Defense Related β-1,3-Glucanases and Chitinases of Rice by Fungal Infection and Its Elicitors. In the International Meeting on Rice Biotechnology supported by the Rockefeller Foundation, Bali, Indonesia, (May 16-21).

สิริเพ็ญนภา สิงตะบุตร์ (2537). การแสดงออกของยีนข้าวที่ต่อต้านเชื้อรา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์