

การแสดงผลของยีนข้าวที่ต่อต้านเชื้อรา

Rhynchosporium oryzae

~~Rice Gene Expression for Defense against~~

Rhynchosporium oryzae

สิริเพ็ญภา สิงตะบุตร

Siriphennapha Singtabut

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University



2537

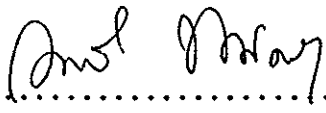
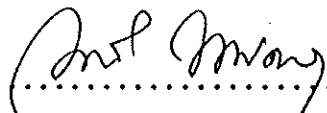
เลขที่.....	SB 006.35	ปี 2537	หน้า 2
Bib Key.....	05/121		

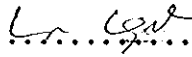
ชื่อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนข้าวที่ต่อต้านเชื้อรา *Rhynchosporium oryzae*
ผู้เขียน นางสาวสิริเพ็ญภา สิงตะบุตร
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

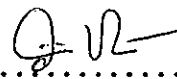
คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ

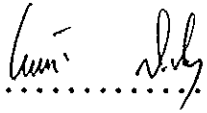
.....ประธานกรรมการ .....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงคันธ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงคันธ์)

.....กรรมการ .....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ หงส์คารา) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ หงส์คารา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒน๊ะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพ็ชรรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้แนบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ไปแล้วหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....
(ดร. ไพรรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนข้าวที่ต่อต้านเชื้อรา

Rhynchosporium oryzae

ผู้เขียน นางสาวสิริเพ็ญภา สิงตะบุตร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการสร้างเอนไซม์และ RNA ของไคตินเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสของข้าว เพื่อตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อราโรคใบวง (*Rhynchosporium oryzae*) พบว่าแอนติบอดีของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในตัวอย่างข้าวที่ติดเชื้อมีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจแอนติบอดีของเอนไซม์ไคตินเนสโดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ สามารถพบแบบแผนของไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกันในใบ หน่อและราก และเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาของการติดเชื้อในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าว ไอโซไซม์บางกลุ่มของเอนไซม์ไคตินเนสเพิ่มขึ้นอย่างจำเพาะในใบ หน่อและราก การหาแอนติบอดีของเอนไซม์ไคตินเนสโดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอสพบว่า มีแบบแผนของไอโซไซม์ชนิดเป็นกลางและ acidic ที่คล้ายคลึงกับผลที่ได้จากเจลแบบไม่แปลงสภาพ ลักษณะของการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไคตินเนสในระดับไอโซไซม์จำเพาะในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืช และความไวของการเหนี่ยวนำสอดคล้องกับผล Western blot ขณะเดียวกันพบว่าระดับแอนติบอดีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ สามารถพบไอโซไซม์ชนิด acidic มีระดับสูงขึ้นเพียงไอโซไซม์เดียวทั้งในใบ หน่อและรากที่ติดเชื้อ ความไวในการตอบสนองของข้าวต่อการรุกรานของเชื้อราตรงส่วนใบจะเกิดขึ้นได้ช้าแต่นานกว่าในส่วนหน่อและราก ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จาก Western blot เมื่อเปรียบเทียบบทบาทของเอนไซม์ทั้งสอง ต่อการต้านทานโรคในข้าวพันธุ์ที่

อ่อนแอและต้านทาน พบว่าความไวและระดับของ เอนไซม์ทั้งสองในข้าวพันธุ์
ที่ต้านทาน มีการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนได้ดีกว่าในข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอ
นอกจากการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไคตินเนสและกลูคาเนส ต่อการรุกร
รานของเชื้อราในระดับโปรตีนแล้ว ยังพบว่าการควบคุมการแสดงออกระดับ
RNA ก็เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA transcripts
ในส่วนใบจะเห็นระดับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมงหลังการพ่นเชื้อ
ในขณะที่ส่วนของหน่อจะพบระดับสูงสุดใน 24 ชั่วโมง

in all types of infected tissue analyzed.

In addition, when the activities of both enzymes were compared between the disease resistant and the disease susceptible varieties, it was found that the enzyme levels in the resistant rice were higher after fungal inoculation. This result indicates the enhanced disease resistance mechanism occurring against fungal infection found in the disease resistant plant.

Besides activation of the specific gene expression at the translation level, the RNA transcription level was also elevated. In the present study, the specific RNA level in the leave tissue was found to be rapidly increased within 2 hours after inoculation where as the prolonged increase up to 24 hours was detected in the tiller tissue.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โต้วัฒนะ กรรมการที่ปรึกษาร่วม พร้อมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพชรรัตน์ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้กรุณาสละเวลาในการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณณลินี จาธิภากร และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงในการให้ข้อมูลและอนุเคราะห์ตัวอย่างสำหรับการศึกษาทดลอง ขอขอบคุณคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี ขอขอบคุณ ดร. จ่านงค์ นพรัตน์ ภาควิชาพยาธิวิทยาและเจ้าหน้าที่ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ที่ได้ช่วยเหลือให้การวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุวิทย์-คุณแม่แย่งน้อย สิงตะบุตร สำหรับรหัสพันธุกรรม ความรัก ความห่วงใย และกำลังใจเสมอมา ขอขอบคุณอง สุธวัฒน์ชัย-สุนารี สิงตะบุตร ที่ช่วยให้กำลังใจ และขอขอบคุณ คุณบุญราศรี จงศุจิพันธ์ ที่ทำให้เกิดความมุ่งมั่นในการฟันฝ่าอุปสรรคและพร้อมที่จะก้าวเดินไปข้างหน้าอย่างเข้มแข็ง

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ คณะวิทยาศาสตร์และบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ประโยชน์นี้ ผลสำเร็จ และส่วนดีทั้งหมดของงานวิจัยครั้งนี้ ขออุทิศให้แต่ผู้ที่ข้าพเจ้ากล่าวมาแล้ว

สิริเพ็ญภา สิงตะบุตร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการรูป	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	24
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	25
วัสดุ	25
อุปกรณ์	27
วิธีการ	28
3. ผลการทดลอง	42
4. วิจารณ์	86
5. สรุป	93
เอกสารอ้างอิง	96
ภาคผนวก	114
ประวัติผู้เขียน	126

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	แผนภาพแสดงปฏิกิริยาระหว่างยีนของพืชเจ้าบ้านและเชื้อโรครุกราน	6
2	สัญญาณและการตอบสนองในปฏิกิริยาระหว่างพืชและเชื้อโรครุกราน	9
3	แผนภาพแสดงยีนของยาสูบ PR-2 ชนิด acidic	18
4	แผนภาพแสดงยีนของยาสูบ PR-2 ชนิด basic	19
5	แผนภาพแสดงยีนของยาสูบ PR-3 ชนิด acidic และ basic	23
6	แบบแผนโปรตีนจากใบข้าวเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE	43
7	แถบแสดงแอมพลิจูดของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคตินเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE	45
8	แถบแสดงแอมพลิจูดของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคตินเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE	46
9	แถบแสดงแอมพลิจูดของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4, C5 และ C6) ของเอนไซม์ไคตินเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE	48
10	การเปรียบเทียบแอมพลิจูดของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนส (C1-C6) ระหว่างตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อและราก เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE	49
11	แถบแสดงแอมพลิจูดของไอโซไซม์ (a, c, d และ e) ของเอนไซม์ไคตินเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE	52
12	แถบแสดงแอมพลิจูดของไอโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของเอนไซม์ไคตินเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย	54

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
SDS-PAGE	
13	55
<p>แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของ เอนไซม์ไคติเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE</p>	
14	56
<p>แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของ เอนไซม์ไคติเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS- PAGE</p>	
15	58
<p>การเปรียบเทียบแอกติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส (a-e) ระหว่างตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อและราก เมื่อ วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE</p>	
16	59
<p>แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE</p>	
17	61
<p>การเปรียบเทียบแอกติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนส (G1, G2, และ G3) ในตัวอย่างใบข้าวที่เป็นตัวอย่าง ควบคุมและในตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง เมื่อวิเคราะห์ ด้วย Native PAGE</p>	
18	62
<p>แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 1 เมื่อ วิเคราะห์ด้วย Native PAGE</p>	
19	63
<p>แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE</p>	

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
20	64
แถบแสดงแอนติบอดีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE	
21	65
แถบแสดงแอนติบอดีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE	
22	67
การเปรียบเทียบแอนติบอดีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนส (G3) ในตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE	
23	69
แบบแผนของโปรตีน (WC1-WC10) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ทำปฏิกิริยา กับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ	
24	70
แบบแผนของโปรตีน (WC1-WC10) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยา กับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ	
25	72
แบบแผนของโปรตีน (WC7-WC11) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์ไคติเนสจากหน่อของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยา กับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ	
26	73
แบบแผนของโปรตีน (WC8-WC11) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์ไคติเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยา กับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคติเนสของมะเขือเทศ	
27	75
แบบแผนของโปรตีน (WG1-WG6) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของ มะเขือเทศ	
28	76
แบบแผนของโปรตีน (WG1-WG6) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western	

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
	blot ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของ มะเขือเทศ
29	แบบแผนของโปรตีน (WG5-WG7) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากหน่อของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของ มะเขือเทศ 77
30	แบบแผนของโปรตีน (WG4-WG8) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของ มะเขือเทศ 79
31	แบบแผน RNA เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis 81
32	แบบแผน DNA insert เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis 82
33	RNA dot blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7 กับ 7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอดีน 83
34	RNA dot blot hybridization ของหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 กับ 7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอดีน 84
35	RNA dot blot hybridization ของหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 กับ RCH10-2 genomic DNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอดีน 85

ตัวย่อและสัญลักษณ์

°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
mA	=	milliampare
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
μ g	=	microgram
μ l	=	microlitre
α	=	alpha

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

β	=	beta
SA-AP	=	streptavidin-alkaline phosphatase
rpm	=	revolution per minute
DEPC	=	diethylpyrocarbonate
kd	=	kilo daltons
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ข้าวเจ้า (*Oryza sativa*) เป็นหญ้าที่สําคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ ในปัจจุบันผลผลิตที่ได้ยังเกี่ยวข้องกับปัญหาการระบาดของโรคข้าวทำให้ผลผลิตลดลงเป็นปัญหาซึ่งเกิดขึ้นกับชาวนาที่ทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นจึงมีการคิดค้นวิธีการที่จะแก้ไขปัญหามาเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสาเหตุของเชื้อรา โดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของนักวิชาการเกษตร เพื่อให้ได้พันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคแต่ยังคงประสบปัญหา ในด้านการต้านทานที่เกิดขึ้นนั้นไม่ยั่งยืนและคงทนถาวรในทุกภูมิภาคของประเทศ โรคใบวงสีน้ำตาล (leaf scald) เป็นโรคข้าวที่สําคัญอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นอย่างรุนแรงและระบาดออกไปอย่างกว้างขวาง การระบาดเกิดขึ้นที่ภาคใต้และภาคเหนืออย่างรุนแรง และกำลังขยายเนื้อที่การระบาดออกไปอย่างกว้างขวาง อาการของโรคสามารถพบเห็นได้ตั้งแต่ต้นข้าวในระยะที่เป็นต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว แต่มักพบอาการรุนแรงในระยะที่ข้าวแตกกอเต็มที่แล้ว ต้นข้าวเป็นโรคจะแสดงอาการโดยเกิดแผลซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดบนใบ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคใบวงสีน้ำตาลเกิดจากเชื้อราที่มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Rhynchosporium oryzae* ได้มีการศึกษาหายีนต้านทาน (resistance gene) ในพืชแต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ต่อมาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ได้มีการพัฒนาไปอย่างมากทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้ใช้เทคนิคเหล่านี้มาศึกษาพบว่า การตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันโรคหลายอย่าง อาทิเช่น การหลั่งของ phytoalexins การผลิตสารลิกนินและ callose เพื่อเสริมความแข็งแกร่งของผนังเซลล์ของพืชหรือการสะสม hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) การสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic

enzyme) เช่น เอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์กลูคาเนส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรคที่รุกราน จึงได้มีการศึกษาในเรื่องนี้กันอย่างกว้างขวาง เพื่อนำมาสู่การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีการต้านทานโรคที่ยั่งยืนถาวร

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนข้าวที่ต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อราใบวง เพื่อศึกษาและตรวจหาชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (pathogenesis-related , PR protein) โดยเน้นในเรื่องของการวิเคราะห์ระดับของเอนไซม์ไฮโดรไลติกคือ เอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส การแสดงออกของยีนเหล่านี้ของข้าวในระดับการสร้าง RNA (transcription) และโปรตีน (translation) รวมทั้งหาความไวของการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดในระหว่างข้าวพันธุ์ที่ติดเชื้อได้ง่ายและพันธุ์ที่ต้านทานในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ เช่น ใบ หน่อและราก โดยอาศัยเทคนิคทางชีวเคมี และ recombinant DNA เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในระดับยีนที่สามารถต้านทานโรค และผลผลิตข้าวที่เพิ่มมากขึ้น

การตรวจเอกสาร

เมื่อมีการรุกรานจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก พืชมีวิธีการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมนั้นโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันหรือกลไกอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ การป้องกันตนเองอาจเกิดจากกลไกหลายด้าน ทั้งทางด้านเคมีและกายภาพเพื่อการต้านทานการเกิดโรค โดยมีนิยามของความต้านทานคือ ความสามารถของพืชเจ้าบ้าน (host) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโรค กลไกความต้านทานแบ่งออกเป็นความต้านทานทั่วไป (general or non-host resistance) และความต้านทานจำเพาะ (specific resistance) ซึ่งความต้านทานทั้งสองอาจเกิดจากธรรมชาติหรือเกิดจากการประยุกต์ทางพันธุวิศวกรรมโดยมนุษย์ ที่ทำให้พืชสามารถต้านทานต่อเชื้อโรคสายพันธุ์นั้น ๆ

1.1 ความต้านทานทั่วไป (general or non-host resistance)

เมื่อพืชเกิดการติดเชื้อของเชื้อโรคชนิดหนึ่ง แต่เชื้อนั้นไม่สามารถก่อโรคในพืชอีกชนิดหนึ่ง การที่พืชอีกชนิดหนึ่งไม่เกิดโรคนั้นแสดงว่าพืชชนิดนั้นเกิดความต้านทาน Heath (1985) ศึกษาความต้านทานของต้นลินินต่อการติดเชื้อของราสนิม และให้นิยามของ non-host resistance ว่าเป็นความต้านทานในการติดเชื้อของพืช โดยเชื้อที่ไม่สามารถก่อโรคกับพืชชนิดนั้น กลไกการต้านทานของพืชบางชนิดต่อเชื้อราที่ก่อโรคอาจเป็นความต้านทานที่มีอยู่แล้วในพืชชนิดนั้นในรูปของปัจจัยทางเคมีและปัจจัยทางกายภาพ เช่น การเสริมความแข็งแรงของโครงสร้างของเซลล์พืช (Schonbeck and Schlosser, 1976) หรือการป้องกันที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยเชื้อที่ก่อโรค (Heath, 1981a) ในบางกรณีกลไกความต้านทานนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนรวมถึงการสังเคราะห์ RNA และการสังเคราะห์โปรตีนในพืช (Legrand, 1983; Yoshikawa *et al.*,

1983) โดยการกระตุ้นของสารที่สร้างออกมาจากเชื้อที่รุกราน (Dixon, 1986)

1.2 ความต้านทานจำเพาะ (specific resistance)

1.2.1 Basic compatibility

Basic compatibility คือความสามารถของเชื้อที่สามารถก่อโรคในพืช โดยเชื้อนั้นสามารถต้านทานต่อกลไกต้านทานพื้นฐานในพืชอันเนื่องมาจากการพัฒนาการทำลายสารประกอบที่ต้านเชื้อ เช่น การผลิตเอนไซม์ของเชื้อที่สามารถเปลี่ยนแปลงสารต้านโรคที่สร้างจากพืช ไปเป็นอนุพันธ์ที่ไม่มีพิษ (non-toxic derivatives) (Tegtmeier and Van Etten, 1982; Schonbeck and Schlosser, 1991) หรือเชื้อไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการต้านทานโรคของพืชหรือเชื้อที่ก่อโรคสามารถยับยั้งกลไกการต้านทานโรคในพืช เช่น การผลิต host-selective toxin ซึ่งสามารถกำจัดเซลล์พืชก่อนที่พืชจะมีการแสดงออกในด้านความต้านทานที่จะหลั่งสารออกไปทำลายเชื้อโรค (Ouchi *et al.*, 1979; Doke, 1983; Scheffer, 1991) กลไกการรบกวนหรือยับยั้งการต้านทานโรคของพืชนี้จึงเป็นที่มาของปฏิกิริยาที่เรียกว่า compatible ดังนั้น Basic compatibility จึงเป็นค่าที่สามารถชี้ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาตอบสนองของพืชเจ้าบ้านกับเชื้อโรค หากมีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นก็สามารถนำไปสู่การเกิดของปฏิกิริยา incompatible ได้

1.2.2 Incompatibility

Incompatibility คือความสามารถของเชื้อโรคที่สามารถก่อโรคในพืชในระยะเริ่มแรกที่มีการรุกราน ในบริเวณที่มีการติดเชื้อหรือบริเวณข้างเคียงที่มีการติดเชื้อนั้น แต่เชื้อโรคขาดความสามารถในการแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยบริเวณที่เกิดการติดเชื้อมักจะเกิดการตายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (necrotic lesions) ซึ่งเป็นกลไกการตอบสนองอย่างหนึ่งของพืชต่อเชื้อที่รุกราน

ปฏิกริยาระหว่างยีนของพืชเจ้าบ้านและยีนเชื้อโรคที่รุกราน โดยแบ่งปฏิกริยาหรือความสัมพันธ์ได้เป็นแบบต่าง ๆ ดังนี้ (รูปที่ 1) ปฏิกริยาชอบหรือที่ไม่มีควมต้านทาน (susceptibility) เกิดขึ้นใน 3 ลักษณะ คือ R-v, r-V และ r-v และปฏิกริยาอีกแบบหนึ่ง R-V แสดงควมต้านทาน (resistance) ความต้านทานจะเกิดขึ้นเนื่องจากมียีนของเจ้าบ้านที่สามารถต้านทานที่เข้าคู่กับยีนของเชื้อโรคที่ไม่ก่อโรคแสดงให้เห็นว่าปฏิกริยาระหว่างเจ้าบ้านและเชื้อโรคเป็นแบบ incompatibility (Ellingboe, 1982)

1.3 ทฤษฎี gene-for-gene

เป็นทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับหลักการของทางพันธุศาสตร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีนของพืชและเชื้อโรค โดย Flor (1947) ได้ทำการศึกษาควมต้านทานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคราสนิมของต้นลินิน พบว่าต้นลินินมียีนอยู่จำนวนหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกควมต้านทานต่อเชื้อราสนิม ขณะที่ราสนิมก็มียีนที่ควบคุมการแสดงออกของควมรุนแรงของการก่อโรคโดยยีนของพืชและยีนของเชื้อมีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องซึ่งกันและกันต่อการแสดงออกของอาการโรค โดยสรุปได้ว่า ถ้าหากมียีนหนึ่งที่สามารถกำหนดควมต้านทานในพืชเจ้าบ้านก็จะมีอีกยีนหนึ่งในเชื้อ จะแสดงถึงการก่อโรคหรือถ้าในพืชมียีนที่แสดงออกถึงควมต้านทานก็จะมียีนในเชื้อที่กำหนดควมไม่รุนแรง หรือไม่ก่อโรคที่สัมพันธ์กันจึงเกิดเป็นทฤษฎีของ complementary gene for gene โดยทฤษฎีนี้จะช่วยชี้ควมสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อได้ชัดเจน ในกรณีที่มีการควบคุมลักษณะควมต้านทานของพืช และควมรุนแรงของเชื้อโดยยีนจำนวนน้อยคู่

เมื่อควมสัมพันธ์แบบ gene for gene มีบทบาทเหนือพื้นฐานความเป็น compatibility ก็จะสามารถพบปฏิกริยาร่วมที่จำเพาะระหว่างพืชกับเชื้อที่นำไปสู่ความเป็น incompatibility ซึ่งเซลล์ของพืชจะสามารถจดจำและแยกแยะควมแตกต่างของโมเลกุล และปฏิเสธการเข้ามา

เชื้อโรค (pathogen)	เจ้าบ้าน (host)	
	R	r
V	RV (-)	rV (+)
v	Rv (+)	rv (+)

รูปที่ 1 แผนภาพแสดงปฏิกริยาระหว่างยีนของพืชเจ้าบ้านและเชื้อโรคที่รุกราน

R แสดงถึงยีนของเจ้าบ้านที่มีความต้านทาน (resistance) ซึ่งเป็นยีนเด่น (dominant)

V แสดงถึงยีนของเชื้อที่ไม่ก่อโรค (avirulence) ซึ่งเป็นยีนเด่น

r แสดงถึงยีนของเจ้าบ้านที่ไม่มีความต้านทาน (susceptibility) ซึ่งเป็นยีนด้อย (recessive)

v แสดงถึงยีนของเชื้อที่ก่อโรค (virulence) ซึ่งเป็นยีนด้อย

+ แสดงปฏิกริยา compatible

- แสดงปฏิกริยา incompatible

อยู่อาศัยของเชื้อที่จะทำลายของพืชทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะ genotype ของพืช และเชื้อ หลังจากเกิดสภาพพื้นฐาน compatibility และมีการพัฒนา ปฏิกริยาเฉพาะเจาะจงที่ควบคุม โดยระบบความสัมพันธ์ gene for gene ที่ทำให้เกิดความเป็น incompatibility ในลำดับต่อมาก็อาจจะมีวิวัฒนาการเพื่อพยายามลดผลของความสัมพันธ์ gene for gene ซึ่งถ้าเชื้อมีความสามารถอยู่ร่วมกับพืชไปได้นานเท่าใด พืชก็ควรจะมีระดับของยีนสำหรับปฏิกริยาร่วมต่อเชื้อมากขึ้น

จากทฤษฎี gene for gene จะเห็นว่ามีควมจำเพาะของ avirulence gene ของเชื้อโรคกับ resistance gene ของพืชเจ้าบ้าน ต่อมาได้มีการศึกษาทำการ clone avirulence gene ของเชื้อโรค เช่น De Wit *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาคูสมบัติและกลไกของ avirulence gene คือยีน *avr9* ใน *Cladosporium fulvum* ที่สามารถเกิดปฏิกริยากับ resistance gene ซึ่งก็คือยีน *cf9* ในมะเขือเทศ ฤกษ์สำคัญของการศึกษาในครั้งนี้คือ การแยกเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็ก และถูกแปลรหัสมาจากยีน *cf9* นอกจากนี้ยังทำการย้ายยีน *cf9* เข้าสู่เชื้อราที่มี *avr9* เพื่อพิสูจน์ ทฤษฎี gene for gene แต่ผลของการศึกษาในด้าน resistance gene ยังไม่ประสบความสำเร็จและยังไม่ทราบว่า resistance gene แสดงออกได้เองหรือถูกเหนี่ยวนำโดยการติดโรค

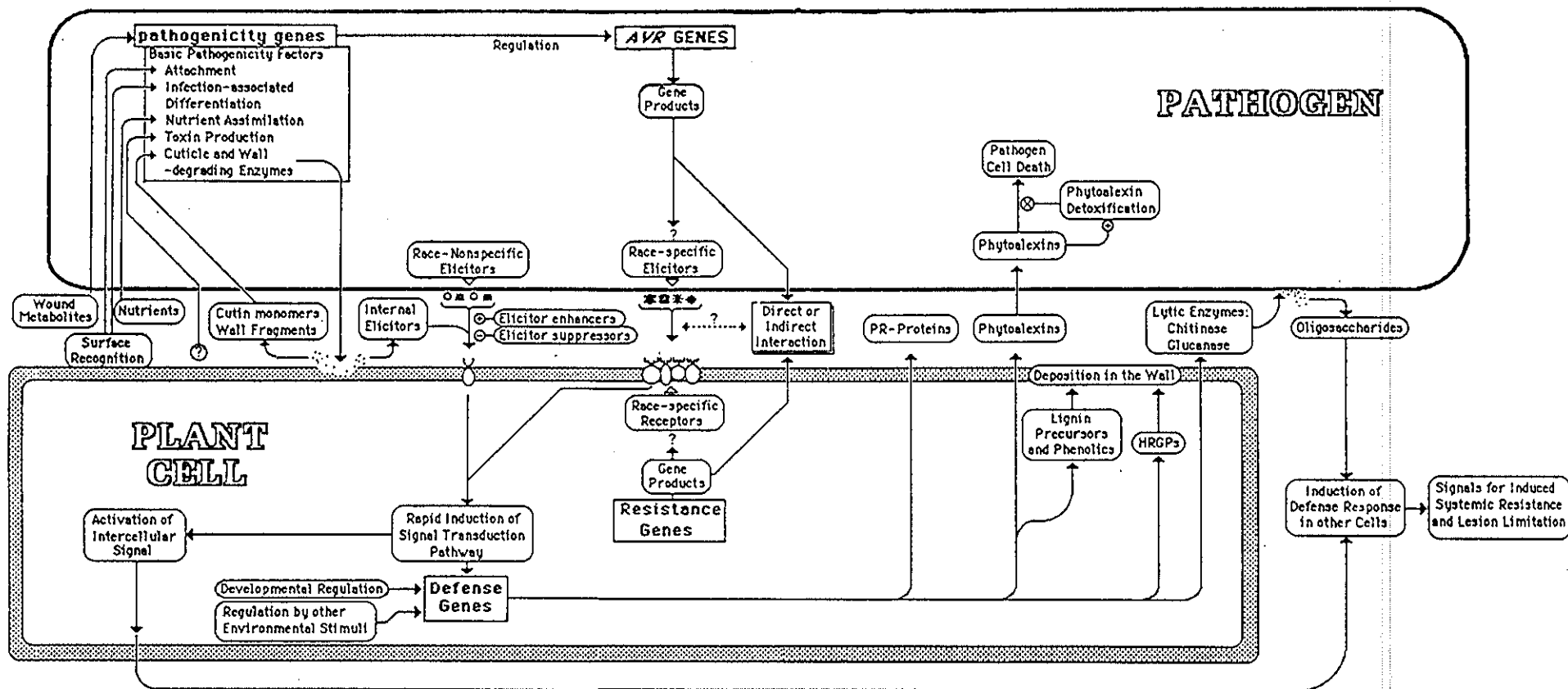
การศึกษา coat protein gene ที่แยกจาก TMV และ N' resistance gene จากยาสูบ พบว่าลำดับของ coat protein gene ของไวรัสเป็นปัจจัยที่บ่งชี้ avirulent และ virulent พบว่า avirulent phenotype เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเพียง single amino acid ใน coat protein เมื่อนำเอา coat protein gene จากไวรัสชนิด virulent ไปใส่ในพืชปรากฏว่าพืชไม่แสดงอาการของโรคเลย ส่วนการนำเอา coat protein gene จากไวรัสชนิด avirulent ใส่ในพืชชนิดเดียวกันผลที่ได้ก็คือเกิดสร้าง necrotic lesion ซึ่งต่อมาพืชนั้นจะตาย พบว่ามีการหลังและคั่งค้างของโปรตีนซึ่งก็คือ defense response

proteins (Culver and Dawson, 1991)

1.4 การตอบสนองของพืชต่อการป้องกันโรค (Defense responses)

พืชสามารถต้านทานการรุกรานจากเชื้อโรคการต้านทานของพืชต่อเชื้อโรคไม่เพียงแต่เป็นการป้องกันแบบที่มีอยู่ทั่วไป ซึ่งเกิดจากการสร้างโครงสร้างของผนังเซลล์ให้แข็งแรง สามารถต้านทานการรุกรานของเชื้อแต่ยังมีการป้องกันอย่างอื่นโดยมีกลไกที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโดยเมื่อมีการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของยีนยังผลให้เกิดการหลั่งของ phytoalexins, การผลิตสารลิกนินและคาลโลส (callose) หรือการสะสม hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs), การสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) ในบริเวณที่มีการรุกรานของเชื้อและสามารถกระตุ้นการต้านทานทุกระบบของพืช การตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อโรคดังเช่นที่กล่าวมา ไม่เพียงแต่เกิดจากการเหนี่ยวนำจากกลไกการติดเชื้อหรือรุกรานเท่านั้นแต่ยังเกิดขึ้นได้จากสาร elicitors ซึ่งปรากฏอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราและในน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) และบางกรณียังเกิดจากการเกิดบาดแผล การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือจากก๊าซเอทิลีน (Darvil and Albersheim, 1984; Bell *et al.*, 1986; Dixon, 1986; Collinge and Slusarenko, 1987)

กลไกการป้องกันโรคของพืช เกิดขึ้นจากการรับสัญญาณจากการรุกรานของเชื้อโรคและการตอบสนองในพืชที่เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาต่าง ๆ ดังสรุปไว้ในรูปที่ 2 (อ้างถึงโดย Lamb *et al.*, 1989) แสดงกลไกเริ่มจากการสัมผัสโดยตรงของเชื้อกับพื้นผิวอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืช (Hamer *et al.*, 1988) แล้วแทงเข้าสู่เซลล์และแทรกเนื้อเยื่อพืชที่ถูกรุกราน (Staples *et al.*, 1986) จากนั้นจะเกิดการย่อยสลาย cuticle และผนังเซลล์ของพืชเจ้าบ้าน (Kolattukudy, 1985; Collmer, 1986) และในเชื้อโรคบางชนิดมีการผลิตท็อกซินเพื่อทำลายเซลล์พืช (Panopoulos and Peet, 1985) เมื่อมีการย่อยผนังเซลล์ของพืช



รูปที่ 2 สัญญาณและการตอบสนองในปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อโรคที่รุกราน
(Lamb et al., 1989)

เจ้าบ้านก็จะมี elicitor ชนิดต่าง ๆ เช่น race-non specific elicitors, internal elicitors, elicitor enhancers และ elicitor suppressors ไปกระตุ้นให้เกิดเหตุการณ์การส่งต่อสัญญาณ (signal transduction) เพื่อไปกระตุ้นระบบการป้องกันโรคของพืชโดย defense genes มีการแสดงออกในรูปแบบที่ตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อ โดยเพิ่มการสะสมและหลัง PR-proteins, phytoalexin, หรือ การเสริมความแข็งแกร่งให้ผนังเซลล์โดยเพิ่มปริมาณ lignin, การปล่อย hydrolytic enzymes เช่น เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์กลูคาเนสโดยสันนิษฐานว่าเอนไซม์ทั้งสองนี้ จะทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อที่มา รุกราน ทำให้ได้ oligosaccharides ทำหน้าที่เป็น elicitor กระตุ้น การเกิด signals transduction มีการส่งผ่านสัญญาณเกิดขึ้นเพื่อกระตุ้น ให้เซลล์อื่น ๆ ของพืชเจ้าบ้านเกิดการตอบสนองต่อเชื้อที่รุกราน

มีข้อสันนิษฐานว่าผลจากการเกิด wound metabolites จากการ รุกรานของเชื้อโรคจะทำให้เกิดการกระตุ้น pathogenicity genes ใน เชื้อโรคเพื่อไปควบคุมการทำงานของ AVR genes ให้สร้าง race-specific elicitors ซึ่งทำหน้าที่เป็นสัญญาณไปกระตุ้น resistance genes ของพืชให้สร้าง race-specific receptors เมื่อมีสัญญาณ เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่าง elicitor และ receptor ก็จะไปกระตุ้น และเหนี่ยวนำให้ยีนป้องกันของพืชทำหน้าที่ดังกล่าวข้างต้นแล้ว

1.5 การตอบสนองทางชีวเคมีในด้านกลไกการป้องกัน

พืชมีการตอบสนองทางชีวเคมี เพื่อให้เป็นกลไกการป้องกันโรคสำหรับ ด้านทานการติดเชื้อ การตอบสนองทางชีวเคมี อาจมีสาเหตุเนื่องมาจาก การเกิดบาดแผล การได้รับสารเคมีและการติดเชื้อ ปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่ เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับเหตุการณ์ hypersensitive response ของ พืชหรือการกระตุ้นจาก elicitors

1.6 Hypersensitive response (HR)

Hypersensitive response เป็นกลไกการป้องกันที่สำคัญต่อการติดเชื้อในพืช สัตว์และมนุษย์ การป้องกันการติดเชื้อในพืชเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกันกับในสัตว์และมนุษย์คือมีระบบภูมิคุ้มกันในพืช มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคหรือการทำลายเชื้อโรค โดยพืชจะสามารถจำแนกระหว่างสิ่งที่เป็นของตนเองและสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามารุกราน เมื่อพบสิ่งแปลกปลอมจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในบริเวณนั้นอย่างรวดเร็ว ในเนื้อเยื่อที่ตายจะพบว่ามีสารที่มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อ ที่พบคือสารจำพวก phytoalexins (Muller and Behr, 1949) แสดงถึงปฏิกิริยา incompatibility ระหว่างพืชที่เป็นเจ้าบ้านกับเชื้อโรค (Dixon, 1986) การแสดงออกของ HR ในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามชนิดของพืชและเชื้อโรคนั้น ๆ

ปฏิกิริยา hypersensitive เป็นปฏิกิริยาที่พืชกับเชื้อไม่สามารถอยู่ร่วมกันได้อย่างสันติ เนื่องจากมีการตายของเซลล์พืชอย่างรวดเร็วผิดปกติ โดยไม่มีกระบวนการอื่นเกี่ยวข้อง ซึ่งเป็นผลให้เชื้อโรคขาดอาหารไม่สามารถเพิ่มจำนวนและตายไปในที่สุด จากศึกษาเนื้อเยื่อที่เกิดปฏิกิริยานี้ ภายใต้อิทธิพลของจุลทรรศน์และอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ทางชีวเคมี พบว่ามีการสะสมสารประกอบฟีนอลิก สารแทนนิน หรือสารอื่น ๆ ที่ได้จากปฏิกิริยา oxidation นี้ ซึ่งเกิดขึ้นจากเซลล์พืชที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและหน้าที่อย่างฉับพลัน (Dufrenoy, 1936)

Keen *et al.* (1981) ศึกษาพบว่าก่อนการตายของเซลล์ซึ่งเป็นการตอบสนองของพืช ต้องการช่วงระยะเวลาหนึ่งที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้น hypersensitive response อาจจะมีมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับความต้านทานในพืช แต่เมื่อมีการพบสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในบริเวณเซลล์ที่ตายก็ทำให้ค้นพบเหตุการณ์ต่าง ๆ อีกเป็นลำดับ ต่อมาได้มีการโคลน (cloned) ยีนซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ในขั้นตอนสุดท้ายของวิถีเมตาบอลิซึมของ phytoalexin ให้กับพืช ทำให้พืชชนิดนั้นสามารถ

ผลิต phytoalexin ขึ้นมาได้ (Hain *et al.*, 1990)

การเกิด HR มีความสัมพันธ์ควบคู่กับการสร้างสารเคมีที่เรียกว่า phytoalexin และการเหนี่ยวนำให้สร้างสารที่สามารถเสริมความแข็งแรงของผนังเซลล์ของพืช เช่น การเกิด lignin รวมทั้งการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนส เป็นต้น

1.7 การสร้างสาร Phytoalexin

จากแนวคิดของ acquired immunity ได้นำไปสู่การค้นพบทฤษฎีการสร้าง phytoalexin ของพืชโดย Muller และ Berger (1941) ที่ศึกษาลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้ของมันฝรั่ง พบว่าถ้าปลูกเชื้อซึ่งเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรงที่ขึ้นส่วนหัวมันฝรั่งก่อน จะทำให้เกิดความต้านทานเฉพาะจุด (local immune) ที่ขึ้นส่วนหัวมันฝรั่งต่อเชื้อสายพันธุ์รุนแรงที่ทดลองปลูกเชื้อตามลงไปในเวลาต่อมา ซึ่งเขาได้อธิบายว่าเซลล์เมื่อสัมผัสกับเชื้อจะผลิตสารบางอย่างออกมา และสารนั้นเป็นสารที่มีพิษต่อเชื้อโดยมีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อราในระดับหนึ่ง ส่วนการที่พืชจะมีความต้านทานขึ้นมาน้อยเพียงไรขึ้นอยู่กับความรวดเร็ว และปริมาณของสารพิษที่สร้างขึ้นมาเรียกสารพิษนี้ว่า phytoalexin (พรทิพย์, 2533)

phytoalexin เป็นสารต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีหลายจำพวก เช่น phenylpropanoids, isopropanoids หรือ acetylene (Ebel, 1986) ในพืชปกติจะไม่พบ phytoalexin การเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างจะเกิดขึ้นโดยวิถีเมตาบอลิซึมที่ซับซ้อน และเกิดการสะสม phytoalexin เมื่อพืชเกิดการติดเชื้อ

1.8 lignification

การต้านทานของพืชต่อเชื้อโรคอีกวิธีหนึ่งคือ การเสริมความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์โดยการสร้างสารลิกนิน ซึ่งเป็น phenolic polymer ที่มีสารตั้งต้นคือ hydroxycinnamyl alcohol แล้วเกิดปฏิกิริยา condensation ของ phenylpropanoid unit หลักฐานจากการศึกษาของ histochemistry แสดงให้เห็นว่า การเกิด lignification เกิดก่อนการแทรกตัวของเชื้อโรค กระบวนการสร้างลิกนินนี้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดจาก biotroph และ necrotroph ทั้งโดยเชื้อโรคประเภท avirulent และ virulent

1.9 โปรตีน PR (Pathogenesis-related proteins)

โปรตีน PR เป็นโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเพื่อต้านทานการติดเชื้อของพืชในเหตุการณ์ defense response มีการศึกษาอย่างมากมายในเรื่องโปรตีน PR ด้านความสัมพันธ์กับพืชในแง่กลไกการต้านทานโรคในพืชที่เกิดการติดเชื้อจากเชื้อชนิดต่าง ๆ เช่น ไวรัส (Van Loon and Van Kammen, 1970; Gianinazzi *et al.*, 1970; Camacho-Henriquez and Sanger, 1984) ไวรอลด์ (Conejero and Semancik, 1977) เชื้อรา (Gianinazzi *et al.*, 1970) หรือแบคทีเรีย (Ahl *et al.*, 1981)

1.9.1 แหล่งที่พบโปรตีน PR

Van Loon และ Van Kammen (1970) เป็นผู้ศึกษาโปรตีน PR เป็นครั้งแรก ในยาสูบที่ติดเชื้อ TMV (Tobacco Mosaic Virus) ในปัจจุบันพบโปรตีน PR ได้ในพืชชั้นสูงหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ (Kombrink *et al.*, 1988) ข้าวบาร์เลย์ (Jutidamrongphan *et al.*, 1991) พืชุนีเยย (Linthorst *et al.*, 1990) และแตงกวา (Boller and Metraux, 1988) เป็นต้น

1.9.2 คุณสมบัติโดยทั่วไปของโปรตีน PR

การศึกษาโปรตีน PR ในพืชมีการทดลองและศึกษากันอย่าง

แพร่หลายในยาสูบ Van Loon และ Van Kammen (1970) และ Gianinazzi *et al.* (1970) ได้ศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน PR ในใบยาสูบ สายพันธุ์ Samsun NN และ Xanthi-nc ที่ติดเชื้อ TMV ตามลำดับ ในยาสูบจะมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ TMV โดยเกิด necrotic lesions ภายใน 1-2 วัน ภายหลังจากการติดเชื้อและพบการแพร่กระจายของ TMV ในบริเวณรอบ ๆ necrotic lesions เมื่อสกัดโปรตีนจากใบยาสูบที่ติดเชื้อ TMV พบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่แตกต่างจากใบยาสูบที่ไม่มีการติดเชื้อ ในระยะแรกพบโปรตีน PR 4 ชนิดคือ PR-1a, PR-1b, PR-1c และ PR-2 ต่อมาพบว่าโปรตีน PR ในยาสูบมี 10 ชนิดคือ PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-2, PR-N, PR-O, PR-P, PR-Q, PR-R และ PR-S (Antoniw *et al.*, 1980; Jamet and Fritig, 1986) จากการศึกษาของ Legrand *et al.* (1987) พบว่า PR-P และ PR-Q มีคุณสมบัติเป็น acidic endochitinase PR-O, PR-N และ PR-2 มีคุณสมบัติเป็น เบต้า-1,3-กลูคาเนส (Kauffmann *et al.*, 1987) และ PR-S มีคุณสมบัติ proteinase inhibitor

โปรตีน PR ที่สำคัญมี 2 ชนิดคือเบต้า-1,3-กลูคาเนสและ ไคตินเนส 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 มีความสามารถด้านการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน (Van Loon and Gerritsen, 1989) และสามารถพบโปรตีนในบริเวณ inter cellular fluid ของใบที่เกิด necrotic lesions (Hogue and Asselin, 1987) เมื่อมีการทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ acidic

protease ก็จะถูกปล่อยจาก vacuole ที่บริเวณรอบ ๆ 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) โดยโปรตีนเหล่านี้จะอยู่ในรูปไฮโดรโฟบิก (อ้างอิงโดย 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) และเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ซึ่งพบได้ทั้งบริเวณ extracellular spaces และ intracellular spaces ของพืช การสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะถูกกระตุ้นโดยการติดเชื้อ

1.10 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (glucan endo-1,3- β -glucosidases; 1,3- β -D-glucan glucanohydrolase; E.C. 3.2.1.39)

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมีบทบาทในการต้านทานการเกิดโรคในพืชโดยสามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อโรคด้วยการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรค เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส สามารถย่อยสลาย Laminarin (β -1,3-glucan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ของเชื้อรา และในสัตว์จำพวกแมลง

แหล่งของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืช พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีการติดเชื้อ เช่น ใบยาสูบ (Van Loon and Van Kammen, 1970), ข้าวบาร์เลย์ (Jutidamrongphan *et al.*,

1991) และมันฝรั่ง (Kombrink *et al.*, 1988) เป็นต้น นอกจากนั้นใน
 ขั้นตอนการเจริญเติบโตของพืช ยังสามารถพบเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส
 เช่นในขั้นตอนการงอกของธัญพืชพวกข้าว (cereal germination)
 Stuart *et al.*, 1986; Hoj *et al.*, 1989), การเจริญของไฮโป
 คอทิล (hypocotyl) และโคลิออปไทล์ (coleoptile) (Goldberg,
 1980; Huber and Nevins, 1980), การควบคุมการขนส่งอาหาร
 ของท่อลำเลียงอาหารและการเคลื่อนย้ายคาลโลส (callose mobili-
 zation) (Abeles and Forrence, 1970), การพัฒนาของดอก
 (Neale *et al.*, 1990; Ori *et al.*, 1990), การเจริญของท่อ
 พอลเลน (pollen tube growth) (Roggen and Stanley, 1969)
 และการสุกของผล (Hinton and Pressey, 1980) เป็นต้น

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยาสู้บ จะอยู่ในรูปของ acidic
 3 ไอโซฟอร์ม และ basic 1 ไอโซฟอร์ม ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 33 kd
 (Shinshi *et al.*, 1988) ซึ่งปลายด้าน N-terminal ของเอนไซม์
 เบต้า-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 clones ของเอนไซม์เบต้า-
 1,3-กลูคาเนสพบว่าทั้งชนิด basic และ acidic มีส่วนที่เหมือนกันในแต่
 ละกลุ่มของพืชยาสู้บ และพบลักษณะเดียวกันนี้ในพืชชนิดอื่น (Fincher
et al., 1986; De Looze, 1989; Takeuchi *et al.*, 1990)
 ไอโซไซม์ชนิด basic จะมี C-terminal extension ที่จะถูกตัดออกใน
 ขบวนการขนส่งออกไปสู่ vacuole (Linthorst *et al.*, 1990) เอน
 ไซม์กลูคาเนสชนิด acidic จะมี C-terminal extension และเก็บ
 สะสมใน extracellular fluid (Shinshi *et al.*, 1988;
 Linthorst *et al.*, 1990) cDNA ในแต่ละกลุ่มที่เป็น basic หรือ

acidic มีลำดับของโปรตีนที่เหมือนกันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ชนิด acidic และ basic มีความเหมือนกันประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (Linthorst *et al.*, 1990) สรุปได้ว่ายีนโครงสร้าง (structural gene) ของกลูคาเนสทั้งชนิด acidic และ basic จะมีส่วนที่อนุรักษ์ (conservative) ในบริเวณที่เป็น coding sequences

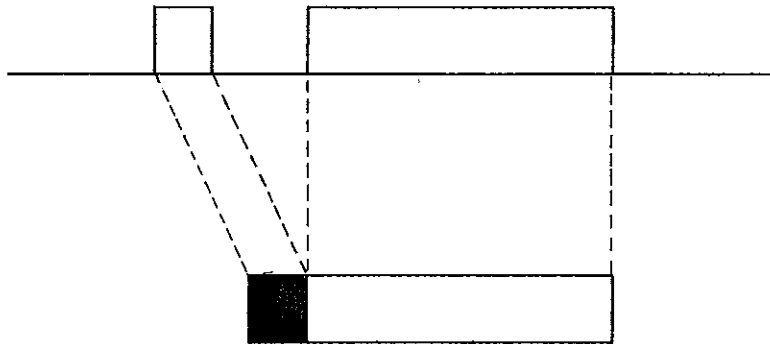
รูปที่ 3 และรูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างของยีนและ protein domain ของ acidic และ basic glucanase ตามลำดับ

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสชนิด acidic สามารถพบได้ในพืชที่ไม่มีการติดเชื้อแต่พบในปริมาณต่ำ ส่วนในพืชที่มีการติดเชื้อหรือในพืชที่ได้รับก๊าซเอธิลีนหรือ salicylic acid จะพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณสูง (Mauch and Staehelin, 1989 ; Memelink *et al.*, 1990) เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสชนิด acidic จะถูกหลั่งสู่ intercellular spaces เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา ส่วนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสชนิด basic จะพบบรรจุอยู่ใน vacuole ในปริมาณสูง ของพืชที่มีการติดเชื้อ (Van den Bulcke, 1989) จะทำหน้าที่ต่อเมื่อเซลล์พืชถูกทำลาย

1.12 เอนไซม์ไคติเนส

จากการศึกษาโปรตีน PR พบว่าโปรตีน PR บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) คือเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ที่สำคัญในเหตุการณ์ defense response ของพืชโดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคโดยการย่อยผนังเซลล์

Acidic glucanase (PR-2)



รูปที่ 3 แผนภาพแสดงยีนของยาสूप PR-2 ชนิด acidic ซึ่งมีส่วนของ N-terminal signal peptide genomic DNA เริ่มจาก 5' upstream (ขวา) ไปยัง 3' downstream (ซ้าย) exon แสดงโดยแท่งสี่เหลี่ยม

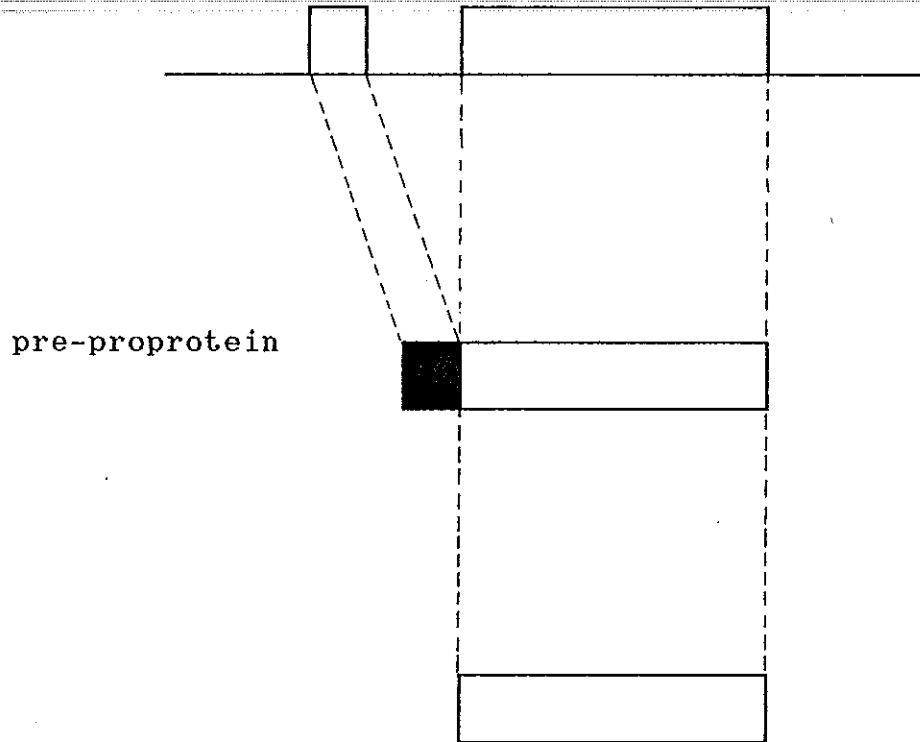
Open reading frame ของยีน PR-2 อยู่บนเส้นตรงตามแนวอน

เส้นประซึ่งเชื่อมกับแท่งสี่เหลี่ยมแสดงถึง pro-protein

N-terminal signal peptide แสดงโดยการแรเงา

(อ้างอิงโดย Linthorst, 1991)

Basis glucanase (PR-2-like)



รูปที่ 4 แผนภาพแสดงยีนของชาสूप PR-2 ชนิด basic

โปรตีนจะไม่มี N-terminal signal peptide และ C-terminal extension genomic DNA เริ่มจาก 5' upstream (ขวา) ไปยัง 3' downstream (ซ้าย) exon แสดงโดยแท่งสี่เหลี่ยม

Open reading frame ของยีน PR-2 อยู่บนเส้นตรงตามแนวอน เส้นประที่เชื่อมกับแท่งสี่เหลี่ยมแสดงถึง pro-protein N-terminal signal peptide แสดงโดยการแรเงา (อ้างถึงโดย Linthorst, 1991)

ไคตินเนส (E.C. 3.2.1.14) 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) นอกจากนี้จะพบว่าแอนติบอดีของเอนไซม์ไคตินเนสจะสูงมากในพืชที่มีบาดแผล หรือพืชที่ได้รับก๊าซเอทิลีนหรือ elicitor ที่ปล่อยจากเชื้อโรค (Boller *et al.*, 1983; Broglie *et al.*, 1986; Hedrick *et al.*, 1988; Parsons *et al.*, 1989) รวมทั้งเกี่ยวข้องกับ HR ด้วย (Boller *et al.*, 1983; Metraux and Boller, 1986; Metraux *et al.*, 1988a) ทั้งเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์กลูคาเนสจะมีฤทธิ์เสริมกันในการต้านการรุกรานโดยช่วยกันทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Mauch *et al.*, 1988b)

เอนไซม์ไคตินเนสพบได้ในพืชที่มีการติดเชื้อ และไม่ติดเชื้อ อาทิเช่น ยาสูบและพืทูเนียที่มีการติดเชื้อจาก TMV (Linthorst *et al.*, 1990), ในถั่ว (*Phaseolus vulgaris*) ที่ติดเชื้อ (Roby *et al.*, 1991) เมล็ดข้าวโพด (Lin *et al.*, 1992), แดงกวา (Boller and Metraux, 1988), มะละกอล, ยางพารา, พืชประเภทสมุนไพรรวม (Boller *et al.*, 1983) รากมะเขือเทศที่มีการติดเชื้อจาก *Fusarium oxysporum* (Benhamou *et al.*, 1990)

เอนไซม์ไคตินเนสสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลำดับของกรดอะมิโนและบริเวณที่หลังเอนไซม์ เมื่อแยกสกัดและหาคณสมบัติของเอนไซม์ไคตินเนสในพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ถั่ว, แดงกวา, มันฝรั่งและยาสูบ (Broglie *et al.*, 1986; Shinshi *et al.*, 1987; Metraux *et al.*, 1988a; Gaynor and Unkenholz, 1989; Laflamme and Roxby, 1989) พบว่าเอนไซม์ไคตินเนสกลุ่ม I เป็นไอโซพอร์มชนิด basic และพบที่ central vacuole และพบว่ามี catalytic domain และ

cysteine-rich domain ที่เรียกว่า hevein domain ซึ่ง hevein domain นี้มี oligosaccharide-binding site เหมือนกับในยางพารา เอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม II เป็นชนิด acidic และมี catalytic domain เหมือนกับเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม I แต่ขาด cysteine-rich domain พบที่บริเวณ extracellular fluid ของใบ ส่วนเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม III ได้มีการศึกษาในแตงกวา พบว่าแตกต่างจากเอนไซม์ไคติเนสทั้งสองกลุ่มที่กล่าวมาแล้วแต่มีแอกติวิตีของไลโซไซม์ (lysozyme) และพบใน extracellular fluid

Shinshi *et al.* (1990) ได้ศึกษาโปรตีน PR-3a และ PR-3b ซึ่งจัดอยู่ในเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม II 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 พบว่ามีคุณสมบัติของแอกติวิตีของไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งสามารถย่อยสลาย peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Trudel *et al.*, 1989)

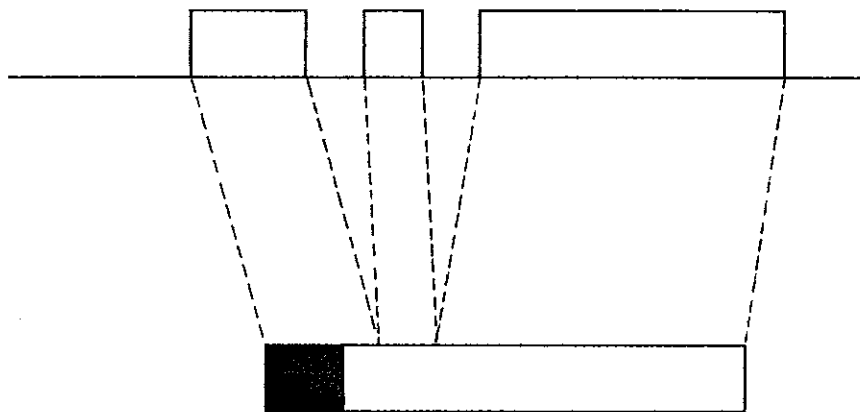
ส่วนเอนไซม์ไคติเนสกลุ่ม III พบได้ในพืช เช่น มะละกอ, ยางพารา, *Parthenocissus quinifolia*, *Arabidopsis thaliana* และแตงกวา (Boller and Metraux, 1988b; Samac *et al.*, 1990) เอนไซม์ไคติเนสกลุ่มนี้สามารถย่อยสลาย peptidoglycan ของแบคทีเรียได้เหมือนกับไลโซไซม์และมีแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส ในปริมาณสูง เอนไซม์ไคติเนสชนิด acidic ในแตงกวาที่มีการติดเชื้อไวรัสพบว่าการสะสมที่ intracellular space

Shinshi *et al.* (1987) ได้ศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนส จากสาหร่ายที่ได้รับฮอร์โมน auxin และ cytokinin พบว่ามี

แอนไซม์ไคตินเนส 2 ไกโซฟอร์มโดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34 และ 32 kd ส่วนการศึกษาของ Boller (1985) พบว่าแอนไซม์ไคตินเนสชนิด basic มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 ถึง 36 kd เมื่อแยกสกัดจากข้าวสาลี มะเขือเทศและถั่วซึ่งมีความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และกรดอะมิโน 67 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Payne *et al.* (1990) ได้ทำการศึกษา พบว่า PR-3a และ PR-3b ถูกสังเคราะห์ในรูปของ pro-proteins ซึ่งมีกรดอะมิโน 24 ตัว เป็น hydrophobic ในบริเวณ N-terminal ใน mature proteins (รูปที่ 5) จะไม่พบส่วนนี้และมี signal peptide สำหรับการส่งผ่านไปยัง endoplasmic reticulum ซึ่งมีความเหมือนกันระหว่างลำดับของกรดอะมิโนและน้ำหนักโมเลกุลถึง 93 เปอร์เซ็นต์ mature protein ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 kd และมีประจุสุทธิเป็นลบ มีค่า pI ต่ำ

Chitinase (PR-3)



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงยีนของยาสู้บ PR-3 ชนิด acidic และ basic โปรตีนจะไม่มี N-terminal signal peptide และ C-terminal extension genomic DNA เริ่มจาก 5' upstream (ขวา) ไปยัง 3' downstream (ซ้าย) exon แสดงโดยแท่งสี่เหลี่ยม Open reading frame ของยีน PR-2 อยู่บนเส้นตรงตามแนวอน เส้นประซึ่งเชื่อมกับแท่งสี่เหลี่ยมแสดงถึง pro-protein N-terminal signal peptide แสดงโดยการแรเงา (อ้างอิงโดย Linthorst, 1991)

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบหาระดับของเอนไซม์โคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่แสดงบทบาทเกี่ยวข้องกับทางด้านทานโรค ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าวที่ติดเชื้อราใบวง โดยใช้วิธีทางชีวเคมีและเทคนิค recombinant DNA
2. วิเคราะห์ การควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ระดับการสร้าง RNA (transcription) และโปรตีน (translation) และความไวต่อการตอบสนองของข้าวเมื่อเกิดภาวะเครียดจากการติดเชื้อราใบวง
3. ศึกษาหาความไว และความจำเพาะของการเหนี่ยวนำการหลั่งเอนไซม์ทั้งสองในข้าวพันธุ์ที่ติดเชื้อได้ง่ายและที่ต้านทานโรคเมื่อพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. ข้าวตัวอย่าง

เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 1 และ กข 7 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จังหวัดพัทลุง

2. เชื้อรา

เชื้อราสาเหตุโรคใบวงคือ *Rhynchosporium oryzae* ที่ใช้ทดลองแยกได้จากแปลงทดลองข้าวของศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่เป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) จากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

จากบริษัท BDH chemicals Ltd ได้แก่ isoamyl alcohol และ formamide

จากบริษัท Hopkin & Williams ได้แก่ ammonium persulphate

จากบริษัท Merck ได้แก่ Folin Ciocalteu phenol reagent, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), Bis-acrylamide (N,N' Methylene diacrylamide), acrylamide, β -mercaptoethanol

จากบริษัท BioRad ได้แก่ cellulose acetate membrane

จากบริษัท Amersham ได้แก่ nylon membrane

จากบริษัท May & Baker ได้แก่ boric acid

จากบริษัท Difco ได้แก่ tryptone, yeast extract,
potato dextrose agar

จากบริษัท Sigma ได้แก่ sodium dodecyl sulphate
(SDS), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Tween 20,
Coomassie brilliant blue R-250, Triton X-100,
fluorescent brightener 28 (Calcofluor white M2R)

จากบริษัท Pharmacia ได้แก่ Standard molecular
weight marker ของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย phosphorylase b,
albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhi-
bitor, α -lactalbumin

3.2 สารเคมีเกรด Molecular biology

จากบริษัท Sigma ได้แก่ lysozyme, RNase A,
ethidium bromide, guanidinium thiocyanate, sodium
sarcosyl sulphate, diethylpyrocarbonate, laminarin,
glycol chitosan

จากบริษัท Promega ได้แก่ nitroblue tetrazolium,
5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, anti-rabbit IgG
(Fc) alkaline phosphatase conjugate antibody

จากบริษัท Sea Kem, FMC Bioproducts ได้แก่ agarose

จากบริษัท BRL ได้แก่ ชุด biotin labelling และ ชุด
PhotoGene nucleic acid detection system

จากบริษัท International Biotechnologies ได้แก่
phenol

จากบริษัท Boehringer Mannheim GmbH ได้แก่
restriction endonuclease type II ซึ่งประกอบด้วย *EcoR* I,
Hind III, *Kpn* I

3.3 สารอื่น ๆ

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

pRCH10-2 genomic DNA ได้รับจาก Professor Christopher J. Lamb, Salk Institute, Callifornia, U.S.A.

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

อุปกรณ์

เครื่องเซนตริฟิวจ์ของบริษัท Beckman รุ่น J2-21
microcentrifuge ของบริษัท Beckman รุ่น Microfuge E
deep-freeze refrigerator ของบริษัท Scientemp
spectrophotometer ของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-160A
micropipette ของบริษัท Gilson
slab gel electrophoresis apparatus ของบริษัท ATTO
ตู้อบแห้งของบริษัท Precision Scientific รุ่น Thelco
เครื่อง homogenizer ของบริษัท Kinematica
เครื่องเขย่าแบบวงกลมของบริษัท Thermolyne รุ่น Big bill
pH meter ของบริษัท Radiometer A/S รุ่น PHM61
เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่งของบริษัท Mettler รุ่น P1210
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งของบริษัท Mettler รุ่น H10
เครื่องล้างฟิล์มเอ็กซ์เรย์

อ่างควบคุมอุณหภูมิ ของบริษัท Thermolyne รุ่น Nuova II

เครื่องผสมสารของบริษัท Scientific รุ่น G-560E

เครื่อง UV light transilluminator ของบริษัท UVP

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าของบริษัท E-C apparatus

เครื่องถ่ายภาพโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าของบริษัท Hoefer

Scientific Instrument

กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olympus

เครื่องเขย่าอ่อนเนื้อของบริษัท Paton Scientific รุ่น

013422

submarine electrophoresis apparatus ของบริษัท

Advance

วิธีการ

2.1 การหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างโดยวิธี 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) เสร็จแล้ว ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm คำนวณหาปริมาณโปรตีนของตัวอย่างโดยนำมาเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานซึ่งเตรียมจาก bovine serum albumin ซึ่งได้จากการทำควบคู่ด้วยกับกับโปรตีนตัวอย่าง

2.2 การทำอิเล็กโตรฟอริซิส

แผ่นเจล (slab gel) ที่ใช้ทำอิเล็กโตรฟอริซิสมีขนาด 8 x 10 cm หนา 1 cm ซึ่งประกอบด้วยโพลีอะครีลาไมด์ เจล 2 ส่วน คือ stacking gel เป็นเจลชั้นบนและ separation หรือ resolving gel เป็นเจลชั้นล่างซึ่งใช้สำหรับแยกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน

2.2.1 การทำอิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ

(Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Native PAGE)

ทำการแยกโปรตีนโดยวิธี Native PAGE ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Davis (1964) นำสารละลายตัวอย่างใส่ลงในแผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจลขนาด 8 x 10 cm ทำอิเล็กโตรฟอริซิส ที่อุณหภูมิห้องใน electrophoresis buffer สำหรับ Native PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง

การเตรียมตัวอย่างของ Native PAGE

นำสารละลายตัวอย่างจากตัวอย่างข้าว 3 ส่วน มาเติม sample buffer 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน หยดลงในช่องเจลที่ได้เตรียมไว้

2.2.2 การทำเจลอิเล็กโตรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

ทำการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงมาจากวิธี Laemmli (1970) นำสารละลายตัวอย่างใส่ลงในแผ่นโพลีอะครีลาไมด์ เจลขนาด 8 x 10 cm ทำอิเล็กโตรฟอริซิส ที่อุณหภูมิห้อง ใน electrophoresis buffer สำหรับ SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง

การเตรียมตัวอย่างของ SDS PAGE

นำสารละลายตัวอย่างจากตัวอย่างข้าว 3 ส่วน มาเติม sample buffer 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้ม นาน 10 นาที หยดลงในช่องเจลที่ได้เตรียมไว้

2.2.3 การย้อมสีโปรตีน

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

2.3 การเตรียมต้นกล้าข้าว

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

นำเมล็ดข้าวตัวอย่างจำนวน 100 เมล็ด มาทำการฆ่าเชื้อโรคโดยแช่ลงใน 70% ethanol นาน 5 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปเพาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษซับที่ชุ่มด้วยน้ำ เก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาเพาะลงกระบะที่มีดินนา วางกระบะข้าวในกรงกันแมลง ที่มีอากาศผ่านได้สะดวก มีน้ำสูงกว่าผิวดินประมาณ 1 cm และมีแสงแดดเพียงพอ เลี้ยงต้นข้าวต่อไปจนมีอายุ 13 วันจึงนำมาทดลองต่อไป

2.4 การเตรียมเชื้อรา

ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบวง (*Rhynchosporium oryzae*) จากแปลงทดลองโดยทำการตัดใบข้าวในส่วนที่เกิดโรครวมทั้งเนื้อเยื่อของใบข้าวในส่วนที่เป็นปกติขนาดประมาณ 0.5 cm X 0.5 cm ทำการฆ่าเชื้อโดย

นำมาล้าง 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 นำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาสปอร์ต่อไป

2.5 การพ่นเชื้อรา

ใช้น้ำกลั่น 10 ml เติลงในจานอาหารวุ้นที่เพาะเชื้อราสาเหตุโรคใบวงที่มีการสร้างสปอร์ เชื้อสปอร์ให้แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่น กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็น spore suspension ปรับให้มีจำนวนสปอร์ 10^5 ต่อ ml นำมาเติม 2% Tween 20 1 หยด ต่อ spore suspension 10 ml จากนั้นนำมาพ่นลงบนใบข้าวตัวอย่าง ทำการคลุมต้นข้าวด้วยถุงพลาสติกทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ในข้าวตัวอย่างซึ่งใช้เป็นชุดตัวควบคุม ใช้น้ำกลั่นพ่นแทน spore suspension

2.6 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บส่วนใบ หน่อและรากของข้าวตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ แต่ละตัวอย่าง 1 ไร่ จำนวน 2 ชุด เพื่อนำไปทดลองหาแอนติบอดีของแอนติบอดีแบบตัว-1, 3-กลูตาเนสและแอนติบอดีชนิดอื่น และทำการเก็บตัวอย่างโดยเก็บส่วนใบและหน่อของข้าวตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ปริมาณ 0.5 ไร่ แต่ละตัวอย่างจำนวน 2 ชุด เพื่อนำไปทดลองเรื่อง RNA จากนั้นนำตัวอย่างข้าวที่เก็บได้แช่แข็งทันทีในไนโตรเจนเหลวและเก็บที่อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งนำไปทดลอง

2.7 การศึกษาการเหนี่ยวนำระดับเอนไซม์ในตัวอย่างข้าว

2.7.1 การสกัดโปรตีนตัวอย่างข้าว

สกัดโปรตีนอย่างหยาบจากส่วนใบ หน่อและรากของตัวอย่างข้าว แขนงข้าวตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงทำการบดตัวอย่างข้าวให้ละเอียดในขณะเย็นจัด ด้วยเครื่องบดยาซึ่งวางอยู่ในกระบอกน้ำแข็ง หลังจากนั้นทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4°C ใส่ตัวอย่างข้าวที่บดแล้วในหลอดทดลองเติม 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 2 ml ต่อข้าวตัวอย่าง 1 g บดด้วยเครื่อง homogenizer นาน 30 วินาที กรองด้วยผ้ากรอง (miracloth) นำสารละลายของตัวอย่างข้าวที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ 12,500 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายส่วนใส (supernatant) นำไปตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry *et al.* (1951)

2.7.2 การตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีเจล อิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Native PAGE)

การหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนสสามารถวิเคราะห์โดยวิธี nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis ในกรณีเอนไซม์ไคติเนสสามารถวิเคราะห์โดยใช้วิธี sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis ได้อีกด้วย ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Davis (1964) แยกสารละลายตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณโปรตีน 30 μ g ด้วยวิธี Native PAGE ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง

2.7.2.1 การตรวจหาแอนติบอดีของเอนไซม์ไคติเนส

ประกบแผ่นเจลที่ได้ด้วยแผ่นเจลที่มีอะครีลาไมด์ 7% ซึ่งมี 0.01% glycol chitin ผสมอยู่ด้วย วางแผ่นเจลภายใต้สภาพที่มีความชื้นของ 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) อุณหภูมิ 40°C นาน 1.5 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายแผ่นเจลที่มี glycol chitin ด้วย 0.01% fluorescent brightener 28 (Calcofluor white M2R) ใน 500 mM Tris-HCl (pH 8.9) ในที่มืด ประมาณ 5-10 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้อง จนมองเห็นแถบใสที่ไม่ติดสี (lytic zone) เมื่อผ่านแสง ultraviolet ที่ส่องขึ้นมาจากเครื่อง UV transilluminator บันทึกภาพด้วยกล้องโพลาไรซ์โดยใช้ฟิลเตอร์สีแดง

2.7.2.2 การตรวจหาแอนติบอดีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

นำแผ่นเจลส่วนที่เหลือไปล้างและแช่ยาเบา ๆ ในน้ำกลั่น ล้างแผ่นเจลด้วย 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) นาน 5 นาที จากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปทำปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรทที่มีอุณหภูมิ 40°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 แช่แผ่นเจลในสารละลายซึ่งประกอบด้วย methanol: acetic acid: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 5:5:2 นาน 5 นาที หลังจากล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมแผ่นเจลด้วย 0.15% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride ใน 1 M NaOH ต้มและแช่ยา นาน 10 นาที จนปรากฏแถบสีแดงซึ่งแสดงแอนติบอดีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จึงนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย methanol: acetic acid: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 3:1:6

2.7.3 การศึกษาแอกติวิตีของ เอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอริซิส แบบมีเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจลโดยเจลชั้นล่างมีอะคริลาไมด์ 15% รวมทั้ง 0.01% glycol chitin และ 0.1% SDS ส่วนโพลีอะคริลาไมด์ เจลชั้นบนมีอะคริลาไมด์ 5% นำสารละลายตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณโปรตีน 30 μg มาทำแยกด้วยอิเล็กโตรฟอริซิส ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง นำแผ่นเจลตัวอย่างมาแช่ใน 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) เขย่าเบา ๆ นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ใน 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ซึ่งมี 1% Triton X-100 ปริมาตร 100 ml ที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง นำแผ่นเจลของตัวอย่างไปย้อมด้วย 0.01% fluorescent brightener 28 (Calcofluor white M2R) ใน 500 mM Tris-HCl (pH 8.9) ในที่มืด นาน 10 นาทีเสร็จแล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้องจนมองเห็นแถบใสที่ไม่ติดสี (lytic zone) เมื่อผ่านแสง ultraviolet ที่ส่องขึ้นมาจากเครื่อง UV transilluminator บันทึกภาพด้วยกล้องโพลาไรซ์โดยใช้ฟิลเตอร์สีแดง

2.7.4 การวิเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ไคติเนส โดยวิธี Western blot

นำสารละลายตัวอย่างใบข้าว ที่มีปริมาณโปรตีน 100 μg มาตกตะกอนด้วย methanol (ซึ่งมี 1% acetic acid) ปริมาตร 1.5 เท่า ส่วนในหน่อและรากของตัวอย่างข้าวให้ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนแล้ว 30 μg มาทำการวิเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยมีอะคริลาไมด์ในเจลชั้นบนและเจลชั้นล่างเป็น 5% และ 15% ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนสในหน่อและรากของตัวอย่างข้าวใช้ปริมาณอะคริลาไมด์และโปรตีน เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,

3-กลูตา-เนส ส่วนการวิเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสในใบ ใช้ปริมาณอะครีลาไมด์ในเจลชั้นบนและเจลชั้นล่างเป็น 5% และ 15% ตามลำดับ ใช้ปริมาณโปรตีนที่ตกตะกอนแล้ว 100 μg นำโปรตีนที่ตกตะกอนแล้วมาทำให้แห้งแล้วละลายในน้ำกลั่น ทำอิลเล็กโตรฟอริซิส ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 ชั่วโมง ทาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูตาเนสและเอนไซม์ไคตินเนส โดยเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลเป็น molecular weight marker

2.7.5 การถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลสู่แผ่นเซลลูโลส อะซีเตก

นำแผ่นเจลที่ได้มาทำการถ่ายโปรตีน โดยใช้เครื่องถ่ายโปรตีนแบบใช้กระแสไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยวางกระดาษกรองลงบนแผ่นฟองน้ำที่วางอยู่ในภาชนะบรรจุ transfer buffer จากนั้นจึงนำแผ่นเซลลูโลส อะซีเตก ที่มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล วางทับบนกระดาษกรองแล้วจึงนำแผ่นเจลมาล้างด้วย transfer buffer แล้ววางทับบนแผ่นเซลลูโลส อะซีเตก โดยไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นวางกระดาษกรองและแผ่นฟองน้ำทับตามลำดับ นำไปใส่ในเครื่องถ่ายโปรตีนทำการผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยให้แผ่นเจลเป็นขั้วลบและแผ่นเซลลูโลส อะซีเตก เป็นขั้วบวก ขณะที่มีการถ่ายโปรตีนควรมีการคนบัฟเฟอร์ตลอดเวลา ความต่างศักย์ที่ใช้ในการถ่ายโปรตีนนี้คือ 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ตัดแผ่นเซลลูโลส อะซีเตก ส่วนที่เป็นโปรตีนมาตรฐานมาย้อมด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R 250 ส่วนแผ่นเซลลูโลส อะซีเตกที่เป็นตัวอย่างนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูตาเนสและเอนไซม์ไคตินเนส

2.7.6 การตรวจหาปฏิกิริยาอิมมูโน

นำแผ่นเซลลูโลส อะซีเตกที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลาย TBST แล้วจุ่มในสารละลาย blocking นาน 1.5 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม primary antibody ในอัตราส่วน 1:1,000 ของสารละลาย blocking นาน 30 นาที primary

antibody ที่ใช้คือแอนติเซราต่อเอนไซม์โคติเนสของมะเขือเทศ และแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ ล้างแผ่นเซลล์ูโลสอะซีเตท ด้วยสารละลาย TBST นาน 10 นาที 3 ครั้ง blocking อีกครั้ง ในสารละลาย blocking นาน 30 นาที เติม secondary antibody คือ anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate ในอัตราส่วน 1:30,000 นาน 30 นาที ล้างแผ่นเซลล์ูโลสอะซีเตทด้วยสารละลาย TBST 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำมาล้างต่อด้วย AP buffer นำมาทำให้เกิดสีด้วย AP color development เขย่าเบา ๆ ตลอดเวลา เมื่อเกิดปฏิกิริยาเสร็จสิ้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น

2.8 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA)

2.8.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย โดยวิธี STET

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

2.8.2 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณมาก

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TB 250 ml ที่อุณหภูมิ 37°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 นาที จะเห็นตะกอนขาวเช่นตรีฟิวจ์ 10,000 rpm 15-20 นาที ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ไม่ให้มีตะกอนติดมา เติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า เช่นตรีฟิวจ์ 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 เช่นตรีฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 10 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่ เติม 1 mg/ml RNase A 50 μ l เก็บที่ 37°C นาน 20 นาที เติมสารละลายอีมีตัวของฟีนอล 7.5 ml และสารละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 7.5 ml เขย่าผสมแบบกลับไปกลับมา เช่นตรีฟิวจ์ 5 นาที ดูดสารละลายที่บน aqueous phase ลงสู่หลอดใหม่ สกัดตามขั้นตอนที่ใช้สารละลายอีมีตัวของฟีนอลอีกครั้ง เติม chloroform: isoamyl alcohol 2 เท่า ผสมและเช่นตรีฟิวจ์ 5 นาที แยก aqueous phase เติม ethanol 2 เท่า เก็บที่ -20°C นาน 30 นาทีหรือทิ้งไว้ค้างคืน เช่นตรีฟิวจ์ 10,000 rpm ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทำให้แห้งและละลายใน TE buffer (pH 8.0) 1-2 ml หาปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยเทียบจาก $OD_{260} = 1$ จะมีปริมาณ DNA 40 μ g/ml

2.8.3 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

(restriction endonuclease)

ย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย restriction endonuclease ในบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสม ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยเทียบจากการย่อย Lambda DNA ปริมาณ 1 μ g ด้วยเอนไซม์ 3-5 ยูนิต ในเวลา 1 ชั่วโมง

2.8.4 การแยก insert DNA ออกจากดีเอ็นเอพาหะ

นำพลาสมิด ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบจำนวนคู่เบสเป็น marker ทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ submarine โดยใช้ 0.8% agarose ใน TBE buffer ส่วน บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสคือ TBE buffer จากนั้นแยกชิ้นส่วน ดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก agarose gel โดยวิธีทำให้ agarose gel เย็นจัดและเซนตริฟิวจ์ นำสารละลาย DNA เติม 3 M sodium acetate (pH 4.5) ในปริมาตร 0.1 เท่า เติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -80°C นาน 10 นาที เซนตริฟิวจ์ 10 นาที ล้าง ตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และ ละลายใน TE buffer (pH 8.0) 100 μl นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและคำนวณความเข้มข้นโดย เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.8.5 การติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม (Probe labelling) ด้วย

วิธี nick translation โดยใช้สารไบโอติน (biotin)

เติมส่วนประกอบข้างล่างนี้ ผสมให้ครบ 50 μl

5 μl 10X dNTP Mix

– μl (1 μg) DNA

– μl autoclaved H_2O จนมีปริมาตรเป็น 45 μl

5 μl 10X Enzyme Mix

นำไปจุ่ม ที่อุณหภูมิต่ำ 16°C นาน 1 ชั่วโมง เติม stop buffer 5 μl นำไปแยกดีเอ็นเอที่ติดฉลากและ dNTP mix โดยวิธี column chromatography

2.8.6 วิธีการแยกดีเอ็นเอที่ติดฉลาก (Probe labelling) โดย

column chromatography

แยกดีเอ็นเอที่ติดฉลากโดยวิธี column chromatography โดยใช้ Sephadex G-50 column เป็นตัวแยก ตามวิธีมาตรฐานที่แสดงไว้โดย Maniatis *et al.* (1982)

2.9 การสกัด RNA จากข้าวตัวอย่าง

นำตัวอย่างข้าวมาบดในโกร่งบดยาให้ละเอียด ขณะเย็นจัดโดยเติมไนโตรเจนเหลว เสร็จแล้วเติมสารละลาย D 5 ml บดด้วยเครื่อง homogenizer 30 วินาที จากนั้นจึงเติม 2 M sodium acetate (pH 4.0) 0.5 ml สารละลายอิมิตัวของฟีนอล 5 ml สารละลายผสม chloroform ต่อ isoamylalcohol (ในอัตราส่วน 49:1) 1 ml ผสมหลังจากที่เติมสารละลายแต่ละชนิดเขย่าหลอดประมาณ 10 วินาที แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ที่สะอาด เติม isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายที่ได้ เขย่าผสมแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บตะกอนและละลายอีกครั้งในสารละลาย D 1.5 ml ตกตะกอนอีกครั้งด้วย isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับสารละลาย D ผสมแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 ชั่วโมง นำไปเซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 75 % ethanol ในน้ำกลั่น (ผสม DEPC) 3 ครั้ง เซนตริฟิวจ์ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำตะกอนให้แห้ง, ละลายตะกอนในน้ำกลั่นที่ผสม 1% DEPC นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm คำนวณความเข้มข้นของ RNA และตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยนำไปทำอิเล็กโตรฟอริซิส แบบ submarine โดยใช้ 1% agarose gel และ TBE buffer

2.10 การทำ dot blot ของ RNA

นำ RNA ที่ได้ปริมาณ 20 μ g มาตกตะกอนด้วย ethanol จากนั้นนำมาเซนตริฟิวจ์และทำให้แห้ง จากนั้นนำมาละลายในน้ำให้มีปริมาตร 10 μ l แล้วผสมกับสารละลายดังต่อไปนี้

100% formamide	20 μ l
formaldehyde (37%)	7 μ l
20xSSC	2 μ l

ผสมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 68°C นาน 15 นาที แล้วนำไปจุ่มลงในกระป๋องน้ำแข็งทันที แล้วเติม 20xSSC ปริมาตร 2 เท่าของแต่ละตัวอย่าง นำแผ่นไนลอนเมมเบรน จุ่มลงในน้ำกลั่นแล้วแช่ใน 20xSSC ส่วนชุดอุปกรณ์สำหรับทำ dot blot ให้นำมาล้างด้วย 0.1 N NaOH ต่อจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด นำแผ่นกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย 20xSSC มาวางลงบนชุด dot blot จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาวางทับอีกครั้ง ประกอบชุด dot blot ทำการดูดโดยใช้แรงดันอากาศ (vacuum suction) ใส่ 10xSSC ลงในช่องที่ต้องการทำ dot blot ของ RNA และใส่ RNA ตัวอย่างลงในแต่ละช่อง หลังจากที่ทำตัวอย่างผ่านลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนแล้วให้ ผ่าน 10xSSC จำนวน 1 ml 2 ครั้ง นำแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากชุด dot blot แล้วตรึง RNA กับแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแสง UV จาก UV light transilluminator นาน 2-5 นาที โดยเอาเมมเบรนด้านที่มี RNA เข้าหาแสง

2.11 การทำไฮบริไดเซชัน (Hybridization)

วางแผ่นเมมเบรนในถุงไฮบริไดเซชัน (hybridization bag) ใส่สารละลาย hybridization ที่ไม่มีดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที ทุกขั้นตอนเขย่าเบา ๆ แล้วเติม DNA probe ซึ่งต้มเพื่อแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกันแล้วทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 60°C ดังคิ่่นนำมาล้างด้วยสารละลาย 2xSSC นาน 5 นาที 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างต่อด้วย 2xSSC 1% SDS ที่อุณหภูมิ 60°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 μ l ต่อ cm^2 บนแผ่นเมมเบรน นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ

65°C ย้ายแผ่นเมมเบรนลงในสารละลาย SA-AP/Tween 20 เวลา
นาน 10 นาที ล้างแผ่นเมมเบรน 3 ครั้งด้วย TBS-Tween 20 ที่อุณหภูมิ
ห้อง นานครั้งละ 5 นาที ล้างด้วย final wash buffer ที่อุณหภูมิห้อง
นาน 60 นาที ซับเมมเบรนด้วยกระดาษกรอง 3 MM วางแผ่นเมมเบรนใน
Photogene development folder ใส่ detection reagent ใน
ปริมาณ 0.01 ml ต่อ 1 cm² ของแผ่นเมมเบรน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ
เคลือบให้ทั่ว เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 3 ชั่วโมง จึงนำแผ่นฟิล์ม
เอกซเรย์ (X-rays film) วางทับลงบนแผ่นเมมเบรน จนกระทั่งมีสัญญาณ
เกิดขึ้นซึ่งตรวจสอบจากฟิล์มเอกซเรย์

3. ผลการทดลอง

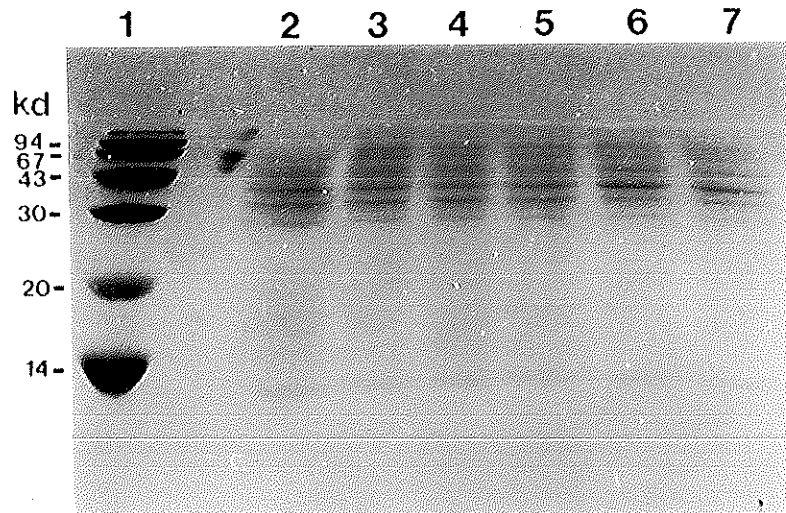
3.1 การตรวจคุณภาพและแบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างข้าว

เมื่อนำตัวอย่างข้าวจากส่วนใบ หน่อและราก มาสกัดโปรตีนด้วย 50mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปวิเคราะห์เอนไซม์แอกติวิตีและการทำ Western blot จะนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้มาทำอิเล็กโตรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส เพื่อตรวจสอบปริมาณที่ถูกต้องและคุณภาพของโปรตีนที่สกัดได้ (รูปที่ 6) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากใบของข้าวตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 มีแถบชัดเจน แต่ลักษณะแบบแผนของโปรตีนที่ได้ไม่แตกต่างกันทั้งในข้าวก่อนและหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่าง 30 μ g ถูกแยกออกเป็นหลายแถบ โดยส่วนใหญ่จะมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 30-67 kd เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน การทดลองแบบเดียวกันก็พบว่าแบบแผนของโปรตีนจากหน่อและรากของตัวอย่างข้าว ก่อนและหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวง 2, 4, 7, 10 และ 15 วัน มีแบบแผนเช่นเดียวกัน

3.2 แอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

3.2.1 แอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีอิเล็กโตรฟอริซิส แบบโพลีอะคริลาไมด์ เจลไม่ปลงสภาพ

นำสารละลายสกัดโปรตีนที่เตรียมได้จากใบ หน่อ และรากของข้าวตัวอย่างมาทำการตรวจสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส โดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่ปลงสภาพ ใช้ slab gel ที่มีอะคริลาไมด์ในเจลชั้นบนและเจลชั้นล่างเป็น 5 และ 15% ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาประกบกับแผ่นเจลที่มี glycol chitin ซึ่งใช้เป็นสับสเตรทเพื่อให้เอนไซม์ไคติเนสจากตัวอย่างข้าวที่นำมาทำอิเล็กโตรฟอริซิสย่อยสับสเตรท นำแผ่นเจลที่มีสับสเตรทมาเชื่อมแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสด้วย fluores-



รูปที่ 6 แบบแผนโปรตีนจากไข่ขาวเมื่อวิเคราะห์ด้วย 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 ตัวอย่างไข่ขาวก่อนฟั่นสเปิร์ราโรคใบวง

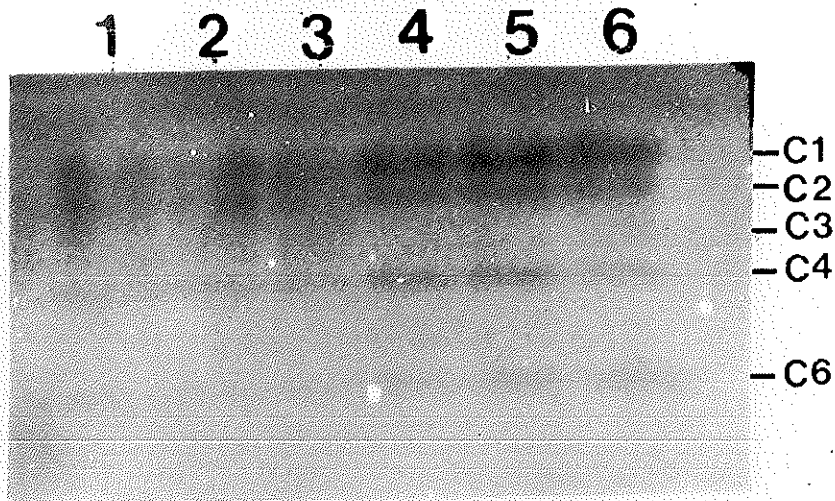
แถวที่ 3-7 ตัวอย่างไข่ขาวหลังฟั่นสเปิร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

cent brightener 28 (Calcofluor white M2R) แล้วนำมาส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator จะพบว่าบริเวณที่เกิดแถบสว่าง (lytic zone) คือตำแหน่งที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส (Trudle and Asselin ,1989)

โปรตีนจากใบข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 ทั้งก่อนและหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราใบวงเมื่อนำมาหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส (รูปที่ 7) พบว่าเกิดแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนส 5 แถบคือ C1, C2, C3, C4 และ C6 โดยที่แถบ C1 และ C2 ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและระดับของแอกติวิตีสูงกว่าแถบ C3, C4 และ C6 เมื่อพิจารณาตัวอย่างข้าวหลังจากพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวงไปแล้ว 7 วันขึ้นไป (แถวที่ 4, 5 และ 6) พบว่าความเข้มของแถบ C1, C2, C4 และ C6 เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งจะแตกต่างจากผลที่ได้เมื่อวิเคราะห์แถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนสในตัวอย่างควบคุมคือไม่พ่นด้วยสปอร์รา ถึงแม้ว่าตัวอย่างข้าวอายุต่างกัน ก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทั้งแบบแผนและปริมาณของไอโซไซม์เหล่านี้ ส่วนแถบ C3 ซึ่งพบทั้งในข้าวก่อนและหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวงจะมีความเข้มเท่ากันตลอดในทุกตัวอย่าง

โปรตีนจากหน่อของข้าวตัวอย่าง ทั้งก่อนและหลังพ่นสปอร์ราเมื่อนำมาหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส (รูปที่ 8) พบว่าเกิดแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนส 5 แถบคือ C1, C2, C3, C4 และ C6 ในตัวอย่างควบคุมคือก่อนพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อราโรคใบวงจะเห็นว่ามีความเข้มของแถบไอโซไซม์ทุกแถบน้อยกว่าในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง โดยเฉพาะในตัวอย่างหลังจากพ่นสปอร์ของเชื้อราใบวง 4 วันขึ้นไป (แถวที่ 3-6) พบว่าแถบ C1, C2, C3 และ C4 จะมีความเข้มของแถบแสดงระดับของแอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน

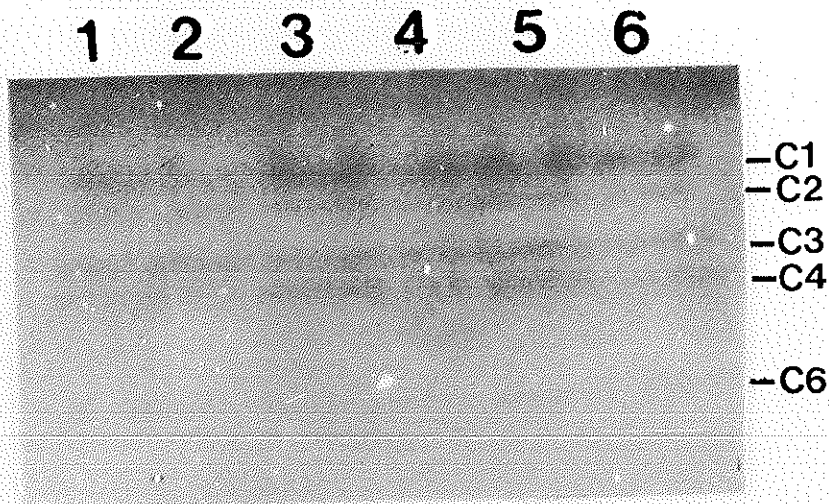


รูปที่ 7 แถบแสดงแอมพลิจูดของไฮโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กท 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนปนสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังปนสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 8 แถบแสดงแอกติวิตีของไฮโซไซม์ (C1, C2, C3, C4 และ C6) ของเอนไซม์ไคติเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กท 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

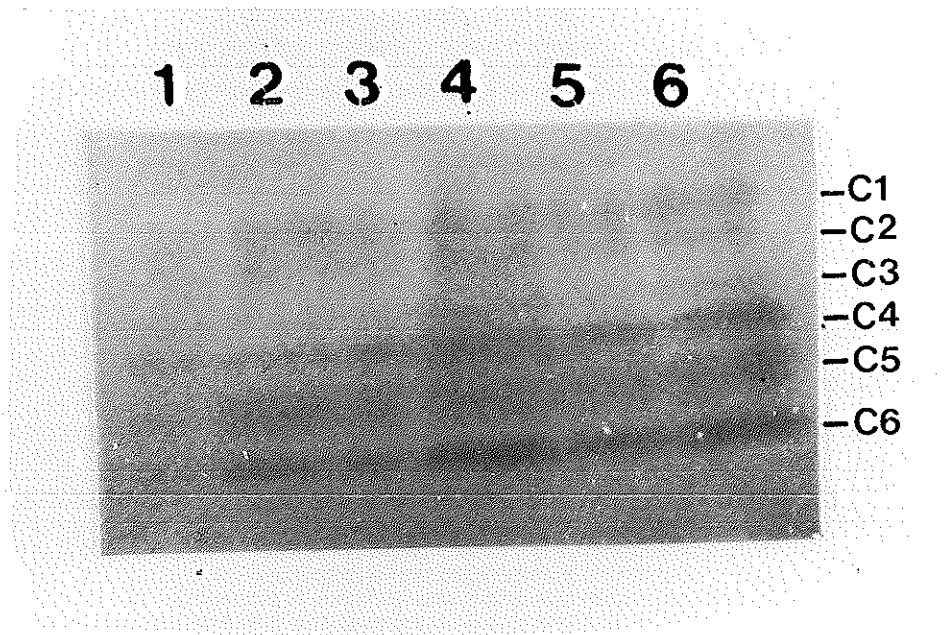
แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

โปรตีนจากรากของข้าวตัวอย่าง ก่อนพ่นสปอร์ของเชื้อราใบ
วงเมื่อนำมาหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส (รูปที่ 9) พบว่าเกิดแถบของ
ไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส 6 แถบคือ C1, C2, C3, C4, C5 และ
C6 โดยความเข้มของแถบของไอโซไซม์จะเพิ่มขึ้นในตัวอย่างหลังจากพ่นด้วย
สปอร์ของเชื้อราใบวง ไอโซไซม์กลุ่ม C1, C2 และกลุ่ม C4, C5, C6 จะ
มีความเข้มของแถบแสดงระดับของแอกติวิตี ของเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มมากขึ้น
ในตัวอย่างข้าวที่พ่นสปอร์ราตั้งแต่ 2 วันขึ้นไป (แถวที่ 2) และมากที่สุดตั้งแต่
7 วันขึ้นไปในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา (แถวที่ 4, 5 และ 6)

รูปที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบแอกติวิตีของไอโซไซม์ของ
เอนไซม์ไคติเนสในตัวอย่างข้าวที่เก็บจากส่วนต่าง ๆ คือ ใบ หน่อและราก
ทั้งก่อนและหลังพ่นด้วยสปอร์ราใบวงนาน 15 วัน พบว่าในใบและหน่อของ
ข้าวตัวอย่างจะมีแบบแผนแสดงแถบของไอโซไซม์ส่วนที่คล้ายคลึงกัน แต่จะ
เห็นเฉพาะบางไอโซไซม์ที่แตกต่างกันชัดเจน เช่น ในตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์
ราซึ่งสกัดจากในใบจะแสดงแถบไอโซไซม์ C1 และ C2 ที่มีแอกติวิตีสูงสุด
รากจะมีแถบไอโซไซม์ C5 ที่ชัดเจนและแตกต่างจากใบและหน่อ ขณะที่แถบ
ไอโซไซม์ C3 จะปรากฏชัดเจนที่สุดในตัวอย่างหน่อ เมื่อเปรียบเทียบ
แอกติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสระหว่างตัวอย่างข้าวที่พ่นและไม่พ่นสปอร์รา พบ
ว่าในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน ความเข้มของแถบแสดงแอกติวิตีของแต่ละ
ไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสจะเห็นเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในตัวอย่างข้าวเมื่อ
พ่นสปอร์รา 15 วันแล้ว (แถวที่ 2, 4 และ 6) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม
(แถวที่ 1, 3 และ 5)

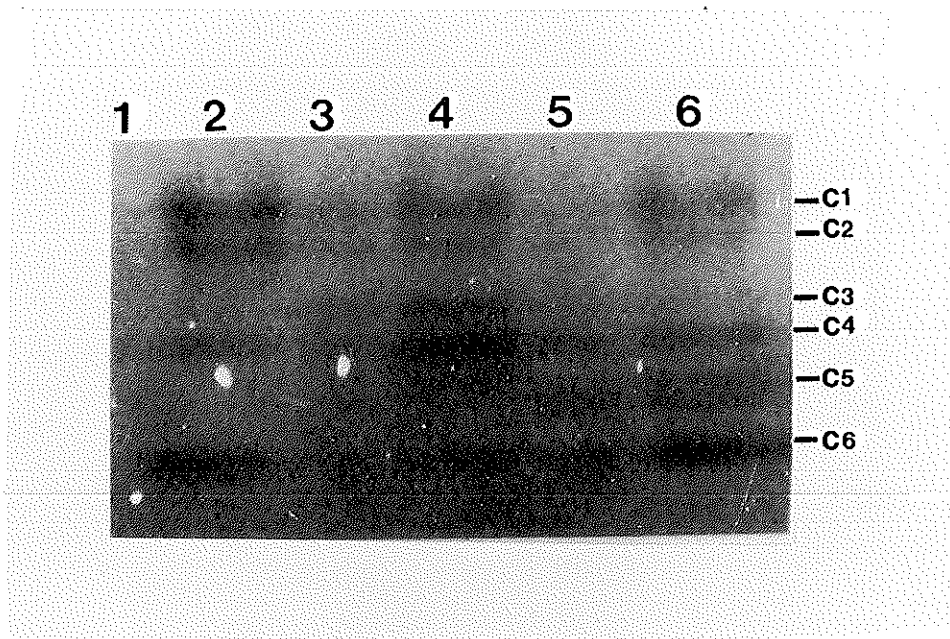


รูปที่ 9 แลบบแสดงแอนติบอดีของไอโซไซม์ (C1, C2, C3, C4, C5 และ C6) ของแอนไซม์ไคติเนสจากรากข้าวพันธุ์ กท 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 10 การเปรียบเทียบแอนติบอดีของไอโซไซม์ของแอนไซม์โคติเนส (C1-C6)
ระหว่างตัวอย่างข้าวส่วนใบ หนอนและราก เมื่อวิเคราะห์ด้วย
Native PAGE

ตัวอย่างข้าวที่เก็บก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

: ใบ (แถวที่ 1), หนอน (แถวที่ 3), ราก (แถวที่ 5)

ตัวอย่างข้าวที่เก็บหลังจากพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน

: ใบ (แถวที่ 2), หนอน (แถวที่ 4), ราก (แถวที่ 6)

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 μ g

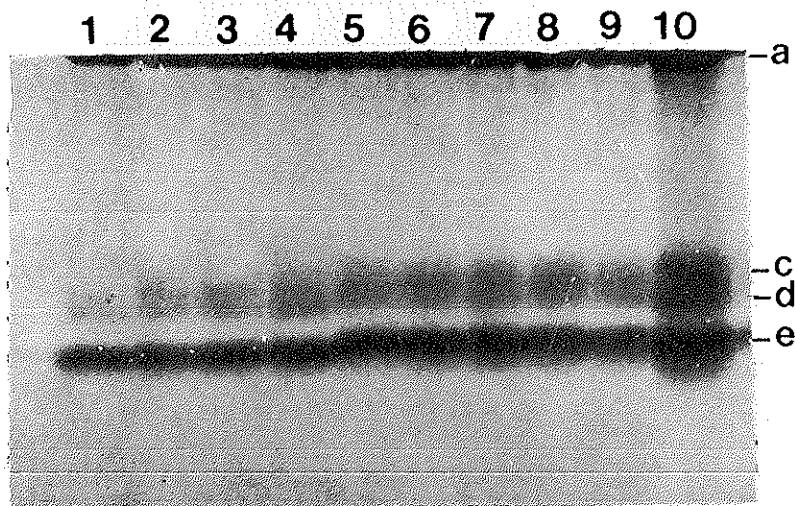
3.2.2 แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธีอิเล็กโตรฟอริซิส แบบ โพลีอะครีลาไมด์ เจล มีเอสดีเอส

การตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสนอกจากจะทำโดยวิธี Native PAGE แล้วยังสามารถทำ SDS-PAGE โดยนำโปรตีนมาทำให้กลับคืนสภาพธรรมชาติจึงจะตรวจหาแอคติวิตีได้ และการทำวิธีนี้จะทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของไอโซไซม์ที่ชัดเจน และเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทำ Western blot โดยใช้ SDS-PAGE ได้

การตรวจสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสจากสารสกัดโปรตีนที่เตรียมได้จากใบ หนอนและรากของข้าวตัวอย่างโดยเจลด่างอิเล็กโตรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส ใช้ slab gel ที่มีอะครีลาไมด์ในเจลชั้นบนและเจลชั้นล่างเป็น 5 และ 15% ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาทำการคืนสภาพโปรตีน เพื่อให้เอนไซม์ไคติเนสจากตัวอย่างข้าวที่นำมาทำอิเล็กโตรฟอริซิสสามารถย่อยสลายสเตรทที่อยู่ในแผ่นเจลได้ นำแผ่นเจลมาย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนสด้วย fluorescent brightener 28 (Calcofluor white M2R) แล้วนำมาส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator จะพบว่าบริเวณที่เกิดแถบสว่าง (lytic zone) คือ ตำแหน่งที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส (Trudle and Asselin, 1989)

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติเนส ในตัวอย่างข้าวที่เก็บทุกวันหลังจากพ่นสปอร์ราในหนึ่งสัปดาห์แรกและเมื่อครบสัปดาห์ที่สองพบว่าใบของข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 11) จะมีแถบแอคติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส 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) จะมีความเข้มน้อยกว่าในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์รา (แถวที่ 2-10) แถบบนสุดคือแถบ a เป็นกลุ่มไอโซไซม์ที่อยู่บริเวณเหนือเจลมีความเข้มชัดเจนและไม่เคลื่อนที่ตามกระแสไฟฟ้า ความเข้มของไอโซไซม์ c, d และ e จะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนเห็นความแตกต่างชัด

เงินระหว่างตัวอย่างที่ไม่พ่นและที่พ่นสไปร์รา และเข็มสอดในตัวอย่างที่พ่นด้วย
สไปร์รานาน 15 วัน (แถวที่ 10)



รูปที่ 11 แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (a, c, d และ e) ของ
เอนไซม์โคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กท 1 เมื่อวิเคราะห์ด้วย

SDS-PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-10 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

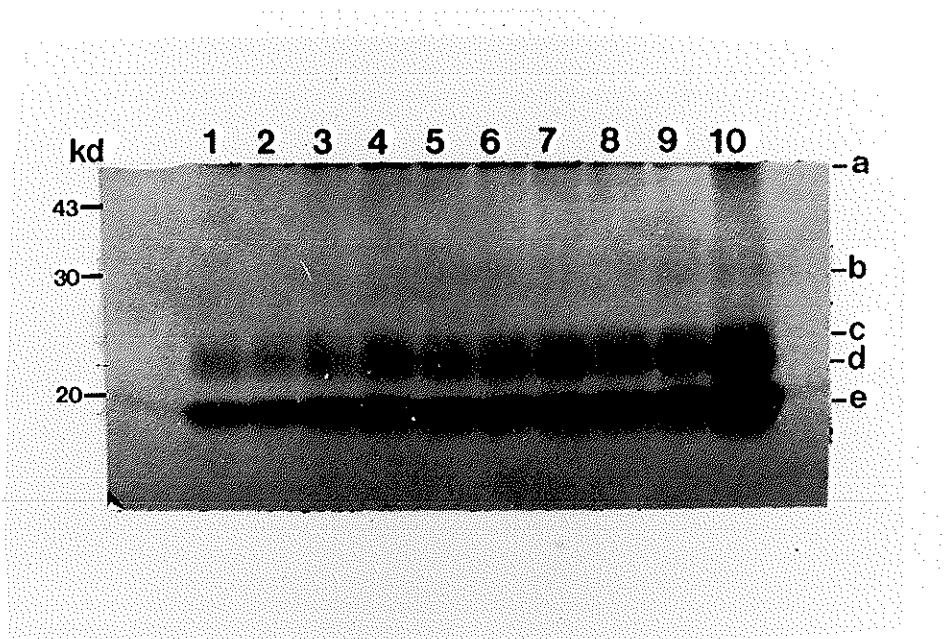
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 15 วัน

ตามลำดับ

การวิเคราะห์แบบเดียวกันในใบของข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 พบว่าเกิดแถบแอดคิตिवิตี้ของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนส จำนวน 5 ไอโซไซม์ คือ a, b, c, d และ e (รูปที่ 12) โดยมีแถบไอโซไซม์ b ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 30.2 kd ซึ่งเห็นได้ไม่ชัดเจนนักในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 แต่ไม่พบในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 ส่วนความเข้มของแถบไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราซึ่งได้ผลที่คล้ายคลึงกันกับตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 11) แต่ปริมาณของไอโซไซม์ c, d และ e จะเห็นเข้มขึ้นชัดเจนได้ในระยะเวลาที่เร็วกว่าในพันธุ์ กข 1 คือในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 ข้าวหลังพ่นสปอร์ราตั้งแต่ 3 วันขึ้นไป (แถวที่ 4-10) โดยใช้ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์เท่ากัน

การตรวจหาแอดคิตिवิตี้ของเอนไซม์ไคตินเนสในหน่อของข้าวตัวอย่างพบว่าเกิดแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนสจำนวน 4 แถบคือ a, b, d และ e ในตัวอย่างข้าวที่ก่อนและหลังพ่นด้วยสปอร์ราดังแสดงผลในรูปที่ 13 โดยไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนสทุกแถบในตัวอย่างก่อนพ่นสปอร์ซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมจะมีอยู่เล็กน้อยเห็นเป็นแถบจาง แถบ a เป็นกลุ่มไอโซไซม์ที่อยู่บริเวณเหนือเจล ในตัวอย่างทุกแถว ดังเช่นที่พบในใบ (รูปที่ 12) เมื่อสังเกตในตัวอย่างข้าวที่พ่นด้วยสปอร์รา พบว่า แถบ b, d และ e จะเพิ่มขึ้นในตัวอย่างหลังจากการพ่นด้วยสปอร์ราตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป (แถวที่ 4, 5 และ 6) ส่วนแถบ e จะเป็นไอโซไซม์ที่มีปริมาณสูงสุด ส่วนไอโซไซม์แถบ b จะเห็นได้ชัดเจน และมีปริมาณในหน่อสูงมากกว่าในใบของข้าว

รูปที่ 14 แสดงแถบแอดคิตिवิตี้ของเอนไซม์ไคตินเนสในรากของข้าวตัวอย่างพบแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนสทั้ง 5 แถบคือ a, b, c, d และ e เหมือนดังในตัวอย่างใบข้าว (รูปที่ 12) แถบ c, d และ e จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างหลังการพ่นสปอร์ราอย่างเห็นได้ชัดและสูงสุดในตัวอย่างวันที่ 15 (แถวที่ 6) ส่วนแถบไอโซไซม์ b พบว่าเป็นแถบที่เห็นได้ชัดเจน และมีความเข้มของแถบของไอโซไซม์สูงขึ้นตามวันที่พ่นด้วยสปอร์ราดังเช่นในตัวอย่างหน่อ (รูปที่ 13)



รูปที่ 12 แถบแสดงแอกติวิตีของไฮโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของ
เอนไซม์ไคติเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย

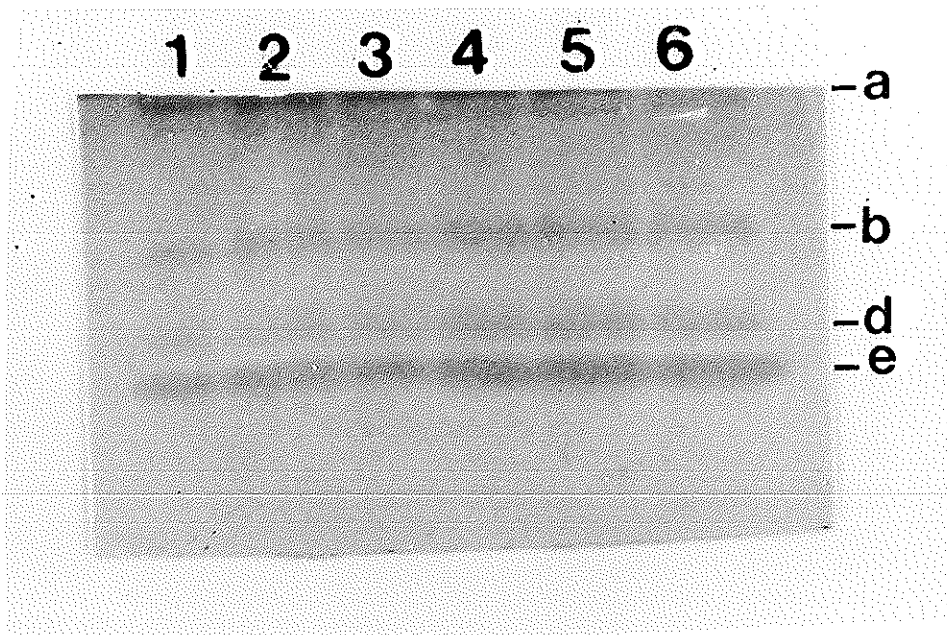
SDS-PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-10 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 15 วัน

ตามลำดับ

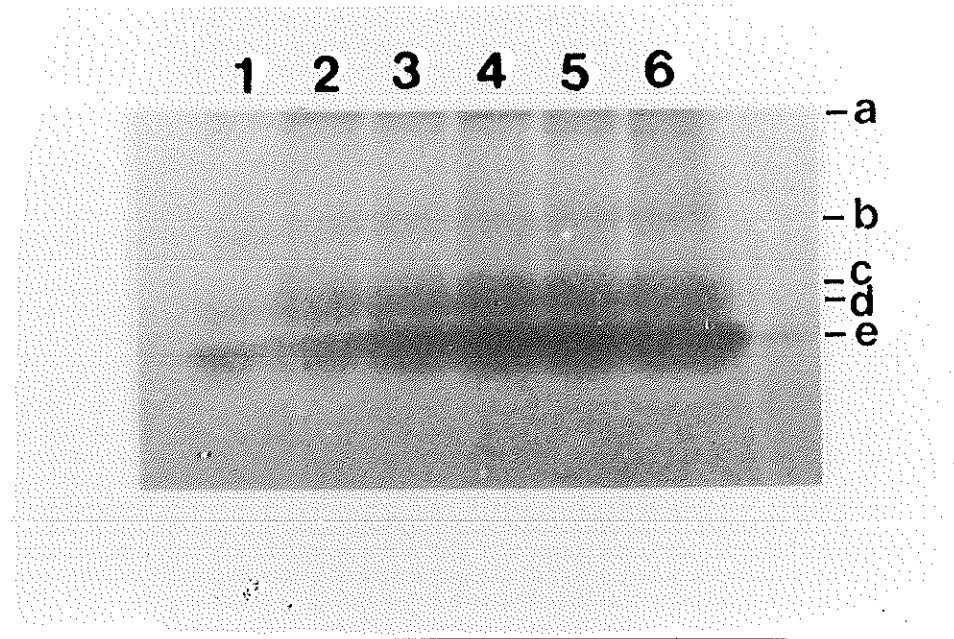


รูปที่ 13. แถบแสดงแอนติบอดีของไฮโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของ
 เอนไซม์โคติเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย
 SDS-PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-10 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 14 แถบแสดงแอกติวิตีของไฮโซไซม์ (a, b, c, d และ e) ของ
 เอนไซม์ไคติเนสจากรากข้าวพันธ์ กท 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย
 SDS- PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-10 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

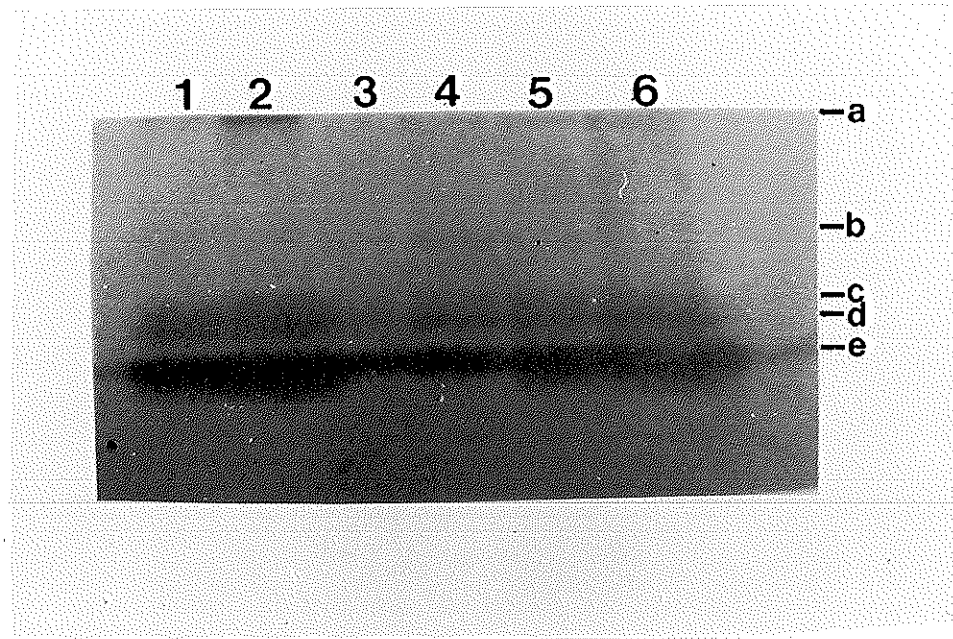
2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดโปรตีนจากข้าวที่ได้จากตัวอย่างส่วนต่าง ๆ คือใบ หน่อและราก ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากันมาหาแอกติวิตีเพื่อเปรียบเทียบแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์โคติเนส (รูปที่ 15) จะเห็นแบบแผนของไอโซไซม์ได้ไม่ชัดเจนนักเมื่อเทียบกับผลที่แสดงในรูปที่ 12, 13 และ 14 แต่ก็สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราและตัวอย่างควบคุมที่เหมือนกันทั้งในใบ หน่อและรากคือมีแถบไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นชัดเจนในตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราเป็นเวลา 15 วัน

3.2.3 แอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยอิเล็กโตร-ฟอริซิสแบบโพลีอะครีลาไมด์ เจล ไม่แปลงสภาพ

นำสารสกัดโปรตีนที่เตรียมได้จากใบ หน่อและรากของข้าว ตัวอย่างมาตรวจสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยทำอิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพ ใช้ slab gel ที่มีความหนาแน่นของอะครีลาไมด์ในเจลชั้นบนและเจลชั้นล่างเป็น 5 และ 15% ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาแช่ในสารละลาย laminarin ซึ่งเป็นสับสเตรก เพื่อให้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากตัวอย่างข้าว ที่นำมาทำอิเล็กโตร-ฟอริซิสไปย่อยสับสเตรก จากนั้นจึงนำแผ่นเจลมาย้อมตรวจแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสด้วย 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride จะพบว่าบริเวณที่เกิดแถบสีแดง คือ บริเวณที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (Pan *et al.*, 1989)

จากการวิเคราะห์แอกติวิตี ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในใบข้าวที่เก็บตัวอย่างทุกวันหลังพ่นสปอร์ราในสัปดาห์แรก และเมื่อครบสัปดาห์ที่สอง (รูปที่ 16) พบว่าในตัวอย่างใบจะเกิดแถบแอกติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้ากลูคาเนสจำนวน 3 ไอโซไซม์คือ G1, G2 และ G3 โดยพบว่าแถบไอโซไซม์ G3 เป็นแถบที่เห็นชัดเจนและมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์รา (แถวที่ 5-9) และมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากที่สุด ในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์รานาน 15 วัน (แถวที่ 9)



รูปที่ 15 การเปรียบเทียบแอกติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนส (a-e) ระหว่างตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อและราก เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

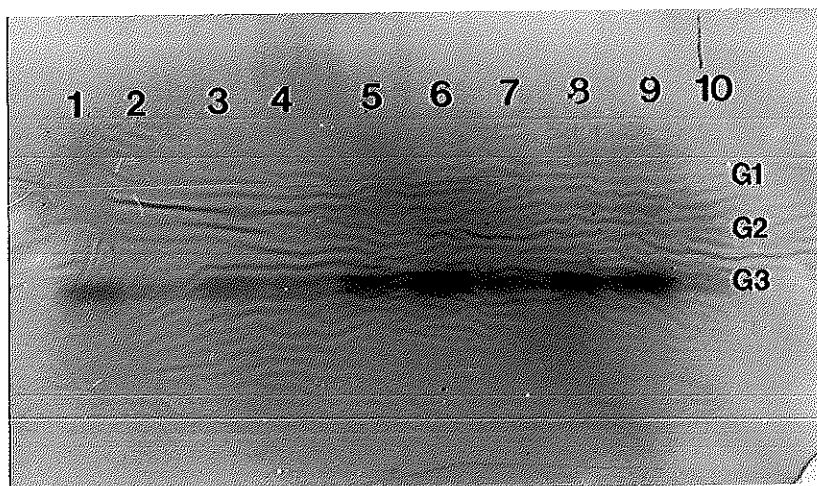
ตัวอย่างข้าวที่เก็บก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

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

ตัวอย่างข้าวที่เก็บหลังจากพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน

:ใบ (แถวที่ 2), หน่อ (แถวที่ 4), ราก (แถวที่ 6)

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 μg



รูปที่ 16 แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของ
 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธ์ กช 7
 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1-9 ตัวอย่างข้าวหลังพ้นสปอร์ราโรคใบวง

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 15 วัน

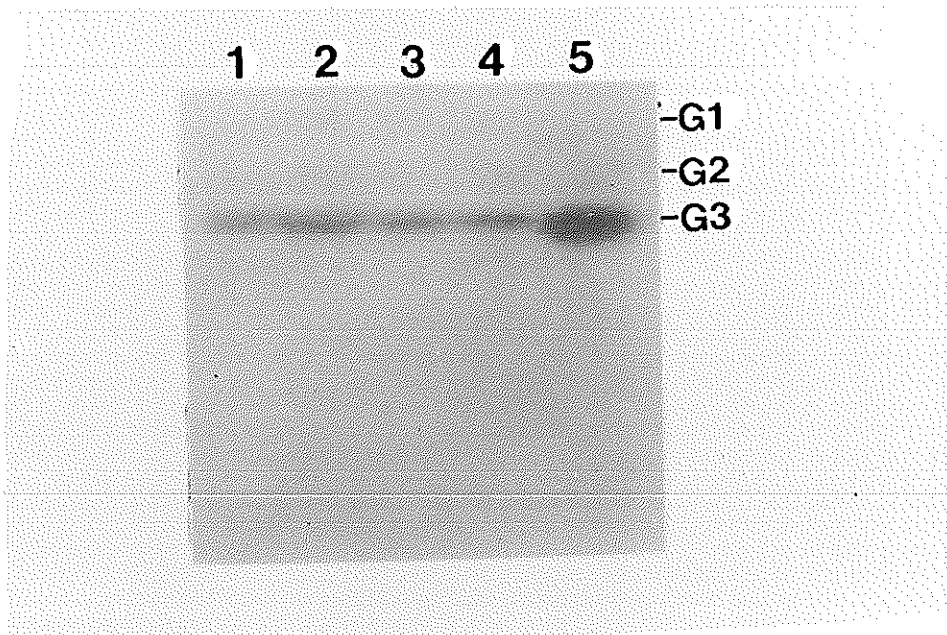
ตามลำดับ

แถวที่ 10 ตัวอย่างข้าวก่อนพ้นสปอร์ราโรคใบวง

เมื่อวิเคราะห์แบบแผนและปริมาณของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 ที่เป็นตัวอย่างควบคุมคือไม่พ่นด้วยสปอร์ราของข้าวอายุต่าง ๆ กัน คือ 13, 28, 32 และ 37 วัน เปรียบเทียบกับข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวงคือข้าวอายุ 28 วัน (รูปที่ 17) พบว่าทั้งข้าวที่เป็นตัวอย่างควบคุมและข้าวที่เก็บหลังพ่นด้วยสปอร์ราที่มีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเกิดขึ้นมี 3 ไอโซไซม์คือ G1, G2 และ G3 ในทุกตัวอย่างควบคุมที่อายุต่างกัน (แถวที่ 1-4) มีแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสไม่แตกต่างกันมากนัก แต่จะแตกต่างจากตัวอย่างข้าวหลังพ่นเชื้อราโรคใบวง (แถวที่ 5) อย่างชัดเจนโดยเฉพาะไอโซไซม์แถบ G3

แถบของแอกติวิตีของไอโซไซม์ของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE ในข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 18) และในข้าวพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 19) พบว่ามีไอโซไซม์ 3 แถบคือ G1, G2 และ G3 โดยแถบ G3 จะแสดงระดับแอกติวิตีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสูงสุด ตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 จะเห็นว่าความเข้มของแถบไอโซไซม์ G3 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนกว่าในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 18) หลังจากการพ่นเชื้อราโรคใบวง และในตัวอย่างข้าวทั้งสองพันธุ์จะมีแอกติวิตีสูงสุดในวันที่ 15 หลังพ่นสปอร์รา

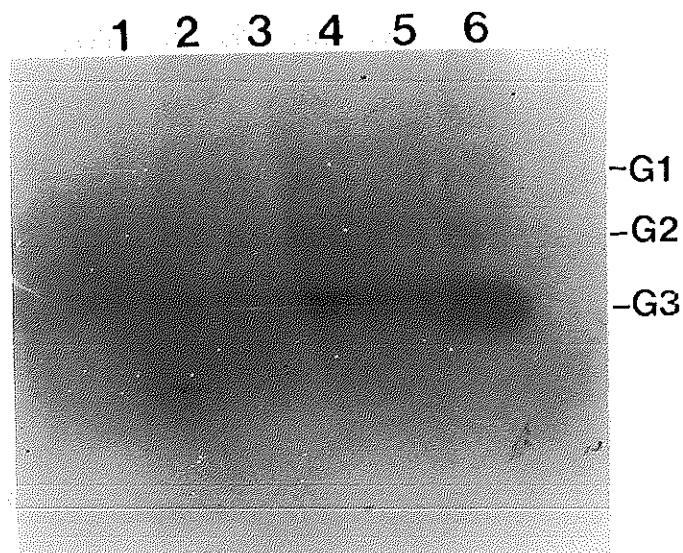
เมื่อตรวจแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในหน่อ (รูปที่ 20) และในราก (รูปที่ 21) พบว่าแถบแอกติวิตีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่เห็นอย่างชัดเจนมีเพียงแถบเดียว คือไอโซไซม์ G3 ซึ่งพบว่าจะมีความเข้มสูงขึ้นตั้งแต่หลังจากทำการพ่นสปอร์ราโรคใบวงนาน 2 วัน และไม่เปลี่ยนแปลงมากนักในเวลาที่นานขึ้น



รูปที่ 17 การเปรียบเทียบแอนติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-
กลูคาเนส (G1, G2, และ G3) ในตัวอย่างใบข้าวที่เป็นตัวอย่าง
ควบคุมและในตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง เมื่อวิเคราะห์
ด้วย Native PAGE

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

แถวที่ 5 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวงอายุ 28 วัน
ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 μg

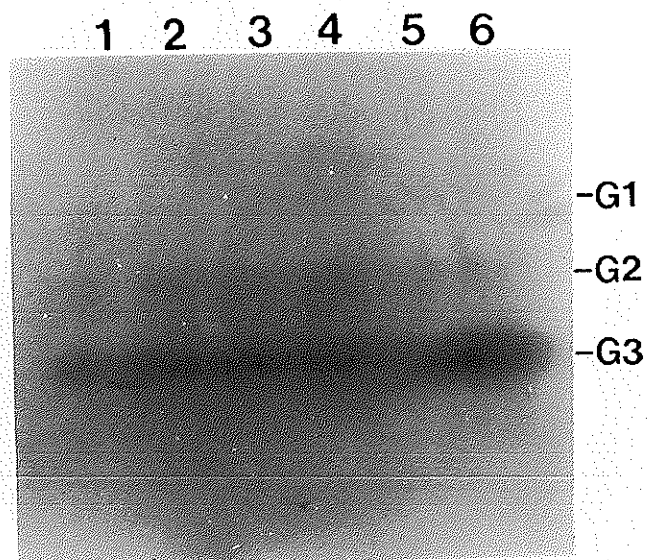


รูปที่ 18 แถบแสดงแอมพลิจูดของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของ
เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 1 เมื่อ
วิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนปนสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังปนสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

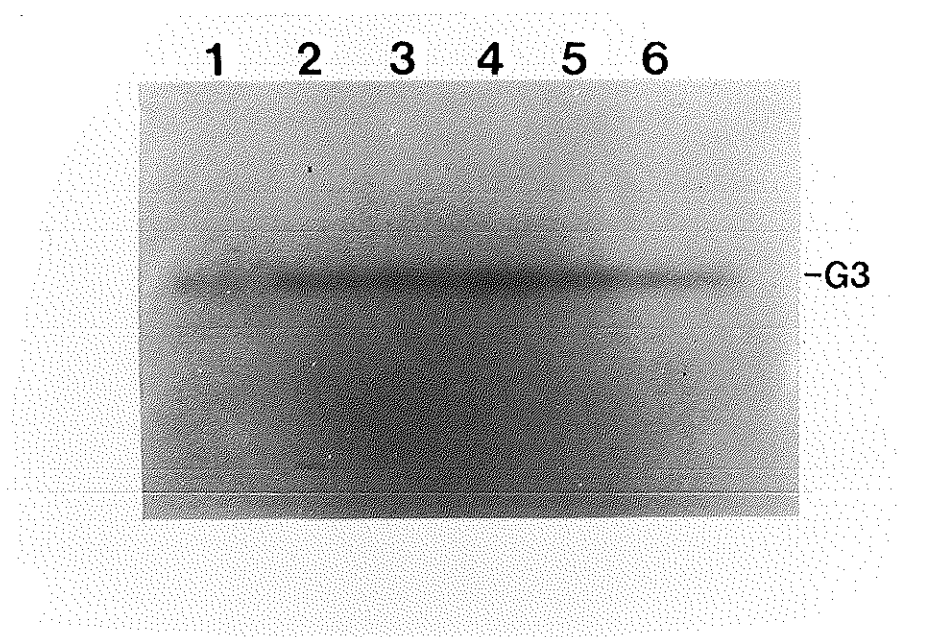


รูปที่ 19 แถบแสดงแอมพลิจูดของไอโซไซม์ (G1, G2 และ G3) ของ
เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบข้าวพันธุ์ กข 7
เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

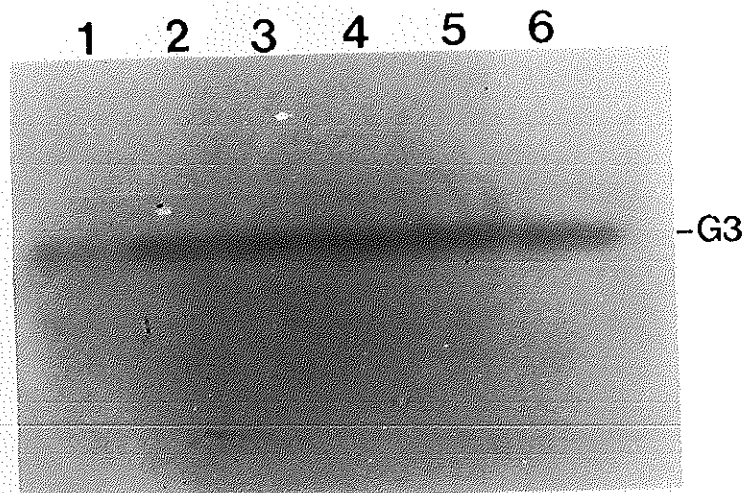
แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

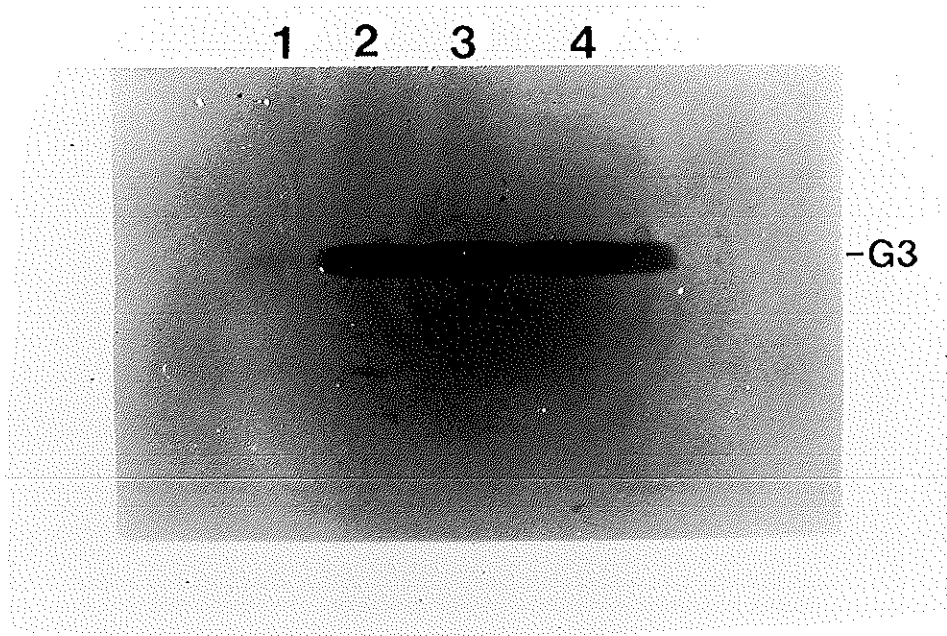


รูปที่ 20 แถบแสดงแอกติวิตีของไฮโซไซม์ (G3) ของเลนไซม์เบต้า-1,3-
กลูคาเนสจากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE
แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรดใบวง
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรดใบวง
2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 21 แถบแสดงแอกติวิตีของไอโซไซม์ (G3) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-
กลูคาเนสจากรากข้าวพันธุ์ กข 7 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE
แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ้นสปอร์ราโรคใบวง
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ้นสปอร์ราโรคใบวง
2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

รูปที่ 22 แสดงผลการเปรียบเทียบแบบแผนและปริมาณของ
ไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากตัวอย่างข้าวส่วนใบ หน่อ
และรากพบว่าไอโซไซม์ G3 เป็นเพียงไอโซไซม์เดียวที่มีปริมาณที่แตกต่าง
ระหว่างตัวอย่างที่พ่นและไม่พ่นสปอร์ราแต่มีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งในใบ หน่อ
และราก



รูปที่ 22 การเปรียบเทียบแอกติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-
กลูคาเนส (G3) ในตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วย Native PAGE

แถวที่ 1 ตัวอย่างใบข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2 ตัวอย่างใบข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน

แถวที่ 3 ตัวอย่างหน่อข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน

แถวที่ 4 ตัวอย่างรากข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน

ปริมาณโปรตีนในแต่ละแถวเท่ากัน แถวละ 30 μg

3.3 การวิเคราะห์ Western blot ของแอนไซม์ไคตินเนสและแอนไซม์

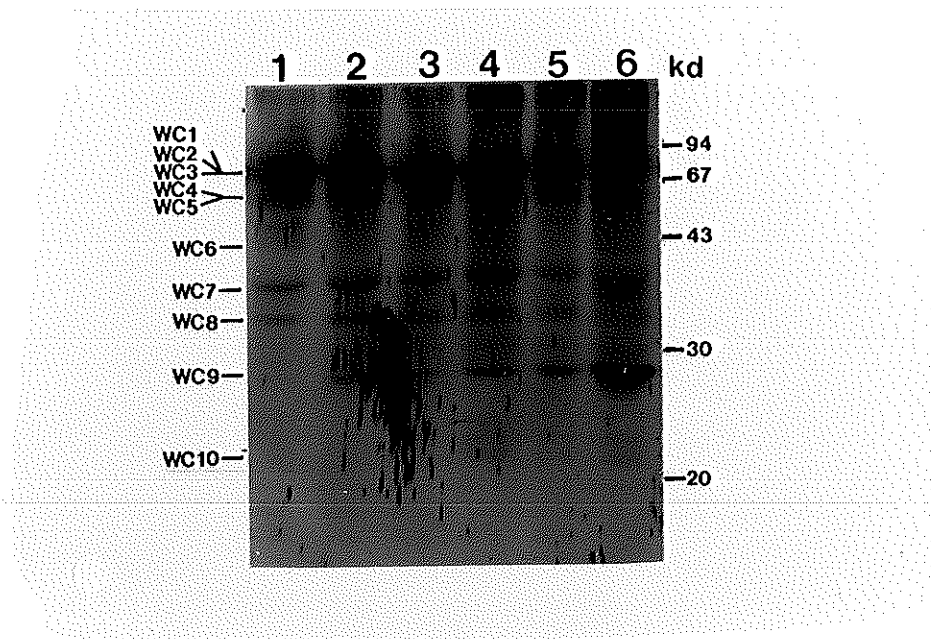
เบต้า-1,3-กลูคาเนส

3.3.1 การวิเคราะห์ Western blot ของแอนไซม์ไคตินเนส

เมื่อนำโปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการสกัดใบ หนอน และรากของข้าวตัวอย่างมาทำเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส จากนั้นนำมาทำการถ่ายโปรตีนสู่แผ่นเซลลูโลส อะซีเตทแล้วนำแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทมาทำปฏิกิริยาอิมมูโนกับแอนติเซราต่อแอนไซม์ไคตินเนสของมะเขือเทศ ซึ่งใช้เป็น primary antibody และใช้ anti-rabbit IgG เป็น secondary antibody ตรวจวัดการเกิดสีแล้วบันทึกผล

จากการทดลองในใบข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 1 ทุกตัวอย่างพบว่าการจับ (cross-react) ของแถบของโปรตีนกับแอนติเซราต่อแอนไซม์ไคตินเนสของมะเขือเทศมี 10 แถบแบ่งตามกลุ่มของน้ำหนักรโมเลกุลได้ตั้งชื่อกลุ่ม WC1, WC2, WC3, WC4, WC5 กลุ่ม WC6, WC7, WC8 และ WC9 และกลุ่ม WC10 ดังแสดงผลในรูปที่ 23 แถบ WC9 ซึ่งมีน้ำหนักรโมเลกุลประมาณ 28.1 kd ในตัวอย่างที่ควบคุมจะมีอยู่น้อยมากแต่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นที่ลดลงจากตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา จนกระทั่งสูงสุดหลังจากการพ่นสปอร์ราโรคใบวง 15 วัน กลุ่มแถบ WC1, WC2, WC3, WC4 และ WC5 มีน้ำหนักรโมเลกุลอยู่ในช่วง 43-94 kd พบได้ในปริมาณที่เท่ากันตลอดในทุกตัวอย่างรวมทั้งกลุ่มแถบ WC6, WC7 และ WC8 มีน้ำหนักรโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 30-43 kd โดยแถบ WC6 และ WC10 จะมีปริมาณน้อยมาก โดยแถบ WC10 มีน้ำหนักรโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 30-20 kd

เมื่อวิเคราะห์โปรตีนไคตินเนส โดยวิธีเดียวกันนี้ในใบข้าวตัวอย่างพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 24) จะพบแบบแผนของแถบโปรตีนที่คล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ โดยมีแถบ WC9 จะมีความเข้มมากที่สุดอย่างเห็นได้ชัดในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา ส่วนแถบ WC6 จะเพิ่มปริมาณมากขึ้นในตัวอย่างที่พ่นสปอร์ราและมีความเข้มชัดเจนกว่าในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 23)

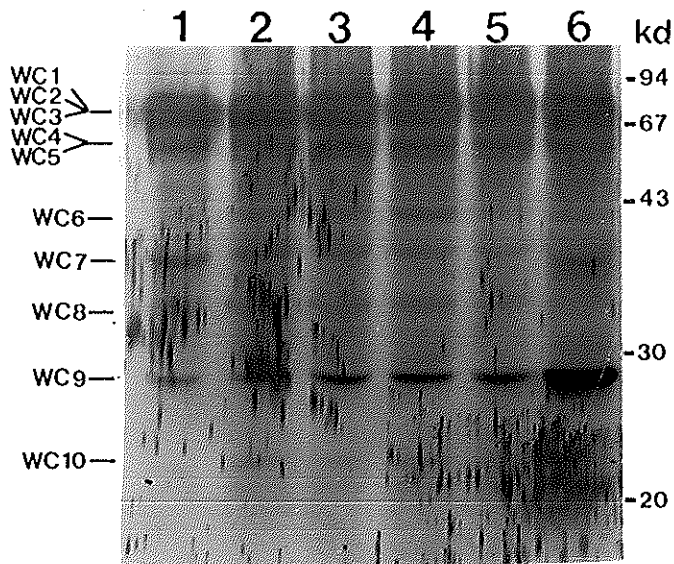


รูปที่ 23 แบบแผนของโปรตีน (WC1-WC10) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของแอนติเจนไซม์โคติเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อแอนติเจนไซม์โคติเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ้นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ้นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 24 แบบแผนของโปรตีน (WC1-WC10) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์โคติเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์โคติเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

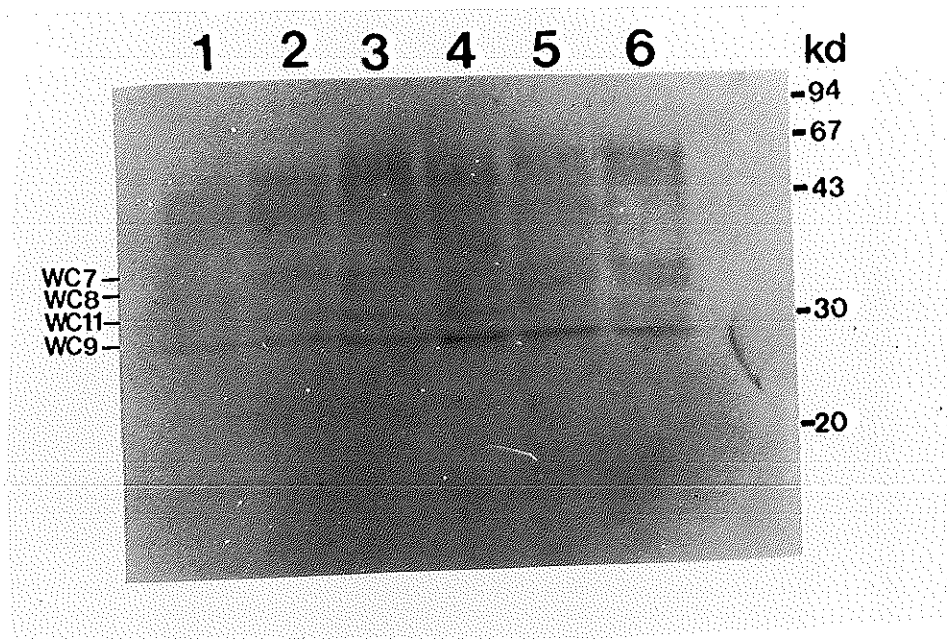
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

รูปที่ 25 แสดงผลของการทำ Western blot ของตัวอย่างที่ได้จากหน่อข้าวพันธุ์ กข 7 โดยใช้แอนติเซราต่อเอนไซม์ไคตินเนสของมะเขือเทศ สังเกตได้ว่าแบบแผนของแถบโปรตีนจะแตกต่างกันไปจากที่ได้จากตัวอย่างใบอย่างชัดเจน (รูปที่ 23) โดยในหน่อมี แถบ WC11 ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่อยู่ระหว่าง WC8 และ WC9 มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 30 kd เพิ่มจากที่พบในตัวอย่างที่ได้จากใบ แต่อย่างไรก็ตามแถบ WC9 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 28.1 kd ยังคงเป็นแถบที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดในตัวอย่างข้าวที่พ่นสปอร์ราในวันที่ 7 (แถวที่ 4) นอกจากนี้ลักษณะของแบบแผนโปรตีนที่ต่างกันยังพบได้ในรากของข้าวพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 26) แถบ WC9 เป็นแถบที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดและมีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา 4 และ 7 วัน (แถวที่ 3 และ 4) แต่แบบแผนโปรตีนที่ได้ในรากก็ยังแตกต่างกันไปจากในใบและหน่อโดยมีแถบของโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคตินเนสได้คือ แถบ WC8, WC11, WC9 และ WC10 ซึ่งแถบ WC10 จะเห็นได้ชัดเจนกว่าในตัวอย่างใบและหน่อ

3.3.2 การวิเคราะห์ Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส

เมื่อนำโปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการสกัดใบ หน่อและรากของข้าวตัวอย่างมาทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบมีเอสดีเอส จากนั้นนำมาทำการถ่ายโปรตีนสู่แผ่นเซลลูโลส อะซีเตทแล้วนำแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทมาทำการวิเคราะห์ Western blot โดยทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนบนแผ่นเซลลูโลส อะซีเตทกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ Western blot ของเอนไซม์ไคตินเนส

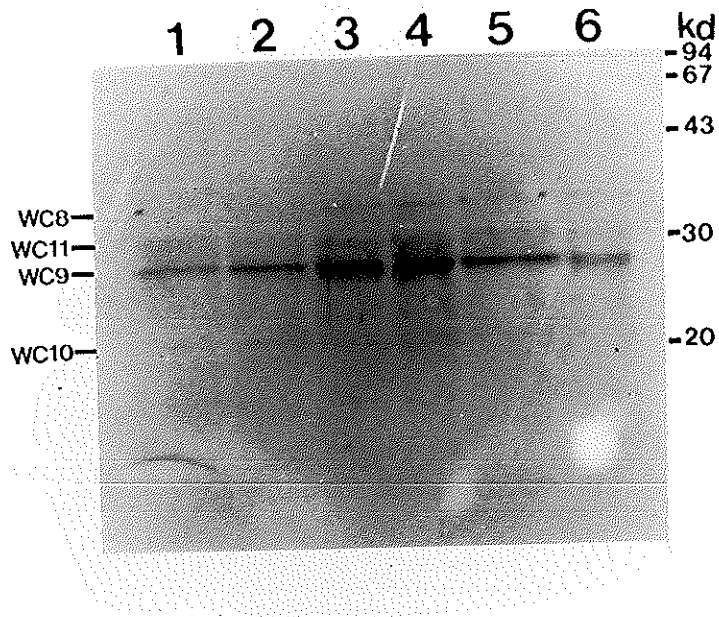


รูปที่ 25 แบบแผนของโปรตีน (WC7-WC11) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของแอนติเจนไคตินเนสจากหน่อของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อแอนติเจนไคตินเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 26 แบบแผนของโปรตีน (WC8-WC11) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของแอนติบอดีไคตินเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อแอนติบอดีไคตินเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

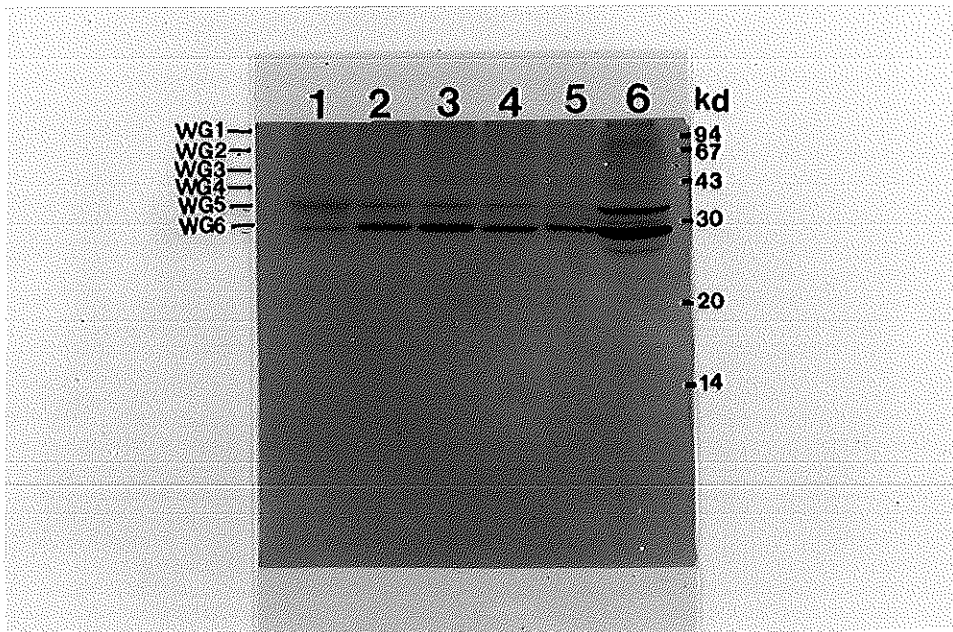
2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

รูปที่ 27 แสดงแบบแผนโปรตีนจากใบของข้าวตัวอย่างพันธุ์

กข 1 ที่สามารถทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ คือแถบ WG1, WG2, WG3, WG4, WG5 และ WG6 พบว่า แถบที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ไม่พ่นและพ่นสปอร์ราอย่างชัดเจนคือแถบ WG5 และ WG6 ซึ่งเป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36.5 และ 28.8 kd ตามลำดับ โดยมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างตัวอย่างเป็นสองช่วงคือจะมีปริมาณมากขึ้นสูงสุดในช่วงแรกเมื่อเก็บตัวอย่างหลังพ่นสปอร์รา 4 วัน (แถวที่ 3) และระดับลดลงในระยะเวลา 10 วัน (แถวที่ 5) และมีปริมาณสูงขึ้นอีกครั้งโดยมีความเข้มข้นของแถบมากที่สุดในตัวอย่างที่เก็บหลังพ่นสปอร์รา 15 วัน (แถวที่ 6) ส่วนแถบ WG1-WG4 เป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูงคือโดยประมาณ 43 kd ขึ้นไปจะเห็นได้ไม่ชัดเจนและไม่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละตัวอย่าง

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ กข 7 (รูปที่ 28) พบว่าแบบแผนของแถบโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศได้ ในลักษณะใกล้เคียงอย่างมากกับที่ได้จากข้าวพันธุ์ กข 1 (รูปที่ 27) คือมี แถบ WG1, WG2, WG4, WG5 และ WG6 แต่การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน แถบ WG5 และ WG6 เห็นได้เป็นสองช่วง โดยช่วงแรกจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในตัวอย่างที่เก็บหลังพ่นสปอร์ราตั้งแต่ 2 วัน (แถวที่ 2) และลดลงตามลำดับ และเพิ่มขึ้นสูงสุดอีกครั้งในวันที่ 15 (แถวที่ 6)

แถบของโปรตีนที่สกัดได้จากหน่อสามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศได้ (รูปที่ 29) คือแถบ WG5, WG7 และ WG6 ตามลำดับซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลบริเวณ 30 kd จะมีแบบแผนของโปรตีนที่แตกต่างไปจากผลที่ได้ในตัวอย่างใบ (รูปที่ 28) แถบ WG6 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.8 kd เป็นแถบโปรตีนที่พบในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา มีปริมาณเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดจากตัวอย่างควบคุม ซึ่งไม่พ่นสปอร์รา (แถวที่ 1) การเพิ่มของโปรตีน WG6 จะเห็นเป็น

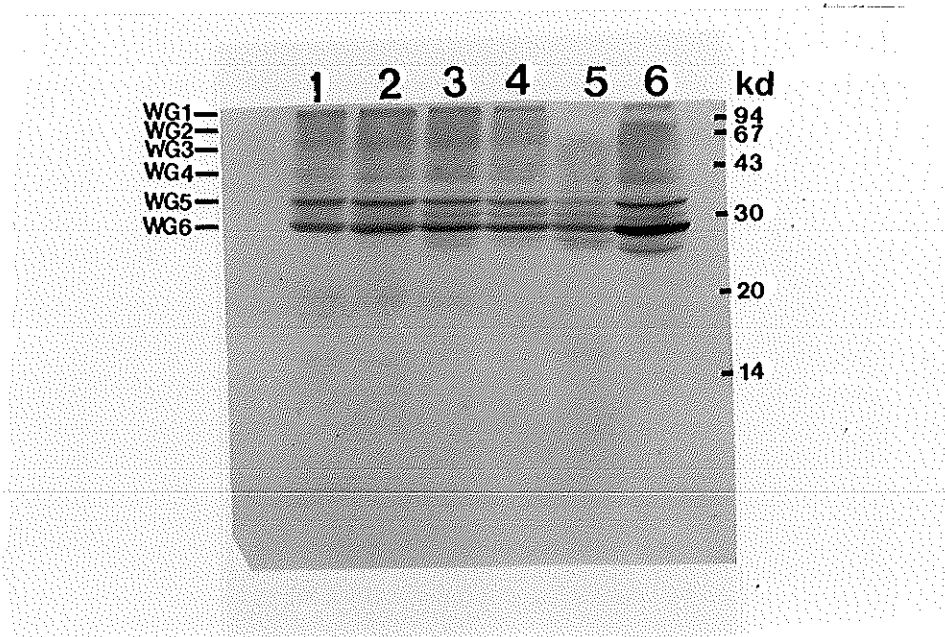


รูปที่ 27 แบบแผนของโปรตีน (WG1-WG6) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของแอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อแอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

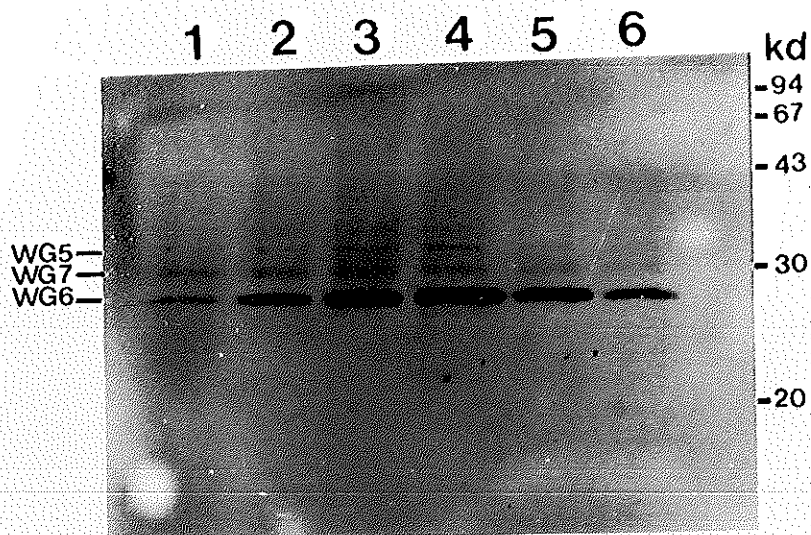


รูปที่ 28 แบบแผนของโปรตีน (WG1-WG6) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบของข้าวพันธุ์ กท 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ



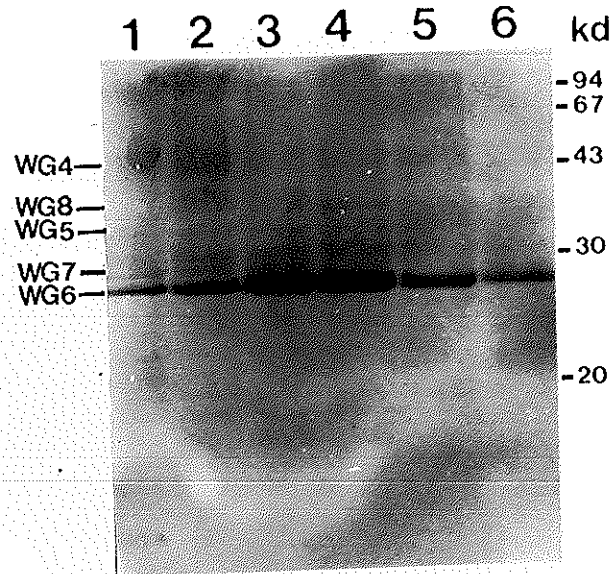
รูปที่ 29 แบบแผนของโปรตีน (WG5-WG7) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของแอนติเจนเบต้า-1,3-กลูคาเนสจากหนองของข้าวพังกู กท 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อแอนติเจนเบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

ที่วง (peak) ตั้งแต่ 2 วันจนถึง 15 วัน และมีจุดยอดที่ตัวอย่างข้าววันที่ 7 หลังจากการพ่นสปอร์รา (แถวที่ 4) และปริมาณจะลดลงในเวลาต่อมา ส่วนในรากของข้าวตัวอย่าง (รูปที่ 30) มีแบบแผนโปรตีนแสดงแถบของโปรตีนที่สามารถจับกับ แอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ ได้แตกต่างไปจากตัวอย่างใบและราก คือแถบ WG4, WG8, WG5, WG7 และ WG6 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันแถบ WG6 เป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับกับในตัวอย่างใบและหน่อคือ 28.8 kd ความเข้มของแถบของโปรตีน WG6 เปลี่ยนแปลงจนเห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่พ่นและไม่พ่นสปอร์ราและมีปริมาณสูงสุดในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ราวันที่ 7 (แถวที่ 4)



รูปที่ 30 แบบแผนของโปรตีน (WG4-WG8) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ของแอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากรากของข้าวพันธุ์ กข 7 ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเซราต่อแอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของมะเขือเทศ

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

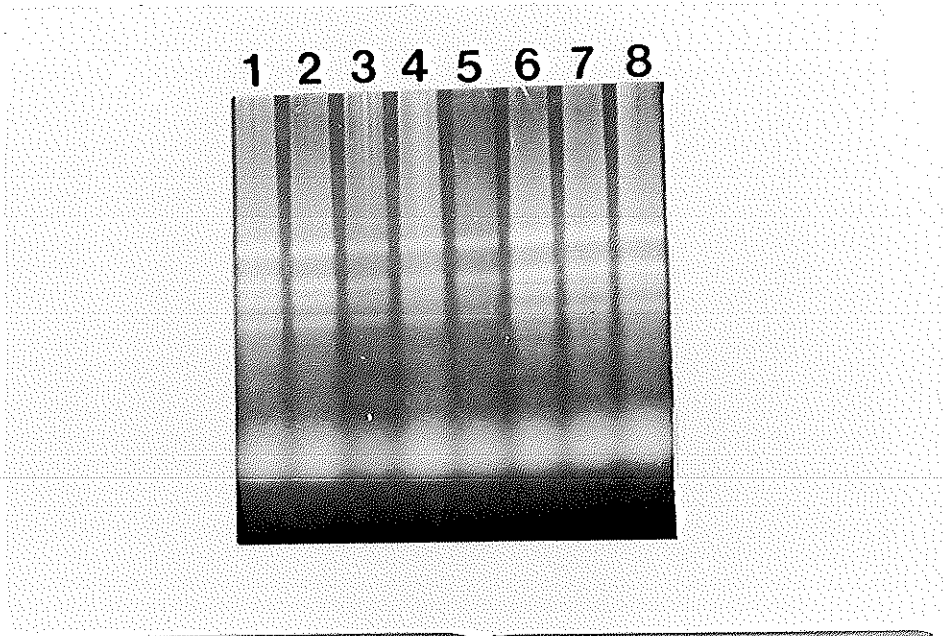
แถวที่ 2-6 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 7, 10 และ 15 วัน ตามลำดับ

3.4 การวิเคราะห์ RNA

เมื่อทำการสกัด RNA จากใบข้าวตัวอย่างทั้งก่อนพ่นสปอร์ของเชื้อรา และหลังพ่นสปอร์ของเชื้อรา 2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่ได้ พบว่าในแต่ละตัวอย่าง RNA ที่ได้มีแถบชัดเจนและมีจำนวน 5 แถบ (รูปที่ 31) จากนั้นนำ RNA ที่ได้จากใบข้าวตัวอย่างมาทำ dot blot hybridization กับ p7-25 cDNA และ pRCH10-2 genomic DNA ซึ่งมีขนาด 220 และ 1,100 base pair ตามลำดับ ซึ่งแยกชิ้นส่วนจากพลาสมิดดีเอ็นเอ (รูปที่ 32) และติดฉลากด้วยสารไบโอตินแล้ว ดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นนี้เป็นรหัสของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสของข้าวบาร์เลย์และเอนไซม์ไคติเนสของข้าวเจ้า ตามลำดับ (รูปที่ 33) พบว่า RNA จากใบของข้าวตัวอย่างสามารถไฮบริไดซ์กับ p7-25 cDNA ของข้าวบาร์เลย์ได้เป็นสองพีคหลังจากการพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวง 2 ชั่วโมงจะมีสัญญาณแสดงปริมาณ RNA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และลดลงในตัวอย่างข้าวที่เก็บหลังพ่นสปอร์รา 8 ชั่วโมงและหลังจากนั้นเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งจนมีปริมาณสูงตลอดไปจนครบ 72 ชั่วโมง ส่วน RNA จากใบของข้าวตัวอย่างที่ไฮบริไดซ์กับ pRCH10-2 genomic DNA ได้ผลไม่แน่นอน

RNA ที่ได้จากหน่อเมื่อนำมา hybridization กับ p7-25 cDNA และ pRCH10-2 genomic DNA ซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนสตามลำดับ พบว่าในหน่อของข้าวตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคใบวงสามารถจับ กับ p7-25 cDNA ได้ (รูปที่ 34) สัญญาณแสดงปริมาณ RNA ที่จับกับ p7-25 cDNA เพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่พ่นด้วยสปอร์ราตั้งแต่ 24 ชั่วโมง (แถวที่ 2-4) ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนจากตัวอย่างที่ไม่พ่นด้วยสปอร์ของเชื้อรา (แถวที่ 1) แต่ผลของ hybridization ของ RNA จากตัวอย่างหน่อกับ pRCH 10-2 genomic DNA (รูปที่ 35) จะสังเกตเห็นมีสัญญาณเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่พ่นสปอร์รา 48 ชั่วโมง (แถวที่ 3) เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่พ่นสปอร์รา (แถวที่ 1) แต่ก็ได้ผลไม่ชัดเจนนัก



รูปที่ 31 แบบแผน RNA เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-8 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง

2, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

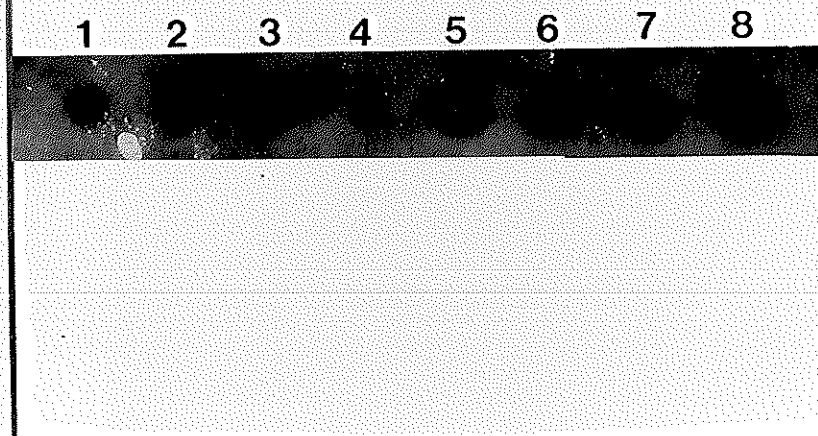


รูปที่ 32 แบบแผน DNA insert เมื่อแยกด้วย agarose gel electrophoresis

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



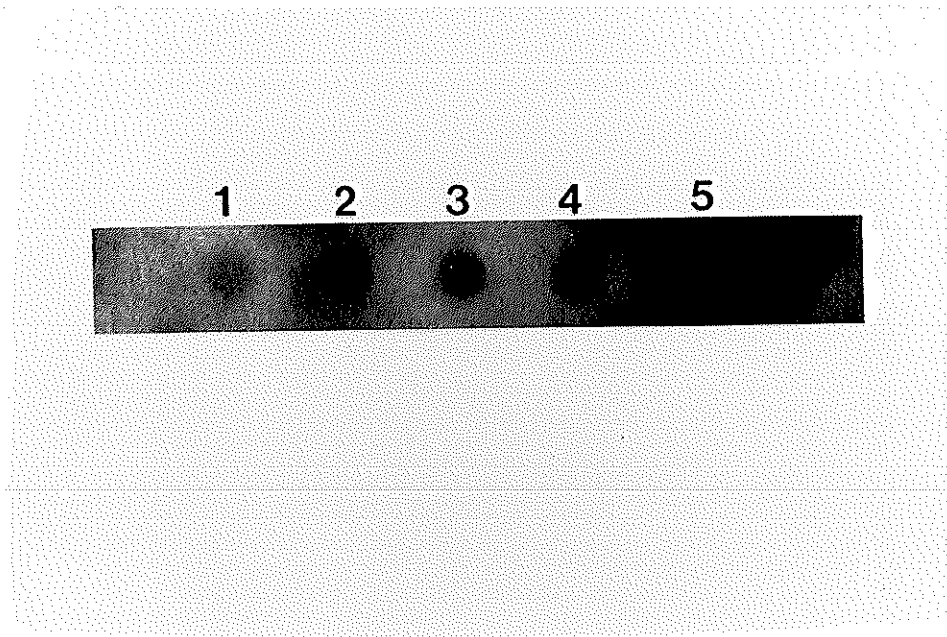
รูปที่ 33 RNA dot blot hybridization ของใบข้าวพันธุ์ กข 7

กับ 7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

แถวที่ 2-8 ตัวอย่างข้าวหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง 2, 4, 8,

12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ



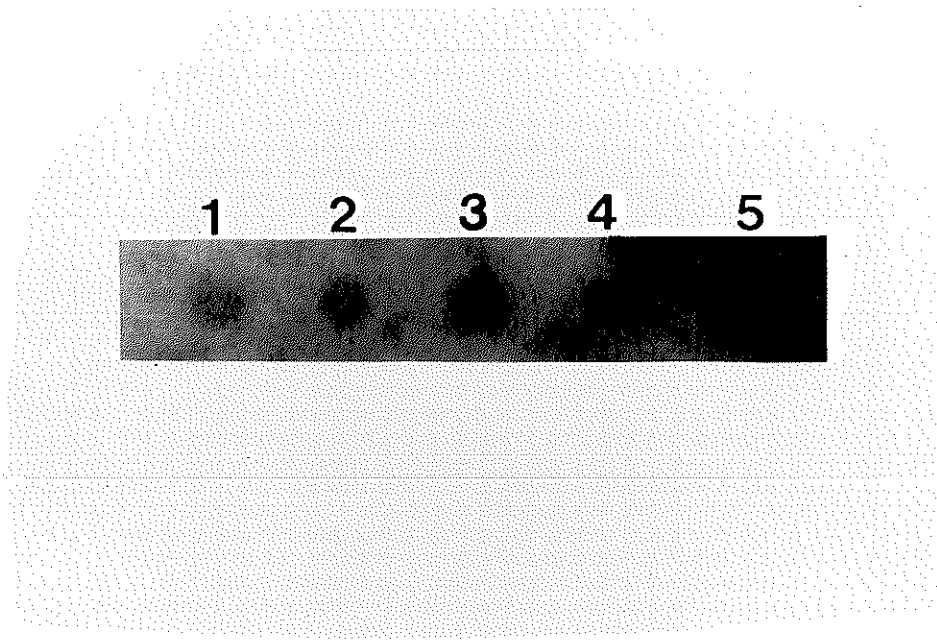
รูปที่ 34 RNA dot blot hybridization ของหน่อข้าวพันธุ์ กข 7

กับ 7-25 cDNA ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน

แถวที่ 1 ตัวอย่างข้าวก่อนพ่นสปอร์ราโรคใบวง

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

แถวที่ 5 p7-25 cDNA (positive control)



รูปที่ 35 RNA dot blot hybridization ของหน่อข้าวพันธุ์ 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)

4. วิจารณ์

4.1 เอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในการตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อโรค

เอนไซม์ไคตินเนสในตัวอย่างของใบข้าวทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีแอสติวิตีเจลอิลเล็กโตรพอริซิส จะสามารถเห็นแบบแผนของไฮโซไซม์ทั้งชนิด neutral และ acidic อย่างชัดเจน ดังเช่นใน Native PAGE จะพบได้จำนวน 6 ไฮโซไซม์ ดังแสดงโดยแถบ C1 และ C2, C3, C4, C5 และ C6 ในขณะที่ SDS-PAGE จะแสดงแบบแผนของไฮโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนสจำนวน 5 แถบ คือ a, b, c, d และ e แต่ลักษณะแบบแผนที่ได้จะแตกต่างกันระหว่างเจลทั้งสองแบบ จำนวนไฮโซไซม์ที่พบได้ลักษณะนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไคตินเนสของข้าวถูกสร้างหรือกำหนดจากยีนที่อยู่เป็นกลุ่มที่เรียกว่า 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 จึงทำให้ผลที่ได้จากแบบแผนเมื่อแยกด้วยอิเล็กโตรพอริซิสที่คล้ายคลึงดังเช่นที่พบในพืชอื่น ๆ 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) และข้าวเจ้า (Zhu and Lamb, 1991) เป็นต้น

ผลที่แสดงปริมาณของไฮโซไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างพืชที่ถูกติดเชื้อกับที่เป็นตัวอย่างปกติและในตัวอย่างที่ติดเชื้อที่เวลาต่างกัน เมื่อวิเคราะห์จากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าว จะเห็นรูปแบบที่คล้ายคลึงกันแต่จะแตกต่างกันในเรื่องเวลาของการเปลี่ยนแปลงระดับดังที่แสดงด้วยแอสติวิตีเจลอิลเล็กโตร

ฟอสฟอรัสของใบ หน่อและราก ใบใบจะมีระดับของไอโซไซม์ C1 และ C2 ซึ่งอยู่บริเวณเหนือเจลมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตั้งแต่ 7 วันหลังจากพ่นเชื้อซึ่งข้าวเริ่มเกิดอาการของโรค ในขณะที่ SDS-PAGE แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างข้าวที่พ่นด้วยสปอร์ราตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป แถบ acidic ไอโซไซม์เหล่านี้จึงจัดเป็นเอนไซม์โคติเนสที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้สร้างและหลั่งออกมาเพื่อทำลายเชื้อโรคที่มารุกรานพืชซึ่งจะเห็นได้ว่าในตัวอย่างข้าวที่พ่นเชื้อแล้ว 15 วัน มีระดับแอนติวิตีต่างจากในตัวอย่างที่ไม่ได้พ่นเชื้ออย่างมากมายหลายเท่า ในเนื้อเยื่อส่วนอื่นของต้นข้าวที่ถูกพ่นเชื้อ ก็จะมีลักษณะแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์โคติเนสที่ใกล้เคียงกัน ดังเช่นที่แสดงในแอนติวิตี เจลอิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพระหว่างใบ หน่อและรากโดยเห็นความแตกต่างของระดับไอโซไซม์ C1, C2, C3 และ C4 ในหน่อของต้นข้าวที่พ่นเชื้อและไม่พ่นเชื้อ ไอโซไซม์ C3 เป็นไอโซไซม์ที่มีลักษณะแถบชัดเจนและมีระดับสูงขึ้นสอดคล้องกับระยะเวลาหลังพ่นเชื้อและเป็นไอโซไซม์เดียวพบได้ในหน่อที่แตกต่างจากส่วนใบและราก ขณะเดียวกันแบบแผนของไอโซไซม์ในรากของตัวอย่างข้าวแสดงจำนวนของไอโซไซม์ถึง 6 ชนิด โดยเฉพาะไอโซไซม์ C4, C5 และ C6 ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่แยกได้ในบริเวณใต้เจลมีระดับสูงขึ้นอย่างชัดเจนในตัวอย่างหลังพ่นสปอร์ราตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป โดยไอโซไซม์เหล่านี้มีระดับเพียงเล็กน้อยในตัวอย่างรากที่ไม่พ่นเชื้อและ C5 เป็นไอโซไซม์เดียวที่พบเด่นชัดในตัวอย่างรากเท่านั้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์โคติเนสในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ จึงมีความจำเพาะในระดับหนึ่ง ถึงแม้ว่าใบจะเป็นส่วนที่สัมผัสกับเชื้อโรคหรือเป็นบริเวณที่ได้รับสัญญาณจากการรุกรานของเชื้อโรคโดยตรง และสัญญาณนี้มีการส่งผ่านไป ในเซลล์โดยวิถีการของ signal transduction เพื่อทำให้พืชมีการตอบสนองในด้านต่าง ๆ รวมทั้งการหลั่งเอนไซม์โคติเนสเพื่อการทำลายเชื้อโรค การตอบสนองเหล่านี้จะเกิดขึ้นไม่เฉพาะแต่ในเซลล์บริเวณที่ถูกรุกราน แต่ยังสามารถกระตุ้นเซลล์ในเนื้อเยื่อส่วนอื่น โดยการเหนี่ยวนำเพื่อการต้านทาน

โรคของพืชเกิดขึ้นในระบบของทั้งต้น (systemic induction) ดังแสดง โดย Ward *et al.* 1991 แต่การตอบสนองโดยเอนไซม์ไคตินเนสจะเกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีนหลายตัวที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และยีนเหล่านี้จะแสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจงในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน ดังนั้นจึงเห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับไอโซไซม์ที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อนั้น ๆ (Felix and Meins, 1986; Keefe *et al.*, 1990; Neale *et al.*, 1990)

การเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ไคตินเนส เมื่อตรวจด้วยแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคตินเนสชนิด acidic (ขนาดโมเลกุล 26 kd) ของมะเขือเทศ พบว่าเอนไซม์ไคตินเนสของข้าวสามารถจับกับ แอนติเซราต่อเอนไซม์ไคตินเนสของมะเขือเทศได้เป็นอย่างดี โดยสังเกตจากความเข้มของแถบโปรตีน WC9 (ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 28.1 kd โดยประมาณ) ที่ชัดเจนในตัวอย่างใบและราก ไอโซไซม์ชนิด acidic ของเอนไซม์ไคตินเนสในข้าวจะถูกหลั่งออกมาหลังจากการเหนี่ยวนำของเชื้อโรค ดังเห็นได้จากในตัวอย่างของวันที่ 7, 10 และ 15 หลังพ่นเชื้อ ซึ่งไอโซไซม์นี้มีอยู่น้อยมากในตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อ แต่ความไวของการเหนี่ยวนำเกิดขึ้นต่างกันระหว่างตัวอย่างใบ หน่อและราก โดยส่วนหน่อและรากของข้าวซึ่งเป็นส่วนที่ได้รับสัญญาณจากการทำลายเซลล์บริเวณใบจะมีการตอบสนองได้ดีกว่าในใบ ซึ่งเห็นได้จากการเปรียบเทียบระดับโปรตีน WC9 ใน Western blot แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองในใบด้านระดับของเอนไซม์ไคตินเนสจะอยู่ได้นานกว่าและคงระดับสูงได้ดังเช่นที่เห็นในตัวอย่างข้าววันที่ 15 หลังพ่นเชื้อแล้ว

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระดับแอกติวิตีของไอโซไซม์ ชนิด acidic C1 และ C2 หรือ c, d และ e ของเอนไซม์ไคตินเนสแสดงโดยแอกติวิตีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพและมีเอสดีเอสตามลำดับ ในใบของข้าวที่มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อ กับการเปลี่ยนแปลงระดับแอกติวิตีของไอโซไซม์ชนิด acidic G3 ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างข้าวหลังพ่นเชื้อ 15 วัน ข้อมูลเหล่านี้จะสนับสนุนเหตุการณ์ของ

การเหนี่ยวนำร่วมกันของเอนไซม์ไคตินเนสและกลูคาเนสเมื่อมีการรุกรานของเชื้อโรคหรือได้รับสาร elicitor รวมทั้งก๊าซเอทิลีน (Vogeli *et al.*, 1988; Mauch and Staehelin, 1989) โดยเอนไซม์ทั้งสองนี้มีการทำงานแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergism) ในการตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อโรค (Mauch *et al.*, 1988b)

ไอโซไซม์ G3 ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งตรวจพบด้วยแอนติบอดีเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพเป็นไอโซไซม์ชนิด acidic ชนิดเดียวที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับที่เด่นชัด ดังแสดงในตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของข้าวที่ติดเชื้อ เช่น ใบ หน่อและรากไม่แตกต่างกันมากนัก ดังเช่นในแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนส (C1-C6) ที่มีลักษณะเป็นไอโซไซม์จำเพาะต่อเนื้อเยื่อนั้น ๆ แต่ความไวของการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ G3 นั้นเห็นได้ชัดเจนและมีระดับแอนติบอดีสูงสุดในหน่อและรากตั้งแต่วันที่ 7-10 หลังพ่นเชื้อ ในขณะที่ในตัวอย่างใบจะมีระดับแอนติบอดีสูงสุดในวันที่ 15 หลังพ่นเชื้อซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์กลูคาเนสโดยวิธี Western blot โดยใช้แอนติเซราต่อเอนไซม์กลูคาเนสชนิด acidic ของมะเขือเทศซึ่งได้มาจากการผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์กลูคาเนสของมะเขือเทศที่มีขนาดโมเลกุล 35 kd สามารถตรวจหรือเกิดปฏิกิริยาร่วม (cross-react) กับเอนไซม์กลูคาเนสในข้าวได้อย่างดี โดยสังเกตจากความเข้มที่ชัดเจนของแถบโปรตีนที่ได้ WG6 เป็นแถบโปรตีนของข้าวที่สามารถจับกับแอนติเซราของเอนไซม์กลูคาเนสซึ่งแสดงโดย SDS-PAGE โดยมีขนาดโมเลกุล 28.8 kd โดยประมาณ พบว่าระดับโปรตีนจะเพิ่มมากขึ้นในทุกตัวอย่างทั้งของใบ หน่อและรากที่พ่นเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับที่ปรากฏอยู่เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อ แต่การเปลี่ยนแปลงของ WG6 ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและรวดเร็วในหน่อและรากจนถึงระดับสูงสุดตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 10 ตามลำดับ ขณะที่ในตัวอย่างใบของข้าวการตอบสนองของเอนไซม์กลูคาเนสก็เห็นได้เป็นสองช่วงคือในระยะแรก WG6 พร้อมกับ WG5 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 หลังพ่นเชื้อและลดลง ต่อ

มากี่มีระดับเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 15 หลังพ้นเชื้อ เหตุการณ์นี้ชี้ให้เห็นว่าในเนื้อเยื่อส่วนใบการตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อในเรื่องของเอนไซม์กลูตาเนสมีรูปแบบลักษณะของการเหนี่ยวนำเกิดขึ้นเป็นสองระยะโดยในระยะแรกเอนไซม์กลูตาเนส จะถูกหลั่งออกมาอย่างย่นยั้งเซลล์ของเชื้อโรคที่มารุกรานบริเวณผิวใบ ผนังเซลล์ของเชื้อโรคที่ถูกย่อยแล้วก็จะทำหน้าที่เป็น elicitor ไปเหนี่ยวนำกลไกการป้องกันของพืชในลำดับต่อมา ซึ่งการตอบสนองจะมีระดับสูงขึ้นและไวขึ้นกว่าครั้งแรกดั่งเช่นที่เห็นการเปลี่ยนแปลงแอนติบอดีและปริมาณเอนไซม์กลูตาเนสในหนองและรากเกิดขึ้นได้รวดเร็ว และชัดเจนกว่าในใบซึ่งเป็นบริเวณที่สัมผัสกับเชื้อโรคโดยตรง จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์กลูตาเนสมีบทบาทในการเกิดสัญญาณซึ่งจะนำไปสู่การเกิด HR โดยการปล่อย elicitor จากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งทำงานโดยเอนไซม์กลูตาเนส (Mauch and Staehelin, 1989; Lamb *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1990)

4.2 เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์กลูตาเนสในข้าวพันธุ์อ่อนแอและต้านทาน

เมื่อเทียบความไวต่อการตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรค ในส่วนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนส c, d และ e เมื่อวิเคราะห์ด้วยเจลแอนติบอดีเล็กโตรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอส ระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีความแตกต่างกันในเรื่องพันธุกรรมด้านการเกิดปฏิกิริยากับเชื้อโรค พบว่าข้าวพันธุ์ กข 7 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ต้านทานโรค ในส่วนใบที่ได้รับการพ้นเชื้อมีระดับแอนติบอดีของไอโซไซม์ c, d และ e เพิ่มขึ้นรวดเร็วและมากกว่าในข้าวพันธุ์ กข 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอและเกิดโรคได้ง่าย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน เริ่มขึ้นตั้งแต่ 2-3 วันหลังพ้นสปอร์ในตัวอย่างของข้าวพันธุ์ กข 7 ในขณะที่ตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1 ค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงระดับและเริ่มเห็นชัดขึ้นในวันที่ 4 หลังพ้นสปอร์ราเมื่อเปรียบเทียบกับระดับที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างที่ไม่พ้นสปอร์รา ข้อสังเกตนี้สอดคล้องกับผลที่แสดงโดยวิธี Western blot ตรงส่วนแบบแผนของโปรตีนจากข้าวที่สามารถทำ

ปฏิกิริยาจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคตินเนสชนิด acidic (ขนาด 26 kd) จากมะเขือเทศ เห็นได้ว่าระดับของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28.1 kd (WC9) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนอย่างรวดเร็วในตัวอย่างข้าวพันธ์ กข 7 เมื่อเทียบกับในตัวอย่างข้าวพันธ์ กข 1 ข้อสังเกตเช่นนี้ยังพบได้ในการเปลี่ยนแปลงระดับแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส G3 ซึ่งพบว่าระดับสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและปริมาณสูงกว่าในข้าวพันธ์ กข 7 เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่พ่นเชื้อของข้าวพันธ์ กข 1 ซึ่งแสดงผลที่สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน WG6 และ WG5 ที่มีขนาดโมเลกุล 28.8 และ 36.5 kd ตามลำดับซึ่งสามารถตรวจพบด้วยแอนติเซราต่อเอนไซม์กลูคาเนสชนิด acidic ของมะเขือเทศในปฏิกิริยาอิมมิโนเบนแน่น Western blot โดยในตัวอย่างข้าวพันธ์ กข 7 ที่มีการติดเชื้อจะมีระดับของโปรตีน WG6 และ WG5 สูงกว่าและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าในตัวอย่างข้าวพันธ์ กข 1 อย่างเห็นได้ชัดเจน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความไวต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อของพืชที่อ่อนแอจะมีน้อยกว่าในพืชที่ต้านทาน ซึ่งเป็นลักษณะที่จะทำให้เกิดโรคขึ้นได้ง่ายกว่าด้วย ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยบ่งชี้ถึงบทบาทของเอนไซม์ไฮโดรเลสในพืช ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคซึ่งตรงกับข้อมูลที่ได้จากการสังเกตของระดับแอกติวิตีของไคตินเนสและกลูคาเนส ในมะเขือเทศที่สูงมากขึ้นหลังจากพ่นเชื้อ *Cladosporium fulvum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบเน่าในมะเขือเทศ ซึ่งมีปริมาณสูงในพันธุ์ที่ต้านทานมากกว่าในพันธุ์ที่อ่อนแอ (Joosten and De Wit, 1988)

4.3 การเหนี่ยวนำระดับ RNA ของเอนไซม์กลูคาเนส

ระดับแอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่เพิ่มมากขึ้นในข้าวหลังการติดเชื้อ ดังที่ได้กล่าวแล้วนั้นเป็นผลมาจากการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ RNA การควบคุมการแสดงออกของยีนจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงระดับของ RNA ของเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่แสดงด้วยสัญญาณของ hy-

bridization กับ ไซโตจีน DNA และกลูตาเนส cDNA probe จากข้าวเจ้าและข้าวบาร์เลย์บนแผ่นเมมเบรน ในตัวอย่างใบจะเห็นว่าหลังการติดเชื้อแล้วระดับการสร้าง RNA ของกลูตาเนสจะถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 ชั่วโมงหลังการพ่นเชื้อและระดับลดลง ต่อมาก็จะมีระดับสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่งซึ่งแสดงถึงการตอบสนองที่เกิดขึ้นภายหลัง ผลที่ได้นี้ก็สอดคล้องและควบคุมกับแบบแผนการเหนี่ยวนำระดับเอนไซม์กลูตาเนส ที่แสดงด้วย Western blot แต่การเหนี่ยวนำระดับโปรตีนจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าในระดับ RNA เป็นอย่างมาก ดังแสดงผลโดย Hedrick *et al.* (1988), Vogeli-Lange *et al.* (1988) และ Jutidamrongphan *et al.* (1991)

ในเนื้อเยื่อต่างกันของข้าว เช่น ในหน่อ การเหนี่ยวนำระดับ RNA transcripts ของกลูตาเนสจะเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่ติดเชื้อระยะเวลาที่ต่างจากในใบคือมีระดับสูงขึ้นใน 24 ชั่วโมงหลังพ่นเชื้อและลดต่ำลงซึ่งการตอบสนองของพืชที่ควบคุมระดับยีน ในส่วนของหน่อต้นข้าวจะเกิดขึ้นเป็นเพียงช่วงเดียวและผลที่ได้ก็ยังพบได้ในระดับของเอนไซม์ด้วย ขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาระดับ RNA transcripts ของเอนไซม์ไซโตจีนในหน่อจะมีปริมาณสูงขึ้นหลังจากพ่นสปอร์แล้ว 48 ชั่วโมง ซึ่งดูเหมือนกับว่าจะตอบสนองได้ช้ากว่ายีนของเอนไซม์กลูตาเนส แต่เนื่องจากผลที่ได้ไม่ชัดเจนนักจึงไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลยืนยันความแตกต่างของการตอบสนองของเอนไซม์ทั้งสองนี้ในพืชต่อการรุกรานของเชื้อ

5. สรุป

การตอบสนองเพื่อการป้องกันโรคของข้าว ต่อการรุกรานของเชื้อราที่เกิดขึ้นหลังพ่นสปอร์ราโรคใบวง (*Rhynchosporium oryzae*) โดยศึกษาส่วนของการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และการควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ทั้งสองในระดับโปรตีน และ RNA พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในตัวอย่างข้าวที่ติดเชื้อจะมีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยสรุปได้ดังนี้

1. การวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสโดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ แสดงแบบแผนของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนสในใบและหน่อพบว่า มี 5 ไอโซไซม์ คือ C1, C2, C3, C4 และ C6 ส่วนในรากมี 6 ไอโซไซม์ โดยมี C5 เพิ่มขึ้นจากที่พบในใบและหน่อ

2. แบบแผนของไอโซไซม์ที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาของการติดเชื้อในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าวจะแตกต่างกัน โดยในใบซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับเชื้อโรคโดยตรงพบว่ามีไอโซไซม์ C1 และ C2 เพิ่มขึ้นสูงสุดในขณะที่ไอโซไซม์ C3, C4 และ C4, C5 และ C6 เพิ่มขึ้นในหน่อและในรากตามลำดับ ซึ่งหน่อและรากเป็นส่วนที่ได้รับการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อที่ใบ

3. แอกติวิตีของไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคตินเนส ที่เพิ่มขึ้นอย่างเฉพาะเจาะจงในใบ หน่อ และรากก็คือ กลุ่ม C1 และ C2 กลุ่ม C3 และ C5 ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสโดยวิธีเจลอิเล็กโตรฟอริซิสแบบมีเอสดีเอสจะพบว่ามีแบบแผนของไอโซไซม์ชนิดเป็นกลางและ acidic ที่คล้ายคลึงกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเจลแบบไม่แปลงสภาพ โดยแสดงไอโซไซม์ 5 ชนิดคือ a, b, c, d และ e เช่นเดียวกันในตัวอย่างใบข้าวที่ติดเชื้อจะมีไอโซไซม์ c, d และ e สูงขึ้นอย่างชัดเจนและ

มากที่สุดในวันที่ 15 หลังการพ่นเชื้อซึ่งเกิดขึ้นในส่วนของหน่อและรากด้วย ไอโซไซม์ b จะพบได้ชัดเจนในหน่อและปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่าในใบและราก

5. ลักษณะของการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไคตินเนส ในระดับไอโซไซม์ที่เฉพาะในเนื้อเยื่อนั้น ๆ ของพืช และความไวของการเหนี่ยวนำ โดยวิธีแอสติวิตีเจลิอิเล็กโตรฟอริซิสสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ด้วย Western blot ของเอนไซม์ไคตินเนสในตัวอย่างข้าวที่แสดงแถบโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์ไคตินเนสของมะเขือเทศได้ตรงแถบ WC9 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.1 kd เป็นแถบที่มีความเข้มสูงสุด ในส่วนใบหลังการติดเชื้อ 15 วัน และในส่วนรากกับหน่อจะเกิดขึ้นในระยะที่เร็วกว่าคือ 7 วัน

6. ขณะที่พบว่าระดับของเอนไซม์ไคตินเนส ถูกเหนี่ยวนำให้สูงขึ้นในข้าวที่ติดเชื้อ ก็พบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับแอสติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีเจลิอิเล็กโตรฟอริซิส แบบไม่แปลงสภาพโดยไอโซไซม์ชนิด acidic มีระดับสูงขึ้นในใบของข้าวตัวอย่างมี 3 ไอโซไซม์คือ G1, G2 และ G3 ไอโซไซม์ G3 จะแสดงระดับแอสติวิตีสูงสุดในตัวอย่างส่วนใบ หน่อและรากที่ติดเชื้อ เช่นเดียวกันในขณะที่มีระดับ G3 เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างที่ไม่พ่นเชื้อ

7. ความไวของการเพิ่มแอสติวิตีของเอนไซม์กลูคาเนส ในการตอบสนองของข้าวต่อการรุกรานของเชื้อราตรงส่วนใบ จะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าและอยู่นานกว่าในส่วนหน่อและราก ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วย Western blot ตรงแถบโปรตีนที่เป็นไอโซไซม์ของเอนไซม์กลูคาเนสที่สามารถจับกับแอนติเซราต่อเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ของมะเขือเทศคือ WG6 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 28.8 kd โดยในใบมีการตอบสนองเป็นสองช่วงและมีปริมาณสูงสุดใน 15 วันหลังพ่นเชื้อ แต่ในส่วนของหน่อและรากพบว่าแถบ WG6 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 และเพิ่มมากที่สุดในวันที่ 7 และลดลงตามลำดับ นอกจากนี้ในส่วนของไอโซไซม์ของเอนไซม์กลูคาเนสที่แสดงโดย Western blot ตรงแถบ WG5 ซึ่งมีขนาด

โมเลกุล 36.5 kd โดยประมาณ เป็นไอโซไซม์ที่เฉพาะและเด่นชัดในใบที่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำของเชื้อรา

8. เมื่อเปรียบเทียบบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองนี้ต่อการต้านทานโรคในตัวอย่างข้าวพันธุ์ที่เกิดโรคได้ง่ายและพันธุ์ที่ต้านทานพบว่าความไวและระดับของเอนไซม์ทั้งสองในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 7 มีการเหนี่ยวนำการแสดงผลของยีนได้ดีกว่าในตัวอย่างข้าวพันธุ์ กข 1

9. นอกจากการแสดงผลของยีนเอนไซม์โคติเนส และเอนไซม์กลูคาเนสต่อการรุกรานของเชื้อราในระดับโปรตีนแล้ว ยังพบว่าการควบคุมการแสดงผลในระดับยีนก็เกิดขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA transcripts ที่สามารถจับกับ cDNA ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากข้าวบาร์เลย์ ในส่วนใบจะเห็นระดับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมงหลังการพ่นเชื้อ ในขณะที่ส่วนของหน่อจะพบการเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA ของเอนไซม์โคติเนสและเอนไซม์กลูคาเนสโดยมีระดับสูงสุดใน 48 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2533. โรคพืชวิทยาขั้นสูง. โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 7-8.
- 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 tabac par *Pseudomonas syringae* de nouvelles proteines (protein "b") associees au developement d'une resistance non specifique a une deuxieme infection. Phyto pathol. 102 : 201
- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S. and Van Loon, L.C. 1980. Comparision of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol. 47 : 79-87.
- 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 localization 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.

Brogliè, K.E., Gaynor, J.J. and Brogliè, 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 spindle tuber viroid (PSTV)-infected tomato leaves. Arch. Virol. 81 : 263-268.

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.

Culver, J.N. and Dawson, W.O. 1991. Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana glauca* plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 4 : 458-463.

- Darvil, A.G. and Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection 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 plumbaginifolia*. *Gene* 70 : 13-23.
- De Wit, P.J.G.M., Marmeisse, R., Van De Nackerveken, 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 Interact.* 6 : 412-417.
- Dixon, R.A. 1986. The phytoalexin response: elicitation, signaling and control of host gene expression. *Biol. Rev.* 61 : 239-291.
- Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissue to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestana* and of the hyphal wall components. *Physiol.*

Plant Pathol. 23 : 345-357.

Dufrenoy, J. 1936. Cellular immunity. Can. J. Bot. 23 :
70-79.

Ebel, J. 1986. Phytoalexin synthesis: The biochemical
analysis of the induction process. Ann. Rev.
Phytopathol. 24 : 235-264.

Ellingboe, A.H. 1982. Host resistance and host-
parasite interactions : A perspective In :
Phytopathogenic Prokaryotes II. M.S. Mount and
G.H. Lacy (eds.). Academic Press, New York,
pp. 103-117.

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 Thomsen, 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 clone encoding an endochitinase
from *Solanum tuberosum*. 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 Xanthi* nc. 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 Mifflin, 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.
- Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schroder, G. and Stocker, R. 1990. Expression of a stibene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrlo. Plant Mol. Biol. 15 : 325-335.
- Hamer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G. and Valent, B. 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. Science 239 : 288-290.
- Heath, M.C. 1981a. A generalized concept of host-parasite specificity. Phytopathology 71 : 1121-1123.

- Heath, M.C. 1985. Implications of non-host resistance for understanding host-parasite interactions. In *Genetic basis of biochemical mechanisms of plant disease*. Symposium book (eds. J.V. Groth and W.R. Bushnell) American Phytopathological Society, St. Paul. 4 : 25-42.
- 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. Biol.* 9 : 411-420.
- Jacobsen, S., Mikkelsen, J.D. and Hejgaard, J. 1990. Characterization of two antifungal endochitinases from barley grain. *Physiol. Plant* 79 : 554-562.
- Jamet, E. and Fritig, B. 1986. Purification and characterization of 8 of the pathogenesis-related 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-glucanase 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.Biol.* 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.

Keefe, 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.

Keen, N.T. 1981. Evaluation of the role of phytoalexins In :Plant disease control. Resistance and susceptibility. R.C. Staples and G.H. Toenniessen(eds.) Wiley-Interscience, New York, pp. 155-177.

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-glucanase 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 nucleotide sequence of cDNA clones encoding potato chitinase genes. Plant Mol. Biol. 13 : 249-250.

Legrand, M. 1983. Phenylpropanoid metabolism and its regulation in disease, in Biochemical Plant Pathology, Callow, J., Ed., Wiley, New York, 367

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 *Coix lachryma-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. Acad. Sci. U.S.A. 87 : 8756-8760.
- Linthorst, H.J.M., Van Loon, L.C., Van Rossum, C.M.A., Mayer, A. and Bol, J.F., 1990. Analysis of acidic and basic chitinases and their expression in transgenic tobacco. Mol. Plant-Microbe Interact. 3 : 252-258.
- Linthorst, H.J.M., Van Loon, L.C., Van Rossum, C.M.A., Mayer, A., Bol, J.F., Van 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 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Mauch, F., Mauch-Manie, B. and Boller, T. 1988b. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations 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 genes 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.
- Muller, K.O. and Behr, L. 1949. Mechanism of *Phytophthora* resistance of potatoes. *Nature* 163 : 498-499.

- Muller, K.O. and Borger, H. 1941. Experimentelle Untersuchungen uber die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel. Arb. Biol. Reichsanst. Land-Forstw. 23 : 189-231.
- 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.
- Ouchi, S., Hibino, C., Oku, h., Fujiwara, M. and Nakabayashi, H. 1979. The induction of resistance or susceptibility. In: Recognition and specificity in plant host-parasite interactions. J. M. Daly and Uritani(eds.) Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 49-65.
- Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S. and Fluhr, R. 1990. A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a 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 poplar trees. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 : 7895-7899.
- 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.
- Scheffer, R.P. 1991. Role of toxins in evolution and

ecology of plant pathogenic fungi. *Experientia* 47: 804-810.

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 pathogenesis-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., Neuhaus, J.M., Ryals, J. and Meins, F., Jr. 1990. Structure of a tobacco endochitinase gene : evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol. Biol.* 14 : 357-368.

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 -glucan 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.
- Tegtmeier, K.J. and Van Etten, H.D. 1982. The role of pisatin tolerance and degradation in the virulence of *Nectria haematococca* on peas: A genetic analysis. Phytopathology 72 : 608-612.
- 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 chitinase 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 reacting 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. and Gerritsen, Y.A.M., 1989. Localization of pathogenesis-related protein in infected and non-infected leaves of Samsun NN tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Plant Sci. 63 : 131-140.
- 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.
- Vogeli-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.
- Yoshikawa, M., Yamauchi, K. and Masago, H. 1978. Glyceollin : its role in restricting fungal growth in resistant soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var. *sajae*. *Physiol. Plant Pathol.* 12 : 73-82.
- Zhu, Q. and Lamb, C.J. 1991. Isolation and characterization of arice gene encoding a basic chitinase. *Mol. Gen. Genet.* 226 : 289-296.

ภาคผนวก

สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

สารละลาย alkaline copper ประกอบด้วย

100 ml 2% Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH

1 ml 1% sodium potassium tartrate

1 ml 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส การเคลื่อนที่ของโปรตีนขึ้นอยู่กับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนนั้น ๆ ดังนั้นจึงสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง โดยการหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_r) ของโปรตีนตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor, α -lactalbumin ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 94, 67, 43, 30, 20.1 และ 14.4 kd ตามลำดับ จากนั้นนำมาเขียนกราฟระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานจึงสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างได้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางที่เคลื่อนที่ของโบรโมฟินอลบลู}}$$

การทำบริสุทธิ์ 100% Triton X-100:

เติม mixed-bed anion resin 5 g ลงใน 50 ml 100% Triton X-100 จากนั้นนำมาคนตลอดเวลา นาน 30 นาที นำมากรองด้วยกระดาษกรอง

สารละลายสำหรับการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจล

โพลีอะครีลาไมด์ เจล แบบไม่แปลงสภาพ สำหรับหาแอกติวิตีของเอนไซม์

เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนส

ส่วนประกอบ (ml)	stacking gel (5%)	resolving gel (15%)
H ₂ O	2.13	1.15
29% acrylamide, 1% N,N'- methylene bis-acrylamide	0.5	2.5
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	-	1.3
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.38	-
10% ammonium persulphate	0.03	0.05
TEMED	0.003	0.002
total volume	3	5

โพลีอะครีลาไมด์ เจล แบบไม่แปลงสภาพที่ใช้เป็น overlaid gel
สำหรับแอกติวิตีของ เอนไซม์ไคตินเนส

ส่วนประกอบ (ml)	gel (7%)
H ₂ O	2.45
29% acrylamide, 1% N,N' - methylene bis-acrylamide	1.15
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.3
10% ammonium persulphate	0.05
1% glycol chitin	0.05
TEMED	0.003
total volume	5

โพลีอะคริลาไมด์ เจล แบบมีเอสดีเอส สำหรับหาแอกติวิตีของเอนไซม์
ไคติเนส

ส่วนประกอบ (ml)	stacking gel (5%)	resolving gel (15%)
H ₂ O	2.1	1.05
29% acrylamide, 1% N,N'- methylene bis-acrylamide	0.5	2.5
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	-	1.3
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.38	-
10% SDS	0.3	0.05
10% ammonium persulphate	0.3	0.05
1% glycol chitin	-	0.05
TEMED	0.003	0.002
total volume	3	5

พอลิอะคริลาไมด์ เจลสำหรับ SDS-PAGE วิเคราะห์แบบแผนของโปรตีน
และ Western blot

ส่วนประกอบ (ml)	stacking gel (5%)	resolving gel (15%)
H ₂ O	2.1	1.1
29% acrylamide, 1% N,N'- methylene bis-acrylamide	0.5	2.5
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	-	1.3
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.38	-
10% SDS	0.3	0.05
10% ammonium persulphate	0.3	0.05
TEMED	0.003	0.002
total volume	3	5

โพลีอะคริลาไมด์ เจลสำหรับ SDS-PAGE วิเคราะห์ Western blot
ของเอนไซม์ไคตินเนสจากใบ

ส่วนประกอบ (ml)	stacking gel (5%)	resolving gel (12%)
H ₂ O	2.1	1.05
29% acrylamide, 1% N,N'- methylene bis-acrylamide	0.5	2.0
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	-	1.3
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.38	-
10% SDS	0.3	0.05
10% ammonium persulphate	0.3	0.05
TEMED	0.003	0.002
total volume	3	5

electrophoresis buffer สำหรับ Native PAGE ประกอบด้วย

25 mM Tris-HCl (pH 8.3)

250 mM glycine

sample buffer สำหรับ Native PAGE ประกอบด้วย

15% sucrose

0.01% bromophenol blue

ละลายใน 125 mM Tris-HCl (pH 6.7)

electrophoresis buffer สำหรับ SDS-PAGE ประกอบด้วย

25 mM Tris-HCl pH 8.3

250 mM glycine

0.1% SDS

sample buffer สำหรับ SDS-PAGE ประกอบด้วย

15% sucrose

2.5% SDS

125 mM Tris-HCl (pH 6.8)

2% β -mercaptoethanol

0.01% bromophenol blue

สารละลาย staining ประกอบด้วย

2.5 g Coomassie brilliant blue R 250

45 ml methanol

45 ml H₂O

10 ml acetic acid

นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง

สารละลาย destaining ประกอบด้วย

30% methanol

10% acetic acid

การเตรียมสารละลาย glycol chitin

นำ glycol chitosan 5 g บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยาแล้วมาละลายใน 10% acetic acid 100 ml จะได้สารละลายที่มีความหนืดตั้งทิ้งไว้ค้างคืน ที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นนำมาเติม methanol 450 ml แล้วนำมากรองแบบสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้มาใส่ในบีกเกอร์แล้วเติม acetic anhydride 7.5 ml ขณะเติมทำการคนตลอดเวลา ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที จะแข็งตัวเป็นเจล ตัดเจลที่ได้ให้มีขนาดเล็ก ๆ นำมาเติม methanol ให้ท่วม ทำการบดด้วยเครื่องปั่นละเอียดความเร็วสูง นาน 4 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ 27,000 rpm นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนที่เป็นเจล เติม methanol ในปริมาตร 1 เท่า บดด้วยเครื่องปั่นละเอียดความเร็วสูงและเซนตริฟิวจ์ 27,000 rpm นาน 15 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 500 ml มี 0.02% sodium azide จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียดความเร็วสูง นาน 4 นาที ก็จะได้สารละลาย 1% glycol chitin

สารละลายสำหรับถ่ายโปรตีน

transfer buffer ประกอบด้วย

25 mM Tris-HCl (pH 8.3)

192 mM glycine

20% methanol

สารละลายสำหรับวิเคราะห์ Western blot

สารละลาย TBST ประกอบด้วย

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

0.05% Tween 20

สารละลาย blocking ประกอบด้วย

1% BSA ใน TBST solution

AP buffer ประกอบด้วย

100 mM Tris-HCl (pH 9.5)

100 mM NaCl

5 mM $MgCl_2$

AP color development ประกอบด้วย

10 ml AP buffer

66 μ l NBT (nitroblue tetrazolium)

33 μ l BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)

สารละลายสำหรับเตรียมพลาสมิด

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย TB: (ต่อ 1 liter)

1. tryptone 12 g 2. 0.17 M KH_2PO_4

yeast extract 24 g 0.72 M K_2HPO_4

glycerol 4 ml ในน้ำกลั่น 100 ml

ในน้ำกลั่น 900 ml

แยก autoclave 1 และ 2 และนำมารวมกันก่อนลงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB: (ต่อ 1 liter)

10 g bacto-tryptone

5 g bacto-yeast extract

10 g NaCl

ปรับให้มี pH 7.5 ด้วย NaCl

สารละลาย A ประกอบด้วย

25 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM EDTA

15% sucrose

2 mg/ml lysozyme

ละลาย ผสมทันทีก่อนใช้ทดลอง

สารละลาย B ประกอบด้วย

0.2 N NaOH และ 1% SDS

TE buffer ประกอบด้วย

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

สารละลาย STET ประกอบด้วย

8% sucrose

5% Triton X-100

50 mM EDTA

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

TBE buffer ประกอบด้วย

0.089 M Tris borate

0.089 M boric acid

0.002 M EDTA

1mg/ml RNase A ประกอบด้วย

RNase A 1 mg ละลายใน 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

15 mM NaCl ปริมาตร 1 ml นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน

15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

สารละลายสำหรับเตรียม RNA และไฮบริไดเซชัน

สารละลาย D ประกอบด้วย

4 M guanidine thiocyanate

25 M sodium citrate

0.5% sodium sarcosyl sulphate

0.1 M β -mercaptoethanol

20xSSC ประกอบด้วย

3 M NaCl

0.3 M sodium citrate dihydrate

ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 4.0 N

NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย blocking สำหรับไฮบริไดเซชันของ RNA ประกอบด้วย

BSA 3 g ละลายใน TBS-Tween 20 100 ml ปรับ

pH 7.5 ด้วย 4 M HCl และกรองผ่าน nitrocellulose

filter ขนาด 0.45 μ

สารละลาย hybridization ประกอบด้วย

1% BSA

1 mM EDTA

0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2)

7% SDS

TBS-Tween 20 ประกอบด้วย

100 mM Tris base

150 mM NaCl

0.05% TBS-Tween 20

ปรับ pH ของสารละลายเป็น 7.5 ด้วย 4 M HCl และกรอง

ผ่าน nitrocellulose filter ขนาด 0.2 μ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวสิริเพ็ญภา สิงตะบุตร

วัน เดือน ปี เกิด 1 กรกฎาคม 2511

วุฒิการศึกษา

วุฒิ

ชื่อสถาบัน

ปีที่สำเร็จการศึกษา

วท.บ.

ม. สงขลานครินทร์

2532