



รายงานการวิจัย

การแสดงออกของยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อเชื้อรา
ที่ก่อโรคไหม้ในข้าวไทย

(Expression of blast fungus resistance genes in Thai rice)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รจนา โอภาสศิริ

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548-2549 ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ และใคร่ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ ในห้องปฏิบัติการชีวเคมีที่จำเป็นในการทำวิจัย จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

โรคไหม้ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* ได้ทำความเสียหายต่อผลผลิตข้าวในประเทศไทยเป็นอย่างมาก การเข้าใจถึงระบบต้านทานต่อราโรคไหม้ในข้าวจะเป็นพื้นฐานสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อเชื้อ งานวิจัยนี้ได้นำวิธี semiquantitative RT-PCR มาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานในระบบป้องกันเซลล์ในช่วงระยะเริ่มแรกที่ข้าวได้รับเชื้อราโรคไหม้ในข้าวหอมนิลซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อราโรคไหม้ จากการเปรียบเทียบระดับ cDNA ของยีน pathogenesis-related proteins (PR) 13 ยีน และยีนในระบบป้องกันเซลล์พืช 2 ยีน พบว่าข้าวทั้งสองพันธุ์มีการแสดงออกของยีนบางชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเชื้อ ยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้นในข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อ ได้แก่ PR1a, PR1, PR4, PR6, PR9, PR10a, PR10, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGP) และ exoglucanase/ β -glucosidase ไอโซไซม์ 445 (BG445) ส่วนยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้นในข้าวหอมนิลที่ได้รับเชื้อมี ได้แก่ PR4, PR6, PR9, PHGP และ BG445 ยีนส่วนใหญ่มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 12 และ 24 ชม. การแสดงออกของยีนในข้าวหอมนิลเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ ที่เวลา 12 หรือ 24 ชม. อาจเป็นเพราะข้าวหอมนิลมีการสร้างระบบต้านทานต่อราโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพจึงไม่มีสัญญาณส่งมาจากตัวกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ระดับการแสดงออกของยีนลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ข้าวขาวดอกมะลิมีการแสดงออกของยีนครอบคลุมช่วงเวลายาวนานกว่าถึง 12-72 ชม. อาจเนื่องมาจากมีการกระจายตัวของเชื้อได้อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามรูปแบบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ที่พบทั้งในข้าวต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงชี้ให้เห็นว่าแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนในกลุ่มนี้เป็นเพียงการเข้าไปมีส่วนร่วมในการสร้างความต้านทานระดับพื้นฐานในข้าวในการตอบสนองต่อเชื้อแบบไม่จำเพาะเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อ

จากการที่ BG445 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเฉพาะในข้าวหอมนิลและข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อราโรคไหม้ ผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาหน้าที่ของยีนนี้ในข้าว BG445 ซึ่งผลิตได้ในรูปของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย และแยกออกมาให้บริสุทธิ์ไม่สามารถย่อยส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราโรคไหม้ ดังนั้นการแสดงออก BG445 ที่เพิ่มสูงขึ้นในข้าวจึงน่าจะไม่ใช่เกี่ยวข้องกับย่อยผนังเซลล์เชื้อราโดยตรง เมื่อนำเอนไซม์ย่อยน้ำตาลที่พบที่ผนังเซลล์ของข้าวพบว่าเอนไซม์สามารถย่อยกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีพันธะ β -(1,4) และไดแซคคาไรด์ที่มีกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β -(1,3) ได้ดีมาก และเอนไซม์ยังย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase ได้ ดังนั้น BG445 อาจมีบทบาทในกระบวนการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์ตรงบริเวณที่ถูกทำลาย โดยทำงานร่วมกับ endoglucanase ซึ่งการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์พืชเป็นหนึ่งในวิธีกลไกป้องกันเซลล์พืช

Abstract

Rice blast disease, caused by the fungus *Magnaporthe grisea*, is a major constraint in rice production in Thailand. Understanding of the molecular response mechanisms against rice blast will aid the basis for development of rice cultivars with durable resistance. In this study, we used semiquantitative RT-PCR to determine the gene expression profiling at the early infection stages in Jaw Hom Nin, a resistant rice variety, and Khao Dawk Mali 105 (KDML 105), a susceptible rice variety, in response to blast fungus. The comparison between the cDNAs levels of 13 pathogenesis-related genes (PR) and 2 defense-related genes revealed that the expression levels of some of these genes were induced in both resistant and susceptible rice varieties after inoculation with blast fungus. The genes which are induced in KDML 105 rice in response to rice blast included PR1a, PR1, PR4, PR6, PR9, PR10a, PR10, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGP) and exoglucanase/ β -glucosidase isozyme 445 (BG445). Only a few genes were upregulated expressed in response to the fungus in Jaw Hom Nin which included PR4, PR6, PR9, PHGP and BG445. In general, the transcripts of these genes reached maximum accumulation levels at 12 or 24 h after blast inoculation. The maximum accumulation of the gene transcripts in Jaw Hom Nin occurred at a single time points either at 12 or 24 h. This early decline in accumulation of transcript levels in response to blast fungus is likely to be due to the fact that there was no continuous signal-delivery from the stimuli because of efficient defense system in resistant rice. On the other hand, the induction of the gene transcripts in KDML 105 covered a wider time range in between 12-72 h. This might imply that there is a continuous retaliation by the host against the pathogen, the spread of which leads to high level of these transcripts. It is worth noting that most of the genes did show some significant difference in the resistant and susceptible reactions. This suggests that accumulation of these genes in both rice varieties is not a prerequisite for the induction of resistance but that genes have a role of a non-specific nature, providing a background level resistance which contribute to the protective state.

Since the expression of BG445 gene was induced significantly in Jaw Hom Nin and KDML 105 in response to blast fungus, this leads to the functional study of this gene in rice. A recombinant BG445 expressed and purified from bacteria could not hydrolyze the blast fungal cell wall components. Therefore, the accumulation of BG445 transcripts in rice might not have a direct role in fungal cell wall degradation. Interestingly, recombinant BG445 protein exhibited a marked

preference for β -(1,4)-linked oligosaccharides and β -(1,3)-linked disaccharide which are the component of cell wall. In addition, the enzyme could hydrolyze oligosaccharides produced from the hydrolysis of rice cell walls with a recombinant rice endo-1,3;1,4- β -glucanase. These results might imply a role for BG445 in regeneration of damaged cell walls by hydrolyzing the products released by endoglucanases, thereby promoting reconstruction of the cell wall which is a one mechanism in defense response in plants.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ณ
บทที่ 1 บทนำ	
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	9
3. ขอบเขตของการวิจัย	9
4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	9
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
1. การศึกษาความแตกต่างระหว่างการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PR gene และ defense- related genes ในข้าวต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้	
1.1 วัสดุและอุปกรณ์	10
1.2 วิธีการทดลอง	
1.2.1 การเพาะเชื้อรา	10
1.2.2 การปลูกและเก็บตัวอย่างข้าว	10
1.2.3 การสกัด RNA	11
1.2.4 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse-transcription	11
1.2.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Semiquantitative RT-PCR	12
2. การศึกษาหน้าที่ของ β -exoglucanase/ β -glucosidase ต่อการตอบสนองต่อเชื้อโรคไหม้	
2.1 การตัดต่อ cDNA ของ BG445 เข้าสู่ expression vector	14
2.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก cDNA ของ BG445 ใน <i>E. coli</i>	15
2.3 การทดสอบการย่อยสลายของเอนไซม์ BG445	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ผลทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
1. การแสดงออกของยีนในกลุ่ม pathogenesis-related genes และ defense-related genes ในข้าวต้านทานและอ่อนแอต่อ โรคไหม้	19
2. การศึกษาหน้าที่ของ Exoglucanase/ β -glucosidase ต่อการตอบสนองต่อ เชื้อราโรคไหม้	
2.1 การผลิตโปรตีนจาก cDNA ของ BG445	32
2.2 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ BG445	33
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ประวัติผู้วิจัย	51

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกกลุ่มของ Pathogenesis related protein	4
2	Primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PR gene และ defense-related genes ที่ใช้ในการทำ PCR	13
3	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม pathogenesis-related proteins และ defense related genes ในข้าวขาวดอกมะลิและข้าวหอมมะลิ	28
4	ความจำเพาะในการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์และ โพลีแซคคาไรด์ของเอนไซม์ BG445	34

สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
1	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PR1a กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 20
2	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PR1 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 21
3	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PR4 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 22
4	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PR6 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 23
5	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PR9 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 23
6	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PR10a กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 24
7	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PR10 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 25
8	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน PHGP กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 26
9	แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่าง ยีน BG445 ไอโซไซม์ 445 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR 27
10	SDS-PAGE ของ BG445 ที่ต่ออยู่กับ โปรตีนไทโอรีดอกซินที่ผลิตขึ้นใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ OrigamiB (DE3) 32
11	กิจกรรมของเอนไซม์ BG445 ในการย่อย pNP- β -D-glucoside ความเข้มข้น 0.2 mM ในบัฟเฟอร์ที่มี pH 3.5-10.5 33
12	กิจกรรมของเอนไซม์ BG445 ในการย่อย pNP- β -D-glucoside ความเข้มข้น 0.2 mM ใน sodium acetate pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 5-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 33
13	การวิเคราะห์การย่อยไคแซคคาไรด์และ โอลิโกแซคคาไรด์ด้วย BG445 35
14	การวิเคราะห์การย่อยผลผลิตที่ได้จากผนังเซลล์ข้าวจากเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase และเอนไซม์ BG445 ด้วย TLC 36

คำอธิบายสัญลักษณ์

ชม.	ชั่วโมง
A ₂₆₀	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร
BG445	Exoglucanase/ β -glucosidase ไอโซไซม์ 445
cDNA	Complementary DNA
dNTP	Deoxyribonucleotides
h	Hour
kDA	Kilo Dalton
KDML 105	Khao Dawk Mali 105
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropyl thio- β -D-galactoside
μ g	Micogram
μ L	Microliter
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
M	Molar
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Picogram
PHGP	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
pmol	Picomole
<i>p</i> NP- β -D-glucoside	<i>p</i> -nitrophenyl β -D-glucopyranoside
PR	Pathogenesis-related protein
RI	Relative intensity
RT-PCR	Reverse transcription-Polymerase chain reaction
RT	Reverse transcription
SDS-PAGE	Sodium dedocyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TLC	Thin layer chromatography

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งการบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปในตลาดโลก การระบาดของโรคและแมลงศัตรูข้าว เช่น โรคไหม้ โรคใบหงิก โรคขอบใบแห้งและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในพื้นที่ปลูกข้าวยังเป็นปัญหาสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต โรคไหม้เป็นปัญหาสำคัญของการปลูกข้าว พบการระบาดในพื้นที่ปลูกข้าวทั่วทุกภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และได้ทำความเสียหายต่อผลผลิตของข้าวเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้อีก (อภิชาติ วรรณวิจิตร และคณะ, 2544) โรคไหม้มีสาเหตุจากเชื้อ *Magnaporthe grisea* หรือในอีกชื่อหนึ่ง *Pyricularia grisea* Cav. พบการระบาดตั้งแต่ในระยะต้นกล้าจนกระทั่งข้าวออกรวง อาการที่เกิดขึ้นกับต้นกล้าคือ ใบมีแผลจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่ตรงกลางแผล กระจายลุกลามไปทั่วบริเวณใบ ถ้าโรครุนแรงกล้าข้าวจะแห้งตาย ถ้าเชื้อราเข้าทำลายข้าวที่เพิ่งเริ่มให้รวงจะทำให้เมล็ดลีบ เมื่อรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยวจะปรากฏรอยข้าวสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวง ทำให้ประาะหักง่ายจนทำให้รวงข้าวร่วงหล่นซึ่งสร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าว (สมศักดิ์ ทองดีแท้, 2541) ปัจจุบันวิธีการหลักที่ใช้เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากโรคไหม้ มี 2 วิธี ได้แก่ การพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทาน และการใช้ยากำจัดศัตรูพืช (Kuyek, 2000) สำหรับในประเทศไทยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ผ่านมาประสบปัญหาเป็นอย่างมากเนื่องจากความหลากหลายของเชื้อสาเหตุของโรค แต่การศึกษายีนควบคุมความต้านทานโรคไหม้ที่มีผลครอบคลุมชนิดของเชื้ออย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) รวมทั้งยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคไหม้นั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจัง (อภิชาติ วรรณวิจิตรและคณะ, 2544)

การที่ข้าวพันธุ์ต้านทานและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชไม่สามารถแก้ไขปัญหาความเสียหายที่เกิดจากโรคไหม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีสาเหตุเนื่องมาจากความเปลี่ยนแปลงของสภาพพื้นที่และความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม รวมทั้งการเกิดวิวัฒนาการของ *M. grisea* ให้มีความต้านทานต่อพืชพันธุ์ต้านทานและยากำจัดศัตรูพืช เชื้อได้พัฒนาความสามารถในการทำลายข้าวมากขึ้น โดยทั่วไปข้าวพันธุ์ต้านทานจะสามารถปลูกในพื้นที่ได้ประมาณ 5-8 ปี จากนั้นเชื้อจะมีวิวัฒนาการจนทำให้ข้าวที่พัฒนาสายพันธุ์ให้ต้านทานต่อเชื่อนั้นๆ ไม่สามารถต้านทานต่อโรคได้ (สงกรานต์ จินตราภรณ์ และบริบูรณ์ สมฤทธิ์, 2544) ดังนั้นการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์ข้าวจึงต้องดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันงานวิจัยในต่างประเทศพยายามที่จะใช้พันธุวิศวกรรมมาแก้ปัญหาเหล่านี้ โดยการแยกยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมความต้านทานต่อ *M. grisea* จากข้าวพันธุ์ต้านทาน เพื่อนำไปสร้างพืชแปลงพันธุ์ให้มีความต้านทาน แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถแก้ปัญหาอย่างยั่งยืน เนื่องจากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายใน

การทำลายข้าวซึ่งเป็นผลมาจากการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมภายในเชื้อให้สามารถต้านทานกับพืชแปลงพันธุ์ (Kuyek, 2000)

กลไกต้านทานนั้น ไม่ได้เกิดจากการทำงานของยีนเพียงยีนใดยีนหนึ่ง หากแต่อาศัยการทำงานร่วมกันของยีนและองค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ที่ซับซ้อน แม้แต่พืชในสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างที่สายพันธุ์ก็มักมีกลไกการทำงานในระดับยีนแตกต่างกัน (Fritig et al., 1998) ดังนั้นงานวิจัยส่วนหนึ่งได้มุ่งเน้นศึกษาถึงการทำงานร่วมกันของยีนต่างๆ โดยเฉพาะยีนด้านทานที่เข้าร่วมในระบบต้านทานต่อโรคใหม่ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะนำมาใช้ในการพัฒนาปรับปรุงข้าวสายพันธุ์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตให้มีความต้านทานต่อโรค

1.1 โปรตีนต้านทาน

โปรตีนต้านทาน (R protein) ทำหน้าที่พื้นฐาน 2 อย่าง คือ จัดจำ avirulent gene (*avr*) ของเชื้อและกระตุ้นการส่งสัญญาณไปยังส่วนต่างๆ ในเซลล์เพื่อให้ระบบป้องกันเซลล์ทำงาน (Hammond-Kosack and Jones, 2000) ปัจจุบันมีการศึกษายีนด้านทานที่แยกออกมาจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ ได้มีการค้นหา R gene ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อโรคใหม่ด้วยวิธีการหลัก 2 วิธี ได้แก่ 1) หาคำแหน่งของ R gene บน chromosome โดยใช้ Quantitative trait loci ในประชากรพืช 2 กลุ่มคือพืชต้านทาน (resistant plant) และพืชอ่อนแอ (susceptible plant) ต่อโรค 2) เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่มพืชต้านทานและอ่อนแอต่อโรค

ในวิธีการที่ 1) โดยใช้ Quantitative trait loci มีทีมวิจัยที่สามารถนำตำแหน่งที่ยีนเพื่อค้นหาตำแหน่งของ R gene บนโครโมโซม และค้นพบยีนด้านทานต่อโรคใหม่ของข้าวมากกว่า 25 ชนิด และพบ quantitative trait loci เป็นจำนวนมาก (Wang and Leung, 1998; Wang et al., 1999; Bryan et al., 2000, Zhuang et al., 2002) งานวิจัยที่มีการค้นพบยีนด้านทานต่อโรคใหม่ที่สำคัญและ R gene ดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นโมเดลเครื่องหมายอย่างกว้างขวางเป็นผลงานของ Wang et al. (2001) โดยค้นพบว่ายีนด้านทานโรคใหม่ Pi-ta จะไม่มีการแสดงออกในภาวะปกติ แต่จะมีการแสดงออกมากขึ้นหลังจากข้าวได้รับเชื้อ 12 –24 ชม. และผลงานของ Jia et al. (2000) ซึ่งได้ใช้วิธี yeast-two-hybrid system มาศึกษา และพบว่าโปรตีน AVR-Pita ของ *M. grisea* สามารถจับกับ leucine-rich domain ของ โปรตีน Pi-ta ของข้าว

อย่างไรก็ตามยีนด้านทานดังกล่าวพบได้ในข้าวบางสายพันธุ์เท่านั้น จึงเป็นไปได้ว่ายังมี R gene อีกหลายชนิดที่ยังไม่มีการค้นพบในข้าวด้านทาน ข้าวป่า สายพันธุ์อื่นๆ

ในวิธีการที่ 2) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่มพืชต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใหม่นั้น พบว่าวิธีการนี้ทำให้นักวิจัยค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันเซลล์พืชต่อเชื้อโรคใหม่เป็นจำนวนมาก Xiong et al. (2001) ได้ใช้วิธี differential gene expression สามารถ

จำแนกยีนด้านทาน 56 ยีนที่ตอบสนองต่อราโรคไหม้ ได้แก่ mitogen activated protein kinase, diacylglycerolkinase, zinc finger protein, Rel A-spo T protein, defense response-signaling protein ซึ่งยีนต่างๆ เหล่านี้เกี่ยวข้องกับระบบส่งสัญญาณในพืช ต่อมา Kim et al. (2003) ใช้วิธี Proteomic analysis ศึกษาความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่ผลิตขึ้นเมื่อข้าวได้รับ *M. grisea* พบว่ามีโปรตีน 14 ชนิดที่มีปริมาณสูงขึ้นในข้าวที่ได้รับเชื้อ ได้แก่ pathogenesis-related protein class 10, isoflavone reductase, β -glucosidase, putative-receptor like protein kinase เป็นต้น ยีนเหล่านี้ทำงานเกี่ยวกับระบบป้องกันเซลล์ และ Lu et al. (2004) ได้ใช้เทคนิค subtractive hybridization จนค้นพบอีก 47 ยีน ที่ถูกกระตุ้นหรือถูกกดการแสดงออกเมื่อข้าวได้รับเชื้อราโรคไหม้

ยีนด้านทานโรคไหม้ที่สำคัญที่มีการค้นพบจนกระทั่งปัจจุบันจากทั้งสองวิธีการ มีประมาณ 73 ยีน และในจำนวนนี้มี 8 ยีนที่ได้มีการโคลนเพื่อนำมาใช้ปรับปรุงพืชให้ต้านทานต่อโรคไหม้และใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมาย ได้แก่ Pib, Pita, Pikh, Pi9, Pi2/Pizt, Pid2, Pi36 and Pi37 (Ballini et al. 2008, และการอ้างอิงที่พบในบทความนี้) อย่างไรก็ตามการเพิ่มการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในพืชแปลงพันธุ์ทำให้ข้าวสามารถต้านทานต่อโรคได้ระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากราโรคไหม้มีวิวัฒนาการในการปรับตัวค่อนข้างรวดเร็ว (Bryan et al. 2000) ถึงแม้งานวิจัยเหล่านี้ได้ศึกษาในข้าวเพียงบางพันธุ์กับเชื้อก่อโรคบางสายพันธุ์ แต่น่าจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำมาต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาข้าวสายพันธุ์อื่นๆ และเชื่อมโยงงานวิจัยดังกล่าว

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับราโรคไหม้ในประเทศไทยในปัจจุบัน ส่วนหนึ่งเป็นการค้นหายีนด้านทานโดยใช้วิธีวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (Quantitative trait loci) เพื่อนำข้อมูลมาประกอบในการปรับปรุงพันธุ์ โดย อภิชาติ วรรณวิจิตร และคณะ (2544) พบว่ายีนควบคุมความต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1, และ 11 และพบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ยีน ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิให้มีความต้านทานต่อโรคไหม้ Sirithunya et al. (2002) ได้พัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ติดตามยีนด้านทานโรคไหม้ และได้ผสมข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ข้าว CT9993-5-10M ให้มีความต้านทานต่อโรคได้ ในขณะที่เดียวกันศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิให้ต้านทานต่อโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับ (backcross) สามารถคัดเลือกข้าวพันธุ์ต้านทานได้ 220 สายพันธุ์ (บุญรัตน์ จงดี และคณะ, 2546)

1.2 โปรตีนด้านทานในระบบป้องกันเซลล์ (Pathogenesis-related protein)

เมื่อพืชได้รับเชื้อ เช่น รา แบคทีเรียและไวรัส พืชจะผลิต phytoalexin เปปไทด์สายสั้นๆ และโปรตีนขนาดเล็ก เช่น thionin (Bloch et al., 1998), defensins (Broekaert et al., 1995) hevein like proteins และ knottin-like peptides (Sekura et al., 1993) และโปรตีนด้านทานเชื้อหลายชนิดเพิ่มขึ้น

ได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนของโปรตีนต้านทานในระบบป้องกันเซลล์กลุ่ม pathogenesis-related protein (PR) ในพืชหลายชนิด เช่น พืชในกลุ่มมะเขือ (*Solanum species*) ต่อเชื้อ *Phytophthora infestans* (Vleeshouwers et al., 2000) ข้าวสาลี ต่อเชื้อ *Fusarium culmorum* (Caruso et al., 1999) จากการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ PR gene และยีนที่เกี่ยวข้องในระบบป้องกันเซลล์ (defense-related gene) อื่นๆ ในพืชต้านทานต่อโรคจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเซลล์ได้รับเชื้อภายใน 24 ชม. แต่พืชอ่อนแอต่อโรคมีระดับการแสดงออกอยู่ในระดับต่ำและเกิดขึ้นช้า

1.2.1 การจำแนกกลุ่มโปรตีน PR

ได้มีการนำลำดับกรดอะมิโน ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และบทบาททางชีววิทยา มาใช้จำแนกกลุ่มของโปรตีน PR ออกเป็น 14 กลุ่ม ดังแสดงตารางที่ 1 (Van Loon and Van Strien, 1999) นอกจากนี้ยังได้มีโปรตีนที่ทำงานได้หลายหน้าที่ซึ่งจัดไว้ในกลุ่ม PR15 ประกอบด้วยโปรตีน germin และ PR 16 ประกอบด้วย germin-like proteins โปรตีนในทั้งสองกลุ่มนี้ทำงานเป็นทั้งเอนไซม์ โปรตีนโครงสร้าง และโปรตีนตัวรับ (Bernier and Berna, 2001; Park et al., 2004a) โปรตีน 5 กลุ่มแรกแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม basidic subclass ซึ่งพบที่แควิวโอด และ acidic subclass พบภายนอกเซลล์ (Kitajima and Sato, 1999)

ตารางที่ 1 การจำแนกกลุ่มของ Pathogenesis related protein (ที่มาจาก Van Loon and Van Strien, 1999)

Family	สมบัติ
PR1	ยังไม่ทราบหน้าที่
PR2	β -1,3-glucanase
PR3	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR4	Chitinase type I, II
PR5	Osmotins และ thaumatin-like proteins
PR6	Proteinase-inhibitory proteins
PR7	Proteinase
PR8	Chitinase type III
PR9	Peroxidase
PR10	Ribonuclease
PR11	Chitinase type I
PR12	Defensin
PR13	Thionin
PR14	Lipid-transfer protein

1.2.2 การชักนำการทำงานของโปรตีน PR

ปัจจัยทางชีวภาพที่สามารถชักนำให้โปรตีน PR ทำงาน ได้แก่ เชื้อก่อโรค แมลง หนอน สัตว์กินพืช (Robert et al., 2001; Schultheiss et al., 2003) ตัวกระตุ้นที่มาจากเชื้อก่อโรค (pathogen-derived elicitors) มีศักยภาพสูงมากในการชักนำการทำงานของโปรตีน PR ได้เป็นอย่างดี ตัวกระตุ้นที่มีการศึกษาพบ ได้แก่ ชิ้นส่วนของโพลีแซคคาไรด์สองชนิด คือ glucan และ chitin ซึ่งพบที่ผนังเซลล์ของรา ไกลโคโปรตีนที่เชื้อราขบออกมา เปปไทด์ และโปรตีน elicitin (Münch-Garthoff et al., 1997; Honée et al., 1998; Zhou, 1999; Edreva et al., 2002) นอกจากนี้โปรตีนก่อโรคที่ถูกปล่อยมาจากเชื้อราและแบคทีเรียสามารถชักนำโปรตีน PR ได้เช่นกัน (Staskawicz et al., 1995; Hennin et al., 2001)

เอนไซม์ polygalacturonases ในพืชสามารถย่อยผนังเซลล์พืชบริเวณที่มี pectin จนได้โอลิโกแซคคาไรด์สั้นๆ ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นระบบป้องกันเซลล์ซึ่งรวมถึงโปรตีน PR ภายในเซลล์พืชได้ (endogenous elicitor) (Boudart et al., 1998) สารเคมีบางชนิด เช่น ฮอร์โมนพืช salicylic acid, polyacrylic และ fatty acid, inorganic salt และปัจจัยทางกายภาพ (บาดแผล, UV-B, osmotic shock, ความเย็น, ภาวะขาดน้ำหรือได้น้ำมากเกินไป และอนุมูลอิสระ) สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน PR ได้เช่นกัน (Edreva, 1990, 1991; Tamás et al., 1997; Pääkkönen et al., 1998; Van Loon, 1999; Buchel and Linthorst, 1999; Fujibe et al., 2000; Schultheiss et al., 2003)

การสังเคราะห์โปรตีน PR ถูกควบคุมตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน มีรหัส DNA ที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีน (cis-regulatory elements) ตรง promotor ของยีน PR หลายชนิด ได้แก่ Wbox, GCC box, G box, MRE-like sequence, SA-responsive element (Zhou, 1999) คาดกันว่าอาจมีโปรตีนตัวรับตรงเชื่อมเซลล์คอยทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของ PR gene และอาจมีฮอร์โมนพืชร่วมในการส่งสัญญาณ เช่น salicylic acid, jasmonic acid และ ethylene สอดคล้องกับการค้นพบว่าฮอร์โมนเหล่านี้สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนของโปรตีน PR ได้ (Zhou, 1999; Cameron et al., 2000; Poupard et al., 2003) โปรตีน PR จะถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากได้รับเชื้ออย่างน้อย 8 ชม. (Matsuoka and Ohashi, 1986) และโปรตีนนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเฉพาะบริเวณที่ถูกกระตุ้น แต่จะไม่มี การส่งโปรตีน PR ไปยังบริเวณอื่น (Gianinazzi et al., 1982)

1.2.4 หน้าที่ของโปรตีน PR สามารถจำแนกตามกลุ่มได้ดังนี้

PR1 โปรตีนมีขนาด 15-17 kDa และมีลำดับอะมิโนไกล์เดียวกับ cysteine-rich proteins แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ของโปรตีนนี้ แต่พบว่าโปรตีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากพืชได้รับเชื้อ เช่น เชื้อรา *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans*, และ *Erysiphe graminis* (Niderman et al., 1995) พบโปรตีนนี้ในข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ยาสูบ และพืชอีกหลายชนิด (Agrawal et al., 2000; Bryngelsson et al., 1994; Molina et al., 1999) โปรตีนกลุ่มนี้มีลำดับคล้ายกับโปรตีน

helothermine ของสัตว์เลื้อยคลาน ซึ่งสามารถจับกับ membrane-channel protein ของเซลล์เป้าหมาย และยับยั้งไม่ให้มีการปลดปล่อย Ca^{2+} ออกมา (Morrisette et al., 1995)

PR2 เป็นกลุ่มเอนไซม์ endo-1,3- β -glucanase แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน (Selitrennikoff, 2001) กลุ่ม 1 เป็น basic protein ขนาด 33 kDa พบใน vacuole กลุ่ม 2 และ 3 เป็น acidic protein และ extracellular protein ขนาดประมาณ 36 kDa ข้อแตกต่างที่สำคัญระหว่างโปรตีนกลุ่ม 1 กับ กลุ่มที่ 2 และ 3 คือ โปรตีนกลุ่มที่ 1 ถูกสังเคราะห์ในรูป preprotein ที่ยังไม่ทำงานจนกว่าจะมีการตัดบางส่วนของโปรตีนนี้ออกไป PR2 พบในพืชหลากหลายชนิด เช่น ยาสูบ ถั่ว กล้วยพืช และไม้ผล (Cote et al., 1991) มีฤทธิ์ต้านเชื้อหลายชนิดเช่น *Rhizoctonia solani*, *C. albicans*, และ *Aspergillus fumigatus* เหตุที่เอนไซม์กลุ่มนี้ฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราได้ อาจเนื่องมาจากเอนไซม์สามารถย่อย 1,3- β -glucan ซึ่งพบที่ผนังเซลล์ของเชื้อราโดยเฉพาะตรงบริเวณ hypha จนทำให้เซลล์ตายได้ (Selitrennikoff, 2001)

PR3 เป็นกลุ่ม chitinase มีขนาดประมาณ 26 และ 43 kDa (Nielsen et al., 1997; Watanabe et al., 1999) เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ตาม domain ที่พบบนโปรตีน สามารถย่อยผนังเซลล์เชื้อราที่มี chitin เป็นส่วนประกอบได้

PR4 เป็นกลุ่ม chitin-binding protein มีขนาด 13-14.5 kDa และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม Class I มีลำดับกรดอะมิโนคล้าย hevein (a chitin-binding polypeptide) ซึ่งสามารถจับกับโปรตีน lectins ได้ ส่วน Class II ไม่มี chitin-binding domain PR4 พบในพืชหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง บาร์เลย์ มะเขือเทศ เป็นต้น (Van Damme et al., 1999) โปรตีนตอบสนองต่อเชื้อหลายชนิด เช่น *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, และ *B. cinerea* คาดว่าโปรตีนใน Class I สามารถจับกับ chitin บนผนังเซลล์เชื้อราจนหยุดการเติบโตของเชื้อได้ (Bormann et al., 1999) ส่วนโปรตีน Class II ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด

PR5 มีลำดับกรดอะมิโนคล้าย tuamatin และ permatins พบในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด, ถั่วเหลือง ข้าว ข้าวสาลี ยาสูบ เป็นต้น (Roberts and Selitrennikoff, 1990; Koiwa et al., 1997b) โปรตีนนี้มีขนาด 22 kDa มี disulfide bond 8 ตำแหน่ง ซึ่งมีส่วนทำให้โปรตีนนี้ทนจากการถูกย่อยด้วย protease ได้ โปรตีนนี้สามารถแทรกตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราได้ (Vigers et al., 1991) เช่น zeamatin ของข้าวโพด สามารถเปลี่ยนแปลงความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารที่ผนังเซลล์เชื้อรา (Roberts and Selitrennikoff, 1990) osmotin ที่พบในยาสูบสามารถรบกวนการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราได้ (Zhang et al., 1999) โปรตีนบางชนิดสามารถจับกับ actin 1,3- β -glucans และ chitinase ซึ่งคาดว่าน่าจะทำให้เกิด cytoplasmic aggregation เช่นที่พบในมันฝรั่งที่ได้รับเชื้อ *Phytophthora infestans* (Takemoto et al., 1997)

PR6 เป็นโปรตีนยับยั้งการทำงานของ proteinase (proteinase inhibitor) (Koiwa et al., 1997a; Ryan, 1990)

PR7 เป็นกลุ่ม proteinase พบ endoproteinase ในมะเขือ คาดว่าเอนไซม์นี้จะช่วยย่อยโปรตีนที่ผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยทำงานร่วมกับ glucanase และ chitinase เพื่อย่อยเชื้อรา (Goldman and Goldman, 1998)

PR8 และ PR11 ประกอบด้วย chitinase type III และ I ตามลำดับ (Edreva, 2005)

PR9 เป็นกลุ่มเอนไซม์ peroxidase คาดว่าน่าจะมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์ ลิกนินเพื่อสร้างความแข็งแรงให้ผนังเซลล์ (Van Loon and Van Strien, 1999)

PR10 เป็นกลุ่มเอนไซม์ ribonuclease สามารถย่อย RNA ของเชื้อไวรัส เช่น TMVPO และ *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* ที่พบในพริกไทย (*Capsicum annuum*) เอนไซม์นี้สามารถย่อยเชื้อราในระยะ oomycete ที่ถูกปล่อยออกมาจากแมลงและหนอนพยาธิต่างๆ ได้ (Park et al., 2004b)

PR-12, PR-13 และ PR-14 เป็นกลุ่ม membrane-permeabilizing ซึ่งสามารถแทรกตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเช่นเดียวกับ PR5 สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา และแบคทีเรีย และทำให้เซลล์แตก (plasmolysis) ได้ (Van Loon and Van Strien, 1999; Selitrennikoff, 2001) สาเหตุอาจเนื่องจากโปรตีนเหล่านี้สามารถทำให้องค์ประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง หรือทำให้เกิดช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Anžlovar et al., 1998)

PR15 และ PR16 เป็นกลุ่ม germin และ germin-like proteins ตามลำดับ อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนโครงสร้างผนังเซลล์ หรือต่อต้านเชื้อโดยตรง หรือเพียงทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ (Park et al., 2004 a)

1.2.3 ลักษณะสำคัญของโปรตีน PR กับความต้านทานต่อโรค

ลักษณะสำคัญของโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน PR เท่าที่มีการศึกษามีดังนี้

1) พืชจะสะสมโปรตีน PR เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเชื้อ พืชต้านทานจะสะสมมากกว่าพืชอ่อนแอต่อโรค เช่นที่พบในมะเขือเทศที่ได้รับกับเชื้อ *Cladosporium fulvum* (Wubben et al., 1996), แอปเปิ้ลกับเชื้อ *Venturia inaequalis* (Poupart et al., 2003), องุ่นกับเชื้อ *Pseudomonas syringae* (Robert et al., 2001), พริกไทยกับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และ TMVPO (Park et al., 2004 a, b) เป็นต้น ในพืชบางชนิดกลับไม่พบความแตกต่างของระดับ mRNA ของ PR gene แต่เมื่อพืชได้รับเชื้อก่อโรคการสังเคราะห์ mRNA จนมีระดับสูงสุดจะเกิดเร็วกว่าเมื่อได้รับเชื้อไม่ก่อโรค (Van Kan et al., 1992)

2) พืชต้านทานบางชนิดจะผลิตโปรตีน PR บางกลุ่มเป็นปริมาณมากอยู่ตลอดเวลา เช่นที่พบใน แอปเปิ้ลในการตอบสนองต่อเชื้อ *Venturia inaequalis* (Gau et al., 2004), มะเขือเทศกับเชื้อ *Alternaria solani* (Lawrence et al., 2000), มันฝรั่งกับเชื้อ *Phytophthora infestans* (Vleeshouwers et al., 2000) จึงได้มีการใช้ PR gene เป็นโมเลกุลเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น มันฝรั่ง

3) พืชแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน PR อยู่ตลอดเวลาสามารถต้านทานต่อโรคได้มากขึ้น เช่น การแปลงพันธุ์ต้นยาสูบให้มีโปรตีน PR1a เพิ่มขึ้นทำให้พืชต้านทานต่อเชื้อ *Peronospora tabacina* และ *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Alexander et al., 1993) ข้าวและส้มที่มีโปรตีน PR5 เพิ่มขึ้นสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Phytophthora citrophthora* ตามลำดับ (Datta et al., 1999; Fagoaga et al., 2001)

4) หลังจากพืชได้รับเชื้อจะมีการกระตุ้นระบบป้องกันเซลล์ทั้งแบบที่เกิดเฉพาะบริเวณที่เชื้อบุกรุกเข้ามา (local resistance) หรือกระจายไปทั่วทั้งต้น (systemic acquired resistance) มีการสะสมโปรตีน PR เกิดขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว PR ถูกนำมาใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายของระบบ systemic acquired resistance (Ward et al., 1991) Edreva (2004) รายงานว่าระบบ systemic acquired resistance และโปรตีน PR กลุ่มต่างๆ มีการประสานงานกันซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อ

ถึงแม้จะค้นพบโปรตีน PR หลายชนิด แต่การศึกษาการแสดงออก PR gene และ defense-related gene ในข้าวกลับมีน้อยมาก โดยงานวิจัยส่วนใหญ่จะแยกศึกษาการแสดงออกแต่ละยีน PR genes ที่มีการศึกษาได้แก่ PR-1 (Schweizer et al., 1997), PR-2 (β -1,3-glucanases) and PR-3 (chitinase) (Anurata et al., 1996; Du and Wang, 1992; Yamaguchi et al., 2000), และ PR-5 (thaumatin-like protein) (Reimann and Dudler, 1993; Schweizer et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา PR gene บางชนิดที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *M. grisea* โดยการแปลงพันธุ์พืชให้มีการแสดงออกของยีนบางยีนมากขึ้นในข้าว Lui et al. (2004) ได้ส่งถ่ายยีน endochitinase และ exochitinase และ Nishizawa et al. (2003) ได้ส่งถ่ายยีน 1,3;1,4- β -glucanase เข้าไปในข้าวพบว่าข้าวมีความต้านทานต่อ *M. grisea* และพบว่าเอนไซม์ทั้งสามชนิดสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อนี้ได้

การศึกษากลไกการทำงานของระบบป้องกันเซลล์ของข้าวในการต้านทานต่อราโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่ดำเนินการมาจนถึงปัจจุบันโดยกลุ่มนักวิจัยทั่วโลก มีแง่มุมการศึกษาที่สำคัญ ได้แก่ การค้นหายีนต้านทาน (R gene) การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของเชื้อและโปรตีนต้านทานในข้าว และการศึกษารูปแบบการแสดงออกและหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันเซลล์พืชสำหรับในประเทศไทย งานวิจัยเกี่ยวกับยีนต้านทานของข้าวต่อราโรคไหม้ส่วนใหญ่เป็นการศึกษา

โมเลกุลเครื่องหมายที่ติดอยู่กับยีนต้านทานเพื่อใช้เป็นตัวติดตามในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทาน

เนื่องจากยังไม่มียานวิจัยที่สนใจศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PR gene และ defense-related genes อื่นๆ ในข้าวต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้ในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความแตกต่างในระดับการทำงานของยีนกลุ่มนี้ระหว่างข้าวพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อราโรคไหม้ ศึกษาระยะเวลาที่มีการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับเชื้อ และศึกษาหน้าที่ของ defense-related genes ต่อการตอบสนองต่อเชื้อโรคไหม้ การศึกษานี้ น่าจะทำให้เกิดความเข้าใจในกระบวนการทำงานร่วมกันของยีนต่างๆ ในข้าวในการต้านทานต่อโรคไหม้ ข้อมูลที่ได้ อาจจะเป็นพื้นฐานที่นำมาใช้ร่วมกับโมเลกุลเครื่องหมายอื่นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีความสำคัญ เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีความต้านทานต่อโรค

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนต้านทานในข้าวไทยสายพันธุ์ที่มีความต้านทานและสายพันธุ์ ที่อ่อนแอต่อเชื้อรา *M. grisea* ที่ทำให้เกิดโรคไหม้
- 2) เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ β -glucanase ของข้าวต่อการตอบสนองต่อเชื้อรา *M. grisea*

3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนต้านทานในข้าวไทย 2 กลุ่มคือ ข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรคไหม้ ได้แก่ ข้าวเจ้าหอมนิล และข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ ได้แก่ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยศึกษาในต้นกล้าข้าวอายุ 3-4 สัปดาห์ โดยศึกษายีนที่อยู่ในกลุ่ม PR gene และ defense-related gene และศึกษาบทบาทของยีนต้านทานของข้าว 1 ชนิด คือ β -glucanase

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

- 1) ได้ข้อมูลบ่งชี้การแสดงออกระดับพื้นฐานของยีนที่อยู่ในระบบป้องกันเซลล์ที่บ่งถึงความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ระหว่างข้าวพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ซึ่งจะ เป็น ประโยชน์ในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบป้องกันเซลล์ของข้าวเมื่อได้รับเชื้อ
- 2) ค้นพบยีนที่มีบทบาทในการควบคุมการต้านทานต่อเชื้อราของข้าว

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาความแตกต่างระหว่างการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PR gene และ defense-related genes ในข้าวต้านทานและข้าวอ่อนแอต่อราโรคไหม้

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

พันธุ์ข้าว: ข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรคไหม้ ได้แก่ ข้าวหอมนิล

ข้าวพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ ได้แก่ ข้าวขาวดอกมะลิ 105

เชื้อรา: *M. grisea* สายพันธุ์ THL191 ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคไหม้

เมล็ดพันธุ์ข้าวและเชื้อรา ได้มาจากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

1.2 วิธีการทดลอง

1.2.1 การเพาะเชื้อรา

นำหัวเชื้อรา *M. grisea* ที่อยู่บนกระดาษกรองที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วย 1% yeast extract, 2% รำข้าว และ 2% agar แล้วนำเชื้อไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียสภายใต้แสง dark light เป็นเวลา 3 วัน เพื่อชักนำให้เกิดสปอร์

1.2.2 การปลูกและเก็บตัวอย่างข้าว

ปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวหอมนิลที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส มีช่วงกลางวัน/กลางคืน 12/12 ชม. จนกระทั่งข้าวมีอายุได้ 2 สัปดาห์จึงให้ปุ๋ยในโตรเจน สูตร N:P:K (46:0:0) ในปริมาณ 2.5 กรัม/ตารางเมตร เมื่อข้าวได้อายุ 3 สัปดาห์ ได้แบ่งข้าวออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมโดยไม่ได้พ่นเชื้อรา กลุ่มที่ 2 พ่น spore เชื้อรา *M. grisea* ที่มีความเข้มข้น 1×10^5 spore/mL ไปบนต้นข้าว แล้วนำต้นข้าวไปบ่มไว้ในถุงดำที่ปิดสนิท และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นปลูกข้าวที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส มีช่วงกลางวัน/กลางคืน 12/12 ชม. เก็บตัวอย่างข้าวหลังจากข้าวได้รับเชื้อที่เวลา 0, 12, 24, 72 และ 192 ชม. แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัด RNA และได้วิเคราะห์ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคโดยอ้างอิงตามเกณฑ์มาตรฐานของ International Rice Research Institute (IRRI) (2002) พบระดับอาการเกิดโรคไหม้ที่ใบเฉพาะในข้าวขาวดอกมะลิที่บ่มกับเชื้อเท่านั้น โดยเริ่มพบอาการเกิดโรคในวันที่ 7 หลังจากบ่มเชื้อ ใน 2 ระดับโดยบางบริเวณพบเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กเท่าปลายเข็ม (ระดับ 1) บางบริเวณเป็นจุดวงกลมสีเทาขนาดเล็กมีขอบสีน้ำตาลที่แผ่ขยายในด้านยาวเพียงเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ระดับ 2) ไม่พบอาการเกิดโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มที่ไม่บ่มกับเชื้อ และข้าวหอมนิลที่บ่มและไม่บ่มกับเชื้อ

1.2.3 การสกัด RNA

สกัด RNA จากตัวอย่างข้าวโดยใช้ Invisorb Spin Plant RNA Mini kit (Invitek, Berlin, Germany) ตามวิธีการที่ปรากฏในคู่มือ แล้วละลาย RNA ที่สกัดได้ใน RNA Storage Solution (Ambion Inc., Austin, TX) นำ RNA มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm (A_{260}) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นด้วยสูตรคำนวณดังนี้ (1 หน่วย ของ A_{260} มีค่าเท่ากับ 40 $\mu\text{g/mL}$ ของ RNA (Sambrook *et al.*, 1989)

$$\text{ความเข้มข้นของ RNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 40$$

ก่อนที่จะนำ RNA ที่สกัดได้ไปสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) นั้น จำเป็นต้องกำจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนมาเพื่อป้องกันไม่ให้ primer เข้าไปจับกับยีนที่อยู่บน genomic DNA ปฏิบัติการประกอบด้วย RNA 8 μL (1 μg), RNase-free DNase 10 X buffer 1 μL และ RNase-free DNase 1 μL (1 unit) (Promega, Madison, WI) บ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย DNase stop solution แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

1.2.4 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse-transcription

นำ mRNA ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งใน RNA ที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse transcription (RT) โดยใช้ SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) ปฏิบัติการสังเคราะห์ cDNA เริ่มจาก Oligo(dT) primer จะเข้าไปจับกับ poly A-tail ของ mRNA จากนั้นเอนไซม์ reverse transcriptase จะทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์บน mRNA แม่แบบแล้วสังเคราะห์ cDNA ซึ่งมีลำดับคู่สมกับ mRNA ซึ่งจะได้ RNA-cDNA hybrid เป็นผลผลิต จากนั้นจึงทำการย่อยสลาย RNA ด้วย RNase H ให้เหลือเฉพาะ cDNA ที่จะนำไปใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ในขั้นตอนถัดไป

ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA มีดังนี้

- 1) ผสม 50 μM oligo (dT)₂₀ primer 1 μL , RNA 1 μg และ DEPC-treated water ให้ได้ปริมาตรรวม 10 μL แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเขย่าบนน้ำแข็งทันที ขั้นตอนนี้เป็นการทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA
- 2) ปั่นส่วนผสมใน 10x cDNA synthesis buffer ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex mixture) ประมาณ 5 วินาทีก่อนใช้
- 3) ผสม 10x cDNA synthesis buffer 2 μL , 25 mM MgCl₂ 2 μL , 0.1 M DTT 2 μL , RNaseOUT 1 μL (40 units), และ SuperScript III 1 μL (200 units) ลงในหลอดทดลองที่แช่อยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นเติมส่วนผสมต่างๆ เหล่านี้ลงไปหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 1

- 4) นำหลอดทดลองใส่ลงในเครื่อง GeneAmp PCR system9700 thermocycler (PE Applied Biosystems, CA) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วบ่มต่อไปเป็นเวลา 50 นาที
- 5) หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วแช่หลอดทดลองในน้ำแข็ง 1 นาที
- 6) เติม RNase H (40 units) 1 μ L ลงไปในปฏิกิริยาและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที เพื่อย่อย mRNA ที่จับอยู่กับ cDNA เก็บ cDNA ที่ได้ที่ -30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทำ PCR

1.2.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Semiquantitative RT-PCR

ได้นำลำดับ cDNA ของ PR gene และ defense-related genes ที่มีการศึกษาในพืชชนิดต่างๆ มาใช้ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเหล่านี้ในข้าวโดยสืบค้นจากฐานข้อมูลจีโนมข้าวใน GenBank ด้วย blast search program ของ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) จากนั้นได้ออกแบบ primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแต่ละชนิดที่พบในข้าว นำ cDNA ของตัวอย่างข้าวที่สังเคราะห์ได้มาเป็นแม่แบบใน PCR เพื่อเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณที่สามารถตรวจวัดได้ โดยใช้ sense และ antisense primers ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิด และ actin ซึ่งเป็นยีนอ้างอิง (ตารางที่ 2)

ผสมสารดังต่อไปนี้ในหลอด PCR

10 X PCR buffer	2 μ L
50 mM MgCl ₂	0.6 μ L
2.5 mM dNTP mix	1.6 μ L
10 μ M sense primer	0.8 μ L
10 μ M anti-sense primer	0.8 μ L
Taq DNA polymerase (1.25 units)	0.1 μ L (Invitrogen)
cDNA	1 μ L
น้ำกลั่น	13.1 μ L
ปริมาตรรวม	20 μ L

วงรอบของ PCR มีดังนี้

- Denaturation step: 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 Annealing step: อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นกับ primer ของแต่ละยีน เป็นเวลา 30 วินาที
 Extension step: 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

ความเข้มข้นของ cDNA ที่ใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ถูกเจือจางลง 1/5 เท่า จำนวนรอบที่ใช้ทำ PCR คือ 25-30 รอบ ซึ่งเป็นจำนวนวงรอบที่เหมาะสมที่ตรวจพบ DNA ได้โดยที่ปฏิกิริยายังไม่ถึงจุดอิ่มตัว

ตารางที่ 2 Primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PR gene และ defense-related genes ที่ใช้ในการทำ PCR

Gene/ GenBank accession No.	Primer name	Sequence (5'—3')	An T (°C)	Product size (bp)
PR1a XM476497	PR1a_F	ACTGCAAGCTGGAGCACTC	52	304
	PR1a_R	TAGGGAGATTGGCCGACG		
PR1 XM468168	PR1_F	TACGGGGAGAACCTGTTC	52	248
	PR1_R	ATGCCGACGTAGTTGCC		
PR2 AB070742 Glucanase	PR2_F	AGAAGGGACGTGCTGGG	52	357
	PR2_R	ATCTTTGGTCGCTGCAGG		
PR3 AB054811	PR3_F	ATGACCGCACCAACGACG	54	354
	PR3_R	TGCGACATCACCTGGTGC		
PR4 AY435041	PR4_F	ACGTGGGATGCTGACAAG	52	285
	PR4_R	CTAGTTATTGCCGACGTCG		
PR5 AJ245900	PR5_F	ACTTGTCGCGTGCCTG	54	336
	PR5_R	ACCATCGTCTTGCACTGG		
PR6 AF435976	PR6_F	AGTTCGAGAAGCTTGTGAG	52	260
	PR6_R	TGGTCCAATAGCTATATCC		
PR9 X66125	PR9_F	TCAGGAGCACACGATC	52	284
	PR9_R	TTGGACGCGAAGTTCCTG		
PR10 AF416604	PR10_F	AGGAGAGGCTGGAGTTC	52	273
	PR10_R	GTGTGAAGCGTCCGGGTT		
PR10a AF274850	PR10a_F	ACCATCTACCCATGAAGC	54	330
	PR10a_R	TTAGGCGTATTCCGGCAGG		
PR12 XM466875	PR12_F	ATGGCTCCGTCTCGTCG	54	243
	PR12_R	CTAGCAGACCTTCTTGCA		
PR13 AB072337	PR13_F	TGGCTCAAGAGACACCTG	54	267
	PR13_R	TAGGAAACAACGGTGACAG		
PR14 BF889445	PR14_F	ACATAGTACTGCGCTTAGC	54	231
	PR14_R	TGGAGGGTATGCCGGTG		
AJ270955 phospho- lipid hydroperoxide glutathione peroxidase	PHGP_F	ACAAGAGCCAGGATCTGAC	54	274
	PHGP_R	ATCCTCGAGCGCCTTCAG		
AK105375 β -exoglu- canase/ β -glucosidase ไอโซไซม์ 445	445-F	TGACGGAAGGAAGAGATAC	52	161
	445-R	AACTGGATTACTTCCATCTC		
Actin	Actin1_F	ACTCTGGTGATGGTGTGTCAGCC	52	460
	Actin1_R	GTCAGCAATGCCAGGGAACATA		

หมายเหตุ An T เป็นอุณหภูมิในขั้นตอนที่ 2 ของวงจร PCR ที่เหมาะต่อการเข้าจับของ primer แต่
ละคู่กับ DNA แม่แบบ

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1% ที่ละลายในสารละลาย TAE buffer (0.04 M Tris-HCl pH 8.0, 0.04 M acetic acid, 0.001 M EDTA pH 8.0) ที่มี 10 µg/mL ethidium bromide บันทึกภาพแถบ DNA ที่เรืองแสงบน UV ด้วยเครื่อง Fluor-STM MultiImager (Bio-RAD, Richmond, CA) และใช้โปรแกรม Quantify One software (Bio-RAD) วัดความเข้มของแถบ DNA โดยเทียบกับ 100 bp Molecular Mass Marker (New England Biolabs, Beverly, MA) เป็น DNA มาตรฐาน ที่ทราบขนาดและปริมาณ (ng) ของ DNA แต่ละแถบเป็นค่าอ้างอิง กำหนดปริมาณ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากค่าสัดส่วนระหว่างความเข้มของแถบ DNA ของยีนนั้นๆ กับความเข้มของแถบ DNA ของยีน actin ที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่างเดียวกันเป็นค่าอ้างอิง

2. การศึกษาหน้าที่ของ exoglucanase/ β -glucosidase ต่อการตอบสนองต่อเชื้อโรคใหม่

การทดลองนี้เป็นการศึกษาหน้าที่ β -exoglucanase/ β -glucosidase ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม defense-related genes ที่ถูกจัดไว้ใน Glycosyl hydrolase family 1 (CAZY, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) และให้ชื่อย่อเอนไซม์นี้ว่า BG445 ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้เพิ่มจำนวน cDNA ของ BG445 ขนาดเต็มสาย (1635 bp) จากต้นอ่อนข้าว โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากลำดับ cDNA ของฐานข้อมูลจีโนมข้าว GenBank accession number AAAA02014151, AK105375 และ AK100820 (Opassiri *et al.*, 2006) สำหรับการทดลองนี้เริ่มจากตัดต่อ cDNA ของ BG445 จาก cloning vector เข้าสู่ expression vector เพื่อใช้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่จะนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์

2.1 การตัดต่อ cDNA ของ BG445 เข้าสู่ expression vector

2.1.1 เพิ่มจำนวน cDNA ของ BG445 แบบที่ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ signal peptide ด้วย PCR นำ cDNA ขนาดเต็มสายของ BG445 ที่แทรกอยู่ใน pBlueScript II SK(+) เป็นแม่แบบ ใช้ sense primer 445-matNcoI (5'-CACCATGGCCTACAATAGCGCCGCGAG-3') และ antisense primer 445-stopr (5'-ATCATTTTCAGGAGGAACCTTCTTG-3') และ *Pfu* DNA polymerase (Promega, Madison, WI) เพื่อสังเคราะห์ DNA ปลายหูกที่มีลำดับ 5' CACC- 3' อยู่ด้าน 5'end ซึ่งจะไปเข้ากับลำดับ 3' GTGG 5' ที่ยื่นออกมาจาก pENTR/D/TOPO vector

ส่วนประกอบใน PCR มีดังนี้

10 X PCR buffer	5 µL
2 mM MgCl ₂	4 µL
2.5 mM dNTP mix	4 µL
10 µM sense primer	1 µL
10 µM anti-sense primer	1 µL

<i>Pfu</i> DNA polymerase (1.25 units)	0.5 μ L
DNA template	1 μ L
น้ำกลั่น	33.5 μ L
ปริมาตรรวม	50.0 μ L จำนวน 2 หลอด

วงรอบของ PCR จำนวน 30 รอบ มีดังนี้

Denaturation step:	94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
Annealing step:	45 องศาเซลเซียส 30 วินาที
Extension step:	72 องศาเซลเซียส 2.30 นาที

2.1.2 แยก cDNA ที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย agarose gel extraction kit ตามวิธีในคู่มือของ Invitrogen แล้วเชื่อม cDNA นี้เข้ากับ pENTR-D/TOPO ตามวิธีที่อธิบายในคู่มือของ Invitrogen โดยใช้ molar ratio ระหว่าง cDNA: pENTR-D/TOPO ประมาณ 2:1 TOPO Cloning reaction ประกอบด้วย

- cDNA ที่แยกออกมาให้บริสุทธิ์ 10 ng
- Salt solution 1 μ L
- pENTR-D/TOPO 1 μ L
- เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรรวมของปฏิกิริยาให้ได้ 6 μ L

บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม TOPO Cloning Reaction ปริมาตร 2 μ L ในหลอดที่มี competent cell *E. coli* สายพันธุ์ One Shot TOP10 แล้วแช่ไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้น heat shock เซลล์ที่ 42 องศาเซลเซียส 30 วินาที แล้วแช่เซลล์ในน้ำแข็งทันที เติม SOC medium ลงไป 250 μ L น้ำหลอดทดลองไปเขย่าในแนวนอนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเกลี่ยเชื้อบน LB agar ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 μ g/mL บ่มเชื้อข้ามคืนที่ตู้อบ 37 องศาเซลเซียส (Sambrook et al., 1989) และคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดที่มี cDNA ของ BG445 แทรกอยู่มาตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี PCR แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1.3 นำพลาสมิดที่มี cDNA ของ BG445 แทรกอยู่มาทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน DNA กับ pET32a(+)/DEST Gateway expression vector เพื่อส่ง cDNA ของ BG445 ไปแทรกไว้ใน pET32a(+)/DEST ขั้นตอนนี้ใช้ Gateway Vector-LR Clonase System (Invitrogen) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้จากปฏิกิริยาส่งเข้าไปในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ OrigamiB (DE3) และใช้ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ 15 μ g/mL kanamycin, 12.5 μ g/mL tetracycline และ 50

$\mu\text{g/mL}$ ampicillin เป็นตัวคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่มี cDNA ของ BG445 แทรกอยู่ (pET32a+)/DEST-BG445) นำโคโลนีที่คัดเลือกได้มาใช้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก cDNA ของ BG445 ใน *E. coli*

2.2.1 เตรียมหัวเชื้อ (starter culture) โดยนำโคโลนี OrigamiB (DE3) ที่มี pET32a(+)/DEST-BG445 ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ปริมาตร 5 mL ซึ่งมียาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ 15 $\mu\text{g/mL}$ kanamycin, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ tetracycline และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14-16 ชม. จากนั้นเติมหัวเชื้อ 1 mL ใน LB medium ปริมาตร 100 mL ซึ่งมียาปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว แล้วเขย่าเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 240 รอบต่อนาทีจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้ประมาณ 0.5-0.6 ชักนำให้แบคทีเรียผลิตโปรตีนด้วยการเติม isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 mM แล้วเขย่าเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชม. เก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง

2.2.2 สกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วย extraction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 200 $\mu\text{g/mL}$ lysozyme, 1% Triton-X 100, 1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride, 40 $\mu\text{g/mL}$ DNase I) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นแยกสารละลายโปรตีนออกมาด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

2.2.3 แยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) โดยใช้ BD TALON cobalt resin และชะโปรตีนออกมาด้วย imidazole ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ (Clontech, Palo Alto, CA) จากลดความเข้มข้นของ imidazole ในสารละลายโปรตีนด้วยการกรองโปรตีนด้วย 10 kDa-cut off centrifugal ultrafiltration membranes (YM-10, Amicon, Beverly, MA) และใช้ 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 ช่วยในการเจือจาง

2.2.4 นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ ด้วยการทดสอบการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (*p*NP- β -D-glucoside) ตามวิธีของ Opassiri et al. (2003) และวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่แยกได้บน SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, CA) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.3 การทดสอบการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์ BG445

ได้ใช้ endoglucanase (ได้รับจาก Dr. Takashi Akiyama, Akiyama et al., 2001) มาใช้ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *M. grisea* แล้วนำโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้มาทดสอบด้วยเอนไซม์ BG445 เนื่องจากเอนไซม์ไม่สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่มาจากผนังเซลล์เชื้อราได้ จึงได้นำเอนไซม์มา

ทดสอบหาสับสเตรทที่อยู่ในข้าวแทน โดยก่อนหน้ามีการรายงานว่ามีเชื้อบุงรุกเข้าสู่เซลล์พืช จะเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์โดยใช้เอนไซม์หลายชนิด วิธีการนี้เป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ในระบบปกป้องเซลล์พืช (Rolland et al., 2006) ดังนั้นจึงได้นำเอนไซม์ BG445 มาทดสอบกับสับสเตรทที่พบที่ผนังเซลล์ข้าว

2.3.1 การทดสอบการย่อยไคแซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์

สับสเตรทที่ใช้ ได้แก่ ไคแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ laminaribiose (เชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β -1,3), cellobiose (β -1,4) และ gentiobiose (β -1,6) และ โอลิโกแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคส ได้แก่ laminari-oligosaccharides (β -1,3) ที่มีจำนวนกลูโคส 3-5 หน่วย และ celooligosaccharides (β -1,4) ที่มีจำนวนกลูโคส 3-6 หน่วย ขั้นตอนการทดสอบการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์มีดังนี้

1) บ่มปฏิกิริยาปริมาตรรวม 50 μ L ประกอบด้วยเอนไซม์ 2.97 pmol สับสเตรท ความเข้มข้น 1 mM ในบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (อุณหภูมิและ pH ที่ใช้ได้ทดสอบแล้วว่าเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณกลูโคสซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาด้วย peroxidase/glucose oxidase assay ตามวิธีของ Opassiri et al. (2003)

2) บ่มปฏิกิริยาปริมาตรรวม 50 μ L ประกอบด้วยเอนไซม์ 2.97 pmol สับสเตรท ความเข้มข้น 5 mM ในบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาด้วย thin layer chromatography (TLC) บน silica gel60 plates (Merck, Darmstadt, Germany) โดยใช้ ethyl acetate-acetic acid-water (2:1:1) ในการแยกน้ำตาล แล้วพ่นแผ่น TLC ด้วย 10% H_2SO_4 ใน ethyl alcohol และนำไปอบที่ 120 องศาเซลเซียส 5-10 นาที

2.3.2 การทดสอบการย่อยโพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคส

สับสเตรทที่ใช้ได้แก่โพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ β -1,3 (laminarin) และ β -1,4 (β -glucans) ที่พบเป็นส่วนประกอบที่ได้จากการย่อยของผนังเซลล์พืช ผสมเอนไซม์ 1-5 μ g กับ สับสเตรทความเข้มข้น 0.5% (w/v) และปรับปริมาตรเป็น 1 mL ด้วย 50 mM sodium acetate pH 5.0 แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 30-60 นาที แล้วเติม *p*-hydroxybenzoic acid hydrozide reagent เพื่อหยุดปฏิกิริยาและวัดปริมาณ reducing sugar ตามวิธีที่อธิบายโดย Lever (1972)

2.3.3 ทดสอบการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์ข้าว

1) เตรียมผนังเซลล์จากต้นอ่อนข้าว โดยบดใบข้าวอายุ 10 วัน ด้วยโกร่งและเติมนิโตรเจนเหลวเพื่อให้บดได้ละเอียดจนเป็นผง กำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโอลิโกแซคคาไรด์ออก

จากผนังเซลล์ ด้วยการกวนตัวอย่างในบีกเกอร์ที่บรรจุเอทานอล 90% และอุ่นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างมาปั่นแยกส่วนผนังเซลล์ออกจากส่วนใสด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 7,000 xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำอีก 3 รอบ แล้วนำตะกอนผนังเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งด้วยระบบปั่นแบบสูญญากาศ

2) การย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase และ BG445

การทดลองที่ 1 ย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ BG445 ปฏิกริยา 20 mL ประกอบด้วยผนังเซลล์ข้าว 100 mg, เอนไซม์ BG445 100 pg ในบัฟเฟอร์ 10 mM sodium acetate pH 5.2 บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที

การทดลองที่ 2 บ่มผนังเซลล์กับเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase ของข้าว (จากห้องปฏิบัติการ Dr. Takashi Akiyama, National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Japan) ปฏิกริยา 20 mL ประกอบด้วยผนังเซลล์ข้าว 100 mg เอนไซม์ 100 pg ในบัฟเฟอร์ 10 mM sodium acetate pH 5.2 บ่มปฏิกริยาที่ 37 องศาเซลเซียส 6 ชม. หยุดปฏิกริยาโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกริยามาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ BG445 ปฏิกริยาประกอบด้วย โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase 10 μ L, เอนไซม์ BG445 14.5 pg (1 μ L) และ 50 mM sodium acetate pH 5.2 2 μ L บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที

ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกริยาจากทั้งสองการทดลองด้วย TLC บน silica gel60 plates โดยใช้สารตัวพาที่ประกอบด้วย 75% acetonitrile แล้วพ่นแผ่น TLC ด้วย 10% H₂SO₄ ใน ethyl alcohol และนำไปอบที่ 150 องศาเซลเซียส 5-10 นาที

บทที่ 3

ผลทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแสดงออกของยีนในกลุ่ม pathogenesis-related genes และ defense-related genes ในข้าวต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ PR gene ทั้งหมดจากฐานข้อมูลยีนอมข้าว ได้แก่ GenBank Rice Genome Project Japan โดยใช้ blast search program และทำการจัดกลุ่ม gene ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene หรือ cDNA และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกับพีชชนิดต่างๆ พบว่าฐานข้อมูลยีนอมข้าวมี PR gene ทั้งหมด 10 กลุ่ม ยีนที่ได้นำมาศึกษา ได้แก่ PR1, PR1a, PR2, PR3, PR4, PR5, PR 6, PR9, PR10, PR10a, PR12, PR13 และ PR14 นอกจากนี้ยังได้ศึกษา defense-related genes ที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันเซลล์มาศึกษา 2 ยีนคือ phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGP) และ exoglucanase/ β -glucosidase ไอโซไซม์ 445 (BG445) ได้ออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA ของ gene นั้นๆ โดยวิธี RT-PCR

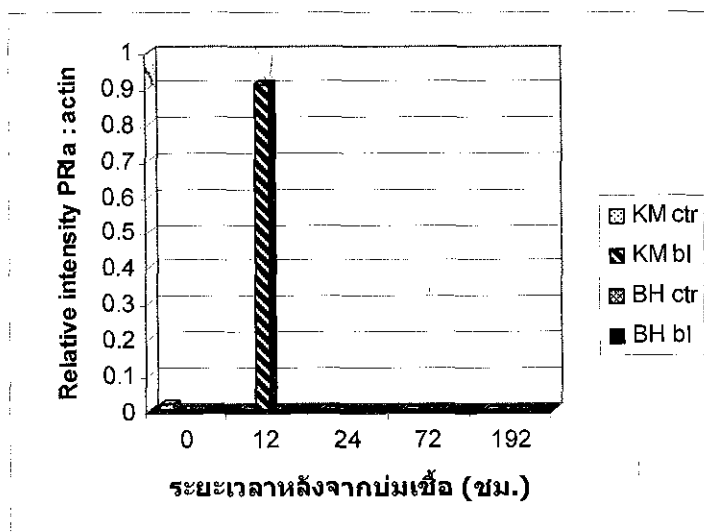
ได้สกัด RNA จากข้าวหอมนิลซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานและข้าวขาวดอกมะลิซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ที่มีอายุ 3 สัปดาห์จากสองกลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุมโดยไม่ได้พ่นเชื้อรา และกลุ่มที่พ่นสปอร์เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ THL191 ที่เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ คือ 0, 12, 24, 72 และ 192 ชม. หลังจากพ่นกับเชื้อ จากนั้นได้ใช้ DNase I กำจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนมากับ RNA ทำการวิเคราะห์คุณภาพ RNA ที่สกัดได้ด้วยการค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย RNA ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่า RNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ และมีคุณภาพค่อนข้างดี จากนั้นได้นำ RNA ดังกล่าวไปเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ด้วย RT-PCR และนำ primer ที่ได้ ออกแบบไว้มาใช้ในปฏิกิริยา PCR ทั้งนี้ตัวอย่างใบข้าวที่นำมาสกัด RNA มีเฉพาะกลุ่มทดลองข้าวขาวดอกมะลิที่พ่นกับเชื้อที่เริ่มพบอาการเกิดโรคในวันที่ 7 หลังจากพ่นเชื้อ พบระดับอาการเกิดโรคไหม้ที่ใบใน 2 ระดับโดยบางบริเวณพบเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กเท่าปลายเข็ม (ระดับ 1) บางบริเวณเป็นจุดวงกลมสีเทาขนาดเล็กมีขอบสีน้ำตาลที่แผ่ขยายในด้านยาวเพียงเล็กน้อยซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ระดับ 2) (อ้างอิงตาม IRRI, 2002) ไม่พบอาการเกิดโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มที่ไม่พ่นกับเชื้อ และในข้าวหอมนิลที่พ่นและไม่พ่นกับเชื้อตลอดระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างจนถึง 192 ชม.

ได้วัดระดับ mRNA ของยีนในกลุ่ม PR gene และ defense-related gene แต่ละยีนโดยอ้างอิงจากระดับ cDNA ที่เพิ่มจำนวนได้จากวิธี RT-PCR โดยเปรียบเทียบระหว่าง 1) ข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ (KM ctr) 2) ข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มที่ได้รับเชื้อ (KM bl) 3) ข้าวหอมนิลกลุ่มที่ไม่ได้รับ

เชื้อ (BH ctr) และ 4) ข้าวหอมนิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ (BH bi) ดังที่แสดงในรูปที่ 1-9 ในการเปรียบเทียบนี้ได้ใช้ค่าสัดส่วนระหว่างความเข้มของแถบ cDNA ของยีนนั้นๆ กับความเข้มของแถบ cDNA ของ actin gene ของตัวอย่างเดียวกันเป็นตัวอ้างอิง (Relative intensity, RI) จากการเปรียบเทียบการแสดงผลของยีนในกลุ่มตัวอย่างพบว่ามียีนเพียงบางชนิดที่มีการแสดงออก อีกทั้งมีรูปแบบและระยะเวลาที่เกิดการแสดงออกของยีนแตกต่างกันในกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับเชื้อ โดยสรุปได้ดังนี้

1) **PR1a** : เป็นยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด จัดอยู่ใน acidic subclass ของ PR1 ซึ่งคาดว่าจะพบอยู่ภายนอกเซลล์

ณ เวลาที่เริ่มต้นทดลอง (0 ชม) ไม่พบการแสดงออกของยีน PR1a ในข้าวขาวดอกมะลิแต่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชม. พบการแสดงออกของยีน PR1a เพิ่มขึ้นชัดเจน โดยมีค่า RI เท่ากับ 0.91 ในขณะที่ข้าวขาวดอกมะลิที่ไม่ได้รับเชื้อ มีการแสดงออกของยีนนี้เพียงเล็กน้อย ณ เวลาที่เริ่มต้นทดลอง (ค่า RI เท่ากับ 0.02) ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นระดับการแสดงออกของยีนในระดับปกติ แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวหอมนิลทุกกลุ่มทดลอง (รูปที่ 1)

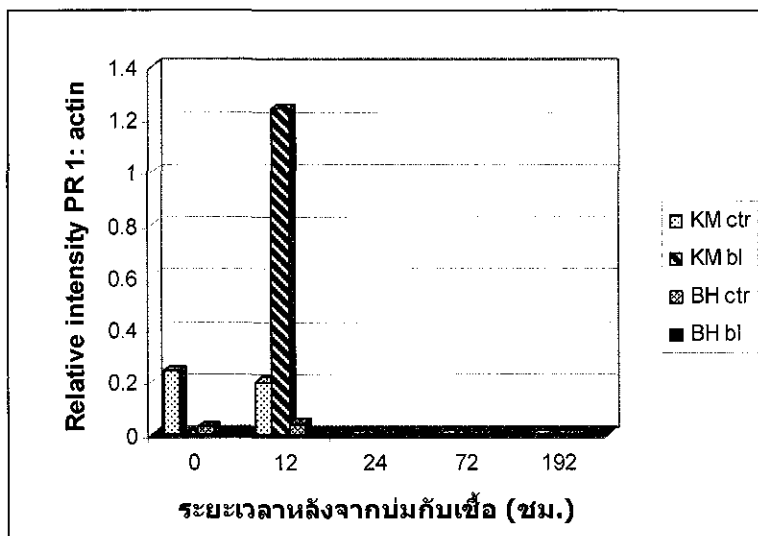


รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PR1a กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

2) **PR1**: เป็นยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด จัดอยู่ใน basic subclass ของ PR1 ซึ่งคาดว่าจะพบได้ในแวคิวโอล

พบการแสดงออกของยีน PR1 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในข้าวขาวดอกมะลิหลังจากที่ได้รับเชื้อ 12 ชม. เมื่อเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิก่อนการควบคุม โดย ณ เวลาเริ่มต้นทดลอง (0 ชม.) ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชม. พบว่าค่า RI เพิ่มขึ้นเป็น 0.24 ในขณะที่ข้าวกลุ่ม

ควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.24 และ 0.2 ณ เวลา 0 ชม. และ 12 ชม. ตามลำดับ แต่ไม่พบการแสดงออกของ ยีนนี้ในข้าวหอมนิลทุกกลุ่มทดลอง (รูปที่ 2)

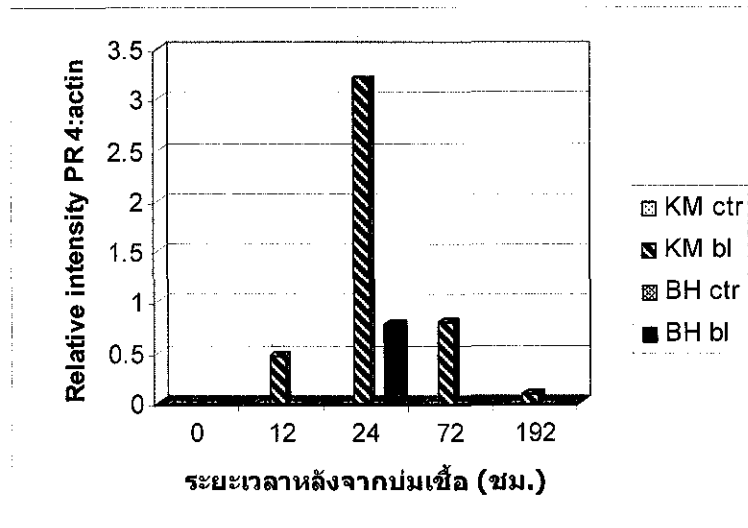


รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PR1 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

3) **PR4:** เป็นยีนของเอนไซม์ chitinase ซึ่งมี chitin-binding domain เกี่ยวข้องกับการย่อย chitin ที่ผนังเซลล์เชื้อรา

PR4 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนภายใน 12 ชม. ในข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อ และระดับการแสดงออกลดลงตามลำดับเมื่อระยะเวลาบ่มกับเชื้อนานขึ้น โดยพิจารณาจากค่า RI ที่มีค่าเท่ากับ 0, 0.47, 3.21, 0.8 และ 0.08 ที่เวลา 0, 12, 24, 72, และ 192 ชม. ตามลำดับ ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวขาวดอกมะลิกุ่มควบคุม พบระดับการแสดงออกของยีน PR4 ในข้าวหอมนิลหลังจากบ่มกับเชื้อรา 24 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 0.78) แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในช่วงเวลาอื่น และไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวหอมนิลกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3)

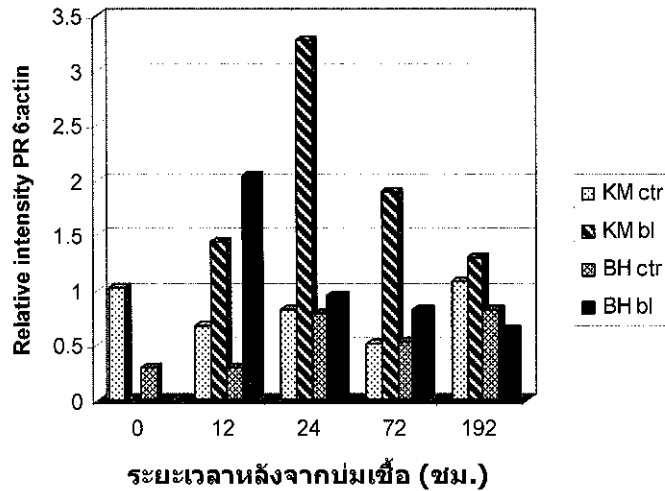
สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Agrawal et al. (2003) พบว่ายีน PR4 สะสมมากขึ้นในข้าวที่ได้รับเชื้อ *M. grisea* สายพันธุ์ที่ทั้งก่อโรคและไม่ก่อโรคในข้าวสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา แต่พบในกลุ่มพืชควบคุมในระดับที่ต่ำมาก และยีนนี้ยังแสดงออกมากขึ้นในการตอบสนองต่อฮอร์โมน jasmonic acid และ abscissic acid ซึ่งบ่งชี้ว่ายีนนี้ถูกชักนำด้วยระบบส่งสัญญาณในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า และทางคณะวิจัยได้พิสูจน์ว่ายีนนี้ถูกควบคุมผ่านระบบส่งสัญญาณชนิด kinase-signaling cascade และ Zhu et al. (2006) ศึกษาพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน PR4 ของข้าวที่ผลิตได้ใน *E.coli* มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *Rhizoctonia solani*



รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PR4 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

4) **PR6:** เป็นยีนของ proteinase-inhibitory protein คาดว่าทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ proteinase ของเชื้อรา

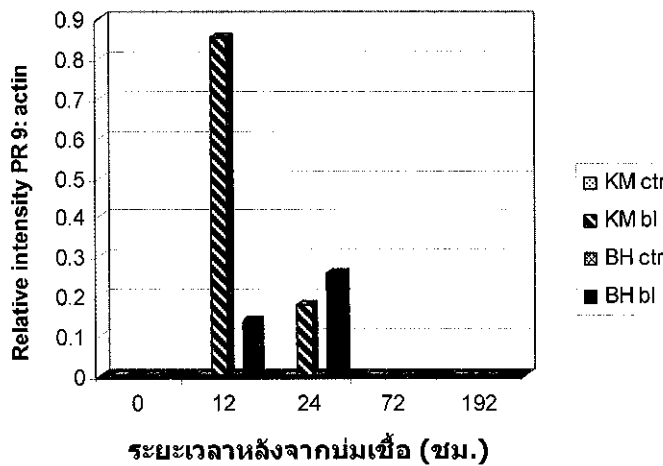
พบการแสดงออกของยีน PR6 ในข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มควบคุมทุกระยะตั้งแต่ 0 ชม ถึง 192 ชม. โดยอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน (ค่า RI เท่ากับ 1.03, 0.68, 0.82, 0.51 และ 1.07 ตามลำดับ) จึงคาดว่าจะเป็นการแสดงออกของยีนในระดับปกติ แต่ระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อข้าวขาวดอกมะลิได้รับเชื้อ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 12 , 24, และ 72 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 1.44, 3.28 และ 1.89 ตามลำดับ) ระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 24 ชม. หลังจากนั้นระดับการแสดงออกค่อยๆ ลดลง ตามลำดับ แสดงว่ายีน PR6 มีการแสดงออกอยู่แล้วในภาวะปกติ แต่ระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อข้าวได้รับเชื้อ พบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวหอมนิลกลุ่มควบคุมทุกระยะเช่นกัน แต่ระดับการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวหอมนิลที่ได้รับเชื้อมีระดับที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ที่เวลา 12 ชม. (ค่า RI ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเชื้อเท่ากับ 0.36 และ 2.04 ตามลำดับ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PR6 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

5) PR9: เป็นยีนของเอนไซม์ peroxidase

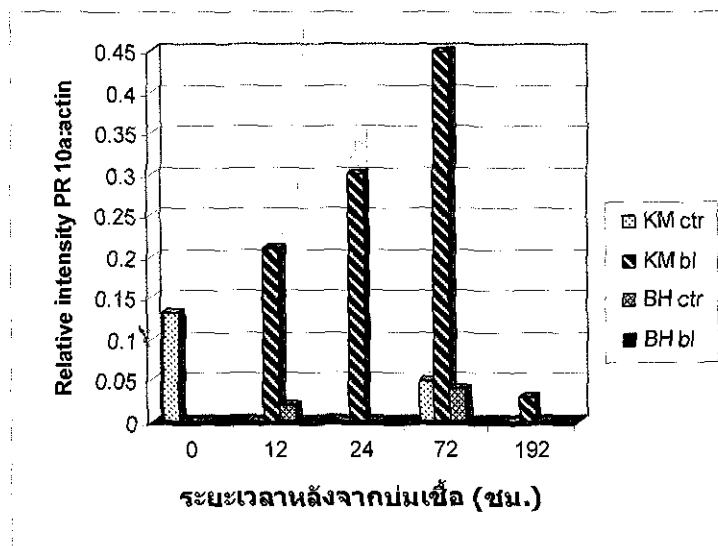
ไม่พบการแสดงออกของยีน peroxidase ทั้งในข้าวขาวดอกมะลิและข้าวหอมนิลกลุ่มควบคุม แต่พบเฉพาะกลุ่มข้าวที่ได้รับเชื้อ ข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อมีการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 ชม. โดยมีค่า RI เท่ากับ 0.85 และลดระดับลงมาที่ 0.18 ที่เวลา 24 ชม. แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน หลังจากนั้น พบการแสดงออกของยีนในข้าวหอมนิลที่ได้รับเชื้อที่เวลา 12 ชม. เช่นเดียวกัน โดยมีค่า RI เท่ากับ 0.14 และระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชม. โดยมีค่า RI เท่ากับ 0.26 และไม่พบการแสดงออกของยีนหลังจาก 24 ชม. (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PR9 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

6) **PR10a:** เป็นยีนของเอนไซม์ ribonuclease คาดว่าจะทำหน้าที่ย่อย RNA ของเชื้อ จัดเป็น acidic class ของ PR10 คาดว่าจะพบโปรตีนนี้ภายนอกเซลล์

ข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของยีน PR10a ในบางระยะได้แก่ 0 และ 72 ชม. ข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อมีระดับการแสดงออก ค่อยๆ เพิ่มระดับจากที่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 0 ชม. จนมีระดับสูงสุดที่เวลา 72 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 0.21, 0.3, และ 0.45 ที่เวลา 12, 24 และ 72 ชม. ตามลำดับ) ซึ่งมีระดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ในข้าวหอมมะลิกลุ่มควบคุมพบว่ามีการแสดงออกของยีนนี้เพียงเล็กน้อยในบางระยะ แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวที่ได้รับเชื้อ (รูปที่ 6)

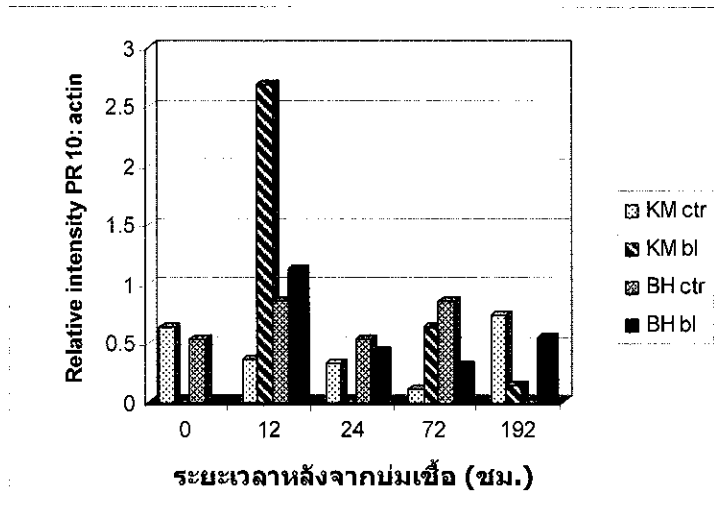


รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PR10a กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

7) **PR10:** เป็นยีนของเอนไซม์ ribonuclease คาดว่าสามารถย่อย RNA ของเชื้อ

ข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของยีน PR10 ในทุกระยะตั้งแต่ 0 ชม ถึง 192 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 0.63, 0.36, 0.33, 0.11 และ 0.73 ตามลำดับ) ซึ่งคาดว่าเป็นระดับการแสดงออกของยีนในระดับปกติ ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นชัดเจนเมื่อข้าวขาวดอกมะลิได้รับเชื้อที่เวลา 12 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 2.68)

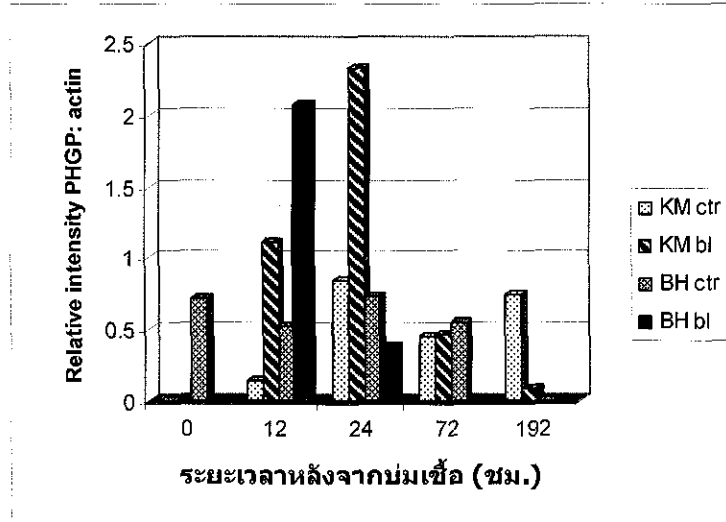
ข้าวหอมมะลิกลุ่มควบคุมมีระดับการแสดงออกซึ่งคาดว่าเป็นระดับการแสดงออกของยีนในระดับปกติ ในระยะต่างๆ เช่นกัน แต่เมื่อข้าวหอมมะลิได้รับเชื้อระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นหรือลดลงในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน แสดงถึงความผันแปรในระดับการแสดงออกของยีนดังนี้ในข้าวหอมมะลิ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PR10 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

8) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGP): เป็นยีนในระบบป้องกัน โดยมีส่วนร่วมใน systemic acquired response ซึ่งเกิดขึ้นทั่วทั้งต้น

ข้าวขาวดอกมะลิกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของยีนนี้ในทุกระยะตั้งแต่ 0 ชม ถึง 72 ชม. ซึ่งมีความผันแปรสูงในแต่ละช่วงเวลา (ค่า RI เท่ากับ 0.14, 0.85, 0.46, และ 0.75 ตามลำดับ) ซึ่งคาดว่า เป็นระดับการแสดงออกของยีนในระดับปกติ ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นชัดเจนเมื่อข้าวขาวดอกมะลิได้รับเชื้อที่เวลา 12 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 1.11) และอยู่ที่ระดับสูงสุดที่เวลา 24 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 2.32) และมีระดับการแสดงออกลดลงที่เวลา 72 และ 192 ชม. ข้าวหอมนิลกลุ่มควบคุมมีระดับการแสดงออกซึ่งคาดว่าเป็นระดับการแสดงออกของยีนในระดับปกติ ในระยะต่างๆ เช่นกัน ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อข้าวหอมนิลได้รับเชื้อที่เวลา 12 ชม (ค่า RI เท่ากับ 2.07) และลดระดับลงตามลำดับหลังจากนั้น (รูปที่ 8)



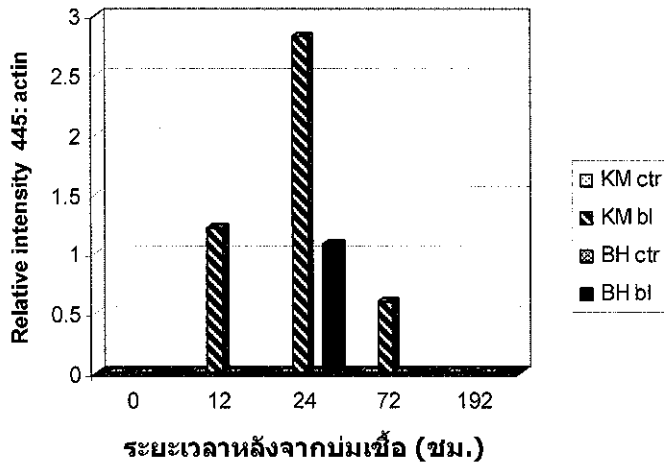
รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน PHGP กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

9) **Exoglucanase/ β -glucosidase ไอโซไซม์ 445 (BG445):** เป็นเอนไซม์ที่คาดว่าจะเกี่ยวกับการย่อยผนังเซลล์

ก่อนหน้านี้ Maneesan (2007) รายงานพบว่าเอนไซม์ BG445 มีระดับ mRNA เพิ่มสูงขึ้นในข้าวที่เกิดบาดแผล ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในการตอบสนองต่อราโรคไหม้ พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนภายใน 12 ชม. ในข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อ และระดับการแสดงออกเพิ่มสูงสุดที่เวลา 24 ชม. และลดลงหลังจากนั้นตามลำดับ โดยพิจารณาจากค่า RI ที่มีค่าเท่ากับ 0, 1.21, 2.83, 0.6 และ 0.02 ตามลำดับที่เวลา 0, 12, 24, 72, และ 192 ชม. ตามลำดับ ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวดอกมะลิลูกผสมควบคุม

พบระดับการแสดงออกของยีน BG445 ในข้าวหอมนิลหลังจากบ่มกับเชื้อรา 24 ชม. (ค่า RI เท่ากับ 1.08) แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในช่วงเวลาอื่นและไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวหอมนิลกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9)

ก่อนหน้านี้ ต่อมา Kim et al. (2003) ใช้วิธี Proteomic analysis ศึกษาความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่ผลิตขึ้นเมื่อข้าวได้รับ *M. grisea* พบว่ามีโปรตีน 14 ชนิดที่มีปริมาณสูงขึ้นในข้าวที่ได้รับเชื้อ ซึ่งรวมถึง β -glucosidase และ Wang et al. (2005) รายงานว่าระดับการแสดงออกของ EST contig BHPiw028 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ BG445 เพิ่มสูงขึ้นในการตอบสนองต่อเชื้อโรคโคนน้ำตาล ซึ่งได้จากการศึกษาด้วยวิธี subtractive hybridization cDNA library screening จึงเป็นไปได้ว่ายีนนี้น่าจะมีส่วนร่วมในระบบป้องกันเซลล์



รูปที่ 9 แผนภูมิแสดงสัดส่วนความเข้มแถบ DNA (Relative intensity) ระหว่างยีน BG445 กับ actin ที่ได้จากการทำ RT-PCR

ส่วนยีนที่ไม่พบการแสดงออกในทุกกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ PR2 gene accession AB070742 (β -1,3-glucanase), PR3 gene accession AB054811 (Chitinase class IV), PR5 gene accession AJ245900 (thaumatin-like proteins), PR12 gene accession XM466875 (Defensin) PR13 gene accession AB072337 (lipid-transfer protein), PR14 gene accession BF889445 (lipid-transfer protein)

ตารางที่ 3 สรุปผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของ PR gene และ defense related genes พบว่ายีนที่แสดงออกสูงขึ้นในข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อ ได้แก่ PR1a, PR1, PR4, PR6, PR9, PR10a, PR10, PHGP และ BG445 ยีนส่วนใหญ่มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 12 และ 24 ชม. ยกเว้นยีน PR10a ที่เวลา 72 ชม. ในขณะที่ข้าวหอมนิลที่ได้รับเชื้อมีเพียงยีน PR4, PR6, PR9, Glutathione และ BG445 ที่มีการแสดงออกสูงขึ้น โดยยีนส่วนใหญ่มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 12 และ 24 ชม. เมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาที่ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดระหว่างข้าวขาวดอกมะลิและข้าวหอมนิล พบว่ายีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาเดียวกัน ที่เวลา 24 ชม. ได้แก่ ยีน PR4, PHGP และ BG445 ส่วนยีนที่มีการแสดงออกสูงสุดในช่วงเวลาแตกต่างกัน ได้แก่ ยีน PR6 ของข้าวขาวดอกมะลิพบที่เวลา 24 ชม. ส่วนข้าวหอมนิลพบที่ 12 ชม. ยีน PR9 ของข้าวขาวดอกมะลิพบที่เวลา 12 ชม. ส่วนข้าวหอมนิลพบที่ 24 ชม.

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกลุ่ม pathogenesis-related proteins และ defense related genes ในข้าวขาวดอกมะลิและข้าวหอมนิล

ยีน	ระยะที่เวลาที่เกิดการชักนำในข้าวกลุ่มที่ได้รับเชื้อ (ชม.)		
	ข้าวขาวดอกมะลิ	ข้าวหอมนิล	หมายเหตุ
PR1a	12	ไม่พบการ แสดงออก	ที่ 0 และ 12 ชม. พบในระดับต่ำใน กลุ่มควบคุมข้าวขาวดอกมะลิ
PR1	12	ไม่พบการ แสดงออก	ที่ 0 และ 12 ชม. กลุ่มควบคุมข้าว ขาวดอกมะลิและข้าวหอมนิลพบที่ 0 และ 12 ชม. เล็กน้อย
PR4	12, 24*, 72, 192	24	ไม่พบในกลุ่มควบคุมของข้าวทั้งสอง ชนิด
PR6	12, 24*, 72, 192	12*, 24, 72, 192	พบในกลุ่มควบคุมในข้าวทั้งสอง ชนิดในทุกช่วงเวลา
PR9	12*, 24	12, 24*	ไม่พบในกลุ่มควบคุมของข้าวทั้งสอง ชนิด
PR10a	12, 24, 72*	ไม่พบการ แสดงออก	พบในกลุ่มควบคุมในข้าวขาวดอก มะลิที่เวลา 0 และ 72 ชม. และข้าว หอมนิลที่ 12 และ 72 ชม.
PR10	12*, 72, 192	12, 24, 72, 192 แต่ มีระดับไม่ต่างจาก กลุ่มควบคุมมาก	พบในกลุ่มควบคุมข้าวขาวดอกมะลิ ในทุกช่วงเวลาแต่มีระดับต่ำกว่ากลุ่ม ได้รับเชื้อ
PHGP	12, 24*, 72, 192	12, 24*	พบในกลุ่มควบคุมในข้าวขาวดอก มะลิที่เวลา 12-192 ชม. และข้าวหอม นิลที่ 0-72 ชม.
BG445	12, 24*, 72	24	ไม่พบในกลุ่มควบคุมของข้าวทั้งสอง ชนิด

* พบการแสดงออกของยีนในระดับสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาต่างๆ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้งข้าวขาวดอกมะลิซึ่งเป็นข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้และข้าวหอมนิลซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคไหม้ต่างมีการแสดงออกของ PR gene และ defense related genes เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับเชื้อเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างที่เด่นชัดในการแสดงออกของยีนทั้งสองกลุ่มระหว่างข้าวสองสายพันธุ์เมื่อได้รับเชื้อ นอกจากนี้ยังพบจำนวนชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อเชื้อในข้าวขาวดอกมะลิมากกว่าข้าวหอมนิล ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากระดับการเกิดอาการของโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิตั้งอยู่ในระดับที่ไม่รุนแรง ซึ่งส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนที่ไม่แตกต่างอย่างเด่นชัด หรืออาจเป็นไปได้ว่าข้าวพันธุ์ต้านทานอาจใช้ระบบการตอบสนองด้วยยีนต้านทานกลุ่มอื่นๆ ที่ไม่พบในข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคจึงทำให้ข้าวมีความต้านทานต่อเชื้อมากกว่า และการที่ชนิดของยีนที่มีการแสดงออกในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อมีบางชนิดที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานโดย Van Loon and Van Strien (1999) ที่ระบุว่าชนิดของ โปรตีน PR และ โปรตีนต่อต้านเชื้อที่ถูกชักนำขึ้นมา อาจแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อที่ได้รับ และแตกต่างกันในพืชแต่ละพันธุ์ มีงานทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าพืชแปลงพันธุ์ที่มีการผลิต โปรตีน PR เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติสามารถต้านทานต่อเชื้อเพียงบางชนิดเท่านั้น (Van loon, 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออก PR gene และ defense-related gene ในข้าวส่วนใหญ่จะแยกศึกษาการแสดงออกแต่ละยีน จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับผลการวิจัยนี้ได้ ตัวอย่างยีนที่มีการศึกษาในข้าวได้แก่ PR-1 (Schweizer et al., 1997), PR-2 (β -1,3-glucanases) and PR-3 (chitinase) (Anurata et al., 1996; Du and Wang, 1992; Yamaguchi et al., 2000), และ PR-5 (thaumatin-like protein) (Reimann and Dudler, 1993; Schweizer et al., 1997)

โปรตีน PR เป็นโปรตีนที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นเมื่อพืชได้รับเชื้อหรือปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (Van loon et al., 1994) โดยพบทั้งในระบบการตอบสนองแบบเฉียบพลันหรือแบบกระจาย เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อกระจายเพิ่มขึ้น มีการค้นพบว่าการสังเคราะห์โปรตีน PR ถูกควบคุมตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน (transcription) โปรตีน PR จะถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากได้รับเชื้ออย่างน้อย 8 ชม. (Matsuoka and Ohashi, 1986; Jantasuriyarat et al., 2005) มีงานวิจัยที่มีการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน PR Wubben et al. (1996) พบว่าพืชมีการสะสมโปรตีน PR เพิ่มขึ้นมากเมื่อได้รับเชื้อ พืชต้านทานจะสะสมมากกว่าพืชอ่อนแอต่อโรค เช่น มะเขือเทศกับเชื้อ *Cladosporium fulvum*; มันฝรั่งกับเชื้อ *Phytophthora infestans* (Tónon et al., 2002) แอปเปิ้ลกับเชื้อ *Venturia inaequalis* (Poupard et al., 2003) องุ่นกับเชื้อ *Pseudomonas syringae* (Robert et al., 2001) พริกไทยกับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และ TMVPo (Park et al., 2004 a, b) เป็นต้น แต่ในพืชบางชนิดมีการสะสม mRNA ของยีน PR ในระดับใกล้เคียงกันเมื่อได้รับเชื้อที่ก่อโรค (compatible) และไม่ก่อโรค (incompatible) แต่ระดับ mRNA ที่เพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดจะเกิดขึ้นในพืชที่ได้รับเชื้อที่ก่อโรคจะเร็วกว่าเชื้อไม่ก่อโรค (Van Kan et al., 1992)

การที่การทดลองนี้กลับพบว่าทั้งข้าวพันธุ์ด้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อโรคใหม่ต่างมีการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ด้วยการแสดงออกของยีนในกลุ่ม PR และยีนที่เกี่ยวข้องในระบบป้องกันเซลล์ไม่แตกต่างกันมากนัก อาจบ่งชี้ว่า PR อาจจะไม่ได้รับบทบาทในการกระตุ้นการสร้างความต้านทานของพืชต่อเชื้อ (induction of resistance) แต่อาจจะมีบทบาทในการป้องกันการรุกรานของเชื้อ (protective state) ดังที่พบทั้งในระบบการตอบสนองแบบเฉียบพลันหรือแบบกระจาย (Van loon, 1997) สอดคล้องกับรายงานว่าก่อนหน้านี้โดย (Edreva, 2005) พบว่าระดับการแสดงออกของ PR สามารถถูกชักนำให้เพิ่มสูงขึ้นได้ไม่เพียงแต่ในพืชด้านทานแต่รวมถึงพืชอ่อนแอต่อโรคด้วยเช่นกัน รวมทั้งปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางกายภาพยังมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มนี้ Kim et al. (2003) ใช้วิธี Proteomic analysis ศึกษาความแตกต่างของปริมาณโปรตีนที่ผลิตขึ้นเมื่อข้าวได้รับ *M. grisea* พบว่ามีโปรตีน 14 ชนิดที่มีปริมาณสูงขึ้นในข้าวที่ได้รับเชื้อ ได้แก่ pathogenesis-related protein class 10, isoflavone reductase, β -glucosidase, putative-receptor like protein kinase เป็นต้น ซึ่งยีนเหล่านี้ทำงานเกี่ยวกับระบบป้องกันเซลล์ เมื่อเร็วๆ นี้ Jantasuriyarat et al. (2005) ได้ใช้ northern blot analysis ศึกษาพบว่า ยีน 5 ชนิดในระบบต่อต้านเชื้อ และระบบส่งสัญญาณ ถูกชักนำเพิ่มขึ้นชัดเจนหลังจากได้รับเชื้อ *M. grisea* 12 หรือ 24 ชม. และลดระดับลงมาที่ระดับปกติที่เวลา 72 ชม. แต่ระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในข้าวด้านทานและอ่อนแอต่อโรคไม่แตกต่างกันมาก ยีนที่อยู่ในระบบต่อต้านเชื้อที่ศึกษามีดังนี้ wound-induced protein, flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase, endo-1,3- β -glucanase, polygalacturonase inhibiting protein, terpene synthase/cyclase ยีนในระบบส่งสัญญาณมีดังนี้ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase, receptor-like protein kinase with lectin domains, bHLH transcription factor, Putative wound inductive protein, serine/threonine protein phosphatase

แต่มีข้อน่าสังเกตที่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน PR ในข้าวหอมนิลเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ ที่เวลา 12 หรือ 24 ชม. เท่านั้น อาจเนื่องมาจากข้าวหอมนิลมีการสร้างระบบด้านทานต่อราโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพมากจึงไม่มีสัญญาณส่งมาจากตัวกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้การแสดงออกของยีน PR ลดลงอย่างรวดเร็ว ต่างจากกรณีของข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อที่พบการแสดงออกของยีนครอบคลุมช่วงเวลาที่ยาวนานกว่า 12-72 ชม. อาจเป็นเพราะเชื้อสามารถกระจายตัวได้อย่างต่อเนื่องจึงทำให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้น

นอกจากนี้ Reimmann et al. (1992) ยังพบว่าพืชหลายชนิดที่ได้รับเชื้อที่ไม่ก่อโรคจะมีการตอบสนองต่อเชื้อด้วยการกระตุ้นยีนในระบบป้องกันเซลล์ และมีการชักนำระบบด้านทานในพืชเช่นกัน Manandhar et al. (1999) ได้ใช้ cDNA ของ PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 and PR-5 และ PR9 จากบาร์เลย์เป็นตัวติดตามในการทำ northern blot analysis พบว่า PR ทุกชนิดยกเว้น PR4 ตอบสนองต่อเชื้อ *M. grisea* ทั้งแบบ avirulent และ virulent โดยพบว่าสะสมเพิ่มขึ้นชัดเจนหลังจากบ่มกับเชื้อ 48

ชม. ซึ่งตรวจพบเพียงเล็กน้อยตั้งแต่ 24 ชม. หรือก่อนหน้านั้น ขณะที่ PR4 ตรวจพบในข้าวที่บ่มกับ virulent ที่ 72 ชม. และ กับ avirulent ที่ 96 ชม. ระดับการแสดงออกสูงสุดของยีน PR2 และ PR9 พบที่ 72 ชม. ที่บ่มกับเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ แต่ PR9 พบการแสดงออกครอบคลุมตั้งแต่ 48-96 ชม. PR1 พบสูงสุดที่ 72 ชม. เมื่อบ่มกับ avirulent และที่ 96 ชม. กับ virulent ส่วน PR3, PR4 และ PR5 มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ 120 ชม. เมื่อบ่มกับเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ งานวิจัยนี้พบสิ่งที่น่าสนใจเกี่ยวกับ การสะสม mRNA เมื่อบ่มกับ virulent มากกว่า avirulent เช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาในข้าวบาร์เลย์ ต่อเชื้อ *Drechslera teres* (Reiss, 1996) และเพื้อ powdery mildew (Gregersen et al., 1997) ผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับที่พบในข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อ โรคใหม่ชนิดที่ก่อให้เกิดโรค ในการศึกษานี้

โดยสรุปจากการทดลองในโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนของโปรตีน PR และยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบความต้านทานในข้าวขาวดอกมะลิและข้าวหอมนิล ไม่เป็นตัวบ่งชี้ ความแตกต่างต่อความต้านทานต่อเชื้อราโรคใหม่ในข้าวทั้งสองพันธุ์ แต่การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ โปรตีนบางชนิดในกลุ่มนี้อาจมีบทบาทในการป้องกันการรุกรานของเชื้อทั้งในระบบเย็บปล้นและ กระจายและมีบทบาทต่อเชื้อในระดับพื้นฐานต่อเชื้อแบบไม่จำเพาะเพื่อป้องกันการกระจายของเชื้อ ซึ่งจะพบได้ทั้งข้าวพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้เป็นเพียงข้อมูลแบบ semiquantitative เนื่องจากระดับการแสดงออกของยีนที่ใช้อ้างอิงอาจมีความผันแปรในแต่ละกลุ่ม

2. การศึกษาหน้าที่ของ Exoglucanase/ β -glucosidase ต่อการตอบสนองต่อเชื้อราโรคใหม่

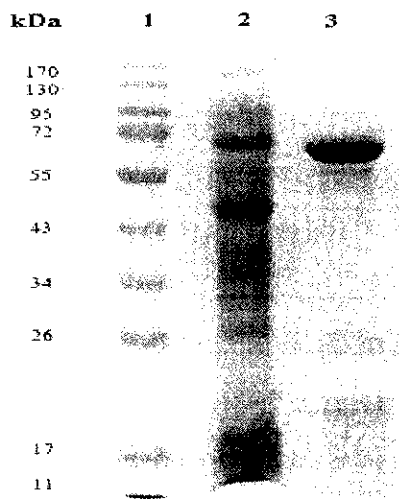
ผลการจากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าของยีนของ exoglucanase/ β -glucosidase ไอโซไซม์ 445 (BG445) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในข้าวขาวดอกมะลิที่ได้รับเชื้อราโรคใหม่ ภายใน 12 ชม. และพบระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 24 ชม. และในข้าวหอมนิลหลังจากบ่มกับเชื้อ 24 ชม. แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในกลุ่มควบคุมของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ก่อนหน้านี้ Maneesan (2007) ศึกษาพบว่าระดับ mRNA ของยีนนี้เพิ่มสูงขึ้นในข้าวที่เกิดบาดแผล นอกจากนี้ Kim et al. (2003) พบว่า β -glucosidase มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวที่ได้รับเชื้อราโรคใหม่ และ Wang et al. (2005) รายงานว่า EST contig BHPiw028 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ BG445 มีปริมาณ เพิ่มขึ้นในข้าวที่ได้รับเพื้อกระโดดสีน้ำตาล จึงเป็นไปได้ว่ายีนนี้น่าจะมีส่วนร่วมในระบบป้องกัน เซลล์ ผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาหน้าที่ของยีนนี้ในข้าว

BG445 ที่นำมาศึกษานี้ถูกจัดไว้ใน Glycosyl hydrolase family 1 (CAZY, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) ในงานวิจัยก่อนหน้าผู้วิจัยได้เพิ่มจำนวน cDNA ขนาดเต็มสายของ BG445 (1635 bp) จากต้นอ่อนข้าว (Opassiri et al., 2006) cDNA นี้ประกอบด้วยส่วนที่เป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโน 510 ตัวของโปรตีน และพบ signal peptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 24 ตัว อยู่ด้านปลาย

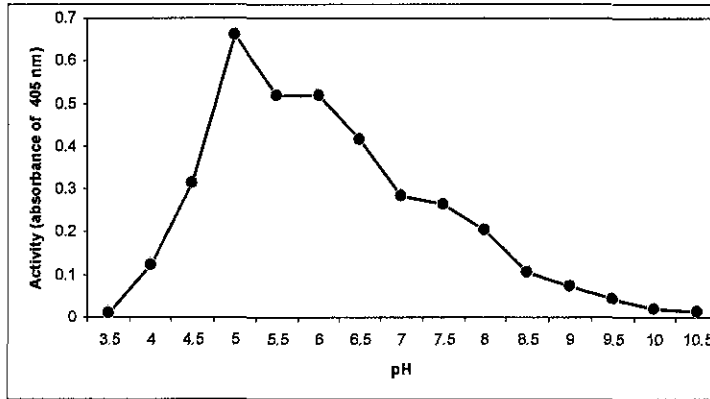
อะมิโนจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ signal peptide คาดว่าเอนไซม์นี้น่าจะถูกส่งออกนอกเซลล์ งานทดลองนี้เริ่มจากตัดต่อ cDNA ของ BG445 เข้ากับ expression vector แล้วนำไปผลิตโปรตีนในแบคทีเรียให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์

2.1 การผลิตโปรตีนจาก cDNA ของ BG445

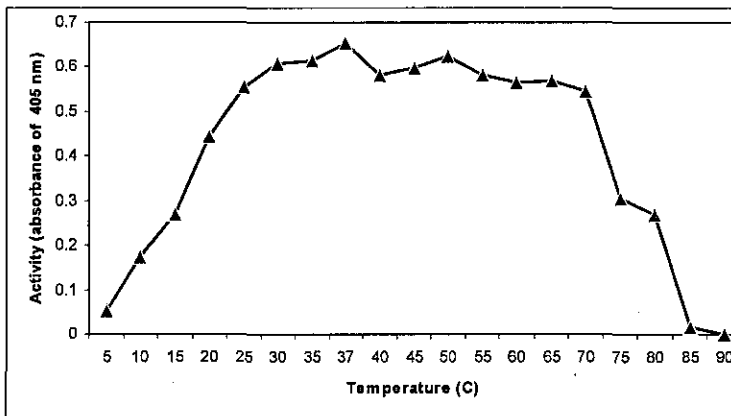
ได้ทำการเพิ่มจำนวน cDNA ของ BG445 ที่ไม่มี signal peptide ด้วยวิธี PCR จากนั้นจึงตัดต่อ cDNA เข้ากับ pET32a+/DEST ซึ่งเป็น expression vector แล้วส่งพลาสมิดสายผสมนี้เข้าไปในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ Origami (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก cDNA ของ BG445 ผลการทดลองพบว่าโปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในสภาพที่สามารถทำงานได้ ที่ปลายอะมิโนของโปรตีนมีโปรตีนไทโอรีดอกซินและบริเวณที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเรียงต่อกัน 6 ตัวต่ออยู่ จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนนี้มีขนาด 69 kDa (รูปที่ 10) ได้แยกโปรตีนสายผสมนี้ให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะที่มีโอบอลด์เป็นลิแกนด์ต่ออยู่กับเรซิน (IMAC) จากการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาโดยทดสอบกับ $pNP\text{-}\beta\text{-D-glucoside}$ ซึ่งเป็นสับสเตรทสังเคราะห์ พบว่าเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 และที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30-65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 11 และ 12)



รูปที่ 10 SDS-PAGE ของ BG445 ที่ต่ออยู่กับโปรตีนไทโอรีดอกซินที่ผลิตขึ้นใน *E. coli* สายพันธุ์ OrigamiB (DE3) ได้ใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.3 mM เป็นสารชักนำการผลิตโปรตีน และเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 8 ชม. แถวที่ 1 เป็นโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาด (Bio-RAD) แถวที่ 2 รีคอมบิแนนท์ BG445 ที่สกัดได้จาก *E. coli* แถวที่ 3 BG445 ที่ถูกแยกออกมาให้บริสุทธิ์ด้วย IMAC



รูปที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ BG445 ในการย่อย *pNP-β-D-glucoside* ความเข้มข้น 0.2 mM ในบัฟเฟอร์ pH 3.5-10.5 โดยใช้บัฟเฟอร์ formate pH 3.5-4, sodium acetate pH 4.5-5.5, sodium phosphate pH 6-8.5 และ CAPS pH 9-10.5 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



รูปที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ BG445 ในการย่อย *pNP-β-D-glucoside* ความเข้มข้น 0.2 mM ใน sodium acetate pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 5-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ BG445

ได้นำเอนไซม์ BG445 ที่ผลิตได้มาทดสอบกับสับสเตรทที่เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้สกัดผนังเซลล์ของเชื้อราโรคใหม่มาใช้ทดสอบกับเอนไซม์ BG445 แต่กลับพบว่าเอนไซม์ไม่สามารถย่อยส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราได้ ดังนั้นการแสดงออก BG445 ที่เพิ่มสูงขึ้นในข้าวจึงไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับย่อยผนังเซลล์เชื้อราโดยตรง

มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า endoglucanase หลายชนิดได้แก่ endo-1,3-β-glucanase, และ endo-1,3;1,4-β-glucanase ในพืชมีส่วนร่วมในระบบป้องกันเซลล์พืชโดยช่วยย่อยผนังเซลล์พืชและเชื้อราจนเป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของยีนหลายชนิดใน

ระบบการส่งสัญญาณของเซลล์ที่ตอบสนองต่อเชื้อ (Yamaguchi et al., 2000, Nishizawa et al., 2003) นอกจากนี้ endoglucanase น่าจะทำงานร่วมกับ β -glucosidase ในการย่อยเซลลูโลสหรือ β -glucans ชนิดต่างๆ ของผนังเซลล์ เพื่อนำโอลิโกแซคคาไรด์หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ย่อยได้หมุนเวียนกลับไปสังเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ในช่วงที่มีพืชมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ (Akiyama et al., 2004) ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ BG445 ด้วยการนำเอนไซม์ BG445 มาทดสอบกับโพลีแซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์พืชด้วย endoglucanase ชนิดต่างๆ

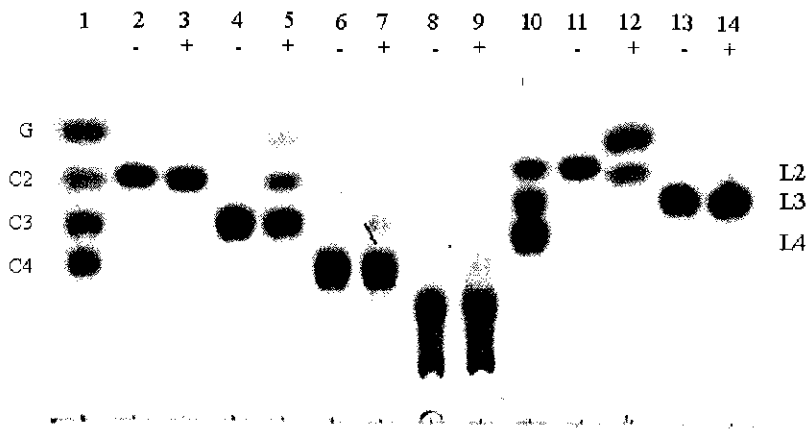
ตารางที่ 4 ความจำเพาะในการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ของเอนไซม์ BG445

Substrate	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Relative activity ^b (%)
<i>p</i> NP- β -D-glucoside	8.82 \pm 0.7	100
Laminaribiose	19.52 \pm 3.9	221 \pm 44
Laminaritriose	n.d. ^c	n.d. ^c
Laminaritetraose	n.d. ^c	n.d. ^c
Laminaripentaose	n.d. ^c	n.d. ^c
Cellobiose	n.d. ^c	n.d. ^c
Cellotriose ^d	23.07 \pm 3.6	291 \pm 1
Cellotetraose ^d	23.58 \pm 6.4	294 \pm 34
Cellopentaose ^d	22.13 \pm 5.7	277 \pm 29
Cellohexaose ^d	22.11 \pm 7.8	274 \pm 54
Gentiobiose	n.d. ^c	n.d. ^c
Laminarin	n.d. ^c	n.d. ^c
Barley 1,3;1,4- β -glucans	n.d. ^c	n.d. ^c
<i>M. grisea</i> cell wall extracts	n.d. ^c	n.d. ^c

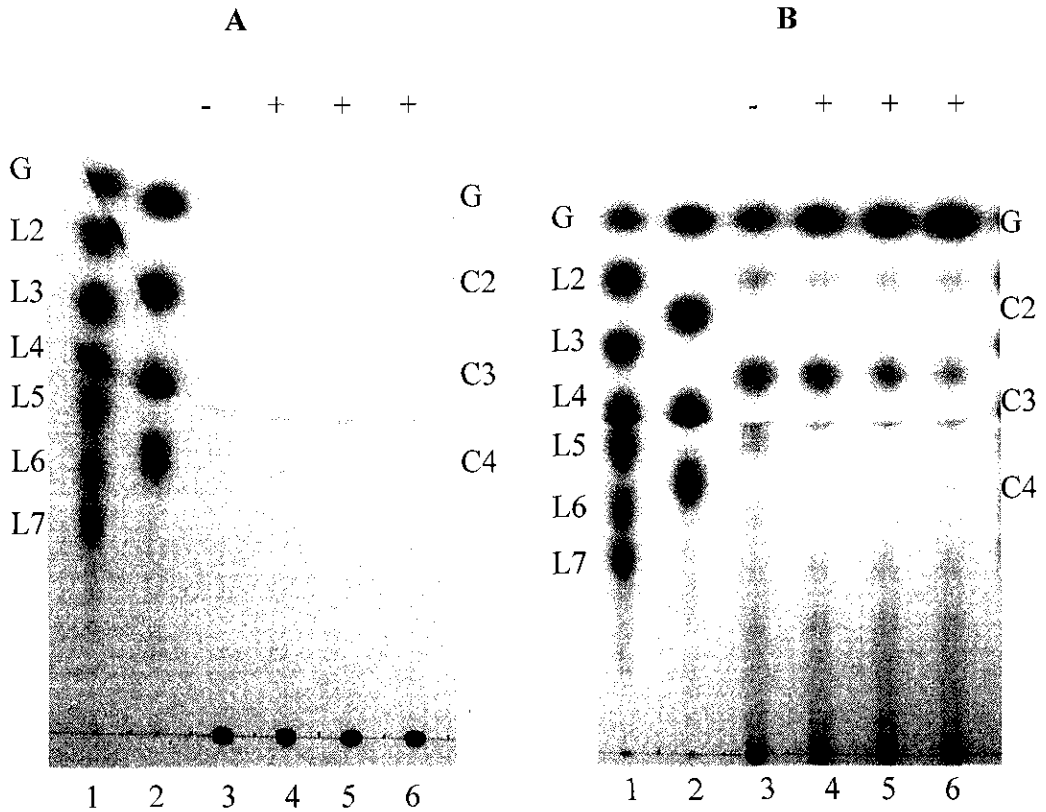
^a สารละลายในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 50 μL ประกอบด้วยเอนไซม์ 2.97 pmol สับสเตรทความเข้มข้น 1 mM ในบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate pH 5.0 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ^b ค่าร้อยละของกิจกรรมของเอนไซม์เทียบจากค่า specific activity ของสับสเตรท *p*NP- β -D-glucoside ^c หมายถึงไม่สามารถวัดได้ ^d ปริมาณกลูโคสที่ใช้คำนวณ specific activity คัดจากปริมาณกลูโคสทั้งหมดที่ได้จากการย่อยจากโอลิโกแซคคาไรด์

ดังที่แสดงในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ BG445 สามารถย่อยไคแซคคาไรด์ที่มีกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β -(1,3) (laminaribiose) ได้ดีมาก แต่ไม่สามารถย่อยไคแซคคาไรด์ที่มีพันธะแบบ β -(1,4) (cellobiose) และ β -1,6 (gentiobiose) นอกจากนี้เอนไซม์ยังย่อยโอลิโกแซค

คาไรด์ที่มีกลูโคสต่อกัน 3-6 หน่วย ด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β -(1,4) (cellooligosaccharides) ได้ดี มาก แต่ไม่สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกลูโคสต่อกัน 3- 5 หน่วย ด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β -(1,3) (laminarioligosaccharides) เอนไซม์ไม่สามารถย่อยโพลิเมอร์ของกลูโคสที่มีกลูโคสต่อกัน ด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β -(1,4) (cellulose), β -(1,3) (laminarin) และ β -(1,3),(1,4) (barley β -glucan) เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบน้ำตาล monosaccharide หรือ oligosaccharide หลังจากบ่ม สับสเตรทเหล่านี้กับเอนไซม์ จากการวิเคราะห์รูปแบบการย่อย cellooligosaccharides และ cellobiose และ laminaribiose ด้วย TLC (รูปที่ 13) พบว่าเอนไซม์นี้มีการทำงานในรูปแบบเช่นเดียวกับเอนไซม์ exoglucanase ซึ่งคล้ายคลึงกับเอนไซม์ β -glucosidases ไอโซไซม์ BGlu1 (Opassiri et al., 2004) เมื่อนำเอนไซม์นี้ไปบ่มร่วมกับโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase พบว่าเอนไซม์ BG445 สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าวได้ (รูปที่ 14)



รูปที่ 13 การวิเคราะห์การย่อยโอลิโกแซคคาไรด์และโอลิโกแซคคาไรด์ด้วย BG445 ปฏิกริยา ประกอบด้วยเอนไซม์ BG445 2.97 pmol, สับสเตรท 5 mM โดยทำปฏิกริยาในบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate pH 5.0 ที่มีปริมาตรรวม 50 μ L บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกริยาด้วย TLC บน silica gel60 plates โดยใช้สารตัวพาที่ ประกอบด้วย ethyl acetate-acetic acid-น้ำ (2:1:1) ในการแยกน้ำตาล แล้วพ่นแผ่น TLC ด้วย 10% H_2SO_4 ใน ethyl alcohol และนำไปอบที่ 120 องศาเซลเซียส 5-10 นาที สัญลักษณ์ + และ - หมายถึง ปฏิกริยาที่มีและไม่มีเอนไซม์ BG445 ตามลำดับ ช่องที่ 1 น้ำตาลมาตรฐานได้แก่ glucose (G) และ cello-oligosaccharides ที่มีจำนวน glucose 2-4 หน่วย (C2-C4); 2 และ 3, cellobiose; 4 และ 5, cellotriose; 6 และ 7, cellotetraose; 8 และ 9, cellopentaose; 10, laminari-oligosaccharides มาตรฐาน ที่มี glucose 2-4 หน่วย (L2-L4); 11 และ 12, laminaribiose; 13 และ 14, laminaritriose



รูปที่ 14 การวิเคราะห์การย่อยผลผลิตที่ได้จากผนังเซลล์ข้าวจากเอนไซม์ *endo-1,3;1,4-β-glucanase* และเอนไซม์ BG445 ด้วย TLC รูป A ผลการย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ BG445 ปฏิกริยา 20 mL ประกอบด้วยผนังเซลล์ข้าว 100 mg, รีคอมบิแนนท์ BG445 ของข้าว 100 pg ในบัฟเฟอร์ 10 mM sodium acetate pH 5.2 บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที รูป B ผลการย่อยผนังเซลล์ข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ *endo-1,3;1,4-β-glucanase* และเอนไซม์ BG445 ที่ช่วงเวลาต่างๆ ปฏิกริยาประกอบด้วย โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ *endo-1,3;1,4-β-glucanase* ของข้าว 10 μL, เอนไซม์ BG445 14.5 pg (1 μL) และ 50 mM sodium acetate pH 5.2 2 μL บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกริยาด้วย TLC บน silica gel60 plates (Merck, Darmstadt, Germany) โดยใช้สารตัวพาที่ประกอบด้วย 75% acetonitrile แล้วพ่นแผ่น TLC ด้วย 10% H₂SO₄ ใน ethyl alcohol และนำไปอบที่ 150 องศาเซลเซียส 10 นาที สัญลักษณ์ + และ - หมายถึงปฏิกริยาที่มีและไม่มีเอนไซม์ BG445 ตามลำดับ ช่องที่ 1 น้ำตาลมาตรฐานได้แก่ glucose (G) และ laminarioligosaccharides ที่มีจำนวน glucose 2-7 หน่วย (L2-L7); 2 , cello-oligosaccharides ที่มีจำนวน glucose 2-4 หน่วย (C2-C7); 3 ปฏิกริยากลุ่มควบคุมที่ไม่มีเอนไซม์ BG445; 4-6 ปฏิกริยากลุ่มที่เติมเอนไซม์ BG445 ที่บ่มที่เวลา 10, 30 และ 60 นาที ตามลำดับ

การที่ยีน BG445 แสดงออกเพิ่มขึ้นในต้นอ่อนข้าวหลังจากบ่มกับเชื้อราโรคไหม้ทั้งในข้าวขาวดอกมะลิและข้าวหอมนิล อาจเป็นผลจากการส่งสัญญาณของฮอร์โมนพืชที่ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่มีส่วนร่วมในระบบป้องกันเซลล์เพื่อไม่ให้เซลล์ถูกทำลาย หรือเพื่อป้องกันการกระจายตัวของเชื้อไปยังเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ กลไกป้องกันเซลล์พืชมีหลายกระบวนการ การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์พืชเป็นหนึ่งในวิธีที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ (Rolland et al., 2006) จากการศึกษาที่เอนไซม์ BG445 สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกลูโคสด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β -(1,4) และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีพันธะแบบ β -(1,3) และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase เอนไซม์ BG445 อาจมีบทบาทในกระบวนการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์ตรงบริเวณที่ถูกทำลายโดยเชื้อราโดยทำงานร่วมกับ endoglucanase ในการย่อยสลาย (1,4)- β -glucan (cellulose), (1,3)(1,4)- β -glucan และ (1,3)- β -glucan ตรงผนังเซลล์จนได้น้ำตาลที่จะนำไปใช้ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างผนังเซลล์บริเวณที่เกิดบาดแผลเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเข้ามาในเซลล์ได้อีก มีรายงานว่าพืชตระกูลหญ้าสามารถตัดกลูโคสออกมาจาก β -glucans แล้วนำไปเปลี่ยนเป็น nucleotide sugar ชนิดต่างๆ เพื่อนำไปสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ เช่น β -glucans หรือโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ (Gibeaut and Carpita, 1991; Carpita and Gibeaut, 1993) มีการตั้งสมมุติฐานว่าเอนไซม์เหล่านี้ที่พบในพืชวงศ์หญ้าอาจถูกส่งออกไปที่บริเวณผนังเซลล์เพื่อย่อย cellulose และ β -glucans (Taiz, 1984; Buchanan et al., 2000)

ก่อนหน้านี้มีการค้นพบการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์โดยใช้น้ำตาลเป็นสื่อกลางในพืช เรียกระบบนี้ว่า sugar sensing โดยอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของสารสังเคราะห์ด้วยแสงการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสและแป้ง รวมทั้งการย่อยสลายผนังเซลล์ (Rolland et al., 2006) เอนไซม์ในกลุ่ม glycosyl hydrolase หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยผนังเซลล์มีการแสดงออกสูงขึ้นในพืชที่อยู่ภายใต้สภาวะเครียด เช่น ภาวะขาดน้ำตาล และได้รับเชื้อก่อโรค (Contento et al., 2004; Fujiki et al., 2001; Lee et al., 2004; Rolland et al., 2006) มีการคาดกันว่าพืชมีระบบติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างของผนังเซลล์ตลอดช่วงการเจริญเติบโต และมีระบบส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว (Pilling and Hofte, 2003; Somerville et al., 2004) ตัวอย่างเช่น พืชกลายพันธุ์ที่ขาด cellulase synthase ทำให้ยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดซึ่งปกติจะถูกควบคุมการแสดงออกด้วย ฮอร์โมน ethylene และ jasmonate ทำงานเพิ่มขึ้น และส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อราดีขึ้น และมีลิกนินผลิตสูงขึ้นด้วย (Ellis et al., 2002; Cano-Delgado et al., 2003) และงานวิจัยล่าสุดพบว่าโปรตีนที่ทำหน้าที่รับสัญญาณ คือ membrane-bound receptor kinase ซึ่งทำงานเกี่ยวข้องกับการยึดตัวของ hypocotyl มีการตอบสนองเมื่อพืชสังเคราะห์ cellulose ลดลง แสดงให้เห็นว่ามีกลไกเชื่อมโยงการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ กับระบบการทำงานในเซลล์ (Hematy et al., 2007)

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนต้านทานในระบบป้องกันเซลล์ในข้าวหอมนิลซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อราโรคไหม้ ในข้าวอายุ 3 สัปดาห์ จากการเปรียบเทียบระดับ cDNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย RT-PCR ของยีน PR gene จำนวน 13 ยีน และ defense-related gene จำนวน 2 ยีน พบว่าข้าวทั้งสองพันธุ์มีการแสดงออกของยีนบางชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเชื้อ จำนวนชนิดของยีนที่มีการแสดงออกในข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีมากกว่าข้าวหอมนิล ยีนส่วนใหญ่มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 12 และ 24 ชม. แต่ไม่พบความแตกต่างที่เด่นชัดในการแสดงออกของยีนระหว่างข้าวสองสายพันธุ์ การแสดงออกของยีนในข้าวหอมนิลเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาสั้นๆ ที่เวลา 12 หรือ 24 ชม. แต่ข้าวขาวดอกมะลิมีการแสดงออกของยีนครอบคลุมช่วงเวลาบ่มที่ยาวนานกว่าถึง 12-72 ชม. การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนเหล่านี้อาจมีบทบาทในการสร้างความต้านทานในระดับพื้นฐานในพืชในการตอบสนองต่อเชื้อแบบไม่จำเพาะเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อ โดยพบได้ทั้งในข้าวพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีนของโปรตีน PR และ defense-related gene ในข้าวทั้งสองพันธุ์ไม่เพียงพอซึ่งต่อความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในข้าว อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้เป็นเพียงข้อมูลแบบ semiquantitative เนื่องจากระดับการแสดงออกของยีนที่ใช้อ้างอิงอาจมีความผันแปรในแต่ละกลุ่มเพื่อยืนยันผลการทดลองที่แม่นยำมากขึ้นจำเป็นต้องใช้เทคนิค Northern blot analysis หรือ Real time PCR แต่เป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายสูง

เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาหน้าที่ของ exoglucanase/ β -glucosidase ไอโซไซม์ 445 (BG445) ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวขาวดอกมะลิ และในข้าวหอมนิลที่ได้รับเชื้อราโรคไหม้แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม จากการศึกษาพบว่า BG445 ซึ่งผลิตได้ในรูปของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไม่สามารถย่อยส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราได้ แต่เอนไซม์สามารถย่อยยกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบที่ผนังเซลล์ของข้าวได้ ได้แก่ cello-oligosaccharides (พันธะ β -1,4) laminaribiose (พันธะ β -1,3) และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยผนังเซลล์ข้าวด้วยเอนไซม์ endo-1,3;1,4- β -glucanase ได้ BG445 อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์ตรงบริเวณที่ถูกทำลายจากเชื้อราโรคไหม้ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันเซลล์พืช อย่างไรก็ตามเอนไซม์นี้อาจย่อยสลายได้หลายชนิด เพื่อทำให้เกิดความเข้าใจถึงหน้าที่ของเอนไซม์นี้มากขึ้น งานวิจัยที่ควรจะได้ดำเนินการในขั้นต่อไป ได้แก่ การค้นหาสับสเตรทธรรมชาติที่พบในข้าวและการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้

บรรณานุกรม

- บุญรัตน์ จงดี, พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, สุรพงษ์ สาครรัง และ Atlin, G. N. (2546). รายงานการวิจัย เรื่องความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้. สถาบันวิจัยข้าว: ปทุมธานี.
- สงกรานต์ จินตราภรณ์ และ บริบูรณ์ สมฤทธิ. (2544). พัฒนาการข้าวไทย. ใน ศูนย์พันธุวิศวกรรม-ศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. หน้า 67. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ: กรุงเทพมหานคร.
- สมศักดิ์ ทองดีแท้. (2541). โรคแมลง สัตว์ศัตรูข้าวและการป้องกันกำจัด. ใน เอกสารประกอบการบรรยายหลักสูตรเทคโนโลยีการผลิตข้าวหอมมะลิคุณภาพดี. หน้า 82-84. โครงการผลิตและจำหน่ายข้าวหอมมะลิของสหกรณ์ กรมวิชาการเกษตรและกรมส่งเสริมการเกษตร: กรุงเทพมหานคร.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และ ชีรยุทธ ตูจินดา. (2544). เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. ใน ศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. หน้า 97. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ: กรุงเทพมหานคร.
- Agrawal, G. K., Jwa, N-S., Hanb, K-S., Agrawal, V. P. and Rakwalc, R. (2003). Isolation of a novel rice PR4 type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components. Plant Physiol. Biochem. 41: 81-90.
- Agrawal, G. K., Jwa, N-S. and Rakwal. R. (2000). A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 274: 157-165.
- Akiyama, T., Pillai, M. A. and Sentoku, N. (2004). Cloning, characterization and expression of OsGLN2, a rice endo-1,3- β -glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds. Planta. 220: 80-86.
- Akiyama T, Shibuya N. (2001). Expression of endo-1,3- β -glucanase genes in rice panicles and roots: cDNA cloning and expression in *Escherichia coli*. Plant Cell Physiol. 42: Supplement 105.
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weyman, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. and Ryals, J. (1993). Increased tolerance to two

- oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogen-related protein 1a. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7327-7331.
- Anurata, C. S., Zen, K-C., Cole, K.C., Mew, T. and Muthukrishnan, S. (1996). Induction of chitinase and β -1,3-glucanases in *Rhizoctonia solani*-infected rice plants: isolation of an infection-related chitinase cDNA clone. Physiologia Plantarum. 97: 39-46.
- Anžlovar, S., Serra, M.D., Dermastia, M. and Menestrina, G. (1998). Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein lunusitin from flax seed. Mol. Plant Microbe Interact. 11: 610-617.
- Ballini, E., Morel, J. B., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Nottoghem, J-L. and Tharreau, D. (2008). A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 21: 859-868.
- Bernier, F. and Berna, A. (2001). Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly?. Plant Physiol. Biochem. 39: 545-554.
- Bloch, C., Patel, Jr., S. U., Baud, F., Zvelebil, M. J., Carr, M. D., Sadler, P. J. and Thornton, J. M. (1998). 1H NMR structure of an antifungal G-thionin protein SIa1: similarity to scorpion toxins. Proteins. 32:334-349.
- Bormann, C., Baier, D., Horr, I., Raps, C., Berger, J., Jung, G. and Schwartz, H. (1999). Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein *Streptomyces tendae* Tu901 that interferes with growth polarity. J. Bacteriol. 181: 7421-7429.
- Boudart, G., Lafitte, C., Barthe, J-P., Fraser, D. and Esquerré-Tugayé, M-T. (1998). Differential elicitation of defense responses by pectic fragments in bean seedlings. Planta. 206: 86-94.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P. and Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of host defense system. Plant Physiol. 108: 1353-1358.
- Bryan, G. T., Wu, K-S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H. P., McAdams, S. A., Faulk, K. N., Donaldson, G. K., Tarchini, R. and Valent, B. (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. Plant Cell. 12: 2033-2045.

- Bryngelsson, T., Sommer-Knudsen, J., Gregersen, P. L., Collinge, D. B., Ek, B. and Thordal-Christensen, H. (1994). Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. Mol. Plant Microbe Interact. 7: 267-275.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones R.L. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. John Wiley and Sons, Inc.: New Jersey.
- Buchel, A. S. and Linthorst, H. J. M. (1999). PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In S. K. Datta and S. Muthukrishnan, Pathogenesis-related Proteins in Plants. pp. 21-47. CRC Press LLC: Boca Raton.
- Cameron, R. K. (2000). Salicylic acid and its role in plant defense responses: what do we really know?. Physiol. Mol. Plant Pathol. 56: 91-93.
- Cano-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M. and Bevan, M. (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 34: 351-362.
- Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J. 3: 1-30.
- Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P. and Buonocore, V. (1999). Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. Plant Sci. 140: 107-120.
- Contento, A. L., Kim, S. J. and Bassham, D. C. (2004). Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to suc starvation. J. Plant Physiol. 135: 2330-2347.
- Cote, F., Cutt, J. R., Asselin, A. and Klessig, D. F. (1991). Pathogenesis-related acidic β -1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. Mol. Plant Microbe Interact. 4: 173-181.
- Datta, K., Velazhahan, R., Oliva, N., Ona, I., Mew, T., Khush, G. S., Muthukrishnan, S. and Datta, S. K. (1999). Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. Theor. Appl. Genetics. 98: 1138-1145.
- Du, L. C. and Wang, J. (1992). Activities and distribution of chitinase and β -1,3-glucanase in rice induced by *Pyricularia oryzae*. Acta Phytopathologica Sinica. 18: 29-36.

- Edreva, A. M., 1990. Induction of "pathogenesis-related" proteins in tobacco leaves by physiological (non-pathogenic) disorders. J. Exp. Bot. 41: 701-703.
- Edreva, A. (1991). Stress proteins of plants-PR(b)-proteins. Sov. Plant Physiol. 38: 579-588.
- Edreva, A. (2004). A novel strategy for plant protection: induced resistance. J. Cell Mol. Biol. 3: 61-69.
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen. Appl. Plant Physiol. 31 (1-2): 105-124.
- Edreva, A., Blancard, D., Delon, R., Bonnet, P. and Ricci, P. (2002). Biochemical changes in β -cryptogein-elicited tobacco: a possible basis of acquired resistance. Beitr. Tabakforsch. Internat. 20: 53-59.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. and Turner, J. G. (2002). The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. Plant Cell. 14: 1557-1566.
- Fagoaga, C., Rodrigo, I., Conejero, V., Hinarejos, C., Tuset, J. J., Arnau, J., Pina, J. A., Navarro, L. and Peña, L. (2001). Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. Mol. Breed. 7: 175-185.
- Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. Curr. Opin. Immunol. 10: 16-22.
- Fujibe, T., Watanabe, K., Nakajima, N., Ohashi, Y., Mitsuhashi, I., Yamamoto, K. T. and Takeuchi, Y. (2000). Accumulation of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves irradiated with UV-B. J. Plant Res. 113: 387-394.
- Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N. and Ito, M. (2001). Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. J. Plant Physiol. 111: 345-352.
- Gau, A. E., Koutb, M., Piotrowski, M. and Klopstech, K. (2004). Accumulation of pathogenesis related proteins in apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. *Elstar*) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar. Remo. Eur. J. Plant Pathol. 110: 703-711.
- Gianinazzi, S. (1982). Antiviral agents and inducers of virus resistance: analogies with interferon. In R. K. S. Wood, Active Defence Mechanisms in Plants. pp. 275-298. Plenum Press: New York.

- Gibeaut, D. M. and Carpita, N. C. (1991). Clean-up procedure for partially methylated alditol acetate derivatives of polysaccharides. J. Plant Physiol. 97: 556-561.
- Goldman, M. H. S. and Goldman, G. H. (1998). *Trichoderma harzianum* transformant has high extracellular alkaline proteinase expression during specific mycoparasitic interactions. Gen. Mol. Biol. 21: 329-333.
- Gregersen, P. L., Thordal-Christensen, H., Forster, H. and Collinge, D. B. (1997). Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). Physiol. Mol. Plant Pathol. 51: 85-97.
- Hammond-Kosack, K. and Jones, J. D. G. (2000). Responses to plant pathogen. In B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones, Biochemistry and Molecular Biology of Plants. pp. 1102-1156. American Society of Plant Physiologists: Maryland.
- Hematy, K., Sado, P. E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.P., and Hofte, H. (2007). A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. Curr. Biol. 17: 922-931.
- Hennin, C., Diederichsen, E. and Höfte, M. (2001). Local and systemic resistance to fungal pathogens triggered by an AVR9-mediated hypersensitive response in tomato and oilseed rape carrying the Cf-9 resistance gene. Physiol. Mol. Plant Pathol. 59: 287-295.
- Henrissat, B. and Davies, G. T. (1997). Carbohydrate-Active Enzymes web site database, CAZY (Online). Available URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>
- Honée, G., Buitink, J., Jabs, T., de Kloe, J., Sijbolts, F., Apotheker, M., Weide, R., Sijen, T., Stuiver, M. and de Wit, P. J. G. M. (1998). Induction of defence-related response in Cf9 tomato cells by the AVR9 elicitor peptide of *Cladosporium fulvum* is developmentally regulated. Plant Physiol. 117: 809-820.
- International Rice Research Institute (IRRI). (2002). Standard Evaluation System for Rice (SES). Los Baños: Philippines. p. 56.
- Jantasuriyarat, C., Gowda, M., Haller, K., Hatfield, J., Lu, G., Stahlberg, E., Zhou, B., Li, H., Kim, H., Yu, Y., Dean, R. A., Wing, R. A., Soderlund, C. and Wang, G-L. (2005). Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. Plant Physiol. 138: 105-115.

- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J. 19: 4004-4014.
- Kim, S. T., Cho, K. S., Yu, S., Kim, S. G., Hong, J. C., Han, C. D., Bae, D. W., Nam, M. H. and Kang, K. Y. (2003). Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. Proteomics. 3: 2368-2378.
- Kitajima, S. and Sato, F. (1999). Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. J. Biochem. 125:1-8.
- Koiwa, H., Bressan, R. A. and Hasegawa, P. M. (1997a). Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends Plant Sci. 2: 379-384.
- Koiwa, H., Kato, H., Nakatsu, T., Oda, J., Yamada, Y. and Sato, F. (1997b). Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. Plant Cell Physiol. 38: 783-791.
- Kuyek, D. 2000. Blast, biotech and big business (Online). Available URL: <http://www.grain.org/publications/reports/blast.htm>.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lawrence, C. B., Singh, N. P., Qiu, J., Gardner, R. G. and Tuzun, S. (2000). Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. Physiol. Mol. Plant Pathol. 57: 211-220.
- Lee, E. J., Koizumi, N. and Sano, H. (2004). Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in Arabidopsis. Plant Cell Environ. 27: 337-345.
- Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. Chem. 47: 273-279.
- Lu, G., Jantasuriyarat, C., Zhou, B. and Wang, G.L. (2004). Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. Theor Appl Genet. 108: 525-534.
- Lui, M., Sun, Z. X., Zhu, J., Xu, T., Harman, G. E. and Lorito, M. (2004). Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. J. Zhejiang Univ Sci. 5: 133-136.

- Manandhar, H. K., Mathur, S. B., Smedegaard-Petersen, V. and Thordal-Christensen, H. (1999). Accumulation of transcripts for pathogenesis-related proteins and peroxidase in rice plants triggered by *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* and u.v. light. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 289-295.
- Maneesan, J. (2007). Study of the natural substrate structure of rice β -glucosidases. Master's degree Dissertation. School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology. Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Matsuoka, M. and Ohashi, Y. (1986). Induction of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves. Plant Physiol. 80: 505-510.
- Molina, A., Gorlach, J., Volrath, S. and Ryals, J. (1999). Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 12: 53-58.
- Morrisette, J., Kratzschmar, J., Haendler, B., El-Hayek, R., Mochca-Morales, J., Martin, B. M., Patel, J. R., Moss, R. L., Schleuning, W. D., Coronado, R. and Possani, L. D. (1995). Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. Biophys. J. 68: 2280-2288.
- Münch-Garthoff, S., Neuhaus, J. M., Boller, T., Kemmerling, B. and Kogel, K.H. (1997). Expression of β -1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing sr5- or sr24-specified race-specific rust resistance. Planta. 201: 235-244.
- National Center for Biotechnology Information, Ncbi (Online). Available URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Niderman, T., Genetet, I., Buryere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. and Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. 108: 17-27.
- Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M. and Mikkelsen, J. D. (1997). Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. Plant Physiol. 113: 83-91.
- Nishizawa, Y., Saruta, M., Nakazono, K., Nishio, Z., Soma, M., Ypshida, T., Nakajima, E. and Hibi, T. (2003). Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *GnI*. Plant Mol. Biol. 51: 143-152.

- Opassiri, R., Hua, Y., Wara-Aswapati, O., Akiyama, T., Esen, A. and Ketudat Cairns, J. R. (2004). β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlul. Biochem. J. 379: 125-131.
- Opassiri, R., Ketudat Cairns, J. R., Akiyama, T., Wara-Aswapati, O., Svasti, J. and Esen, A. (2003). Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. Plant Sci. 165: 627-638.
- Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A. and Ketudat Cairns J. R. (2006). Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase. BMC Plant Biol. 6: 33.
- Pääkkönen, E., Seppänen, S., Holopainen, T., Kokko, H., Kärenlampi, S., Kärenlampi, L. and Kangasjärvi, J. (1998). Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. New Phytol. 138: 295-305.
- Park, C-J., An, J-M., Shin, Y-C., Kim, K-J., Lee, B-J. and Paek, K-H. (2004a). Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. Planta. 219: 797-806.
- Park, C-J., Kim, K-J., Shin, R., Park, J. M., Shin, Y-C. and Peak, K-H. (2004b). Pathogenesis related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. Plant J., 37, 186-198.
- Pilling, E. and Hofte, H. (2003). Feedback from the wall. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 611-616.
- Poupard, P., Parisi, L., Campion, C., Ziadi, S. and Simoneau, P. (2003). A wound- and ethephon inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and incompatible race of *Venturia inaequalis*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 62: 3-12.
- Reimmann, C. and Dudler, R. (1993). cDNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced thaumatin-like protein from rice (*Oryza sativa*). Plant physiol. 101: 1113-1114.
- Reimmann, C., Ringli, C. and Dudler, R. (1992). Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. Plant Physiol. 100: 1611-1612.

- Reiss, E. and Bryngelsson, T. (1996). Pathogenesis-related proteins in barley leaves, induced by infection with *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem and by treatment with other biotic agents. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49: 331-341.
- Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thévenot, P., Boulay, M., Buffard, D. and Esnault, R. (2001). Molecular characterization of the incompatible interactions of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. Eur. J. Plant Pathol. 107: 249-261.
- Roberts, W. and Selitrennikoff, C. P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. J. Gen. Microbiol. 136: 1771-1778.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants : conserved and novel mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 675-709.
- Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 425-449.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Király, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K-H. and Hückelhoven, R. (2003). Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. Plant Sci. 165: 1275-1280.
- Schweizer, P., Buchala, A., Silverman, P., Seskar, M., Raskin, I. and Metraux, J-P. (1997). Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. Plant Physiol. 114: 79-88.
- Segura, A., Moreno, M. and Garcia-Olmedo, F. (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. FEBS Lett. 332: 243-246.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal Proteins. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2883-2894.
- Sirithunya, P., Tragoonrung, S., Vanavichit, A., Pa-In, N., Vongsaprom, C. and Toojinda, T. (2002). Quantitative trait loci associated with leaf and neck blast resistance in recombinant inbred line population of rice (*Oryza sativa*). DNA Res. 30: 79-88.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs, H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. Science. 306: 2206-2211.

- Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J, Ellis, J. G. and Jones, J. D. G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. Science. 268: 661-667.
- Taiz, L. (1984). Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. Annu. Rev. Plant physiol. 35: 585-657.
- Takemoto, D., Furuse, K., Doke, N. and Kawakita, K. (1997). Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells. Plant Cell Physiol. 38: 441-448.
- Tamás, L., Huttová, J. and Žigová, Z. (1997). Accumulation of stress-proteins in intercellular spaces of barley leaves induced by biotic and abiotic factors. Biol. Plant. 39: 387-394.
- Tonón, C., Guevara, G., Oliva, C. and Daleo, G. (2002). Isolation of a potato acidic 39 kDa β -1,3-glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. J. Phytopathol. 150: 189-195.
- Van Damme, E. J., Charels, D., Roy, S., Tierens, K., Barre, A., Martins, J. C. Rouge, P., Van Leuven, F., Does, M. and Peumans, W. J. (1999). A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. Plant Physiol. 119: 1547-1556.
- Van Kan, J. A. L., Joosten, M. H. A. J., Wagemakers, G. A. M., Van den Berg-Velthuis, G. C. M. and De Wit, P. J. G. M. (1992). Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. Plant Mol. Biol. 20: 513-527.
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur. J. Plant Pathol. 103: 753-765.
- Van Loon, L. C. (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In S. K. Datta and S. Muthukrishnan, Pathogenesis-related Proteins in Plants. pp. 1-9. CRC Press LLC: Boca Raton.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis related proteins. Plant Mol.r Biol. Reporter. 12: 245-264.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 85-97.

- Vigers, A. J., Roberts, W. K. and Selitrennikof, C. P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. Mol. Plant-Microbe Interac. 4: 315-323.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., Dooijeweert, W. V., Govers, F., Kamoun, S. and Colon, L. T. (2000). Does basal PR gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*?. Physiol Mol Plant Pathol. 57: 35-42.
- Wang, G. L. and Leung, H. (1998). Molecular biology of host-pathogen interactions in rice diseases. In K. Shimamoto, Molecular Biology of Rice. pp. 201-232. Springer-Verlag: Tokyo.
- Wang, X., He, R. and He, G. (2005). Construction of suppression subtractive hybridization libraries and identification of brown planthopper-induced genes. J. Plant Physiol. 162: 1254-1262.
- Wang, Z. X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna L., Hayasaka, H., Katayose, Y. and Sasaki, T. (1999). The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Plant J. 19: 55-64.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Widerhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Métraux, J. P. and Ryals, J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. Plant Cell. 3: 1085-1094.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S. and Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. Microbiology. 145: 3353-3363.
- Wubben, J. P., Lawrence, C. B. and de Wit, P. J. G. M. (1996). Differential induction of chitinase and β -1,3-glucanase gene expression in tomato by *Cladosporium fulvum* and its race specific elicitors. Physiol. Mol. Plant Pathol. 48: 105-116.
- Xiong, L., Lee M. W., Qi, M. and Yang, Y. (2001). Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. Mol. Plant Microbe Interact. 14: 685-692.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T. and Shibuya, N (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -Glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. Plant Cell. 12: 817-826

- Zhang, G. P., Shi, Y. L., Wang, W. P. and Liu, W. Y. (1999). Cation channel formed at lipid bilayer by Cinnamomin, a new type II ribosome-inactivating protein. Toxicon. 37: 1313-1322.
- Zhou, J-M. (1999). Signal transduction and pathogenesis-induced PR gene expression. In S. K. Datta, and S. Muthukrishnan, Pathogenesis-related Proteins in Plants. pp. 195-207. CRC Press LLC: Boca Raton.
- Zhu, T., Song F. and Zheng, Z. (2006). Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. J. Phytopathol. 154: 378-384.
- Zhuang, J. Y., Ma, W. B., Wu, J. L., Chai, R. Y., Lu, L., Fan, Y. Y., Jin, Z. M., Leung, H. and Zheng, K. L. (2002). Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice. Euphytica. 128: 363-370.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อหัวหน้าโครงการ รงนา โอภาสศิริ

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

วัน เดือน ปี เกิด 8 ธันวาคม 2518

สถานที่เกิด จังหวัดขอนแก่น

วุฒิการศึกษา

วท.บ. (เกษตรนิยาม) ชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2541

วท.ด ชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พ.ศ. 2546

ประสบการณ์การทำงาน

กุมภาพันธ์ 2550- ปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ธันวาคม 2546 –กุมภาพันธ์ 2550

อาจารย์

สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เมษายน 2551-มีนาคม 2552

Visiting Researcher

Research Faculty of Agriculture

Hokkaido University, Japan

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224598 โทรสาร 044-224185

E-mail opassiri@sut.ac.th

ผลงานวิชาการ

International Publication

Opassiri R, Ketudat Cairns JR, Akiyama T, Wara-Aswapati O, Svasti J, and Esen A. (2003).

Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. Plant Science. 165: 627-638.

Opassiri R, Hua Y, Wara-Aswapati O, Akiyama T, Svasti J, Esen A, and Ketudat Cairns JR.

(2004). β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlu1. Biochem. J. 379: 125-131.

- Chuenchor W, Pengthaisong S, Yuvaniyama J, Opassiri R, Svasti J, and Ketudat Cairns JR. (2006). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of rice BGlu1 β -glucosidase with and without 2-deoxy-2-fluoro- β -D-glucoside. *Acta Cryst. F.* 62: 798-801.
- Opassiri R, Pomthong B, Onkoksoong T, Akiyama T, Esen A, and Ketudat Cairns JR. (2006). Analysis of rice- glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase. *BMC Plant Biol.* 6: 33
- Suginta W, Vongsuwan A, Prinz H, Opassiri R, Svasti J and Songsiriritthigul C. (2007). Mutations of Trp275 and Trp397 enhanced the exo- and endo-activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BBA- General Subjects.* 1770: 1151-1160.
- Opassiri R, Pomthong B, Akiyama T, Nakphaichit M, Onkoksoong, T, Ketudat Cairns M, and Ketudat Cairns JR. (2007). A Stress-induced rice β -glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. *Biochem. J.* 408: 241-249.
- Chuenchor W, Pengthaisong S, Robinson RC, Yuvaniyama J, Oonanant W, Bevan DR, Esen A, Chen C, Opassiri R, Svasti J, and Ketudat Cairns JR. (2008). Structural Insights into Rice BGlu1 β -Glucosidase Oligosaccharide Hydrolysis and Transglycosylation. *J. Mol. Biol.* 377: 1200-1215.
- Akiyama, T., Jin, S., Yoshida, M., Hoshino, T., Opassiri, R., and Ketudat Cairns JR. (2009). Cloning and recombinant expression of an endo-1,3;1,4- β -glucanase gene expressed in response to wounding, methyl jasmonate, abscisic acid and ethephon in rice seedlings. *J. Plant Physiol.* (in press).
- Seshadri, S., Akiyama, T., Opassiri, R., Kuaprasert, B., and Ketudat Cairns J. (2009). Structural and enzymatic characterization of Os3BGlu6, a rice β -glucosidase hydrolyzing hydrophobic glycosides and (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 2)-linked disaccharides. *Plant Physiol.* (in press).

Proceeding

- Nakphaichit M, Opassiri R, Akiyama T, and Ketudat-Cairns M. (2007). Expression of rice β -glucosidase in bacteria, yeast and plant cell. *International Conference on Integration of*

Science and Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand. 26-27 April 2007. pp. 48-54. (Full paper)

Phetsom J, Opassiri R, Ketudat-Cairns JR, Ronald PC, and Ketudat-Cairns M. 2007. Analysis of glycosyl hydrolase family 1 on NSF 45K rice oligonucleotide array. TSB2007: Biotechnology for gross national happiness. Thammasat Univ, Bangkok 9-12 Oct 2007. (Full paper).

Ketudat Cairns JR, Opassiri R, Chantarangsee M, Chuenchor W, Akiyama T, Esen A, Svasti J, and Wara-Aswapati O. (2003). Investigation of glycosyl hydrolase family 1 and 35 genes in rice. BioThailand 2003. Chonburee Thailand, 17-20 July 2003. (Full paper)

Selected Invited lecture

Opassiri R, Pomthong B, Akiyama T, Onkoksoong T, Ketudat Cairns JR. 2007. Recombinant protein production and characterization of rice glycosyl hydrolase family 1 and 5 β -glucosidases. The Conference of New Reserch Scholars, The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education, 11-13 October 2007. (invited lecture No. O-BIO-E01)

Ketudat-Cairns JR, Opassiri R, Ketudat-Cairns M, Kongsaree P, Yuvaniyama J, and Svasti J. 2007. From Thai rosewood to structural and functional genomics of rice β -glucosidases. Protein Society of Thailand/"2nd Annual Symposium of Protein Society of Thailand/ 20-21 Sep 2007 Bangkok. (Invited lecture No. 11).

Opassiri R and Ketudat Cairns JR. (2004) Exo-beta-glucanase and transglycosylase activities of rice BGlu1 beta-glucosidase. (oral presentation) 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Chiang Mai, Thailand, 2-6 February, 2004. (Invited lecture, Abstracts p. 27)

Selected Poster Presentation

Opassiri R, Pomthong B, Akiyama T, Onkoksoong T, Ketudat Cairns JR. 2007. A rice glycosyl hydrolase family 5- β -glucosidase containing a fascin-like domain is expressed in response to environmental stresses/ Protein Society of Thailand/"2nd Annual Symposium of Protein Society of Thailand/ 20-21 Sep 2007 Bangkok. (poster No. 27).

Maneesan J, Ketudat-Cairns JR, Akiyama T, and Opassiri R. 2007. Rice Os4glu12 β -glucosidase: its expression in response to stresses and isolation of its natural substrates. Protein Society of Thailand/"2nd Annual Symposium of Protein Society of Thailand/ 20-21 Sep 2007 Bangkok. (poster No. 26).

- Kuntothom T, Opassiri R, Hrmova M, and Ketudat-Cairns JR. 2007. Cloning and characterization of barley β -glucosidase/ β -mannosidase. Protein Society of Thailand/"2nd Annual Symposium of Protein Society of Thailand/ 20-21 Sep 2007 Bangkok. (poster No. 30).
- Opassiri R, Pomthong B, Onkoksoong T, Akiyama T, and Ketudat Cairns JR. (2006). Functional genomic analysis of rice glycosyl hydrolase family 1. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 18-23 June 2006.

รางวัลที่เคยได้รับ

1. Certificate for Outstanding in Biology, the Science Society of Thailand, 1995.
2. Certificate of Honors, Thab Nelanithi Foundation, Thailand, 1998.
3. First Class Honors, Khon Kaen University, 1998.
4. The Development and Promotion of Science and Technology Talents Project of Thailand (DPST) Scholarship, DPST, 1994-1999.
5. The Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship, the Thailand Research Fund, 1999- 2003
6. Visiting Researcher Scholarship to Department of Biology, Virginia Polytechnic Institute and State University., USA, The Thailand Research Fund, Sep-Dec 1999 and Jan-Aug 2002.
7. Poster Popular Vote Award in the 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Protein Society of Thailand, 24-25 Oct 2006.
8. Good Poster Presentation Award in the 2nd Annual Symposium of Protein Society of Thailand, Protein Society of Thailand, 20-21 Sep 2007 Bangkok.