บทคัดย่อ

223088

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 peroxidise (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 แต่ข้าวขาวดอกมะลิมีการแสดงออกของยีนครอบคลุมช่วงเวลาบ่มที่ยาวนานกว่าถึง 12-72 ชม. อาจเนื่องมาจากมีการกระจายตัวของเชื้อได้อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามรูปแบบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ที่พบทั้งในข้าวต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงชี้ให้เห็นว่าแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีนในกลุ่มนี้เป็นเพียงการเข้าไปมีส่วนร่วมในการสร้างความต้านทานระดับพื้นฐานในข้าวในการตอบสนองต่อเชื้อแบบไม่จำเพาะเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อ

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

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 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 peroxidise (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.