การโคลนและวิเคราะห์ยีนต้านทานเชื้อราโรคไหม้จากข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย

Cloning and Characterizing Blast Disease Resistance Locus Isolated from Domestic Germplasm of Thailand

พยุงศักดิ์ รวยอารี หทัยรัตน์ อุไรรงค์
พากเพียร อรัญนารถ[1] พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์[2]

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

Rice is the major staple of half the world's population and is one of the most important plants as a major crop and as the model of monocot plants. Rice blast, caused by the *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, is a modal pathosystem for dissecting fungal pathogen-plant interactions. The main objective of this study is to enhance our understanding of the molecular mechanisms of disease resistance and rice blast disease by determining the role of rice disease resistance genes and fungal pathogenicity genes that are homologous to known disease resistance genes such as nucleotide-binding site plus leucine rice repeat (NBS-LRR) and protein kinase and to suspected pathogenicity genes in other fungal plant pathogens in pathogenicity such as *MAC1*, MAP kinase, and ABC transporters, respectively. Several resistance genes as well as pathogenicity genes have been cloned and sequenced in this study. All candidate genes were obtained through Polymerase Chain Reaction technique. Functional and complementation analyses of these fungal pathogenicity genes are in progress. Results from this study and the putative functions of the identified genes are discussed.

บทคัดย่อ

รหัสกิจกรรม 05-01-47-02

รหัสการทดลอง 05-01-47-0203

[1] สถาบันวิจัยข้าว

[2] ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี

โรคไหม้ของข้าวเป็นโรคที่มีความสำคัญด้านเศรษฐกิจในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกข้าวในประเทศต่างๆ ทั่วโลก และสามารถพบโรคนี้ได้ทุกปี ในประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ เช่น หางยี 71 เหลืองทอง และผาเลือด เป็นต้น ได้นำข้าวพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบยืนยันความต้านทานการเกิดโรคด้วยวิธีการปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr พบว่า ข้าวพันธุ์หางยี 71 และผาเลือดมีความต้านทานอย่างสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์ราชบุรีและปทุมธานี ส่วนข้าวพันธุ์เหลืองทองแสดงความต้านทานต่อเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่ระดับปานกลาง จากนั้น ได้สกัดดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ต้านทานทั้งสามสายพันธุ์ รวมทั้งเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์เพื่อสร้างจีโนมิกดีเอ็นเอไลบรารี่จากข้าว และเพื่อสกัดแยกยีนต้านทานจากข้าว (Disease Resistant Genes) โดยอาศัยบริเวณของยีนที่มีความจำเพาะ (conserved motif) และมีความเหมือนทางโครงสร้างยีนต้านทานอย่างสูงจากยีนต้านทานที่โคลนได้ในพืชต่างๆ ได้แก่ NBS-LRR (Nucleotide Binding Site plus Leucine Rich Repeat) และ Protein Kinase analog มาใช้ในการทำโคลนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR-based approach) อีกทั้ง ได้ทำการโคลนยีนของเชื้อราที่คาดว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคพืช (pathogenicity genes) ด้วยวิธีเดียวกันโดยใช้โอลิโกนิวคลิโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความเหมือนกับยีนก่อโรคจากเชื้อราต่างๆ ได้แก่ Adenylate cyclase (*MAC1*) และ cAMP regulatory subunit A (*SUM1*) เป็นต้น พบว่า แอมพลิคอนที่โคลนได้จากข้าวและเชื้อราดังกล่าวมีความเหมือนกับยีนต้านทานและยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคพืช ภายหลังการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบส และกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล (NCBI) ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและควบคุมโรคไหม้ต่อไปในอนาคต

คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่สำคัญที่สุดของประเทศไทยและของโลก ประชากรโลก 1 ใน 3 หรือจำนวนประชากร 2,000 ล้านคนโดยประมาณบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก พื้นที่เพาะปลูกข้าวครอบคลุมพื้นที่มากกว่า 360 ล้านเอเคอร์ทั่วโลกและมีปริมาณการผลิต 560 ล้านตันต่อปี ในประเทศไทยนิยมปลูกข้าวทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทว่า เกษตรกรทั่วโลกรวมทั้งเกษตรกรไทยต้องเผชิญปัญหาเรื่องโรคพืชที่สำคัญของข้าว เช่น แมลง แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อราที่จัดว่าเป็นศัตรูหมายเลขหนึ่งของข้าวได้แก่ เชื้อราโรคไหม้ หรือ “rice blast fungus” ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (Ou, 1985; Rossman *et al*. 1990)

ในประเทศไทย โรคไหม้ของข้าวเป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการปลูกข้าวในประเทศ และพบมีการระบาดของโรคอยู่เป็นประจำทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

นักวิจัยทั่วโลกและในประเทศไทยได้พยายามปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่างๆ ให้มีความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ด้วยวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบปกติ แต่ประสบปัญหาเกี่ยวกับขั้นตอนที่ซับซ้อน และใช้เวลานานกว่าจะคัดเลือกได้พันธุ์ต้านทานที่ต้องการ ตลอดจนปัญหาเรื่องความไม่ถาวร (durable) ของความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ดังกล่าวที่ตัวเชื้อราเองมีความแปรปรวนเพื่อเอาชนะความต้านทานของพันธุ์ข้าวที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์อยู่เสมอ ที่ผ่านมาได้มีการวิจัยเพื่อสำรวจหาสายพันธุ์ (pathotypes) ของเชื้อราโรคไหม้ต่างๆ ที่มีความสามารถในการก่อโรคในข้าวพันธุ์ต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ (Yamada, 1985; Kiyosawa, 1984; พูนศักดิ์ และคณะ, 2546) พบว่า เชื้อราโรคไหม้มีระดับการก่อโรคในข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่แตกต่างกัน เนื่องจากพันธุ์ข้าวมีพื้นฐานทางพันธุกรรมต่อการตอบสนองต่อเชื้อราที่แตกต่างกัน ข้าวบางพันธุ์อาจแสดงคุณสมบัติที่มีความต้านทาน (resistance) ต่อเชื้อราโรคไหม้บางสายพันธุ์ ในขณะที่ข้าวบางพันธุ์มีความอ่อนแอ (susceptibility) ต่อการเข้าทำลายของเชื้อราบางสายพันธุ์ ความสัมพันธ์ระหว่างข้าวและเชื้อราในลักษณะที่เกิดโรค (compatible interaction) และ ไม่เกิดโรค (incompatible interaction) เป็นไปตามทฤษฎี “gene-for-gene concept” (Flor, 1971) ที่ซึ่ง ยีนต้านทาน R แต่ละตัวแสดงความต้านทานต่อเมื่อมีการตอบสนองต่อสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคพืชที่มียีน *Avr* ประกอบอยู่ด้วยเท่านั้น

Song *et al*. (1995) ได้ค้นพบยีนต้านทานโรคในข้าว โดยสกัดแยกยีน *Xa21* ที่มีรหัสเป็น receptor kinase-like protein ที่ทำหน้าที่ในความต้านทานต่อแบคทีเรียโรคขอบใบแห้ง (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*) Wang *et al*. (1999) สกัดแยกและวิเคราะห์ยีน Pib ที่จัดอยู่ใน nucleotide binding และ leucine–rich repeat สำหรับความต้านทานโรคไหม้ ที่ผ่านมาได้มีการโคลนยีนต้านทานจากพืชหลายๆ ชนิด หนึ่งในจำนวนนั้น ได้แก่ NBS-LRR ที่ประกอบด้วย nucleotide-binding site (NBS) และ leucine-rice repeat (LRR) motif และ ยีนโปรตีนไคเนส (Protein kinase) (Bent, 1996; Hammond-Kosak and Jones, 1997) โดยนำบริเวณที่มีความเหมือนอย่างสูง (conserved motifs) ภายในยีนต้านทานต่างๆ มาใช้ออกแบบไพรเมอร์ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR-based strategies) เพื่อสกัดแยกลำดับเบสยีนต้านทาน (resistance gene analogs, RGAs) จากพืชหลายๆ ชนิด โดย RGAs มีศักยภาพในการเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับตำแหน่งของยีน เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบใช้เครื่องหมายโมเลกุล หรือแม้แต่นำมาใช้เป็นยีนต้านทานตัวเลือก (resistance gene candidate) ดังกล่าว ได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในถั่วเหลือง ข้าวและข้าวโพด (Collins *et al*., 1998, Kanazin *et al*., 1996, Mago *et al*., 1999)

Dodds และคณะ (2001) กล่าวถึง ยีนต้านทานแอนนาลอกมีศักยภาพในการทำหน้าที่เป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยโมเลกุลเครื่องหมายได้

ที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาสกัดแยกยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในพืชในเชื้อราหลายชนิด รวมทั้งในเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Magnaporthe grisea*) เพื่อทำความเข้าใจเพิ่มเติมในเรื่องของวิถีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (เช่น cAMP signaling pathway) ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการต่างๆ ในเชื้อรา เช่น การเจริญเติบโต การพัฒนาโดยอาศัยและไม่อาศัยเพศ และการสร้างโครงสร้างในการก่อโรคในพืชหรือแอพเพรสซอเรียม เป็นต้น Choi and Dean (1997) ได้แสดงให้เห็นว่าทรานส์ฟอร์แมนต์ที่ไม่ได้ประกอบด้วยยีน *MAC1* (adenylate cyclase) ในจีโนมซึ่งมีความจำเป็นต่อการสร้างโมเลกุล cAMP ภายในเซลล์ไม่สามารถสร้างโครงสร้างที่ใช้ในการก่อโรคหรือที่เรียกว่าโครงสร้างแอพเพรสซอเรียมได้และเชื้อราไม่มีความสามารถเจาะเข้าสู่ใบข้าวที่อ่อนแอต่อโรคตามปกติได้ Adachi and Hamer (1998) ได้รายงานว่า การเกิดมิวเตชั่นที่หนึ่งตำแหน่งเบส (point mutation) ของ PKA regulatory subunit (*SUM1*) สามารถนำหน้าที่บางส่วนกลับคืนในยีน *mac1* ได้เพียงบางส่วน

การได้พันธุ์ต้านทานและยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ดังกล่าว ที่ผ่านมาต้องอาศัยเทคนิคที่ซับซ้อน และใช้เวลานาน เช่น การโคลนยีนต้านทานเชื้อราโรคไหม้ และแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งโดยวิธี “map-based cloning” (Wu *et al*. 1995; Song *et al*. 1995) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อนำพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคไหม้หรือพันธุ์ข้าวต้านทานจากสายพันธุ์พ่อแม่พื้นเมืองของประเทศไทยมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมเพื่อการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้มาซึ่งพันธุ์ข้าวที่ประกอบด้วยยีนต้านทาน (R) ต่อเชื้อราโรคไหม้และคงคุณสมบัติต่างๆ ตามต้องการ คาดว่าการศึกษาดังกล่าวจะย่นระยะเวลาในการหายีนต้านทาน (R) จากข้าวที่ใช้ศึกษา ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณสมบัติต้านทานโรคไหม้ด้วยวิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายเป็นตัวช่วย (molecular marker-aided selection breeding) ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
2. เชื้อรา *Magnaporthe grisea* สายพันธุ์ราชบุรีและปทุมธานี
3. พันธุ์ข้าวหางยี 71 เหลืองทอง ขาวตาแห้ง 17 กข23 และ TN1
4. เครื่องชั่งสาร
5. เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
6. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (NucleoSpin Plant L Kits, CLONTECH)
7. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)
8. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Labnet/Spectrafuge16M, National)
9. Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA)
10. Lambda FIX®II/XhoI partial fill-in Vector, (Stratagene, La Jolla, CA)
11. pDRIVE® cloning vector (Qiagen, Valencia, USA)
12. Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
13. ABI PRISM® 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA)
14. DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
15. เครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) GelDoc transluminator

วิธีการ

<u>การทดลองย่อยที่ 1</u> การโคลนยีน หาลำดับเบส และวิเคราะห์ลำดับเบสยีนต้านทานจากข้าว nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) และไคเนสแอนนาลอก (KA)

ขั้นตอนที่ 1. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

1.1 การเตรียมสายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ศึกษา และสภาพการเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรา *Magnaporthe grisea* ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีจำนวนสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากจังหวัดราชบุรี และสายพันธุ์จากจังหวัดปทุมธานี เก็บรักษาเชื้อไว้บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ เพื่อชักนำการสร้างสปอร์

สกัดสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้โดยการเลี้ยงเส้นใยบน PDA นาน 7 วัน ที่ 22 องศาเซลเซียส แยกสปอร์จากเส้นใยเชื้อราด้วยการกรองโดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อบนผ้ากรองปลอดเชื้อ (Miracloth) เหวี่ยงสปอร์ที่แยกได้ด้วยการใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Labnet/Spectrafuge16M, National) ที่ 14,000g ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และปรับความเข้มข้นเป็น 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

1.2 การทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรค

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ หางยี71 (ได้รับความอนุเคราะห์จากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช อาคารพันธุกรรมพืชสิรินธร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร) และเหลืองทอง (ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายอารักขาพืช ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี) ข้าวสามสายพันธุ์ใช้ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ และข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง17 กข23 และ TN1 (ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายวิชาการ สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร) ใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมการทดลอง เนื่องจากข้าวทั้งสามสายพันธุ์เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ศึกษาทั้งสองสายพันธุ์ เพาะเมล็ดข้าวจำนวน 6 ถึง 10 เมล็ด ในกระถางปลูกขนาดประมาณ 4 นิ้ว ที่บรรจุด้วยส่วนผสมของดิน ณ โรงเรือนปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เป็นเวลา 10 วัน ก่อนปลูกเชื้อด้วยการสเปรย์สารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 0.25 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 ให้ทั่วใบข้าวทุกใบ เก็บไว้เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ พร้อมให้น้ำหล่อเลี้ยงไว้ในกระถางเพาะปลูกทุกใบ ส่วนการทดลองควบคุม เพาะปลูกข้าวในลักษณะเดียวกัน แต่ไม่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์เชื้อรา เมื่อครบ 3 สัปดาห์แล้ว สังเกตและบันทึกลักษณะอาการการเกิดโรคของข้าวแต่ละต้น ใช้สเกลการให้คะแนนตามลักษณะอาการของโรคตั้งแต่ 0 - 4 ดังต่อไปนี้ 0 = ไม่ปรากฏอาการ 1 = มีรอยโรคขนาดเล็ก (chlorotic flecks) 2 = ปรากฏ necrotic lesions 3 = ปรากฏ necrotic lesions พร้อมด้วย chlorotic lesions ขนาดใหญ่ และ 4 = ปรากฏรอยโรคแบบ coalescing necrotic lesions ครอบคลุมทั่วใบ (Mitchell and Dean, 1995)

ขั้นตอนที่ 2. การสกัดกรดนิวคลิอิก

ตัดใบข้าวโดยใช้กรรไกรจากข้าวอายุ 20 วัน มาเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ก่อนการสกัดกรดนิวคลิอิก ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว 2 วิธี ได้แก่ CTAB method (วิธีการที่ 1) และใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (NucleoSpin Plant L Kits, CLONTECH, Palo Alto, CA) (วิธีการที่ 2)

วิธีการที่ 1

บดใบข้าวที่แช่แข็งไว้ที่ตู้ปรับอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ให้มีขนาดเล็กเป็นผงละเอียดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว เติมบัฟเฟอร์ (DNA extraction buffer) ที่ประกอบด้วย 2% CTAB, 2% PVP, 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, pH8.0, 100 mM Tris-Cl, pH 8.0 และ 2% เมอร์แคพโตเอธานอล (เติมก่อนใช้) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (FINEVORTEX, FINEPCR, Korea) บ่มตัวอย่างที่ต้องการสกัดในอ่างปรับอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24:1 v/v) เขย่าหลอดนาน 5 นาที และเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนลงในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.7 มิลลิลิตร ตกตะกอนกรดนิวคลิอิกด้วยไอโซโพรพานอลเย็นจัด (2/3 ของปริมาตร) นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เหวี่ยงหลอดโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 10 นาที ขจัดสารละลายใสส่วนบน และล้างตะกอนที่ได้ 2 ครั้งด้วยสารละลาย wash buffer (75% เอธานอล 10 mM แอมโมเนียมอะซิเตท) เติมสารละลาย RNase 3 ไมโครลิตร (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) บ่มนาน 30 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนสกัดซ้ำด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม (25:4) สองครั้ง ตกตะกอนซ้ำด้วย 100% เอธานอล ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย บ่มที่ -20 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ล้างตะกอนตะกอนด้วย 70% เปอร์เซ็นต์เอธานอล 500 ไมโครลิตร ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที และละลายในสารละลาย TE (1mM TrisHCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)

วิธีการที่ 2

สกัดกรดนิวคลิอิกโดยใช้ชุดสกัดกรดนิวคลิอิก (NucleoSpin Plant L Kits, CLONTECH, Palo Alto, CA) บดใบข้าวแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียดด้วยการใช้โกร่งก่อนเติมบัฟเฟอร์ (C1) 1.25 มิลลิลิตร ต่อ 250 มิลลิกรัม ของตัวอย่างพืช ถ่ายลงในหลอดโพลิโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร (Greiner Bio-one Inc, USA) เติมสารละลาย RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร บ่มสารละลายนาน 30 นาที ที่ 60 องศาเซลเซียส เหวี่ยงด้วยความเร็วสูงนาน 5 นาที ที่ 4,500g ดูดสารละลายใสลงในหลอดโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร ใหม่ เติมบัฟเฟอร์ (C4) และเอธานอล ด้วยปริมาตรเดียวกันกับปริมาตรสารละลายใส เขย่าหลอดทันทีนาน 30 วินาที เตรียมหลอดทดลองโพลิโพรพิลีนใหม่ขนาด 15 มิลลิลิตร บรรจุด้วยคอลัมน์ หยอดสารละลายผ่านคอลัมน์ดังกล่าว เหวี่ยงคอลัมน์ด้วยความเร็วสูงนาน 2 นาที ที่ 4,500g ขจัดสารละลายที่ไหลผ่านทิ้ง ดูดสารละลาย (CQW) 1 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ เหวี่ยงด้วยความเร็วสูงนาน 2 นาที ที่ 4,500 g ขจัดสารละลายใส ดูดบัฟเฟอร์ (C5) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ เหวี่ยงด้วยความเร็วสูงนาน

3 นาที 4,500g ขจัดสารละลายใสทิ้ง จึงเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงอีกครั้งนาน 10 นาที ที่ 4,500g เพื่อขจัดบัฟเฟอร์ (C5) ให้แห้ง วางคอลัมน์ลงในหลอดโพลิโพรพิลีนใหม่ ดูดสารละลาย CE ลงในคอลัมน์ เหวี่ยงด้วยความเร็วสูงนาน 3 นาที ที่ 4,500g เพื่อเก็บดีเอ็นเอที่ได้ นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์บน 1.0% อะกาโลสเจล และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

ขั้นตอนที่ 3. การสังเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอไลบราลี่จากข้าว

นำจีโนมิกดีเอ็นเอข้าวที่สกัดได้ด้วยวิธีการข้างต้น มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแบบไม่สมบูรณ์อย่างต่อเนื่อง (serial partial digestion) ด้วยการใช้เอ็นไซม์ *Bam*HI เข้มข้น 0U, 0.15U, 0.075U, 0.035 U, 0.4U, 1U, 2U ตามลำดับ ก่อนบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที, 30 นาที, 45 นาที, 1 ชม. และ นานกว่า 1.5 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวิเคราะห์ด้วย 1.0% อะกาโลส เจล อิเลกโตรฟอเรซิส ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าด้วยเอ็นไซม์ *Bam*HI ที่ความเข้มข้น 0.4U บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที สามารถทำให้เกิดการตัดจำเพาะแบบไม่สมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาด้วยการใช้ 0.5M EDTA (pH) 8.0 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์แบบตัดจำเพาะแบบไม่สมบูรณ์ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยเอธานอล และละลายลงในสารละลาย TE (1mM TrisHCl, pH 8.0, 0.1 Mm EDTA, pH 8.0) เพื่อนำมาใช้ในปฏิกิริยาไลเกชั่น ต่อไป

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้นที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมโดยประมาณ มาทำปฏิกิริยา “partial fill-in” ตามคำแนะนำจากคู่มือบริษัทผู้ผลิต (STRATAGENE, La Jolla, USA) (ปฏิกิริยา partial fill-in เป็นปฏิกิริยาที่ใช้เตรียมจีโนมิกดีเอ็นเอเพื่อการสอดแทรกเข้าสู่ Lambda FIX®II vector ซึ่งเวกเตอร์ได้ผ่านการ “partial fill-in” ให้ประกอบด้วย 5-overhang เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความถูกต้องของไลบราลี่ที่ได้ อีกทั้ง partial fill-in จะช่วยป้องกันการเกิด self-ligation ซึ่งจะลดจำนวนรีคอมบิแนนต์โมเลกุลที่ประกอบด้วยหลายอินเสิร์ทได้อย่างดียิ่ง) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 300 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม, 30 ไมโครลิตร 10x fill-in buffer, 10 mM dGTP, 10 mM dATP และ 15U Klenow บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จึงเติม 33 ไมโครลิตร 10x STE (0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA) และ 100 ไมโครลิตร 1x STE (0.02 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA) สกัดสารละลายสองครั้งด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ตกตะกอนด้วยเอธานอล ทิ้งตะกอนให้แห้ง และละลายด้วยสารละลาย Tris-EDTA 25 ไมโครลิตร

เพื่อทำปฏิกิริยาไลเกชั่น ไลเกตดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ที่ชื่อว่า Lambda FIX®II vector (STRATAGENE, La Jolla, USA) ในปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร

ที่ประกอบด้วย 2U T4 DNA ligase (STRATAGENE, La Jolla, USA), 1 ไมโครลิตร Lambda FIX® II , 0.8 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอในสารละลาย Tris-EDTA ข้างต้น (0.4 ไมโครกรัม) 0.5 ไมโครลิตร 10x Ligase buffer และ 0.5 ไมโครลิตรของ 10 mM rATP (pH 7.5) ส่วนตัวควบคุมใช้ DNA test insert ที่ได้จากผู้ผลิต (STRATAGENE, La Jolla, USA) แทนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา “partial fill-in reaction” บ่มปฏิกิริยาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เวกเตอร์ชนิดนี้สามารถบรรจุดีเอ็นเอสอดแทรกที่มีขนาดตั้งแต่ 9 ถึง 23 kb จากนั้น ดูดสารละลายจากปฏิกิริยาไลเกชั่นปริมาตร 1 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลาย “packaging extract” ที่เพิ่งนำออกมาจาก -80 องศาเซลเซียส ด้วยการทำให้ละลายเพียงเล็กน้อยบนน้ำแข็ง (ประมาณ 2-3 นาที) ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปต และเหวี่ยงหลอดทดลองด้วยความเร็วสูงเป็นระยะเวลาสั้นๆ (3 - 5 วินาที) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง (22 องศาเซลเซียสโดยประมาณ) จากนั้น เติมสารละลาย SM buffer (5.8 กรัม NaCl, 2.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$, 50.0 มิลลิลิตร 1M Tris-HCl (pH 7.5), และ 5.0 มิลลิลิตร 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เจลาติน ต่อปริมาตรทั้งสิ้น 1 ลิตร) เติมคลอโรฟอร์ม 20 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยการใช้ปิเปต เหวี่ยงด้วยความเร็วสูงประมาณ 5 วินาที เพื่อดึงคลอโรฟอร์มลงมาที่ก้นหลอด เติมสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยาที่ผสมกับ packaging extract จำนวน 1 ไมโครลิตร (ที่เหลือเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส) ลงในเซลล์เจ้าบ้าน XL1-Blue MRA strain (P2) และ VCS257 (ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ตามคู่มือแนะนำจากผู้ผลิตที่ละลายอยู่ใน 10 mM $MgSO_4$ และมีค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ที่ 0.4-0.6) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สำหรับจีโนมิกดีเอ็นเอที่ต้องการไลเกต และ DNA test insert (STRATAGENE, La Jolla, USA) ตามลำดับ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ถ่ายสารละลายลงในหลอดทดลองพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 20 x 110 มิลลิเมตร จึงเติมวุ้นอาหารชนิดแข็ง LB top agar (10 กรัม NaCl, 10 กรัม tryptone, 5 กรัม yeast extract, 20 กรัม วุ้น ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.0) ที่ทำให้อุ่นล่วงหน้าที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ นาน 2-3 วินาที และเพลทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกใสโพลิสไตร์เพตริดิสก์ขนาด 70 x 9 มิลลิเมตร (Biobasic, Thailand) ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NZY agar (5 ก NaCl, 2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$, 10 กรัม NZ amine (casein hydrolysate), 5 กรัม yeast extract, 15 กรัม วุ้น ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.5) บ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นับจำนวนพลากค์ที่ได้ในแต่ละเพลทเป็นค่าไตเตอร์ในรูป pfu หรือ (plaque-forming units / ml) จากนั้น เก็บรักษาไลบราลี่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 4. การโคลนยีนและวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสยีนต้านทานจากข้าว

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยเทมเพลทจีโนมิกดีเอ็นเอข้าวพันธุ์หางยี 71 และเหลืองทองด้วย Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากบริเวณที่มีความเหมือนอย่างสูงของยีน NBS-LRR และโปรตีนไคเนส

(Leister, et al., 1998; Kanazin et al., 1996) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 50 µl ประกอบด้วย 2.5U Taq DNA polymerase, 1x QIAGEN PCR Buffer, 200 µM dNTP , 20-100 µg ของเทมเพลทดีเอ็นเอ, ไพรเมอร์ A (forward) 0.5 µM และไพรเมอร์ B (reverse) 0.5 µM อุณหภูมิ (annealing temperature) 42 องศาเซลเซียส (สำหรับ NBS-LRR) และ 50 องศาเซลเซียส (สำหรับโปรตีนไคเนส), สภาพการทำปฏิกิริยา ได้แก่ : 2 นาที 30 วินาที/90 องศาเซลเซียส ตามด้วย 30 รอบของแต่ละโปรแกรมดังนี้ 15 วินาที denaturation step ที่ 93 องศาเซลเซียส/45 วินาที annealing temperature ที่ 42 หรือ 50 องศาเซลเซียส และ 1 นาที 20 วินาที elongation step ที่ 72 องศาเซลเซียส ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำแอมพลิคอนที่ได้จำนวน 20 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์บน 1.5% อะกาโลสเจล

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการโคลนยีน

สกัดดีเอ็นเอแฟรกเมนต์ออกจากอะกาโลสเจล ด้วยการใช้ใบมีดที่เช็ดด้วย 75% เอธานอลตัดแถบดีเอ็นเอออกภายใต้การส่องดูด้วยแสงยูวี ใส่ชิ้นเจลที่ตัดได้ลงใน 1.7 มิลลิลิตร หลอดทดลองขนาดเล็ก (Eppendorf tube) และสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยการใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) ตามคำแนะนำจากคู่มือบริษัทผู้ผลิต เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ -80 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที ตามด้วยการเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงนาน 3 - 5 วินาที และเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.2 การทำไลเกชั่น

นำดีเอ็นเอที่ตัดออกจากเจลมาตรวจสอบความเข้มข้นคร่าวๆ โดยใช้ 1% อะกาโลสเจล จากนั้นทำปฏิกิริยาไลเกชั่นโดยใช้ QIAGEN PCR cloning Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) ตามคำแนะนำจากคู่มือบริษัทผู้ผลิตในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย pDrive® Cloning vector (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร แอมพลิคอนหรือดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจล 1 - 4 ไมโครลิตร, 2x Ligation master mix 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น (sterile distilled water) ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยการใช้ปิเปตขนาด P200 บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน หรือเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนถัดไป

ทำปฏิกิริยาไลเกชั่นตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต ในปริมาตรปฏิกิริยารวม 5 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 1.5 ไมโครลิตร 2x ligation buffer 2.5 ไมโครลิตร เวกเตอร์ (pDrive® cloning vector kit, Qiagen, Valencia, USA) 1 ไมโครลิตร บ่มนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส หรือที่ 16 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง

4.3 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) และDH5α (Epicentre, Madison, WI, USA) ในรูปแช่แข็ง ตามวิธีการเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์จากชุดน้ำยาเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ชุดสำเร็จ (Transformation & Storage Solution, TSS) จากบริษัทคู่มือผู้ผลิต (Epicentre, Madison, WI, USA) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยการเขี่ยเชื้อลงใน LB 2 มิลลิลิตร (10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.0) บรรจุอยู่ในหลอดโพลิโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร (Greiner Bio-one Inc, USA) เขย่าที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน ด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นเจือจางเชื้อแบคทีเรียที่ได้ใน LB เหลว ในอัตราส่วน 1:100 และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อนานประมาณ 4 ชั่วโมงที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ให้อยู่ที่ประมาณ 0.25-0.4 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาใส่ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 1.7 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยการเหวี่ยงโดยอาศัยความเร็วสูง 14,000g ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้ได้ตะกอนที่ก้นหลอด ขจัดสารละลายใสทิ้ง ในขณะเดียวกัน นำสารละลาย 2x TSS ออกจาก -20 องศาเซลเซียส มาละลายอย่างสมบูรณ์ จึงผสมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:1 เติมสารละลาย TSS 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ประกอบด้วยตะกอนแบคทีเรียในแต่ละหลอด นำคอมพิเทนต์เซลล์ที่อยู่ในสารละลาย TSS ไปใช้ในขั้นตอนการฝากถ่าย (transformation) ได้ในทันที หรือสามารถเก็บรักษาระยะยาวได้ที่ -80 องศาเซลเซียส

4.4 การฝากถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย และการคัดเลือกหาโคโลนีด้วยการใช้ระบบ “บลู-ไวท์”

เพื่อนำดีเอ็นเอเข้าสู่ระบบแบคทีเรีย นำไลเกชั่นปริมาตร 1-4 ไมโครลิตรมาผสมกับคอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ ด้วยการใช้ปิเปต วางไว้บนน้ำแข็งนาน 5 นาที ก่อนนำหลอดทดลองไปบ่มที่อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) บ่มหลอดไว้บนน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ที่ทำให้อุ่นไว้ก่อนหน้านี้ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วยการใช้ปิเปต นำไปบ่มที่ตู้ปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยการเขย่าที่ 200 rpm นาน 1 ชั่วโมง ก่อนทำการเพลท (100 และ 200 ไมโครลิตร) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกใสโพลิสไตร์เพตริดิสก์ขนาด 70 x 9 มิลลิเมตร (Biobasic, Thailand) ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง (10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 20 กรัม วุ้นอะการ์ ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.0) ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน 1 มิลลิลิตร เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ต่อ LB 1 ลิตร),

100 mM IPTG เข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร (ต่อ LB 1 ลิตร) และ X-Gal 2 มิลลิลิตร เข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ต่อ LB 1 ลิตร) บ่มเพลทในตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำเพลทที่บ่มข้ามคืนแล้วไปไว้ในตู้ปรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ในขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นโคโลนีสีขาวและสีฟ้าชัดเจน ก่อนเขี่ยโคโลนีสีขาวที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรกไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีการที่เรียกว่า พลาสมิดดีเอ็นเอมินิเพรพ (plasmid DNA miniprep) ต่อไป เก็บแบคทีเรียที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรกในหลอดไครโอ (Greiner Bio-One Inc, USA) ที่ประกอบด้วยสารละลายกลีเซอรอล 80% (กลีเซอรอล 80 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 20 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วนเซลล์ 650 ไมโครลิตร ต่อกลีเซอรอล 350 ไมโครลิตร และหาลำดับเบสดีเอ็นเอสอดแทรกในขั้นตอนถัดไป

4.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เขี่ยโคโลนีสีขาวจากเพลทที่บ่มข้ามคืนไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB (10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นานข้ามคืน ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ 200 rpm ดูดสารละลาย 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาดเล็กปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้จากเซลล์ *E. coli* ด้วยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ทำการเหวี่ยงเซลล์แบคทีเรียให้ตกตะกอนโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที ขจัดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนด้วยการใช้บัฟเฟอร์ P1 (ที่ประกอบด้วยสารละลาย RNase 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 250 ไมโครลิตร เขย่าให้ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร เติมสารละลาย P2 250 ไมโครลิตร และเขย่าหลอดกลับไปกลับมาช้าๆ 4 ถึง 6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ P3 350 ไมโครลิตร และเขย่าหลอดทดลองกลับไปกลับมาช้าๆ 4 ถึง 6 ครั้ง (ทันทีที่เติมบัฟเฟอร์ P3) นำหลอดไปเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่นอยู่ที่ภายใต้ก้นหลอด ดูดสารละลายใสลงในหลอดทดลองที่ประกอบด้วยคอลัมน์เสียบอยู่ด้านบน นำคอลัมน์ไปเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 1 นาที ขจัดสารละลายที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง ซับหลอดให้แห้ง เติมบัฟเฟอร์ PB 0.5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ เหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 1 นาที ขจัดสารละลายที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง นำคอลัมน์ไปไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร ใหม่ ก่อนเติมบัฟเฟอร์ EB 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำคอลัมน์ไปเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูง ที่ 14,000g นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอไปวิเคราะห์บน 1% อะกาโลสเจลอิเลกโตรฟอเรซิส เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บระยะสั้น หรือ ที่ -20 องศาเซลเซียสได้เป็นระยะเวลานาน

4.6 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรก

เพื่อเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรกไว้เป็นระยะนาน ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เลี้ยงไว้นานข้ามคืน ปริมาตร 650 ไมโครลิตรลงในหลอดไครโอขนาด 12.5 x 38 มิลลิเมตร (Greiner Bio-One Inc, USA) เติมสารละลายกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 80% (กลีเซอรอล 80มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 20 มิลลิลิตร) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปต นำไปเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

4.7 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก (DNA sequencing)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาหาลำดับเบส ได้แก่ SP6 (5’-CATTTAGGTGACACTATAG-3’) และ T7 (5’-GTAATACGACTCACTATAG-3’) นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาใช้เป็นเทมเพลทในปฏิกิริยาหาลำดับเบสปริมาตร 10 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Perkin-Elmer, CA, USA) และ 3.2 pmole ของแต่ละไพรเมอร์ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้แก่ 30 รอบของ 96 องศาเซลเซียส/10 วินาที 50 องศาเซลเซียส/5วินาที 60 องศาเซลเซียส/4นาที ขึ้นต้นด้วย 96 องศาเซลเซียส/10 วินาที ใน Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำตัวอย่างมาตกตะกอนด้วยการเติม 50 ไมโครลิตรของ เอธานอล/โซเดียมอะซิเตท (10/1) ผสมให้เข้ากันบนน้ำแข็งนาน 20 นาที และเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 20 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปล้างสองครั้งด้วย 70% เอธานอล และทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนเติม 1.5 ไมโครลิตร sequencing loading dye (80% deionized formamide, 5 mM EDTA pH8.0 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บลูเด็กซ์แตรน) ภายหลังการทำให้เสียสภาพ denaturation นาน 3 นาที ที่ 90 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างทั้งหมดไปหยอดลงในโพลิอะคริลาไมด์ เจลในเครื่อง ABI PRISM® 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้ DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank nonredundant sequence database ด้วยการใช้ gapped BLAST VERSION 2.0 (Altschul et al., 1997) Blastn เปรียบเทียบนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการเปรียบเทียบกับนิวคลิโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล Blastx เปรียบเทียบการแปรรหัสเป็นโปรตีน (six-frame conceptual translation) ของนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูล

ขั้นตอนที่ 5. การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics)

ลำดับเบสที่ได้จากขั้นตอนการหาลำดับเบสด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติแล้ว สามารถวิเคราะห์ด้วยการใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการใช้ฐานข้อมูลชีวภาพจากอินเทอร์เน็ต (NCBI database, Altschul, *et al*. 1997) ExPASy Proteomics Servers และโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA star expert sequence analysis software, DNAstar) ตามคำแนะนำบริษัทคู่มือคู่ผลิต ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้ DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank nonredundant sequence database ด้วยการใช้ gapped BLAST VERSION 2.0 (Altschul *et al*., 1997) Blastn เปรียบเทียบนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการเปรียบเทียบกับนิวคลิโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล Blastx เปรียบเทียบการแปรรหัสเป็นโปรตีน (six-frame conceptual translation) ของนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูล

<u>การทดลองย่อยที่ 2</u> การโคลนยีน หาลำดับเบส วิเคราะห์ลำดับเบสยีน *MAC1* และ *SUM1* จากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

ขั้นตอนที่ 1. การเตรียมสายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ศึกษา และสภาพการเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรา *M. grisea* ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีจำนวนสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากจังหวัดราชบุรี และสายพันธุ์จากปทุมธานี เก็บรักษาเชื้อไว้บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ เพื่อชักนำการสร้างสปอร์

สกัดสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้โดยการเลี้ยงเส้นใยบน PDA นาน 7 วัน ที่ 22 องศาเซลเซียส แยกสปอร์จากเส้นใยเชื้อราด้วยการกรองโดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อบนผ้ากรองปลอดเชื้อ (Miracloth) เหวี่ยงสปอร์ที่แยกได้ด้วยการใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Labnet/Spectrafuge16M, National) ที่ 14,000g ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และปรับความเข้มข้นเป็น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 2. การสกัดกรดนิวคลิอิกจากเชื้อรา

เลี้ยงเส้นใยในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDA) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และตัดชิ้นเส้นใยขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร จำนวน 5 ชิ้น เขี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าว เขย่าฟลาสก์ที่ 250 rpm นาน 3 วัน ก่อนเก็บกลุ่มเส้นใยด้วยเครื่องสูญญากาศ (vacuum apparatus) ที่ประกอบด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร (Whatman, NJ, USA) บดเส้นใยที่กรองได้ด้วยไนโตรเจนเหลวภายในโกร่ง ใช้วิธี

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (NucleoSpin Plant L Kits, CLONTECH, Palo Alto, CA) และวิธีการแบบเดียวกัน (วิธีการที่ 1 และ 2) ดังกล่าวข้างต้น

ขั้นตอนที่ 3. การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคพืชในเชื้อรา

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่เมอเรสด้วยเทมเพลทจีโนมิกดีเอ็นเอเชื้อราสายพันธุ์ปทุมธานีและราชบุรีด้วยการใช้ Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากบริเวณที่มีความเหมือนอย่างสูงของยีน *MAC1* และ *SUM1* ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.5U Taq DNA polymerase, 1x QIAGEN PCR Buffer, 200 μM dNTP, 20-100 ไมโครกรัมของเทมเพลทดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ A (forward) 0.5 μM และไพรเมอร์ B (reverse) 0.5 μM อุณหภูมิ (annealing temperature) 52 องศาเซลเซียส (สำหรับ *MAC1*) และ 50 องศาเซลเซียส (สำหรับ *SUM1*) สภาพการทำปฏิกิริยาได้แก่: 2 นาที 30 วินาที/90 องศาเซลเซียส ตามด้วย 30 รอบของแต่ละโปรแกรมดังนี้ 15 วินาที denaturation step ที่ 93 องศาเซลเซียส/ 45 วินาที annealing temperature ที่ 52 องศาเซลเซียส และ 1 นาที 20 วินาที elongation step ที่ 72 องศาเซลเซียส ตามด้วยขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนวิเคราะห์บนอะกาโลสเจล ดังอธิบายข้างต้น

นำแอมพลิคอนจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจำนวน 20 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์บน 1.5% อะกาโลสเจล นาน 3-6 ชั่วโมง ที่ความต่างศักย์ 60 โวลท์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่อง GelDoc transluminator และเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย 1kb DNA ladder (New England Biolabs, MA, USA)

3.1 การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการโคลนยีน

สกัดดีเอ็นเอแฟรกเมนต์ออกจากอะกาโลสเจล ด้วยการใช้ใบมีดที่เช็ดด้วย 75% เอธานอลตัดแถบดีเอ็นเอออกภายใต้การส่องดูด้วยแสงยูวี ใส่ชิ้นเจลที่ตัดได้ลงใน 1.7 มิลลิลิตร หลอดทดลองขนาดเล็ก (Eppendorf tube) และสกัดดีเอ็นเอด้วยออกจากเจลด้วยการใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) ตามคำแนะนำจากคู่มือบริษัทผู้ผลิต เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ -80 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที ตามด้วยการเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงนาน 3 ถึง 5 วินาที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การทำไลเกชั่น

นำดีเอ็นเอที่ตัดออกจากเจลมาตรวจสอบความเข้มข้นคร่าวๆ โดยใช้ 1%อะกาโลสเจล จากนั้นทำปฏิกิริยาไลเกชั่นโดยใช้ QIAGEN PCR cloning Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) ตามคำแนะนำจากคู่มือบริษัทผู้ผลิตในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย pDrive® Cloning vector (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร แอมพลิคอนหรือดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจล 1-4 ไมโครลิตร, 2x Ligation master mix 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น (sterile distilled water) ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยการใช้ปิเปตขนาด P200 บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน หรือเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนถัดไป

ทำปฏิกิริยาไลเกชั่นตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต ในปริมาตรปฏิกิริยารวม 5 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 1.5 ไมโครลิตร 2x ligation buffer 2.5 ไมโครลิตร เวกเตอร์ (pDrive® cloning vector kit, Qiagen, Valencia, USA) 1 ไมโครลิตร บ่มนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือที่ 16 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง

3.3 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) และ DH5α (Epicentre, Madison, WI, USA) ในรูปแช่แข็ง ตามวิธีการเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์จากชุดน้ำยาเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ชุดสำเร็จ (Transformation & Storage Solution, TSS) จากบริษัทคู่มือผู้ผลิต (Epicentre, Madison, WI, USA) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยการเขี่ยเชื้อลงใน LB 2 มิลลิลิตร (10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.0) บรรจุอยู่ในหลอดโพลิโพรพิลีนขนาด 50 มิลลิลิตร (Greiner Bio-one Inc, USA) เขย่าที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน ด้วยความเร็ว 200 rpm จากนั้นเจือจางเชื้อแบคทีเรียที่ได้ใน LB เหลว ในอัตราส่วน 1:100 และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อนานประมาณ 4 ชั่วโมงที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ให้อยู่ที่ประมาณ 0.25-0.4 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาใส่ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 1.7 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยการเหวี่ยงโดยอาศัยความเร็วสูง 14,000g ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้ได้ตะกอนที่ก้นหลอด ขจัดสารละลายใสทิ้ง ในขณะเดียวกัน นำสารละลาย 2x TSS ออกจาก -20 องศาเซลเซียสมาละลายอย่างสมบูรณ์ จึงผสมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:1 เติมสารละลาย TSS 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ประกอบด้วยตะกอนแบคทีเรียในแต่ละหลอด นำคอมพิเทนต์เซลล์ที่อยู่ในสารละลาย TSS ไปใช้ในขั้นตอนการฝากถ่าย (transformation) ได้ในทันที หรือสามารถเก็บรักษาระยะยาวได้ที่ -80 องศาเซลเซียส

3.4 การฝากถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย และการคัดเลือกหาโคโลนีด้วยการใช้ระบบ “บลูไวท์”

เพื่อนำดีเอ็นเอเข้าสู่ระบบแบคทีเรีย นำไลเกชั่นปริมาตร 1 - 4 ไมโครลิตรมาผสมกับคอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ ด้วยการใช้ปิเปต วางไว้บนน้ำแข็งนาน 5 นาที ก่อนนำหลอดทดลองไปบ่มที่อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) บ่มหลอดไว้บนน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ที่ทำให้อุ่นไว้ก่อนหน้านี้ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วยการใช้ปิเปต นำไปบ่มที่ตู้ปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยการเขย่าที่ 200 rpm นาน 1 ชั่วโมง ก่อนทำการเพลท (100 และ 200 ไมโครลิตร) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกใสโพลิสไตร์เพตริดิสก์ขนาด 70 x 9 มิลลิเมตร (Biobasic, Thailand) ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง (10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 20 กรัม Agar ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.0) ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน 1 มิลลิลิตร เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ต่อ LB 1 ลิตร), 100 mM IPTG เข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร (ต่อ LB 1 ลิตร) และ X-Gal 2 มิลลิลิตร เข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ต่อ LB 1 ลิตร) บ่มเพลทในตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำเพลทที่บ่มข้ามคืนแล้วไปไว้ในตู้ปรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ในขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นโคโลนีสีขาวและสีฟ้าชัดเจน ก่อนเขี่ยโคโลนีสีขาวที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรกไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีการที่เรียกว่า พลาสมิดดีเอ็นเอมินิเพรพ (plasmid DNA miniprep) ต่อไป เก็บแบคทีเรียที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรกในหลอดไครโอ (Greiner Bio-One Inc, USA) ที่ประกอบด้วยสารละลายกลีเซอรอล 80% (กลีเซอรอล 80 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 20 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วนเซลล์ 650 ไมโครลิตร ต่อกลีเซอรอล 350 ไมโครลิตร

3.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เขี่ยโคโลนีสีขาวจากเพลทที่บ่มข้ามคืนไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB (10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, ต่อปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นานข้ามคืน ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ 200 rpm ดูดสารละลาย 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้จากเซลล์ *E. coli* ด้วยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ทำการเหวี่ยงเซลล์แบคทีเรียให้ตกตะกอนโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที ขจัดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนด้วยการใช้บัฟเฟอร์ P1 (ที่ประกอบด้วยสารละลาย RNase 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 250 ไมโครลิตร เขย่าให้ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร เติมสารละลาย P2 250 ไมโครลิตร และเขย่าหลอดกลับไปกลับมาช้าๆ 4 ถึง 6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ P3 350 ไมโครลิตร และเขย่าหลอดทดลองกลับไปกลับมาช้าๆ 4 ถึง 6 ครั้ง (ทันทีที่เติมบัฟเฟอร์ P3) นำหลอดไปเหวี่ยง

โดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 5 นาที ในขั้นตอนนี้จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่นอยู่ที่ภายใต้ก้นหลอด ดูดสารละลายใสลงในหลอดทดลองที่ประกอบด้วยคอลัมน์เสียบอยู่ด้านบน นำคอลัมน์ไปเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 1 นาที ขจัดสารละลายที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง ซับหลอดให้แห้ง เติมบัฟเฟอร์ PB 0.5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ เหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 1 นาที ขจัดสารละลายที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง นำคอลัมน์ไปไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร ใหม่ ก่อนเติมบัฟเฟอร์ EB 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำคอลัมน์ไปเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูง ที่ 14,000g นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอไปวิเคราะห์บน 1.0% อะกาโลสเจลอิเลกโตรฟอเรซิส เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสสำหรับเก็บระยะสั้น หรือ ที่ -20 องศาเซลเซียสได้เป็นระยะเวลานาน

3.6 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรก

เพื่อเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสอดแทรกไว้เป็นระยะนาน ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เลี้ยงไว้นานข้ามคืน ปริมาตร 650 ไมโครลิตรลงในหลอดไครโอขนาด 12.5 x 38 มิลลิเมตร (Greiner Bio-One Inc, USA) เติม 80% สารละลายกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปต นำไปเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

3.7 การหาลำดับเบสดีเอ็นเอสอดแทรก

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาหาลำดับเบส ได้แก่ SP6 (5’-CATTTAGGTGACACTATAG-3’) และ T7 (5’-GTAATACGACTCACTATAG-3’) นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาใช้เป็นเทมเพลทในปฏิกิริยาหาลำดับเบสปริมาตร 10 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Perkin-Elmer, CA, USA) และ 3.2 pmole ของแต่ละไพรเมอร์ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้แก่ 30 รอบของ 96 องศาเซลเซียส/10 วินาที 50 องศาเซลเซียส/5วินาที 60 องศาเซลเซียส/4นาที ขึ้นต้นด้วย 96 องศาเซลเซียส/10 วินาที ใน Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) ภายหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำตัวอย่างมาตกตะกอนด้วยการเติม 50 ไมโครลิตรของ เอธานอล/โซเดียมอะซิเตต (10/1) ผสมให้เข้ากันบนน้ำแข็งนาน 20 นาที และเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วสูงที่ 14,000g นาน 20 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปล้างสองหนด้วย 70% เอธานอล และทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนเติม 1.5 ไมโครลิตร sequencing loading dye (80% deionized formamide, 5 mM EDTA pH8.0 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บลูเด็กซ์แตรน) ภายหลังการทำให้เสียสภาพ denaturation นาน 3 นาที ที่ 90 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างทั้งหมดไปหยอดลงในโพลิอะคริลาไมด์ เจลในเครื่อง ABI PRISM® 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้ DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

nonredundant sequence database ด้วยการใช้ gapped BLAST VERSION 2.0 (Altschul *et al*., 1997) Blastn เปรียบเทียบนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการเปรียบเทียบกับนิวคลิโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล Blastx เปรียบเทียบการแปรรหัสเป็นโปรตีน (six-frame conceptual translation) ของนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูล

ขั้นตอนที่ 4. การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics)

ลำดับเบสที่ได้จากขั้นตอนการหาลำดับเบสด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติแล้ว สามารถวิเคราะห์ด้วยการใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการใช้ฐานข้อมูลชีวภาพจากอินเทอร์เน็ต (NCBI database, Altschul, *et al*. 1997) ExPASy Proteomics Servers และโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA star expert sequence analysis software, DNAstar) ตามคำแนะนำบริษัทคู่มือคู่ผลิต ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้ DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank nonredundant sequence database ด้วยการใช้ gapped BLAST VERSION 2.0 (Altschul et al., 1997) Blastn เปรียบเทียบนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการเปรียบเทียบกับนิวคลิโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล Blastx เปรียบเทียบการแปรรหัสเป็นโปรตีน (six-frame conceptual translation) ของนิวคลิโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูล

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง 2 ปี เริ่มต้น ตุลาคม 2546 สิ้นสุด กันยายน 2548

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และ โรงเรือนปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรคไหม้ด้วยเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากจังหวัดราชบุรีและสายพันธุ์จากจังหวัดปทุมธานี (ภาพที่ 3) สามารถทำให้เกิดโรคไหม้ในข้าวขาวตาแห้ง 17 กข23 และ TN1 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรค (susceptible) มากที่สุด รองลงมาได้แก่ พันธุ์เหลืองทอง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีคุณสมบัติต้านทานปานกลาง (moderate resistant) ต่อเชื้อราทั้งสอง

สายพันธุ์ แต่เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ในข้าวพันธุ์หางยี 71 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน (resistant) (ตารางที่ 1; ภาพที่ 4)

ดีเอ็นเอไลบราลี่ที่สังเคราะห์ได้สำหรับข้าวพันธุ์หางยี 71 และเหลืองทองมีขนาดประมาณ 9-23 kb เมื่อทำปฏิกิริยา "fill-in" และไลเกตเข้าสู่แลมด์ดาเวกเตอร์ (Lambda FIX®II/XhoI partial fill-in Vector, (Stratagene, La Jolla, CA) ทำปฏิกิริยาแพกเกจด้วยการใช้ Gigapack III Gold packaging extract (Stratagene, La Jolla, CA) ไลบราลี่ที่ยังไม่ได้แอมพลิไฟล์ประกอบด้วยจำนวนพลากค์มากกว่า $1x10^6$ plaque forming units สำหรับข้าวเหลืองทอง ส่วนข้าวพันธุ์หางยี 71 มีจำนวนพลากค์น้อยกว่า $1x10^2$ plaque forming units แอมพลิไฟล์ไลบราลี่จากเหลืองทองและเก็บรักษาไว้ที่ตู้ปรับอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

แอมพลิคอนที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมีขนาดตั้งแต่ 450-600 bp ซึ่งสอดคล้องกับบริเวณที่มีความเหมือนอย่างสูงของยีนต้านทาน (NBS-LRR) จากการออกแบบไพรเมอร์ 6 คู่ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคโดยเชื้อรา *MAC1* และ *SUM1* จากการออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่ ตามลำดับ (ตารางที่ 2; ภาพที่ 1)

ไลเกตแอมพลิคอนที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเข้าสู่ pDRIVE® cloning vector (Qiagen, Valencia, USA) เขี่ยโคโลนีทรานส์ฟอร์แมนต์จำนวน 2 โคโลนี สำหรับแต่ละยีน ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสด้วยการใช้ nested primers ของแต่ละยีน (ไม่ได้แสดงผล) ส่วนลำดับกรดอะมิโน (deduced amino acids) ของแอมพลิคอนที่ได้จากดีเอ็นเอแฟรกเมนต์เหล่านี้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน Adenylate cyclase ของเชื้อราที่ 80% ของความเหมือนลำดับเบสเทียบกับลำดับที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล และกับ NBS-LRR จากพืชชนิดต่างๆ ที่ช่วงตั้งแต่ 40-60% ความเหมือนของลำดับเบส ได้กำหนดชื่อโคลนที่ประกอบด้วยแอมพลิคอนของยีนต่างๆ และผลการหาลำดับเบสไว้ในตารางที่ 3 และภาพที่ 2

การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อราในแง่ของการเกิดโรค (plant-pathogen interactions) ที่มีความสำคัญต่อการควบคุมโรคและการปรับปรุงพันธุ์ ได้มีรายงานการโคลนยีนที่คาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคพืชจากเชื้อราหลายชนิด เช่น จากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*M.grisea* : Mitchell and Dean, 1997 ; Adachi and Hamer, 1998), *Colletotrichum lagenarium* (เชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนส, Takano *et al*. 2001),*C. gloeosporioides* (Kim *et al*. 2000) เป็นต้น การศึกษานี้มุ่งศึกษายีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคพืช ได้แก่ *MAC1* และ *SUM1* ซึ่งเป็นยีนที่สกัดแยกได้จากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์ในประเทศไทย ทั้งนี้ได้มีการโคลนยีน *MAC1* จากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดย Choi and Dean (1997) แต่ใช้สายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในต่างประเทศ (Mg 70-15) พบว่า มิวแตนท์ของเชื้อราที่มีความบกพร่องของยีน

MAC1 มีความผิดปกติในเรื่องของการเจริญเติบโต การสร้างสปอร์ การสืบพันธุ์และการสร้างโครงสร้างที่ใช้ในการก่อโรคหรือแอพเพรสซอเรียม อีกทั้ง ยีน *SUM1* สามารถนำหน้าที่กลับคืนของมิวแตนท์ *MAC1* ได้บางส่วน ในเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ มิวเตชั่นใน *SUM1* ยับยั้งการเกิดความผิดปกติทางด้านการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของ *mac1* มิวแตนท์ที่ปราศจากอะดินิเลตไซเคลส (Adachi and Hamer, 1998) อย่างไรก็ตามยีนที่โคลนได้เป็นเพียงบางส่วนของยีนเท่านั้นสามารถต่อยอดเพื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการได้ยีนที่สมบูรณ์ ปริมาณกรดอะมิโนที่เชื้อราสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์ไทยสามารถกำหนดรหัสได้โดยยีน *MAC1* และ *SUM1* จำนวนอินทรอนที่ปรากฏการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งหน้าที่ของยีนทั้งสองในการเกิดโรคในข้าว เป็นต้น ซึ่งอยู่ในระหว่างเตรียมการศึกษาเพื่อทดสอบหน้าที่ของยีนที่โคลนได้ โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำลายการแสดงออกของยีนที่โคลนได้จากเชื้อราด้วยวิธีทางเลือกที่หนึ่ง ได้แก่ “site-directed mutagenesis” และด้วยวิธีทางเลือกที่สอง ได้แก่ “ทรานส์โพซอนมิวตาเจเนซิส” (transposon mutagenesis) เตรียมการสกัดโปรโตพลาสต์ที่จำเป็นใช้ในการฝากถ่ายยีนของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ และเตรียมการทดสอบเพื่อหาการแสดงออกของยีนและการทดสอบการกลับคืนของลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อรา (complementation analysis)

แม้ว่ามีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการก่อโรคพืชอยู่ก่อนหน้านี้ แต่การความเข้าใจในเรื่องดังกล่าวโดยเฉพาะในเรื่อง cAMP-PKA ยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนัก การศึกษามุ่งเพิ่มความรู้ความเข้าใจว่าเชื้อรามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไหม้ในข้าวได้อย่างไร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการออกแบบโมเลกุลเป้าหมายใหม่ที่ใช้ต้านเชื้อรา (Anti-fungal molecules) เพื่อควบคุมโรคไหม้ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

1. การโคลนยีน หาลำดับเบส และวิเคราะห์ลำดับเบสยีนต้านทานจากข้าว nucleotide binding site- leucine-rich-repeat (NBS-LRR) และไคเนสแอนนาลอก (KA)

จากการศึกษาการโคลนยีน nucleotide binding site- leucine-rich-repeat (NBS-LRR) และไคเนสแอนนาลอก (KA) จากข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย ได้แก่ ข้าวพันธุ์หางยี 71 และข้าวพันธุ์เหลืองทอง สามารถใช้วิธีการเพิ่มจำนวนแอมพลิคอนหรือชิ้นส่วนของยีนได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แอมพลิคอนที่โคลนได้มีขนาด 450 - 500 bp โดยประมาณจากการตรวจสอบด้วยอะกาโลสเจลอิเลกโตรฟอเรซิส เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสแอมพลิคอนยีน NBS-LRR สองแอมพลิคอนที่โคลนได้ พบมีความเหมือนกับยีน resistance protein (*Tritichum astivum*) ที่ 9e-32 และ

2e-57 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ส่วนแอมพลิคอนยีนโปรตีนไคเนส สองแอมพลิคอนที่โคลนได้ พบมีความเหมือนกับ putative wall-associated protein kinase ที่ 2e-32 และ 6e-70 ตามลำดับ ทั้งนี้ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้มาซึ่งพันธุ์ข้าวที่ประกอบด้วยยีนต้านทาน (R) ต่อเชื้อราโรคไหม้ คาดว่าการศึกษาดังกล่าวจะย่นระยะเวลาในการหายีนต้านทาน (R) ในข้าว ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณสมบัติต้านทานโรคไหม้ด้วยวิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายเป็นตัวช่วย (molecular marker-aided selection breeding) ต่อไป

2. การโคลนยีน หาลำดับเบส และวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *MAC1* และ *SUM1* จากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

จากการศึกษาการโคลนยีน *MAC1* และ *SUM1* จากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากสายพันธุ์ปทุมธานี สามารถใช้วิธีการเพิ่มจำนวนแอมพลิคอนหรือชิ้นส่วนของยีนได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส แอมพลิคอนที่โคลนได้มีขนาด 600 bp โดยประมาณ จากการตรวจสอบด้วยอะกาโลสเจลอิเลกโตรฟอเรซิส เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสแอมพลิคอนยีน *MAC1* สองแอมพลิคอนที่โคลนได้ พบมีความเหมือนอย่างสูงกับยีน adecylate cyclase (*Magnaporthe grisea*) ที่ 2e-120 และ 4e-17 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ส่วนแอมพลิคอนยีนโปรตีน *SUM1* สองแอมพลิคอนที่โคลนได้ พบมีความเหมือนกับยีนที่โคลนได้จาก *M. grisea* 70-15 Accession หมายเลข XM365053.1 ที่ 2e-120 ทั้งสองแอมพลิคอน ทั้งนี้ ยีน MAP kinase, ABC transporters และ Avirulence gene จากเชื้อราอยู่ในแผนการทดลองในขั้นตอนถัดไปด้วยเช่นกัน การศึกษาความต้านทานและความสามารถการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา ช่วยเพิ่มความเข้าใจปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อราในระดับชีววิทยาโมเลกุล เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและควบคุมโรคไหม้ต่อไป

3. แนวทางการกำหนดแผนงานวิจัยและพัฒนาในอนาคต

การศึกษานี้ นับว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาการปรากฏของยีนต้านทานในข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย เนื่องจากข้าวพันธุ์ต้านทานมีจำนวนอยู่ค่อนข้างมาก และความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีอยู่สูง ทำให้สามารถทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตได้ อีกทั้ง การนำพันธุ์ข้าวป่ามาใช้เพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโดยใช้วิธีดังกล่าว นับว่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ เพื่อประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและควบคุมโรคไหม้ต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกรมวิชาการเกษตร ตามทะเบียนวิจัยเลขที่ 05-01-47-0203 ขอขอบคุณคุณดารา เจตนะจิตร์ สำหรับความช่วยเหลือด้านวิชาการ คุณวิลาวรรณ จั่นแก้ว คุณสุนิสา คงสมโอษฐ์ และคุณสุภาวดี ฤทธิ์สน สำหรับความช่วยเหลือการทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรค ขอแสดงความขอบคุณอย่างยิ่งต่อคุณวรรณภา เอี่ยมพ่อค้า และคุณณาตยา นุ่มนวล สำหรับจัดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์การทดลอง อีกทั้ง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่อนุเคราะห์เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ อุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนาการ และคณะ. (2546). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. บทคัดย่อการประชุมวิชาการ "ข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2546" สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

Adachi, K., and Hamer, J.E. (1998). Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 10:1361-1373

Altschul, S.F., Madden, T.L., Shaffer, A.A., Zhang, Z., Zhang, J., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Bent, A. (1996). Plant disease resistance genes: Function meets structure. Plant Cell 8: 1757-1771.

Choi, W., and Dean, R.A. (1997) The adynylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. Plant Cell 9:1973-1983.

Collins, N.C., Webb, C.A., Seah, J.G., Ellis, S.H., Hulbert, S.H., and Pryor, A. (1998). The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. Mol. Plant. Microbe. Inter. 11:968-978.

Dodds, P.N., Lawrence, G.J., and Ellis, J.G. (2001). Contrasting modes of evolution acting on the complex N locus for rust resistance in flax. Plant J. 27:439-453.

Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9. 275-296.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. Annu. Rev. Plant Physio.Plant. Mol. Biol. 48: 575-607.

Kanazin, V., Marek, L.F., and Shoemaker, R.C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93:11746-11750.

Kiyosawa, S. (1984). Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast fungus. Rice Genet. Newsl. 1, 95-97

Leister, D., Kurth, J., Laurie, D.A., Yano, M., Sasaki, T., Devos, K., Graner, A., and Schilze-Lefert, P. (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 370-375.

Mago, R., Nair, S., and Mohan, M. (1999). Resistance gene analogues from rice: Cloning, sequencing and mapping. Theor. Appl. Genet. 99:50-57.

Mitchell, T.K., and Dean, R.A. (1995). The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 7:1869-1878.

Ou, S.H. (1985). Rice Diseases, 2nd ed. (Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute).

Rossman, A.Y., Howard, R.J., and Valent, B. (1990). *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast fungus. Mycologia 82, 509-512.

Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, .H.-S., Pi, L. –Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauguet, C., and Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. Science 270, 1804-1806.

Wang et al., 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

Wu, K.-S., Martinez, C., Lentini, Z., Tohme, L., Chumley, F.G., Scolnik, P.A., and Valent, B. (1995). Cloning a blast resistance gene by chromosome walking. In Rice Genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, 16-20 Oct. 1995. G.S. Khush, ed (Manilla Phillippines: International Rice Research Institute), pp. 669-674.

Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibushi, K., and Watanabe, S. (1976). Proposal of a new method for differentiating races of *Puricularia oryzae* Cavara in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 42, 216-219.

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *M. grisea*

พันธุ์ข้าว	**สายพันธุ์เชื้อรา**	
	ปทุมธานี	**ราชบุรี**
เหลืองทอง	ต้านทานปานกลาง	ต้านทานปานกลาง
หางยี 71	ต้านทาน	ต้านทาน
TN1	อ่อนแอ	อ่อนแอ
ขาวตาแห้ง 17	อ่อนแอ	อ่อนแอ
กข23	อ่อนแอ	อ่อนแอ

ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์สังเคราะห์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ไพรเมอร์	**ลำดับเบส**
NBS-LRR	
B5 (forward primer)	GGI GGI (AG)TI GGI AAI ACI ACA
B6 (reverse primer)	IAG IG(CT) IAG IGG IAG ICCA
B10 (reverse primer)	IAA IG(CT) IAG IGG IAG ICCA
B12 (reverse primer)	IAA IG(CT) IAA IGG IAG ICCA
Protein kinase	
C4 (forward primer)	G(AGCT)G G(AGCT)G T(ACT)G GIA AGA C(AGCT)A CA
C6 (reverse primer)	A(AG)I GCT A(AG)I GGI A(AG)I CCA
C7 (reverse primer)	(AG)IG C(AG)T A(AG)T GCA T(AG)A AA
MAC1	
A1 (forward primer)	T(AGCT)G T(AGCT)T T(CT)A C(AGCT)G A(CT)A T(ACT)A AA
A3 (forward primer)	CA(AGCT) GA(AG) GG(AGCT) GA(CT) GC(AGCT) TT(CT) ATGA
A4 (reverse primer)	A(CT)(AGCT) GG(AGCT) CC(AG) (AT)A(AG) TA(AG) TCC ATA
SUM1	
A8 (forward primer)	A(CT)C C(ACGT)C A(CT)A T(ACT)A T(ACT)A AA
A9 (reverse primer)	A(AG)(AG) AA(AG) TT(ACGT) CC(AG) TC(ACGT) GTC AT A

ตารางที่ 3 แสดงแอนนาลอกยีนต้านทาน Nucleotide binding site-leucine rice repeat *MAC1* และ *SUM1* ที่สกัดได้จากข้าวและเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ตามลำดับ เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับ GenBank และแสดงผลลัพธ์ที่ได้สูงสุด

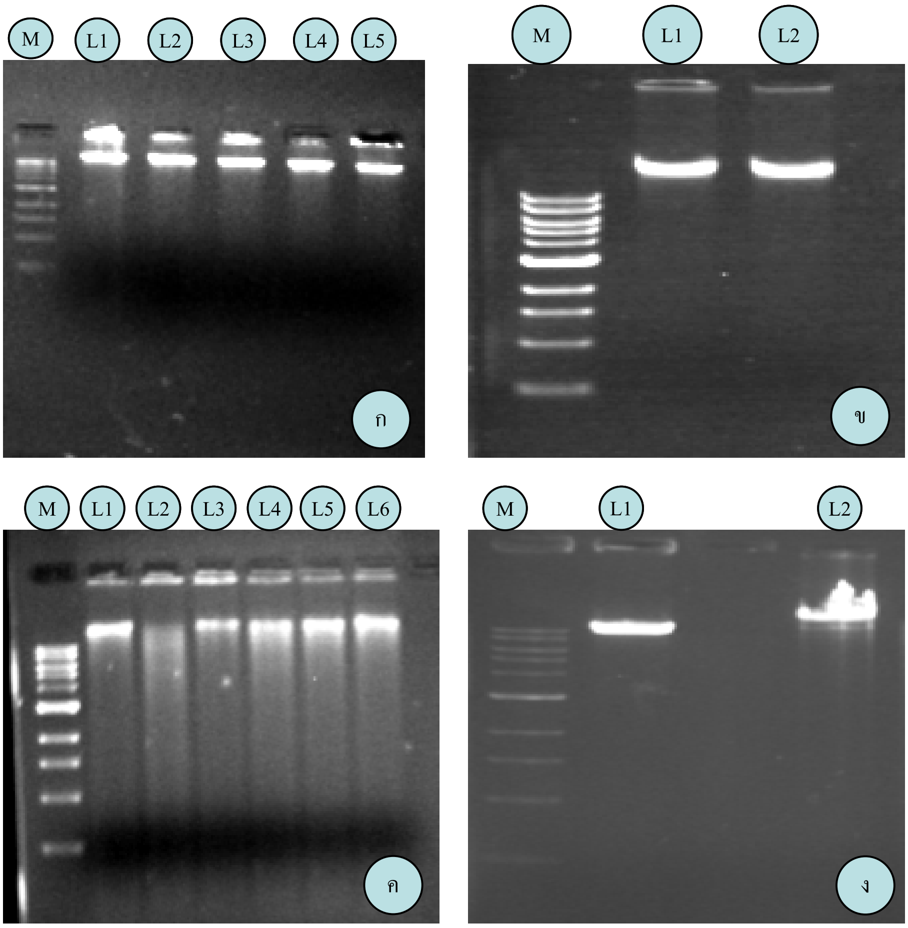
Clone name	Gene Name	Source	Alignment	Probability scores
pMR001	*MAC1*	เชื้อราปทุมธานี	(AF006827) Adenylate cyclase *Magnaporthe grisea*	2e-120
pMR006	*MAC1*	”	(AAC34139) Adenylate cyclase *Magnaporthe grisea*	4e-17
pMRP010	NBS-LRR	ข้าวหางยี 71	(AF087521) resistance protein (*Triticum astivum*)	9e-32
pMR016	*SUM1*	เชื้อราปทุมธานี	(XM 365053.1) *Magnaporthe grisea* 70-15	2e-120
pSPP001	NBS-LRR	ข้าวหางยี 71	(AF087521) resistance protein (*Triticum astivum*)	2e-57
pSPP015	โปรตีนไคเนส	”	(AC113336) Putative wall-associated protein kinase	2e-32
pSPP16	โปรตีนไคเนส	”	”	6e-70
pSPF18	*SUM1*	เชื้อราปทุมธานี	(XM 365053.1) *Magnaporthe grisea* 70-15	2e-120

ภาพที่ 1 (ก) L1-L5 แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าว

(ข) L1 และ L2 แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อรา

(ค) L1-L5 แสดงดีเอ็นเอข้าวที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดเฉพาะที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

(ง) L1 แสดงเวกเตอร์ Lambda FIX®II vector และ L2 แสดงการไลเกชั่นดีเอ็นเอข้าวเข้าสู่แลมป์ด้าเวกเตอร์ Lambda FIX®II vector

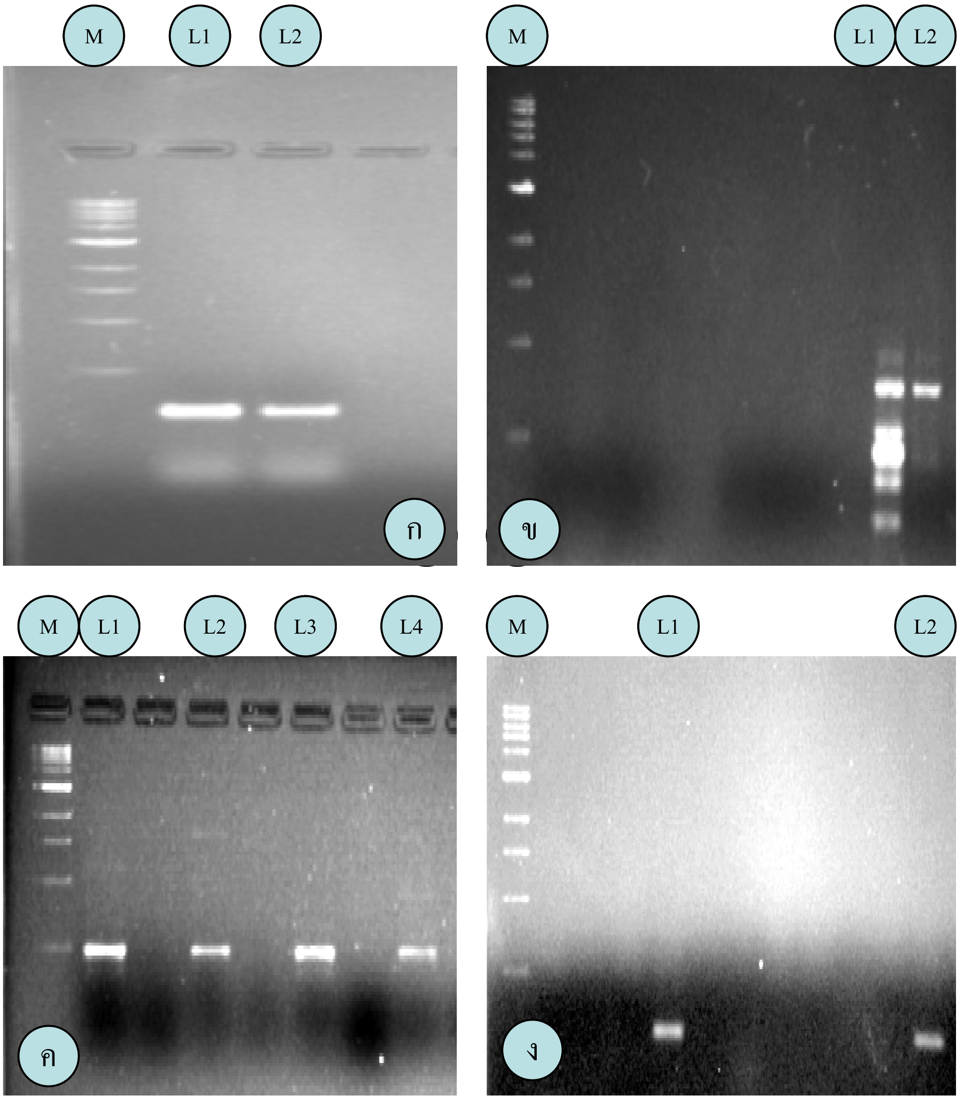


ภาพที่ 2 (ก) L1 และ L2 แสดงแอมพลิคอนยีน *MAC1* จากเชื้อราบน 0.8% อะกาโลส

(ข) L2 แสดงแอมพลิคอนยีนโปรตีนไคเนสจากข้าวบน 0.8% อะกาโลส

(ค) L1, L2, L3 และ L4 แสดงแอมพลิคอนยีน NBS-LRR จากข้าวบน 0.8% อะกาโลส

(ง) L1 และL2 แสดงแอมพลิคอนยีน *SUM1* จากเชื้อราบน 0.8% อะกาโลส

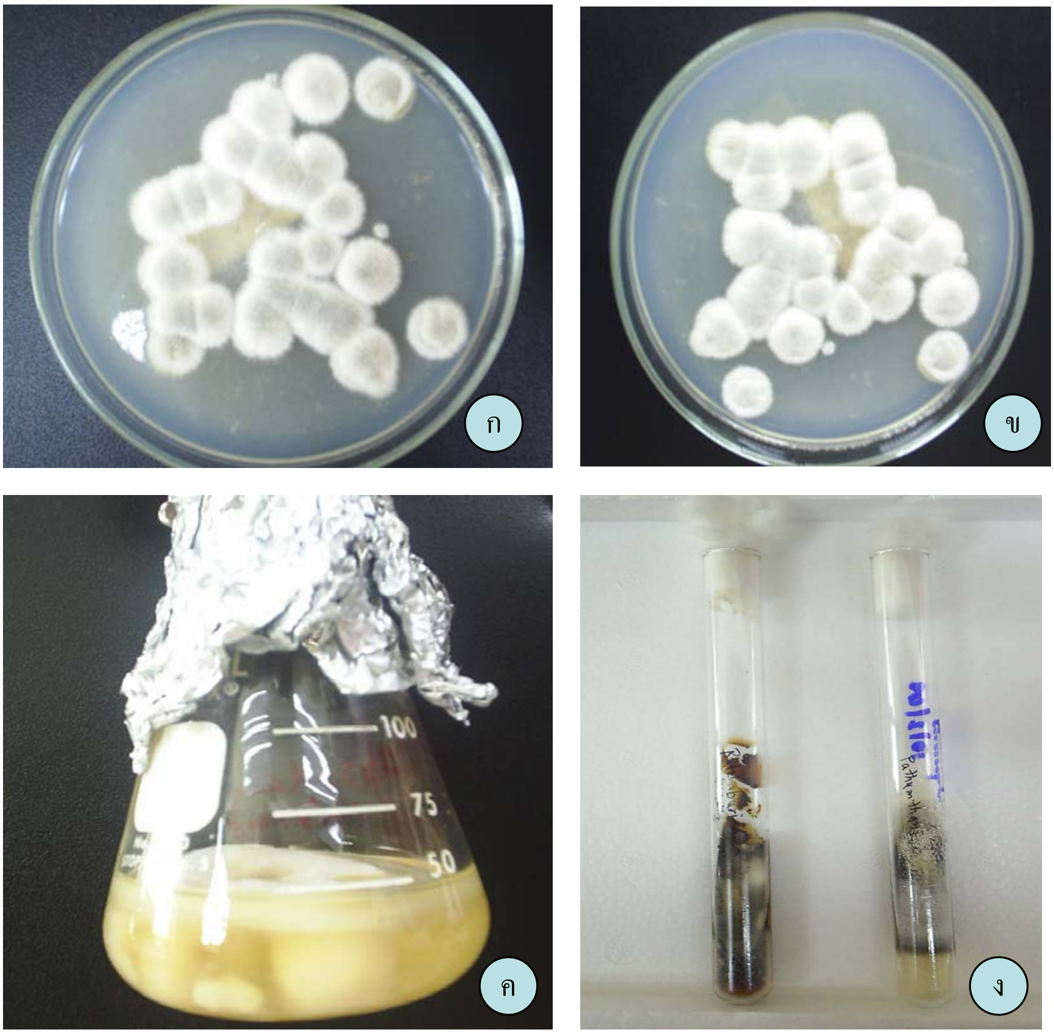


ภาพที่ 3 (ก) แสดงการเติบโตของเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ราชบุรีบนวุ้นอาหารเลี้ยงชนิดแข็ง PDA

(ข) แสดงการเติบโตของเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ปทุมธานีบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง PDA

(ค) แสดงการเติบโตของเชื้อราโรคไหม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDA

(ง) แสดงการเติบโตของเชื้อราโรคไหม้ทั้งสองสายพันธุ์ราชบุรีและปทุมธานีบนอาหารลี้ยงเชื้อ PDA



ภาพที่ 4 (ก) ภาพแสดงการปลูกข้าวก่อนปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

(ข) ใบข้าวหางยี 71 หลังปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์ปทุมธานี

(ค) ข้าวพันธุ์เหลืองทองที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์จากปทุมธานี

(ง) อาการโรคไหม้ของข้าวขาวตาแห้งที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์จากปทุมธานี