การศึกษายีนต้านทานโรคในยางพาราเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยาง

A study on Disease Resistance Genes in Rubber Tree

(*Hevea brasiliensis*) for Rubber Breeding Program

ชัชมณฑ์ แดงกนิษฐ์ นาถาวร [1] อารมณ์ โรจน์สุจิตร์ [2]

[1] ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร

[2] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

Phytophthora palmivora เป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและโรคเส้นดำในยางพารา ทำให้ใบร่วงก่อนเวลาอันควร และหน้ากรีดของต้นยางเสียหาย มีผลให้ผลผลิตลดลง ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในยางพาราพันธุ์ BPM 24 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน และ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดโรคจากการพ่นใบยางด้วย ซูโอสปอร์ (zoospore) ของเชื้อ *P. palmivora* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (พ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) โดยใช้เทคนิคซีดีเอ็นเอ- เอเอฟแอลพี (cDNA-AFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถแสดงความแตกต่างของยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน โดยดูจากแถบดีเอ็นเอท่อนสั้น ๆ ที่ปรากฏหลังจากแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจล

การทำซีดีเอ็นเอ- เอเอฟแอลพี เริ่มจากสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากใบยาง จากนั้นแยก mRNA เพื่อเตรียมเป็น cDNA แล้วจึงตัดย่อย cDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะได้ cDNA ท่อนสั้น ๆ จำนวนมาก เชื่อมต่อ cDNA เหล่านี้ด้วย adapter เพื่อให้เป็นส่วนที่จะจับกับ selective primer ที่แตกต่างกัน แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดไปแยกบน 6% denaturing polyacrylamide gel ด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 350 โวลท์ อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง ผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบยางที่ได้รับเชื้อ (zoospore) กับชุดควบคุม (ปลอดเชื้อ) พบว่าการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่ทั้งในพันธุ์ BPM 24 และ RRIM 600 มียีนที่มีการแสดงออกมากขึ้น (up regulation) หลังจากได้รับเชื้อ ซึ่งในเบื้องต้นคาด ว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* หรือเรียกว่าเป็น candidate gene จึงได้คัดเลือกยีนในกลุ่มดังกล่าวจากพันธุ์ BPM 24 มาหาลำดับเบส ของยีน แล้วนำไปสืบค้น (Blast search) กับยีนที่มีรายงานอยู่ใน GenBank and Protein Database (NCBI) พบว่าส่วนใหญ่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ defense mechanism ในเซลล์พืช ได้แก่ยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ peroxidase และ phenylalanene amonia lyase และยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนในกลุ่ม pathogenesis related-protein คือ

ß-1,3 –glucanase และ chitinase และในการทดลองนี้ได้พบยีนที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล นั่นคือ อาจเป็นยีนที่ค้นพบใหม่

นอกจากนี้จากการใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) พบว่าระยะเวลาของการได้รับเชื้อในพันธุ์ BPM 24 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน มีความสัมพันธ์กับกับการแสดงออกของ peroxidase mRNA โดยมีการ แสดงออกของ peroxidase mRNA สูงสุดภายหลังจากได้รับเชื้อ 18 ชั่วโมง ดังนั้น peroxidase mRNA จึงอาจเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง scopolitin (phytoalexin) ซึ่งเป็นสารที่ใบยางสร้างขึ้นเพื่อต่อต้านการรุกรานของเชื้อ (Churngchow and Rattarasarn, 2001) จึงควรจะได้ทดสอบการแสดงออกของยีนเหล่านี้กับปริมาณการสร้าง scopolitin เพื่อจะได้ทราบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับความต้านทานต่อเชื้อหรือไม่ต่อไป

คำนำ

Phytophthora palmivora เป็นสาเหตุของโรคใบร่วงในยางพารา อาการของโรคใบร่วง ใบยางจะร่วงทั้งที่มีสีเขียวสดและสีเหลือง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศโดยมีลักษณะที่ปรากฏเด่นชัด คือ มีรอยช้ำสีดำอยู่ที่บริเวณก้านใบ และที่จุดกึ่งกลางของรอยช้ำมีหยดน้ำยางเกาะติดอยู่ด้วยใบยางร่วงที่เกิดจ ากเชื้อรานี้เมื่อนำขึ้นมา สะบัดไปมาเพียงเบาๆ ใบย่อยจะหลุดทันที ซึ่งต่างกับใบยางที่ร่วงหล่นตามธรรมชาติ แผ่นใบบางครั้งจะเป็นแผลที่มีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ ขนาดของแผลไม่แน่นอน สำหรับต้นยางอ่อนถ้าหากถูกเชื้อเข้าทำลาย จะเกิดอาการยอดเน่าแล้วลุกลามไปทำลายก้านใบและแผ่น ใบ ทำให้ต้นยางตายได้ ซึ่งโรคนี้จะระบาดบริเวณพื้นที่ปลูกยางที่มีฝนตกชุก ความชื้นสูง จะระบาดมากในบริเวณภาคใต้ฝั่งตะวันตก คือ จ .ระนอง พังงา กระบี่ ตรัง ภูเก็ต และสตูล และภาคตะวันออก ได้แก่ จ .ระยอง จันทบุรี และตราด ส่วนภาคใต้ฝั่งตะวันออก คือ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และพัทลุง สำหรับโรคที่หน้ากรีดยางโดยมีเชื้อราชนิดเดียวกันนี้เป็นสาเหตุ เรียกว่าโรคเส้นดำ ต้นยางที่มีขนาดใหญ่ที่แสดงอาการใบร่วงนี้ไม่ได้รับอันตรายจนถึงกับทำให้ต้นยางตายได้ เพียงแต่ปริมาณน้ำยางหรือผลผลิตที่ได้ลดลงเท่านั้น จึงไม่แนะนำให้ชาวสวนยางทำการพ่นยารักษาโรค การปลูกยางด้วยพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรค เป็นวิธีการป้องกันกำจัดโรคได้ทางหนึ่งที่ใช้ได้ผลดี ในปัจจุบันมียางพันธุ์แนะนำที่ให้ผลผลิตสูงและมีความต้านทานโรคดังกล่าว ได้แก่พันธุ์ GT 1 สถาบันวิจัยยาง 251 และ BPM 24 เป็นต้น (http://www.yangpara.com/disease/Disease_004.htm)

เชื้อ *P. palmivora* กระตุ้นการสร้าง scopolitin ต้านการรุกรานของเชื้อ กระตุ้นการสร้างลิกนินเพื่อกักกันการลุกลามของเชื้อในยางพารา นอกจากนี้การค้นพบ elicitin ที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงของเชื้อรา *P. palmivora* ทำให้ต้นยางมีการตอบสนองต่อเชื้อโดยทำให้ใบยางพาราเกิดรอยไหม้แบบ distal necrosis คือ เกิดอาการเหี่ยวได้ ซึ่งพบว่าในใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) จะเกิดอาการเหี่ยวมากกว่าใบยางพันธุ์ต้านทาน (BPM24) ซึ่งแสดงว่า ใบยางพันธุ์อ่อนแอไม่สามารถต้านทานโรคได้ (compatibility)

ในขณะที่ใบยางพันธุ์ต้านทานมีการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive) ที่บ่งชี้ถึงการต้านทานโรค (incompatibility) (Churngchow and Rattarasarn, 2000) elicitin ยังกระตุ้นการสร้างสารฟีนอลิก และ *o*-dianisidine peroxidase และเหนี่ยวนำความต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ในต้นอ่อนยางพาราได้ (ดุษฎี, 2552) นอกจากนี้ใบยางที่บ่มด้วย zoospore ของเชื้อ *P. palmivora* กระตุ้นให้มีการทำงานของเอนไซม์ polyphenoloxidase และ phenylalanine ammonia lyase: PAL) เพิ่มขึ้น (นิสาพร, 2551)

จากรายงานการวิจัยข้างต้น แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมเหล่านี้ ถูกควบคุมโดยยีน หรือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้อง แต่ทั้งนี้กลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนต้านทานโรคในยางพารายังมีการศึกษาน้อยมาก มีเพียงรายงานว่ามีการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดที่อาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดก้างปลา (นภาวรรณ, 2548) และยีนที่อาจเกี่ยวข้องกับโรค South American leaf blight (Lespinasse *et al*, 2000) เท่านั้น ดังนั้นจึงได้ศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนในยางพาราพันธุ์ต้านทาน และพันธุ์อ่อนแอ ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ปลอดเชื้อ) โดยใช้เทคนิคซีดีเอ็นเอ-เอเอฟแอลพี แล้วโคลนยีนที่ได้เพื่อนำไปพัฒนาหาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker)ของยีนต้านทานโรคดังกล่าว เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ยางโดยเทคนิคชีวโมเลกุลต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. โกร่งสำหรับบดตัวอย่าง
2. ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
3. ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
4. เครื่องปั่นตกตะกอนตัวอย่างความเร็วสูง (Microcentrifuge)
5. ไปเปต ขนาด 2, 10, 200, 1,000 ไมโครลิตร
6. หลอดทดลอง ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
7. เครื่องแยกสารพันธุกรรมในแนวนอน (Agarose gel electrophoresis)
8. เครื่องแยกสารพันธุกรรมในแนวตั้ง (Polyacrylamide gel electrophoresis)
9. ชุดถ่ายภาพเจล และ UV Transilluminators
10. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (PCR Thermocycler)
11. เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heat box)
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
13. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)
14. กล้องจุลทรรศน์

15. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave, Tomy Japan)
16. เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง
17. pH meter
18. คอลัมน์ PD-10 (Pharmacia)
19. แผ่นกระจกนับจำนวนสปอร์ (Petroff Hausser Counting Chamber)
20. Total RNA Extraction Kit (Qiagen)
21. Miniprep Gel Extraction Kit (Qiagen)
22. Oligotex mRNA kit (Qiagen)
23. Promega kit Universal Riboclone® cDNA Synthesis (Promega)
24. เอนไซม์ตัดจำเพาะ*ApoI* (Promega) และ *MseI* (Biolab)
25. *ApoI* และ *MseI* Adapter
26. ต้นยางปลอดเชื้อ พันธุ์ RRIM 600 และ BPM 24

วิธีการทดลอง

ศึกษาการแสดงออกของยีนในใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 และ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อ *Phytophthora palmivora* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ปลอดเชื้อ) โดยดำเนินการในระหว่างเดือน ตุลาคม 2549-กันยายน 2553 ที่ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี อ. ท่าชนะ จ. สุราษฎร์ธานี รายละเอียดดังนี้

1. การเตรียมเชื้อ *Phytophthora palmivora*

แยกเชื้อบริสุทธิ์จากก้านใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงจากศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี เลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) 1 สัปดาห์ กระตุ้นการสร้างสปอร์โดยย้ายเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร V_8 เป็นเวลา 5 วัน แยก zoospore โดยเทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตรลงบนสายรา นำไปบ่มในตู้เย็นเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที Sporangium ของเชื้อราจะแตกออก ปล่อยให้ zoospore หลุดออกมาได้ นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 5×10^6 zoospore/ มิลลิลิตร โดยใช้ Petroff Hausser Counting Chamber นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไปใ ช้ปลูกเชื้อบนใบยางต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างพืช

เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (Embryo) ของเมล็ดยางพารา พันธุ์ RRIM 600 และ BPM 24 บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารชักนำให้เกิดยอดและรากในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 3 เดือน จะได้ต้นยางปลอดเชื้อ จากนั้นนำ zoospore ของเชื้อที่เตรียมไว้มาพ่นลงบนใบยาง โดยทำแยกกัน ดังนี้

ชุดที่ 1

- RRIM 600 พ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control)
- RRIM 600 พ่นด้วย zoospore

ชุดที่ 2

- BPM 24 พ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control)
- BPM 24 พ่นด้วย zoospore

เก็บใบยางแต่ละชุดแยกกันหลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 6, 12, และ 18 ชั่วโมง

3. การสกัด Total RNA

ชั่งน้ำหนักใบยางแต่ละตัวอย่างทดลอง 100 มิลลิกรัม เติมด้วยไนโตรเจนเหลว 20 มิลลิลิตรในโกร่งแล้วบดให้ละเอียด สกัด total RNA โดยใช้ Total RNA Extraction Kit (Qiagen) เก็บไว้ที่ –20 ^{o}C ตรวจสอบคุณภาพของ total RNA โดยการทำ agarose gel electrophoresis ดูจากการย้อมติดสีเอทธิเดียมโบรไมด์ของ rRNA ขนาด 28 S และ 18 S และตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA จากการตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (OD_{260}) และ 280 nm (OD_{280}) Total RNA ที่มีคุณภาพดีมีค่า อัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 และสามารถคำนวณความเข้มข้นของ RNA ได้จากสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของRNA} = (OD_{260})(\text{dilution factor})(40\ \text{ng}/\mu\text{l})$$

4. การสังเคราะห์ cDNA

เริ่มจากการสังเคราะห์ mRNA จาก total RNA ก่อน โดยใช้ Oligotex mRNA kit (Qiagen) จากนั้นจึงสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Promega kit Universal Riboclone® cDNA Synthesis System ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การสังเคราะห์ single strand cDNA (ss cDNA) และ การสังเคราะห์ double strand cDNA (ds cDNA) ตามลำดับ

5. การทำ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เป็นการแยก cDNA ของตัวอย่างทดลองทั้งหมดด้วย agarose gel electrophoresis โดยเตรียมตัวอย่าง ดังนี้ ตัด DNA (DNA digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apo*I และ *Mse*I จากนั้นเชื่อมต่อ DNA (DNA ligation) กับ adaptor คือ *Apo*I Adapter และ *Mse*I Adapter เพื่อให้ชิ้นส่วนของ DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นไม่จับกันเป็นสายยาว แล้วทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR ซึ่งจะทำ 2 ขั้นตอน คือ pre selective amplified และ selective amplified โดยใช้ primer ที่มีเบสคัดเลือกเพิ่มมากขึ้นทางด้าน 3′ จากนั้นแยก DNA ด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 350 โวลท์ ที่อุณหภูมิ 10-14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วย้อมแถบ DNA ด้วยวิธี Silver staining เพื่อให้มองเห็นความแตกต่างของแถบ DNA ที่ปรากฏบนแผ่นเจล

6. การทำ TA cloning

แยกชิ้นส่วน DNA ของยีนที่มีการแสดงออกมากขึ้น (up regulate) ในพันธุ์ BPM 24 ออกจาก Polyacrylamide gel โดยใช้ Gel Extraction Kit แล้วนำไปเพิ่มปริมาณอีกครั้งด้วยเทคนิค PCR นำ DNA ที่แยกได้ ไปเชื่อมต่อเข้า กับ Cloning Vector จะได้ DNA ลูกผสม นำไป ใส่ลงใน Competent

Cells ผสมให้เข้ากัน วางในน้ำแข็งเวลา 20 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที นำไปวางในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม Luria-Bertani Medium 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60-90 นาที นำเชื้อใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร LB ผสมกับ ยาปฏิชีวนะ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เชื้อปริมาตร 50, 100 และ 150 ไมโครลิตรต่อจาน ทำการกระจายเชื้อไปทั่วจานจนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง ตรวจหาเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับ DNA ลูกผสมโดยสังเกตจากลักษณะการต้านยาปฏิชีวนะของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่ได้รับ DNA ลูกผสมจะสามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ เพราะ Cloning Vector มียีนต้านยาปฏิชีวนะอยู่ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับ DNA ลูกผสมไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ

7. การเตรียม DNA ลูกผสมจากแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ได้รับ DNA ลูกผสมโดยการคัดเลือกโคโลนีที่ต้านยาปฏิชีวนะ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เตรียม DNA ลูกผสมที่อยู่ในรูปของพลาสมิดจากแบคทีเรียโดยใช้ชุดน้ำยาแยก Plasmid ของบริษัท Qiagen ตรวจสอบพลาสมิด DNA ลูกผสม โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1% นำพลาสมิดที่ได้ มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพลาสมิดจากอัตราส่วนค่าดูดกลืนแสงระหว่างความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พลาสมิดที่บริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 2.0 คำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิดจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (1 OD = 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำพลาสมิดไปเป็นแม่พิมพ์สำหรับสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนโดยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับเบส

8. การทำ semiquantitative RT-PCR (sq RT-PCR)

นำใบยางพันธุ์ BPM 24 หลังจากได้รับเชื้อ เป็นเวลา0, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง มาสกัด Total RNA แล้วทำการเพิ่มปริมาณยีน *rbp* ด้วยเทคนิคPCR โดยใช้forward primer 5′-TGCTTTGTYAATGGTTGTGA-3′ และ reverse primer 5′-CCAAATGTRTGTGCACCTGA-3′ เปรียบเทียบกับยีนควบคุม คือ18S rRNA *rRNA* (forward primer 5′-CAAAGCAAGCCTACGCTCTG-3′, reverse primer 5′-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3′) โดยกำหนดโปรแกรม PCR ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ในช่วงดีเนเจอร์เรชั่นเริ่มต้น (Initial denaturation) ต่อด้วย 95 องศาเซลเซียส 1 นาที/72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบในช่วงแอลนีลลิ่ง (annealing) และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ในช่วงขยายสุดท้าย (final extension) นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำelectrophoresis บนเจล 1.5% จากนั้นวัดความเข้มของแถบ DNA (band intensity) โดยใช้ Gel documentation รุ่น BioDoc-It™ System โปรแกรม Labworks 4.0 คำนวณค่าอัตราส่วนความเข้มของแถบยีน *rbp* เปรียบเทียบกับ18S rRNA จะได้ค่า Relative intensity

ระยะเวลาทำการทดลอง

ตุลาคม 2549-กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ

ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน และ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ หลังจากได้รับเชื้อ *P. palmivora* ด้วยเทคนิคซีดีเอ็นเอ-เอเอฟแอลพี พบว่าการแสดงออกของยีนส่วนใหญ่ทั้งในพันธุ์ BPM 24 และ RRIM 600 มียีนที่มีการแสดงออกมากขึ้น (up regulation) เมื่อเทียบกับ control และเมื่อนำยีนเหล่านั้นบางส่วนมาหาลำดับเบส แล้ วนำไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานอยู่ใน ธนาคารยีน (GenBank and Protein Database) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งมีกลุ่มยีนที่น่าสนใจ คือ T1-4 และ T7-1ที่มีลำดับเบสของยีนใกล้เคียงกับ Beta-1,3 glucanase gene และ Chitinase mRNA ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ß-1,3 –glucanase และ chitinase ซึ่งมีรายงานว่าเป็นกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า pathogenesis related-protein ส่วน T4-1 มีลำดับเบสของยีนใกล้เคียงกับ NBS-LRR type disease resistance protein (*Populus trichocarpa*), mRNA และ T8-1และ T9-1 มีลำดับเบสของยีนใกล้เคียงกับ rubber peroxidase 1 (*rbp1*) mRNA และ Phenyl alanine ammonia-lyase mRNA ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของดุษฎี (2552) ซึ่งรายงานว่า elicitin ที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* กระตุ้นการสร้างสารฟีนอลิก และ *o*-dianisidine peroxidase และเหนี่ยวนำความต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ในต้นอ่อนยางพารา รวมทั้งนิสาพร (2551) รายงานว่าใบยางที่บ่มด้วย zoospore ของเชื้อ *P. palmivora* กระตุ้นให้มีการทำงานของเอ นไซม์ polyphenoloxidase และ PAL เพิ่มขึ้น

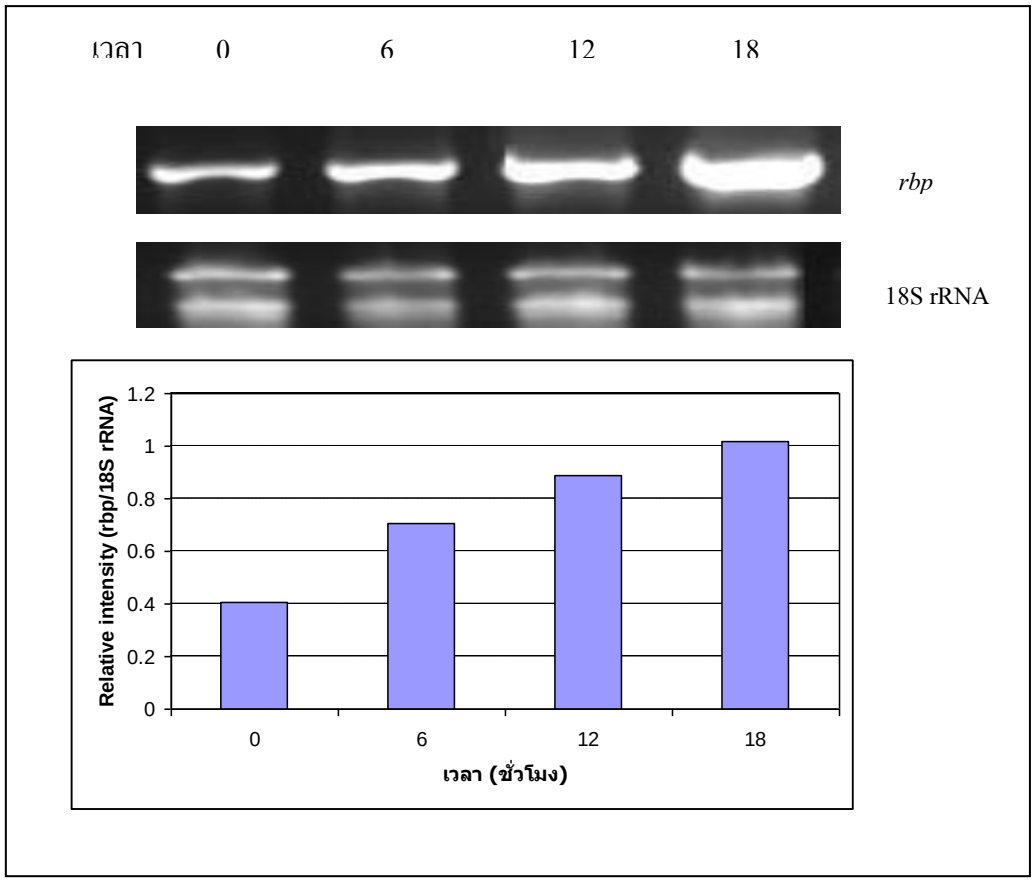
นอกจากนี้ยังพบยีนที่ไม่มีในฐานข้อมูลจำนวน 2 ยีน ดังนั้นยีนเหล่านี้จึงอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะของความต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ในยางพารา ซึ่งจะได้ทดสอบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในยางพันธุ์ต่าง ๆ ว่ามีความสัมพันธ์กับระดับความต้านทานหรือไม่ต่อไป

ตารางที่ 1 TDFs ที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกับยีนที่มีในฐานข้อมูล

TDF	GenBank accession no.	Length (bp)	Homology to gene (Genebank ID)	Organism	Expression
T1-4	A16120.1	195	Extracellular Beta-1,3 glucanase gene	*Nicotiana tabacum*	up-regulate in infected BPM 24
T4-1	FE969210.1	205	NBS-LRR type disease resistance protein (*Populus trichocarpa*), mRNA	*Hevea brasiliensis*	up-regulate in infected BPM 24
T7-1	DQ873889.2	146	Chitinase mRNA	*Hevea brasiliensis*	up-regulate in infected BPM 24
T8-1	DQ650301.1	141	*Hevea brasiliensis* rubber peroxidase 1 (rbp1) mRNA	*Hevea brasiliensis*	up-regulate in BPM 24
T11-1	EF148282.1	141	Unknown mRNA	*Populus trichocarpa*	up-regulate in infected BPM 24
T4-7	NM_112098.2	171	zinc finger (AN1-like) family protein (AT3G12630) mRNA	*Arabidopsis thaliana*	up-regulate in infected BPM 24
T9-1	NM_120505	201	Phenyl alanine ammonia-lyase mRNA	*Arabidopsis thaliana*	up-regulate in infected BPM 24

ผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *rbp* ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR ในใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 หลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 0, 6, 12, และ 18 ชั่วโมง พบว่าขนาดแถบ PCR product ของยีน *rbp* มีขนาดแตกต่างกัน โดยก่อนได้รับเชื้อ (เวลา 0 ชั่วโมง) มีขนาดของแถบเล็กสุดและขนาดจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับเชื้อเพิ่มขึ้น จนมีขนาดของแถบใหญ่ที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ซึ่งแตกต่างกับแถบ PCR product ของยีน *18S rRNA* ที่มีขนาดใกล้เคียงกันในทุกระยะเวลา ดังรูปที่ 1 หลังจากนั้นนำแถบของ PCR product ดังกล่าวไปวัดความเข้มของแถบด้วย Gel Documentation

รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0 แล้วหาอัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบของยีน *rbp* เทียบกับ *18S rRNA* (Relative intensity) สำหรับใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *rbp* ในใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 หลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลาต่างกัน พบว่าค่า Relative intensity ต่ำสุดที่เวลา 0 (ก่อนได้รับเชื้อ) และค่อย ๆ เพิ่ม ขึ้นตามระยะ เวลาที่ได้รับเชื้อเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุด ที่เวลา 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน *rbp* ในใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 นั้นมีอยู่แล้วก่อนได้รับเชื้อ และเมื่อได้รับเชื้อจะกระตุ้นให้มีการแสดงออกม ากขึ้นและแปรผันตามระยะ เวลาที่ได้รับเชื้อ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าการแสดงออกของยีน *rbp* สูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ เนื่องจากค่า Relative intensity ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มเวลาของการได้รับเชื้อให้นานขึ้นอีก



รูปที่ 1 การแสดงออกของยีน *rbp* และ *18S rRNA* ในใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 โดยวิธี semiquantitative RT-PCR และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาของการได้รับเชื้อกับค่าอัตราส่วนของความเข้มแถบของยีน *rbp* และ *18S rRNA* (Relative intensity)

ตารางที่ 2 อัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบ PCR product ของยีน *rbp* กับ *18S rRNA* (Relative intensity) ในใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 หลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 0, 6, 12, และ 18 ชั่วโมง

เวลาที่ได้รับเชื้อ (ชั่วโมง)	ความเข้มแถบ (band intensity)		Relative intensity
	rbp	***18S rRNA***	**(*rbp*/*18S rRNA*)**
0	69.97 ± 1.29	172.02 ± 1.33	0.406
6	121.47 ± 2.15	172.30 ± 1.64	0.705
12	154.02 ± 1.89	173.70 ± 1.00	0.886
18	169.80 ± 1.10	172.49 ± 1.70	1.015

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. จากแบบแผนการแสดงออกของยี นที่ได้โดยเทคนิคซีดีเอ็นเอ- เอเอฟแอลพี ของใบยางพันธุ์ BPM 24 ที่พ่นด้วย zoospore ของเชื้อ *P. Palmivora* เทียบกับใบที่ไม่ได้รับเชื้อ พบว่ามียีนที่มีการแสดงออกต่างกัน จำนวน 40 ยีน ในจำนวนนี้เป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และ ลดลง เท่ากับ 23 และ 9 ยีน ตามลำดับ และมียีนที่แสดงออกเฉพาะใบที่ได้รับเชื้อ 8 ยีนซึ่งคาดว่าเป็น candidate ยีนของลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *P. Palmivora* เนื่องจากมีการแสดงออกเฉพาะในใบที่ได้รับเชื้อ เพื่อตอบโต้การเข้าทำลายของเชื้อโรค (active resistance) และกลไกเหล่านี้ถูกควบคุมโดยการทำงานของยีน

2. ยีนที่ทราบลำดับพันธุกรรมแล้ว 9 ยีน พบว่าเป็นยีนที่มีรายงานใน ธนาคารยีนจำนวน 7 ยีน ซึ่งมีรายงานว่ายีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง (defense mechanism) ของพืช นอกจากนี้พบยีน ที่ไม่มีรายงานในฐานข้อมูล ของธนาคารยีนจำนวน 2 ยีน จึงอาจเป็นยีนที่ค้นพบใ หม่จากการทดลองนี้ ซึ่งจะต้องยืนยันผลอีกครั้งหนึ่งโดยการโคลนยีนทั้งหมดให้ได้ cDNA ที่สมบูรณ์

3. ในจำนวน 9 ยีนที่ทราบลำดับพันธุกรรมแล้ว ได้นำยีน *rbp* มาออกแบบไพรเมอร์ และศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยเทคนิค sqRT-PCR พบว่ามีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ใบยางได้รับเชื้อ โดยยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาที่ได้รับเชื้อเพิ่มขึ้น เป็นการยืนยันว่ายีน *rbp* เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *P. Palmivora* ในยางพันธุ์ BPM 24 ซึ่งจะได้นำยีนดังกล่าวไปทำการทดสอบเพิ่มเติมว่าสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลของลักษณะต้านทานต่อโรค ดังกล่าวในยางได้หรือไม่ โดยดูจากการแสดงออกและการกระจายตัวของยีนในลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างแม่และพ่อที่เป็นพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร . เปลื้อง สุวรรณมณี ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และขอขอบคุณศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องแยกสารพันธุกรรมในแนวนอน (Agarose gel electrophoresis) รวมทั้งศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี ที่ได้อนุเคราะห์ไนโตรเจนเหลวเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ดุษฎี ชินนาพันธ์. 2552. หน้าที่หลากหลายของเอฟเฟกเตอร์ชนิดโพลีเปปไทด์จากเชื้อ *Phytophthora palmivora* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในยางพารา . วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 139 น.

นภาวรรณ เลขะวิพัฒน์. 2548. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีในการศึกษาพันธุกรรม และการคัดเลือกพันธุ์ยาง. เอกสารประกอบการประชุม การติดตามความก้าวหน้าและการดำเนินงานวิจัยและพัฒนายาง เงินงบพิเศษการค้นคว้ายาง ปี 2548, 9-12 สิงหาคม 2548, โรงแรมทิพย์วิมานรีสอร์ท เพชรบุรี.

นิสาพร มูหะมัด. 2551. การสะสมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราหลังติดเชื้อรา . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 113 น.

Bachem, C.B., Oomen, R.J.F.J and Visser, R.G.F. 1998. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-StepProtocol. *Plant Molec. Biol. Reporter* 16**:** 157–173.

Churngchow, N. and Rattarasarn, M. 2000. The elicitin secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochem*. 54: 33-38.

Churngchow, N. and Rattarasarn, M. 2001. Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. *J. Plant Physiol*. 158 (7) : 875-882.

Duvick, D. N. 1999. Consequences of classical plant breeding for pest resistance. Workshop on ecological effects of pest resistance genes in managed ecosistems, Bethesda, MD, January 31- February 3, 1999.

http://www.yangpara.com/disease/Disease_004.htm [15 ม.ค. 54]

Lespinasse, D., Grivet, L., Troispoux, V., Rodier-Goud, M., Pinard, F. and Seguin, M. 2000. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Appl. Genet*. 100 : 975-984.

Meyer, B. C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S. and Sobral, B.W. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide- binding superfamily. *The plant J*. 20(3) : 317-332.

Morrissey, J. P. and Osbourn, A. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanisms of pathogenesis. *Microbiol. and Molec. Biol. Reviews*. 63(3) : 708-724.

McDowell, J. M. and Woffenden, B. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnol*. 21(4) : 178-183**.**

ภาคผนวก ก

ชื่อนิวคลีโอไทด์	จำนวนเบส	ลำดับเบส (5′->3′)
*Apo*I adapter forward	17	CTCGTAGACTGCGTCC
*Apo*I adapter reverse	18	AATTGGTACGCAGTCTAC
*Mse*I adapter forward	16	GACGATGAGTCCTGAG
*Mse*I adapter reverse	14	TACTCAGGACTCAT
*Apo*I pream	21	CTCGTAGACTGCGTACCAATT
*Apo*I CGC	18	GACTGCGTACCAATTCGC
*Apo*I TGA	18	GACTGCGTACCAATTTGA
*Apo*I CAG	18	GACTGCGTACCAATTCAG
*Apo*I TCT	18	GACTGCGTACCAATTTCT
*Apo*I CTA	18	GACTGCGTACCAATTCTA
*Mse*I pream	19	GACGATGAGTCCTGAGTAA
*Mse*I ATC	18	GATGAGTCCTGAGTAATC
*Mse*I ATG	18	GATGAGTCCTGAGTAATG
*Mse*I AGG	18	GATGAGTCCTGAGTAAGG
*Mse*I ACG	18	GATGAGTCCTGAGTA
*Mse*I ACC		GATGAGTCCTGAGTA