



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของไคโตซานต่อแอคติโนไซโทสเกลตอนและหน้าที่ของ
เยื่อหุ้มในรากของข้าว *Oryza sativa* ภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูง

โดย นางสาวอัญชลี ใจดี

กันยายน 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: บทบาทของไคโตซานต่อแอคติโนไมซีโทสเกลตอนและหน้าที่ของเยื่อหุ้ม
ในรากของข้าว *Oryza sativa* ภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูง

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5280200
Project Title : Roles of chitosan on actin cytoskeleton and membrane function in roots from *Oryza sativa* under heat shock
Investigator : Miss Anchalee Chaidee Chulalongkorn University
E-mail Address : acchaidee@gmail.com
Project Period : 16 March 2009 - 15 September 2011

Effects of chitosan on heat shock-induced changes in extracellular pH, alkaline phosphatase, and actin cytoskeleton were investigated in root cells of rice (*Oryza sativa* L.) cv. KDML105 and HKL1 to test whether chitosan can induce thermotolerance in root tissues. Therefore cut root tips (40 mg FW, 5 mm length) were exposed to different levels of heat shock, chitosan, and chitosan pretreatment prior to heat shock. Both cultivars responded to heat shock and chitosan differently. At 35°C actin cytoskeleton reorganized to short fragments and dots in root border cells (RBCs) of HKL1, it did not change in KDML105. At this temperature, extracellular acidification occurred in HKL1 while no change of extracellular pH was found in KDML105. In addition, actin ring formation was found only in KDML105 at 38°C, whereas actin filament mostly fragmented in HKL1. It seems that change in actin organization was most rapid and pronounced comparing to pH and alkaline phosphatase. Moreover, secretory activity measured with alkaline phosphatase was not associated to the cytoskeleton. Like heat shock, HKL1 was more sensitive to chitosan treatment (10 ppm O80 20 min) than KDML105. Though extracellular pH was increased by chitosan similarly, actin fragmentation was found in RBCs only in HKL1. In addition, chitosan-induced cell plasmolysis was more pronounced in elongating epidermal cells of HKL1 than KDML105. Interestingly, actin ring was also found at 35°C in epidermal cells and actin fragment in RBCs of KDML105 when chitosan was present. This finding indicates that chitosan does not strengthen the cytoskeleton and membrane integrity but enhance the severity of heat shock based on the shift of temperature causing actin fragmentation. These differential responses of both rice cultivars to stress are useful for future research with other approaches on roles of heat shock-induced actin ring.

Keywords : actin, chitosan, heat shock, *Oryza sativa*, root border cell

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5280200

ชื่อโครงการ บทบาทของไคโทซานต่อแอคตินไซโทสเกเลตอนและหน้าที่ของเยื่อหุ้มในรากของข้าว *Oryza sativa* ภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูง

ชื่อนักวิจัย นางสาวอัญชลี ใจดี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: acchaidee@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ 16 มีนาคม 2552 ถึง 15 กันยายน 2554

การศึกษาผลของไคโทซานต่อการเปลี่ยนแปลง pH และ alkaline phosphatase ภายนอกเซลล์ และการจัดเรียงตัวของแอคตินไซโทสเกเลตอนในเนื้อเยื่อรากข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และหอมคลองหลวง 1 (HKL1) มีขึ้นเพื่อทดสอบว่าไคโทซานสามารถชักนำความทนต่ออุณหภูมิสูงในเนื้อเยื่อรากได้หรือไม่ ทดลองโดยแช่ปลายรากข้าวที่ตัดให้ยาว 5 มิลลิเมตร จำนวน 40 ชิ้น (น้ำหนักสด 40 มิลลิกรัม) ให้ได้รับอุณหภูมิสูงและไคโทซานที่ระดับต่าง ๆ ตลอดจนการให้ไคโทซานก่อนแล้วตามด้วยภาวะอุณหภูมิสูง ผลการทดลองพบว่าข้าวทั้งสองพันธุ์ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงและไคโทซานแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 35°C แอคตินไซโทสเกเลตอนในเซลล์บอร์เตอร์ของราก (RBCs) ข้าวพันธุ์ HKL1 จัดเรียงตัวใหม่เป็นสายสั้นและเป็นจุด ส่วนพันธุ์ KDML105 ไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ ยังพบภาวะเป็นกรดภายนอกเซลล์ในพันธุ์ HKL1 ในขณะที่ pH ภายนอกเซลล์ของพันธุ์ KDML105 ไม่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมินี้ ยิ่งไปกว่านั้น พบแอคตินรูปร่างแหวน (actin ring) เฉพาะในพันธุ์ KDML105 ที่อุณหภูมิ 38°C ในขณะที่เกิดแอคตินสายสั้นเป็นส่วนใหญ่ในพันธุ์ HKL1 ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า แอคตินไซโทสเกเลตอนมีการเปลี่ยนแปลงที่ไวต่ออุณหภูมิและเห็นได้ชัดเจนกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ pH และ alkaline phosphatase ยิ่งไปกว่านั้น กิจกรรมการหลั่งสารออกนอกเซลล์ที่วัดจากเอนไซม์ alkaline phosphatase ไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกับไซโทสเกเลตอน นอกจากนี้ พันธุ์ HKL1 ไวต่อไคโทซาน (10 ppm O80 20 นาที) มากกว่า KDML105 ในทำนองเดียวกันกับภาวะอุณหภูมิสูง แม้จะมีการเพิ่มขึ้นของ pH ภายนอกเซลล์เหมือนกัน แต่การเกิดสายสั้นของสายแอคตินเกิดขึ้นเฉพาะใน RBCs ของ HKL1 ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่ามีเซลล์ที่เกิด plasmolysis อย่างชัดเจนในบริเวณ elongation zone ของพันธุ์ HKL1 มากกว่า KDML105 นอกจากนี้ การที่อุณหภูมิ 35°C ทำให้เกิด actin ring ในเซลล์ชั้นผิวและแอคตินสายสั้นใน RBCs ของพันธุ์ KDML105 เมื่อมีไคโทซานมีความน่าสนใจมาก เพราะแสดงให้เห็นว่าไคโทซานไม่ได้ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับแอคตินไซโทสเกเลตอนและเยื่อหุ้มเซลล์ แต่กลับเพิ่มความรุนแรงของภาวะอุณหภูมิสูงให้มากขึ้น เมื่อดูจากการเปลี่ยนเป็นแอคตินสายสั้นที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำลง การตอบสนองของแอคตินที่แตกต่างกันระหว่างข้าวสองสายพันธุ์นี้สามารถเป็นเครื่องมือที่ใช้เพื่อศึกษาถึงหน้าที่ของ actin ring ที่เกิดจากภาวะอุณหภูมิสูงโดยใช้วิธีการทดลองอื่นๆ ได้ต่อไป

คำหลัก แอคติน ไคโทซาน ภาวะอุณหภูมิสูง *Oryza sativa* เซลล์บอร์เตอร์ของราก

บทนำ

ปัญหาการระบาดของโรคและแมลงและมีผลอย่างมากต่อการผลิตพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานการณ์ปัจจุบันที่ปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงที่ทำนายได้ยากไปในปัจจุบัน จึงเกิดแนวคิดที่จะลดความเสียหายของผลผลิตด้วยวิธีการต่าง ๆ เป็นต้นว่า การใช้สารโพลีเมอร์ชีวภาพ เช่น ไคโทซาน เป็นปุ๋ยชีวภาพ มีหลักฐานที่แสดงว่าการใส่ไคโทซานลงในดินมีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด (Ohta et al., 2004) ล่าสุดมีรายงานว่าไคโทซานเร่งระยะเวลาการออกดอกและเพิ่มจำนวนช่อดอกของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ได้ (Limpanavech et al. 2008) ผู้วิจัยยังพบว่าขนาดของคลอโรพลาสต์และจำนวนชั้นของเซลล์บันเดิลชีท (bundle sheath cells) ที่มีซิลิกาบอดี (silica body) เพิ่มขึ้นหลังการได้รับไคโทซานสม่ำเสมอและต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน แม้ว่าจะยังไม่ทราบถึงกลไกที่ไคโทซานมีผลต่อการเติบโตและการออกดอกของพืช แต่มีแนวคิดที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการชักนำกลไกการต้านทานโรคของพืช ไคโทซานเป็นสารอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของไคทิน (deacetylated chitin) มีคุณสมบัติการต่อต้านเห็ดราและเป็น potent elicitor ที่ชักนำกลไกการต้านทานโรคของพืช (Amborabé et al., 2008) ที่สภาวะกรดถึงกลาง ไคโทซานมีค่า pKa ประมาณ 6.5 ไคโทซานจะมีประจุเป็นบวกและสามารถกระทำต่อชีวโมเลกุลของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีประจุเป็นลบ เช่นฟอสโฟลิพิดได้ (Liu et al., 2004) ไคโทซานไม่ก่อให้เกิดภาวะเป็นด่างภายนอกเซลล์ (extracellular alkalinization) ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ไมโครโมลาร์ (Baureithel et al., 1994) ส่วนความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจะก่อให้เกิด extracellular alkalinization ในระดับ 50 % ของค่าสูงสุดในเซลล์แขวนลอยมะเขือเทศ (Stratmann et al., 2000). ในเซลล์แขวนลอย poplar ไคโทซานก่อให้เกิด extracellular alkalinization ประมาณ 0.5 pH ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Haruta and Constabel, 2003) จะเห็นได้ว่าการตอบสนองของค่า extracellular pH ต่อไคโทซานผันแปรตามชนิดของพืชที่ศึกษา นอกจากการเปลี่ยนแปลงของ pH แล้ว ไคโทซานยังมีผลให้ความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้นในเซลล์แขวนลอยถั่วเหลือง ซึ่งตามมาด้วยการฆ่าตัวตายของเซลล์ในเวลาต่อมา (Zuppin et al., 2003) ไคโทซานยังมีผลกระตุ้นการสร้างสารไฟโตอะเล็กซิน (phytoalexin) ที่มีผลยับยั้งการเติบโตของเห็ดราในผักถั่ว (Hadwiger and Beckman, 1980) และ proteinase inhibitors ในใบมะเขือเทศอีกด้วย (Doares et al., 1995) ยิ่งไปกว่านั้น ไคโทซานยังก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นำไปสู่การปิดปากใบมากขึ้น (Lee et al., 1999) ผลต่อปากใบเช่นนี้ช่วยลดโอกาสในการแพร่ของเชื้อโรคเข้าทางปากใบได้ (Lee et al., 1999)

ในปัจจุบัน ความเข้าใจถึงความเกี่ยวข้องระหว่างโคโทซานและแอกตินในเซลล์พืชยังมีไม่มากนัก แต่เป็นที่ทราบกันแล้วว่าโคโทซานกระตุ้นให้ปากใบปิดโดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดอแปโซซิก ซึ่งกลไกการปิดปากใบที่เกี่ยวข้องกับการดอแปโซซิกนั้นควบคุมโดยแอกตินไฮโดรเจลเลตอน (Eun and Lee, 1997) ไม่เฉพาะแค่การเปลี่ยนแปลงปากใบเท่านั้นที่ควบคุมโดยแอกตินไฮโดรเจลเลตอน แต่ยังรวมถึงการเติบโตที่ยืดยาวของละอองเกสรและเซลล์ขนราก (Fu et al., 2001; Ketelaar et al., 2002) และการตอบสนองต่อ nod factors ในเซลล์ขนรากอีกด้วย (de Ruijter et al., 1999) บทบาทต่อการจัดระเบียบโครงสร้างไซโทพลาซึม (cytoplasmic organization) ก็เกิดได้จากปฏิกิริยาพอลิเมไรเซชันของแอกตินมอนอเมอร์ (G-actin) ไปเป็นแอกตินสายยาว (filamentous actin, F-actin) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยตัวเองและมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (Staiger, 2000) ภายใต้ภาวะเครียดจากอุณหภูมิที่ผิดปกติ การจัดเรียงตัวของแอกตินไฮโดรเจลเลตอนนั้นจะเกิดขึ้นตามหลังการเปลี่ยนแปลงระดับ fluidity ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Sangwan et al., 2002; Sung et al., 2003) ในเซลล์ชั้นผิวของราก *Arabidopsis* ที่ได้รับอุณหภูมิสูงที่ 42°C แอกตินสายยาวเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมไรเซชันเป็นสายสั้นลงในเวลาเพียง 10 นาที โดยการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถผันกลับได้ในเวลา 1 ชั่วโมง (Müller et al., 2007) ในภาวะที่อุณหภูมิสูงกระตุ้นให้เกิด extracellular alkalinization นั้นมีการหลั่งโปรตีน รวมทั้ง alkaline phosphatase ออกสู่ภายนอกเซลล์ (Chaidee and Pfeiffer, 2006) กระบวนการหลั่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์นี้ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของแอกตินไฮโดรเจลเลตอน (Staiger, 2000) จะเห็นได้ว่า แอกตินไฮโดรเจลเลตอนนั้นเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเซลล์หลายด้าน ทั้งการจัดระเบียบโครงสร้างไซโทพลาซึม การเติบโตและพัฒนา การเคลื่อนไหวของเซลล์ การส่งสัญญาณ และการหลั่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์

สำหรับกระบวนการหลั่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์นั้น มีการศึกษาโดยใช้สิ่งทดลองหลายแบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาด้วยเซลล์แขวนลอยและปลายราก (Chaidee and Pfeiffer, 2006; Wen et al., 2007) การหลั่งสารเมือก (mucilage) จากบริเวณปลายรากนั้นสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ผลัดออกจากชั้นผิวด้วย เซลล์ที่มีชีวิตเหล่านี้เรียกว่าเซลล์บอร์เดอร์ของราก (root border cells, RBCs) เป็นเซลล์ที่เกิดมาจากเนื้อเยื่อเจริญหุ้มราก (root cap meristem) ซึ่งเมื่อมีพัฒนาการเต็มที่จะเป็นเซลล์มีรูปร่างยาวและจะผลัดออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบรากเมื่อมีตำแหน่งของเซลล์อยู่ที่บริเวณรอบนอกของหุ้มราก (periphery of root cap) (Hawes et al. 1986) เป็นเซลล์ที่มีโปรตีนที่จำเพาะซึ่งหลั่งออกมาจาก RBCs มากถึงกว่า 100 ชนิด (Wen et al., 2007) บทบาทของโปรตีนเหล่านี้มีหลายด้าน เช่น การดูดซับแร่ธาตุจากดิน การเติบโต และการป้องกันตัวเองจากโรคและความเครียดทางสิ่งแวดล้อม (Neumann and Roemheld, 2007) นอกจากการ

หลังโปรตีนหลากหลายชนิดออกสู่ภายนอกเซลล์แล้ว การเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของ extracellular pH (alkalinization) จัดว่าเป็นตัวบ่งชี้ระดับความเครียด (stress marker) ของเซลล์พืช (Chaidee and Pfeiffer, 2006) และเนื้อเยื่อรากได้ (Felle et al., 2005) ภาวะเป็นด่างภายนอกเซลล์ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วนี้ เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่ลำเลียงไอออนต่าง ๆ บนเยื่อหุ้มเซลล์ (Felle, 2001) นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า การตอบสนองดังกล่าวช่วยทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดที่จะลดโอกาสในการติดเชื้อโรคของเซลล์ได้ (Felle, 2001)

การปรับค่า pH ภายนอกเซลล์มีผลต่อกระบวนการหลังสารออกนอกเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น acid phosphatase (Pfeiffer, 1996; Chaidee et al., 2008a) ออกซินช่วยเพิ่มการเติบโตได้ด้วยการสร้างสภาวะเป็นกรด (acidification) ที่บริเวณผนังเซลล์ ทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ผนังเซลล์ละลายตัวหลายชนิดทำงานได้ดีขึ้น ส่งผลให้เซลล์ขยายตัวยืดยาวออกได้ สภาวะเป็นกรดที่ผนังเซลล์นี้เหมาะกับ acid phosphatase ด้วยเช่นกัน (Pfeiffer, 1996; 1998) นักวิทยาศาสตร์สันนิษฐานว่าการทำงานของออกซินนั้นเกี่ยวข้องกับแอกตินไซโทสเกเลตอน เพราะสารทั้งสองโมเลกุลต่างก็มีบทบาทสำคัญต่อการเติบโต ตัวอย่างเช่น ผลการทดลองที่พบว่า การจัดเรียงตัวใหม่ของแอกตินเป็นสายยาวและบางนั้นขึ้นกับความเข้มข้นของออกซิน และสัมพันธ์กับการเติบโตที่กระตุ้นด้วยออกซิน (Waller et al., 2002) เมื่อทำให้เกิดภาวะเป็นด่างที่ภายนอกเซลล์ด้วยการให้อุณหภูมิสูงและการให้ nigericin (สารยับยั้งการทำงานของ proton pump) พบว่าสิ่งที่เกิดขึ้นควบคู่กันไป คือการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (Chaidee et al., 2008a) ยิ่งไปกว่านั้น การให้สาร fusicoccin (สารกระตุ้นการทำงานของ proton pump) ซึ่งสร้างสภาวะเป็นกรดภายนอกเซลล์ กลับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Chaidee et al., 2008a) จากที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น จะเห็นได้ว่าเซลล์พืชสามารถปรับตัวต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ทำให้ pH ภายนอกเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ด้วยการปรับการทำงานหรือชนิดของเอนไซม์ที่หลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์และกระบวนการเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของแอกตินไซโทสเกเลตอน

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่มีความสำคัญยิ่งของประเทศไทย การผลิตข้าวได้รับผลกระทบอย่างมากจากความเครียดทางสิ่งแวดล้อม รวมทั้งภาวะอุณหภูมิสูง ภาวะขาดน้ำในดินมีผลให้ปากใบปิดมากขึ้นเพื่อลดการเสียน้ำทางปากใบ เมื่อเกิดภาวะดังกล่าวร่วมกับความเข้มแสงสูง การปิดปากใบจะมีผลให้อุณหภูมิของใบเพิ่มขึ้นสูงกว่าอุณหภูมิอากาศได้ถึง 4-5 °C และนำไปสู่ oxidative stress และความเสียหายของเซลล์ตามมา (Dat et al., 1998; Taiz and Zeiger, 2006) โดยทั่วไป ภาวะอุณหภูมิสูงเกิดขึ้นเมื่อพืชเผชิญกับ

อุณหภูมิที่สูงกว่าภาวะปกติประมาณ 5-10 °C (Taiz and Zeiger, 2006) อย่างไรก็ตาม ระดับอุณหภูมิที่มากพอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยามีความผันแปรแตกต่างกันไปโดยขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของพืช ตัวอย่างเช่น พืชวงศ์ถั่ว *Prosopis chilensis* มีค่าอุณหภูมิที่สามารถก่อให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ 50% สูงกว่า *Glycine max* L. (Ortiz and Cardemil, 2001) การศึกษาในข้าวพบว่า ข้าว indica นั้นทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า japonica เมื่อดูจากความสมบูรณ์ของดอกย่อย (Jagadish et al., 2007) ยิ่งไปกว่านั้น อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงถูกยับยั้งด้วยภาวะอุณหภูมิสูงใน *Solanum* สายพันธุ์อ่อนแอ มากกว่าสายพันธุ์ทนต่อความร้อน (Reynolds et al., 1990) เซลล์พืชมีกลไกการปรับตัวทั้งระยะสั้นและระยะยาวต่อความเครียดจากอุณหภูมิสูง (Sung et al., 2003). นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (temperature sensor) ที่นำไปสู่กระบวนการถ่ายทอดสัญญาณ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวให้อยู่รอดในภาวะอุณหภูมิสูงได้ต่อไป (Sung et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าภาวะอุณหภูมิสูงมีผลเพิ่มอัตราการหายใจระดับเซลล์ทั้งในส่วนต้นเหนือดินและรากที่อยู่ใต้ดิน การรักษาสมดุลของการสร้างและเผาผลาญสารประกอบคาร์บอนให้ได้พลังงานต้องสมดุลกัน จึงจะทำให้พืชอยู่รอดได้ในภาวะที่ไม่เหมาะสม ความรุนแรงของภาวะอุณหภูมิสูงสามารถบรรเทาได้ทางหนึ่งด้วยการเพิ่มความสามารถในการดูดน้ำทางราก แม้ว่ารากจะมีความสำคัญเช่นนี้ แต่ข้อมูลเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิสูงต่อรากนั้นมีอยู่ค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนต้นเหนือดิน นอกจากนี้ กลไกความทนต่อภาวะอุณหภูมิสูงก็มีการศึกษากันอย่างมากในส่วนต้นเหนือดินของพืช ในขณะที่ความเข้าใจกลไกดังกล่าวในส่วนรากมีค่อนข้างน้อย (Sung et al., 2003; Rachmilevitch et al., 2008)

จากที่กล่าวมาข้างต้น การควบคุมการตอบสนองของพืชต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมทั้งทางชีวภาพและกายภาพนั้นมีความคาบเกี่ยวกันไม่มากนักน้อย ดังนั้นการศึกษาเชิงเปรียบเทียบถึงการตอบสนองของข้าวสองสายพันธุ์ที่มีความไวต่อภาวะอุณหภูมิสูงต่างกัน และการใช้ตัวชี้วัดภาวะเครียดสองชนิดร่วมกัน น่าจะเป็นวิธีการที่ใช้ เพื่อหาคำตอบทางชีววิทยาเกี่ยวกับการตอบสนองและการปรับตัวของพืชต่อภาวะเครียดทางสิ่งแวดล้อมได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการเปรียบเทียบผลของไคโทซานต่อแอคติโนไซโทสเกลตอนที่ยังไม่ทราบมาก่อนกับผลของภาวะอุณหภูมิสูงที่มีการศึกษามากพอสมควรแล้ว นอกจากนี้ ยังมีการตรวจสอบว่าไคโทซานสามารถชักนำความต้านทานต่อภาวะอุณหภูมิสูงได้เหมือนกับผลเชิงบวกที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือไม่ โดยดูจากผลที่มีต่อแอคติโนไซโทสเกลตอน pH และ phosphatase ภายนอกเซลล์

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างพืช

เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L. พันธุ์ KDML105 และพันธุ์ HKL1 ที่ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดและเพาะให้งอกเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 22-25°C ใช้รากที่มีลักษณะตรงและยาวประมาณ 2.0-3.5 เซนติเมตร

วิธีการให้ภาวะอุณหภูมิสูงและโคโทซาน

นำต้นกล้าข้าวมาตัดปลายรากยาว 5 mm ในเวลา 5 นาที และใส่ในหลอดพลาสติก (Eppendorf tube) ปริมาตร 2.2 ml ที่บรรจุน้ำกลั่น 1 ml จากนั้นแช่หลอดในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิได้ (5-l polypropylene water bath; Minitherm 2, Dinkelberg, Neu-Ulm, Germany) อุณหภูมิที่ใช้คือ 22-25 45 50 55 และ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที วัดค่า pH และอุณหภูมิของน้ำที่แช่ชิ้นรากทันทีด้วยเครื่องวัด pH (digital pH-meter 525 with temperature sensor; Wissenschaftlich Technische Werkstätten WTW, Weilheim, Germany) ที่เชื่อมต่อกับ microelectrode (Schott, Hofheim, Germany) อุณหภูมิที่วัดได้คือ 22-25 35 38 41 และ 45 °C ตามลำดับ (Chaidee and Pfeiffer, 2006) จากนั้น ดูดของเหลวในหลอด 990 µl ใส่ในหลอดใหม่และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 200g เป็นเวลา 5 min ที่ 25°C หลังจากการปั่นเหวี่ยง ดูดน้ำส่วนบน 945 µl (supernatant) อย่างระมัดระวังใส่ในหลอดใหม่ และแช่ที่ตู้ปรับอุณหภูมิ -20°C ไว้สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป การเก็บของเหลวที่แช่ชิ้นรากอีกวิธีที่ใช้คือการกรองด้วยฟิลเตอร์ขนาดรูพรุน 45-90 µm (Sigma, Austria)

สำหรับวิธีการให้โคโทซานนั้นทำโดยตัดปลายรากจำนวน 40 ราก ใส่ในหลอดพลาสติกเช่นเดียวกับการทดลองภาวะอุณหภูมิสูง แต่ใช้สารละลายโคโทซาน 10 ppm O80 (Limpanavech et al., 2008) ปริมาตร 1 ml และ 0.001% acetic acid แทนน้ำกลั่น ระหว่างทดลองวางหลอดที่มีชิ้นรากบนเครื่องเขย่าอัตโนมัติและเขย่าที่ความเร็วต่ำที่พอให้ของเหลวในหลอดขยับไปมาเบาๆ ในการทดลองให้โคโทซานก่อนภาวะอุณหภูมิสูง ทำโดยนำหลอดรากที่แช่สารละลายโคโทซานตามเวลาที่กำหนดมาวัดค่า extracellular pH จากนั้นนำไปใส่ในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิไว้เป็นเวลาตามที่กำหนด วัด extracellular pH และอุณหภูมิของของเหลวในหลอดทดลองทันที และเก็บตัวอย่างของเหลวตามวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองเรื่องภาวะอุณหภูมิสูง

วิธีการย้อมเซลล์และการตรวจดูแอคตินไซโทสเกเลตอน

สำหรับการย้อมแอคตินในเซลล์บอร์เดอร์ของราก (RBCs) ที่ผลัดออกสู่ของเหลวที่แช่ราก ทำโดยผสมสารละลาย fixative (Grolig, 1990) ที่เข้มข้นสองเท่า ปริมาตร 45 µl ลงในของเหลวที่เหลือจากขั้นตอนการปั่นเหวี่ยง (ปริมาตร 45 µl) ส่วนการย้อมสีชั้นเซลล์ผิวทำโดยสุมปลายรากจำนวน 4 รากมาเติมสารละลาย

fixative ที่เข้มข้นหนึ่งเท่า ปริมาตร 50 μ l สารละลาย fixative (Grolig, 1990) ที่เข้มข้นหนึ่งเท่า ประกอบด้วย 1.5% (w/v) formaldehyde 0.05% (v/v) glutaraldehyde 0.05% (w/v) Triton-X-100 10 mM EGTA 5 mM MgSO_4 และ 100 mM PIPES, pH 6.9 จากนั้น เติม 2.5 μ l 6.6 μ M Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA) และนำตัวอย่างมาส่องดูแอกตินไซโทสเกเลตอนด้วย confocal laser scanning microscope (Zeiss Axiovert IM 35 and Zeiss LSM 510; Zeiss, Oberkochen, Germany) โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงคือ Argon ion laser (excitation wavelength 488 nm) ใช้ band-pass filter ที่ 505–550 nm และใช้ high numerical aperture oil immersion objective (Plan-Apochromat 63x, NA 1.4) สแกน โดยใช้ความเข้มแสงเลเซอร์ระดับต่ำและในเวลาสั้นเพื่อลดโอกาสเกิด bleaching ของสารสีฟลูออเรสเซนต์

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในของเหลวที่แช่ราก

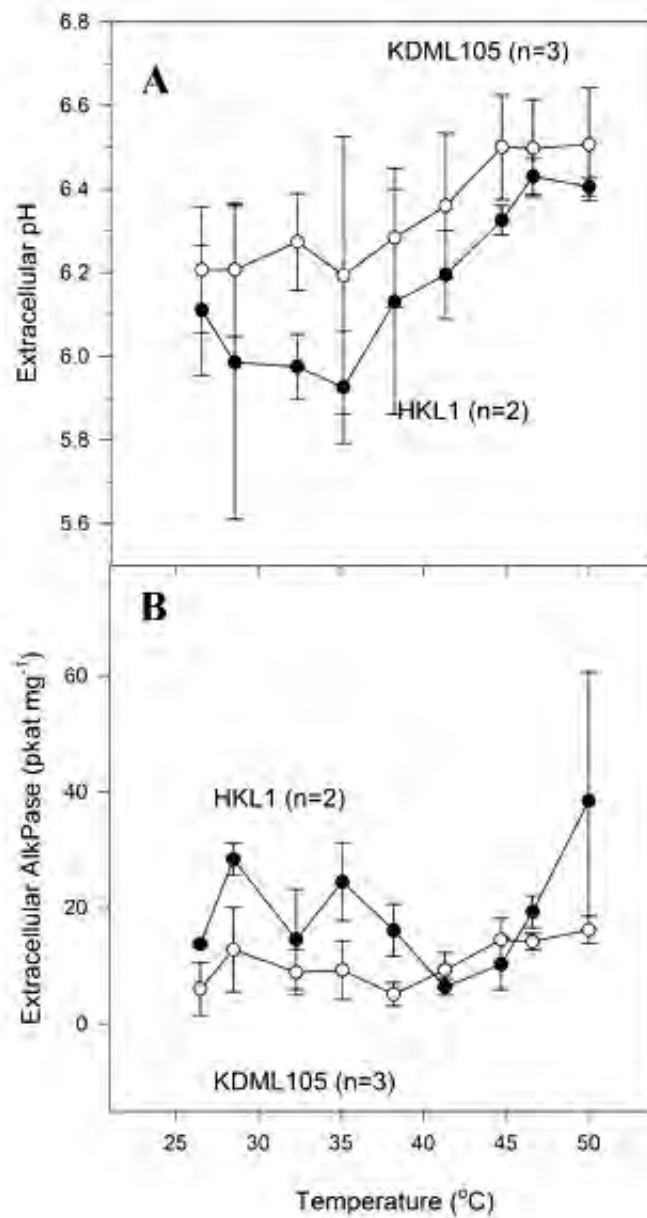
กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase ในของเหลวที่เก็บไว้หลังการให้อุณหภูมิสูงและโคโทซานนั้น วัดจากปฏิกิริยาการสลายสารตั้งต้น คือ *p*-nitrophenyl ให้เป็น nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยลบค่าพื้นหลังที่ 800 nm วิธีทำปฏิกิริยามาตรฐาน (0.7 ml) ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-MES, pH 8.0) ที่เติม 2.5 mM MgCl_2 และ 2.5 mM *p*-nitrophenyl phosphate (Pfeiffer, 1998) หลังจากทำปฏิกิริยาด้วยการเติมตัวอย่างพืช (supernatant) ปริมาตร 0.5 ml เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะต้องหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.1 ml 0.7 N NaOH และวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังจากหยุดปฏิกิริยาได้ 15 นาที สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ nitrophenol ที่ทราบค่าความเข้มข้น

ผลการทดลอง

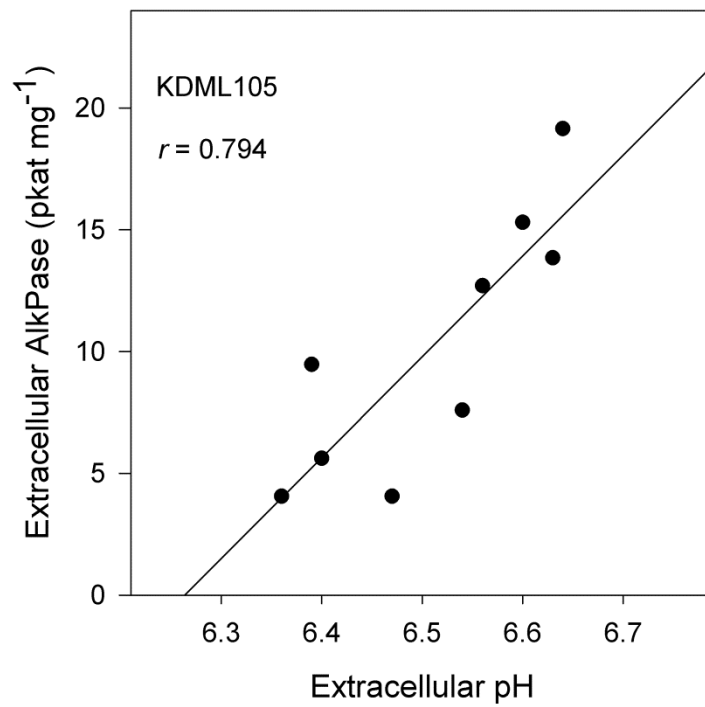
ผลของภาวะอุณหภูมิสูงต่อ extracellular pH และกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase

จากการศึกษาเปรียบเทียบความไวต่ออุณหภูมิสูงของเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากของข้าว สองสายพันธุ์ คือ หอมคลองหลวง (HKL1) และ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) โดยใช้ค่าการเพิ่มขึ้นของ extracellular pH เป็นตัววัดระดับความไวต่ออุณหภูมิ พบว่า extracellular pH ของข้าวพันธุ์ KDML105 ไม่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ 35°C ในขณะที่ค่า extracellular pH ของรากข้าวพันธุ์ HKL1 มีแนวโน้มลดลงจาก 6.11 ± 0.16 เป็น 5.93 ± 0.13 (ลดลง 0.18 pH unit, extracellular acidification) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1 A) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 38°C ค่า extracellular pH ของรากข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยในพันธุ์ KDML105 มีค่าสูงสุด 6.50 ± 0.13 ที่อุณหภูมิ 45°C (เพิ่มขึ้น 0.19 pH unit เมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH ที่อุณหภูมิ 26.5°C) ส่วนพันธุ์ HKL1 มีค่าสูงสุด 6.43 ± 0.04 ที่อุณหภูมิ 47°C (เพิ่มขึ้น 0.32 pH unit เมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH ที่อุณหภูมิ 26.5°C) แม้ว่าจะไม่พบการตอบสนองของปลายรากต่ออุณหภูมิสูงในลักษณะ extracellular alkalization ในช่วงอุณหภูมิ 26.5-38°C ในข้าวทั้งสองพันธุ์ แต่จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 35°C ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีการตอบสนองของ extracellular pH แตกต่างกัน ดังนั้น อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างการตอบสนองทางสรีรวิทยาของรากข้าวสองสายพันธุ์นี้ในขั้นต่อไป คือ อุณหภูมิระดับปานกลาง (35-38°C) และระดับสูง (45°C)

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular alkaline phosphatase ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิ 26.5-38°C เช่นเดียวกับ pH ในข้าวพันธุ์ KDML105 แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีค่าคงที่ที่อุณหภูมิ 45-50°C (เพิ่มขึ้น 2.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่อุณหภูมิ 26.5°C) ส่วนข้าวพันธุ์ HKL1 แม้ว่าจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ผันแปรค่อนข้างมากในช่วงอุณหภูมิ 26.5-38°C แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่นเดียวกัน โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 50°C (เพิ่มขึ้น 2.8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่อุณหภูมิ 26.5°C) (รูปที่ 1 B) เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่าง extracellular pH และ alkaline phosphatase พบว่ามีสหสัมพันธ์เชิงบวก ($r = 0.794$, $p < 0.05$) เฉพาะในพันธุ์ KDML105 (รูปที่ 2)



รูปที่ 1. ผลของการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิต่อ extracellular pH และกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ส่วนปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML105 และพันธุ์ HKL1 ข้อมูลแสดงด้วยค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n =2-3)

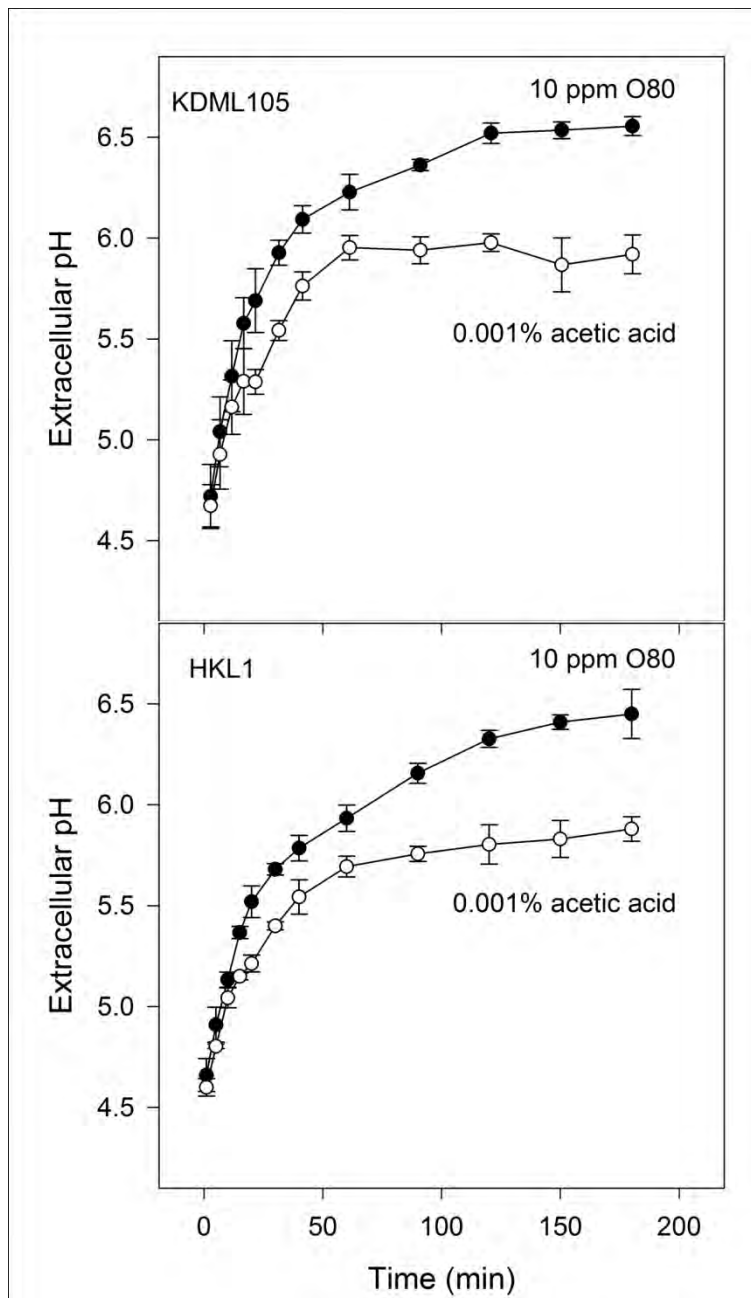


รูปที่ 2. ความสัมพันธ์ระหว่าง extracellular pH และกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ส่วนปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML105 ข้อมูลตัวแทนจาก 3 การทดลอง

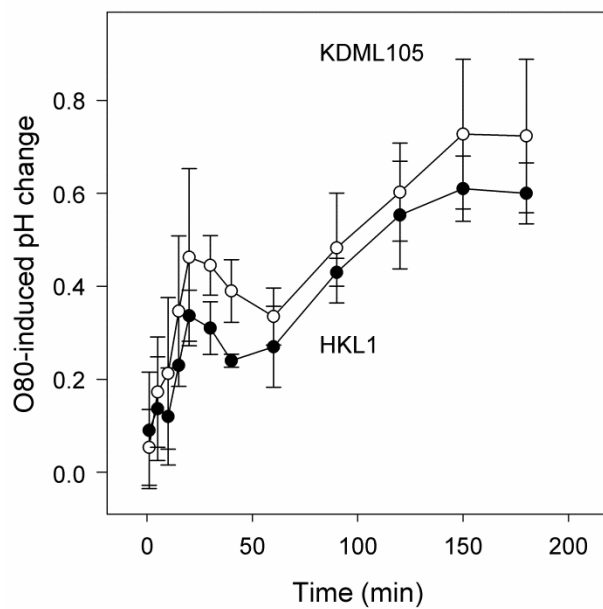
ผลของไคโทซานต่อ extracellular pH ของเนื้อเยื่อราก

การวัด extracellular pH ที่ส่วนปลายรากของข้าวสองสายพันธุ์ คือ KDML105 และ HKL1 ที่ได้รับไคโทซานชนิด O80 ความเข้มข้น 10 ppm โดยมีชุดทดลองที่ได้รับ 0.001% acetic acid เป็นชุดควบคุม ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 3 โดยพบว่าปลายรากของข้าวทั้งสองพันธุ์มี extracellular pH เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ได้รับไคโทซาน โดยมีค่า extracellular pH ต่างจากรากที่ไม่ได้รับไคโทซานอย่างชัดเจนที่เวลา 20 นาที กล่าวคือ รากข้าวพันธุ์ KDML105 ที่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 5.69 ± 0.16 ในขณะที่รากที่ไม่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 5.29 ± 0.06 ในทำนองเดียวกัน รากข้าวพันธุ์ HKL1 ที่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 5.52 ± 0.08 ในขณะที่รากที่ไม่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 5.21 ± 0.04 (รูปที่ 3) นอกจากนี้พบว่า extracellular pH มีค่าสูงสุดเมื่อได้รับไคโทซานเป็นเวลา 150 min โดยที่รากข้าวพันธุ์ KDML105 ที่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 6.54 ± 0.04 (รากที่ไม่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 5.87 ± 0.13) ในขณะที่รากข้าวพันธุ์ HKL1 ที่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 6.41 ± 0.04 (รากที่ไม่ได้รับไคโทซาน มี extracellular pH 5.83 ± 0.09) (รูปที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้าวทั้งสองพันธุ์ พบว่าไคโทซานกระตุ้นให้รากเกิดการเปลี่ยนแปลง extracellular pH ในรูปแบบเหมือนกัน ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาการตอบสนอง 180 นาที (รูปที่ 4) โดยที่เวลา 20 นาที ไคโทซานมีผลให้ค่า extracellular pH เพิ่มขึ้น 0.46 ± 0.19 pH unit ในพันธุ์ KDML105 ในขณะที่รากพันธุ์ HKL1 มีการเพิ่มขึ้นของ extracellular pH 0.34 ± 0.05 pH unit



รูปที่ 3. ผลของไคโทซาน (10 ppm O80) ต่อ extracellular pH ที่ส่วนปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML1055 และ HKL1 ข้อมูลแสดงด้วยค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n =4)

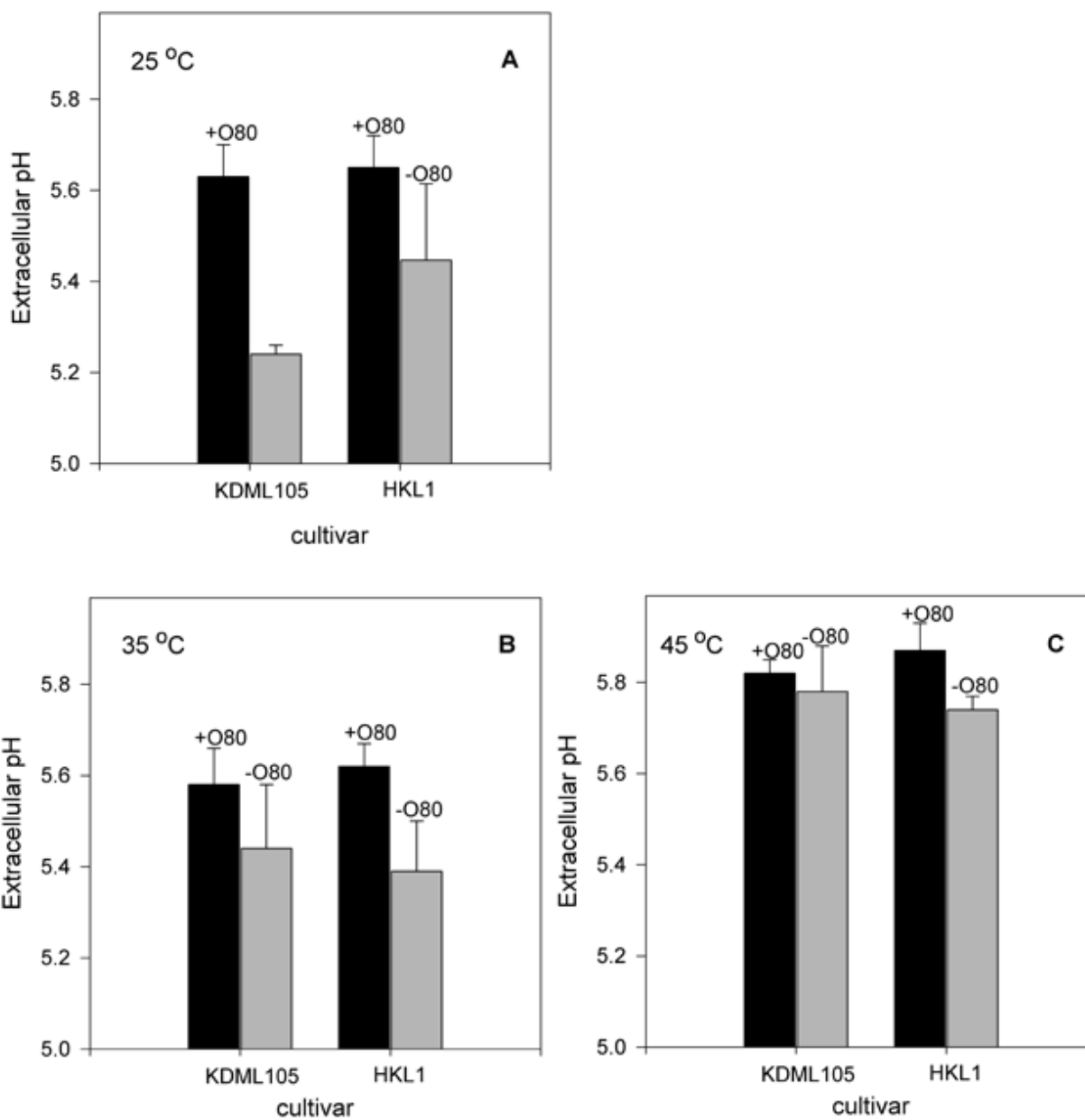


รูปที่ 4. ผลของไคโทซาน (10 ppm O80) ต่อ extracellular pH ที่เปลี่ยนแปลง (pH change) ที่ส่วนปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML105 และ HKL1 ข้อมูลแสดงด้วยค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n =4)

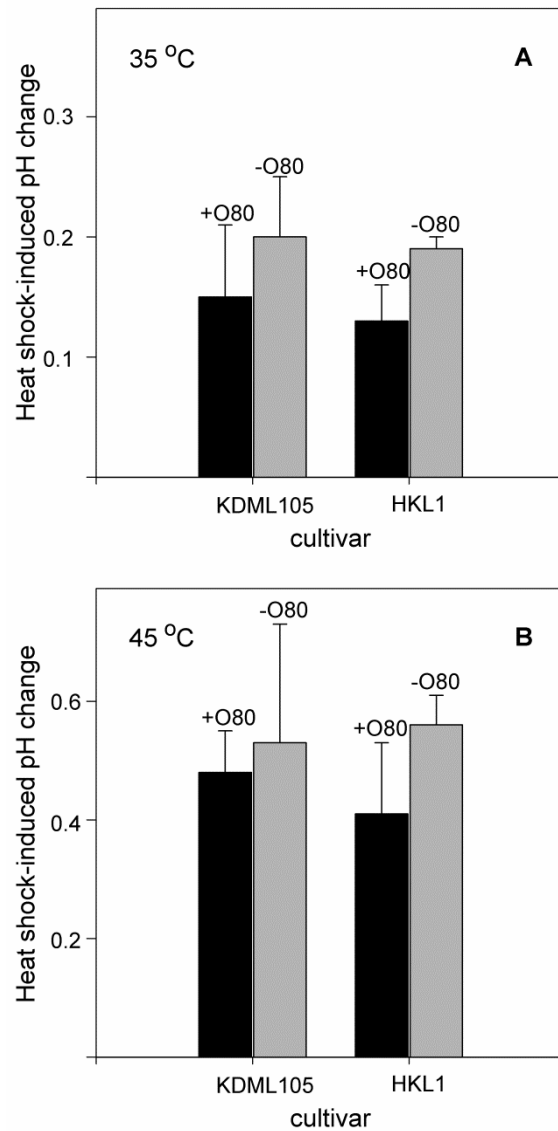
ผลของโคโทซานต่อการเปลี่ยนแปลง extracellular pH ของเนื้อเยื่อรากที่ได้รับอุณหภูมิสูง

การวัด extracellular pH ที่ส่วนปลายรากของข้าวสองสายพันธุ์ คือ KDML105 และ HKL1 ที่ได้รับโคโทซาน ชนิด O80 10 ppm เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงให้ภาวะอุณหภูมิสูง 3 ระดับ คือ 25 °C และ 45 °C ได้ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 5 ที่อุณหภูมิ 25 °C การได้รับโคโทซาน มีผลเพิ่ม extracellular pH จาก 5.24 ± 0.02 เป็น 5.63 ± 0.07 ในพันธุ์ KDML105 (เพิ่มขึ้น 0.39 pH unit) และ จาก 5.45 ± 0.17 เป็น 5.65 ± 0.07 ในพันธุ์ HKL1 (เพิ่มขึ้น 0.20 pH unit) (รูปที่ 5 A) ที่อุณหภูมิ 35 °C การได้รับโคโทซาน มีผลเพิ่ม extracellular pH จาก 5.44 ± 0.14 เป็น 5.58 ± 0.08 ในพันธุ์ KDML105 (เพิ่มขึ้น 0.14 pH unit) และ จาก 5.39 ± 0.01 เป็น 5.62 ± 0.05 ในพันธุ์ HKL1 (เพิ่มขึ้น 0.23 pH unit) (รูปที่ 5 B) ที่อุณหภูมิ 45 °C การได้รับโคโทซาน มีผลเพิ่ม extracellular pH จาก 5.78 ± 0.10 เป็น 5.82 ± 0.03 ในพันธุ์ KDML105 (เพิ่มขึ้น 0.04 pH unit) และ จาก 5.74 ± 0.03 เป็น 5.87 ± 0.06 ในพันธุ์ HKL1 (เพิ่มขึ้น 0.13 pH unit) (รูปที่ 5 C)

เมื่อพิจารณาผลของโคโทซานต่อการเปลี่ยนแปลง extracellular pH เนื่องจากอุณหภูมิสูง (heat shock-induced pH change) (รูปที่ 6) โดยพบว่า ที่อุณหภูมิ 35 °C การได้รับโคโทซานมีผลลด heat shock-induced pH change ประมาณ 25 % ในพันธุ์ KDML105 กล่าวคือ ลดลงจาก 0.20 ± 0.05 เป็น 0.15 ± 0.06 pH unit และ ลดลงประมาณ 32 % ในพันธุ์ HKL1 กล่าวคือ ลดลงจาก 0.19 ± 0.01 เป็น 0.13 ± 0.03 pH unit (รูปที่ 6 A) ส่วนที่อุณหภูมิ 45 °C การได้รับโคโทซานมีผลลด heat shock-induced pH change ประมาณ 9 % ในพันธุ์ KDML105 กล่าวคือ ลดลงจาก 0.53 ± 0.20 เป็น 0.48 ± 0.07 pH unit และ ลดลงประมาณ 27 % ในพันธุ์ HKL1 กล่าวคือ ลดลงจาก 0.56 ± 0.05 เป็น 0.41 ± 0.12 pH unit (รูปที่ 6 B)



รูปที่ 5. ผลของไคโทซาน (10 ppm O80 20 min) ต่อ extracellular pH ที่ส่วนปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML105 และ HKL1 ที่ได้รับภาวะอุณหภูมิสูงระดับต่าง ๆ (A: 25°C; B: 35°C; C: 45°C) เป็นเวลา 5 นาที ข้อมูลแสดงด้วยค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n =4-6)

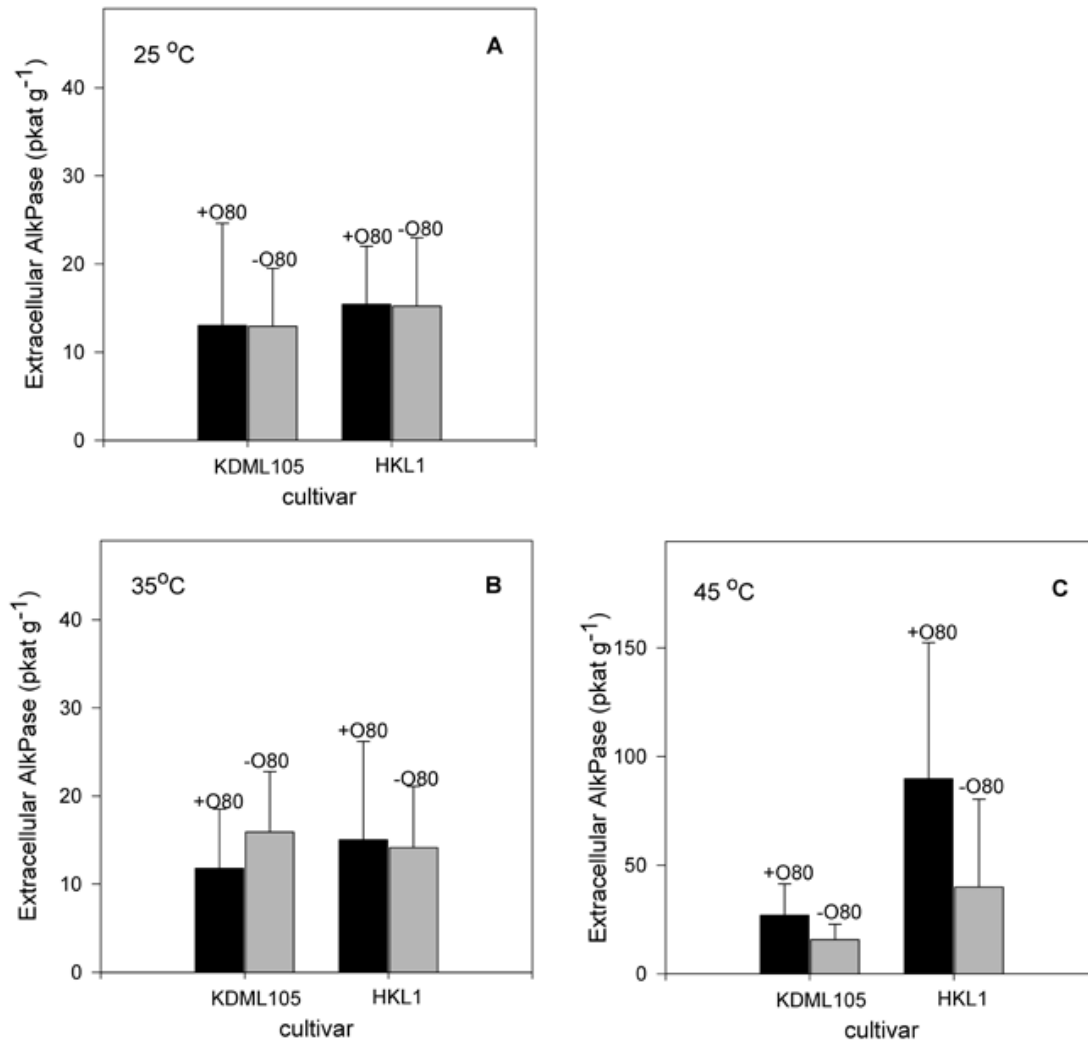


รูปที่ 6. ผลของไคโทซาน (10 ppm O80 20 min) ต่อการเปลี่ยนแปลง pH เนื่องจากอุณหภูมิสูง (heat shock-induced pH change) ที่ส่วนปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML105 และ HKL1 ที่ได้รับภาวะอุณหภูมิสูง ระดับต่าง ๆ (A: 35°C; B: 45°C) เป็นเวลา 5 นาที ข้อมูลค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n =4-6)

ผลของไคโทซานต่อการหลั่งเอนไซม์ **phosphatase** จากเนื้อเยื่อรากที่ได้รับอุณหภูมิสูง

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ **phosphatase** ที่หลั่งออกสู่ภายนอกจากส่วนปลายรากของข้าวสองสายพันธุ์ คือ KDML105 และ HKL1 ที่ได้รับไคโทซานชนิด O80 10 ppm เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงให้ภาวะอุณหภูมิสูง 3 ระดับ คือ 25 35 และ 45 °C ได้ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 7 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 25°C การได้รับไคโทซานไม่มีผลเพิ่ม **alkaline phosphatase** ในข้าวทั้งสองพันธุ์ กล่าวคือ ในพันธุ์ KDML105 รากที่ได้รับไคโทซานมีกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** 13.04 ± 11.58 pkat g^{-1} รากที่ไม่ได้รับไคโทซาน มีกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** 12.95 ± 6.56 pkat g^{-1} และในพันธุ์ HKL1 รากที่ได้รับไคโทซานมีกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** 15.43 ± 6.61 pkat g^{-1} ส่วนรากที่ไม่ได้รับไคโทซานมีกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** 15.24 ± 7.77 pkat g^{-1} (รูปที่ 7 A) ที่อุณหภูมิ 35°C ในพันธุ์ KDML105 รากที่ไม่ได้รับไคโทซานมีกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** 15.93 ± 6.85 pkat g^{-1} (รูปที่ 7 B) ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ของรากที่ไม่ได้รับไคโทซาน ที่อุณหภูมิ 25°C (12.95 ± 6.56 pkat g^{-1}) (รูปที่ 7 A) ประมาณ 23% ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การได้รับอุณหภูมิสูงระดับปานกลาง ที่ 35°C มีผลเพิ่มกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ระหว่างรากที่ได้รับไคโทซานกับรากที่ไม่ได้รับไคโทซาน ที่อุณหภูมิ 35°C จะเห็นว่าการได้รับไคโทซานสามารถลดผลของการได้รับอุณหภูมิ 35°C ได้ โดยกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ลดลงจาก 15.93 ± 6.85 pkat g^{-1} เป็น 11.80 ± 6.783 pkat g^{-1} (-26%) ส่วนในพันธุ์ HKL1 การได้รับอุณหภูมิ 35°C มีผลต่อกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ไม่แตกต่างจากการได้รับอุณหภูมิ 25°C (รูปที่ 7 A-B) นอกจากนี้ การได้รับไคโทซานไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของ **alkaline phosphatase** ต่ออุณหภูมิ 35°C กล่าวคือ รากที่ได้รับไคโทซานร่วมกับอุณหภูมิ 35°C มีกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** 15.03 ± 11.17 pkat g^{-1} ในขณะที่รากที่ไม่ได้รับไคโทซานแต่ได้รับอุณหภูมิ 35°C มีกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** 14.15 ± 6.98 pkat g^{-1} (รูปที่ 7 B) ที่อุณหภูมิ 45°C ในภาวะที่รากไม่ได้รับไคโทซาน กิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ในข้าวพันธุ์ KDML105 มีค่า 15.77 ± 7.08 pkat g^{-1} ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ที่อุณหภูมิ 25°C (12.95 ± 6.56 pkat g^{-1}) ประมาณ 22 % ในขณะที่ กิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ในข้าวพันธุ์ HKL1 มีค่าเฉลี่ย 39.98 ± 40.42 pkat g^{-1} ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ที่อุณหภูมิ 25°C (15.24 ± 7.77 pkat g^{-1}) ประมาณ 162 % นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของ **alkaline phosphatase** ระหว่างรากที่ได้รับไคโทซานกับรากที่ไม่ได้รับไคโทซาน ที่อุณหภูมิ

45°C จะเห็นว่าการได้รับไคโทซานมีผลเพิ่มกิจกรรม alkaline phosphatase ในข้าวทั้งสองพันธุ์ กล่าวคือ กิจกรรมของ alkaline phosphatase เพิ่มขึ้นจาก $15.77 \pm 7.08 \text{ pkat g}^{-1}$ เป็น $26.94 \pm 14.41 \text{ pkat g}^{-1}$ (+69 %) ในข้าวพันธุ์ KDML105 และ กิจกรรมของ alkaline phosphatase เพิ่มขึ้นจาก $39.98 \pm 40.42 \text{ pkat g}^{-1}$ เป็น $89.71 \pm 62.64 \text{ pkat g}^{-1}$ (+124 %) ในข้าวพันธุ์ HKL1 (รูปที่ 7 C)



รูปที่ 7. ผลของไคโทซาน (10 ppm O80 20 min) ต่อ extracellular alkaline phosphatase (AlkPase) ที่ส่วนปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML105 และ HKL1 ที่ได้รับภาวะอุณหภูมิสูงระดับต่าง ๆ (A: 25°C; B: 35°C; C: 45°C) เป็นเวลา 5 นาที ข้อมูลแสดงด้วยค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n =4-6)

ผลของภาวะอุณหภูมิสูงต่อแอกตินไซโทสเกเลตอนในเนื้อเยื่อรากของข้าว

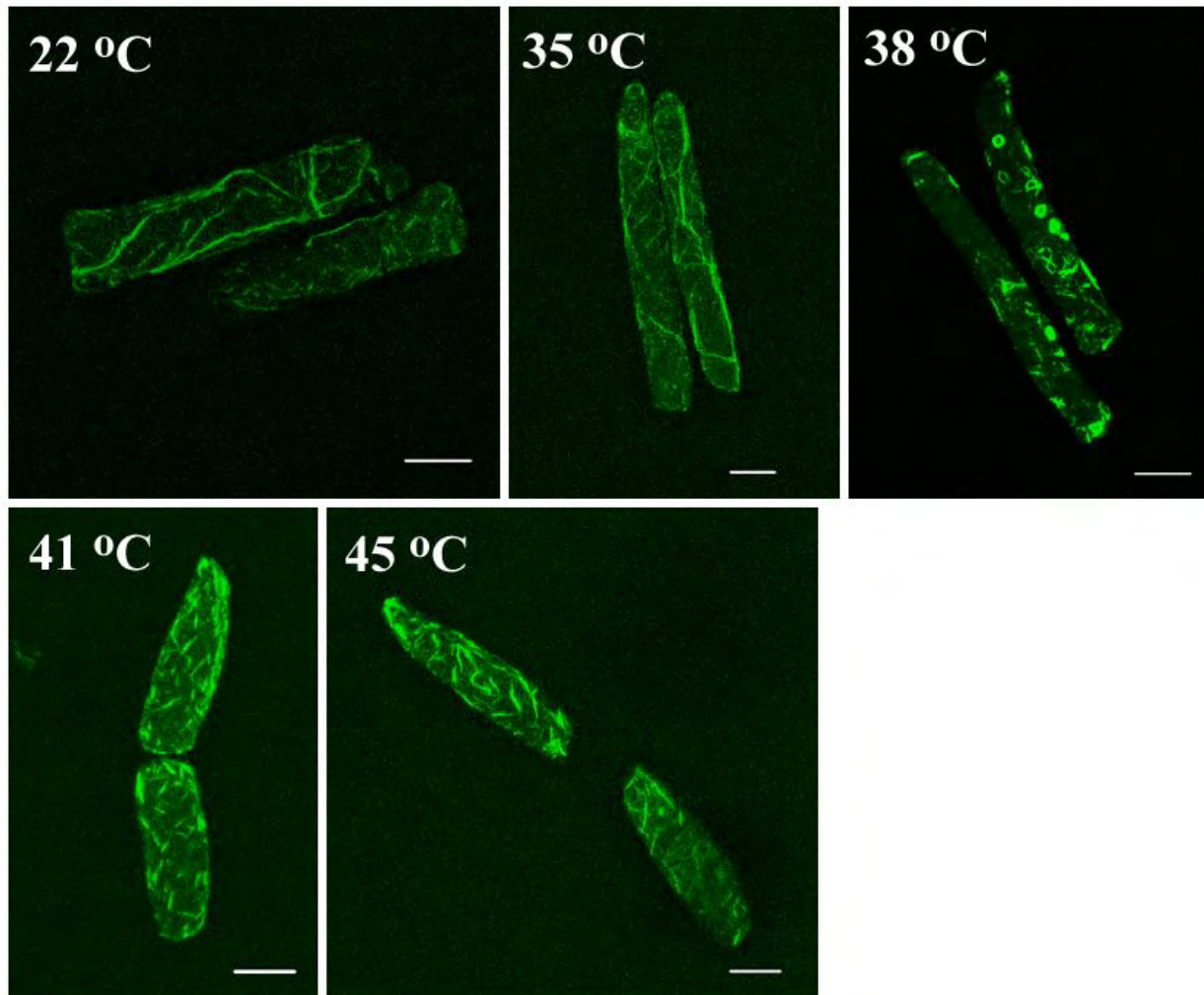
ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

เซลล์บอร์เดอร์ของราก (RBCs) ที่ผลัดออกสู่ของเหลวรอบปลายรากข้าวพันธุ์ KDML105 ในภาวะอุณหภูมิปกติ (22-25°C) มีแอกตินเป็นสายยาวบางและจัดเรียงตัวเป็นโครงข่ายตามแนวยาวในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 35 °C พบว่าไม่มีผลที่ชัดเจนต่อโครงข่ายสายแอกตินใน RBCs แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 38 °C แอกตินเกิดการหักเป็นท่อนสั้น (fragmentation) (รูปที่ 8) และเกิด actin ring จำนวนมาก (รูปที่ 8) ส่วนที่อุณหภูมิ 41-45°C แอกตินมีลักษณะเป็นท่อนสั้น (short fragment) กระจายตัวอยู่ทั่วในบริเวณคอร์เทกซ์ของเซลล์ (รูปที่ 8) เมื่อตรวจสอบแอกตินใน RBCs ที่ยังคงติดอยู่ใกล้กับชั้นผิวของรากซึ่งโดยปกติแล้วจะมีสารเมือกห่อหุ้มอยู่นั้น พบว่าแอกตินมีลักษณะเหมือนกับ RBCs ที่ผลัดออกจากปลายราก (รูปที่ 8 และ 9 A) สำหรับเซลล์ชั้นผิว (epidermal cells) ในบริเวณ division zone (ที่ระยะห่างจากปลายรากประมาณ 1 mm) ในภาวะปกติจะมีสายแอกตินยาวหนาและเรียงตัวในแนวขวาง (transverse) เซลล์บริเวณนี้มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงคล้ายกับ RBCs กล่าวคือ พบว่าเส้นใยแอกตินจัดเรียงตัวเป็นสายสั้นและหนา เป็นเส้นโค้ง และมีความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์มาก และพบ actin ring ในเซลล์ชั้นผิวทั้งใน division zone (1.0-1.5 mm) (รูปที่ 9 B-C) ใน elongation zone (2.1 mm) และในเซลล์ขนราก (รูปที่ 9 D-E) อีกด้วย โดยมี actin ring จำนวนมากในเซลล์บริเวณ division zone มากกว่าในบริเวณ differentiation zone

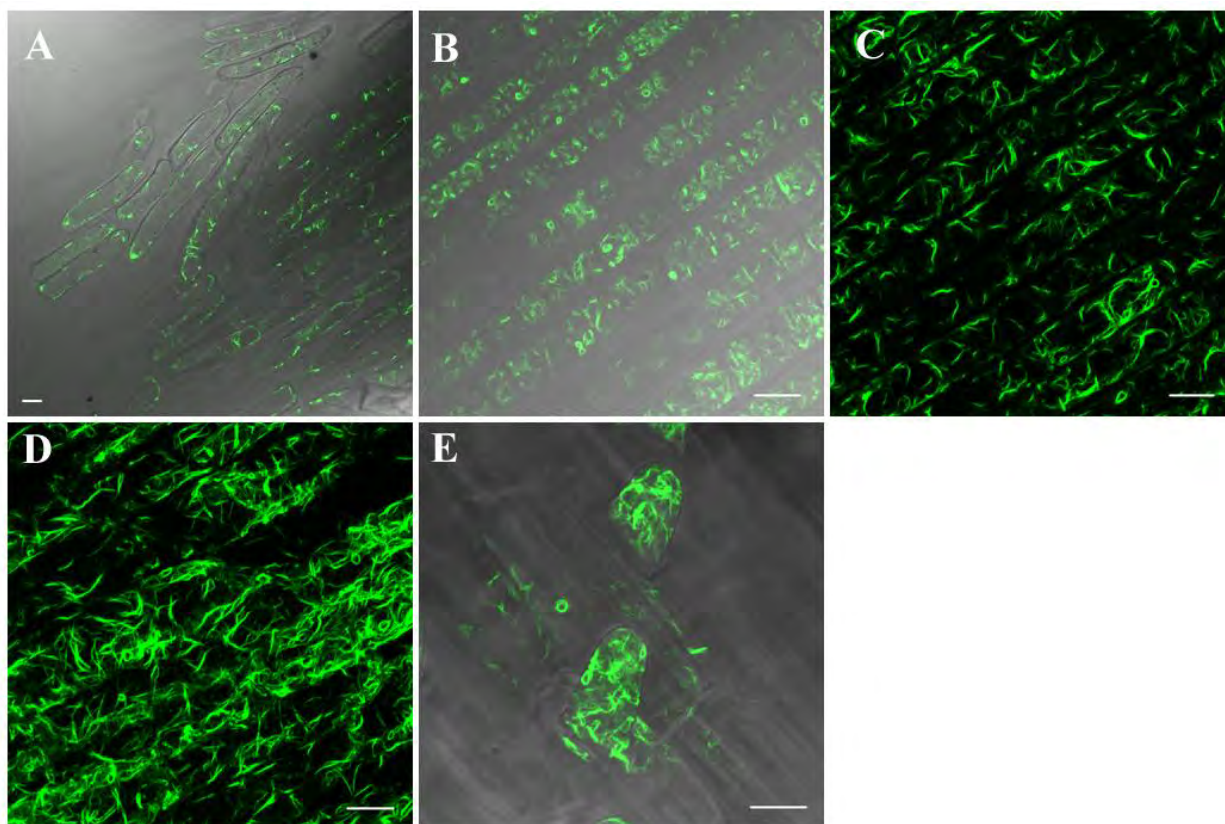
ข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง 1 (HKL1)

ใน RBCs ของรากที่ได้รับอุณหภูมิปกติ (22-25°C) มีการจัดเรียงตัวของแอกตินเป็นโครงข่ายตามแนวยาวของเซลล์ (รูปที่ 10) ภาวะอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 35°C ขึ้นไป มีผลต่อการจัดเรียงตัวของแอกตินในข้าวสายพันธุ์ HKL1 ในลักษณะที่แตกต่างกันไป กล่าวคือ พบว่าแอกตินเริ่มเกิดการหักเป็นท่อน (fragmentation) ที่ 35°C แอกตินมีลักษณะเป็นจุด (dots) เป็นส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิ 38°C ส่วนที่อุณหภูมิ 41-45°C แอกตินมีลักษณะเป็นท่อนสั้น กระจายตัวอยู่ในบริเวณคอร์เทกซ์ของเซลล์ (รูปที่ 10) นอกจากนี้ ยังพบว่าไม่มีการสร้าง actin ring จำนวนมากใน RBCs ของข้าวพันธุ์ HKL1 เหมือนกับที่พบในข้าวพันธุ์ KDML105 (รูปที่ 8 และ 10) เมื่อตรวจสอบแอกตินใน RBCs ที่ยังคงติดอยู่ใกล้กับชั้นผิวของรากซึ่งโดยปกติแล้วจะมีสารเมือกห่อหุ้มอยู่นั้น พบว่าแอกตินมีลักษณะเป็นท่อนสั้นและเป็นจุด และจับตัวเป็นก้อนที่ข้าวเซลล์ (รูปที่ 11 B) เหมือนกับ RBCs ที่ผลัดออกจากปลายราก (รูปที่ 10) ส่วนแอกตินในเซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone (1.5 mm) มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิ 38°C ค่อนข้างหลากหลาย โดยพบทั้งเซลล์ที่มีแอกตินเป็นเส้นหนาและจัดเรียงตัวเป็นโครงข่ายในแนวขวาง เซลล์ที่มีความหนาแน่นของเส้นแอกตินลดน้อยลง และเซลล์ที่มีพื้นหลังฟลูออเรสเซนส์ที่มากขึ้น (รูปที่ 11 E) ที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะแต่ละรากมีสารเมือกห่อหุ้มที่ปลายรากในปริมาณที่

แตกต่างกันซึ่งสามารถส่งผลให้ความรุนแรงของอุณหภูมิที่แต่ละรากได้รับนั้นให้แตกต่างกันไปได้ ส่วนเซลล์ชั้นผิวใน elongation zone และ root hair zone นั้น ได้รับผลจากอุณหภูมิสูงค่อนข้างรุนแรง โดยพบว่าเซลล์ชั้นผิวบางส่วนมีสภาพที่ผิดปกติและไม่ติดสีฟลูออเรสเซนต์ ส่วนเซลล์ชั้นผิวที่ยังคงมีสภาพเป็นปกตินั้นมีแอกตินที่เป็นเส้นหนาและสั้น และมีพื้นหลังฟลูออเรสเซนต์ที่มากขึ้น (รูปที่ 11 F)



รูปที่ 8 ผลของการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์บอร์เดอร์ราก (root border cells, RBCs) ที่ผลัดออกสู่บริเวณรอบนอกของปลายรากของข้าวพันธุ์ KDML105 อุณหภูมิเริ่มต้น คือ 22°C เพิ่มเป็นแต่ละอุณหภูมิในเวลา 5 นาที
บาร์เท่ากับ 10 μm



รูปที่ 9 ผลของการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์บริเวณปลายรากข้าวพันธุ์ KDML105

อุณหภูมิเริ่มต้น คือ 22°C เพิ่มขึ้นแต่ละอุณหภูมิในเวลา 5 นาที

A เซลล์บอร์เดอร์ของรากที่ติดอยู่กับเนื้อเยื่อผิวราก (attached root border cells, aRBCs) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C เป็นเวลา 5 นาที

B เซลล์ชั้นผิว (epidermal cells) บริเวณ division zone (1.0 mm) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C 5 นาที

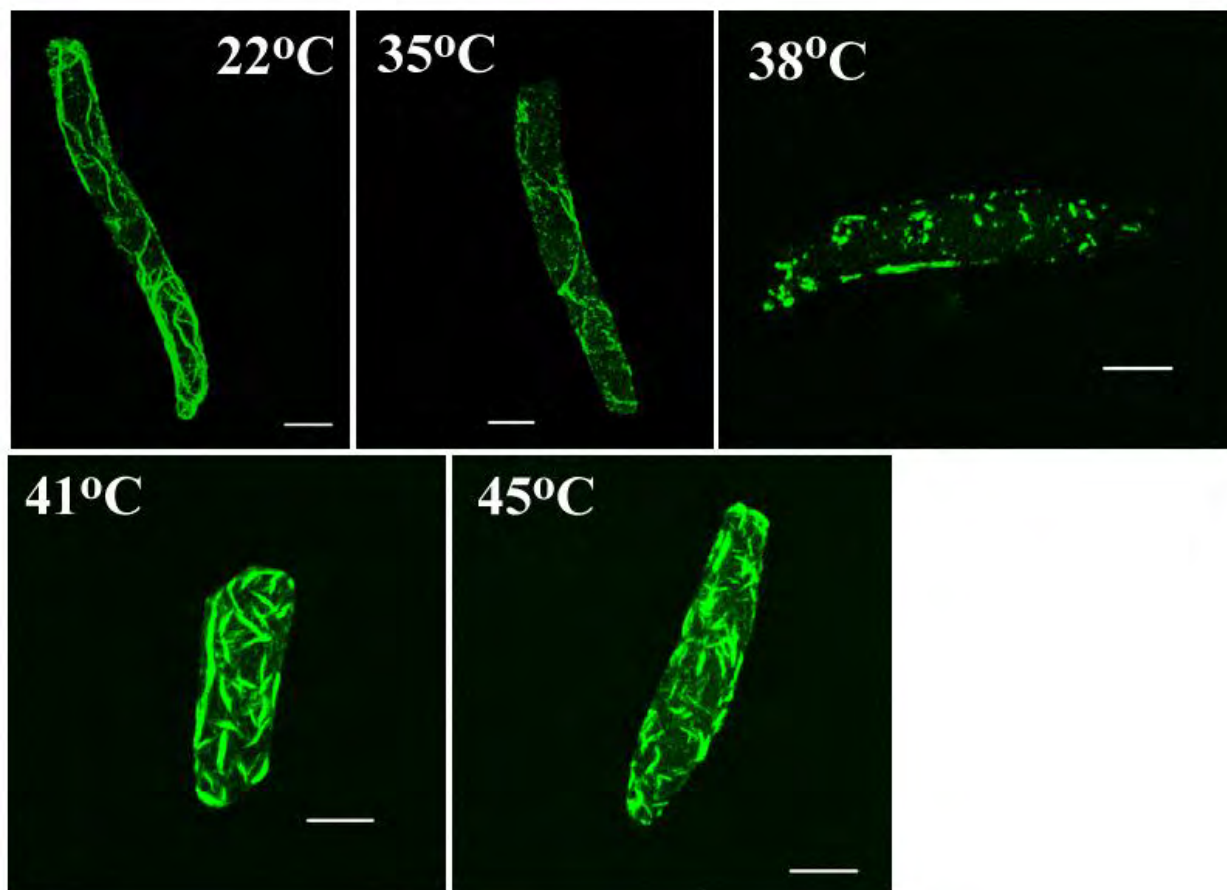
C เซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone (1.5 mm) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C 5 นาที

D เซลล์ชั้นผิวบริเวณ elongation zone (2.1 mm) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C 5 นาที

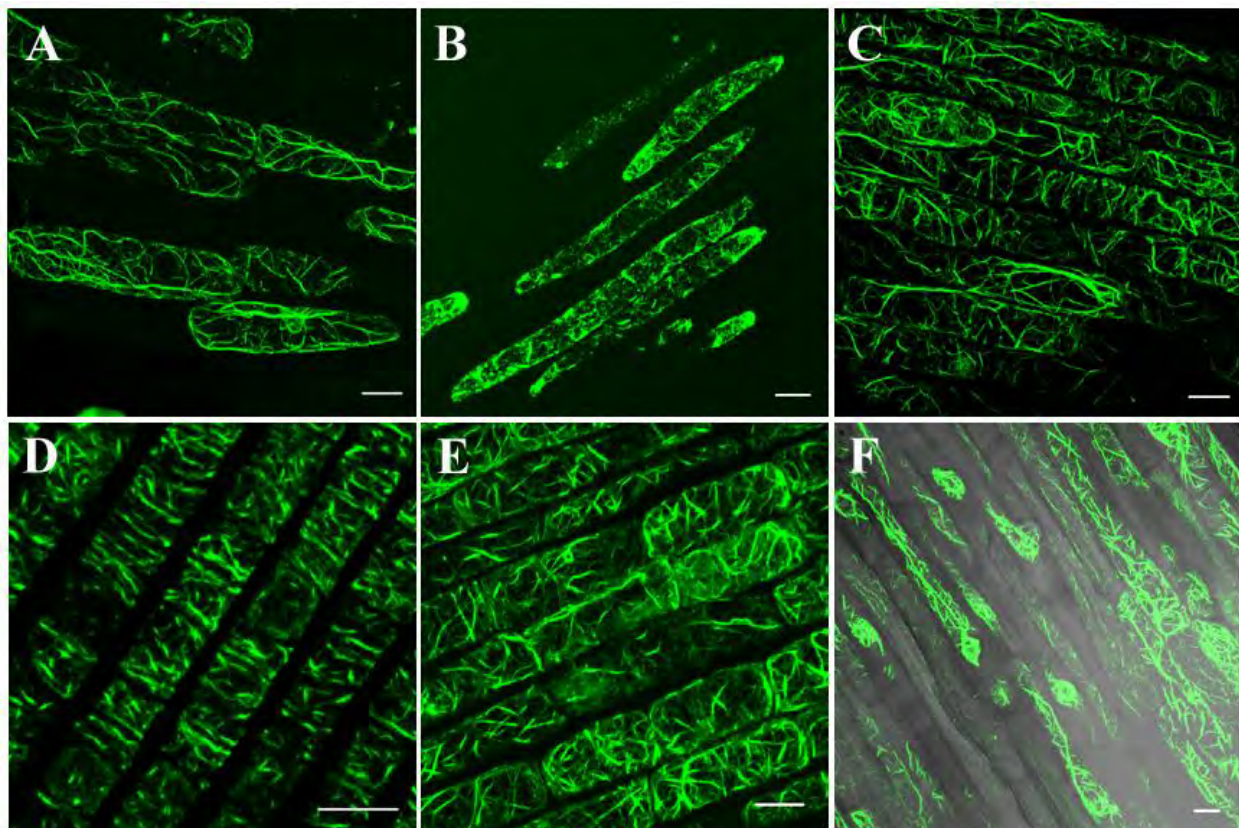
E เซลล์ชั้นผิวบริเวณ root hair zone หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C 5 นาที

A B E ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนส์ซ้อนบนภาพถ่ายแบบไบรท์ฟิลด์ (fluorescent image superimposed on bright-field image)

บาร์เท่ากับ 10 μm



รูปที่ 10 ผลของการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินในชั้นคอร์เท็กซ์ของเซลล์บอร์เดอร์ราก (root border cells, RBCs) ที่ผลัดออกสู่บริเวณรอบนอกของปลายรากของข้าวพันธุ์ HKL1 อุณหภูมิเริ่มต้น คือ 22°C เพิ่มขึ้นแต่ละอุณหภูมิในเวลา 5 นาที บาร์เท่ากับ 10 μm



รูปที่ 11 ผลของการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์บริเวณปลายรากข้าวพันธุ์ HKL1

อุณหภูมิเริ่มต้น คือ 22°C เพิ่มเป็นแต่ละอุณหภูมิในเวลา 5 นาที

A เซลล์บอร์เดอร์ของรากที่ติดอยู่กับเนื้อเยื่อผิวราก (attached root border cells, aRBCs) ที่ได้รับอุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 5 นาที

B เซลล์บอร์เดอร์ของรากที่ติดอยู่กับเนื้อเยื่อผิวรากที่ได้รับอุณหภูมิ 38°C เป็นเวลา 5 นาที

C เซลล์ชั้นผิวบริเวณ elongation zone (2.1 mm) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 22°C 5 นาที

D เซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone (1.0 mm) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C 5 นาที

E เซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone (1.5 mm) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C 5 นาที

F เซลล์ชั้นผิวบริเวณ root hair zone (2.8 mm) หลังจากได้รับอุณหภูมิ 38°C 5 นาที

F ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนส์ซ้อนบนภาพถ่ายแบบไบรท์ฟิลด์ (fluorescent image superimposed on bright-field image)

บาร์เท่ากับ 10 μm

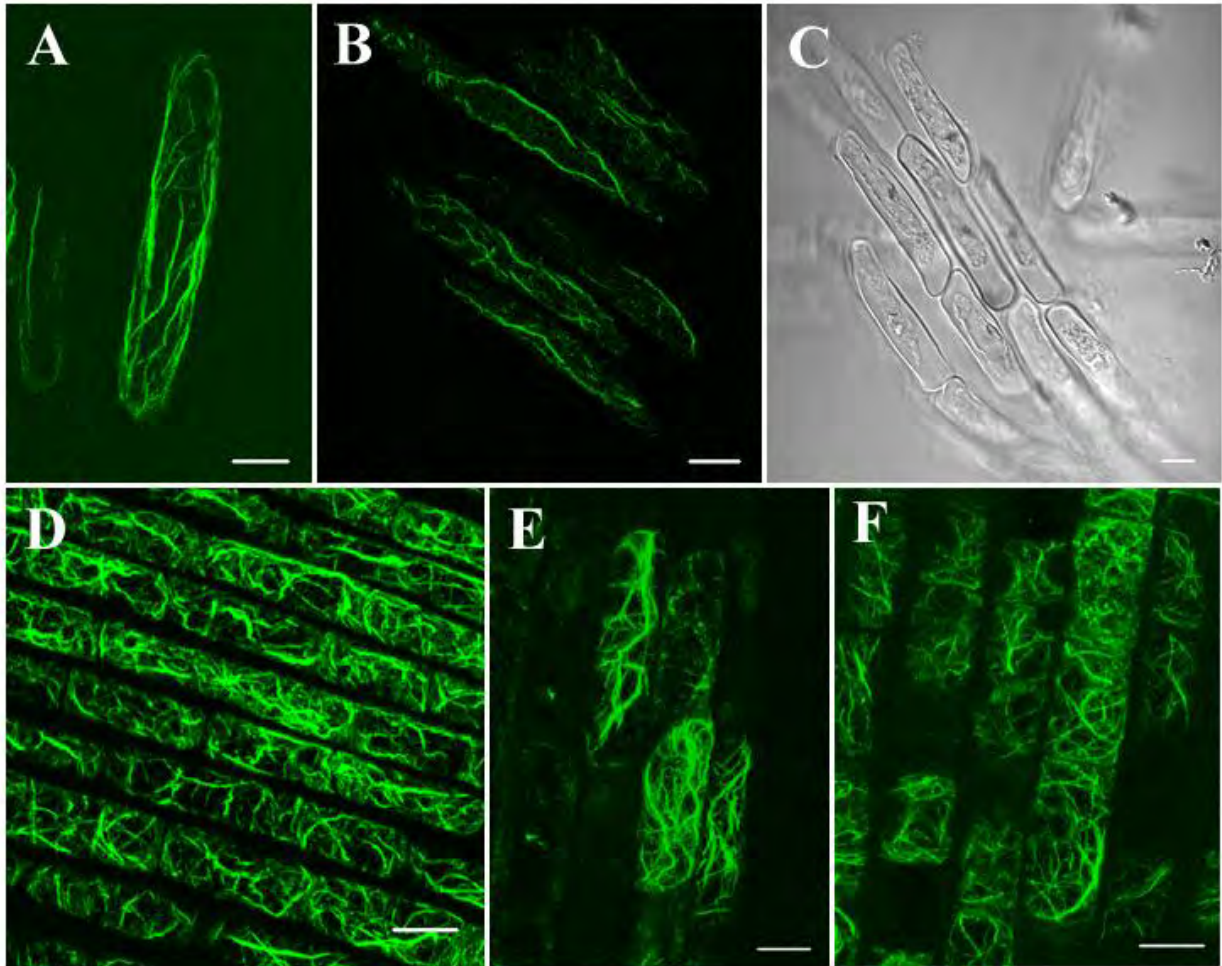
ผลของโคโทซานต่อแอกตินไซโทสเกลตอนในเนื้อเยื่อรากของข้าว

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

หลังจากแช่ปลายรากข้าวพันธุ์ KDML105 ในสารละลายโคโทซาน (10 ppm O80) และ สารละลาย 0.001 % acetic acid (ชุดควบคุม) เป็นเวลาต่าง ๆ และนำมาตรวจสอบแอกตินไซโทสเกลตอน ได้ผลดังรูปที่ 12 โดยแอกตินมีลักษณะเป็นเส้นใยทั้งแบบเส้นบางและหนาเรียงตัวเป็นโครงข่ายในแนวยาว (longitudinal) อยู่ในบริเวณคอร์เท็กซ์ของ RBCs (รูปที่ 12 A) และเซลล์ชั้นผิวใน elongation zone (รูปที่ 12 D) และเรียงตัวเป็นโครงข่ายในแนวขวาง (transverse) ในเซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone โคโทซานเริ่มมีผลเปลี่ยนแปลงลักษณะของแอกตินไซโทสเกลตอนใน RBCs หลังการได้รับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยพบลักษณะเส้นใยแอกตินแบบสายสั้น (fragments) (รูปที่ 12 B) ส่วนการได้รับโคโทซานเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีผลให้ RBCs ส่วนใหญ่เกิด plasmolysis และไม่สามารถตรวจสอบโครงร่างสายแอกตินในเซลล์ที่เสียหายเหล่านี้ได้ (รูปที่ 12 C) ส่วนเซลล์ชั้นผิวใน elongation zone บางส่วนเกิด plasmolysis เมื่อได้รับโคโทซานเพียง 20 นาที และไม่สามารถตรวจสอบโครงร่างแอกตินในเซลล์ที่เสียหายเหล่านี้ได้เช่นกัน (รูปที่ 12 E-F) อย่างไรก็ตาม เซลล์ชั้นผิวที่ไม่เกิด plasmolysis มีลักษณะของสายแอกตินแตกต่างกันไป โดยมีทั้งเซลล์ที่มีแอกตินเป็นสายบางที่จัดเรียงตัวในแนวยาวและขวางในลักษณะที่ไม่ต่างจากชุดควบคุม (รูปที่ 13 D-F) และเซลล์ที่พบลักษณะของแอกตินที่ถูกรบกวน ได้แก่ ลักษณะแอกตินแบบสายสั้น (fragments) และแบบจุด (dots) (รูปที่ 12 F).

ข้าวพันธุ์หอมคลองหลวง 1 (HKL1)

แอกตินในเซลล์ RBCs ของรากชุดควบคุมมีการเรียงตัวเป็นโครงข่ายในแนวยาวในชั้นคอร์เท็กซ์ของเซลล์ (รูปที่ 13 A) ในลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ RBCs ของข้าวพันธุ์ KDML105 การได้รับสารละลายโคโทซาน (10 ppm O80) เป็นเวลา 20 นาที มีผลให้แอกตินใน RBCs มีลักษณะเป็นสายสั้นและเป็นจุด (รูปที่ 13 B) อย่างไรก็ตาม RBCs ที่อยู่ใกล้ชิดกับเนื้อเยื่อชั้นผิวได้รับผลของโคโทซานน้อยกว่า โดยพบว่ามีลักษณะเส้นใยแอกตินไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (รูปที่ 13 C) เช่นเดียวกันกับเซลล์ชั้นผิวใน division zone (รูปที่ 13 D-E) ส่วนเซลล์ผิวในบริเวณ elongation zone ได้รับผลจากโคโทซานค่อนข้างมาก โดยพบว่าเซลล์ผิวมีลักษณะ plasmolysis และไม่ติดสีย้อมฟลูออเรสเซนต์เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 13 F)



รูปที่ 12 ผลของโคโทซานต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์รากของข้าวพันธุ์ KDML105

A เซลล์บอร์เดอร์ราก (root border cells) ที่ผลัดออกสู่บริเวณหลังจากได้รับ 0.001% acetic acid เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

B เซลล์บอร์เดอร์ราก หลังจากได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

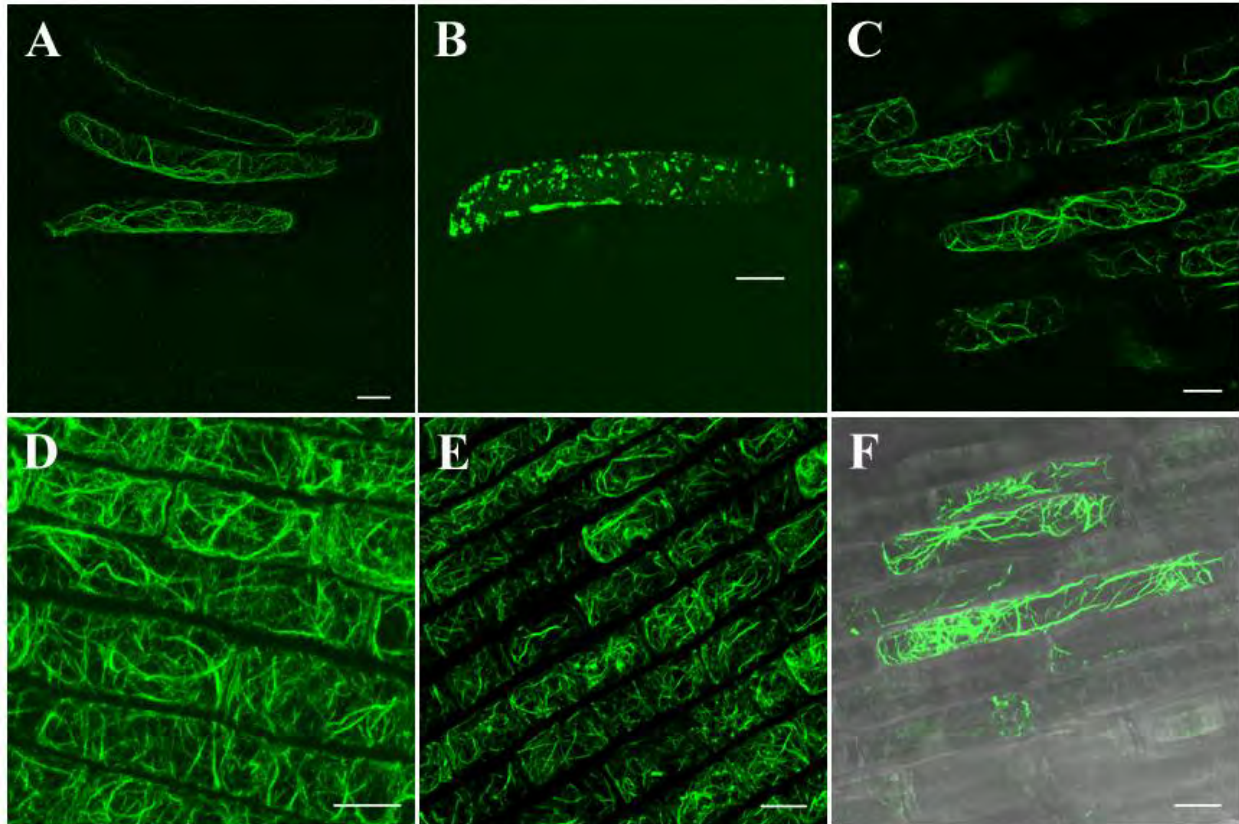
C เซลล์บอร์เดอร์ราก หลังจากได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

D เซลล์ชั้นผิว (epidermal cell) บริเวณ elongation zone ที่ได้รับ 0.001% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที

E เซลล์ชั้นผิวบริเวณ elongation zone ที่ได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาที

F เซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone ที่ได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาที

บาร์เท่ากับ 10 μm



รูปที่ 13 ผลของไคโทซานต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์รากของข้าวพันธุ์ HKL1

A เซลล์บอร์เดอร์ของราก (root border cells, RBCs) หลังจากได้รับ 0.001% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที

B เซลล์บอร์เดอร์ของรากหลังจากได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาที

C เซลล์บอร์เดอร์ของรากที่ติดอยู่กับเนื้อเยื่อผิวราก (attached root border cells, aRBCs) หลังจากได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาที

D เซลล์ชั้นผิว (epidermal cell) บริเวณ division zone ที่ได้รับ 0.001% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที

E เซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone ที่ได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาที

F เซลล์ชั้นผิวบริเวณ elongation zone ที่ได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาที

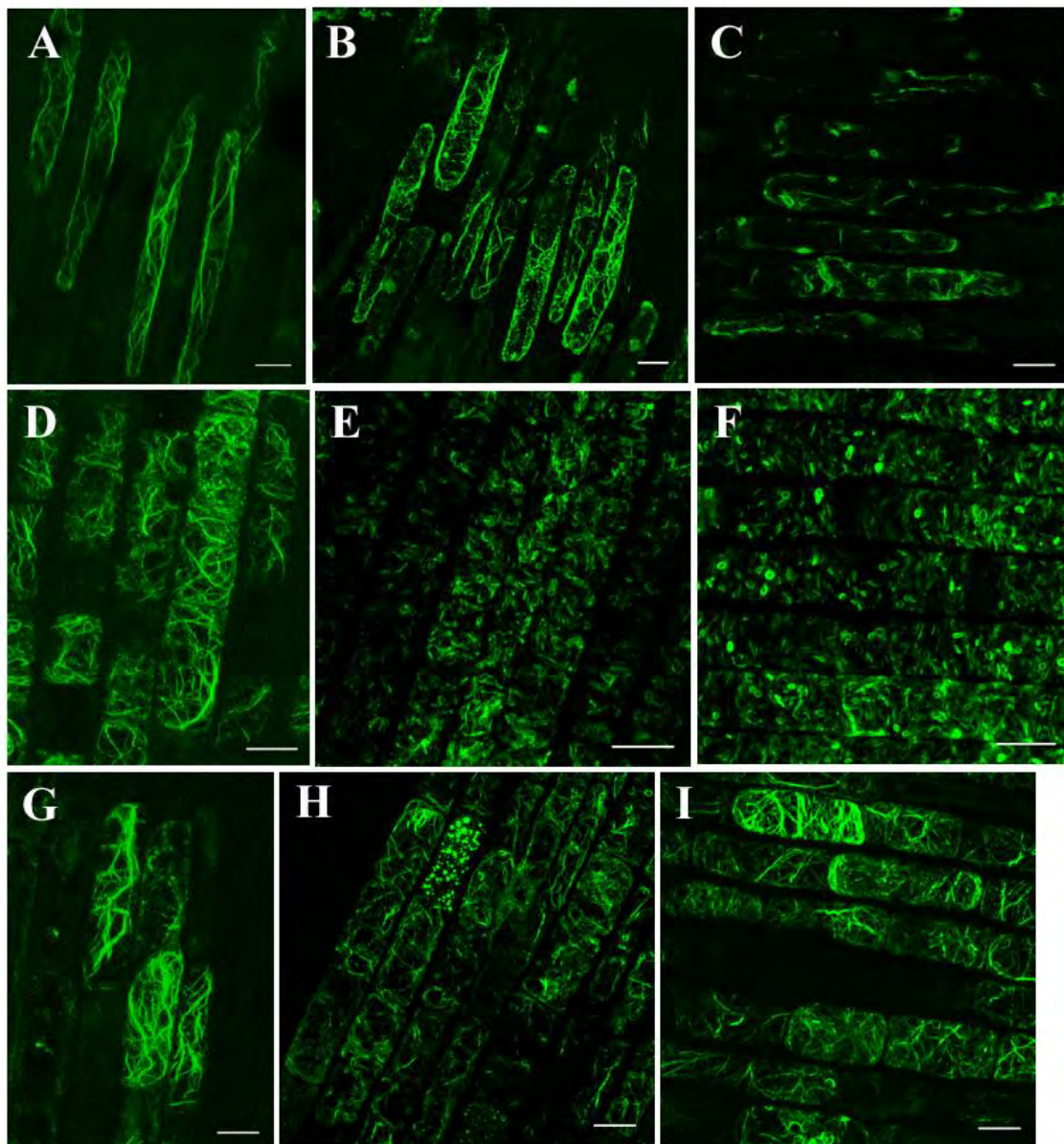
F ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนส์ซ้อนบนภาพถ่ายแบบไบรท์ฟิลด์ (fluorescent image superimposed on bright-field image)

บาร์เท่ากับ 10 μm

ผลของไคโทซานต่อแอกตินไซโทสเกลตอนในเนื้อเยื่อรากของข้าวที่ได้รับอุณหภูมิสูง

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

การได้รับ 0.001% acetic acid เป็นเวลา 20 นาทีไม่มีผลต่อโครงข่ายแอกตินไซโทสเกลตอนใน RBCs และเซลล์ชั้นผิวของรากข้าวพันธุ์ KDML105 (รูปที่ 12 A และ D) ไคโทซาน (10 ppm O80 20 นาที) ไม่มีผลต่อโครงข่ายสายแอกตินใน RBCs ที่ 22°C โดยพบว่าแอกตินมีลักษณะเป็นสายยาวและบางเรียงตัวเป็นโครงข่ายตามแนวยาวของเซลล์ (รูปที่ 14 A) แต่มีผลเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของสายแอกตินที่อุณหภูมิ 35°C กล่าวคือ พบแอกตินที่มีลักษณะสายสั้นและเป็นจุดมากขึ้นและมีแอกตินสายยาวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 25°C (รูปที่ 14 A และ B) ส่วนที่อุณหภูมิ 38°C พบ actin ring และแอกตินสายสั้น ในลักษณะคล้ายคลึงกับผลของอุณหภูมิสูงที่ 38°C โดยไม่ได้รับไคโทซาน (รูปที่ 12 A และ 14 C) นอกจากใน RBCs แล้ว ลักษณะของแอกตินเช่นนี้ยังพบในเซลล์ชั้นผิวอีกด้วย (รูปที่ 14 E-F) ในสภาวะที่ไม่ได้รับไคโทซาน อุณหภูมิ 35°C ไม่มีผลต่อโครงข่ายสายแอกตินใน RBCs ทั้ง ๆ ที่เป็นเซลล์ที่มีโอกาสได้รับผลของอุณหภูมิสูงมากกว่าเซลล์ชั้นผิว (รูปที่ 8 B) หลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไคโทซานอาจเพิ่มระดับความเครียดภายในเซลล์มากขึ้นจนมีผลต่อแอกตินคล้ายกับผลของอุณหภูมิ 38°C (รูปที่ 9 C และ 14 E-F) แม้แต่ที่อุณหภูมิ 22°C ไคโทซานก็ยังมีผลเปลี่ยนแปลงลักษณะสายแอกตินในเซลล์ชั้นผิวด้วย โดยทำให้เกิดแอกตินแบบจุดขึ้นในบางเซลล์ (รูปที่ 14 D) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่ 38°C ชักนำให้เกิด actin ring และแอกตินสายสั้น โดยไม่ขึ้นกับการได้รับหรือไม่ได้รับไคโทซาน (รูปที่ 9 C และ 14 F)



รูปที่ 14 ผลของไคโทซานต่อการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์รากของข้าวพันธุ์ KDML105 ภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูง

A-C เซลล์บอร์เดอร์ของรากที่ติดอยู่กับเนื้อเยื่อผิวราก (attached root border cells, aRBCs) หลังจากได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาทีและตามด้วยภาวะอุณหภูมิสูงที่ 22°C (**A**) 35°C (**B**) และ 38°C (**C**)

D-F เซลล์ชั้นผิว (epidermal cell) บริเวณ division zone (1.0-1.2 mm) ที่ได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาทีและตามด้วยภาวะอุณหภูมิสูงที่ 22°C (**D**) 35°C (**E**) และ 38°C (**F**)

G-I เซลล์ชั้นผิว (epidermal cell) บริเวณ division zone (1.5-1.8 mm) ที่ได้รับ 10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาทีและตามด้วยภาวะอุณหภูมิสูงที่ 22°C (**G**) 35°C (**H**) และ 38°C (**I**)

บาร์เท่ากับ 10 μm

บทวิจารณ์

โคโทซานชักนำให้รากข้าวเกิดการเพิ่มขึ้นของ pH ภายนอกเซลล์ (extracellular alkalinization) เช่นเดียวกับเซลล์แขวนลอยและพืชชนิดอื่น ๆ (Amborabé et al., 2008; Stratmann et al., 2000) การชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ pH ภายนอกเซลล์นี้เชื่อว่าเป็นกระบวนการที่พืชมีเพื่อสร้างสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ (Felle, 2001) เมื่อเกิดการเพิ่มขึ้นของ pH ภายนอกเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นด้วยผลจากภาวะอุณหภูมิสูง การกระตุ้นด้วย nigericin (สารยับยั้งการทำงานของ H^+ -ATPase) หรือแม้กระทั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ พืชจะปรับตัวอย่างหนึ่งซึ่งคล้ายกับในเห็ดราคือการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดที่ทำงานได้ดีที่ pH นั้น เช่น การเพิ่มกิจกรรมของ alkaline phosphatase โดยไม่เพิ่มกิจกรรมของ acid phosphatase เป็นต้น (Chaidee et al., 2008a) ในภาวะอุณหภูมิปกติ (22-25°C) เมื่อปลายรากข้าวได้รับโคโทซาน (10 ppm O80) เป็นเวลา 20 นาที จะมีผลให้เซลล์มี extracellular pH เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 0.39 pH unit ในข้าวพันธุ์ KDML105 และ 0.20 pH unit ในข้าวพันธุ์ HKL1 (รูปที่ 3) pH ที่เพิ่มขึ้นนี้คิดเป็น 54% (HKL1) และ 65% (KDML105) ของค่าการเปลี่ยนแปลงสูงสุดที่ระยะเวลา 150 นาที (รูปที่ 3) ระดับการเพิ่มขึ้นของ extracellular pH ของรากข้าวที่ได้รับโคโทซานนี้น้อยกว่าเซลล์แขวนลอยมะเขือเทศที่ได้รับโคโทซาน 10 ppm เป็นเวลา 20 นาทีเท่ากัน ซึ่งมี pH เพิ่มขึ้นถึง 1.0 pH unit (Stratmann et al., 2000) จะเห็นว่าการใช้ค่าการเปลี่ยนแปลง pH ภายนอกเซลล์เป็นตัวบ่งชี้ระดับความเครียดทางสิ่งแวดล้อมที่กระทำต่อเซลล์อาจเหมาะสมกับเซลล์แขวนลอยมากกว่าเนื้อเยื่อราก เพราะมีพื้นผิวสัมผัสโดยรวมมากกว่าเมื่อเทียบกับน้ำหนักเท่ากัน ส่งผลให้ค่า extracellular pH เป็นค่าที่ตอบสนองอย่างรวดเร็วมากต่อสิ่งเร้าจากภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ เมื่อเกิดภาวะภายนอกเซลล์เป็นด่างมากขึ้น พืชมีการปรับรูปแบบเอนไซม์ที่หลั่งออกมาให้สอดคล้องกับภาวะภายนอกเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase ที่ทำงานได้ดีที่ pH สูง ลักษณะการตอบสนองเช่นนี้เหมือนกับสิ่งมีชีวิตกลุ่มเห็ดรา (Denison, 2000; Chaidee et al., 2008a)

โดยปกติแล้ว phosphatase ที่ทำงานได้ดีที่ pH เป็นด่างมักเป็นเอนไซม์ที่พบมากในไซโทพลาซึม (Duff et al., 1994; Morita et al., 1996) การเพิ่มขึ้นของ alkaline phosphatase ภายนอกเซลล์ เป็นตัวบ่งชี้ถึงความแข็งแรงของเซลล์ตลอดจนการหลั่งสารออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ การหลั่ง phosphatase ออกสู่ภายนอกเซลล์เกิดมากขึ้นเมื่อเซลล์เผชิญกับภาวะผิดปกติของปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ เช่น การมีปริมาณธาตุฟอสฟอรัสต่ำ และภาวะอุณหภูมิสูง (Duff et al., 1994; Morita et al., 1996; Chaidee and Pfeiffer, 2006) มีหลักฐานว่า extracellular phosphatase เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติบโตและการดูดธาตุฟอสฟอรัสของพืช (Lee and Satter, 1988; Pfeiffer, 1998) และการเพิ่มปริมาณฟอสเฟตภายนอกเซลล์เพื่อให้พืชสามารถเผชิญกับภาวะผิดปกติเหล่านั้นได้ (Duff et al., 1994; Sharma et al., 2005) อย่างไรก็ตาม การ

เปลี่ยนแปลง pH ภายในอกรากข้าวเนื่องจากการได้รับโคโทซานซึ่งเป็นความเครียดทางชีวภาพ (biotic stress) นี้ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (รูปที่ 5 A) จึงไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่าง extracellular pH กับ alkaline phosphatase ดังเช่นที่มีรายงานไว้ในการศึกษาผลของภาวะอุณหภูมิสูงต่อเซลล์แขวนลอย *Chenopodium rubrum* (Chaidee et al., 2008a) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase เพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า เมื่อภายนอกเซลล์มี pH เพิ่มขึ้น 0.6-0.7 pH unit จากการได้รับอุณหภูมิสูง (เพิ่มจาก 22°C เป็น 38°C ในเวลา 5 นาที)

เมื่อปลายรากข้าวได้รับอุณหภูมิสูงที่ระดับ 35°C เป็นเวลา 5 นาที มีผลให้เกิด extracellular acidification ในข้าวพันธุ์ HKL1 และไม่มีผลต่อ extracellular pH ของข้าวพันธุ์ KDML105 (รูปที่ 1 A) ในพันธุ์ HKL1 ผลของอุณหภูมิสูงที่ทำให้เกิด acidification ภายนอกเซลล์หายไปในช่วงทดลองที่ใช้ 0.001% acetic acid เป็นชุดควบคุมแทนน้ำกลั่น (รูปที่ 4 A) อาจเนื่องมาจาก buffering capacity ที่เพิ่มขึ้นเพราะ acetic acid ในสถานะที่มี 0.001% acetic acid ภายนอกเซลล์ อุณหภูมิ 35°C ทำให้ pH ภายนอกเซลล์ของรากข้าวทั้งสองพันธุ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (+0.20 pH unit) (รูปที่ 4 A) และในสถานะที่มีโคโทซานส่วนของ pH ที่เพิ่มขึ้นอีกเนื่องจากอุณหภูมิสูงมีค่าน้อยกว่าสถานะที่ไม่ได้รับโคโทซานประมาณ 25% ใน KDML105 และ 32% ใน HKL1 (รูปที่ 4 A) pH ที่เพิ่มขึ้นนี้ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลง buffering capacity ในของเหลวภายนอกเซลล์เนื่องจากกระบวนการหลั่งสาร เช่น organic acid หรือ กรดอะมิโนออกจากเซลล์ อีกส่วนหนึ่งเป็นเพราะ proton pump ถูกยับยั้งการทำงาน (Felle, 2001; Chaidee et al., 2008a) เป็นที่ทราบกันดีว่าโคโทซานมีผลเพิ่ม extracellular pH และยับยั้งการทำงานของ proton pump (Amborabé et al., 2008; Stratmann et al., 2000) ส่วนของ pH ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิสูงที่น้อยลงในสถานะที่มีโคโทซานนี้อาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ proton pump หรือการเพิ่มขึ้นของ buffering compound ในของเหลวภายนอกอกรากด้วยอุณหภูมิสูงก็เป็นได้ (ด้วยข้อจำกัดเรื่องวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อรากที่ต้องเตรียมสดและมีปริมาณมากเพียงพอทำให้ไม่สามารถวัดกิจกรรมของ proton pump ในครั้งนี้ได้)

ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase ภายนอกอกรากข้าวพันธุ์ KDML105 ที่ได้รับอุณหภูมิสูงที่ระดับ 35°C มีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับโคโทซาน (-26%) ส่วนใน HKL1 ไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 5 B) แนวโน้มการลดลงของ alkaline phosphatase ใน KDML105 นี้ แม้จะไม่มากนัก แต่ทำให้เห็นความสัมพันธ์คล่องกันระหว่าง การเปลี่ยนแปลงของ extracellular pH และ alkaline phosphatase เมื่อได้รับโคโทซานร่วมกับภาวะอุณหภูมิสูงที่พบเฉพาะในข้าวพันธุ์ KDML105 (รูปที่ 4 B และ 5 B) สหสัมพันธ์ระหว่าง extracellular pH กับ extracellular alkaline phosphatase ในภาวะอุณหภูมิสูง พบเฉพาะในข้าวพันธุ์ KDML105 (รูปที่ 7) และลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับเซลล์แขวนลอย *Chenopodium* ชนิดเฮเทอโรโทรป (Chaidee et al., 2008a) นอกจากนี้ จากข้อมูลของ pH และ alkaline phosphatase ของรากที่ได้รับโคโท

ชานที่อุณหภูมิ 25°C ในข้าวทั้งสองพันธุ์ (รูปที่ 3 A และ 5 A) ยืนยันว่ารากข้าวทั้งสองพันธุ์ตอบสนองต่อไคโทซานชนิด O80 เหมือนกัน แต่ตอบสนองต่อภาวะอุณหภูมิสูงระดับปานกลาง (35°C) แตกต่างกัน (รูปที่ 4 A และ 5 B) ส่วนที่อุณหภูมิระดับสูง (45°C) การได้รับไคโทซานไม่ได้มีผลลดผลของอุณหภูมิที่มีต่อ extracellular pH แต่มีผลกิจกรรมของ alkaline phosphatase มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 4 B และ 5 C) อาจบ่งชี้ว่าไคโทซานไม่สามารถลดความเครียดจากอุณหภูมิระดับสูงนี้ได้

หมวกราก (root cap) ปลดปล่อยสารเมือก (mucilage) โปรตีน และเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งเรียกว่าเซลล์บอร์เดอร์ของราก (root border cells, RBCs) ออกมาสู่บริเวณภายนอก ราก (Hawes et al., 1986; Wen et al., 2007) RBCs เหล่านี้สร้างมาจากเนื้อเยื่อเจริญหมวกราก (root cap meristem) เมื่อพัฒนาเต็มที่จะเป็นเซลล์ที่ยาวและจะหลุดออกไปจากผิวรากเมื่อมีตำแหน่งของเซลล์อยู่ในบริเวณรอบนอกของหมวกราก (cap periphery) (Hawes et al., 1998; Hamamoto et al., 2006) เซลล์เหล่านี้หลังโปรตีนหลายชนิดออกสู่ภายนอกเซลล์และมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันเนื้อเยื่อส่วนปลายรากจากโรคติดเชื้อและปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางกายภาพที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ (Neumann and Roemheld, 2007; Wen et al., 2007) เป็นที่ทราบกันดีว่าการหลังโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์นั้นเกี่ยวข้องกับแอกตินไซโทสเกเลตอน ในงานวิจัยนี้ จึงตรวจสอบการจัดเรียงตัวของเส้นใยแอกตินใน RBCs เหล่านี้หลังจากเนื้อเยื่อปลายรากข้าวได้รับภาวะอุณหภูมิสูง และเปรียบเทียบกับผลการศึกษาโดยใช้เซลล์แขวนลอย *C. rubrum* (Chaidee et al., 2008b) ผลการศึกษาพบว่าแอกตินไซโทสเกเลตอนของเนื้อเยื่อรากข้าวทั้งสองพันธุ์ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงแตกต่างกัน กล่าวคือ การได้รับอุณหภูมิต่ำกว่า 35 °C ไม่มีผลต่อโครงข่ายแอกตินใน RBCs ของพันธุ์ KDML105 แต่มีผลให้แอกตินเปลี่ยนแปลงจากสายยาวบางและจัดเรียงตัวเป็นโครงข่ายกลายเป็นมีลักษณะเป็นท่อนสั้น (actin fragments) และพบ actin ring ที่อุณหภูมิ 38 °C เฉพาะในพันธุ์ KDML105 ทั้งใน RBCs ที่ผลิตออกจากราก RBCs ที่ติดอยู่กับผิวรากและในเซลล์ชั้นผิวตลอดความยาว 2.5 cm ส่วนในพันธุ์ HKL1 นั้น แอกตินเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากโดยมีลักษณะเป็นจุด (actin dots) โดยไม่พบ actin ring ส่วนที่อุณหภูมิสูงกว่า 38 °C แอกตินเกิดการหักเป็นท่อนสั้น (fragmentation) เช่นเดียวกันในข้าวทั้งสองพันธุ์ (รูปที่ 8 -11) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแอกตินมีความไวต่ออุณหภูมิสูงอย่างมาก และเซลล์ที่ปลายรากข้าวพันธุ์ KDML105 ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเฮเทอโรโทรปตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงเหมือนกับเซลล์แขวนลอย *C. rubrum* ชนิดเฮเทอโรโทรป (Chaidee et al., 2008b) การสร้าง actin ring นี้สันนิษฐานว่าเกิดขึ้นได้เอง (self-assembly) จากแอกตินสายยาวที่พันเป็นวงให้สายแอกตินเข้ามาแนบชิดกันโดยการทำงานของโปรตีน myosin (Foissner et al., 2002) แม้ว่าจะยังไม่ทราบถึงหน้าที่ของ actin ring แต่การค้นพบว่าการเกิด actin ring ที่กระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูงในเซลล์แขวนลอย *C. rubrum* ชนิดเฮเทอโรโทรปนั้นสามารถผันกลับได้เมื่อเข้าสู่ภาวะอุณหภูมิปกติ (Chaidee et al., 2008b) จึงบ่งชี้ว่า การเกิด actin ring ไม่ใช่ความเสียหายของแอกตินเมื่อได้รับอุณหภูมิสูง แต่น่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงของแอกตินที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวของเซลล์ต่อภาวะอุณหภูมิ

สูง ผลการศึกษาโดยใช้เนื้อเยื่อรากเป็นข้อมูลที่ยืนยันว่าการเกิด actin ring เป็นการตอบสนองของแอกตินที่จำเพาะต่อชนิดเซลล์และต่อช่วงอุณหภูมิแคบ ๆ ในระดับที่เซลล์ยังมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาได้ (physiological range) นอกจากนี้ การสังเกตพบว่ามี actin ring หนาแน่นในเซลล์บริเวณ division zone มากกว่าในบริเวณ differentiation zone (รูปที่ 9 D-E) สนับสนุนรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าเซลล์แขวนลอย BY-2 ซึ่งมีการแบ่งตัวอยู่เสมอมีจำนวนของ actin ring มากกว่าในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งบ่งชี้ว่าการเกิด actin ring นั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ของพืชด้วย (Smertenko et al., 2010) แม้ว่าจะพบ actin ring ได้ในสภาวะปกติเช่นกัน แต่จำนวน actin ring เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูง อีกทั้งมีจำนวน actin ring ในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนในของเหลวภายนอกเซลล์ลดลง (Chaidee et al., 2008b) ในงานวิจัยนี้ จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 38 °C เซลล์ชั้นผิวของ KDML105 เกิด actin ring ทุกเซลล์ โดยไม่มีเซลล์ที่แสดงลักษณะเสียหาย หรือ plasmolysis ส่วนเซลล์ชั้นผิวของ HKL1 บริเวณ elongation และ root hair นั้น ได้รับผลจากอุณหภูมิสูงค่อนข้างรุนแรง โดยบางเซลล์มีสภาพที่ผิดปกติและไม่ติดสีฟลูออเรสเซนต์ (รูปที่ 9 และ 11) ยิ่งไปกว่านั้น การตอบสนองที่ต่างกันที่อุณหภูมิ 35 °C ของข้าวทั้งสองพันธุ์ อาจบ่งชี้ว่ารากข้าวพันธุ์ KDML105 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าพันธุ์ HKL1 สำหรับการพบ actin ring ที่กระตุ้นด้วยอุณหภูมิ 38 °C เฉพาะใน KDML105 แต่ไม่พบในพันธุ์ HKL1 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องทางกรรมพันธุ์กัน (รูปที่ 8 และ 10) อาจนำไปสู่การศึกษาเชิงเปรียบเทียบเพื่อให้ทราบถึงหน้าที่และความเกี่ยวข้องของ actin ring กับการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงได้

เมื่อเชื่อมโยงการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงของสายแอกตินกับ pH และ alkaline phosphatase จะเห็นได้ว่า extracellular acidification ที่อุณหภูมิ 35 °C ในข้าวพันธุ์ HKL1 (รูปที่ 1 A) อาจเกี่ยวข้องกับการมีแอกตินสายยาวที่เป็นโครงข่ายในชั้นคอร์เทกซ์ของ RBCs ลดลงและเกิด fragmentation ของสายแอกตินส่วนหนึ่ง (รูปที่ 10) สำหรับใน KDML105 นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของทั้งสายแอกตินและ extracellular pH เกิดขึ้นที่อุณหภูมินี้ (รูปที่ 1 A และ 8) ส่วนกิจกรรมของ alkaline phosphatase นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนมากพอที่จะอธิบายเชื่อมโยงไปถึงโครงสร้างแอกตินได้ แม้ว่าจะเป็นที่น่าทึ่งที่การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง acid และ alkaline phosphatase นั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลั่งสารออกนอกเซลล์ หรือ secretion ซึ่งควบคุมโดยสายแอกติน (Pfeiffer, 1996; Chaidee et al., 2008a; Hussey et al., 2006)

ไคโทซานกระตุ้นให้เกิดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์หลายประการ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลาไม่กี่นาที คือ การเพิ่มขึ้นของโปรตอนไอออนและแคลเซียมไอออนภายในไซโทพลาซึม ที่นำไปสู่กระบวนการถ่ายทอดสัญญาณ และการสร้างโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับ hypersensitive response และการฆ่าตัวตายของเซลล์ (Amborabé et al., 2008; Iriti and Faoro, 2009) อย่างไรก็ตาม

ความเกี่ยวข้องของไคโทซานต่อโครงสร้างแอกตินไซโทสเกเลตอนยังมีไม่มากนัก ไคโทซานชักนำให้เกิดการสร้างกรดแอมไซซิก (Iriti and Faoro, 2009) ซึ่งกรดแอมไซซิกนี้ควบคุมการปิดปากใบโดยเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของสายแอกตินไซโทสเกเลตอน (Eun and Lee, 1997; Li et al., 1998; Nick, 1998) ในงานวิจัยนี้ พบว่าไคโทซานมีผลเปลี่ยนแปลงแอกตินไซโทสเกเลตอนแตกต่างไปจากผลของอุณหภูมิสูง กล่าวคือ ไม่พบ actin rings เหมือนที่พบในภาวะอุณหภูมิสูงแม้ว่าทั้งสองกรณีล้วนทำให้เกิด extracellular alkalinization ใน KDML105 (รูปที่ 1 3 9 และ 12) และเซลล์ที่ไม่เสียหายเมื่อได้รับไคโทซานยังคงมีโครงข่ายสายยาวของแอกตินโดยอาจพบลักษณะการเป็นจุดของแอกตินร่วมด้วย ในขณะที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการหักเป็นท่อนสั้นและเป็นจุด เป็นการเปลี่ยนแปลงของแอกตินที่มีรูปแบบเฉพาะตัวและชัดเจนกว่าผลของไคโทซาน (รูปที่ 8-13) หลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของแอกตินไซโทสเกเลตอนมีความไวต่อสิ่งรบกวนนอกเซลล์เป็นอย่างมาก อีกทั้งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงมีความจำเพาะและขึ้นกับชนิดของความเครียดมากกว่า extracellular alkalinization นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับความรุนแรงของไคโทซานที่มีต่อแอกตินไซโทสเกเลตอนในเซลล์รากนั้นไม่เท่ากันในข้าวทั้งสองพันธุ์ รากข้าวพันธุ์ HKL1 ได้รับผลจากไคโทซาน (10 ppm O80 เป็นเวลา 20 นาที) รุนแรงกว่า KDML105 โดยพบว่าสายแอกตินเกิดการหักเป็นท่อนสั้นและจุดทั่วทั้ง RBCs ที่ผลัดออกสู่ของเหลวรอบราก ในขณะที่ไคโทซานไม่มีผลต่อโครงสร้างแอกตินใน RBCs ของรากข้าวพันธุ์ KDML105 ไคโทซานยังมีผลรบกวนโครงสร้างแอกตินใน RBCs ที่ยังคงติดอยู่กับปลายราก และชั้นผิวบริเวณ division zone ของพันธุ์ HKL1 โดยพบว่าแม้จะยังคงมีโครงข่ายสายยาวของแอกตินในชั้นคอร์เทกซ์ของเซลล์ แต่มีความหนาแน่นของโครงข่ายแอกตินลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ได้รับไคโทซาน นอกจากนี้ เซลล์ชั้นผิวบริเวณ elongation zone ของ HKL1 จำนวนมากเกิดการเสียหายไปและไม่ติดสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ แต่มีเพียงเซลล์ชั้นผิวบริเวณ elongation zone บางเซลล์ของ KDML105 ที่แอกตินถูกรบกวนโดยไคโทซาน โดยมีแอกตินเปลี่ยนแปลงไปเป็นจุด บางเซลล์แอกตินยังคงเป็นสายยาวแต่เรียงตัวใกล้กันกลายเป็นเส้นหนาขึ้น (actin bundle) และมีเซลล์ผิวบางเซลล์อยู่ในสภาวะที่ผิดปกติจนไม่ติดสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ อย่างไรก็ตาม เมื่อได้รับไคโทซานนานขึ้น 1-3 ชั่วโมง RBCs ของ KDML105 เกิดการเสียหายมากกว่า 50% (รูปที่ 12-13) การเสียหายของเซลล์ชั้นผิวบริเวณ elongation zone นี้ อาจเกิดเนื่องจากไคโทซานเป็นโมเลกุลที่มีประจุเป็นบวกสามารถทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลบนเยื่อหุ้มเซลล์และส่งผลเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านและสัญญาณของเซลล์ได้ (Amborabé et al., 2008) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลของอุณหภูมิสูงที่พบว่า RBCs ของ HKL1 อ่อนแอต่ออุณหภูมิสูงที่ 35°C มากกว่า KDML105 (รูปที่ 8 และ 10) เมื่อดูผลของการได้รับไคโทซานเป็นเวลา 20 นาทีก่อนที่จะได้รับภาวะอุณหภูมิสูงของรากข้าวพันธุ์ KDML105 พบการเปลี่ยนแปลงของสายแอกตินที่น่าสนใจคือ การหักเป็นท่อนและเป็นจุดของแอกตินใน RBCs และการเกิด actin ring ที่อุณหภูมิ 35°C ในเซลล์ชั้นผิวบริเวณ division zone (รูปที่ 14) การหักเป็นท่อนและเป็นจุดของแอกตินใน RBCs ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีโอกาสสัมผัสกับไคโทซานและอุณหภูมิมากกว่าเซลล์ชั้นผิวของพันธุ์

KDML105 นี้ เหมือนกับลักษณะที่พบใน RBCs ของ HKL1 ที่ได้รับอุณหภูมิ 35-38°C หลักฐานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโคโทซานอาจเพิ่มระดับความเครียดภายในเซลล์มากขึ้นจนมีผลต่อแอกตินคล้ายกับผลของอุณหภูมิ 38°C ลักษณะการหักเป็นท่อนและเป็นจุดน่าจะเป็นความเสียหายของแอกตินเมื่อได้รับโคโทซานและอุณหภูมิสูง จากผลการทดลองทั้งหมดในงานวิจัยนี้และงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Chaidee et al., 2008b) สนับสนุนแนวคิดที่ว่า การเกิด actin ring ในชั้นผิวบริเวณ division zone ซึ่งอยู่ถัดจาก RBCs และมีสารเมือกปกคลุมอีกชั้นหนึ่งในข้าวพันธุ์ KDML105 เป็นขั้นตอนการปรับตัวของแอกตินไซโทสเกเลตอนต่อภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูง

หนังสืออ้างอิง

- Amborabé BE, Bonmort J, Fleurat-Lessard P, Roblin G (2008) Early events induced by chitosan on plant cells. *J Exp Bot* 59: 2317-2324
- Baureithel K, Felix G, Boller T. (1994) Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J Biol Chem* 269: 17931-17938
- Chaidee A, Pfeiffer W (2006) Parameters for cellular viability and membrane function in *Chenopodium* cells show a specific response of extracellular pH to heat shock with extreme Q₁₀. *Plant Biol* 8: 42-51
- Chaidee A, Wongchai C, Pfeiffer W (2008a) Extracellular alkaline phosphatase is a sensitive marker for cellular stimulation and exocytosis in heterotroph cell cultures of *Chenopodium rubrum*. *J Plant Physiol* 165:1655-1666.
- Chaidee A, Foissner I, Pfeiffer W (2008b) Cell-specific association of heat shock-induced proton flux with actin ring formation in *Chenopodium* cells: comparison of auto- and heterotroph cultures. *Protoplasma* 234:33-50.
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, and Scott IM (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol* 116: 1351-1357
- Denison SH (2000) pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol* 29: 61-71.
- de Ruijter NCA, Bisseling T, Emons AMC (1999) Rhizobium Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *MPMI* 12: 829-832
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4095-4098
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorous metabolism. *Physiol Plant* 90: 791-800.
- Eun S-O, Lee Y (1997) Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiol* 115: 1491-1498
- Felle HH (2001) pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biol* 3: 577-591

- Felle HH, Herrmann A, Hückelhoven R, Kogel K-H (2005) Root-to-shoot signaling: apoplastic alkalinization, a general stress response and defence factor in barley (*Hordeum vulgare*). *Protoplasma* 227: 17-24
- Fu Y, Wu G, Yang Z (2001) Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol* 152: 1019-1032
- Hadwiger LA, Beckman JM (1980) Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol* 66: 205–211
- Hamamoto L, Hawes MC, Rost TL (2006) The production and release of living root cap border cells is a function of root apical meristem type in dicotyledonous angiosperm plants. *Annals Bot* 97: 917-923.
- Haruta M, Constabel CP (2003) Rapid alkalinization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells. *Plant Physiol* 131: 814-823
- Hawes MC, Pueppke SG (1986) Sloughed peripheral root cap cells: yield from different species and callus formation from single cells. *American J of Bot* 73: 1466-1473
- Hawes MC, Brigham LA, Wen F, Woo HH, Zhy Y (1998) Function of root border cells in plant health: Pioneers in the rhizosphere. *Annu Rev Phytopathol* 36: 311-327.
- Jagadish SVK, Craufurd PQ, Wheeler TR (2007) High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.) *J Exp Bot* 58: 1627–1635
- Ketelaar T, de Ruijter NCA, Emons AMC (2002) Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* 15: 285-292
- Iriti M, Faoro F (2009) Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signaling & Behavior* 4: 66-68
- Lee S, Choi H, Suh S, Doo IS, Oh KY, Choi EJ, Taylor ATS, Low PS, Lee Y (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* 121: 147–152
- Lee, Y. and Satter, R. L. (1988) Effects of temperature on H⁺ uptake and release during circadian rhythmic movements of excised *Samanea* motor organs. *Plant Physiol* 86: 352–354.
- Li J, Lee Y-RJ, Assmann SM (1998) Guard cells possess a calcium dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. *Plant Physiol* 116:785–795.

- Limpanavech P, Chaiyasuta S, Vongpromek R, Pichyangkura R, Khunwasi C, Chadchawan S, Lotrakul P, Bunjongrat R, Chaidee A, Bangyeekhun T. (2008) Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. *Scientia Hort* 116, 65-72.
- Liu H, Y Du, X Wang, Sun (2004) Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol* 95:147–155.
- Morita N, Nakazato H, Okuyama H, Kim Y, Thompson GA Jr. (1996) Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*. *Biochim Biophys Acta* 1290: 53-62.
- Müller J, Menzel D, Šamaj J (2007) Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress. *Protoplasma* 230: 231-242
- Neumann G, Römheld V (2007) The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In (R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri eds) *The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. 2nd edition. Taylor & Francis Group, LLC. New York, p 23-72.
- Nick P (1998) Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants. *Int Rev Cyt* 184:33–80.
- Ohta K, Morishita S, Suda K, Kobayashi N, Hosoki T (2004) Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. *J Japan Soc Hort Sci* 73: 66–68
- Ortiz C, Cardemil L (2001) Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J Exp Bot* 52: 1711-1719
- Pfeiffer W (1996) Auxin induces exocytosis of acid phosphatase in coleoptiles from *Zea mays*. *Physiol Plant* 98: 773-779
- Pfeiffer W (1998) Expression and low pH increase the activity of an apoplastic acid phosphatase in growing tissues from *Zea mays*. *Physiol Plant* 102: 111-118
- Rachmilevitch S, Lambers H, Huang B (2008) Short-term and long-term root respiratory acclimation to elevated temperatures associated with root thermotolerance for two *Agrostis* grass species. *J Exp Bot* 59: 3803–3809

- Reynolds MP, Ewing EE, Owens TG (1990) Photosynthesis at high temperature in tuber-bearing *Solanum* species: a comparison between accessions of contrasting heat tolerance. *Plant Physiol* 93: 791-797
- Sangwan V, Örvar BL, Beverly J, Hirt H, Dhindsa RS (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of MAP kinase pathways. *Plant J* 31: 629-638
- Sharma AD, Singh N, Kang JK. (2005) Short-term water logging-induced changes in phosphatase activities in shoots and roots of sorghum seedlings: role of phosphatases during waterlogging in relation to phosphorus. *Gen Appl Plant Physiol* 31:71-9.
- Staiger CJ (2000) Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 257-288
- Stratmann J, Scheer J, Ryan CA (2000) Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a β -glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *PNA*s 97: 8862-8867
- Sung D-H, Kaplan F, Lee K-J, Guy CL (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci* 8: 179-187
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Inc. 792pp.
- Waller F, Nick P (1997) Response of actin microfilaments during phytochrome-controlled growth of maize seedlings. *Protoplasma* 200:154–162
- Wen F, VanEtten HD, Tsaprailis G, Hawes MC (2007) Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiology* 143: 773-783
- Zupini A, Baldan B, Million R, Favaron F, Navazio L, Mariani P (2003) Chitosan induces Ca^{2+} - mediated programmed cell death in soybean cells. *New Phytologist* 161: 557-568

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมวิชาการ Botanikertagung 2011 จัดขึ้นที่เมืองเบอร์ลิน ประเทศเยอรมนี ระหว่างวันที่ 18-23 กันยายน 2554 เรื่อง “Actin reorganization in root border cells and epidermal cells of *Oryza sativa* under heat shock”