ชื่อวิทยานิพนธ์ ปฏิกิริยาตอบสนองของแคลลัสยางพาราต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora*
ผู้เขียน นางสาวพันธ์วศรี แสงสุวรรณ
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา ซึ่งทำให้ผลผลิตลดลง ผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยการนำส่วนต่างๆ ของยางพาราซึ่งได้แก่ เมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และ RRIM600 และข้อปล้องพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 รวมทั้งนำเทคนิคทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาชักนำให้เกิดแคลลัส จากยางพาราพันธุ์ดังกล่าวซึ่งมีระดับความต้านทานต่างๆ กัน แล้วนำมาทดสอบด้วยเชื้อรา *P. palmivora* เป็นการทดลองแบบ *in vitro* เพื่อศึกษาปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิติน (Scp) ซึ่งเป็นไฟโต-อเล็กซินของยางพารา จากการทดลองเมื่อให้แคลลัส, เมล็ดอ่อนและข้อปล้องทำปฏิกิริยากับซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้น 5×10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าซูโอสปอร์จากเชื้อราสามารถกระตุ้นแคลลัส,เมล็ดอ่อนและข้อปล้องให้มีการสังเคราะห์ Scp ในยางพันธุ์ต้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ นั่นคือปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp แปรผันตรงกับระดับความต้านทานโรคของยางพารา

อิลิซิติน (elicitin) ที่เตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ สามารถเตรียมให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านคอลัมน์ PD-10 ตามลำดับ แล้วทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Tricine SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าอิลิซิตินเป็นโปรตีนขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน เมื่อนำอิลิซิตินมากระตุ้นแคลลัส, เมล็ดอ่อนและข้อปล้องพบว่าอิลิซิตินสามารถกระตุ้นทั้งแคลลัส, เมล็ดอ่อนและข้อปล้องให้มีการสังเคราะห์ Scp ในพันธุ์ต้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ เมื่อศึกษาปริมาณการสังเคราะห์ Scp ในแคลลัสเมล็ดอ่อน (ใช้เป็นตัวแทนของแคลลัสยางพารา) หลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินพบว่าแคลลัสพันธุ์ต้านทาน (GT1) มีการสร้าง Scp มากกว่าแคลลัสพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และมีอัตราเร็วในการสร้าง Scp สูงกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ รวมทั้งทำให้เกิดการตายของเซลล์ (cell death) ได้เร็วกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ จากการศึกษาสารสกัดของแคลลัสทั้งสองพันธุ์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินและซูโอสปอร์ พบว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 มีการสะสมโปรตีน, เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากกว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 แต่ปริมาณโปรตีนและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ไม่ชัดเจนนัก ในขณะที่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ใช้บอกความแตกต่างได้ชัดเจนมากกว่า และยังพบว่าอิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้แคลลัสทั้งสองพันธุ์มีการสร้างโปรตีน, เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้มากกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ จากการย้อมแอคติวิตีของสารสกัดแคลลัสเมล็ดอ่อน สามารถตรวจพบแถบไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดส 1 และ 2 แถบจากแคลลัสพันธุ์ GT1 และ RRIM600 ตามลำดับ แต่ไม่พบแถบไอโซโซม์ในชุดควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับการสังเคราะห์ Scp พบว่า หลังจากถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินแคลลัสมีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ซึ่งให้ผลการทดลองที่ตรงข้ามกับการสังเคราะห์ Scp ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นสูงมากจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิตินใช้ Scp เป็นสับสเตรตจึงทำให้มี Scp ในระดับต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแคลลัส, เมล็ดอ่อนและข้อปล้องพันธุ์ต่างๆ มีการตอบสนองต่อเชื้อราชนิดนี้ได้ต่างกัน และพบว่าการทดสอบโดยใช้แคลลัสสามารถลดความแปรปรวนได้มากกว่าการทดสอบในเมล็ดอ่อนและข้อปล้องจึงเป็นวิธีที่มีประโยชน์ และควรพัฒนาเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางให้มีความต้านทานโรคในระบบ *in vitro* ต่อไป

Thesis Title	Defense Response of *Hevea* Calluses to *Phytophthora palmivora*
Autor	Miss Phanvasri Sangsuwan
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

Abstract

Rubber tree infected with *Phytophthora palmivora*, a pathogen of rubber tree, causes secondary leaf fall and black stripe leading to a decrease of latex production. Defense response of *Hevea* explants was investigated using immature seed of two *Hevea* cultivars (GT1 and RRIM600) and internodal stem of five *Hevea* cultivars (BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 and RRIM600), which were different in their susceptibilities to this pathogen. Calluses and organs of these cultivars inoculated with zoospores of the fungus *in vitro* were established as a suitable system for studying the accumulation of *Hevea* phytoalexin namely scopoletin. The results showed that the speed and extent of scopoletin biosynthesis were associated with the resistance of calluses, immature seed and internodal stem to this pathogen.

Elicitin from the fungal culture filtrate was partially purified by ammonium sulfate precipitation, followed by chromatography on PD-10. It was a protein of MW ca 10 kDa as determined by Tricine SDS-PAGE and stained with silver nitrate. After elicitin treatment, levels of scopoletin biosynthesis in *Hevea* calluses were higher in resistant than in susceptible cultivars. When integument-derived calluses of GT1 (resistant) and RRIM600 (susceptible) were used as plant materials for studying the scopoletin biosynthesis, the accumulation of this phytoalexin was also associated with the resistance of *Hevea* calluses when treated with zoospores and elicitin of this pathogen. The level of scopoletin was lower when treated with elicitin however, the rate of its scopoletin production was higher than that treated with zoospores which lead to cell death after 24 hours. Crude extracts of *Hevea* calluses treated with zoospores and elicitin revealed that the accumulation of total protein, β-1, 3-glucanase and peroxidase in GT1 were higher than those in RRIM600 calluses. The amount of total protein and β-1,

3-glucanase were not clearly different between cultivars whereas peroxidase activity could significantly distinguish. Furthermore, elicitin treatment could induce the biosynthesis of β -1, 3-glucanase and peroxidase a much higher than zoospores inoculation. One band of peroxidase was found from the crude extract of GT1 and two bands from RRIM600 calluses as determined by SDS-PAGE and activity staining which were not detected in the controls. On the other hand, scopoletin level after elicitin treatment was lower than that after zoospore inoculation which was different from peroxidase production. The opposite detection may be due to a very high level of peroxidase after elicitin treatment can use scopoletin as substrate.

It can be conclude that different cultivars of *Hevea* calluses, immature seed and internodal stem showed different responses to zoospores and elicitin treatment, but variation observed in *Hevea* calluses were less than those detected in immature seed and internodal stem. Therefore the former method should be developed and used to distinguish the resistance of rubber cultivar *in vitro*.