รายงานการวิจัย

ผลของไคโตซานต่อระดับของโมเลกุลส่งสัญญาณ (SA, JA และ ABA) และการแสดงออกของ marker genes ในระบบป้องกันตนเองของยางพารา

Effect of chitosan on the levels of signaling molecules (SA, JA and ABA) and expression of marker genes in defense system of *Hevea brasiliensis*

รศ.ดร.นันทา เชิงเชาว์

ดร.นิอร จิรพงศธรกุล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2557 – 2558

บทคัดย่อ

Abscisic acid (ABA) เป็นฮอร์โมนพืช ที่นอกจากมีบทบาทสำคัญในพืช ได้แก่ ควบคุมการเจริญเติบโต การงอกของเมล็ด และการเปิดปิดของปากใบแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อ abiotic stress และมีหลักฐานยืนยันว่า ABA มีส่วนเกี่ยวข้องใน plant-pathogen interaction อย่างไรก็ตามบทบาทของ ABA ต่อการต้านทานโรค ยังมีข้อขัดแย้งกันอยู่ โดยมีความซับซ้อนและแตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิดของพืชและชนิดของเชื้อก่อโรคนั้น ๆ สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้เมื่อพ่นใบของยางพาราต้นอ่อนด้วย ABA ความเข้มข้น 50 µM พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนของโปรตีนรวม ตลอดจนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเอง ได้แก่เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL), catalase (CAT) และ peroxidase (POD) ส่วนเอนไซม์ที่มีการเพิ่มขึ้นไม่ชัดเจนนัก คือ polyphenol oxidase (PPO) นอกจากนี้ ABA ยังกระตุ้นให้ใบยางพาราสังเคราะห์ลิกนินและแคลโลสเพิ่มขึ้นด้วย การเพิ่มขึ้นของสารและเอนไซม์ต่าง ๆ ข้างต้น น่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ยางพาราติดเชื้อ *Phytophthora palmivora* ลดลง หลัง treat ด้วย 50 µM ABA

Innate immunity ในพืชสามารถกระตุ้นได้เช่นเดียวกับในสัตว์ โดยเกิดจากการจดจำชิ้นส่วนของเชื้อก่อโรค (pathogen associated molecular pattern, PAMP) ด้วย pattern recognition receptor (PRR) ของพืช ไคโตซานเป็นสารที่คล้ายคลึงกับ PAMP จึงสามารถชักนำระบบ immunity ในพืชได้ จากรายงานที่ผ่านมาเมื่อพืชได้รับไคโตซานจะส่งผลให้มีการสร้าง ABA เพิ่มขึ้น และกระตุ้นให้มีการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเอง ได้แก่ H_2O_2, ไฟโตอเล็กซิน, ลิกนิน และแคลโลส รวมทั้งกระตุ้นให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ PAL, POD และ PPO เพิ่มขึ้น สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ หลังจากพ่นใบยางด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.2 % พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเองเพิ่มขึ้น ได้แก่ PAL ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์ salicylic acid (SA) และ สารตั้งต้นที่จะนำไปสู่การสร้าง scopoletin (Scp) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินที่พบในยางพารา ดังนั้นหลัง treat ด้วยไคโตซาน พบว่ามีระดับของ SA และ Scp สูงขึ้นจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ CAT และ POD ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม H_2O_2 scavenger เพิ่มขึ้น แสดงว่าไคโตซานส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ H_2O_2 เช่นเดียวกับที่มีการศึกษาในพืชอื่น และยังพบว่าไคโตซานทำให้ใบยางมีการสร้างลิกนินและแคลโลสเพิ่มขึ้นด้วย เอนไซม์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อพ่นใบยางด้วยไคโตซาน คือ PPO ซึ่ง

ไม่เป็นไปตามที่รายงานไว้ในพืชอื่น อย่างไรก็ตามไคโตซานส่งผลให้ยางพาราติดเชื้อ *P. palmivora* ลดลงชัดเจนกว่าการ treat ด้วย ABA จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ ABA ที่ 3 ชั่วโมงหลังการ treat และมีการเพิ่มขึ้นของ SA ที่ 12 ชั่วโมง คือเพิ่มขึ้นหลังจากที่ ABA ลดลง จึงอาจกล่าวได้ว่า ABA และ SA เป็น antagonist กัน จะเห็นได้ว่าระดับของ ABA เพิ่มขึ้นหลังการ treat ด้วยไคโตซาน ดังนั้น internal ABA ที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ PAL, CAT และ POD รวมทั้ง ลิกนิน และแคลโลส ซึ่งคล้ายคลึงกับการ treat ด้วย ABA จากภายนอก (external ABA)

ในระบบป้องกันตนเอง ฮอร์โมนพืชสามารถทำหน้าที่ได้ 2 ด้าน คือ เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณให้พืชเกิดระบบป้องกันตนเองโดยผ่านทางการแสดงออกของยีน และ เป็น abiotic elicitor ฮอร์โมนพืชที่สำคัญ ได้แก่ SA, jasmonic acid (JA), ethylene (ET) และ ABA โดย SA มีบทบาทหลักในระบบป้องกันตนเองของพืชแบบ systemic acquired resistance (SAR) ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย biotrophic pathogen ส่วนอีกระบบคือ induced systemic resistance (ISR) ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย necrotrophic pathogen โดยระบบนี้มี JA และ ET เป็นโมเลกุลหลักในการส่งสัญญาณ ส่วน ABA มีบทบาทหลักในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายนอกของพืชเมื่อได้รับสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น ความแห้งแล้ง โดยมีหน้าที่ควบคุมการเปิดปิดของปากใบ และการสร้างแคลโลส เพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อโรค แม้โมเลกุลส่งสัญญาณเหล่านี้มีบทบาทหลักที่แตกต่างกัน แต่ก็มีการทำงานที่สัมพันธ์กันทั้งในแง่ต่อต้านและส่งเสริมซึ่งกันและกันตามที่รายงานไว้ในพืชอื่น เช่น ABA และ SA ในระบบป้องกันตนเองของพืชเป็นแบบต่อต้านกัน (antagonistic interaction) ส่วนคู่ ABA-JA มีทั้งที่เป็นแบบส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน (synergistic) และแบบยับยั้งการทำงานซึ่งกันและกัน ความสัมพันธ์ระหว่าง ABA และ JA ในกระบวนการป้องกันตนเองของพืชนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อก่อโรค, พืชที่ทำการศึกษา และสภาวะการกระตุ้น สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้เนื่องจากการวัดระดับของ JA ด้วย HPLC ไม่ประสบความสำเร็จ แม้ว่าจะสามารถอนุโลมโดยใช้การแสดงออกของยีน *COI1* แทนได้ แต่ผลการทดลองก็ยังไม่ชัดเจนเพียงพอที่จะยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลส่งสัญญาณต่าง ๆ ได้ เพียงแต่มีแนวโน้มว่าคู่ ABA-SA เป็น antagonist กัน เช่นที่มีรายงานในพืชอื่น ส่วนคู่ ABA-JA ยังไม่อาจสรุปได้ตาม condition ที่ศึกษาในครั้งนี้

Abstract

Abscisic acid (ABA) is a plant hormone which controls plant growth, seed germination and stomatal aperture. It has also been shown to modulate plant responses to abiotic stresses and evidence has pointed to the involvement of ABA in plant-pathogen interactions. However, the direct influence of ABA on plant responses to pathogen attacks remains controversial. The role of ABA in plant disease resistance is complex and varies among different types of plant pathogen interactions. In this study, total protein including activities of enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL), catalase (CAT) and peroxidase (POD) were obviously induced after treated rubber (*Hevea brasiliensis*) leaves with 50 µM ABA, however not significant induction for polyphenol oxidase (PPO). The 50 µM ABA also enhanced the accumulations of lignin and callose in rubber leaves. Furthermore, higher resistance to *Phytophthora palmivora* was detected after the treatment, this should be resulted from the inductions of defense responses mentioned above.

Innate immunity can be induced, in plants as in animals, by the recognition of pathogen associated molecular pattern (PAMP) through specific pattern recognition receptor (PRR) of plant. Chitosan can act as a PAMP, able to trigger a long lasting immunity in plants. According to previous reports, chitosan caused an induction of ABA. It also induced H_2O_2, phytoalexin, lignin and callose including activities of PAL, POD and PPO. For this research, salicylic acid (SA) and scopoletin (Scp), phytoalexin of rubber tree, were detected at higher levels than controls after treated rubber leaves with 0.2 % chitosan. The activity of enzymes PAL, CAT and POD including amounts of lignin and callose were also enhanced. The activity of PPO was relatively the same, however resistace to *P. palmivora* was obviously induced and even higher than those treated with ABA. According to HPLC measurement, level of ABA was peaked at 3 hours while SA was peaked at 12 hours (after the reduction of ABA), this may infer that ABA and SA mediated antagonistic reactions.

Chitosan caused the accumulation of internal ABA and the defense reactions caused by chitosan were similar to the external ABA application, therefore the responses mentioned above could be resulted from the internal ABA.

In plant immune system, plant hormone has 2 roles as a signal molecule controlling defense responses through gene expression and as a abiotic elicitor. SA, jasmonic acid (JA), ethylene (ET) and ABA are the main plant hormones that involve in plant immunity. SA was identified as a regulator in systemic acquired resistance (SAR) which is induced by biotrophic pathogen while JA and ET are the main signal molecules of induced systemic resistance (ISR) which is mediated by necrotrophic pathogen. ABA participates in plant structural change to environment stresses such as drought to control stomatal aperture avoiding the pathogen penetration. Even though these signal molecules possess different roles, for some conditions they can act synergistic or antagonistic. Generally, ABA and SA are antagonists while the ABA and JA could be either synergistic or antagonistic depend on the type of pathogen and the type of affected plant. For this study, the level of JA measured by HPLC was not successful. Even though the expression level of *COI1* could refer to the level of JA, the gene expression patterns were not obvious enough to conclude the network of these signal melecules. The obtained results inferred that the ABA and SA were antagonists as reported in other plants, however the interactions between ABA and JA can not be identified under this investigation.