ชื่อวิทยานิพนธ์ ปฏิกิริยาการตอบสนองของยางพาราต่อซูโอสปอร์และอิลิซิตินจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

ผู้เขียน นางเมธินี รัตรสาร

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

Phytophthora palmivora (Butler) เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพาราซึ่งทำให้ผลผลิตลดลง เชื้อราในกลุ่มนี้ยังก่อให้เกิดโรครากต้น และผลเน่าในพืชอื่น ๆ อีกร้อยกว่าชนิดได้แก่ สับปะรด มะละกอ ส้ม มะเขือเทศ และทุเรียน ใบยางที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้จะสร้าง phytoalexin ซึ่งเรืองแสงได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC และ HPLC พบว่าสารเรืองแสงคือ scopoletin (Scp) และเมื่อศึกษาด้วยวิธี spectrofluorophotometer พบว่าปริมาณและอัตราเร็วในการสะสม scopoletin (Scp) มีความสัมพันธ์แปรผันกับระดับความต้านทานของใบยาง กล่าวคือพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) สามารถสร้าง Scp ในปริมาณและอัตราเร็วที่สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และพบว่า Scp ที่ผลิตขึ้นมาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้โดยมีค่า I_{50} ประมาณ 1 มิลลิโมลาร์ ในขณะเดียวกันจะสังเกตเห็นการตายของเซลล์ตรงตำแหน่งที่วางสปอร์ของเชื้อรา โดยใบยางพันธุ์ต้านทานเกิดเป็นจุดสีดำเรียกว่า hypersensitive cell death ส่วนพันธุ์อ่อนแอลักษณะแผลเป็นรอยไหม้มีสีน้ำตาลและแผ่วงกว้างออกไปซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค (disease lesion) นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถกระตุ้นให้ใบยางสร้าง pathogenesis related-proteins หรือ PR-proteins (β-1,3-glucanase and chitinase) และลิกนินเพิ่มขึ้น โดยพบว่าปริมาณและอัตราเร็วในการสะสม PR-proteins และลิกนิน มีความสัมพันธ์กับระดับความต้านทานของใบยางด้วย ท็อกซินจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อราถูกเตรียมให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-50 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าท็อกซินดังกล่าวเป็นโปรตีนขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 ดาลตัน หลังจากวิเคราะห์หา amino acid compositions และ N-terminal sequences พบว่าท็อกซินที่ได้เป็นโปรตีนในกลุ่ม elicitins และให้ชื่อว่า palmivorein โปรตีนกลุ่มนี้ตรวจพบได้ใน *Phytophthora* สายพันธุ์อื่น ๆ ด้วยได้แก่ *P. capsici* *P. cactorum* และ *P. parasitica*

เมื่อนำท็อกซินบริสุทธิ์มากระตุ้นใบยางพบว่าปฏิกิริยาตอบสนองของใบยางต่อท็อกซินสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้จากการปลูกเชื้อลงบนใบยางด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อราโดยตรงกล่าวคือเกิด hypersensitive cell death ในพันธุ์ต้านทานและเกิด disease lesion ในพันธุ์อ่อนแอ และพบว่าการสร้าง Scp, PR-proteins และลิกนินในพันธุ์ต้านทานถูกกระตุ้นให้มีการสร้างในอัตราที่สูงกว่าและเร็วกว่าในพันธุ์อ่อนแอ นอกจากนี้ elicitin สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง mRNA ของไคติเนสในใบยางพันธุ์ต้านทานมากขึ้นแสดงว่าการกระตุ้นเกิดขึ้นในระดับ transcription เนื่องจากท็อกซินเป็นโปรตีนจึงทำให้ควบคุมปริมาณได้ง่ายกว่าการนับสปอร์และสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาตอบสนองของใบยางได้เร็วกว่า (ภายใน 24 ชม.) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการกระตุ้นปฏิกิริยาตอบสนองในยางพารา โดยใช้ลักษณะของรอยไหม้ รวมทั้งปริมาณของ Scp, PR-proteins และลิกนินซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยสปอร์และ/หรือท็อกซินของเชื้อราเป็นตัวบ่งชี้ในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora* ได้

Thesis Title	Defense Responses of *Hevea brasiliensis* Against Zoospores and Elicitin from *Phytophthora palmivora*
Author	Mrs. Matinee Rattarasarn
Major Program	Biochemistry
Academic year	2002

Abstract

Phytophthora palmivora (Butler) is a pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) which causes secondary leaf fall and black stripe leading to the decrease of rubber latex. It also causes root, stem and fruit rot on more than a hundred plant species, including pineapple, papaya, orange, tomato and durian. Rubber leaves produced a blue fluorescent phytoalexin (observed under UV light) after inoculation with zoospores of the fungus. The fluorescent compound was identified as scopoletin (Scp), hydroxycoumarin, on analyses by TLC and HPLC. The speed and extent of scopoletin accumulation measured by a spectrofluorophotometer were positively correlated with the resistant degree of rubber leaves to the pathogen. Scp exhibited a fungitoxic effect on the fungus with an I_{50} value of about 1.0 mM. Necroses detected on two rubber clones after spore inoculation were obviously different. The lesions in the resistant clone (BPM-24) were black and did not extend out of the treated zones as a consequence of hypersensitive cell death. In contrast, the necroses of the susceptible clone (RRIM600) were brown and expanded as a disease lesion. In addition, the accumulation of pathogenesis-related proteins or PR-proteins (β-1,3-glucanase and chitinase and lignin in were also associated with the resistance of rubber leaves to the fungus. Toxin from the culture filtrates of the fungus was purified by ammonium sulfate precipitation, followed by chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G-50. It was a protein of MW ca 10,000 daltons as determined by SDS-PAGE and stained with silver nitrate. The analyses of amino acid compositions and N-terminal sequences indicated that the toxin from this fungus is an elicitin, and named as palmivorein.

The proteins in elicitin family were also detected in other *Phytophthora* spp. such as *P. capsici, P. cactorum* and *P. parasitica.* The necrotic lesions caused by purified toxin were similar to those caused by spore inoculation. The accumulation of Scp, PR-proteins and lignin induced by toxin were highly produced in the resistant clone. Furthermore, the expression of PR-protein encoding gene (chitinase) was induced in the resistant clone after elicited with the elicitin. Therefore, the induction took place at the transcriptional level. The quantity of applied toxin was not only more precise than that of zoospore but it also induced defense reactions much more rapidly (within 24 hours). Therefore, the differences in characteristics of lesions, the levels of Scp, PR-proteins and lignin accumulation after zoospore inoculation and/or toxin treatment can be used as parameters in the selection of rubber clones resistant to *P. palmivora*.