ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกยางพันธุ์ต้านทานจากเชื้อพันธุ์ (germplasm) โดยใช้ซูโอสปอร์และท็อกซินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*
ผู้เขียน นางสาวนารถธิดา รอดโพธิ์ทอง
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

Phytophthora palmivora เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพาราส่งผลให้ผลผลิตลดลง การทดสอบใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์และท็อกซิน (อิลิซิติน) จากเชื้อราดังกล่าวที่นำมาทดสอบ สามารถคัดเลือกพันธุ์ยางที่มีความต้านทานต่อโรคได้ 6 พันธุ์จาก 17 เชื้อพันธุ์ (germplasm) ใบยางที่บ่มด้วยซูโอสปอร์ทำให้เห็นความแตกต่างของสิ่งกีดขวางทางกายภาพ (physical barrier) และสิ่งกีดขวางทางเคมี (chemical barrier) โดย physical barrier ดูได้จากจำนวนแผลที่ถูกเจาะด้วยซูโอสปอร์ผ่านผนังเซลล์ของใบยางซึ่งมีผลต่อลักษณะของสายรา, การเกิดสปอร์แรงเจียมและรูปแบบการสร้างสคอพอลิติน (ไฟโตอเล็กซินของใบยางพารา) ที่แตกต่างกันในใบยางแต่ละพันธุ์ ส่วน chemical barrier ดูได้จากปริมาณสคอพอลิตินและลิกนินที่แตกต่างกัน โดยพบว่าในหนึ่งตำแหน่งที่ถูกเจาะใบยางมีความสามารถในการสร้างสคอพอลิตินแปรตามระดับความต้านทาน และสคอพอลิตินมีผลในการยับยั้งการสร้างสายราและสปอร์แรงเจียมด้วย จากลักษณะทั้งหมดที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้มีขนาดของรอยไหม้ (นีโครซีส) ที่ไม่เท่ากัน โดยใบยางพันธุ์ต้านทานเกิดเป็นจุดสีดำขนาดเล็กเรียกว่า “ hypersensitive cell death ” พันธุ์ปานกลางเกิดเป็นรอยไหม้สีน้ำตาลแผ่กว้างแต่มีขอบเขตที่ชัดเจนกว่าพันธุ์อ่อนแอที่รอยไหม้มีลักษณะแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆอย่างไม่มีขอบเขตซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค (disease lesion) นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถกระตุ้นให้ใบยางสร้างลิกนินได้ โดยพบว่าปริมาณลิกนินมีแนวโน้มแปรผันตามระดับความต้านทานของใบยางด้วย

สำหรับอิลิซิตินจากน้ำเลี้ยงเชื้อราถูกเตรียมให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ PD-10 เมื่อตรวจความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าอิลิซิตินเป็นแถบโปรตีนหลักมีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน เมื่อนำอิลิซิตินมากระตุ้นใบยางพาราทำให้เห็นความแตกต่างของ chemical barrier ในใบยางแต่ละพันธุ์ด้วยการแสดงออกในลักษณะการสร้างสคอพอลิตินภายในเซลล์ใบ เป็นการแสดงถึงความสามารถที่แท้จริงในการสร้างสคอพอลิติน ที่สามารถอธิบายได้โดยอาศัยสมมุติฐานเกี่ยวกับ resistant (R) และ susceptible (S) receptor ที่ว่าระดับความต้านทานแปรผันตามปริมาณของ R receptor โดยที่ R receptor มีสัมพรรคภาพ (affinity) สูงกว่า S receptor การจับกับ R receptor ส่งผลให้เกิดการตอบสนองแบบ hypersensitive ในขณะที่ระดับความอ่อนแอแปรผันตามปริมาณ S receptor และการจับอิลิซิตินทำให้เกิดอาการของโรค นอกจากนี้การสร้างลิกนินก็มีแนวโน้มแปรผันตามปริมาณสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ของใบยางแต่ละพันธุ์

การจัดลำดับความต้านทานที่ได้จากการบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์และการกระตุ้นด้วยอิลิซิตินสามารถจัดเป็นระดับคะแนน จนสามารถคัดเลือกพันธุ์ยางที่มีระดับความต้านทานสูงได้ เนื่องจากการทดลองด้วยอิลิซิตินจะควบคุมปริมาณได้ง่ายกว่าการนับ ซูโอสปอร์และสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาการตอบสนองของใบยางทางเคมีได้โดยตรง (ไม่ได้รับผลกระทบทางกายภาพ) จึงเหมาะจะนำมาใช้ในการกระตุ้นปฏิกิริยาการตอบสนองใบยางพารา เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางที่ต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora* ได้

Thesis Title	Selection of *Hevea* Resistant clones from Germplasm by Zoospores and Toxin of *Phytophthora palmivora*
Author	Miss Narttida Rodpothong
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

Abstract

Phytophthora palmivora is a pathogen of rubber tree (*Hevea brasilliensis*) which causes secondary leaf fall and black stripe leading to the decrease of latex production. Six resistant rubber clones were selected from seventeen germplasms by treating their *Hevea* leaves with zoospores and elicitin of the fungus. Inoculation with zoospores showed the differences of physical and chemical barriers of rubber leaves. The physical barrier was observed from the numbers of lesion penetrated by zoospores through *Hevea* cell wall which affected the character of mycelium, sporangial production and pattern of scopoletin (Scp) biosynthesis (phytoalexin of rubber tree). Whereas chemical barrier was detected from the different levels of Scp and lignin produced in each rubber clone. The capability of Scp biosynthesis in one penetration site was associated to the degree of resistance. In addition, the synthesized Scp had an inhibiting effect on mycelial and sporangial productions. Different size of necrosis was the sum of all of the mentioned actions. The lesions in the resistant clones were small – black – spot called " hypersensitive cell death ". The necroses of semi-resistant clones were brown and expanded out but less than that of the susceptible ones of which the necroses expanded out as disease lesions. Furthermore, the fungus could

induce the biosynthesis of lignin in rubber leaves which varied according to the degree of resistance.

Elicitin from the fungal culture filtrate was partially purified by ammonium sulfate precipitation, followed by the chromatography on PD-10. It was a protein of MW ca. 10 Kd as determined by SDS-PAGE and stained with silver nitrate. The difference in chemical barrier, which was expressed as the level of Scp induced by elicitin in leaf cells, was explained by the hypothesis involving resistant (R) and susceptible (S) receptors. Degree of resistance may vary according to the quantity of R receptor in which the R receptor had higher affinity than the S receptor. The binding with R receptor precedes the hypersensitive responses. Whereas susceptibility may link with the quantity of S receptor and this binding will lead to the symptom of disease. In addition, the biosynthesis of lignin induced by elicitin in each rubber clone varied in parallel to the quantity of Scp produced by leaf cells.

The order of resistant clones were presented by scoring according to the necrotic sizes caused by zoospores and Scp levels induced by elicitin. The quantity of applied elicitin was not only more precise than that of spore concentration but it also directly induced chemical response without the effect of physical barrier. Therefore, this method was appropriate for use in classification of resistant rubber clones.