ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของอิลิซิตินและซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ต่อใบยางพารา พันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600)

ผู้เขียน นางสาวนิลุบล บุญหวังช่วย

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

Phytophthora botryosa เป็นเชื้อราซึ่งก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา ผลเสียที่ตามมาคือทำให้ผลผลิตลดลง จากการทดลองบ่มใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อรา พบว่าใบยางมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อราชนิดนี้โดยการสังเคราะห์สารเรืองแสงใต้แสงยูวี เรียกว่าสคอพอลิติน (scopoletin) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินที่พบในยางพารา จากการวัดหาปริมาณสคอพอลิตินที่เวลาต่างๆกันโดยวิธี spectrofluorometry พบว่าปริมาณและอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิตินแปรผันตามความต้านทานของใบยาง นั่นคือพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) สามารถสร้างสคอพอลิตินในปริมาณและอัตราเร็วที่สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ในขณะที่มีการสร้างสคอพอลิตินจะสังเกตเห็นการตายของเซลล์ตรงตำแหน่งที่วางสปอร์ของเชื้อรา โดยใบยางพันธุ์ต้านทานเกิดรอยไหม้ (necrosis) สีดำที่มีขอบเขตชัดเจนตามลักษณะของ hypersensitive cell death ส่วนพันธุ์อ่อนแอเกิดรอยไหม้สีน้ำตาลและแผ่วกว้างออกไปซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค (disease lesion) นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถกระตุ้นให้ใบยางสร้าง pathogenesis related-proteins (PR-proteins) เช่น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสเพิ่มขึ้นด้วย โดยพบว่าปริมาณและอัตราเร็วในการสร้าง PR-proteins แปรผันตามระดับความต้านทานของใบยางเช่นกัน ในการย้อมแอคติวิตีพบว่าใบยางชุดควบคุมพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) ตรวจพบไคติเนส 3 ไอโซไซม์ (X, Y และ Z) ส่วนใบยางพันธุ์ RRIM600 ตรวจพบไคติเนส 2 ไอโซไซม์ (X และ Y) แต่หลังจากบ่มด้วยเชื้อราพบว่าไอโซไซม์ Y และ Z มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในขณะที่ไอโซไซม์ X มีปริมาณลดลง การที่ไอโซไซม์ Z ตรวจพบเฉพาะในใบยางพันธุ์ต้านทานเท่านั้นอาจบ่งบอกว่าไอโซไซม์ Z เป็นไอโซไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการต้านทานโรคในยางพารา นอกจากนี้จากผลการวิจัยพบว่ามีการสร้างลิกนินในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานสูงกว่าพันธุ์อ่อนแออย่างชัดเจน

สำหรับอิลิซิติน (elicitin) ที่ได้จากน้ำเลี้ยงของเชื้อราชนิดนี้ สามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-50 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าอิลิซิตินที่ได้เป็นโปรตีนขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน เมื่อนำอิลิซิตินมากระตุ้นใบยางพบว่าการตอบสนองของใบยางต่ออิลิซิตินสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้จากการบ่มใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อราโดยตรง กล่าวคือเกิด hypersensitive cell death ในพันธุ์ต้านทานและเกิด disease lesion ในพันธุ์อ่อนแอ และพบว่าอิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินและ PR-proteins ในพันธุ์ต้านทานสูงกว่าในพันธุ์อ่อนแอ โดยอิลิซิตินจะถูกควบคุมปริมาณได้ง่ายกว่าการนับสปอร์และสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาตอบสนองของใบยางได้เร็วกว่า (ภายใน 24 ชั่วโมง) ด้วย ดังนั้นลักษณะรอยไหม้ ปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินและ PR-proteins รวมถึงการสร้างลิกนินซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และ/หรืออิลิซิตินของเชื้อราชนิดนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. botryosa* ได้

Thesis Title	Effect of Elicitin and Zoospores of *Phytophthora botryosa* on Leaves of Resistant (BPM-24) and Susceptible (RRIM600) Clones of *Hevea brasiliensis*.
Author	Miss Nilubon Boonwangchoay
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2002

Abstract

Phytophthora botryosa is a pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). It causes secondary leaf fall and black stripe which leads to the decrease of rubber latex. Rubber leaves produced a blue fluorescence phytoalexin (observed under UV light) after inoculation with spores of this fungus. The blue fluorescence compound was identified as scopoletin (a phytoalexin produced by *Hevea*). According to the measurement by spectrofluorometer, the speed and extent of scopoletin biosynthesis were associated with the resistance of rubber leaves to this pathogen. Necroses detected on two rubber clones after spore inoculations were obviously different. The lesion in the resistant clone (BPM-24) was black and did not extend out of the treated zone due to a hypersensitive cell death. In contrast, the necrosis was brown and expanded as a disease lesion in the susceptible clone (RRIM600). In addition, biosyntheses of PR-proteins (beta1,3-glucanase and chitinase) were also associated with the resistance of rubber leaves to this fungus. A resistant clone produced the two enzymes more rapidly and lasted longer than a susceptible clone. Three isozymes (X,Y,Z) and two isozymes (X,Y) of chitinase were observed in the control leaves of BPM-24 and RRIM600 clones, respectively. The isozymes Y and Z were increased by fungal infection whereas the isozymes X was decreased after inoculation. The isozymes Z which appeared only in the BPM-24 may be responsible for the resistance of *Hevea*. The amount of lignin was also detected in the BPM-24 clone at a much higher level than in the RRIM600 clone.

Elicitin was purified from the culture filtrate of *P. botryosa* by ammonium sulfate precipitation, then chromatographed on DEAE-cellulose and Sephadex G-50. It is a protein of MW ca 10 kilodaltons as determined by Tricine-SDS-PAGE and stained with silver nitrate. The necrotic lesions caused by purified elicitin were similar to those caused by spore inoculation. Biosyntheses of scopoletin and PR-proteins induced by elicitin were also linked to the resistance of the rubber clone. The quantity of applied elicitin was not only more precise than that of spore but it also induced defense reactions much more rapidly (within 24 hours). Therefore, the different character of lesions, the levels of scopoletin and PR-proteins after spore inoculation and/or elicitin treatment can be used as parameters in screening of resistant rubber clone.