รายงานการวิจัย

ปฏิกิริยาตอบสนองของยางพาราต่อท็อกซินจากเชื้อรา *Phytophthora* spp.

Hevea defense reactions against toxins of *Phytophthora* spp.

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รศ. ดร. นันทา เชิงเชาว์

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2543 - 2544

สมอ
เลขหมู่ QK495.D5b4 N63 2545 ฉ.1
Bib Key 228207

บทคัดย่อ

Phytophthora spp. (*P. palmivora* และ *P. botryosa*) เป็นเชื้อราซึ่งก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา ผลเสียที่ตามมาคือทำให้ผลผลิตลดลง เชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* ยังก่อให้เกิดโรคราก ต้น และผลเน่าในพืชอื่น ๆ อีกร้อยกว่าชนิด ได้แก่ สับปะรด มะละกอ ส้ม มะเขือเทศและทุเรียน หลังจากบ่มด้วยเชื้อราทั้งสอง ใบยางจะสร้าง phytoalexin ซึ่งเรืองแสงได้ภายใต้แสง UV เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC และ HPLC พบว่าสารเรืองแสงคือ scopoletin (hydroxycoumarin) หลังจากวัดหาปริมาณ scopoletin (Scp) ที่เวลาต่าง ๆกันโดยวิธี Spectrofluorometry พบว่าปริมาณและอัตราเร็วในการสะสม Scp แปรผันตามระดับความต้านทานของใบยาง นั่นคือพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) สามารถสร้าง Scp ในปริมาณและอัตราเร็วที่สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ในขณะที่มีการสร้าง Scp จะสังเกตเห็นการตายของเซลล์ตรงตำแหน่งที่วางสปอร์ของเชื้อรา โดยใบยางพันธุ์ต้านทานเกิดรอยไหม้ (necrosis) สีดำที่มีขอบเขตชัดเจนตามลักษณะของ hypersensitive cell death ส่วนพันธุ์อ่อนแอเกิดรอยไหม้สีน้ำตาลและแผ่วกว้างออกไป ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค (disease lesion) นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถกระตุ้นให้ใบยางสร้าง PR-proteins (เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส) เพิ่มขึ้นด้วย โดยพบว่าปริมาณและอัตราเร็วในการสะสม PR-proteins ก็แปรผันตามระดับความต้านทานของใบยางด้วย ท็อกซินจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อราทั้งสองถูกเตรียมให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-50 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าท็อกซินดังกล่าวเป็นโปรตีนขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันคือประมาณ 10,000 ดาลตัน จากการวิเคราะห์หา N-terminal sequences และ amino acid compositions สรุปได้ว่าท็อกซินจากเชื้อราทั้งสองเป็นโปรตีนในกลุ่ม elicitins โปรตีนกลุ่มนี้ตรวจพบได้ใน *Phytophthora* สายพันธุ์อื่น ๆด้วย เช่น *P. capsici* *P. cactorum* และ *P. parasitica* เมื่อนำท็อกซินมากระตุ้นใบยาง พบว่าปฏิกิริยาตอบสนองของใบยางต่อท็อกซิน สอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้จากการบ่มใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อราโดยตรง กล่าวคือเกิด hypersensitive cell death ในพันธุ์ต้านทานและเกิด disease lesion ในพันธุ์อ่อนแอ กระตุ้นให้มีการสร้าง Scp และ PR-proteins ในพันธุ์ต้านทานสูงกว่าและเร็วกว่าพันธุ์อ่อนแอ โดยท็อกซินจะถูกควบคุมปริมาณได้ง่ายกว่าการนับสปอร์และสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาตอบสนองของใบยางได้เร็วกว่า (ภายใน 24 ชม.) ดังนั้นลักษณะของรอยไหม้ รวมทั้งปริมาณของ Scp และ PR-proteins ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อราและ/หรือท็อกซินสามารถใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora* spp.ได้

Abstract

Phytophthora spp. (*P. palmivora* and P. *botryosa*) are pathogens of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). They cause secondary leaf fall and black stripe which leads to the decrease of rubber latex. The fungi in this genus also cause root, stem and fruit rot on more than a hundred plant species, including pineapple, papaya, orange, tomato and durian. Rubber leaves produced a blue fluorescence phytoalexin (observed under UV light) after inoculation with spores of these fungi. The fluorescense compound was identified as scopoletin (hydroxycoumarin) by TLC and HPLC methods. According to the measurement by spectrofluorometer, the speed and extent of scopoletin (Scp) accumulation was associated with the resistance of rubber leaves to these pathogens. Necroses detected on two rubber clones after spore inoculations were obviously different. The lesions in the resistant clone (BPM-24) were black and did not extend out of the treated zones as a hypersensitive cell death. In contrast to the susceptible clone (RRIM600), the necroses were brown and expanded as a disease lesion. In addition, the accumulations of PR-proteins (beta 1,3-glucanase and chitinase) were also associated with the resistance of rubber leaves to these fungi. Toxins were purified from the culture filtrates of the two fungi by ammonium sulfate precipitation, then chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G-50. Both are proteins of MW ca 10,000 daltons as determined by Tricine-SDS-PAGE and stained with silver nitrate. The amino acid compositions and N-terminal sequences concluded that the toxins from both fungi are elicitins. 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 toxins were similar to those caused by spore inoculations. The accumulations of Scp and PR-proteins induced by toxins were also linked to the resistance of rubber clone. The quantity of applied toxin 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 Scp and PR-proteins after spore inoculation and/or toxin treatment can be used as parameters in screening of resistant rubber clone.