ชื่อวิทยานิพนธ์	ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา
ผู้เขียน	นางสาวนุรอามาลี ดีนามอ
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

Phytophthora palmivora เป็นเชื้อราซึ่งก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา ผลเสียที่ตามมา คือ ทำให้ผลผลิตลดลง ผู้วิจัยได้กระตุ้นใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ซึ่งมีความต้านทานต่างกันด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ พบว่า ในพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) ทำให้เกิดรอยไหม้ (necrosis) สีน้ำตาลแบบแผ่กว้าง ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค (compatible reaction) ส่วนพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) รอยไหม้จะมีขอบเขตชัดเจนสีน้ำตาลเข้มแบบ hypersensitive cell death ซึ่งเป็นลักษณะของ incompatible reaction นอกจากนี้ซูโอสปอร์สามารถกระตุ้นใบยางให้สร้างสคอพอลิติน (ไฟโตอเล็กซินของยางพารา) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ใช้โพลิเมอร์ไรซ์สารฟีนอลิก) และลิกนิน (เพิ่มความแข็งแรงให้ผนังเซลล์) ในปริมาณที่สร้างแปรผันตามระดับความต้านทานของใบยาง กล่าวคือมีการสร้างในใบยางพันธุ์ BPM-24 มากกว่าใบยางพันธุ์ RRIM600 การศึกษากลไกการป้องกันโรคของใบยางทั้งสองพันธุ์ที่สภาวะการเกิดปฏิกิริยาใกล้เคียงกัน จะต้องใช้วิธีการตัดใบ แล้วแช่ในซูโอสปอร์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ตามลำดับ โดยวิธีการแช่ชิ้นใบยางสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร ในซูโอสปอร์ความเข้มข้นดังกล่าว 1 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่น พบว่า ในน้ำที่แช่ใบยางมีการสะสมสคอพอลิตินสูงสุด 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกที่ 12 ชั่วโมง และครั้งที่ 2 ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งที่ 12 ชั่วโมง พันธุ์ BPM-24 จะมีการสะสมสคอพอลิตินสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 5 เท่า จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายราได้ดีกว่า ส่วนค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบของพันธุ์ BPM-24 มากกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 2.2 เท่า วิธีแช่ใบถือเป็นวิธีที่รุนแรงมาก ทำให้ใบยางทั้งสองพันธุ์เกิดโรค (compatible) จึงพบปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบลดลง เนื่องจากเซลล์ใบแตก จนปล่อยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมาในน้ำแช่ใบจำนวนมาก เพื่อลดความรุนแรงของโรคจึงใช้วิธีการวางชิ้นใบ (ขนาด 1x1 ตารางนิ้ว) บนกระดาษกรองชื้น ซึ่งกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีค่าสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เมื่อใช้วิธีที่ลดความรุนแรงลงและใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรท พบว่า ในพันธุ์ BPM-24 มีการสร้างปริมาณเอนไซม์

เปอร์ออกซิเดสและลิกนินสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 2 และ 1.43 เท่า ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกถึงระดับความต้านทานโรคของยางพาราได้ ในใบยางที่กำลังติดเชื้อมีการสะสมสารฟีนอลิก ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและพบว่าสามารถกำจัดได้ด้วยคอลัมน์ PD-10 เมื่อตรวจสอบไอโซไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสแบบ native PAGE และ SDS-PAGE พบแถบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิดอะซิดิก 3 ไอโซไซม์ (X, Y และ Z) โดยไม่พบไอโซไซม์ Y ในชุดควบคุม แสดงว่าไอโซไซม์ Y เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค และน่าจะเป็นไอโซไซม์ที่ทำหน้าที่โพลิเมอร์ไรซ์องค์ประกอบของ hydroxycinnamyl alcohol ให้เป็นลิกนิน เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ เพราะไอโซไซม์ Y สามารถย้อมติดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยสับสเตรทที่เป็นตัวตั้งต้นของการสร้างลิกนิน ได้แก่ guaiacol, coniferyl alcohol และ syringaldazine หลังติดเชื้อมีการสร้างสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น เพื่อกำจัด H_2O_2 และสคอพอลิตินที่มากเกินพอซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์พืชด้วย ผู้วิจัยพบว่าไอโซไซม์ Y ยังย้อมติด *o*-dianisidine และสคอพอลิติน ซึ่ง *o*-dianisidine ใช้ตรวจวัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั่วไปไม่จำเพาะเจาะจง ส่วนสคอพอลิตินจำเพาะกับไอโซไซม์ Y ด้วย แสดงว่าสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดสอาจซ้อนทับกับเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการสร้างลิกนิน

Thesis Title	Peroxidase Isozymes that Involve in *Hevea* Defense Response
Author	Miss Nuramalee Deenamo
Major Programe	Biochemistry
Academic Year	2004

Abstract

Phytophthora palmivora is a pathogen of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), causes secondary leaf fall and black stripe leading to a decrease of rubber latex. Necroses on two rubber leaf cultivars with difference in degree of resistance inoculated with zoospores of this fungus were obviously different. The yellowish brown and expanded lesions in RRIM600 (susceptible cultivar) or disease lesions indicated a compatible reaction. In contrast, the necroses in resistant cultivar, BPM-24, did not extend out of the treated zones and became dark brown as hypersensitive cell death indicating an incompatible reaction. In addition to the distinguishable lesions, accumulation of scopoletin (Scp, phytoalexin produced by *Hevea*), level of peroxidases and biosynthesis of lignin were also associated with the resistance of rubber leaves to this fungus. In order to obtain the maximal defense responses of both cultivars, leaves of both rubber cultivars were cut into pieces (2x2 cm^2) and soaked for 1 hour in different zoospore concentrations of *P. palmivora* ; at $1x10^7$ and $5x10^7$ zoospores/ml for RRIM600 and BPM-24, respectively, then placed in distilled water. Scp accumulation appeared as two peaks (at 12 and 48 hours after inoculation) during the defence process. The first peaks of Scp and peroxidase activity produced by BPM-24 were higher (5 and 2.2 folds, respectively) than those by RRIM600. The soaking method, which was more violent and led both rubber leaf cultivars to the compatible reaction, resulted in a decrease of peroxidase activities. In order to reduce the harmful reaction, leaf discs (1x1 $inch^2$) were presoaked with zoospore solution and then placed on moist paper. Total peroxidase activity in BPM-24 was induced continuously and reached the highest level at 96 hours which was greater than that in RRIM600. With this method, peroxidase

activity and lignin biosynthesis in BPM-24 were found higher (2 and 1.43 folds, respectively) than those in RRIM600. Phenolic compounds, which could be separated by PD-10 column, were found to accumulate in infected rubber leaves and they were able to inhibit peroxidase activity. The analyses of peroxidase isozymes by native PAGE and SDS-PAGE showed three acidic isozymes : X, Y and Z. Only isozyme Y was undetected in control leaves, indicating the relation of this isozyme to defense response. This isozyme may involve in polymerization hydroxycinnamyl alcohol to form lignin because it could be stained by guaiacol, coniferyl alcohol and syringaldazine (precusors of lignin biosynthesis). Furthermore, the isozyme Y was stained by *o*-dianisidine (a general substrate) and scopoletin (specific substrate for Scp peroxidase). The Scp peroxidase was induced to detoxify the high level of H_2O_2 and Scp that are harmful to plant cells as well. Thus, there may be many isoforms overlapping in the isozyme Y.