

รายงานการไปเพิ่มพูนความรู้ทางวิชาการ

เรื่อง



ไฟโตอเล็กซินจากยางพาราซึ่งถูกกระตุ้นโดยเชื้อรา
ไฟทอปทอราพาลมิโวรา

**Phytoalexin from *Hevea* induced by
*Phytophthora palmivora***

Order Key	24933
BIB Key	168999

สง.อ

เลขหมู่	QK495.E9 3663 2542
เลขทะเบียน	2 พ.อ. 2542

ผศ.ดร.นันทา เขิงเขาว์
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1 มิถุนายน พ.ศ. 2541-30 พฤษภาคม พ.ศ. 2542

บทคัดย่อ

Phytophthora palmivora เป็นเชื้อราซึ่งก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา ผลเสียที่ตามมาคือทำให้ผลผลิตลดลง นอกจากนี้เชื้อราดังกล่าวยังก่อให้เกิดโรคราก ต้น และ ผลเน่าในพืชอื่น ๆ อีกกว่าชนิด ได้แก่ สับปะรด มะละกอ ส้ม มะเขือเทศ และ ทุเรียน หลังจาก inoculate ด้วยสปอร์ของเชื้อราตัวนี้ ใบยางจะสร้าง phytoalexin ซึ่งเรืองแสงได้ใต้แสง UV เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC และ HPLC พบว่าสารเรืองแสงคือ scopoletin (hydroxycoumarin) หลังจากวัดหาปริมาณของ scopoletin (Scp) ที่เวลาต่าง ๆ กันโดยวิธี spectrofluorometry พบว่าอัตราเร็วในการสร้างและปริมาณ (Scp) ที่สะสม แปรผันตามระดับความต้านทานของใบยางซึ่งสอดคล้องกับการ inoculate ใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioedes* และ *Microcyclus ulei* แต่ให้ผลตรงกันข้ามเมื่อทดลองกับเชื้อรา *Corynespora cassiicola* Scp สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora* และเชื้อราอื่น ๆ ซึ่งก่อให้เกิดโรคในใบยาง ได้แก่ *P. botryosa* และ *C. cassiicola* โดยมีค่า I_{50} เท่ากับ 1.3, 1.2 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ที่ออกซินจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ซึ่งมีความเป็นพิษต่อใบยางสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม และผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose & Sephadex G50 ตามลำดับ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าที่ออกซินดังกล่าวเป็นโปรตีนขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 ดาลตัน เมื่อนำที่ออกซินมากระตุ้นใบยางสองพันธุ์ที่มีความต้านทานต่างกัน พบว่าทำให้เกิดรอยไหม้ (necrosis) ได้เช่นเดียวกับการ inoculate ใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อราโดยตรง และขนาดของรอยไหม้ในพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) จะมีขอบเขตชัดเจนสีน้ำตาลเข้มแบบ hypersensitive response ซึ่งเป็นลักษณะของ incompatibility ส่วนพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) รอยไหม้ไม่มีขอบเขตที่ชัดเจน มีสีน้ำตาลอ่อนซึ่งเป็นลักษณะของ compatible reaction ความแตกต่างดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองด้วยสปอร์ นอกจากนี้ที่ออกซินบริสุทธิ์สามารถกระตุ้นใบยางให้สร้าง Scp ได้เช่นเดียวกัน โดยปริมาณที่สร้างได้แปรผันตามระดับความต้านทานของใบยางและให้ผลชัดเจนเช่นเดียวกับการทดลองด้วยสปอร์ ดังนั้นลักษณะของรอยไหม้และปริมาณของ Scp ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยสปอร์และ/หรือที่ออกซิน สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora* ได้ นอกจากนี้ที่ออกซินดังกล่าวอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานของพืชชนิดอื่น ซึ่งเป็น host ของเชื้อราตัวนี้ได้

Abstract

Phytophthora palmivora is a pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). It causes secondary leaf fall and black stripe which leads 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 fluorescence phytoalexin (observed under UV light) after inoculation with spores of this fungus. The fluorescence 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 this pathogen. The result was correlated to Scp accumulation after infection *Hevea* leaves with *Colletotrichum gloeosporioides* and *Microcyclus ulei* but opposite results was obtained with *Corynespora cassiicola*. Scp exhibited a fungitoxic effect on *P. palmivora* and the other *Hevea* leaf pathogens : *P. botryosa* and *C. cassiicola* with I_{50} values of 1.3, 1.2 and 2.0 mM, respectively. Toxin was purified from the culture filtrate of *P. palmivora* by ammonium sulfate precipitation, then chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G50. It is a small protein of MW ca 10,000 daltons as determined by SDS-PAGE and stained with silver nitrate. The necrotic lesions on rubber leaves caused by purified toxin were similar to the ones did by spore inoculation. The lesions in BPM-24 (resistant) clone did not extend out of the treated zones and their colours were dark brown as usual hypersensitive response which indicate an incompatibility. In contrast to the RRIM600 (susceptible) clone, lesions were expanded and their colours were yellowish brown which indicate a compatible reaction. The different appearance of the lesions between two rubber clones was correlated to the result obtained by spore inoculation. The accumulation of Scp after toxin treatment was also associated with the resistance of rubber leaves to this fungus. Therefore, the different character of lesions and the level of Scp after spore inoculation and/or toxin treatment can be used as parameters in screening of resistant rubber clone. In addition, the toxin may be applicable for screening other plant species which are the hosts of this pathogen.