

26 MAY 1999



**STUDIES ON SPECIFIC MOLECULAR MARKERS OF  
TAPPING PANEL DRYNESS (TPD) IN *HEVEA BRASILIENSIS***

**UNCHERA SOOKMARK**

**With compliments  
of**  
ศิริกนกนที

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

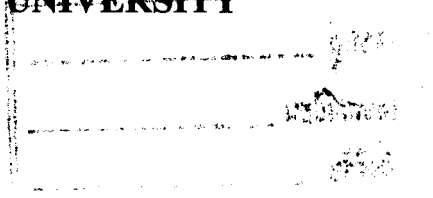
1999

ISBN 974-661-924-1

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
L54b  
1999  
C.2

310055 C.1



3936500 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

KEYWORD : *HEVEA BRASILIENSIS* / LATEX/ RUBBER TREE / TAPPING  
PANEL DRYNESS / TPD

UNCHERA SOOKMARK : STUDIES ON SPECIFIC MOLECULAR  
MARKERS FOR TAPPING PANEL DRYNESS (TPD) IN *HEVEA BRASILIENSIS*.

THESIS ADVISOR : JARUNYA NARANGAJAVANA D.Agr.Sc., SKORN  
MONGKOLSUK Ph.D., CHINDA NAIYANERT M.Sc.,175 p. ISBN 974-661-924-1

Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major economic crop of Thailand. It frequently happens in *Hevea* plantation that the latex production of certain tree becomes abnormally low or nonexistent. This spontaneous drying up of the tapping cut is so called Tapping Panel Dryness (TPD). The syndrome seems to be a physiological disorder which can occur spontaneously by natural, but in most case can be induced by the over-exploitation of rubber tree (overtapping and/or overstimulation). This disease often seriously affected the rubber yield since the plants are no longer tapped. The purposes of this present work were to identify and characterize the specific molecular markers for TPD and try to develop the method for early diagnosis TPD tree in the field.

The latex from TPD tree exhibited accumulation of a 15 kDa protein (PDF 15) and 22 kDa protein (PDF 22) and also a *de novo* expression of a 29 kDa protein (PDF 29) in the latex cytosol. The compartment analysis suggested that PDF 15 and PDF 22 are normally bound to the rubber particle membrane. Partial amino acid sequences of PDF 15, PDF 22 and PDF 29 had homology to rubber elongation factor (REF), Hev b 3 and patatin, respectively. The PCR cloning of these three proteins were performed by using cDNA from rubber latex as template and used as probes. There was no significant difference in gene expression observed between healthy and TPD trees, indicating that the TPD-related accumulation of these three proteins was not due to transcriptional regulation mechanism. The preliminary ELISA tests using PDF 15 antibody with the pooled latex cytosol was successfully discriminate between healthy and TPD trees. The ELISA tests on a large scale and with individual sample need to be developed because the contamination of rubber particle in cytosol sample interferes the quantification.

3936500 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อัญชิวรา สุขมาก : การศึกษาโปรตีนบ่งชี้จำเพาะของโรคเปลือกแห้งในยางพารา (STUDIES ON SPECIFIC MOLECULAR MARKERS FOR TAPPING PANEL DRYNESS (TPD) IN *HEVEA BRASILIENSIS*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จรัญญา ณรงค์ชวณะ D.Agr.Sc., ศกรณ มงคลสุข Ph.D. , จินดา นัยเนตร M.Sc.175 หน้า ISBN 974-661-924-1

การปลูกยางพาราซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มักประสบปัญหาเรื่องโรคของต้นยาง โดยเฉพาะโรคเปลือกแห้ง (Tapping Panel Dryness -TPD) ทำให้ผลผลิตลดลงหรือหยุดให้ผลผลิต สาเหตุของอาการเปลือกแห้งยังไม่ปรากฏหลักฐานแน่ชัด เพียงแต่สรุปว่าเป็นความผิดปกติทางสรีรวิทยาซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ นอกจากนั้นอาจชักนำให้เกิดอาการเปลือกแห้งได้โดยการกรีดเอาน้ำยางออกมากเกินไป หรือการใช้น้ำยากกระตุ้นให้น้ำยางไหลมากเกินไป และถ้าปล่อยให้ต้นยางเป็นโรคเปลือกแห้งจนกระทั่งเกิดอาการเปลือกแห้งแบบถาวร จะทำให้ต้องตัดต้นยางทิ้งโดยไม่สามารถทำการกรีดยางได้อีก โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโปรตีนบ่งชี้จำเพาะที่เกี่ยวข้องกับโรคเปลือกแห้ง และพัฒนาวิธีตรวจสอบโรคเปลือกแห้ง ในต้นยางก่อนที่ต้นยางจะเกิดอาการเปลือกแห้งแบบถาวร

จากการศึกษาพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15 และ 22 kDa (PDF 15, PDF 22) ซึ่งมักจะ overexpress ในต้น TPD เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ และพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 29 kDa (PDF 29) ซึ่งจะ express เฉพาะในต้น TPD เท่านั้น นอกจากนั้นพบว่า PDF 15 และ PDF 22 เป็นโปรตีนที่พบในส่วนของ rubber particle จากการตรวจสอบลำดับ amino acid ของ PDF 15, PDF 22 และ PDF 29 พบว่ามีความคล้ายคลึงสูงสุดกับลำดับ amino acid ของ rubber elongation factor (REF), Hev b3 และ patatin ตามลำดับ และได้ทำการ clone cDNA fragment ของโปรตีนทั้งสามและใช้เป็น probe ในการศึกษาการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้อง จากการศึกษพบว่า การแสดงออกของยีน PDF 15, PDF 22 และ PDF 29 ในต้น TPD และต้นปกติไม่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้ทราบว่า การสะสมของโปรตีนทั้งสามในต้น TPD ไม่ได้ถูกควบคุมที่ระดับ transcription นอกจากนั้นได้ทดลองพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคเปลือกแห้งโดยเทคนิค ELISA โดยใช้ antibody ที่มีความจำเพาะต่อ PDF 15 และ PDF 22 พบว่า ELISA ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นปกติ และต้น TPD ได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของ rubber particle ใน cytosol ของน้ำยาง ซึ่งจะต้องพัฒนาวิธีที่เหมาะสมต่อไป