4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมอิลิซิตินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*

ในการเตรียมอิลิซิตินจากเชื้อรา *P. botryosa* ในอาหารเหลวสูตร PDB พบว่าอิลิซิตินมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและคงที่หลังจากเลี้ยงประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นจะค่อยๆลดลงเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 เดือน เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 90% พบว่ามีปริมาณอิลิซิตินเริ่มต้น 134.3±5.9 มิลลิกรัม คิดเป็น 100% จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา 1 ลิตร จากนั้นนำไปกำจัดเกลือออกด้วยคอลัมน์ PD-10 พบว่ามีปริมาณอิลิซิตินเหลือ 125.3 ± 4.0 มิลลิกรัม คิดเป็น 93.3 % จากปริมาณเริ่มต้น และเมื่อทำอิลิซิตินให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose พบว่ามีปริมาณอิลิซิตินเท่ากับ 72.5 ± 10.4 มิลลิกรัม คิดเป็น 54.0% จากปริมาณเริ่มต้น ในการทำอิลิซิตินให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-50 พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 15.8 ± 3.4 มิลลิกรัม คิดเป็น 11.8% จากปริมาณเริ่มต้น ก่อนนำไปใช้งานจริงนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหิดแห้งอีกครั้ง จะได้สารละลายอิลิซิติน 3.0 มิลลิกรัม เมื่อนำสารละลายอิลิซิตินที่ได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยอาศัยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอสแล้วย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าสารละลายอิลิซิตินที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P.botryosa* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตันเช่นเดียวกับอิลิสซิตินในเชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* อื่นๆ เท่าที่มีรายงาน ได้แก่ cryptogein จาก *P. cryptogea*, capsicein จาก *P. capsici*, paraciticein จาก *P. parasitica* และ palmivorein จาก *P. palmivora* เป็นต้น (Ricci *et al.*, 1989; Nespoulous *et al.*, 1992; Churngchow and Rattarasarn., 2000) จะเห็นว่าอิลิซิตินต่างๆจะมีชื่อตามสปีชีส์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ชื่ออิลิซิตินตามชื่อสปีชีส์ของเชื้อรา *P. botryosa* ว่า botryosein

การทดลองนี้หาปริมาณโปรตีนรวมของสารละลายที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนโดยวิธีกรดไบซินโคนินิกแทนวิธีแบรดฟอร์ด เนื่องจากเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบกันพบว่าปริมาณโปรตีนรวมมีค่าต่างกันประมาณ 10 เท่า แสดงว่าสารละลายแบรดฟอร์ดไวต่ออิลิซิตินจากน้ำเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ค่อนข้างต่ำซึ่งสอดคล้องกับการหาปริมาณโปรตีนของ palmivorein (Churngchow and Rattarasarn, 2000) จากการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ palmivorein พบว่ามีกรดอะมิโนชนิดเบส เช่น ไลซีนน้อยมาก จึงทำให้มีความไวต่อ Bradford reagent ต่ำ ชี้ให้เห็นว่าอิลิซิตินจากเชื้อราชนิดนี้ (botryosein) น่าจะเป็นอิลิซิตินในกลุ่มแอลฟา (α-class) แม้ว่าจะยังไม่ได้ยืนยันผลด้วย N-terminal, amino acid composition, และ

isoelectric point (pI) แต่ botryosein ก็สามารถจัดเป็น α-elicitin ได้ เนื่องจากที่ pH 7.0 botryosein จับกับ DEAE-cellulose column แสดงว่ามีค่า pI ต่ำกว่า 7.0

จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa* ในอาหารเหลวที่เหมาะสมเชื้อราชนิดนี้จะสามารถผลิตโปรตีนหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular protein) ซึ่งเรียกชื่อโดยรวมว่า อิลิซิติน (elicitin) โดยสามารถตรวจพบได้ในน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) (Nespoulous *et al.* 1992; Huet *et al.*, 1992; Huet and Pernollet, 1993) อิลิซิตินเป็นโปรตีนพิษโมเลกุลมีขนาดเล็กน้ำหนักประมาณ 10 กิโลดาลตัน มีสมบัติเป็นอิลิซิเตอร์ นั่นคือ สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองในพืช ได้แก่ การสะสมไฟโตอเล็กซิน การสังเคราะห์ PR-proteins และการตายของเซลล์หรือนีโครซีส เป็นต้น โดยจัดเป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์เนื่องจากเป็นสารที่ได้มาจากเชื้อโรค (Darvill and Albersheim, 1984)

จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *P. botryosa* จะสร้างและหลั่งอิลิซิตินออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อราได้ในปริมาณที่มากกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ เห็นได้จากแถบของโปรตีนที่ทำโพลีอะคริลาไมล์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส ซึ่งพบแถบของอิลิซิตินสีเข้มและหนาทึบกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆอย่างชัดเจนแสดงว่าโปรตีนหลักที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตออกมาในน้ำเลี้ยงคืออิลิซิติน ดังนั้นถ้าต้องการนำอิลิซิ-ตินจากเชื้อราชนิดนี้ไปใช้ในการทดสอบกับพืชเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองก็อาจเตรียมง่ายๆ โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อรามาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 90% จากนั้นนำไปกำจัดเกลือออกด้วยคอลัมน์ PD-10 ก็สามารถนำไปใช้ทดสอบได้เลย แต่ทั้งนี้การเตรียมเชื้อรา *P. botryosa* ให้บริสุทธิ์และการย้ายโคโลนีของเชื้อรานี้ลงบนอาหารเหลวต้องปราศจากการปนเปื้อน

4.2 การศึกษานิโครซีสหลังจากกระตุ้นใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินที่เตรียมได้จากเชื้อรา *P. botryosa*

เมื่อปลูกเชื้อรา *P. botryosa* บนใบยางพาราทั้งสองพันธุ์พบว่า นิโครซีสที่เกิดขึ้นจากการเจาะใบยางด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้แตกต่างกันอย่างชัดเจนในทุกความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้ในการทดลอง โดยนิโครซีสในใบยางพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) จะมีขนาดเล็กและมีขอบเขตของบาดแผลที่ชัดเจนแสดงถึงความสามารถในการกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ส่วนนิโครซีสในใบยางพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) มีขนาดใหญ่และแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ แสดงถึงการเกิดโรคคือ ไม่สามารถกักบริเวณเชื้อได้ สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

ดังนั้นอาการนิโครซีสที่เกิดจากการตอบสนองของใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ต่อเชื้อราก่อโรคชนิดนี้สามารถใช้บอกระดับความต้านทานโรคของยางพาราได้ นั่นคือ ระดับความต้านทานแปรผกผันกับขนาดของนิโครซีสซึ่งขนาดของนิโครซีสระหว่างพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) กับพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าเพิ่มปริมาณของเชื้อรามากขึ้นเรื่อยๆ ระดับความต้านทานโรคก็จะลดลง อย่างไรก็ตามพันธุ์ต้านทานก็ยังคงมีขนาดของนิโครซีสที่เล็กกว่าพันธุ์อ่อนแอ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองของใบยางพาราต่อเชื้อรา *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasarn, 2001) นั่นคือขนาดของแผลนิโครซีสระหว่างพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) กับพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้

จากผลการศึกษานิโครซีสบนใบยางพาราทั้งสองพันธุ์หลังจากกระตุ้นด้วยอิลิซิติน พบว่านิโครซีสที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิตินมีลักษณะใกล้เคียงกับการบ่มด้วยสปอร์ กล่าวคือพันธุ์ต้านทานเห็นขอบเขตชัดเจนและมีสีเข้มกว่าพันธุ์อ่อนแอแต่มีขนาดของบาดแผลที่เล็กกว่า และนิโครซีสในใบยางทั้งสองพันธุ์ไม่มีการลุกลามออกไปเรื่อยๆเหมือนการติดเชื้อ คือไม่แปรผันตามเวลาที่ใช้ทดสอบ แต่ถ้าหากเพิ่มปริมาณของอิลิซิตินที่ใช้กระตุ้น ขนาดของนิโครซีสก็จะโตขึ้นด้วย แสดงว่าขนาดของนิโครซีสแปรผันตามความเข้มข้นของอิลิซิติน แม้ว่าการทดลองนี้จะใช้บอกระดับความต้านทานโรคของยางพาราได้ไม่ชัดเจนเท่ากับการบ่มด้วยสปอร์ แต่ลักษณะของนิโครซีสที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยอิลิซิตินก็ได้แสดงให้เห็นว่าอิลิซิตินจากเชื้อราชนิดนี้มีสมบัติเป็นอิลิซิเตอร์ (elicitor) นั่นคือสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองในพืช โดยเกิดการตายของเซลล์หรือนิโครซีสนั่นเองเช่นเดียวกับ palmivorein ซึ่งเป็นอิลิซิตินที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ที่สามารถทำให้ใบยางพาราและใบยาสูบเกิดนิโครซีสและทำให้เกิดอาการเหี่ยวด้วย (Churngchow and Rattarasarn, 2000) แสดงว่าอิลิซิตินที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราเป็น

ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิด hypersensitive cell death ในพันธุ์ต้านทานและทำให้เกิดโรคในพันธุ์อ่อนแอ ดังนั้นลักษณะและขนาดของนีโครซีสซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินสามารถใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. botryosa* โดยซูโอสปอร์จะให้ผลการทดลองที่ชัดเจนกว่า

4.3 การศึกษาการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินหลังจากกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินที่เตรียมได้จากเชื้อรา *P. botryosa*

เมื่อทำการปลูกเชื้อรา *P. botryosa* ลงบนใบยางทั้งสองพันธุ์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินชนิดที่พบในยางพารา (Garcia *et al.*, 1995) จากการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของซูโอสปอร์สูง (5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และระดับกลาง (1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) สามารถสังเกตเห็นสารเรืองแสงได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และ 8 ตามลำดับโดยใบยางพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) จะสังเกตเห็นสารเรืองแสงได้ก่อนและชัดเจนกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของซูโอสปอร์ต่ำ (5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) จะเริ่มเห็นการเรืองแสงเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 10-12 ชั่วโมง โดยใบยางพันธุ์ต้านทานเรืองแสงได้ก่อนและชัดเจนกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอเช่นกันและเมื่อเวลาผ่านไปทั้งสามความเข้มข้นจะมีสารเรืองแสงเพิ่มมากขึ้นจนไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยตาเปล่า ส่วนผลจากการบ่มใบยางทั้งสองพันธุ์ด้วยอิลิซิตินพบว่าที่ความเข้มข้นของอิลิซิติน 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเท่านั้นที่สามารถเห็นสารเรืองแสงได้อย่างชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 4-8 ชั่วโมงแต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ และที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเห็นสารเรืองแสงน้อยมาก เมื่อเวลาผ่านไปทั้งสามความเข้มข้นของอิลิซิตินจะสังเกตเห็นการเรืองแสงลดลงอย่างชัดเจน

จากการวัดหาปริมาณโดยวิธี spectrofluorometry พบว่าที่สปอร์ความเข้มข้นระดับต่ำ ใบยางพันธุ์ต้านทานมีแนวโน้มในการสังเคราะห์สคอพอลิตินทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ได้ค่อนข้างใกล้เคียงกับใบยางพันธุ์อ่อนแอ แต่ในบางการทดลองผู้วิจัยเคยพบว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอถูกกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าพันธุ์ต้านทานเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะซูโอสปอร์สามารถเจาะเข้าไปในผิวใบของใบยางพันธุ์อ่อนแอได้มากกว่าใบยางพันธุ์ต้านทานเนื่องจากใบยางพันธุ์อ่อนแอมีเนื้อใบที่บางกว่าใบยางพันธุ์ต้านทานหรือที่ความเข้มข้นนี้อาจยังไม่เพียงพอที่จะทำให้ใบยางพันธุ์ต้านทานเกิด defense response ส่วนที่ความเข้มข้นระดับกลางและสูงใบยางพันธุ์ต้านทานสามารถสังเคราะห์สคอพอลิตินได้สูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแออย่างชัดเจน

ประมาณ 2 เท่า และมีอัตราเร็วในการสร้างที่สูงกว่าด้วย ดังนั้นการเลือกใช้จำนวนซูโอสปอร์ในการทดลองเป็นข้อควรระวังที่สำคัญอย่างหนึ่ง เพราะหากเลือกใช้จำนวนซูโอสปอร์ไม่เหมาะสมอาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนและเข้าใจการสังเคราะห์สคอพอลิตินดังกล่าวผิดพลาดได้ ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ถ้าใช้ปริมาณของซูโอสปอร์น้อยเกินไป ใบยางพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) จะตอบสนองต่อเชื้อราได้น้อย แต่ถ้าใช้ปริมาณซูโอสปอร์ที่เหมาะสมใบยางพาราพันธุ์ต้านทานจะตอบสนองโดยการสังเคราะห์สคอพอลิตินในปริมาณที่มากกว่าและมีอัตราเร็วในการสังเคราะห์ที่สูงกว่า เพื่อให้สามารถควบคุมเชื้อไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อควบคุมเชื้อได้แล้วการสังเคราะห์สคอพอลิตินมีแนวโน้มที่จะลดลง ในขณะที่ใบยางพันธุ์อ่อนแอมีอัตราเร็วและปริมาณในการสังเคราะห์ที่ต่ำกว่า แต่เนื่องจากไม่สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้เพราะฉะนั้นการสังเคราะห์สคอพอลิตินจึงยังคงมีต่อไปเรื่อยๆ แสดงว่าการสังเคราะห์สคอพอลิตินในใบยางพาราทั้งสองพันธุ์สามารถบอกระดับความต้านทานโรคของยางพาราได้ ซึ่งสอดคล้องกับการบ่มใบยางด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioedes* และ *M. ulei* (Garcia *et al.*, 1995) และการศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินของใบยางเมื่อบ่มใบยางด้วยเชื้อรา *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasarn, 2001) แต่ให้ผลตรงข้ามเมื่อทดลองกับเชื้อรา *C. cassiicola* (Breton *et al.*, 1997) และถ้าใช้ปริมาณซูโอสปอร์มากเกินไป ใบยางพาราพันธุ์ต้านทานก็จะตอบสนองต่อเชื้อราเหมือนกับใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ นั่นคือระดับความต้านทานโรคของยางพาราจะลดลง (Churngchow and Rattarasarn, 2001)

ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณการสร้างสคอพอลิตินจากการกระตุ้นใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ด้วยอิลิซิตินพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของอิลิซิตินที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสร้างสคอพอลิตินเช่นกันซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าต้องใช้อิลิซิตินเข้มข้นระหว่าง 1-2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยใบยางพันธุ์ต้านทานสามารถสร้างสคอพอลิตินได้สูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอประมาณ 2 เท่า และมีอัตราเร็วในการสร้างที่สูงกว่าด้วย ดังนั้นการกระตุ้นใบยางด้วยอิลิซิตินของเชื้อราชนิดนี้สามารถบอกระดับความต้านทานโรคของยางพาราได้เช่นกัน อิลิซิตินจากเชื้อราชนิดนี้สามารถกระตุ้นหรือชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองในพืชโดยการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันตนเองของพืชแสดงว่าโปรตีนชนิดนี้มีสมบัติเป็นอิลิซิเตอร์

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสคอพอลิตินที่เกิดจากการบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรานี้โดยตรงกับกระตุ้นด้วยอิลิซิติน พบว่าปริมาณของสคอพอลิตินในใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์มีปริมาณการสังเคราะห์ที่สูงกว่า และมีระยะเวลาในการสังเคราะห์ที่ยาวนานกว่าการกระตุ้นด้วยอิลิซิติน ทั้งนี้เนื่องมาจากการบ่มด้วยซูโอสปอร์จะทำให้ใบยางติดเชื้อ

อยู่ตลอดเวลา เพราะเมื่อซูโอสปอร์เจาะผ่านผิวใบยางเข้าไปแล้วสามารถเคลื่อนที่แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นเซลล์ใบยางจึงถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์สคอพอลิตินและสะสมอยู่บริเวณที่มีการติดเชื้อตลอดเวลาต่างกับอิลิซิตินซึ่งเป็นโปรตีนพิษที่มาจากเชื้อรา เมื่อแทรกเข้าสู่ภายในเซลล์ได้แล้วจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองโดยการสังเคราะห์สคอพอลิติน จากนั้นอิลิซิตินก็จะถูกกำจัดไปโดยเอนไซม์ในพืช (Kamoun *et al.*, 1993) ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ ดังนั้นปริมาณการสังเคราะห์จึงต่ำกว่าและมีระยะเวลาในการสังเคราะห์สั้นกว่า จากการที่อิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้ใบยางตอบสนองได้อย่างรวดเร็วและบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ จึงอาจนำอิลิซิตินมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการจัดอันดับความต้านทานโรคของยางพาราได้

4.4 การศึกษาการสังเคราะห์ Pathogenesis-related proteins ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. botryosa*

ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ในระดับกลาง (1×10^7สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากสามารถบอกระดับความต้านทานของใบยางได้ค่อนข้างชัดเจน โดยสังเกตผลจากนีโครซีสที่เกิดขึ้นร่วมกับผลการสังเคราะห์สคอพอลิติน พบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสในใบยางพาราทั้งสองพันธุ์เพิ่มขึ้นหลังจากการติดเชื้อรา โดยพันธุ์ต้านทานจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็วที่สูงกว่าอย่างชัดเจนและมีแนวโน้มที่จะลดลงช้ากว่าด้วย นั่นคือสามารถรักษาระดับของเอนไซม์ทั้งสองไว้ได้นานกว่านั่นเอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใบยางพันธุ์ต้านทานถูกลุกลามได้ช้ากว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของโปรตีนในใบยาง ก็ให้ผลสอดคล้องกับค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสอง โดยค่าโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเป็นผลรวมของโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิดซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างความแข็งแรงให้กับใบยาง ได้แก่เอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน เพื่อกักบริเวณเชื้อราไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียง (Bradley *et al.*, 1992) และรวมถึงเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งใช้ในการสร้างไฟโตอเล็กซิน (antimicrobial) ที่จะมาทำลายเชื้อรา (Hahlbrock and Scheel, 1989) ส่วนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสเป็นโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งถูกกระตุ้นหรือชักนำให้สร้างขึ้นมาเพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราในส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนและไคตินตามลำดับ (Linthorst, 1991)

จากผลการศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ต่อเชื้อราชนิดนี้ พบว่าสามารถบอกระดับความต้านทานโรคของยางพาราได้ไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับผลที่ได้จากการศึกษานีโครซีสและการสังเคราะห์สคอพอลิติน ดังนั้นในการศึกษาผลการสังเคราะห์ PR-proteins ต้องทำควบคู่ไปกับแผลนีโครซีสและการสังเคราะห์สคอพอลิติน นอกจาก

นี้ในช่วงแรกของการศึกษาผู้วิจัยได้ทดลองใช้ใบยางพาราที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยยางสงขลา พบว่าผลการศึกษา PR-proteins มีค่าแปรปรวนสูงมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากระยะห่างระหว่างต้นยางที่ปลูกมีน้อย เมื่อต้นใดต้นหนึ่งติดโรคก็จะลุกลามไปทั่วทั้งแปลงทดลอง และยางพาราแต่ละพันธุ์มีความอ่อนแอต่อเชื้อราแตกต่างกันออกไปเช่นยางพันธุ์ RRIM600 อ่อนแอต่อเชื้อรา *Phytophthora* ยางพันธุ์ BPM-24 อ่อนแอต่อเชื้อรา *Oidium* ดังนั้นตลอดปียางสองพันธุ์นี้จะหมุนเวียนกันติดเชื้อรา จนหาช่วงที่ใบยางพาราทั้งสองพันธุ์นี้ปลอดเชื้อราแทบไม่ได้ และหากใบยางผ่านการติดเชื้อราใดๆมาก่อน (แม้จะไม่ปรากฏอาการของโรค) เมื่อนำมาทดลองตามวิธีที่รายงานไปแล้ว พบว่าชุดที่บ่มด้วยเชื้อรามีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนและเอนไซม์เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม ทั้งนี้เพราะใบยางในขณะนั้นได้ติดเชื้อราและถูกกระตุ้นมาก่อนแล้ว นั่นคือโปรตีนในชุดควบคุมมีปริมาณสูงกว่าใบยางในช่วงปลอดเชื้อรา (มีค่า base line สูง) ดังนั้นจึงได้แก้ปัญหาโดยการทดลองปลูกต้นยางอ่อนในถุงเพาะชำและฉีดล้างใบยางทุกวัน พบว่าใบยางติดเชื้อราน้อยลง (มีค่า base line ต่ำ) จึงได้ใบยางปลอดเชื้อราสำหรับการทดลอง และให้ผลการทดลองที่มีค่าแปรปรวนลดลงมาก ในช่วงปลอดเชื้อจะตรวจพบปริมาณโปรตีน และค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสองในใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) สูงกว่าใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) เล็กน้อย ในการทดลองชุดเดียวกันการเลือกใช้ใบยางต้องมีความพิถีพิถันมาก ทั้งนี้เพื่อลดการแปรปรวนของผลการทดลอง เช่น เลือกใช้ใบยางจากต้นและกิ่งเดียวกัน และเลือกใช้ใบที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันด้วย ไม่ใช้ใบที่มีรอยกัดแทะของแมลงหรือใบที่มีรอยไหม้ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อใดๆมาก่อน นอกจากนี้ยังเลือกใช้ใบชุดควบคุมและใบชุดทดลองจากก้านเดียวกันอีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนไอโซไซม์ของเอนไซม์ไคติเนสในใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ทั้งที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อรานี้ พบว่ามีการลดลงของแถบไอโซไซม์ X อย่างชัดเจนหลังติดเชื้อราและลดลงเล็กน้อยในการทดลองชุดควบคุม แสดงว่าไอโซไซม์ X น่าจะไม่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของใบยาง แต่อาจจะใช้บ่งบอกสภาพของใบยางได้ เนื่องจากยิ่งติดเชื้อรานานแถบไอโซไซม์นี้ยิ่งลดลงมาก ส่วนไอโซไซม์ Y ซึ่งพบในใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ และไอโซไซม์ Z ที่พบเฉพาะในยางพันธุ์ BPM-24 ถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นเมื่อติดเชื้อรา แสดงว่าไอโซไซม์ทั้งสองน่าจะเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค และการที่ไอโซไซม์ Z ตรวจพบเฉพาะในใบยางพันธุ์ BPM-24 เท่านั้นแสดงว่าไอโซไซม์ดังกล่าวอาจมีความจำเพาะกับเชื้อราชนิดนี้มากกว่าไอโซไซม์อื่น จึงทำให้ใบยางพันธุ์ BPM-24 มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. botryosa* ดีกว่าใบยางพันธุ์ RRIM600

ส่วนค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ด้วยสารละลายอิลิซิตินทั้งในแง่ปริมาณและอัตราเร็วที่เพิ่มขึ้น พบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสองจะเพิ่มขึ้นด้วยปริมาณที่ไม่แตกต่างกันนัก (ใบยางพันธุ์ต้านทานถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ทั้งสองได้สูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอประมาณ 1.5 เท่า) โดยจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆลดลง จึงสามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ไม่ชัดเจนมากนัก และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของโปรตีนก็ให้ผลสอดคล้องกับค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสอง

เมื่อเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสองที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินพบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสองที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์จะถูกตรวจพบเมื่อใบยางพาราติดเชื้อตั้งแต่ 48 ชั่วโมงเป็นต้นไปแล้วจะค่อยๆลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง แต่ค่าความว่องไวที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยอิลิซิตินจะตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 และค่อยๆลดลงเมื่อถึงชั่วโมงที่ 32 แสดงว่าสารละลายอิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ PR-proteins ได้รวดเร็วกว่าการบ่มด้วยสปอร์ของเชื้อรา ทั้งนี้เพราะอิลิซิตินเป็นสารที่มาจากเชื้อรา โมเลกุลมีขนาดเล็กจึงแทรกเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่าย เมื่อแทรกเข้าสู่เซลล์ได้แล้วจะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ PR-proteins ขึ้น จากนั้นความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิตินก็จะถูกทำลายโดยเอนไซม์ภายในพืชเอง (Kamoun *et al.*, 1993) ทำให้การสร้าง PR-proteins ลดลงอย่างรวดเร็วด้วย นอกจากนี้การกระตุ้นด้วยอิลิซิตินจะไม่มีการลุกลามออกไปเรื่อยๆเหมือนการติดเชื้อ ทำให้มีระยะเวลาในการสังเคราะห์อยู่ในช่วงสั้นๆ ส่วนการบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์ใบยางจะติดเชื้ออยู่ตลอดเวลาจึงกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์ทั้งสองชนิดในระยะเวลาที่ยาวนานกว่า เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราในส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนและไคติน (Linthorst, 1991)

4.5 การศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. botryosa*

ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ในระดับกลาง (1×10^7สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้สามารถบอกระดับความต้านทานของใบยางได้ค่อนข้างชัดเจน จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาการสร้างลิกนินจะเกิดบริเวณนีโครซีส โดยลิกนินจะทำปฏิกิริยากับกรดเห็นเป็นสีแดงรอบๆนีโครซีส ใบยางพาราพันธุ์ต้านทานจะตอบสนองต่อเชื้อราชนิดนี้โดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินขึ้นบริเวณผนังเซลล์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามได้อย่างชัดเจน ส่วนใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอพบปฏิกิริยาการสร้างลิกนินเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินสามารถใช้บอกระดับความต้านทานโรคได้ซึ่งสอดคล้องกับการบ่มใบยางด้วยเชื้อรา *M. ulei* (Garcia *et al.*, 1995) ส่วนปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยอิลิซิติน พบว่าใบยางพาราพันธุ์ต้านทานเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินได้ชัดเจนกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอเช่นกัน แต่การสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิตินเห็นผลได้ไม่ชัดเจนเหมือนกับการบ่มด้วยสปอร์ของเชื้อรา เนื่องจากแผลนีโครซีสมีขอบเขตไม่ชัดเจนและมีขนาดเล็ก