

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) อยู่ในตระกูล Euphobiaceae มีถิ่นกำเนิดแถบลุ่มน้ำอะเมซอนทวีปแอฟริกาใต้เป็นพืชให้น้ำยาง พื้นที่การเพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในแถบเอเชีย ซึ่งเป็นศูนย์กลางการผลิตของโลก และประเทศไทยมีการผลิตยางเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยผลิตและแปรรูปเป็นสินค้าส่งออกเป็นพืชที่ทำรายได้ให้ประเทศจำนวนมากกล่าวคือ ในปี พ.ศ. 2543 มีมูลค่ารวม 134,143 ล้านบาท เฉพาะการส่งออกยางซึ่งเป็นวัตถุดิบ 60,743 ล้านบาทเป็นสินค้าที่อยู่ใน 10 อันดับแรกของการส่งออก (www.thailandrubber.thaigov.net) จึงถือได้ว่ายางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ เนื่องจากยางพาราเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนที่มีความชื้นในอากาศค่อนข้างสูงและมีฝนตกจึงมีพื้นที่การปลูกในภาคใต้มากที่สุด โดยคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่การเพาะปลูกทั้งหมด ส่วนพื้นที่ที่เหลืออยู่ในภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ จากลักษณะและสภาพอากาศดังกล่าว จึงทำให้เกิดผลกระทบประสบบัญหาจากเชื้อโรคต่างๆ ได้ เมื่อมีการกรีดเอาน้ำยางมาใช้ประโยชน์หน้ายางถูกกรีดจะเป็นช่องทางให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่ระบบท่อลำเลียงภายในลำต้นทำให้เกิดโรคและตายในที่สุด

เชื้อรา *Phytophthora palmivora* เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคใบร่วงและเส้นดำเกษตรกรไม่สามารถกรีดเอาน้ำยางมาใช้ได้ ผลผลิตลดลงทำให้ส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจภายในประเทศ ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการควบคุมโรสดังกล่าวซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ 1) เลือกลูกเฉพาะยางพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูง และ 2) ใช้สารเคมีในการกำจัดโรค แต่วิธีหลังจะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมรวมทั้งมนุษยชาติ และเป็นการแก้ไขปัญหในระยะสั้นเท่านั้น หากจะแก้ปัญหาก็ประสบความสำเร็จในระยะยาวจึงควรปรับปรุงพันธุ์ยางให้มีความต้านทานโรคและสามารถให้ผลผลิตสูง โดยการปรับปรุงพันธุ์จึงเป็นวิธีที่มีความยั่งยืนทางนิเวศวิทยามากกว่า แต่เนื่องจากยางพาราเป็นไม้ยืนต้นที่ใช้ระยะเวลาในการออกดอกและผสมเกสร ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานจึงต้องใช้เวลานาน รวมทั้งใช้แรงงานเป็นจำนวนมาก การคัดเลือกลักษณะต่างๆ ต้องผสมข้ามหลายๆ ชั่วรุ่น และต้องนำไปศึกษาในแปลงปลูกหลายปี ปัจจุบันมีวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพหลายด้านเข้ามาเสริมเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว เช่น เทคนิคไมโครคัตติ้ง (บีทมา ชนะสงคราม, 2534; สมปอง เตชะโต และอรุณี ม่วงงาม, 2535ก, ข) วิธีการนี้คาดว่าสามารถผลิตต้นยางที่ปราศจากต้นตอให้ผลผลิตน้ำยางสูงกว่าวิธีการขยายพันธุ์แบบเดิม เทคนิค

การเพาะเลี้ยงอับละของเกสร (Chen, 1984; สมปอง เตชะโต และวันทนา เอ็งย่อง, 2531) การเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน (Te-chato and Chartikul, 1993a, b) การเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารพิษจากเชื้อ *Phytophthora spp.* เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ที่ต้านทานต่อโรคใบร่วง (Te-chato *et al.*, 1995a, b) และการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ (อรุณี ม่วงงาม และสมปอง เตชะโต, 2535) วิธีการข้างต้นนับเป็นทางเลือกใหม่ในการขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ยางในอนาคต ประเทศที่มีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีด้านนี้อย่างต่อเนื่อง คือ ประเทศฝรั่งเศส และประเทศจีน อย่างไรก็ตามประเทศไทยก็มีความก้าวหน้าทางด้านนี้ในระดับหนึ่ง ดังที่กล่าวแล้วโดยนักวิจัยข้างต้น

ปัจจุบันองค์ความรู้เกี่ยวกับกระบวนการตอบสนองของยางพาราต่อเชื้อโรคในระบบเซลล์ยังมีน้อย การนำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าวมาศึกษาจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทำให้เข้าใจ defense reaction ของยางพารามากขึ้น Kobayashi และ Estevesvieira (2000) ศึกษาแคลลัสฝ้ายพันธุ์ 101-102B ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Xantamonas campestris pv. malvacearum* พบว่า เกิดการตายของเซลล์ (cell death) ภายหลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง Zhao และ Sakai (2003) ศึกษาพบว่ายีสต์อีลิซิเตอร์ (yeast elicitor, YE) สามารถกระตุ้นเซลล์ซัสเพนชันของ *Cupressus lusitanica* ให้มีการสะสม β -thujaplicin ซึ่งเป็นปฏิชีวนะที่มีพิษต่อเชื้อรา (antimicrobial) Daayf และคณะ (2003) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedimis* (Foa) สามารถกระตุ้นให้แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มพันธุ์ต้านทาน (BSTN) มีการสะสมไฟโตเอเล็กซินในปริมาณสูงกว่าแคลลัสปาล์มพันธุ์อ่อนแอ (JHL) นอกจากนี้ Churngchow and Rattarasarn (2001) รายงานว่าใบยางพาราที่ถูกกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* สามารถกระตุ้นให้มีการสะสมไฟโตเอเล็กซิน (สคอพอลิติน) ในใบยางพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) เช่นเดียวกับนิลุล บุญหวังช่วย (2545) พบว่า เมื่อบ่มใบยางพันธุ์ต้านทานด้วยชูโอสปอร์และอีลิซิตินของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* กระตุ้นให้มีปริมาณและอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ แต่ยังไม่มีการวิจัยใดที่ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองระหว่างเชื้อก่อโรคกับแคลลัสยางพารา ประกอบกับการที่ภาคใต้มีฝนตกชุกและบางครั้งฝนตกไม่ถูกต้องตามฤดูกาลทำให้ใบยางติดเชื้อราเกือบตลอดปี จึงทำให้ผู้วิจัยขาดแคลนใบยางปลอดโรคที่จะใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ใบยางที่ไม่มีอาการของโรค แต่ผ่านการติดเชื้อมาไม่นานและยังคงมีระดับ Pathogenesis related-proteins (PR-proteins) สูงจะให้ผลการทดลองที่มีค่าแปรปรวนมาก หากจะปลูกต้นยางอ่อนในเรือนทดลองแบบ

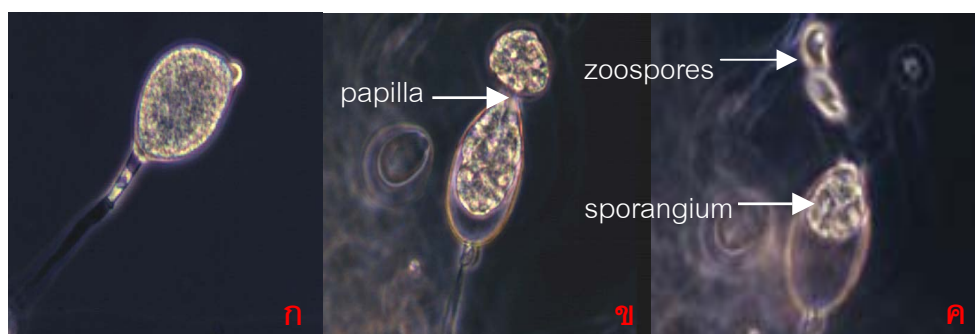
ปลอดเชื้อ (green house) ก็จะมีค่าใช้จ่ายที่สูงจนเกินไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้แคลลัสในการทดสอบแทนไปอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้จึงตั้งสมมุติฐานโดยใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับข้อปลั่งองและเมล็ดอ่อน เพื่อศึกษาปริมาณและอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิติน (Scp) หลังถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิทินจากเชื้อรา *P. palmivora* เพื่อให้เข้าใจปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างยางพารา กับเชื้อโรคได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางด้านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางรวมทั้งพืชชนิดอื่นๆ ให้มีความต้านทานโรคได้อีกด้วย

การตรวจเอกสาร

1.1 เชื้อรา *Phytophthora*

Phytophthora เป็นเชื้อราในกลุ่ม oomycetes มีทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำและในดิน ลักษณะเส้นใย (mycelium) มีสีเขียว แตกกิ่งก้านสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจิอฟอร์ (sporangiophore) ภายหลังที่เจริญเป็นสปอร์แรงเจียมแล้วสปอร์แรงจิอฟอร์จะเจริญให้สปอร์แรงจิอฟอร์อันใหม่จากปลายอันเดิม และดันสปอร์แรงเจียมไปด้านข้างของสปอร์แรงจิอฟอร์ โดยส่วนที่เป็นสปอร์แรงจิอฟอร์นั้นจะมีลักษณะบวมพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียมมีรูปร่างลักษณะและขนาดแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ ทำหน้าที่ให้กำเนิดซุโอสปอร์ที่อุณหภูมิระหว่าง 12-15 °C โดยซุโอสปอร์จะดันออกทางปลายของสปอร์แรงเจียมที่มีลักษณะเป็นปุ่ม (papilla) (รูปที่ 1) เมื่อซุโอสปอร์ออกมาจะว่ายน้ำได้ระยะหนึ่งแล้วจะเข้าเกราะ (encysted) และเริ่มงอกใหม่ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อ (germ tube) เข้าทำลายพืช (ประสาทพร, 2534)



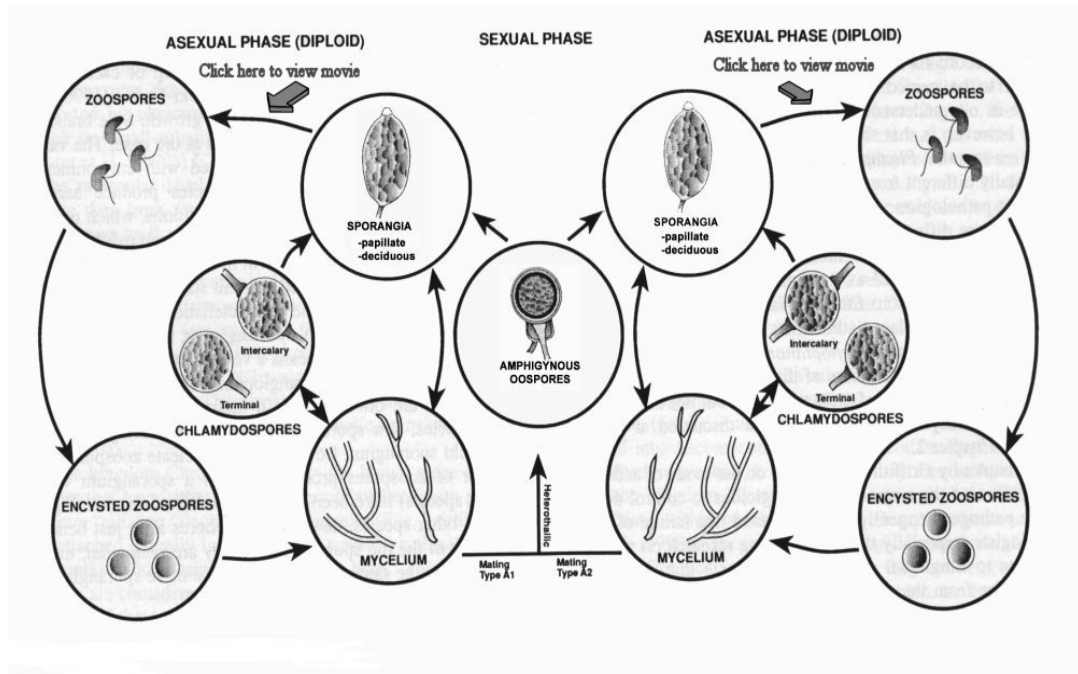
รูปที่ 1 ลักษณะของเชื้อรา *P. palmivora*

- (ก) ลักษณะของซุโอสปอร์แรงเจียมก่อนปลดปล่อยซุโอสปอร์
- (ข) ซุโอสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* ซึ่งปลดปล่อยซุโอสปอร์ออกมาทาง papilla (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้)
- (ค) ซุโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* 2 ซุโอสปอร์ ที่กำลังว่ายอยู่บริเวณด้านบน

(ที่มา : www.botany.hawaii.edu/.../Bot201/Oomycota/Phytophthora.jpg)

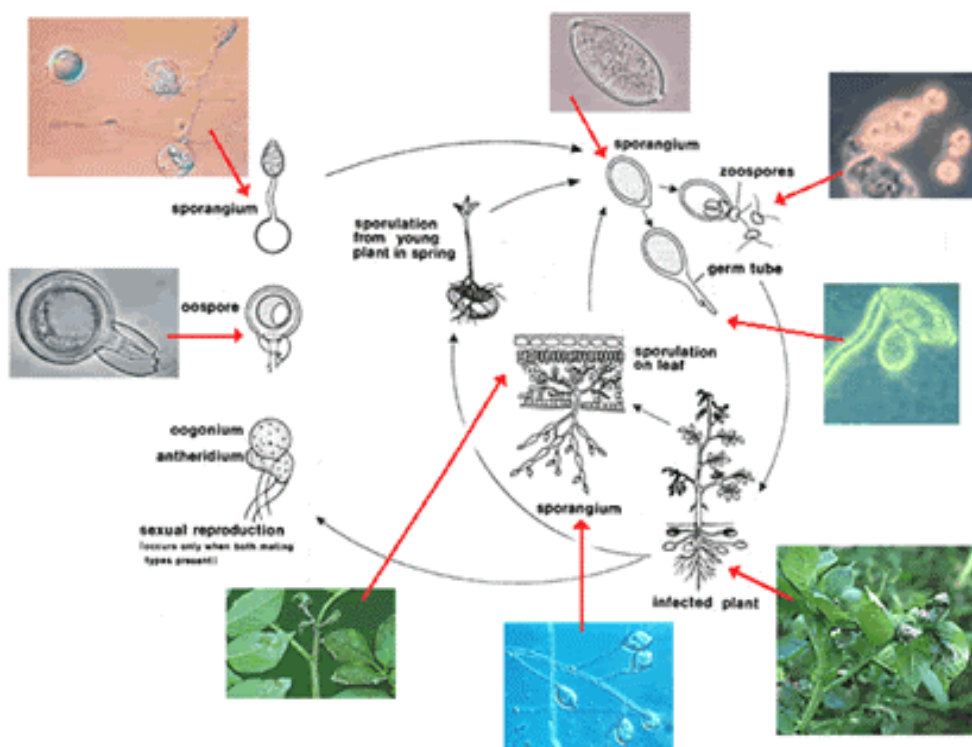
Phytophthora มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น เส้นใยราจะเปลี่ยนเป็นแกมีแทนเจียม (gametangium) เพศผู้เรียกแอนเทอริเดียม (antheridium) ซึ่งภายในจะมีเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gamete) และแกมีแทนเจียมเพศเมียเรียก โอโอโกเนียม (oogonium) มีรูปร่างกลม การผสมของนิวเคลียสทั้งสองเพศจะเกิดขึ้นภายในโอโอโกเนียมและให้กำเนิดโอโอสปอร์ (oospore) ซึ่งจะงอกเป็นท่อและเจริญเป็นสปอร์แรงเจียม (sporangium) ต่อไป

การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *P. palmivora* สามารถผลิตสปอร์ได้ 2 ชนิด คือ ซูโอสปอร์ (zoospore) และคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) แต่ถ้าเป็นแบบอาศัยเพศผลิตสปอร์ชนิดโอโอสปอร์ (oospore) เท่านั้น (www.unimelb.edu.au) ดังแสดงในรูปที่ 2 เชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูโดยอยู่ในรูปของโอโอสปอร์กับในรูปของเส้นใยที่อยู่ในพืชที่เป็นโรค เมื่อสภาพความชื้นเหมาะสมก็จะเกิดสปอร์แรงเจียมให้ซูโอสปอร์ที่เคลื่อนที่ในน้ำหรือกระเด็นไปกับฝนแล้วไปงอกเข้าทำลายพืช (ไพโรจน์ , 2525) เช่น เชื้อรา *P. infestans* ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ สามารถอยู่ข้ามฤดูในลักษณะที่เป็นเส้นใยซึ่งเจริญอยู่ในเซลล์พืชที่ติดมากับหัวมันฝรั่ง เส้นใยจะเจริญเข้าไปในหัว ตาและหน่อของมันฝรั่ง เมื่อนำไปขยายพันธุ์ราจะเจริญเข้าสู่ส่วนของลำต้นและส่วนต่างๆเหนือดิน จากนั้นจะเกิดสปอร์แรงเจียมออกพอร์แทงออกมาทางปากใบ (stomata) และมีสปอร์แรงเจียมที่ปลาย เมื่อแก่เต็มที่จะหลุดไปกับฝน เมื่อตกลงบนใบหรือต้นที่มีน้ำเพียงพอก็จะงอกเข้าทำลายพืชและทำให้เกิดโรคได้ (ประสาทพร, 2534) ดังแสดงวงจรชีวิตในรูปที่ 3



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อรา *P. palmivora*

(ที่มา : www.botany.unimelb.edu.au/.../duriansite/phytophthora.htm/)



รูปที่ 3 วงจรโรคใบไหม้ของมะเขือเทศและมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *P. infestans*
(ที่มา : www.cals-ncsu.edu/.../Faculty/ristaino/graphics/fig1.gif)

เชื้อรา *Phytophthora* ทำให้พืชเกิดโรคได้ตั้งแต่ระยะกล้าของผัก ไม้ดอกไม้ประดับจนถึง ไม้ผล ไม้ป่าที่โตเต็มที่แล้ว ตัวอย่างเช่น ทูเรียน มะละกอ โกโก้ (ประสาทพร, 2534; Erwin and Reberio, 1996) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่า ลำต้นเน่า โคนเน่า บางสปีชีส์เกิดที่ตาหรือผลและ ทำให้เกิดใบไหม้ ทำลายกิ่งก้านและผล เชื้ออาจมีพืชอาศัยกว้างขวางหรือเพียง 2-3 ชนิด แล้ว แต่สปีชีส์ของเชื้อ บางชนิดจะทำให้เกิดอาการใบไหม้หรือทำลายกิ่งอ่อนและผล บางชนิดมีพืช อาศัยที่จำกัดสามารถเข้าทำลายพืชได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น แต่บางชนิดมีพืชอาศัยที่ กว้างขวาง ตัวอย่างเชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น *P. parasitica* สาเหตุโรค โคนเน่า รากเน่าของส้ม โรครากเน่าและยอดเน่าของสับปะรด โรคเน่าดำของกล้วยไม้ โรคผลเน่า ของมะเขือยาว โรคโคนเน่าระดับดินและผลเน่าของมะเขือเทศ *P. parasitica* var *nicotianae* สาเหตุโรคแห้งดำของยาสูบ และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทูเรียน ราก เน่าในพริกไทยดำ รวมทั้งโรคใบร่วง ผักเน่าและเส้นดำของยางพาราด้วย (สถาบันวิจัยยาง กรม วิชาการเกษตร, 2544)

มีเชื้อรา *Phytophthora* หลายสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคในยางพาราซึ่งพบในหลายประเทศ ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora botryosa*, *Phytophthora hevea*, *Phytophthora parasitica* และ *Phytophthora meadii* สำหรับประเทศไทยสปีชีส์ที่เป็นสาเหตุของโรคดังกล่าวคือ *P. palmivora* และ *P. botryosa* โดยเชื้อราทั้งสองชนิดนี้สามารถทำลายต้นยางพาราได้ทุกส่วนไม่ว่าจะเป็นใบอ่อน ใบโตเต็มที่ ใบแก่ ก้านใบ ผลอ่อน ผลที่โตเต็มที่ และหน้ากรีดของยาง โดยก่อให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆ ของพืช เมื่อเชื้อราเข้าทำลายใบ จะก่อให้เกิดจุดสีเทา เข้ม ค่อนข้างกลม ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้น มีลักษณะไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ เมื่อแผลมาชนกัน ก่อให้เกิดรอยแผลสีดำขนาดใหญ่ทำให้ใบเหี่ยวและร่วง จากนั้นอาการจะลุกลามไปยังก้านใบ เกิด รอยแผลเป็นทางดำที่ส่วนล่างของก้านใบและมีคราบน้ำยางบริเวณกลางแผล ทำให้ก้านใบร่วง หลุดจากต้น (รูปที่ 4ก, 4ข) ถ้าอาการรุนแรงเชื้อจะเข้าทำลายยอดอ่อนทำให้ยอดเน่าเป็นสีน้ำตาลและเกิดอาการเน่าตายตามลงไป และเชื้อยังสามารถเข้าทำลายผลยางพาราได้ทั้งผล อ่อนและผลแก่ โดยก่อให้เกิดผลเน่าสีดำชุ่มน้ำ แล้วทำให้ผลหลุดร่วงจากลำต้น (รูปที่ 4ค) รวมทั้ง ก่อให้เกิดโรคเส้นดำซึ่งเป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกยางทั่วไปโดยเฉพาะ อย่างยิ่งในท้องที่ที่เกิดโรคใบร่วงและผักเน่าระบาดเป็นประจำทุกปี ลักษณะอาการของโรคใน ระยะแรกจะสังเกตเห็นรอยช้ำเหนือรอยกรีดโดยมีสีมืดปกติ ระยะต่อมาจะกลายเป็นรอยบวมสีดำ หรือน้ำตาลดำ เป็นเส้นขยายขึ้นลงตามแนวขนานกับลำต้น เมื่อเงื่อนไขเปลือกออกจะเห็นรอยบวมสี ดำเป็นลายเส้นดำบนเนื้อไม้ อาการขั้นรุนแรงเปลือกหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคปริเน่า มีน้ำยาง

ไหล และเปลือกจะเน่าหลุดออกมา เปลือกที่งอกใหม่จะเสียหายจนทำการกรีดยางซ้ำบนหน้าที่เป็นเปลือกงอกใหม่ไม่ได้ (รูปที่ 4ง) ทำให้ต้นยางมีระยะเวลาที่ให้ผลผลิตสั้นลงเป็นเวลา 8-16 ปี จึงจัดได้ว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยางธรรมชาติและเป็นอันตรายแก่ต้นยางมากที่สุดโรคหนึ่งในประเทศไทย (ไพโรจน์ , 2525)



รูปที่ 4 โรคในยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* และ *P. botryosa*

- . สนวนยางที่เกิดโรคใบร่วงจากเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora spp.*
- . เชื้อรา *Phytophthora spp.* ที่เกิดบริเวณก้านใบ
- . ฝักยางที่ถูกเชื้อ *Phytophthora spp.* ทำลาย
- . โรคเส้นดำ (black stripe)

(ที่มา : www.rubberthai.com/information/sick-rubber)

1.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพารา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ ที่สามารถนำชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่างๆ (organ) เนื้อเยื่อ (tissue) เซลล์ (cell) หรือ โปรโตพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ที่ปลอดเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงอาจอยู่ในรูปอาหารก้อน (solid medium, agar medium) หรืออาหารเหลว (liquid medium) ซึ่งทำการเลี้ยงโดยการเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า อาหารที่ใช้เลี้ยงมีองค์ประกอบของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ธาตุเหล็ก วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงประกอบด้วยแสง อุณหภูมิ และความชื้น แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช หากเป็นพืชเมืองหนาวควรจะวางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าพืชเมืองร้อน โดยห้องที่วางเลี้ยงต้องควบคุมอุณหภูมิได้ มีความเข้มแสงในระดับที่พอเหมาะต่อการเจริญในระยะต่างๆ ตามที่พืชต้องการ การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถให้พืชต้นใหม่ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น จึงได้นำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นมามากมาย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มมีการศึกษามานานแล้ว และใช้ขยายพันธุ์พืชชนิดต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชประเภทผัก และไม้ดอก นิยมใช้วิธีการนี้กันอย่างแพร่หลายเพื่อการขยายพันธุ์พืชและปรับปรุงพันธุ์ ส่วนไม้ผล และพืชยืนต้นเศรษฐกิจยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร พืชยืนต้นที่มีการทดลองและทำการศึกษากันส่วนมากเป็นพืชเมืองหนาว เช่น องุ่น แอปเปิล เชอร์รี่ ท้อ พลัม และพลับ พืชยืนต้นที่มีการศึกษากันน้อยพืชหนึ่งคือ ยางพารา ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย จึงน่าสนใจที่จะศึกษาเพื่อนำเทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์เพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต ยางพาราเป็นพืชยืนต้นที่มีรายงานประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Chen, 1989 ; Carron *et al.*, 1989) โดยทั่วไปเมื่อนำชิ้นส่วนพืชมาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนที่เลี้ยงโดย 2 กระบวนการ คือ กระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) และกระบวนการออแกโนเจเนซิส (organogenesis) กระบวนการทั้งสองข้างต้นประกอบด้วย กระบวนการที่ชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยตรงเรียกว่า direct organogenesis/embryogenesis และกระบวนการเกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยผ่านการสร้างแคลลัสเรียกว่า indirect organogenesis /embryogenesis การชักนำพืชต้นใหม่โดยวิธีการหลังนี้ให้ต้นพืชที่มีความแปรปรวนสูงกว่าเนื่องจากการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์ผิดปกติในอัตราสูง ตัวอย่างพืชให้น้ำยางที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ โดยผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส คือ Guayule ซึ่งเป็นพืชล้มลุกให้

น้ำยางที่สำคัญในแถบอเมริกาใต้ น้ำยางที่ได้มีคุณภาพใกล้เคียงกับยางพารา จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดและส่วนลำต้นของ *Guayule* บนอาหารสังเคราะห์ในหลอดทดสอบพบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวจากแปลงปลูกมีปัญหาการปนเปื้อนมาก จึงได้เลือกชิ้นส่วนที่เตรียมในสภาพปลอดเชื้อโดยการเพาะเมล็ดในหลอดทดสอบทั้งนี้เพราะสามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ง่าย โดยการจุ่มแช่เมล็ดในแอลกอฮอล์ 70% แล้วลนไฟก่อนนำมาวางเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ สูตรพื้นฐาน MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตเบนซิลอะดีนีน (benzyladenine), BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากวิธีการนี้พบว่าสามารถชักนำให้เมล็ดงอกในสภาพปลอดเชื้อได้ จากต้นที่ปลอดเชื้อนี้มีการพัฒนาจากเนื้อเยื่อให้เป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส เมื่อทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม สามารถชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoots) ได้ เนื่องจากการชักนำการเกิดพืชต้นใหม่ด้วยวิธีการดังกล่าวผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส จึงมีข้อเสียทำให้พืชต้นใหม่ที่ได้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงดังกล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นในการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเพื่อชักนำพืชต้นใหม่โดยตรงไม่ผ่านกระบวนการสร้างแคลลัสทำให้ได้พืชที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ นับเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ดี การพัฒนาวิธีการดังกล่าวประกอบด้วย การเลือกชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วใช้ชิ้นส่วนที่มีจุดเจริญปลายยอดซึ่งเรียกว่า organised explant ร่วมกับสูตรอาหารที่เหมาะสม การขยายพันธุ์โดยวิธีการนี้เรียกว่า ไมโครคัตติง (microcutting) นับเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชที่นิยมกันมากในปัจจุบัน เพราะสามารถเพิ่มจำนวนพืชต้นใหม่ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ประกอบด้วยขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน คือ นำชิ้นส่วนพืชที่ดูแลในสภาพปลอดเชื้อได้แก่ ปลายยอด (shoot tip) ลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ข้อ (node) ปล้อง (internode) ข้อใบเลี้ยง (cotyledonary node) หรือลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ที่มีความยาวประมาณ 10 ถึง 40 มิลลิเมตร มาฟอกฆ่าเชื้อหรือหากเป็นต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อก็สามารถนำมาใช้ได้เลย หลังจากเตรียมชิ้นส่วนแล้วนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ที่มีความเหมาะสมและปรับสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงตามชนิดพืชที่เลี้ยง สามารถชักนำการเกิดเป็นพืชต้นใหม่ การเลี้ยงแตกต่างกันไปในแต่ละชิ้นส่วนขึ้นกับปัจจัยหลัก 2 ประการ คือ พันธุกรรมของพืชรวมถึงชิ้นส่วนของพืชและสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงด้วย Carron และคณะ (1989) รายงานการขยายพันธุ์ยางจากชิ้นส่วนข้อที่มีความยาว 30-40 มิลลิเมตร จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดภายในหลอดทดสอบ โดยนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาแช่ในสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีทั้ง IBA (3-indolebutyric acid) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐาน MS ที่ปราศจากสารควบคุมการ

เจริญเติบโต เติมผงถ่าน (activated charcoal) ความเข้มข้น 5% และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 6% สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ เมื่อตัดแยกแต่ละยอดมาแช่ในสารละลายผสมระหว่าง BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ NAA (1-naphthylacetic acid; α -naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% และผงถ่านเข้มข้น 0.05% สามารถชักนำรากให้เป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ การชักนำยอดรวมและรากจากยอดแต่ละยอดใช้เวลา 3 ถึง 4 เดือน Chen (1989) รายงานการขยายพันธุ์ยางภายในหลอดทดสอบ โดยการเลี้ยงส่วนข้อลำต้นบนอาหารดัดแปลงสูตร Nistch โดยการเติมโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ว่าช่วยให้การพัฒนารากของตาเป็นไปได้ดี นอกจากนี้พบว่า วิตามินมีความจำเป็นมากในการพัฒนารากของยอดด้วย อย่างไรก็ตามการใช้ส่วนยอดของต้นกล้าอายุ 2 ถึง 4 สัปดาห์ ที่เพาะเมล็ดภายในหลอดทดสอบและจากแปลงโดยตรง มาปักชำในอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐาน MS เติมเคซีนไฮโดรไลเซต เพื่อชักนำรากให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ พบว่า ส่วนยอดจากต้นกล้าที่ชักนำในหลอดทดสอบ สามารถชักนำรากได้หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แต่ส่วนยอดที่นำมาจากแปลงโดยตรงนั้นไม่มีรายงานผลสำเร็จในการเลี้ยง การชักนำยอดจากชิ้นส่วนอื่นๆ ของยางพาราเช่น ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และใบเลี้ยง พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จคงมีพัฒนารากที่เกิดขึ้นเท่านั้น แม้ว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ในอัตราความเข้มข้นต่ำๆ หรือไม่ใช้เลย อย่างไรก็ตามวิธีการไมโครคัตติงยังสามารถทำได้กับชิ้นส่วนพืชที่ดูแลภายนอกหลอดทดสอบ (*in vivo*) พืชยืนต้นอื่นๆ ที่สามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีการไมโครคัตติงภายนอกหลอดทดสอบ เช่น แพร่ และแอปเปิล โดยการนำชิ้นส่วนข้อที่มีความยาว 40 มิลลิเมตร มาปักชำในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ พบว่าลำต้นที่ประกอบด้วยข้อจำนวน 2 ข้อ สามารถชักนำรากได้ดีกว่าลำต้นที่มีเพียงข้อเดียว การแช่ชิ้นส่วนพืชด้วย IBA ความเข้มข้น 1% ก่อนการปักชำช่วยส่งเสริมการสร้างรากได้ดีกว่าการแช่ด้วย IBA ความเข้มข้น 2% หรือไม่ได้แช่เลย แต่การขยายพันธุ์ในสภาพเช่นนี้ไม่สามารถทวีจำนวนต้นพืชได้เหมือนกับการทำภายในหลอดทดสอบ ต้นพืชที่ได้มีจำนวนเท่ากับชิ้นส่วนพืชที่ปักชำ ดังนั้นการขยายพันธุ์ในหลอดทดสอบเพื่อทวีจำนวนก่อนจากนั้นจึงนำยอดแต่ละยอดไปปักชำเพื่อชักนำให้เกิดรากภายในหรือนอกหลอดทดสอบ สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้ตามต้องการ เมื่อได้ต้นกล้าที่มีทั้งยอดและรากที่สมบูรณ์ ขั้นตอนการย้ายต้นกล้างแปลงก็เป็นขั้นตอนที่สำคัญซึ่งต้นกล้าที่ได้ต้องผ่านการปรับสภาพก่อนการย้ายลงปลูก เพื่อเพิ่มความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอก และช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตด้วย วิธีการปรับสภาพสามารถทำได้ทั้งภายในและภายนอกหลอด

ทดสอบ โดยการย้ายต้นกล้าที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของวุ้น 0.8% เป็น 1.20% การเพิ่มความเข้มข้นของวุ้นเป็นการลดปริมาณน้ำในอาหารให้น้อยลง นับเป็นการเตรียมต้นกล้าต่อสภาวะความเครียดของน้ำ เขาพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเมื่อย้ายปลูกได้ มีรายงานวิธีการเตรียมต้นกล้าอย่างพาราที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีการไมโครคัตติงในหลอดทดสอบ โดยการจุ่มแช่ต้นกล้าในยาแก้นราไดเทนเอ็ม 45 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ก่อนการย้ายปลูกลงดิน หลังจากย้ายต้นกล้าลงดินปลูกฉีดพ่นต้นกล้าด้วยยาแก้นราที่มีองค์ประกอบของไดเทนเอ็ม 45 อัตราความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และเบนเลท อัตราความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร อีกครั้ง พร้อมกันนี้ต้องรักษาความชื้นสัมพัทธ์ให้สูงถึง 100% ควบคุมอุณหภูมิ 35 °C ภายใต้การให้ร่มเงา 75% และที่สำคัญต้องไม่ให้ต้นกล้าอย่างขาดน้ำ วิธีการเตรียมต้นกล้าในสภาพแวดล้อมดังกล่าวข้างต้นสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าอย่างได้ นอกจากนี้การปรับสภาพต้นกล้าภายนอกหลอดทดสอบก็สามารถทำได้โดยการลดความชื้น และเพิ่มความเข้มแสงเป็นลำดับก็สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าได้เช่นกัน จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการศึกษารายละเอียดและปรับปรุงพันธุ์อย่างพาราด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยกว่าพืชชนิดอื่นๆ และพบปัญหามากมายในการทดลองเป็นต้นว่า ยางพาราเป็นพืชที่มีน้ำยางเมื่อนำขึ้นส่วนต่างๆ มาเลี้ยงทำให้ขึ้นส่วนที่วางเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลที่เรียกว่า browning ไม่มีการพัฒนาของขึ้นส่วนและตายในที่สุด จึงต้องทำการศึกษาเพื่อหาวิธีการป้องกันและแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่พบเพื่อเพิ่มผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างพารา (สมปอง เตชะโตและอรุณี ม่วงแก้วงาม, 2537)

1.2.1 ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างพารา

1.2.1.1 การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ culture)

การเพาะเลี้ยงปลายยอด (shoot tip culture)

การเพาะเลี้ยงตาข้าง (axillary bud culture)

การเพาะเลี้ยงใบ (leaf culture)

การเพาะเลี้ยงอินเทกกูเมนต์ (integument culture)

การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture)

การเพาะเลี้ยงอับละของเกสร (anther culture)

1.2.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single culture)

1.2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีมากมายหลายสูตร แต่สูตรพื้นฐานที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ สูตรอาหารมูราชิเกะและสคูก (Murashige and Skoog, 1962) มีชื่อย่อว่า MS องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ

1.2.2.1 สารอนินทรีย์ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยๆ คือ

1.2.2.1.1 ธาตุอาหารหลัก เป็นธาตุอาหารหลักที่ต้องการปริมาณมาก ได้แก่ C H O N P K S Ca Mg

1.2.2.1.2 ธาตุอาหารรอง เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ Fe Cl Co Mn Cu Zn Bo Mo Na I

1.2.2.2 สารประกอบคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นระหว่าง 2-8% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

1.2.2.3 วิตามิน ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้กันมากได้แก่ ไรอามีน นิโคตินิคแอซิด ไพริดอกซิน กรดอะมิโนเชิงซ้อน และไบโอติน เป็นต้น

1.2.2.4 สารอินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ เป็นต้น

1.2.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโต ต้องเลือกใช้ให้เหมาะกับวัตถุประสงค์ หากต้องการชักนำยอดควรใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินสูงกว่าออกซิน หากต้องการชักนำรากควรเลือกใช้ออกซิน อัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินมีความสำคัญมาก จึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิด และชิ้นส่วนพืช

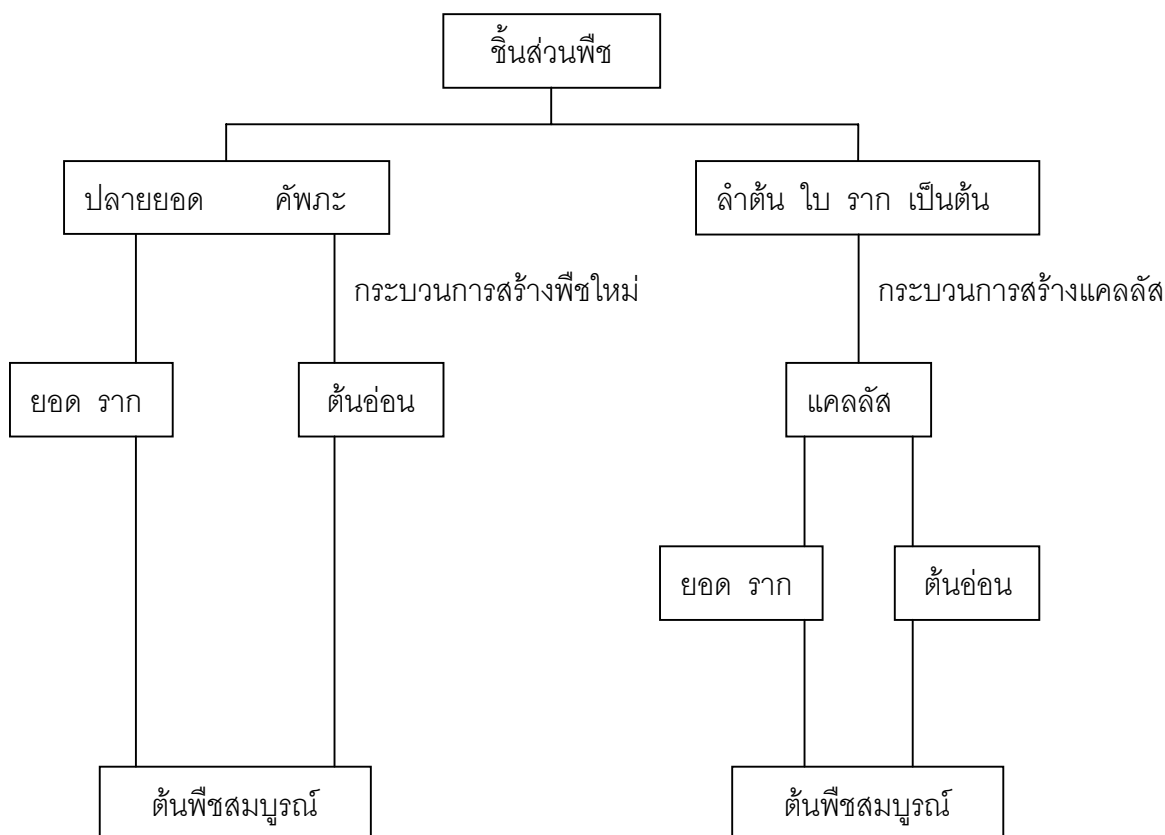
ออกซินที่นิยมใช้ได้แก่ NAA IAA 2,4-D ไซโตไคนินที่นิยมใช้ได้แก่ BA Kinetin และ Zeatin เป็นต้น (รังสฤษฏ์, 2540)

1.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัส (callus) หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาราเอนไคมา (parenchyma) แต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophylls) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิด

ของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้ากันเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus (รังสฤษฏ์, 2540)

ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่างๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ดังแสดงขั้นตอนของพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองต่างๆ ในรูปที่ 5 แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของคัพภะ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ปลายยอด ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่อพิเศษอื่นๆ ของพืชที่สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกันคือ แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ใส่หรือแกนลำต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem vessels) ไส้ลมพาเรนไคมา (xylem parenchyma) และเอนโดสเปิร์ม (endosperm) (รังสฤษฏ์, 2540)



รูปที่ 5 พัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

1.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1.2.4.1 ขนาดและรูปร่าง (size and shape) ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงแม้ไม่มีข้อจำกัดหรือข้อวิฤต แต่ในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กจนเกินไป นั่นคือมี critical minimum size ซึ่งถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กกว่านี้แล้วไม่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ ตัวอย่างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหาร (phloem tissues) ของรากแครอท (*Daucus carota*) ที่มีน้ำหนักเพียง 3.8 มิลลิกรัม สามารถเกิดแคลลัสได้ (รูปที่ 6) แต่ถ้าเป็นเนื้อเยื่อจากหัว tuberous meristemetic tissues ของ Jerusalem artichoke แล้ว อาจมีขนาดเล็กเกินไปทั้งนี้เพราะเซลล์มีขนาดเล็กกว่า จึงมีเปอร์เซ็นต์ถูกทำลายหรือถูกกระทบกระทั่งขณะแยกเนื้อเยื่อน้อยกว่า

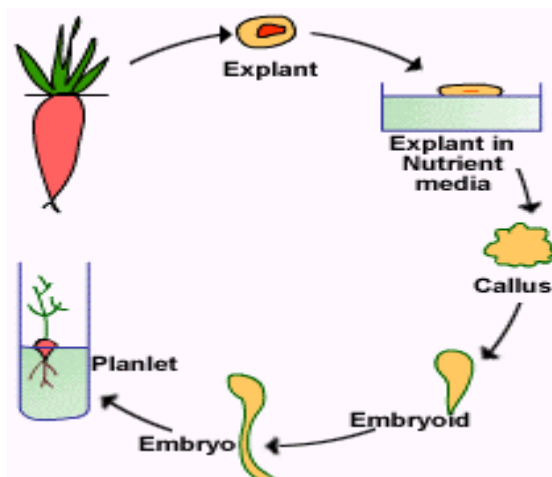
1.2.4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth hormone) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเซลล์ โดยทั่วไปแล้วถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นราก ถ้าสัดส่วนนี้ต่ำจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือต้น และหากสัดส่วนนี้สมดุลจะพัฒนาไปเป็นแคลลัสต่อไป ความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่างๆ นั้นพบว่า ออกซินอยู่ในช่วง 0.01-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคนินซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์จะอยู่ในช่วง 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ปริมาณและสัดส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสจะขึ้นอยู่กับชนิดพืช ชนิดชิ้นส่วน และระยะเวลาการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้

1.2.4.3 ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากต้องการธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักต่างๆ ไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมพวกกรดอะมิโนเช่น กลูตามีน แอสปาดเตต พิวรีน และพิริมิดีน สารพวกเคซินไฮโดรไลเซต สารสกัดจากมอลท์ ยีสต์ และน้ำมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วยเช่นกัน

1.2.4.4 แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญได้แก่ น้ำตาลซูโครส และหรือแซคคาไรส ความเข้มข้น 2 - 4%

1.2.4.5 ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factors) โดยเฉพาะแสง ซึ่งต้องการความเข้มต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย (เลี้ยงในที่มืด) อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 °C นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจของเซลล์ด้วย

1.2.4.6 สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่ใช้เลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง มักเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่า และตำแหน่งที่ชิ้นส่วนแคลลัสสัมผัสกับอาหารจะมีสารที่เป็นของเสียจากเมแทบอลิซึม (metabolic wastes) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (รังสฤษฏ์, 2540)



รูปที่ 6 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากแครอท

(ที่มา : www.edugreen.teri.res.in/explore/bio/graphics/toti-a.gif)

1.2.5 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.2.5.1 การขยายพันธุ์พืช สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นและตรงตามพันธุ์โดยเฉพาะพืชที่ไม่ออกดอก ผล พืชที่เมล็ดงอกช้าหรืองอกยาก เมล็ดสะสมอาหารไม่เพียงพอทำให้งอกและการพัฒนาต้นอ่อนในเมล็ดไม่สมบูรณ์ จากการศึกษาเมล็ดกล้วยไม้พบว่าฝักหนึ่งมีเมล็ดนับหมื่นแต่ไม่สามารถงอกได้หรืองอกได้น้อยกว่า 0.1% เนื่องจากไม่มีทั้งไบเล็ยงและเอ็นโดสเปิร์ม การที่ต้นอ่อนบางต้นงอกและเจริญได้เพราะมีการอยู่ร่วมกันกับราไมคอร์ไรซาซึ่งคอยให้วิตามินบีหนึ่งที่เป็นต่อการงอกและการเจริญ นอกจากนี้ร่ายังช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ไปเป็นโมเลกุลเล็กทำให้เมล็ดดูดน้ำได้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวการเพาะเมล็ดจากฝักสดสามารถช่วยให้เมล็ดงอกได้จำนวนหมื่นต้นต่อฝัก สำหรับพืชที่ขยายพันธุ์โดยวิธีการปกติดั้งเดิม เช่น การตอน การติดตา การตัดชำได้ช้า มีชิ้นส่วนที่จะนำมาขยายพันธุ์ได้น้อย การใช้เทคนิคนี้จะช่วยได้มาก

1.2.5.2 การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืช

คือ การเกิดโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไมโคพลาสมา ที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้หากไม่แสดงอาการให้เห็นและทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากที่จะแก้ไขหรือป้องกันกำจัดนอกจากจะกำจัดหรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป การใช้สารเคมีคลุกเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ก่อนปลูกแม้จะช่วยลดปริมาณเชื้อที่อาจติดมากับผิวของวัสดุปลูกได้ แต่อาจใช้ได้ผลดีในกรณีการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมาภายนอกเซลล์พืชได้ การผลิตพืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่จะให้ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราและแบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้วจะแสดงอาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรียและราเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถขจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมาก และดำรงชีวิตอยู่ในเซลล์พืช จึงมักไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็นแม้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็ตาม ในทางปฏิบัติจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงจนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อไวรัส ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุดคือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (vascular tissues) ซึ่งได้แก่ ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ที่ติดต่อกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืชที่เชื้อไวรัสจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

1.2.5.3 การปรับปรุงพันธุ์พืช โดยกระบวนการสร้างแคลลัสมีการเหนี่ยวนำให้มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีสาเหตุจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะ 2,4-D เมื่อเป็นเช่นนี้เซลล์ลูทที่แบ่งเสร็จเรียบร้อยแล้วจะมีข้อมูลพันธุกรรมที่ขาดหายไปบางส่วนหรืออาจเพิ่มขึ้นมา เซลล์เหล่านี้เมื่อไปอยู่ส่วนใดของต้นพืชก็จะแสดงอาการออกมาให้เห็น ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการที่เรียกว่า somaclonal variation ในกรณีที่ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศ และเรียกว่า gametoclonal variation หากเป็นชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศ ในช่วงระยะเวลาสั้นเพียง 1-3 เดือนสามารถพัฒนาพืชพันธุ์ใหม่โดยวิธีการนี้ได้ และเป็นวิธีการที่ลงทุนน้อย จากลักษณะสัณฐานที่ผิดไป เมื่อทำการเปรียบเทียบกับพันธุ์ที่ปลูกอยู่หากดีกว่า เช่น ทนแล้ง ทนโรคทนแมลง และให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพดีกว่าก็ใช้เป็นพันธุ์ส่งเสริมการปลูกต่อไป เทคนิคนี้ใช้กันมากในไม้ดอกไม้ประดับ ช่วยให้ได้พันธุ์ที่มีดอก สี ขนาดเป็นที่ต้องการของตลาดทำให้ผู้ปลูกได้รับประโยชน์มาก เพราะหากปรับปรุงด้วยวิธีการธรรมดาแล้วต้องใช้เวลาเป็นปี

1.2.5.4 การผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดที่ให้สารที่มีคุณสมบัติ

เป็นยาหรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางกรณีเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณน้อยมาก จึงต้องใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น

1.2.5.5 การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหาร

สังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

1.2.5.6 การเก็บรักษาพันธุ์พืช

ในปัจจุบันพืชพรรณหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชที่หายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปในไม่ช้า สาเหตุสำคัญอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์เอง นอกจากนี้พืชบางชนิดยังยากที่จะขยายพันธุ์หรือเก็บรักษาพันธุ์ได้โดยวิธีปกติ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานและไม่คุ้มค่านัก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในสภาพปลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารเคมีที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (water stress) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ยาวนาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งเช่นปกติ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายคือ เก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196°C เมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้น ๆ (รังสฤษฏ์, 2540)

1.3 กลไกการตอบสนองของยางพาราต่อเชื้อก่อโรค

พืชโดยทั่วไปมีกลไกการป้องกันโรค โดยต่อต้านเชื้อโรคทำให้พืชได้รับความเสียหายจากโรค น้อยลง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูง การป้องกันโรคของพืชอาจเกิดจากลักษณะ โครงสร้างของพืชเอง ทำให้เกิดการกีดขวางและยับยั้งการเจริญลุกลามของเชื้อเข้าสู่พืช ซึ่งเป็น ปฏิกริยาทางชีวเคมีในเซลล์และเนื้อเยื่อพืช โดยการสร้างสารที่เป็นพิษต่อเชื้อโรคหรือไปยับยั้งการ เจริญของเชื้อโรค ยางพารามีกลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเช่นเดียวกับพืชทั่วไป ปฏิกริยาต่อต้าน เชื้อโรคในยางพาราพบครั้งแรกโดย Tan และ Low ในปี 1975

1.3.1 การป้องกันของพืชทางโครงสร้าง (structural defense)

การป้องกันเชื้อโรคเข้าทำลายพืช มีผิวเป็นส่วนแรกที่เป็นเกราะป้องกันการเจาะผ่าน ของเชื้อ ลักษณะของโครงสร้างคุณสมบัติและปริมาณของส่วนประกอบ เช่น การมีขี้ผึ้งคลุมใบและ ผลจะป้องกันหยดน้ำเกาะติดผิวพืช ทำให้สปอร์ของเชื้อราที่อยู่บนผิวไม่งอกหรือไม่มีความชื้นพอที่ จะทวีจำนวนได้, การมีขนที่ผิวหนาแน่นทำให้หยดน้ำไม่เกาะติดผิวหรืออยู่ได้ไม่นานมีสภาพไม่ เหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อ, การมีความหนาของ cuticle ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค มากขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เชื้อต้องเจาะผ่านสู่พืชโดยตรง, ความหนาและเหนียวของผนังด้านนอก เซลล์ epidermis ทำให้เชื้อราเจาะผ่านสู่พืชทางตรงไม่ได้หรือยากขึ้น นับว่าความหนาและเหนียว เป็นปัจจัยที่สำคัญมากของพืชต้านทานโรคบางชนิด, ความหนาและเหนียวของผนังเซลล์เนื้อเยื่อ ท่อลำเลียงน้ำและอาหารของพืช เนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์ sclerenchyma จะกีดกันการลุกลามของเชื้อ รา, ชนิดและโครงสร้างของปากใบ การที่ปากใบมีช่องแคบอาจทำให้พืชต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ ราที่เจาะผ่านพืชทางปากใบดีขึ้น ตลอดจนการปิด-เปิดของปากใบ ก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำให้ พืชต้านทานโรคด้วย

1.3.2 โครงสร้างป้องกันโรคหลังเชื้อเข้าสู่พืช

(defense structures after infection)

เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่พืชโดยเจาะผ่านโครงสร้างป้องกันของพืชที่อยู่ผิวนอกหรือภายในพืช
ก็

ตาม พืชจะแสดงปฏิกิริยาโต้ตอบทางโครงสร้างลักษณะต่างๆ ออกมาเป็นระดับความต้านทานโรค
ในการป้องกันการเจริญลุกลามของเชื้อ ปฏิกิริยาดังกล่าวมีดังนี้

1.3.2.1 การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อ โดยเกิดเนื้อเยื่อที่ประกอบ
ด้วยเซลล์เจริญเป็นชั้น cork (cork layers) ชั้นที่เกิดขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อและสารพิษที่เชื้อ
ขับถ่ายออกมาขยายวงกว้างออกไปอีก และยังระงับการไหลเวียนของน้ำและอาหารจากเนื้อเยื่อ
ปกติไปยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ทำให้เชื้อและเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วอยู่ในขอบเขตของแผลที่เห็นเป็น
จุดหรือพองพูนแยกส่วนออกมาจากเนื้อเยื่อปกติ

1.3.2.2 การเกิดการแตกปริของเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อส่วนที่ดีถูกตัดขาด
ออกจากบริเวณตัวเชื้อหรือบาดแผลที่เป็นโรค ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคและสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นลุกลาม
ไปยังเนื้อเยื่อปกติ, การเกิด tylose ในท่อ xylem เป็นในระหว่างที่เชื้อโรคเข้าทำลายท่อลำเลียง
พันธุ์พืชที่ต้านทานต่อโรคจะเกิด tylose ได้มากมายอย่างรวดเร็วก่อนที่เชื้อจะลุกลามไปถึง โดย
เชื้อยังเจริญอยู่แค่ส่วนราก หากเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค เชื้อจะเจริญไปถึงก่อนแล้วจึงเกิด tylose
ภายหลัง ทำให้ไม่สามารถกีดกันการลุกลามของเชื้อได้ พืชจึงเป็นโรครุนแรง

1.3.2.3 การสะสมยางเหนียวของเนื้อเยื่อ ทำให้เชื้อบางชนิดชะงักการเจริญ
ขยายขอบเขตออกไปไม่ได้จะถูกจำกัดอยู่เฉพาะในแผลและตายในที่สุด

1.3.3 การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเซลล์ (cellular defense structure)

ขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์ โดยเกิดได้ 2 แบบ คือ
เกิดการโป่งออกของเซลล์ epidermis และเซลล์ที่อยู่ใต้ epidermis ในระหว่างที่เชื้อแทงผ่านพืช
โดยตรงซึ่งอาจยับยั้งการแทงผ่านและการตั้งรกรากของเชื้อได้ และการเกิดเป็นปลอกห่อหุ้มเส้นใย
ของเชื้อราที่เริ่มแทงผ่านเซลล์

1.3.4 การป้องกันที่เกิดจากปฏิกิริยาของ cytoplasm (cytoplasmic defense reaction)

โดยที่ cytoplasm ไปคลุมกลุ่มของเส้นใยโดย nucleus ของพืชจะเคลื่อนตามไป
ด้วย แล้ว protoplasm ของเซลล์จะเริ่มจางหายไปในขณะที่เส้นใยของเชื้อเจริญเพิ่มขึ้น บางครั้ง
เซลล์ที่เชื้อเข้าทำลาย cytoplasm และ nucleus จะขยายใหญ่ขึ้น cytoplasm จะกลายเป็นเมล็ด
เด่นชัด เส้นใยของเชื้อสลายตัวเห็นเป็นส่วนๆ แล้วการเข้าทำลายก็หยุดลงในที่สุด (ไพโรจน์,
2525)

1.3.5 รอยไหม้ (necrosis) และการตายอย่างว่องไวของเซลล์ (hypersensitive cell death)

การเกิดรอยไหม้เป็นลักษณะที่เกิดจากการตายของเซลล์ตรงตำแหน่งที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อโรคหรือสารพิษต่างๆ โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล มักเป็นแบบแห้ง หรือมีแผลเป็นหย่อมๆ ถ้าพืชเกิดรอยไหม้อย่างว่องไวเมื่อถูกบุกรุกจากเชื้อก่อโรคจะเรียกการตอบสนองนี้ว่า “hypersensitive” อาการรอยไหม้พบทั่วไปตามบริเวณส่วนของพืชที่เป็นโรค ได้แก่ ขน ใบ ต้น โคน ราก หัว ผัก ผล ฯลฯ ขนาดของรอยไหม้จะมีขอบเขตกว้างหรือแคบ เกิดเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น ส่วนของพืช, ชนิดของพืชที่ถูกอาศัย, เชื้อที่บุกรุก, สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมต่างๆ อาการของรอยไหม้ที่พบทั่วไป เช่น อาการแบบเป็นจุดมักเกิดบนใบหรือผลตามปกติมีขนาดแผลประมาณ 1 หรือ 2 มิลลิเมตรจนถึง 1 เซนติเมตรขึ้นไป (ไพโรจน์, 2525) มีรูปร่างกลม เนื้อเยื่อตรงกลางแผลซึ่งตายแล้วจะทำให้เห็นโชนรอบๆ แผล อาจเป็นสีแดงหรือเหลือง เช่น โรคแอนแทรคโนสของถั่วฝักยาว แตงกวา แตงโม และฝ้าย นิโครซิสมีขนาดใหญ่กว่า 1 เซนติเมตร, โรคใบจุดนูน (*Colletotrichum leaf spot*) หรือลักษณะรอยไหม้ที่เป็นจุดนูนสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลืองลักษณะคล้ายรอยไหม้ แผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตรซึ่งเกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* หรือบางโรคอาจจะมีลักษณะเป็นรอยขีด (streak) ตามความยาวของใบ เส้นใบและลำต้น หรือไม้อาจมีลักษณะรอยไหม้เป็นจุดกลมและเป็นลายก้างปลาบนใบอ่อนและใบแก่เพราะเกิดการลุกลามไปตามเส้นใบ เป็นอาการของโรคใบจุดก้างปลา (*Corynespora leaf disease*) ที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassicola* (สถาปนวิชัยยาง, 2544)

Breton และคณะ (1997a) ได้นำเชื้อรา *C. cassicola* มาบ่มบนใบยางพารา พบว่าหลังจากบ่มเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง นิโครซิสที่เกิดขึ้นจากการเข้าทำลายใบยางด้วยสปอร์ มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างใบยางพันธุ์ต้านทาน (พันธุ์ GT1) กับพันธุ์อ่อนแอ (PB260) โดยที่นิโครซิสในใบยางพันธุ์ต้านทาน มีขนาดเล็กเป็นจุดๆ ซึ่งแสดงถึงการเกิด hypersensitive reaction โดยตรงกันข้ามกับนิโครซิสในใบยางพันธุ์อ่อนแอที่พบว่ามีความใหญ่ และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงนิโครซิสจะแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ จนทำให้เกิดรอยต่าง (discolor) บริเวณเส้นใบที่อยู่รอบๆ บาดแผลซึ่งแสดงถึงการเกิดโรคก้างปลา (fish bone) ทั้งนี้เนื่องจากใบยางพันธุ์ต้านทานแสดงถึงความสามารถในการกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียง ส่วนพันธุ์อ่อนแอการที่พบขนาดของนิโครซิสใหญ่และแผ่กว้างแสดงถึงการเกิดโรคคือ เกิดปฏิกิริยา compatible ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อนแอ ส่วนปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์ต้านทานเรียกว่า ปฏิกิริยา incompatible แต่ถ้ามีการเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อโรคปฏิกิริยานี้ก็สามารถ

เปลี่ยนเป็น compatible ได้เช่นกัน ดังนั้นลักษณะของนีโครซีส์ที่เกิดจากการตอบสนองของใบยางต่อเชื้อก่อโรคสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้

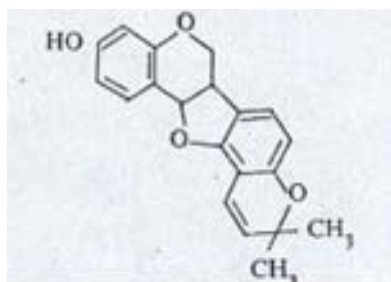
1.3.6 การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (Phytoalexin synthesis)

ไฟโตอเล็กซินเป็นปฏิชีวนะสารที่พืชสร้างขึ้นและมีพิษต่อเชื้อโรค (antimicrobial) มีมวลโมเลกุลต่ำ และมีธาตุคาร์บอน, ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบที่พบสะสมเฉพาะในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้น (stress) จากอิทธิพลของชนิดต่างๆทั้งไบโอติก (biotic) และอไบโอติก (abiotic) พบในตำแหน่งที่มีการบุกรุกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย (Darvill and Albersheim, 1984; Kuc', 1985) เช่น จากการบ่มดอกทานตะวันด้วยเชื้อรา *Helminthosporium carbonum* มีการสร้าง ayapin และ scopoletin ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. carbonum* ได้ (Tal and Robeson, 1986)

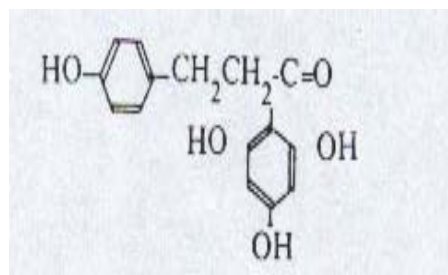
ไฟโตอเล็กซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะ ขึ้นอยู่กับพืชที่สร้างขึ้นจากการกระตุ้นของเชื้อ โดยไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งปฏิกิริยาเกิดในเนื้อเยื่อที่มีปฏิกิริยาอยู่และในเนื้อเยื่อของเซลล์ข้างเคียง อัตราการเกิดไฟโตอเล็กซินขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และกำเนิดในเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น (ไพโรจน์, 2525) เชื้อที่เป็นสาเหตุโรคจะกระตุ้นให้พืชสร้างไฟโตอเล็กซินได้ในอัตราความเข้มข้นต่ำกว่าเชื้อที่ไม่ได้เป็นสาเหตุโรค ไฟโตอเล็กซินที่พืชสร้างจะมีพิษต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนั้นน้อยกว่าเชื้อราอื่นๆ ที่ไม่ใช่สาเหตุโรค เช่น จากการศึกษาการสะสมไฟโตอเล็กซิน บริเวณอพิเดอร์มิสของใบถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบกับระหว่างเชื้อรา *Botrytis fabae* ที่ก่อให้เกิดโรคและเชื้อราที่ไม่ใช่สาเหตุโรคคือ *Botrytis cinerea* พบว่าถ้าเป็นเชื้อที่ก่อโรคเส้นใยของเชื้อราจะเจาะผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ได้เร็ว และเกิดการตายของเซลล์พืชก่อนที่จะมีการสะสมไฟโตอเล็กซินได้มากพอเพื่อใช้ในการต้านทาน แต่เชื้อราที่ไม่ได้ทำให้เกิดโรคถูกหยุดการเจริญเติบโตทันที เพราะมีการสะสมไฟโตอเล็กซินจำนวนมาก (Darvill and Albersheim, 1984) และนอกจากนี้เชื้อราที่แตกต่างกันจะมีปฏิกิริยาในระดับที่แตกต่างกัน ในพืชพันธุ์ต้านทานโรคหรือพืชที่เป็นโรคนั้นมีการเกิดไฟโตอเล็กซินคล้ายกัน แต่แตกต่างกันที่อัตราการเกิดเท่านั้น อย่างเช่นที่พบในการปลูกเชื้อ *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* บนใบ *Plane tree* ที่เป็นพันธุ์ต้านทาน (*Platanus occidentalis*) และพันธุ์อ่อนแอ (*Platanus acerifolia*) สามารถชักนำให้เกิดนีโครซีส์และการสะสมไฟโตอเล็กซินได้สองชนิดคือ scopoletin และ umbelliferone การสะสมไฟโตอเล็กซินในปฏิกิริยา incompatible (พันธุ์ต้านทาน) มากกว่าในปฏิกิริยา compatible (อ่อนแอ)

ประมาณ 30 เท่าจากการหยดบนหลังใบ และประมาณ 120 เท่าในการสะสมภายในเนื้อเยื่อของเซลล์ (Modafar, 1995) และอิลิซิทินจากเชื้อรา *Puricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*) กระตุ้นเซลล์ชั้นพินของข้าวให้มีการสะสมไฟโตอเล็กซินได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้ใบเลี้ยงยอดอ่อนของถั่วเหลืองสะสมไฟโตอเล็กซินได้

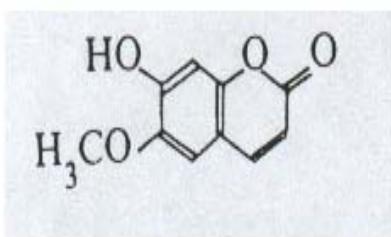
ไฟโตอเล็กซินสามารถแยกออกมาจากลำต้น ราก ใบและผล ที่เกิดจากการติดเชื้อมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันมากกว่า 350 แบบ จากพืช 30 ชนิดซึ่งมากกว่า 130 แบบ มาจากพืชวงศ์ Leguminosae พบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledons) และพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledons) มีชื่อเฉพาะใช้เรียกแตกต่างกัน (Kuc', 1995) เช่น phaseollin พบในถั่วเมล็ดแบนต่างๆ, phloretin พบในแอปเปิล, scopoletin พบในมันเทศและยางพารา และ rishitin พบในมันฝรั่ง เป็นต้น (รูปที่ 7) (ไพโรจน์, 2525)



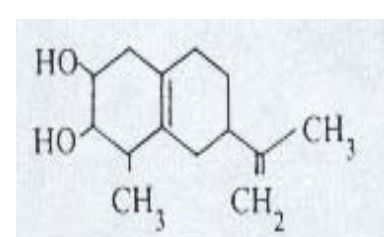
Phaseollin พบในถั่วเมล็ดแบนต่างๆ



Phloretin พบในแอปเปิล



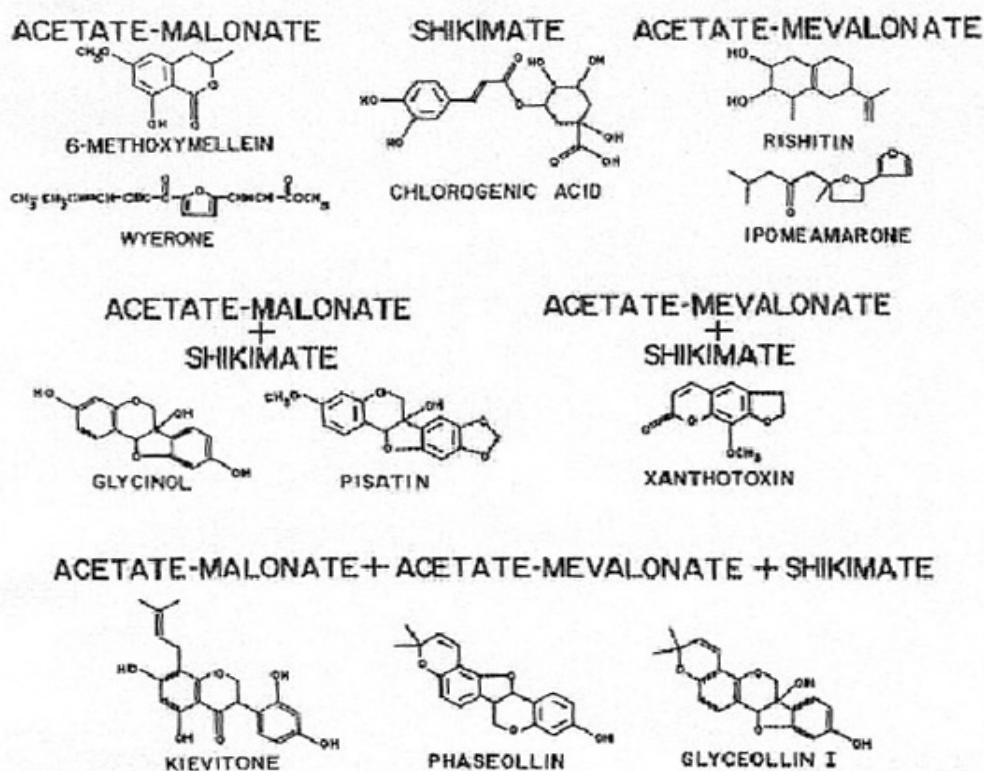
Scopoletin พบในมันเทศและยางพารา



Rishitin พบในมันฝรั่ง

รูปที่ 7 ตัวอย่างโครงสร้างของไฟโตอเล็กซินที่พืชสร้างขึ้น เพื่อตอบโต้การเข้าทำลายของเชื้อรา
(ที่มา : ดัดแปลงจากไพโรจน์, 2525)

วิธีการสังเคราะห์ไฟโตเล็กซินในพืชทุกชนิดอาศัยเมแทบอลิซึมของ shikimate, acetate-malonate และ acetate-mevalonate ซึ่งเป็นวิถีเมแทบอลิซึมแบบทุติยภูมิ (secondary metabolism pathways) โดยวิถี shikimate ถูกนำไปสังเคราะห์ chlorogenic acid, วิถี acetate-mevalonate ถูกนำไปสังเคราะห์ 6-methoxymellein และ wyerone ส่วนวิถี acetate-mevalonate ถูกนำไปสังเคราะห์ rishitin และ ipomeamarone สำหรับไฟโตเล็กซินบางชนิดต้องอาศัยวิถีการสังเคราะห์ร่วมกันสองถึงสามวิถี ตัวอย่างเช่น จากวิถี acetate-mevalonate ร่วมกับวิถี shikimate ใช้สังเคราะห์ glycinol และ pisatin ส่วนวิถี acetate-malonate, acetate mevalonate และ shikimate วิถีทั้งสามทำให้เกิดการสังเคราะห์ kievitone, phaseollin และ glyceollin I เป็นต้น (รูปที่ 8) (Kuc', 1995)



รูปที่ 8 ตัวอย่างวิถีที่นำไปสู่การสังเคราะห์ไฟโตเล็กซิน
(ที่มา : Kuc', 1995)

สำหรับในยางพาราการตอบสนองในการป้องกันตัวเองพบครั้งแรกในปี 1975 โดย Tan และ Low พบว่าหลังจากปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ลงบนใบยางพารา ใบยางพาราจะตอบสนองโดยการกระตุ้นให้เซลล์บริเวณที่กำลังติดเชื้อสังเคราะห์ไฟโตเอเล็กซินเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งไฟโตเอเล็กซินที่ใบยางสังเคราะห์ขึ้นสามารถเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต ต่อมา Giesemann และคณะ (1986) ได้ทำการวิเคราะห์ไฟโตเอเล็กซินที่ใบยางพาราสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อต้านเชื้อ *Microcyclus ulei* พบว่าระดับการต้านทานสัมพันธ์กับความเร็วและปริมาณการสะสมสคอพอลิติน โดยในพันธุ์ที่ต้านทานมีการสะสมสคอพอลิตินสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Garcia *et al.*, 1995 b) รวมทั้งสร้างได้เร็วกว่าพันธุ์อ่อนแอ สคอพอลิตินสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของโคนิเดียม (conidium) ซึ่งเป็นสปอร์ของเชื้อรา *M. ulei* ได้ เช่นเดียวกับที่รายงานโดย Churngchow และ Rattarasam (2001) โดยการบ่มเชื้อรา *P. palmivora* ลงบนใบยาง 4 พันธุ์ ได้แก่ BPM-24, PB-235, RRIT251 และ RRIM600 สามารถบอกความแตกต่างของระดับความต้านทานโรคโดยอาศัยอัตราเร็วกับปริมาณของสคอพอลิตินที่เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อซึ่งพบว่าพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) และ PB235 (ค่อนข้างต้านทาน) สามารถสังเคราะห์ปริมาณไฟโตเอเล็กซินได้เร็วและมีปริมาณในการสังเคราะห์สูงกว่าพันธุ์ RRIT251 (ปานกลาง) และ RRIM600 (อ่อนแอ)

1.3.7 การสังเคราะห์ Pathogenesis – related proteins (PR-proteins)

PR-proteins เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายให้กับตนเอง จากการรุกรานของเชื้อโรคหรือจากการกดดันด้วยสารเคมี (chemical treatments) และฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมถึงการถูกกดดันจากการเกิดบาดแผล (wounding) และอิทธิพลของฮอร์โมนต่างๆ โดยทั่วไปในพืชชั้นสูงมีการสะสม PR-proteins เพื่อทำหน้าที่ต่อต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคหรือไวรัส (Kitajima and Sato, 1999)

PR-proteins ที่พืชสร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ โดยการสร้างเอนไซม์สำหรับทำหน้าที่เป็น PR-proteins นั้นเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจงแต่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อหรือถูกกดดันเท่านั้นไม่ใช่มาจากการควบคุมปกติของยีนพันธุกรรม ส่วนใหญ่ป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์ปานกลางถึงต่ำและมักไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคใด (Legrand *et al.*, 1987)

เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสและไคติเนส เป็น PR-proteins ที่มีบทบาทสำคัญ

ในการต้านทานโรคในพืช สามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อราต่างๆ โดยการย่อยสลายผนังเซลล์ในส่วนที่เป็นเบต้า-1, 3-กลูแคนและไคตินตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีการติดเชื้อ เช่น ใบยาสูบ, ข้าวบาร์เลย์และมันฝรั่ง เป็นต้น เอนไซม์ไคตินเนสซึ่งเตรียมได้จากข้าวบาร์เลย์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma reesei*, *Alternaria alternaria*, *Phycomyces blakesleesusus* และ *Neurospora crassa* (Robert and Selitrennikoff, 1986)

Mauch และคณะ (1988a) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบคู่กับเอนไซม์ไคตินเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากฝักถั่วลิ้นเต้าที่ถูกรุกรานด้วยเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Fusarium phasioli* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 15 ชนิดใน 18 ชนิดที่ทดสอบ แต่ถ้าใช้เอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสเพียงอย่างเดียว จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เฉพาะเชื้อรา *F. solani* และ *Fusarium pisi* เท่านั้น ดังนั้นเบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคตินเนสในถั่วจึงสามารถทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Mauch *et al.*, 1988b) และถูกยับยั้งการสร้างเมื่อใช้ออกซินและไซโตไคนิน (Shinshi *et al.*, 1987) แสดงว่าเอนไซม์ทั้งคู่นอกจากจะทำงานร่วมกันแล้วยังถูกควบคุมด้วยกลไกที่คล้ายคลึงกัน

Martin (1991) ได้แยกเอนไซม์ไคตินเนสให้บริสุทธิ์จากน้ำยางพาราและพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสสูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด ในขณะที่พืชทั่วไปมีไคตินเนสเพียง 1 – 2% ของโปรตีนทั้งหมดเท่านั้น นอกจากนี้ Churngchow และคณะ (1995) รายงานว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสก็มีปริมาณสูงเช่นเดียวกันโดยสูงถึง 15% ของโปรตีนทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากต้นยางพาราถูกกรีดทุกวัน หนัวยางถูกเปิดออกทำให้เชื้อราผ่านเข้าไปตามท่อน้ำยางได้ง่าย ดังนั้นเพื่อป้องกันเชื้อรา เอนไซม์ทั้งสองจึงถูกสร้างขึ้นตลอดเวลาโดยไม่ต้องมีการกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อเหมือนในพืชอื่นๆ นอกจากนี้การเกิดบาดแผลจากการกรีดก็อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณโปรตีนดังกล่าวสูงกว่าพืชทั่วไป และจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ในน้ำยางพันธุ์ RRIM600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคต่ำและให้ชื่อว่า GI และ GII ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ GT1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูงกว่า พบว่ามี 2 ไอโซไซม์เช่นกันแต่พบในปริมาณที่แตกต่างกัน กล่าวคือพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณ GI : GII = 3 : 1 และพันธุ์ GT1 มีปริมาณ GI : GII = 1 : 7 ดังนั้น GII อาจเป็นไอโซไซม์ที่มีบทบาทในการต้านทานการเกิดโรคของต้นยาง (Churngchow *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mauch และคณะ (Mauch *et al.*, 1988a) ซึ่งพบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากถั่วเพียงหนึ่งไอโซไซม์ที่สามารถต้านเชื้อรา ส่วนอีกไอโซไซม์เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (maturation) เท่านั้น

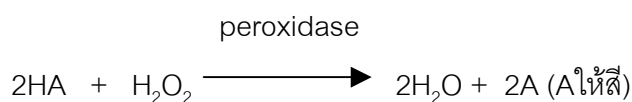
จากการศึกษาของ Parijs และคณะ (1991) พบว่า hevein ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กในน้ำยางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ และเมื่อต้นยางเกิดบาดแผลหรือกระตุ้นด้วยเอทิลีนจะทำให้ยีนของ hevein แสดงออกมากขึ้น (Broekaert *et al.*, 1990) ส่วน Kush และคณะ (1990) พบว่ายีนของโคติเนสและยีนอื่นๆ ซึ่งจัดเป็น plant defense gene ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase, chalcone synthase, chalcone isomerase และ 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase แสดงออกในเซลล์น้ำยาง (laticifers) มากกว่าในใบยางประมาณ 10-50 เท่า และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมีปริมาณเพิ่มขึ้นในน้ำยาง เมื่อต้นยางถูกทำลายด้วยสารเอเทรล (ethrel) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถปลดปล่อยก๊าซเอทิลีนออกมาหลังจาก จากข้อมูลในยางพาราพอสรุปได้ว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโคติเนส ในน้ำยางถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นโดยสภาวะกดดันจากการเกิดบาดแผลหรือจากการกระตุ้นด้วยเอทิลีน และเอนไซม์ทั้งคู่อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของต้นยาง แม้ว่าในพืชบางชนิดเช่นมะเขือเทศ เอนไซม์ทั้งคู่เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อรา (Hedrick *et al.*, 1988) แต่ในพืชบางชนิด เช่น ถั่ว บางไอโซไซม์ของเบต้า-1,3-กลูคาเนสและโคติเนสไม่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (Mauch *et al.*, 1988b)

สำหรับการทดลองกับเชื้อรา *C. cassiicola* พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโคติเนสถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการถูกรุกราน แต่ปริมาณการสังเคราะห์ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ไฟโตเอเล็กซิน เนื่องจากใบยางพาราทั้งพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอถูกชักนำให้สร้างเอนไซม์ทั้งสองในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งมีบทบาทในการป้องกันตัวเองของพืชเช่นกันจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นในปริมาณที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใบยางพันธุ์ต้านทานมีปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอประมาณ 2 เท่า (Breton *et al.*, 1997a)

1.3.8 การสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสมีการศึกษาครั้งแรกในหัวผักขาดขาว (Horseradish) โดย Theorell และคณะ (1942) โดยในปี 1985 Pual ได้ใช้ CM-celulose chromatography แยกไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสได้ทั้งหมด 5 ไอโซไซม์ ได้แก่ A,B,C,D และ E ต่อมาในปี 1966 Shannon และคณะ ได้ใช้ DEAE-cellulose chromatography แยกไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดส A ได้ 3 ไอโซไซม์ ได้แก่ A1, A2 และ A3 พจนมาลย์ สุรนิลพงค์ (2538) ทำการศึกษาคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุใบร่วงของยางพาราโดยใช้แคลลัสของยางพาราพันธุ์พื้นเมือง ศึกษาผลของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสต่อการตอบสนองการต้านทานต่อสารจากเชื้อรานี้เมื่อวิเคราะห์บนแผ่น polyacrylamide gel พบว่า แคลลัสที่ไม่ป่มด้วยเชื้อรานี้

จะพบไฮโซไซม์เปอร์ออกซิเดส 2 ไฮโซไซม์ และแคลลัสที่บ่มด้วยเชื้อรานี้พบไฮโซไซม์เปอร์ออกซิเดส 4 หรือ 6 ไฮโซไซม์ ส่วนพัชรากร รัตนภูมิ (2543) ได้รายงานว่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่แยกด้วยวิธี Native-PAGE และ SDS-PAGE มีลักษณะคล้ายคลึงกันโดยที่ก่อนแยกบริสุทธิ์มีปริมาณ 5 ไฮโซไซม์ และหลังจากผ่านการแยกบริสุทธิ์จะเหลือ 2 หรือ 3 ไฮโซไซม์ เปอร์ออกซิเดส : Peroxidase (EC:1.11.1.7 donor H₂O₂ oxidoreductase) เป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ที่มีฮีโมเกาะติดอยู่หรือเป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) จับกับเอนไซม์อย่างแน่นด้วยพันธะโควาเลนต์ เปอร์ออกซิเดสสามารถใช้ H₂O₂ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและออกซิไดส์สารประกอบอินทรีย์ที่ให้อิเล็กตรอนกลายเป็นผลผลิตที่ให้สีและ H₂O ออกมาได้ด้วยสมการ



เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสพบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่ายเซลล์เดียวจนถึงพืชชั้นสูงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีเปอร์ออกซิเดสอยู่ในอวัยวะและเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น หัวใจ ตับ ปอด ตา สมองและเนื้อเยื่อไขมัน ส่วนพืชพบเปอร์ออกซิเดสในส่วนต่างๆเช่น เมล็ด ราก ลำต้น เปลือกของลำต้น ใบ ผล และอยู่ในส่วนต่างๆของเซลล์ เช่น ในผนังเซลล์ ไซโทซอล คลอโรพลาสต์ โดยอาจอยู่ในรูปของสารละลายอิสระหรือจับกับผนังเซลล์ด้วยพันธะไอออนิกหรือพันธะโควาเลนต์ ซึ่งปล่อยออกมานอกเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์ไฮโซไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะกับสับสเตรทต่างๆ กัน เช่น ascorbate, pyrogallol, o-dianisidine, guaiacol และในปี 1989 Geiger และคณะ พบว่ารากของยางพาราที่ติดเชื้อรา *Rigidoporous lignosus* จะมีการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าปกติ

พืชชนิดหนึ่งๆ จะมีการสร้างเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาหลายไฮโซไซม์เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ช่วยซ่อมแซมผนังเซลล์โดยจะเร่งกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน (lignin), ซูเบอร์ิน (suberin) เพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อไม้ (Van Huystee and Zheny, 1993) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. infestans* ได้ (Friend et al., 1973) ในยางพาราการกักบริเวณไม่ให้เชื้อ *M. ulie* ลูกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงโดยลิกนินเป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งในการต้านเชื้อรานี้ (Garcia et al., 1995b) บางไฮโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต และการขยายตัวของเซลล์,

เมแทบอลิซึมของออกซิน, เมแทบอลิซึมของอัลคาลอยด์ โดย Pomer และคณะ (1997) พบว่า อะซิดิกและเบสิกเปอร้ออกซิเดสมีบทบาทเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของอัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสีผิวของผลไม้ โดยตรวจพบเปอร้ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในส่วนของเปลือกหุ้มรังไข่ที่โตเต็มที่ทั้ง 3 ชั้น คือ epicarp, mesocarp และ endocarp แสดงว่าเอนไซม์นี้มีความสำคัญในการเปลี่ยนสีผิวทำให้ผลไม้สีน้ำตาล Breton และคณะ (1997a) พบว่าในใบยางพาราที่ถูกกรุกรานด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* ซึ่งก่อให้เกิดโรคใบจุดและใบร่วงในยางพารา เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย isoelectric focusing พบว่าอะซิดิกและเบสิกเปอร้ออกซิเดสมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นในใบยางพาราพันธุ์ด้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ ดังนั้นเปอร้ออกซิเดสจึงจัดว่ามีส่วนในการป้องกันตัวเองของพืชด้วย จากการศึกษาของ Largrimini และ Rothstein (1987) พบว่าเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของยาสูบ เช่น ใบ ราก พืช (pith) ของลำต้นและแคลลัส พบเปอร้ออกซิเดสที่มีลักษณะเฉพาะตัวที่แตกต่างกันโดยในรากมีทั้งหมด 12 ไอโซไซม์ ในแคลลัสมี 8 ไอโซไซม์ ในใบมี 5 ไอโซไซม์และในพืชมมี 4 ไอโซไซม์

1.4 อิลิซิดิน

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Phytophthora* ทุกสปีชีส์และเชื้อ *Pythium* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำลายพืชเศรษฐกิจสำคัญๆ ในอาหารเหลวที่เหมาะสม เชื้อราจะผลิตโปรตีนชนิดหนึ่งที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular protein) จึงพบโปรตีนชนิดนี้ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) และให้ชื่อรวมว่า อิลิซิดิน (elicitins) (Huet and Pernollet, 1989) โดยโปรตีนเหล่านี้จะกระตุ้นใบที่ติดเชื้อให้เกิดรอยแผล (necrosis) เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อมีโอกาสบุกรุกเข้าทำลายส่วนอื่นๆ ของพืชและยังกระตุ้นการเกิด systemic acquired resistance (SAR) กระบวนการเกิดทั้งสองลักษณะนี้เป็นการตอบสนองขั้นพื้นฐานเมื่อมีเชื้อโรคเข้ามาบุกรุกทำลาย (www.interpro)

อิลิซิดินเป็นโปรตีนพิษ (toxin) โมเลกุลมีขนาดเล็ก โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 เรซิดิว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 แห่ง โมเลกุลของอิลิซิดินจะไม่ถูกเติมน้ำตาล และโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ประมาณ 50% เป็นเกลียวอัลฟา (α -helix) พบแผ่นพับที่เบต้า (β -pleated sheet) น้อยมากหรือบางชนิดไม่พบเลย (Huet *et al.*, 1992; Nespoulous *et al.*, 1992 ; Huet and Pernollet, 1993)

อิลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรากรากลุ่ม *Phytophthora* ทุกสปีชีส์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 เรซิดิว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันประมาณ 10 กิโลดาลตัน แต่จะแตกต่างกันที่ลำดับกรดอะมิโนในโมเลกุลอิลิซิดินเท่านั้น

อิทธิฤทธิ์กลุ่มแรกที่มีการศึกษากรรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบและการจัดลำดับกรรดอะมิโนในโมเลกุลของโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์ คือ cryptogin, capsicein และ cinnamomin ซึ่งเตรียมให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. cryptogea*, *P. capsici* และ *P. cinnamomi* ตามลำดับ (Huet and Pernollet, 1989; Ricci *et al*, 1989) พบว่า อิทธิฤทธิ์ทั้งสามชนิดมีความอนุรักษ์ (conserve) ในการจัดลำดับกรรดอะมิโนในโมเลกุลและมีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 80% โดยเฉพาะบริเวณส่วนกลางโมเลกุล (central core) ส่วนที่แตกต่างกันคือ การเรียงตัวของกรรดอะมิโนบริเวณปลาย NH_2 และปลาย COOH ของสายเปปไทด์

ต่อมานักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่ม สามารถสกัดอิทธิฤทธิ์ให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Phytophthora* สปีชีส์อื่นๆ และตรวจสอบหาคุณสมบัติด้วย เช่น parasiticein จาก *P. parasitica* (Nespoulous *et al*, 1992; Ricci *et al*, 1992) Dre β และ Dre α จาก *P. drechsleri* (Huet *et al*, 1992) MgM β และ MgM α จาก *P. megasperma* (Huet *et al*, 1993) cactorein จาก *P. cactorum* (Huet *et al*, 1993; Dubery *et al*, 1994) และ palmivorein จาก *P. palmivora* (Chungchow and Rattarasarn, 2000) ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นโปรตีนที่มีจำนวนกรรดอะมิโนเท่ากับ 98 เรซิดิวซ์ น้ำหนักโมเลกุล 10 กิโลดาลตัน แต่มีองค์ประกอบของกรรดอะมิโนและการจัดลำดับกรรดอะมิโนที่แตกต่างกัน จึงทำให้ประจักษ์คุณสมบัติแตกต่างกัน (Bonnet *et al*, 1996)

1.4.1 คุณสมบัติของอิทธิฤทธิ์

อิทธิฤทธิ์มีคุณสมบัติเป็นอิทธิฤทธิ์เตอร์ (elicitor) คือ สารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองต่างๆ ในพืช ซึ่งได้แก่ การสะสมไฟโตลิกซิน การสังเคราะห์ PR-proteins และการตายของเซลล์หรือเนโครซิส (necrosis) อิทธิฤทธิ์เตอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ 1) ไบโอดีคอิทธิฤทธิ์เตอร์ (biotic elicitor) ได้มาจากเชื้อโรคต่างๆ และสามารถจำแนกตามโครงสร้างพบว่ามีทั้งที่เป็น polypeptide polysaccharide glycoprotein chitosan และ fatty acid 2) อไบโอดีคอิทธิฤทธิ์เตอร์ (abiotic elicitor) ได้แก่ แสง รังสีอัลตราไวโอเล็ตและไอออนของโลหะหนัก (Darvill and Albersheiml, 1984)

อิทธิฤทธิ์จัดเป็นไบโอดีคอิทธิฤทธิ์เตอร์ที่มีโครงสร้างเป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) เมื่อนำอิทธิฤทธิ์มาทดสอบกับเซลล์แขวนลอยของยาสูบ พบว่าอิทธิฤทธิ์สามารถกระตุ้นเซลล์แขวนลอยให้เกิดการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive response) จึงทำให้เซลล์แขวนลอยมีระดับความเป็นต่างและค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้เซลล์แขวนลอยของยาสูบยังสามารถสังเคราะห์เอทิลีนและแคปซิดิโอล (capsidiol) ซึ่งเป็นไฟโตลิกซินชนิดหนึ่ง ความว่องไวทางชีวภาพของอิทธิฤทธิ์ถูกกำจัดได้โดยเอนไซม์ (pronase) ของพืช นอก

จากอิลิซิตินจะสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองในยาสูบแล้ว ยังสามารถกระตุ้นให้ยาสูบเกิดความต้านทาน (acquired resistance) ต่อเชื้อรา *P. parasitica* var. *nicotianae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคแห้งดำในยาสูบ (black shank disease) ด้วย โดยสามารถป้องกันตนเองจากการบุกรุกของเชื้อชนิดนี้ (Ricci *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังชักนำให้หัวผักกาดแดง (radish) ต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุของโรคใบจุดอีกด้วย (Kamoun *et al.*, 1993)

อิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้พืชตระกูลมะเขือ (Solanaceae) และตระกูลกะหล่ำ (Cruciferae) ตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ โดยพืชตระกูล Solanaceae จะตอบสนองต่ออิลิซิตินเฉพาะกลุ่มที่มีความจำเพาะเจาะจงเท่านั้น เช่น ยาสูบ (*Nicotiana*) ทุกสปีชีส์ ส่วนพืชตระกูล Cruciferae ตอบสนองต่ออิลิซิตินเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น เช่น หัวผักกาดขาว (turnip) และหัวผักกาดแดง (radish) แต่อิลิซิตินไม่สามารถกระตุ้นให้พืชตระกูลเบญจมาศ (Compositae) พืชวงศ์ (Leguminosae) และพืชตระกูลแตง (Cucumbitaceae) เกิดการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอิลิซิตินเป็นอิลิซิเตอร์ที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัย (host) (Kamoun *et al.*, 1993)

Chungchow และ Rattarasarn (2000) รายงานว่า palmivorein ซึ่งเป็นอิลิซิตินที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* สามารถทำให้ใบยางพาราและใบยาสูบเกิดอาการเหี่ยว น้ำหนักใบลดลงและเกิดอาการนีโครซีสได้ โดยอาการนีโครซีสที่เกิดขึ้นจะถูกจำกัดขอบเขตแน่นอนในใบยางพันธุ์ต้านทาน BPM-24 และใบยาสูบ ทั้งนี้เนื่องจากพันธุ์ต้านทานเมื่อถูกกระตุ้นจะมีการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ บ่งชี้ถึงความสามารถในการต้านทานโรค (incompatibility) ส่วนใบยางพันธุ์อ่อนแอ RRIM600 ไม่สามารถควบคุมขอบเขตนีโครซีสได้ จึงตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยทำให้เกิดโรคหรือไม่สามารถต้านทานโรคได้ (compatibility) ส่วนใบยาสูบตอบสนองต่อ palmivorein แบบ incompatibility เนื่องจากยาสูบไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อรา *P. palmivora* นอกจากนี้พบว่า Zhao และ Sakai (2003) ศึกษาพบว่า ยีสต์อิลิซิเตอร์ (yeast elicitor, YE) สามารถกระตุ้นเซลล์ชั้นผิวของ *Cupressus lusitanica* ให้มีการสะสม β -thujaplicin ซึ่งเป็นปฏิชีวนะสารที่มีพิษต่อต้านเชื้อรา (antimicrobial) รวมทั้ง Daayf และคณะ (2003) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedimis* (Foa) สามารถกระตุ้นให้แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มพันธุ์ต้านทาน (BSTN) มีการสะสมไฟโตเอเล็กซินในปริมาณสูงกว่าแคลลัสปาล์มพันธุ์อ่อนแอ (JHL) ได้ด้วย

1.4.2 ชนิดของอิลิซิติน

อิลิซิตินสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแอลฟา (α -class) และกลุ่มเบต้า (β -class) โดยอาศัยลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence), องค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition), จุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point; pI) และดัชนีไฮโดรพาที (hydropathy index) ซึ่งบ่งชี้ถึงบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิกของโปรตีน โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ที่สอดคล้องกับความว่องไวทางชีวภาพ

1.4.2.1 กลุ่มแอลฟา

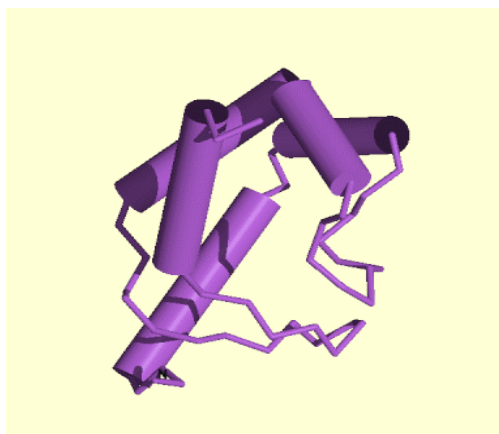
เป็นอิลิซิตินที่มีสภาพเป็นกรด (acid elicitin) มีค่า pI ประมาณ 4.5 (Berre *et al.*, 1994) มีกรดอะมิโนแวลีน (valyl residue) ที่ตำแหน่ง 13 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้แยกความแตกต่างของอิลิซิตินได้ดีที่สุด เนื่องจากแขนงข้าง (side chain) ของเรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 13 นี้สัมพันธ์กับความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิตินมากกว่าตำแหน่งอื่นๆ จากการหาโครงสร้างของอิลิซิตินในสภาพสามมิติโดยอาศัยเทคนิค nuclear magnetic resonance (Bouaziz *et al.*, 1994) พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 13 อยู่บริเวณผิวนอกของโมเลกุล ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของกรดอะมิโนในการทำงานของโปรตีน รวมถึงดัชนีไฮโดรพาทีและบริเวณที่ทำงานได้ (active site) หรือบริเวณควบคุม (regulatory site) (Huet *et al.*, 1992) ดังนั้นกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 13 จึงมีผลต่อความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่างอิลิซิตินกับตัวต่อรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย (Donohue *et al.*, 1995) ตัวอย่างของกลุ่มแอลฟาอิลิซิตินเช่น capsicein, parasiticein, palmivorein, Dre α , MgM α และ cactorein เป็นต้น

1.4.2.2 กลุ่มเบต้า

เป็นอิลิซิตินที่มีสภาพเป็นเบส (basic elicitin) มีค่า pI ประมาณ 8.5 (Berre *et al.*, 1994) มีกรดอะมิโนไลซีน (lysyl residue) ที่ตำแหน่ง 13 (Donohue *et al.*, 1995) ตัวอย่างเช่น cryptogein, Dreß, MgMß และ cinnamomin เมื่อใช้ความเข้มข้นของอิลิซิตินที่เท่ากันในการทดสอบกับใบยาสูบ พบว่า อิลิซิตินกลุ่มเบต้าสามารถกระตุ้นให้ใบยาสูบเกิดการตอบสนองได้มากกว่าอิลิซิตินกลุ่มแอลฟาประมาณ 100 เท่า (มีลักษณะโครงสร้างของอิลิซิติเตอร์จากเชื้อรา *P. cryptogea* ในรูปที่ 9 (Zanetti *et al.*, 1992; MEDLINE:PUB00004861) สังเกตได้จากรอยไหม้สีน้ำตาลหรือนิโครซีส โดยใบยาสูบที่ทดสอบด้วยอิลิซิตินกลุ่มเบต้าจะมีนิโครซีสขนาดใหญ่ แต่บริเวณกว้าง ส่วนใบยาสูบที่ทดสอบด้วยอิลิซิตินกลุ่มแอลฟาจะมีนิโครซีสขนาดเล็ก (Kamoun *et al.*, 1993) แสดงให้เห็นถึงความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากลำดับของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกันนั่นเอง ดังนั้นการปรับเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนของอิลิซิติน จึงมีผลทำให้ความว่องไวทางชีวภาพเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Ricci *et al.*, 1989) จากผลการทดลองติดฉลากกัมมันตรังสี (radioactive label) บนโมเลกุลของอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ (movement) ของอิลิซิตินภายในเซลล์ของใบยาสูบ (*in vivo*) พบว่า อิลิซิตินทั้งสองกลุ่มสามารถเคลื่อนที่จากบริเวณก้านใบเข้าไปยังบริเวณปลายใบได้โดยไม่ต้องอาศัยโมเลกุลใดๆ ในใบยาสูบเป็นตัวช่วยนำพาไปและสามารถเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วเดียวกันกับอัตราเร็วของของเหลวภายในเซลล์ แม้ว่าอิลิซิตินจะทำให้เซลล์เสียสภาพสมดุลก็ตาม ดังนั้นการที่อิลิซิตินทั้งสองกลุ่มทำให้เกิดนิโครซีสที่แตกต่างกัน จึงไม่เกี่ยวข้องกับ การเคลื่อนที่ของอิลิซิตินภายในเซลล์ แต่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะบริเวณที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์เป้าหมาย (Zanetti *et al.*, 1992) Donohue และคณะ (1995) รายงานว่าเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 13 ของ cryptogein จากกรดอะมิโนไลซีนเป็น

กรดอะมิโนแวลีน พบว่า cryptogein ที่ถูกเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนมีความว่องไวทางชีวภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากตำแหน่งที่ 13 ของอิลิซิตินกลุ่มแอลฟาเป็นกรดอะมิโนแวลีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดอะลิฟาติก (aliphatic) แขนงข้าง (side chain) หรือ R group จึงมีลักษณะไม่โพลาร์ (nonpolar) และไม่แตกตัว ดังนั้นจึงมักซ่อนอยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีน เพราะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ส่วนอิลิซิตินกลุ่มเบต้าตำแหน่งที่ 13 คือ ไลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดเบสิก (basic) แขนงข้างจึงมีลักษณะโพลาร์และแตกตัวได้ ค่า pK_a ของไลซีนเท่ากับ 10.5 จึงมักพบอยู่ที่บริเวณผิวนอกของโปรตีนเพราะชอบน้ำ (hydrophilic) จึงมีผลทำให้อิลิซิตินกลุ่มเบต้ามีความเป็นพิษมากกว่าอิลิซิตินกลุ่มแอลฟา นอกจากตำแหน่งที่ 13 แล้วตำแหน่งที่ 2, 14, 72 และ 94 ก็มีบท

บาทเกี่ยวข้องกับควมว่องไวของอิลิซิดินเช่นกันแต่น้อยกว่าตำแหน่งที่ 13 (Donohue *et al.*, 1995)



รูปที่ 9 โครงสร้างผลึกของอิลิซิดินเตอร์จากเชื้อรา *P. cryptogea*
(ที่มา : www.interpro)

จากการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบพบว่า อิลิซิดินทั้งสองกลุ่ม จะมีกรดอะมิโนลูซีน (Leu) เซรีน (Ser) ธรีโอนีน (Thr) และอะลานีน (Ala) เป็นองค์ประกอบประมาณ 50% ของสายเปปไทด์ และไม่พบกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Trp) ฮิสติดีน (His) และอาร์จินีน (Arg) (Yu, L. 1995) เชื้อรา *Phytophthora* บางสปีชีส์จะผลิตเฉพาะแอสติคอิลิซิดินเพียงกลุ่มเดียว เช่น parasiticein จาก *P. parasitica* (Nespoulous *et al.*, 1992; Ricci *et al.*,

1992) cactorein จาก *P. cactorum* (Huet *et al.*, 1993; Dubery *et al.*, 1994) และ palmivorein จาก *P. palmivora* (Chungchow and Rattarasarn, 2000) บางสปีชีส์ก็สามารถผลิตได้ทั้งสองกลุ่ม เช่น *P. drechsleri* สามารถผลิตอิลิซิตินได้สองไอโซฟอร์มเป็นแอสติค (Dre α) และเบสิก (Dre β) อย่างละหนึ่งไอโซฟอร์ม มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนถึง 92% แต่เบต้าอิลิซิตินกระตุ้นให้ใบยาสูบเกิดนิโครซิสมากกว่าแอลฟาอิลิซิติน (Huet *et al.*, 1992) ต่อมา Huet และคณะ (1993) ได้รายงานว่ *P. megasperma* ก็สามารถผลิตอิลิซิตินได้สองไอโซฟอร์มเช่นกันเป็นแอสติค (MgM α) และเบสิก (MgM β) อย่างละหนึ่งไอโซฟอร์มมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน 86.7% และพบว่า MgM β มีความเป็นพิษน้อยกว่าเบต้าอิลิซิตินตัวอื่นๆ จากการศึกษาคโครงสร้างปฐมภูมิของ MgM β ทำให้ทราบว่าที่ตำแหน่ง 5, 57 และ 61 ของ MgM β มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับแอลฟาอิลิซิติน ซึ่งทำให้ MgM β มีความเป็นพิษน้อยลงแสดงว่าความว่องไวของอิลิซิตินไม่ได้ขึ้นกับตำแหน่งที่ 13 เพียงอย่างเดียวแต่ขึ้นกับตำแหน่งที่ 5 และ 57-65 ด้วย (Huet *et al.*, 1993)

นอกจากนี้ *P. cryptogea* ก็เป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตอิลิซิติน

ได้มากกว่าหนึ่งฟอร์มคือ เป็นแอสติคสองฟอร์มและเบสิกอีกหนึ่งฟอร์ม โดยที่ 95% เป็นเบสิกอิลิซิตินเรียกว่า cryptogein B (มีค่า pI เท่ากับ 8.5) อีก 2 และ 3% เป็นแอสติคอิลิซิตินเรียกว่า cryptogein A₁ และ cryptogein A₂ ตามลำดับ (มีค่า pI เท่ากับ 4.5 และ 4.6) ทำนองเดียวกับ MgM β และ MgM α คือ cryptogein B มีความเป็นพิษมากกว่า cryptogein A₁ และ A₂ แต่ยังไม่เคยพบเชื้อรา *Phytophthora* สปีชีส์ใดเลยที่หลั่งเฉพาะเบสิคกลุ่มเดียว (Berre *et al.*, 1994)

ที่อกชินจากเชื้อรา *C. cassicola* สามารถทำให้ใบยางเกิดนิโครซิสได้และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการบ่มเชื้อลงบนใบยางด้วยสปอร์โดยตรง นอกจากนี้การบ่มใบยางพาราด้วย palmivorein ซึ่งเป็นอิลิซิติเตอร์ที่มีขนาด 10 กิโลดาลตันของเชื้อรา *P. palmivora* ในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) ทำให้เกิดนิโครซิสแตกต่างกันคือพันธุ์ที่ต้านทานพบนิโครซิสที่มีขอบเขตชัดเจนสีดำตามลักษณะของ hypersensitive cell death ส่วนพันธุ์อ่อนแอพบรอยไหม้เป็นสีน้ำตาลและแผ่กว้างออกไป ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค ทำให้สามารถนำที่อกชินของเชื้อราไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ยางได้ (นิลกุล บุญหวังช่วย, 2545)

สำหรับการชักนำให้เกิดความต้านทาน (acquired resistance) พบว่า

อิลิซิเตอร์ทั้งสองกลุ่มสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานได้ใกล้เคียงกัน (Ricci *et al.*, 1989) ต่อมา Donohue และคณะ (1995) เสนอแนะว่าการที่อิลิซิตินทั้งสองกลุ่มชักนำให้เกิดความต้านทานใกล้เคียงกันนั้นไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิติน แต่อาจจะเกี่ยวข้อง กับปฏิกิริยาการตอบสนอง (defense reaction) ของพืชเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินมากกว่า โดยพืช จะต้องมีตัวดักจับ (receptor) ที่จำเพาะเจาะจงกับอิลิซิตินเหมือนกันทั้งสองกลุ่ม จากนั้นจะส่ง สัญญาณให้พืชรับรู้ที่กำลังถูกรุกราน เพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดกลไกในการป้องกันตนเอง

1.4.3 การเตรียมอิลิซิตินให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา

โดยอาศัยมาตรฐานทางชีวเคมีนั้นคืออาศัยคุณสมบัติการละลาย สมบัติทาง ประจุ

ไฟฟ้าและขนาดของโมเลกุลของอิลิซิตินในการแยกให้บริสุทธิ์ เริ่มต้นจากนำน้ำเลี้ยงเชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นของเกลือ 90% เพื่อให้ไอออนของเกลือที่มากเกินไปแย่งจับน้ำจากโปรตีน ทำให้น้ำที่จับอยู่กับโปรตีนน้อยลง โปรตีนจึงรวมตัวกันและตกตะกอนซึ่งในตะกอนเหล่านั้นจะมีอิลิซิตินรวมอยู่ด้วย จากนั้นนำอิลิซิ-ตินที่ได้มาแยกโดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) ซึ่งภายในคอลัมน์บรรจุโพลีเมอร์ที่มีประจุบวกหรือประจุลบ ได้แก่ diethylaminoethyl (DEAE) หรือ carboxymethyl (CM) เป็นต้น โปรตีนที่ประจุสุทธิตรงกันข้ามจะ จับกับโพลีเมอร์ภายในคอลัมน์ได้และถูกชะออกมาเมื่อปรับ pH ให้โปรตีนที่แยกมีประจุสุทธิเป็น ศูนย์หรือเติมเกลือลงในตัวชะ (elute) เพื่อสลายพันธะไอออนิก (ionic bond) ระหว่างโปรตีนกับโพลีเมอร์ภายในคอลัมน์ ต่อจากนั้นนำอิลิซิตินมาแยกโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) และโพลีอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล สำหรับวิธี gel filtration เป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีการบรรจุเจล (gel) ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีรูเล็กๆ

ลักษณะคล้ายฟองน้ำทำหน้าที่เหมือนตะแกรงแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกับโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะเข้าไปในเนื้อเจลไม่ได้และถูกชะออกจากหลอดแก้วก่อนโดยผ่านไประหว่างอนุภาคเจลเท่านั้น แต่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กสามารถเข้าไปข้างในเนื้อเจลได้ จึงสามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันได้ ส่วนเทคนิคที่ใช้คืออิเล็กโทรโฟรีซิสและ anionic detergent (SDS) ในการแยกโปรตีนขนาดต่างๆ ออกจากกัน โดยการนำโปรตีนมาต้มกับ SDS detergent ซึ่งจะจับกับโปรตีนในลักษณะไม่เป็นโควาเลนต์ ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ จำนวนประจุจึงเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนโปรตีน ในขณะที่เดียวกันโปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติและเปลี่ยนรูปร่างเป็น random coil ที่มีขนาดโมเลกุลเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนเช่นกัน ดังนั้นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถใช้คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างได้ โดยเปรียบเทียบกับอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ของโปรตีนกับอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน (Robyt and White, 1987 ; Huet and Pernollet, 1989; Huet *et al.*, 1992 ; Huet and Pernollet, 1993 ; Churngchow and Rattarasarn, 2000)

วัตถุประสงค์

1. เตรียมอิลลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ของเชื้อรา *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์ขึ้น
2. ศึกษา kinetics และวัดปริมาณของไฟโตเอเล็กซินจากแคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง), เมล็ดอ่อนและข้อปล้องที่ถูกกระตุ้นด้วยอิลลิซิดินและเปรียบเทียบกับการบ่มด้วยไฮสเปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*
3. ศึกษาการตอบสนองของแคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง), เมล็ดอ่อนและข้อปล้องของยางพันธ์ุต่างๆ ต่อเชื้อรา *P. palmivora*

