บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในแต่ละปีประเทศไทยส่งออกยางพาราในรูปของยางแปรรูป, ผลิตภัณฑ์ยาง รวมทั้งการส่งออกผลิตภัณฑ์จากไม้ยางพาราในรูปของเฟอร์นิเจอร์ ทำให้อาชีพสวนยางทำรายได้ที่แน่นอนและได้แพร่หลายไปในทุกจังหวัดของภาคใต้ ปัจจุบันก็ได้แพร่หลายไปยังภาคตะวันออกและบางจังหวัดของภาคอิสาน โรคของยางพาราที่เกิดขึ้นรุนแรงในประเทศไทย คือโรคใบร่วงและโรคเส้นดำ ซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยางธรรมชาติและเป็นอันตรายแก่ต้นยางมากที่สุดโรคหนึ่งในประเทศไทย เพราะทำให้ผลผลิตยางลดลงประมาณร้อยละ 30-50 ซึ่งเกิดจากเชื้อราในกลุ่มไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora*) โดยที่เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ก็เป็นราสายพันธุ์หนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าว (สถาบันวิจัยยาง, 2542)

จากการที่ชาวสวนสามารถกรีดเอาน้ำยางมาใช้ประโยชน์ได้เมื่อต้นยางมีอายุประมาณ 5-6 ปี ดังนั้นการเลือกต้นอ่อนไปปลูกต้องคำนึงถึงผลผลิตที่ได้เป็นหลัก ยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงและนิยมปลูกกันมากคือพันธุ์ RRIM600 แต่บางพื้นที่ที่มีความชื้นสูงทำให้ต้นยางติดเชื้อราได้ง่าย จึงต้องเลือกปลูกพันธุ์ยางที่มีความต้านทานโรคสูงด้วย การใช้สารเคมีสามารถควบคุมเชื้อราได้ในระยะสั้นเท่านั้นและส่งผลเสียต่อระบบนิเวศน์ด้วย วิธีควบคุมในระยะยาวคือการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานโรคสูงมาปลูกทดแทน จากหนังสือแนะนำพันธุ์ยางปี 2542 รายงานว่ายางพันธุ์ชั้น 1 ที่มีระดับความต้านทานดีและดีมากต่อเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* (ในระดับ field test) มีเพียง 3 พันธุ์ คือ KRS156 (ดี), RRIC110 (ดี) และ BPM-24 (ดีมาก) และยางพันธุ์ชั้น 2 ที่มีระดับความต้านทานดีมีเพียง 3 พันธุ์ คือ RRIT226, RRIT250 และ BPM1 ส่วนระดับดีมากไม่มี ซึ่งกว่าจะได้ข้อสรุปว่ายางพันธุ์ใดให้ผลผลิตสูงและสมควรได้รับการส่งเสริม

อย่างแพร่หลาย (จัดอันดับเป็นพันธุ์ชั้น 1 และ 2) นั้น ต้องใช้เวลาในการปรับปรุงพันธุ์ยางและตรวจสอบเป็นเวลาถึง 30 ปี การแก้ปัญหาเรื่องระยะเวลาที่ใช้เพื่อจะสรุปให้ได้ว่ายางพันธุ์ใดให้ผลผลิตสูง สมควรส่งเสริมแนะนำให้เกษตรกรปลูกนั้น ได้มีนักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาค้นคว้าโดยการใช้วิธีการต่างๆเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสังเคราะห์ยางกับลักษณะอื่นๆ ที่อาจตรวจวัดได้ง่าย เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอ รีดักเทส (HMG-CoA reductase) กับปริมาณน้ำยาง (Wititsuwannakul, 1986) และการศึกษาเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอซินเทส (HMG-CoA syntase) ในซี-ซีรั่มกับปริมาณน้ำยาง (นงเยาว์, 2542) แต่วิธีการเหล่านี้ ยังจำเป็นต้องมีข้อมูลจากวิธีการอื่นๆมาประกอบอีก เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรค

เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชมีศัตรูมากมาย ได้แก่ เชื้อรา, เชื้อแบคทีเรีย, เชื้อไวรัส รวมไปถึงไส้เดือนฝอย และพืชชนิดหนึ่งก็อาจเกิดโรคได้หลายโรคในเวลาเดียวกัน แต่พืชก็มีชีวิตอยู่ได้ จะเห็นได้ว่าเมื่อพืชเกิดการติดเชื้อ (infection) พืชบางพันธุ์จะแสดงความอ่อนแอ บางพันธุ์แสดงอาการต้านทานและบางพันธุ์ไม่แสดงอาการใดๆเลยหรือแสดงอาการแต่ต่อมาอาการของโรคลดลง แสดงว่าพืชแต่ละชนิดมีกระบวนการหรือกลไกในการป้องกันตัวเองเพื่อต่อต้านการรุกรานของเชื้อโรคแตกต่างกัน เนื่องจากพืชไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแต่สามารถปรับตัวเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรค โดยปฏิกิริยาการตอบสนองของพืชมีสองลักษณะคือ เมื่อพืชพันธุ์อ่อนแอ (susceptible) ถูกรุกรานโดยเชื้อโรคที่รุนแรง (virulent pathogen) พืชก็จะตอบสนองด้วยการแสดงอาการของโรคหรือเป็นโรคนั่นเอง เนื่องจากมีสภาวะหรือปฏิกิริยาที่เหมาะสม (compatible) และเมื่อพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant) ถูกรุกรานโดยเชื้อโรคที่ไม่รุนแรง (avirulent pathogen) พืชก็จะตอบสนองด้วยการไม่แสดงอาการของโรค เพราะเกิดสภาวะหรือปฏิกิริยาที่ไม่เหมาะสม (incompatible reaction) แต่จะมีกลไกในการป้องกันตัวเอง (defense machanism) ซึ่งมีหลายอย่างและแต่ละอย่างไม่ได้แสดงผลในการป้องกันโรคโดยลำพัง แต่กระบวนการเหล่านี้จะต้องสัมพันธ์กัน (ประสาทพร, 2534) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ ประเภทแรกเป็นความต้านทานที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติก่อนที่เชื้อจะเข้า

ทำลาย (passive resistance) และความต้านทานที่เกิดขึ้นเพื่อตอบโต้การเข้าทำลายของเชื้อโรค (active resistance) (ธรรมศักดิ์, 2529)

ในธรรมชาติพืชจะมีโครงสร้างและส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการป้องกันตนเองต่อเชื้อโรค ซึ่งประกอบด้วยสิ่งกีดขวางทางกายภาพ (physical barrier) และสิ่งกีดขวางทางเคมี (chemical barrier) สิ่งกีดขวางทางกายภาพที่มีอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ขี้ผึ้งคลุมใบและผล, ความหนาของคิวตินและความเหนียวของผนังเซลล์ด้านนอกทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจาะผ่านเข้าสู่พืชได้ รวมถึงความหนาและความเหนียวของผนังเซลล์เนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) และเนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์ สเคลอเรนไคมา (sclerenchyma) นอกจากนี้ลักษณะการเปิดปิดของปากใบมีบทบาทในการป้องกันโรคด้วย เช่น ในข้าวสาลีพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมเหล็กจะมีปากใบเปิดช้ากว่าปกติ ดังนั้นกว่าสปอร์ของเชื้อราสนิมจะงอกเข้าไปได้ก็ถูกแดดเผาและตายไป ส่วนสิ่งกีดขวางทางเคมีที่มีอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ การขาดธาตุอาหารบางชนิดสำหรับการเจริญของเชื้อโรค และการสร้างสาร phytoanticipins เป็นต้น (ธรรมศักดิ์, 2529; ประสาทพร, 2534) เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่พืชโดยการเจาะผ่านโครงสร้างของพืช พืชจะมีปฏิกิริยาโต้ตอบการเข้าทำลายของเชื้อโรคซึ่งเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว (rapid active resistance) และอย่างช้าๆ (delayed active resistance) ปฏิกิริยาโต้ตอบที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ได้แก่ การสร้าง cork layers, การเกิด abscission regions, การสร้าง tyloses และ gum, การโป่งออกของเซลล์ epidermis หรือเกิดปลอกห่อหุ้ม (sheath) เส้นใยของเชื้อ (ไพโรจน์, 2525; ประสาทพร, 2534), การทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตายเรียกว่า “ hypersensitive cell death ” (Dufrenoy, 1936) โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis), สร้างสารปฏิชีวนะซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ เรียกว่า ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) (Hahlblock, 1989), เกิดกระบวนการ lignification เพื่อกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง (Friend *et al.,* 1973) และเกิดการซ่อมแซมผนังเซลล์ของพืชให้แข็งแรงขึ้น (Bradley *et al*., 1992) นอกจากนี้ปฏิกิริยาโต้ตอบที่เกิดขึ้นได้อย่างช้าๆทางเคมี ได้แก่ การสร้างโปรตีนขึ้นมาทำลายเชื้อโรคที่เรียกว่า pathogenesis related-proteins

(PR-proteins) ได้แก่ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส (Linthorst, 1991) และการเกิดกลไกที่เรียกว่า systemic acquire resistance (SAR) (Guest and Brown, 1997) เป็นต้น

ยางพาราเองก็มีกลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเช่นเดียวกับพืชทั่วไป Churngchow and Rattarasarn (2001) พบว่าซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิติน (ไฟโตอเล็กซิน) ในพันธุ์ต้านทานสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ นอกจากนี้พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) ของเชื้อรา *P. palmivora* มีความเป็นพิษต่อใบยางคือทำให้เกิดรอยไหม้ (necrosis) ได้คล้ายกับสปอร์ ท็อกซินที่เตรียมให้บริสุทธิ์จาก culture filtrate เป็นโปรตีนขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุล 10 kDd (Churngchow and Rattarasarn, 2000) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวมีชื่อเรียกรวมว่าอิลิซิติน และเมื่อนำอิลิซิตินมากระตุ้นใบยางพบว่าทำให้มีการสร้างสคอพอลิติน, เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส (PR-protiens) และลิกนินเพิ่มขึ้น โดยทั้งหมดมีค่าแปรผันตรงกับระดับความต้านทานของใบยาง ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของใบยางพาราพันธุ์ชั้น 1, 2 และ 3 ซึ่งจัดลำดับโดยสถาบันวิจัยยาง รวมทั้งเชื้อพันธุ์ (germplasm) ที่มีการคัดเลือกเบื้องต้นว่าให้ผลผลิตสูง ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์วิจัยยางสงขลาและสถานีทดลองยางยะลา ด้วยการบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์และทดสอบด้วยอิลิซิตินของเชื้อรา *P. palmivora* วิธีการนี้ใช้เวลาในการศึกษาน้อยกว่าการศึกษาในระดับ field test ของสถาบันวิจัยยาง ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกพันธุ์ยางที่ต้านทานโรค นำมาทดแทนยางพันธุ์ต้านทานเดิมที่มีอยู่น้อยชนิดมาก

การตรวจเอกสาร

1.1 ยางพารา

ยางพารามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* Muell. Arg ตั้งขึ้นโดย Dr. Jean Mueller นักพฤษศาสตร์ชาวสวิตเซอร์แลนด์ สามารถจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic classification) ได้ดังนี้

1.1.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic classification)

Class : Angiospermae

Subclass : Dicotyledoneae

Order : Euphorbiales

Family : Euphorbiaceae

Genus : *Hevea*

Species : *brasiliensis*

Scientific name : *Hevea brasiliensis*

Common name : Para Rubber

พืชสกุลนี้มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปอเมริกาใต้ซึ่งรู้จักกันดีในนามหุบเขาแห่งป่าลุ่มแม่น้ำอเมซอน มีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาค่อนข้างแปรปรวน สามารถแพร่กระจายพันธุ์ได้ในระบบนิเวศน์วิทยาที่มีความหลากหลาย บางชนิดพันธุ์มีคุณลักษณะพิเศษสามารถอาศัยในสภาพภูมิประเทศในวงจำกัด บางชนิดพันธุ์อ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมแต่การผสมข้ามเป็นไปด้วยดี บางครั้งเป็นไปโดยธรรมชาติเอง หรือโดยมนุษย์ผสมพันธุ์ขึ้นมาซึ่งนับเป็นวิวัฒนาการทางด้านชนิดพันธุ์อย่างหนึ่งของธรรมชาติ (http://industrial.riu.ac.th/botany/data_botany/type/108.htm.)

ฐานพันธุกรรมเชื้อพันธุ์พืชเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์และผสมพันธุ์ให้ได้พันธุ์ที่ดีโดยให้ผลผลิตสูง เหมาะกับดินฟ้าอากาศ ต้านทานโรคและศัตรูพืช ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนมีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ แต่ปัจจุบันพันธุ์พืชและเชื้อพันธุ์พืชตามธรรมชาติได้ถูกทำลาย

จนใกล้จะสูญพันธุ์โดยกิจกรรมของมนุษย์ หรือจากภัยธรรมชาติ จึงได้มีการรณรงค์ในการอนุรักษ์พันธุ์พืช ซึ่งกรมวิชาการเกษตรได้มีการรวบรวมและอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ยางพาราที่นำเข้าจากต่างประเทศไว้จำนวนมาก ทั้งชนิดและปริมาณไว้ตามศูนย์และสถานีทดลองยางต่างๆทั่วประเทศ (สำนักงานคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2545)

1.1.2 การปรับปรุงพันธุ์ยาง และคำแนะนำพันธุ์ยางของสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร

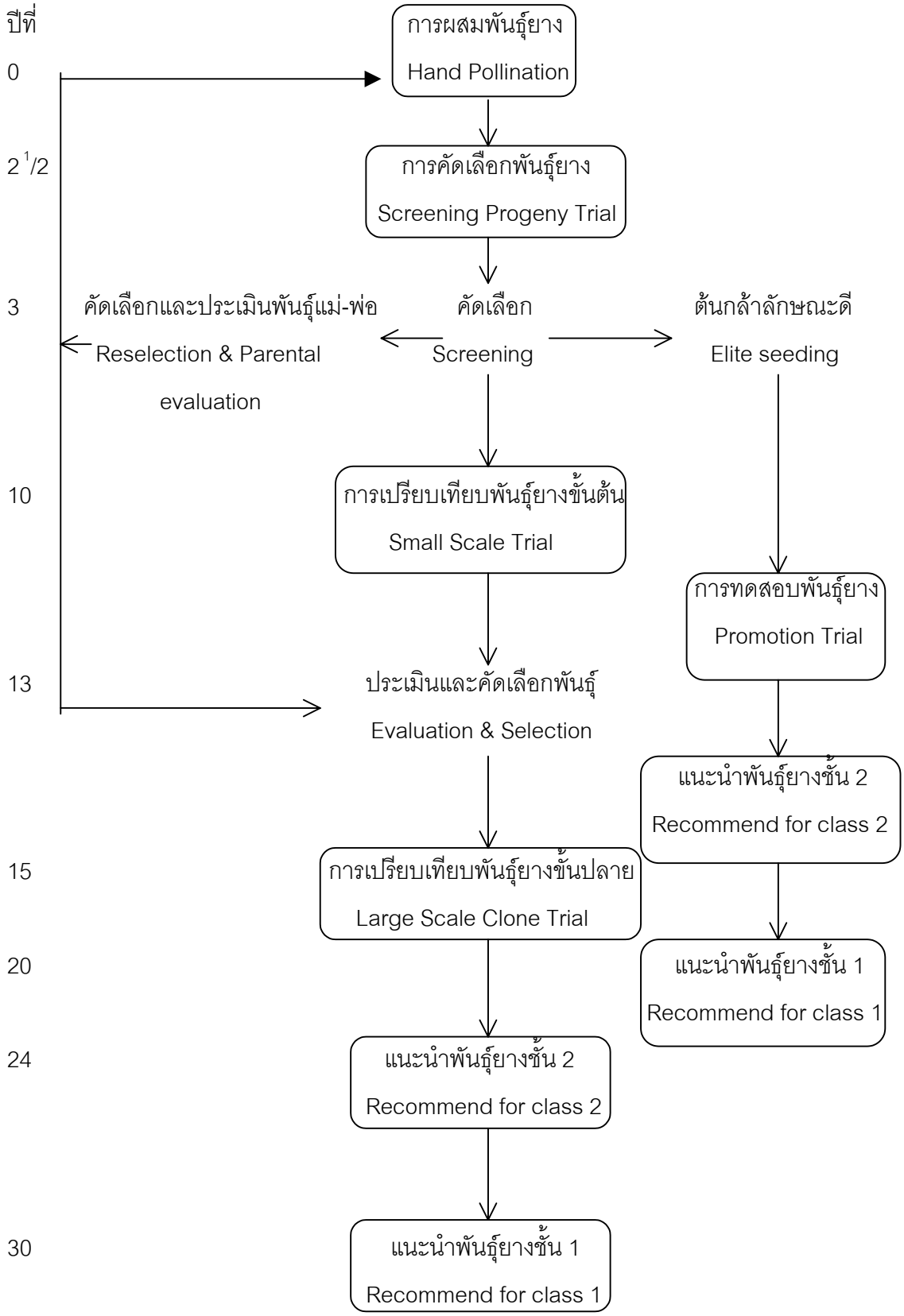
สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ทำการปรับปรุงพันธุ์ยางโดยการผสมและคัดเลือกพันธุ์ยางทั้งจากในประเทศ และแลกเปลี่ยนพันธุ์ยางกับต่างประเทศ โดยมีวิธีการและแผนการปรับปรุงพันธุ์ยางที่เป็นมาตรฐานสากลที่ต้องใช้ระยะเวลาปรับปรุงนานถึง 30 ปี (รูปที่ 1) สำหรับพันธุ์ยางที่ผ่านการคัดเลือกจากแปลงเปรียบเทียบและทดสอบพันธุ์ยางในสภาพแวดล้อมต่างๆ จะนำมาคัดเลือกพันธุ์ยางที่ดีที่สุด และจัดทำเป็นคำแนะนำพันธุ์ยางทุก 4 ปี โดยคำนึงถึงผลผลิต การเจริญเติบโต การต้านทานโรค และความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ตารางที่ 1) เพื่อให้เกษตรกรชาวสวนยางสามารถเลือกปลูกได้อย่างถูกต้องต่อไป

1.1.2.1 การผสมพันธุ์ยาง (Hand Pollination)

ยางเป็นพืชพวกผสมเปิดตามธรรมชาติ (Naturally open-pollination) ปัจจัยที่ทำให้ยางเป็นพืชผสมข้ามคือดอกตัวผู้และตัวเมียแยกกันอยู่คนละดอกแต่ต้นเดียวกัน จึงสามารถปรับปรุงให้ดีขึ้นได้โดยการผสมพันธุ์ ซึ่งคาดหวังว่ากรรมพันธุ์ของต้นแม่และต้นพ่อมารวมกันแล้วจะได้ลูกผสมที่อาจมีลักษณะเหนือแม่พ่อได้ ต้นแม่พ่อที่ใช้ในการผสมพันธุ์จะต้องมีดอกบานพร้อมกัน การผสมพันธุ์จะสำเร็จได้มากน้อยเท่าใดขึ้นอยู่กับพันธุ์ อากาศ ฝน และ ความชำนาญของผู้ผสมพันธุ์ ผลสำเร็จในการผสมพันธุ์มีน้อยมากประมาณ 3-10% จากการผสมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยยางสงขลาโดยใช้แม่พ่อพันธุ์ดีได้รับผลสำเร็จเพียง 2-3%

1.1.2.2 การเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นต้น (Small Scale Trial)

ต้นกล้าลูกผสมที่ปลูกในถุงพลาสติกเมื่ออายุได้ 2 เดือนจะย้ายไปปลูกในแปลงปลูก ศึกษาการเจริญเติบโตในช่วงแรกระยะ 2 ปี โดยใน 1 ปีแรกวัดขนาด



รูปที่ 1 แผนผังการปรับปรุงพันธุ์ยาง (ที่มา : สถาบันวิจัยยาง, 2545 ก)

เส้นรอบวงของลำต้นตรงจุดสูงจากพื้นดิน 15 เซนติเมตร และเมื่ออายุ 2 ปีวัดขนาดเส้นรอบวงของลำต้นสูงจากพื้นดิน 40 เซนติเมตร ศึกษาผลผลิตระยะแรกและศึกษาเกี่ยวกับความต้านทานโรค การแตกกิ่ง และทรงพุ่มของต้น ทำการคัดเลือกลูกผสม (screening) ที่มีแนวโน้มดีไว้ 10-15% นำไปติดตาขยายพันธุ์ไว้เพื่อนำไปคัดเลือกในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นต้นต่อไป

1.1.2.3 การเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นปลาย (Large Scale Trial)

เป็นการคัดเลือกพันธุ์กับพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ จากแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ขั้นต้นและพันธุ์ที่คาดว่าจะดี (promising clones) ที่ได้รับจากต่างประเทศ ใช้ระยะเวลาปลูกตามปกติที่ใช้ปลูกในสวนยาง ใช้พันธุ์มาตรฐานเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ทำการทดลองกระจายในพื้นที่ต่างๆหลายท้องที่ เพื่อศึกษาอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อพันธุ์ยาง การศึกษามีการเก็บข้อมูลต่างๆเช่นเดียวกับแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นต้น

การคัดเลือกพันธุ์ยางที่มีลักษณะดีเพื่อแนะนำให้เกษตรกรปลูกมีหลักเกณฑ์คือ

ครั้งที่ 1 เมื่อกรีดหน้าที่ 1 ได้ 3 ปี (ปีกรีดที่ 3) จะแนะนำเป็นพันธุ์ยางชั้น 2

ครั้งที่ 2 เมื่อกรีดหน้าที่ 1 หมด (5 ปี) และกรีดหน้าที่ 2 ได้ 1 ปี (ปีกรีดที่ 6) จะแนะนำเป็นพันธุ์ยางชั้น 1

รวมเวลาตั้งแต่ผสมพันธุ์ไปจนถึงแนะนำให้เกษตรกรปลูกได้ใช้เวลา 30 ปี (สถาบันวิจัยยาง, 2545 ก)

1.1.3 การศึกษาเกี่ยวกับความต้านทานโรค

ทางสถาบันวิจัยยางได้ทำการศึกษาความต้านทานโรคของยางพาราซึ่งประกอบด้วยโรคต่อไปนี้คือ ใบร่วงไฟท็อปทอร่า, ใบจุดออยเดียม, ใบจุดคอลเลโทตริคลัม, โรคเส้นดำและโรคราสีชมพู โดยทำการประเมินผลด้วยสายตาในภาพรวมของยางแต่ละพันธุ์ เช่น โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อราไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora* leaf fall) ทำการประเมินโดยสังเกตความโปร่งของทรงพุ่มใบคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพุ่มใบปกติหรือดูจากปริมาณใบร่วงบนพื้นดิน และกำหนดความรุนแรงของโรคเป็น 6 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่แสดงอาการ (no symptom)

1 = น้อยมาก (very light) มีพุ่มใบโปร่งหรือปริมาณใบร่วงบนพื้นดินประมาณ 1-10%

2 = น้อย (light) มีพุ่มใบโปร่งหรือปริมาณใบร่วงบนพื้นดินประมาณ 11-25%

3 = ปานกลาง (moderate) มีพุ่มใบโปร่งหรือปริมาณใบร่วงบนพื้นดินประมาณ 26-50%

4 = รุนแรง (severe) มีพุ่มใบโปร่งหรือปริมาณใบร่วงบนพื้นดินประมาณ 51-75%

5 = รุนแรงมาก (very severe) มีพุ่มใบโปร่งหรือปริมาณใบร่วงบนพื้นดินประมาณ 75%

และโรคเส้นดำ (black stripe) ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora* ประเมินโดยหาเปอร์เซ็นต์ต้นที่เป็นโรคกับการตรวจสอบด้วยสายตา โดยคิดพื้นที่ที่ถูกทำลายเป็นเปอร์เซ็นต์ของหน้ากรีดและกำหนดคะแนนความรุนแรงของโรคเป็น 6 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่แสดงอาการ (no symptom)

1 = น้อยมาก (very light) มีพื้นที่ถูกทำลาย 1-5% ของหน้ากรีด

2 = น้อย (light) มีพื้นที่ถูกทำลาย 6-20% ของหน้ากรีด

3 = ปานกลาง (moderate) มีพื้นที่ถูกทำลาย 21-40% ของหน้ากรีด

4 = รุนแรง (severe) มีพื้นที่ถูกทำลาย 41-60% ของหน้ากรีด

5 = รุนแรงมาก (very severe) มีพื้นที่ถูกทำลายมากกว่า 60% ของหน้ากรีด

(สถาบันวิจัยยาง, 2544 ก)

1.1.4 **คำแนะนำพันธุ์ยาง ปี** 2542

เป็นของสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร พันธุ์ยางที่แนะนำจะพิจารณาจากข้อมูลที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ยางภายในประเทศและต่างประเทศ การเลือกใช้พันธุ์ยางที่จะปลูกควรพิจารณาทั้งผลผลิต รายละเอียดลักษณะต่างๆ และข้อจำกัดของพันธุ์นั้นๆ พันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกแบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ

พันธุ์ยางชั้น 1 เป็นพันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกโดยไม่จำกัดเนื้อที่ปลูก พันธุ์ยางในชั้นนี้ได้ผ่านการทดลอง และศึกษาลักษณะต่างๆ อย่างละเอียด พันธุ์ยางที่แนะนำ ได้แก่ BPM-24, KRS156, PB255, PB260, PR255, RRIC110, RRIM600 และ RRIT251

พันธุ์ยางชั้น 2 เป็นพันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกโดยจำกัดเนื้อที่ปลูก ปลูกได้ไม่เกินร้อยละ 30 ของเนื้อที่ปลูกยางที่ถือครอง แต่ละพันธุ์ควรปลูกไม่น้อยกว่า 7 ไร่ พันธุ์ยางชั้นนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาลักษณะบางประการเพิ่มเติม พันธุ์ยางที่แนะนำ ได้แก่ BPM1, PB-235, RRIC100, RRIC101, RRIT226 และ RRIT250

พันธุ์ยางชั้น 3 เป็นพันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกโดยจำกัดเนื้อที่ปลูก ปลูกได้ไม่เกินร้อยละ 20 ของเนื้อที่ปลูกยางที่ถือครอง แต่ละพันธุ์ควรปลูกไม่น้อยกว่า 7 ไร่ พันธุ์ยางชั้นนี้ส่วนใหญ่อยู่ในระหว่างการทดลองและต้องศึกษาลักษณะต่างๆเพิ่มเติม พันธุ์ยางที่แนะนำ ได้แก่ Haiken-2, PR302, PR305, RRIC121, RRIT163, RRIT209, RRIT214, RRIT218 และ RRIT225 (สถาบันวิจัยยาง, 2542)

ตารางที่ 1 ลักษณะที่สำคัญบางประการของพันธุ์ยางชั้น 1 และชั้น 2

ลักษณะ	พันธุ์ยางชั้น 1								พันธุ์ยางชั้น 2					
	RRIT 251	KRS 156	BPM 24	PB 255	PB 260	PR 255	RRIC 110	RRIM 600	RRIT 226	RRIT 250	BPM 1	PB 235	RRIC 100	RRIC 101
การเจริญเติบโต [1/]														
- ระยะก่อนเปิดกรีด	2	3	3	1	2	3	1	3	2	3	2	1	1	2
- ระยะระหว่างกรีด	4	3	3	2	1	3	3	3	3	3	2	3	3	3
ความหนาของเปลือก [2/]														
- เปลือกเดิม	3	3	1	2	3	4	4	4	4	4	3	3	3	3
- เปลือกงอกใหม่	3	3	3	2	4	2	4	3	2	3	2	4	4	4
ผลผลิต [1/]														
- ระยะ 2 ปีแรก	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
- ระยะ 3-10 ปี	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2
- ผลผลิตลดลงในช่วงผลัดใบ	2	1	3	3	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2
- ผลผลิตเมื่อใช้สารเคมีเร่งน้ำยาง	-	3	4	3	3	3	3	3	-	4	2	4	-	-

[1/] 1 = ดี 2 = ค่อนข้างดี 3 = ปานกลาง 4 = ค่อนข้างต่ำ 5 = ต่ำ

[2/] 1 = หนา 2 = ค่อนข้างหนา 3 = ปานกลาง 4 = ค่อนข้างบาง 5 = บาง , - = ยังไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลักษณะ	พันธุ์ยางชั้น 1								พันธุ์ยางชั้น 2					
	RRIT 251	KRS 156	BPM 24	PB 255	PB 260	PR 255	RRIC 110	RRIM 600	RRIT 226	RRIT 250	BPM 1	PB 235	RRIC 100	RRIC 101
ความต้านทานโรค [3/]														
- ใบร่วงไฟท็อปทอร่า	3	2	1	4	3	3	2	5	2	2	2	3	3	3
- ใบจุดออยเดียม	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	2	2
- ใบจุดคอลเลโทตริกัม	3	4	3	4	3	5	3	3	3	3	3	4	2	3
- โรคเส้นดำ	2	3	2	3	3	3	3	5	3	3	2	3	3	2
- โรคราสีชมพู	3	4	3	4	2	3	3	4	4	4	3	2	3	3
อาการเปลือกแห้ง[4/]	2	3	3	3	4	2	3	2	3	4	3	4	3	4
ความต้านทานลม[3/]	3	3	3	2	2	2	4	3	3	3	2	2	2	2
การปลูกในพื้นที่จำกัด														
- ลาดชัน	N	N	G	G	G	N	N	G	-	-	-	N	N	-
- หน้าดินตื้น	N	G	G	G	G	G	N	N	-	-	-	N	N	-
- ระดับน้ำใต้ดินสูง	N	N	G	G	G	G	N	N	-	-	-	N	N	-

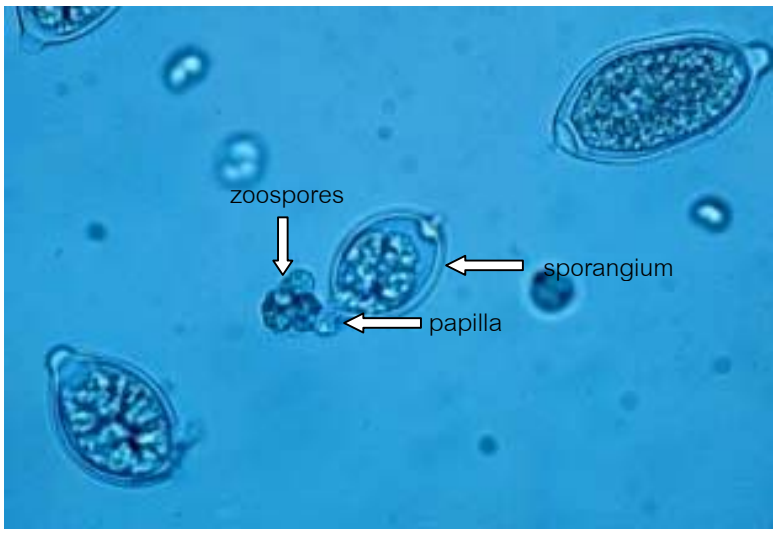
[3/] 1 = ดี 2 = ค่อนข้างดี 3 = ปานกลาง 4 = ค่อนข้างอ่อนแอ 5 = อ่อนแอ

[4/] 1 = น้อย 2 = ค่อนข้างน้อย 3 = ปานกลาง 4 = ค่อนข้างมาก 5 = มาก, - = ยังไม่มีข้อมูล, N = ไม่แนะนำ, G = ได้ (ที่มา : ดัดแปลงจากสถาบันวิจัยยาง, 2542)

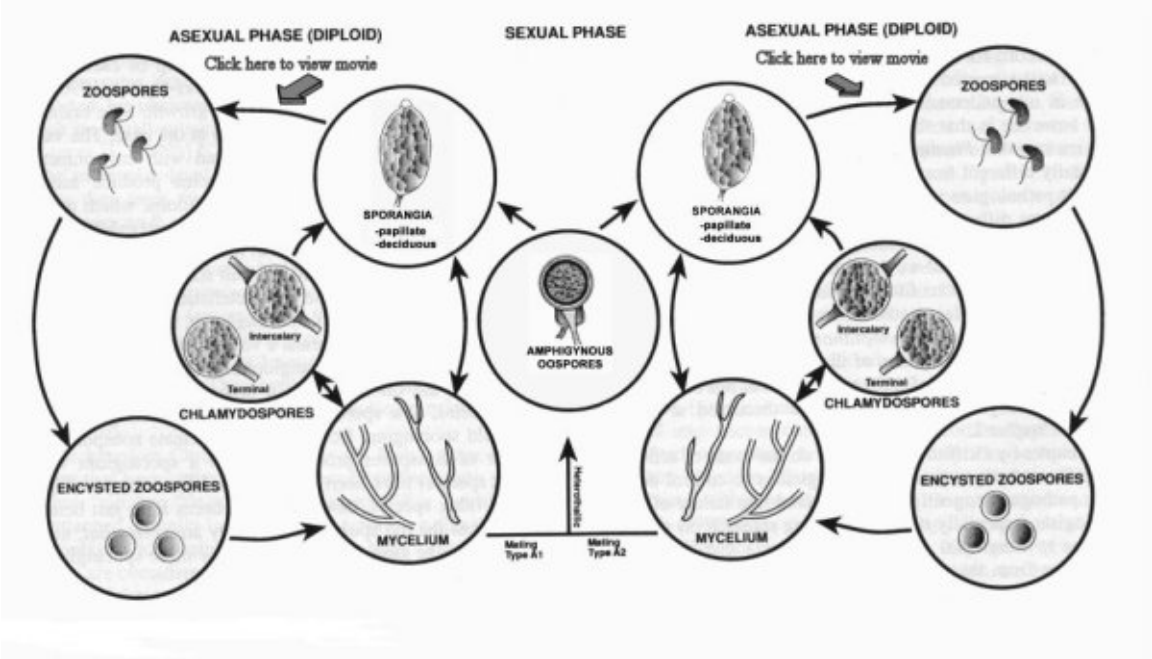
1.2 เชื้อราไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora*)

ไฟท็อปทอร่าเป็นเชื้อราในกลุ่มโอโอไมซิส (oomycetes) มีทั้งอาศัยอยู่ในน้ำและในดิน มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวแตกกิ่งก้านสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) ภายหลังที่เจริญเป็นสปอร์แรงเจียมแล้วสปอร์แรงจิโอฟอร์จะเจริญให้สปอร์แรงจิโอฟอร์ใหม่จากปลายอันเดิม และดันสปอร์แรงเจียมไปด้านข้างของสปอร์แรงจิโอฟอร์ โดยส่วนที่เป็นสปอร์แรงจิโอฟอร์นั้นจะมีลักษณะบวมพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียมมีรูปร่างคล้ายผลมะนาวให้กำเนิดซูโอสปอร์ (zoospore) ที่อุณหภูมิระหว่าง 12-15 องศาเซลเซียส และอาจงอกเป็นท่อ (germ tube) เข้าทำลายพืชได้โดยตรงที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส สำหรับซูโอสปอร์จะดันออกทางปลายสปอร์แรงเจียมด้านที่มีปุ่ม (papilla)(รูปที่ 2)

ไฟท็อปทอรามีการขยายพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยแบบอาศัยเพศจะมีการผลิตซูโอสปอร์แรงเจีย (zoosporangia) ซึ่งจะมีการปลดปล่อย zoospores ที่เคลื่อนที่โดย biflagella หลังจากว่ายน้ำระยะหนึ่งแล้วจึงเข้าเกราะ (encyst) และงอกเป็นท่อหรือสร้างซูโอสปอร์ขึ้นอีก ส่วนการขยายพันธุ์แบบใช้เพศนั้นสายราเพศผู้ (male hypha) จะเจริญเป็นแอนเทอริเดียม และสายราเพศเมีย (female hypha) จะเจริญเป็นโอโอโกเนียม (oogonium) แล้วให้กำเนิดโอโอสปอร์ (oospore) (ประสาทพร, 2534) ซึ่งจะงอกเป็นท่อและเจริญเป็นเส้นใยหรือเจริญเป็นสปอร์แรงเจียมต่อไป การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *P. palmivora* สามารถผลิตสปอร์ได้ 2 ชนิดคือ zoospore และ chlamydospores แต่ถ้าเป็นแบบอาศัยเพศผลิตสปอร์ชนิด oospore (www.botany.unimelb.eolu.au/…/duriansite/ phytophthora.htm/) (รูปที่ 3) เส้นใยของราเจริญอยู่ในเซลล์พืชและอยู่ระหว่างเซลล์พืชซึ่งจะแทง haustorium เข้าไปในเซลล์พืช เช่นเชื้อ *P. infestans* ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งมีวงจรชีวิตดังนี้ คือ เชื้อรา *P. infestans* สามารถอยู่ข้ามฤดูในลักษณะที่เป็นเส้นใยติดมากับหัวมันฝรั่ง เส้นใยจะเจริญเข้าไปในหัว ตาและหน่อของมันฝรั่ง เมื่อนำไปขยายพันธุ์ราจะเจริญเข้าสู่ส่วนของลำต้นและส่วนต่างๆเหนือดิน จากนั้นจะเกิดสปอร์แรงจิโอฟอร์แทงออกมาทางปากใบ (stomata) และมีสปอร์แรงเจียมที่



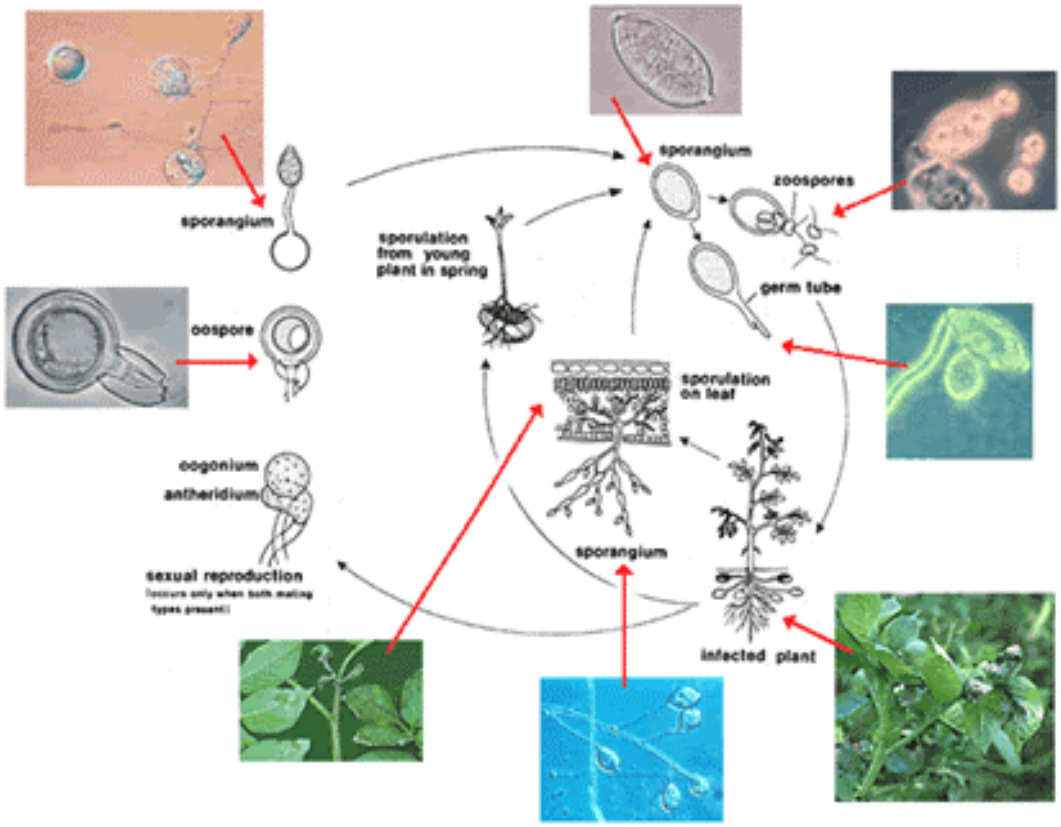
รูปที่ 2 โครงสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) ของ *Phytophthora palmivora* โดยที่ตำแหน่งกลางภาพมีการปลดปล่อยซูโอสปอร์ (zoospores) ออกจากด้านที่มี papilla ของสปอร์-แรงเจียม (ที่มา : http://ag.arizona.edu/classes/plp427L/sporan.ipg)



รูปที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora*

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

ปลาย เมื่อแก่เต็มที่จะหลุดไปกับฝน เมื่อตกลงบนใบหรือต้นที่มีน้ำเพียงพอก็จะงอกเข้าไปทำลายพืชและทำให้เกิดโรคได้ (ประสาทพร, 2534)

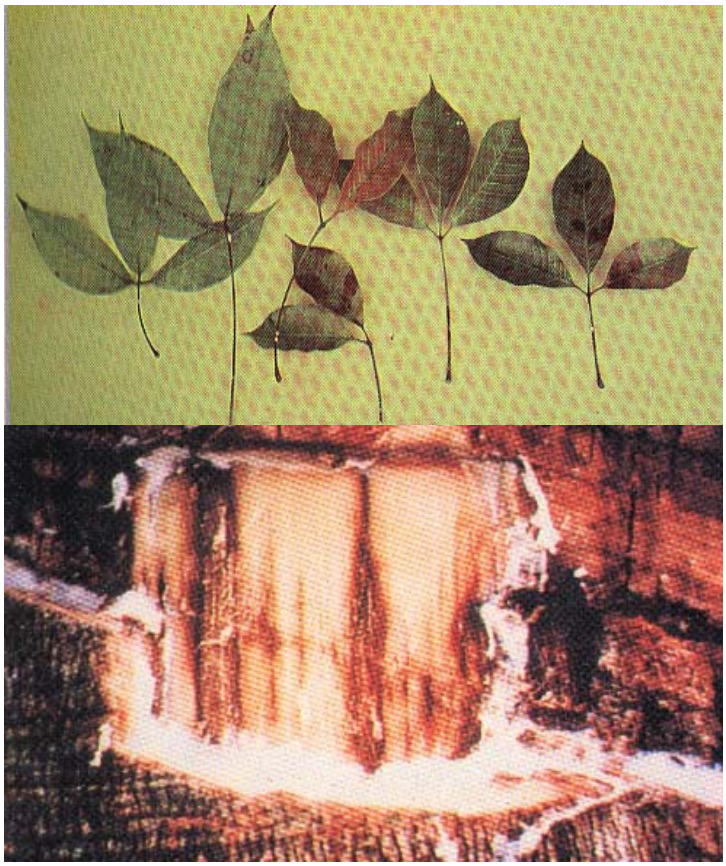


รูปที่ 4 วงจรโรคใบไหม้ของมะเขือเทศและมันฝรั่งที่เกิดจาก *Phytophthora infestans*
(ที่มา : www.cals-ncsu.edu/…/Faculty/ristaino/graphics/fig1.gif)

ไฟท็อปทอร่าทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด เช่น ผัก, ไม้ดอกไม้ประดับ, พืชล้มลุกต่างๆ รวมทั้งพืชยืนต้น เช่น มะละกอ, มะเขือเทศ, ยาสูบ, มันฝรั่งและยางพารา เป็นต้น (ประสาทพร, 2534; Erwin and Reberio, 1996) ส่วนมากทำให้เกิดอาการราก เน่า, โรคเน่าระดับดิน, โรคเน่าของลำต้นและหัว บางชนิดจะทำให้เกิดอาการใบไหม้ หรือทำลายกิ่งอ่อนและผล บางชนิดมีพืชอาศัยที่จำกัดสามารถเข้าทำลายพืชได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น แต่บางชนิดมีพืชอาศัยที่กว้างขวาง ตัวอย่างเชื้อไฟท็อปทอร่าที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น *P. parasitica* var *nicotianae* สาเหตุโรคแข้งดำของยาสูบ, *P. parasitica* สาเหตุโรคโคนเน่า, รากเน่าของส้ม, โรครากเน่าและยอดเน่าของสับปะรด, โรคเน่าดำของกล้วยไม้, โรคผลเน่าของมะเขือยาว, โรคโคนเน่าระดับดินและผลเน่าของมะเขือเทศ และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน รวมทั้งโรคใบร่วงและเส้นดำของยางพาราด้วย

เชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* ซึ่งก่อให้เกิดโรคใบร่วง (*Phytophthora* leaf fall) และเส้นดำ (black stripe) ในยางพาราพบแพร่กระจายในหลายๆประเทศมีหลายสปีชีส์ได้แก่ *P. palmivora, P. botryosa, P. hevea, P. meadii* และ *P. parasitica* แต่ในประเทศไทยสปีชีส์ที่ตรวจพบมากเมื่อมีการระบาดของโรคดังกล่าวคือ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ต้นยางที่เป็นโรคใบร่วงจากเชื้อราดังกล่าวจะไม่ผลิใบยางออกมาใหม่ในปีนั้นๆซึ่งเป็นลักษณะอาการที่แตกต่างจากต้นยางที่ใบร่วงโดยเชื้อราสาเหตุอื่นๆ เช่น *Oidium* spp. และ *Colletotrichum* spp. (พงษ์เทพ, 2522) ใบยางที่ร่วงจะมีทั้งสีเขียวสดหรือสีเหลือง ลักษณะที่ปรากฏเด่นชัดคือมีรอยช้ำดำอยู่บริเวณก้านใบและที่จุดกึ่งกลางของรอยช้ำมีหยดน้ำยางเกาะติดอยู่ เมื่อนำใบยางเป็นโรคมาสะบัดไปมาเบาๆ ใบย่อยจะหลุดทันที ซึ่งต่างกับใบยางที่ร่วงหล่นตามธรรมชาติเมื่อนำมาสะบัดใบย่อยจะไม่ร่วง ลักษณะแผ่นใบบางครั้งจะเป็นแผลที่มีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ ขนาดแผลไม่แน่นอน (สถาบันวิจัยยาง, 2544 ข) (รูปที่ 5ก) ส่วนโรคเส้นดำเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมยางธรรมชาติและเป็นอันตรายแก่ต้นยางมากที่สุดโรคหนึ่งในประเทศไทย โรคนี้แพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกยางทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในท้องที่ที่เกิดโรคใบร่วงและฝักเน่าระบาดเป็นประจำทุกปี ลักษณะอาการของ

โรคในระยะแรกจะสังเกตเห็นบริเวณเป็นโรคมีลักษณะเป็นรอยช้ำเหนือรอยกรีดโดยมีสีผิดปกติ ระยะต่อมาจะกลายเป็นรอยบุ๋มสีดำหรือน้ำตาลดำ เป็นเส้นขยายขึ้นลงตามแนวขนานกับลำต้น เมื่อเฉือนเปลือกออกจะเห็นรอยบุ๋มสีดำเป็นลายเส้นดำบนเนื้อไม้ อาการขั้นรุนแรงเปลือกหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคปริเน่า, มีน้ำยางไหล และเปลือกจะเน่าหลุดออกมา เปลือกที่งอกใหม่จะเสียหายจนทำการกรีดยางซ้ำบนหน้าที่เป็นเปลือกงอกใหม่ไม่ได้ ทำให้ต้นยางมีระยะเวลาที่ให้ผลผลิตสั้นลงเป็นเวลา 8-16 ปี ถ้าการเข้าทำลายของเชื้อไม่รุนแรงเปลือกจะเป็นปุ่มปม (รูปที่ 5ข) (พงษ์เทพ, 2522; สถาบันวิจัยยาง, 2544 ข)



ก

ข

รูปที่ 5 โรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryosa*

ก. โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่มไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora* leaf fall)

ข. โรคเส้นดำ (back stripe)

(ที่มา : สถาบันวิจัยยาง, 2544 ข)

1.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อก่อโรค (plant-pathogen interaction)

พืชสามารถตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคได้ 2 ปฏิกิริยาคือ ตอบสนองด้วยการแสดงอาการเกิดโรค (compatible reaction) และตอบสนองด้วยการไม่แสดงอาการของโรค (incompatible reaction) ในปฏิกิริยา compatible เกิดขึ้นเมื่อพืชพันธุ์อ่อนแอ (susceptible) ถูกรุกรานด้วยเชื้อโรคที่รุนแรง (virulent pathogen) และปฏิกิริยา icompatible เกิดขึ้นในพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant) ที่ถูกรุกรานโดยเชื้อโรคที่ไม่รุนแรง (avirulent pathogen) พืชจะตอบสนองด้วยการไม่แสดงอาการของโรค แต่จะมีกลไกในการป้องกันตัวเอง (defense mechanism) (ประสาทพร, 2534) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ ชนิดแรกเป็นความต้านทานที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติก่อนที่เชื้อจะเข้าทำลาย (passive resistance) เช่น ขี้ผึ้ง, คิวตินและผนังเซลล์ที่หนา ยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อและชนิดที่สองเป็นความต้านทานที่เกิดขึ้นเพื่อตอบโต้ต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค (active resistance) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ความต้านทานที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (rapid active defense) เช่น การเกิด cork, tylose, gum, ปฏิกิริยา hypersensitivity, การสร้างสารพิษ (phytoalexin) และการสร้างลิกนิน เป็นต้น และความต้านทานที่ต้องใช้เวลานานจึงจะเกิดขึ้น (delay active defense) เช่น PR-proteins และ systemic acquired resistance (SAR) เป็นต้น (ธรรมศักดิ์, 2529; Oku, 1994; Guest and Brown, 1997)

1.4 ความต้านทานที่มีอยู่ตามธรรมชาติก่อนที่เชื้อจะเข้าทำลาย (passive resistance)

เป็นลักษณะความต้านทานที่มีอยู่ตามธรรมชาติในพืชซึ่งจะขัดขวางการเข้าทำลายและแพร่กระจายของเชื้อโรค ซึ่งเมื่อเชื้อโรคเข้าไปในใบพืชแล้วจะเจริญเติบโตทำลายพืช อาจทำลายที่ใดที่หนึ่งเฉพาะบริเวณที่เชื้อเข้าไป (localized infection) หรือไปเจริญในท่อน้ำท่ออาหาร (vascular bundle) แล้วทำให้อาการของพืชไปแสดงที่อื่นด้วย (systemic infection) ลักษณะและการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเชื้อโรค

1.4.1 **โครงสร้างป้องกันเชื้อโรคทำลายพืช** (preexisting defense structure)

โครงสร้างป้องกันเชื้อโรคเข้าทำลายพืชประกอบด้วยหลายส่วนดังนี้คือผิวเป็นส่วนแรกของพืชที่เป็นเกราะป้องกันการเจาะผ่านของเชื้อ ลักษณะของโครงสร้างคุณสมบัติและส่วนประกอบที่คลุมใบและผลจึงมีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เพื่อป้องกันหยดน้ำเกาะติดผิวพืช ทำให้สปอร์ของเชื้อราที่อยู่บนผิวพืชไม่สามารถงอกได้, ขนของผิวพืชที่หนาแน่นทำให้หยดน้ำไม่เกาะติดผิวหรืออยู่ไม่ได้นานในสภาพที่ไม่เหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อ, ความหนาของคิวติเคิล (cuticle) ซึ่งประกอบด้วยคิวติน และขี้ผึ้งที่ปกคลุมอยู่บนผนังด้านนอกเซลล์มีการแสดงออกทางกายภาพและทางเคมี เมื่อถูกรบกวนด้วยเชื้อโรค, ความหนา (thickness) และความเหนียว (toughness) ของเซลล์อิพิเดอร์มิส (epidermis) ทำให้เชื้อราเจาะผ่านเข้าพืชทางตรงไม่ได้, การสร้างลิกนินในผนังด้านนอกเซลล์ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญมากของพืชต้านทานโรคบางชนิด เช่นโรคใบร่วงของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea (oryzae)* พบว่าที่ผนังด้านนอกของเซลล์ส่วนใหญ่บางและมี pectin มากกว่า lignin, ความหนาและความหนืดของผนังเซลล์เนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำ (xylem) และอาหาร (phloem) หรือเนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์ sclerenchyma จะกีดกันการลุกลามของเชื้อรา แบคทีเรีย และไส้เดือนบางชนิด เช่น การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคราสนิมบนกิ่ง, ก้าน และ ลำต้นของธัญพืช นอกจากนี้รวมทั้งชนิดและโครงสร้างของปากใบ (stomata) ปากใบที่มีช่องแคบอาจทำให้พืชต้านทานต่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อราที่เจาะผ่านพืชทางปากใบดีขึ้น ตลอดจนเวลาการปิดเปิดของปากใบก็มีส่วนเกี่ยวข้อง ตัวอย่างที่เห็นได้คือข้าวสาลีพันธุ์ต้านทานบางพันธุ์ ปากใบจะเปิดสายมากเป็นสาเหตุให้สปอร์ที่อยู่ในหยดน้ำใกล้ปากใบซึ่งงอกตั้งแต่เช้าถูกแดดเผาตายไป เพราะเมื่อสปอร์งอกแล้วไม่สามารถเข้าไปในพืชได้ หรือในโรค ergot ของข้าวสาลีหรือข้าวบาเลย์ที่เกิดจากเชื้อ *Claviceps purpurea* พบว่าในพันธุ์ที่ต้านทานมีกลีบดอกปิดตลอดเวลาจะเปิดเฉพาะในตอนเช้าช่วงผสมเกสรเท่านั้นจึงยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา (ธรรมศักดิ์, 2529) ความต้านทานที่พืชสร้างขึ้นเพื่อโต้ตอบการทำลายของเชื้อโรค แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

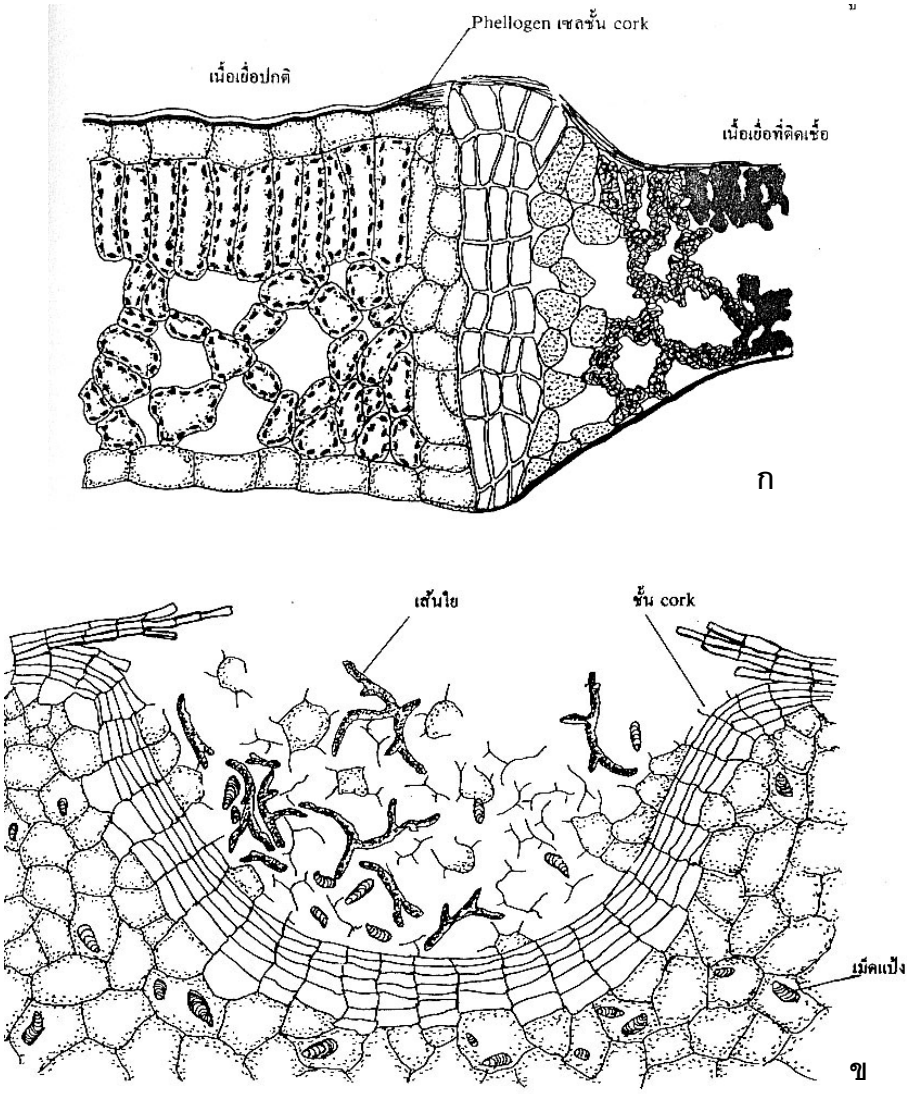
1.5 ความต้านทานที่พืชสร้างขึ้นเพื่อโต้ตอบการทำลายของเชื้อโรค (active resistance)

เป็นลักษณะของความต้านทานที่พืชสร้างขึ้น เพื่อตอบโต้การเข้าทำลายของเชื้อโรคเพื่อป้องกันการเจริญลุกลามของเชื้อโรคออกไป ปฏิกิริยาดังกล่าวมีดังนี้

1.5.1 ความต้านทานที่พืชสร้างขึ้นเพื่อโต้ตอบการทำลายของเชื้อโรคอย่างรวดเร็ว (rapid active resistance)

1.5.1.1 การป้องกันทางโครงสร้างที่เกิดจากเนื้อเยื่อ (histological defense structures)

1.5.1.1.1 เนื้อเยื่อประกอบด้วยเซลล์เจริญเป็นชั้น cork (cork layers) การเจริญเป็นชั้นของเซลล์มักเกิดจากหลายๆชั้นเรียงซ้อนทับเนื่องจากเซลล์ของพืชได้รับการกระตุ้นจากสารที่พืชขับถ่ายออกมาทางเนื้อเยื่อ เกิดกับบริเวณที่พืชติดเชื้อหรือแผลพืช ชั้นที่เกิดขึ้นนี้ช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อและสารพิษออกมาขยายวงกว้างออกไประงับการไหลเวียนของน้ำและอาหารของพืช จากเนื้อเยื่อปกติไปยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรคทำให้เชื้อและเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วอยู่ในขอบเขตที่เห็นเป็นจุดหรือพองนูนแยกส่วนออกมาจากเนื้อเยื่อปกติ (รูปที่ 6) (ไพโรจน์, 2534; Guest and Brown, 1997)



รูปที่ 6 การเจริญของเซลล์เป็นชั้น cork กั้นระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและเนื้อเยื่อปกติ

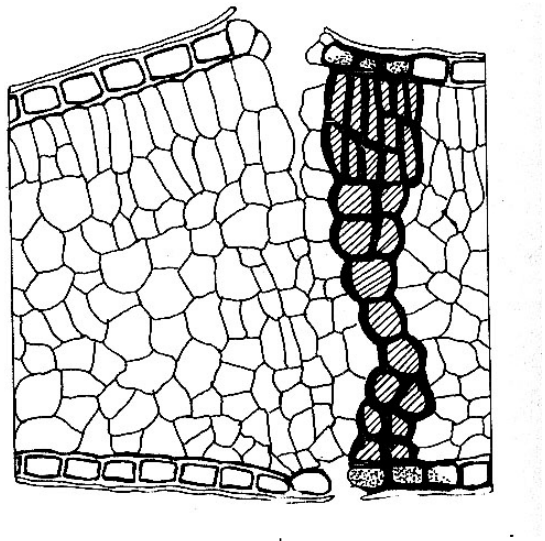
ก. ใบ

ข. หัวมันฝรั่ง

(ที่มา : Agrios, 1978)

1.5.1.1.2 เนื้อเยื่อแตกปริออก (abscission regions หรือ zone)

การแตกของเนื้อเยื่อเป็นช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เป็นชั้นทั้งสองข้างรอบบริเวณติดเชื้อของเนื้อเยื่อพืช (protective layers) การเกิดพบในใบอ่อนของไม้ผลบางชนิด ทำให้ใบร่วง เช่น ใบท้อที่ยับยั้งการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* หรือเชื้อรา *Clasterosporium carpophilum* (Mehrotra and Aggarwal, 2003) พบว่ามิดเดิล ลาเมลลา (middle lamella) ของเซลล์ที่อยู่ระหว่างชั้นทั้งสองนั้นถูกย่อยตลอดตามความหนาของใบทำให้เนื้อเยื่อดีถูกตัดออกจากบริเวณตัวเชื้อหรือแผลที่เป็นโรค ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคและสารที่เชื้อสร้างขึ้นลุกลามไปยังเนื้อเยื่อปกติ (รูปที่ 7) (ธรรมศักดิ์, 2529;ไพโรจน์, 2534)

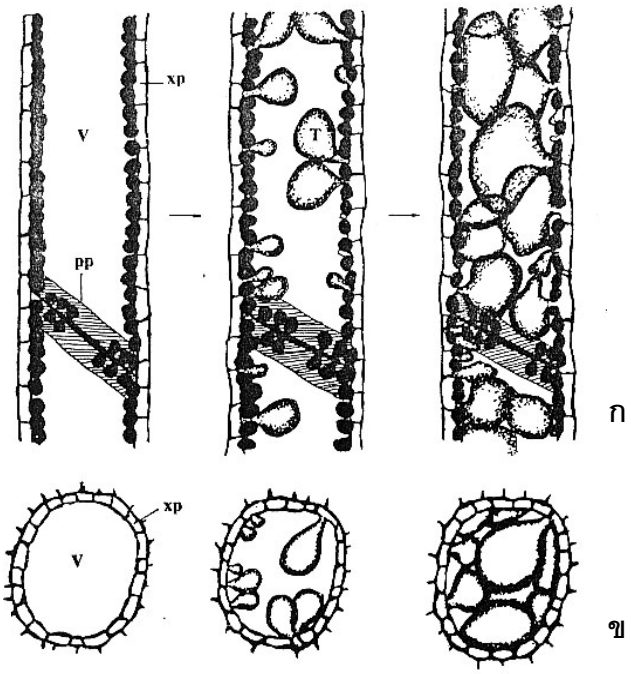


รูปที่ 7 การเกิดเนื้อเยื่อแตกปริเป็นช่องว่างรอบจุดที่เป็นโรค (abscission layer)
(ที่มา : Agrios, 1978)

1.5.1.1.3 การเกิด tylose ในท่อ xylem (tylosis)

การเกิด tylose เป็นการเจริญของโปรโตพลาส (protoplasm) ของเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) ที่อยู่ติดกับท่อ xylem โดยเจริญเข้าไปภายในท่อ xylem มีขนาดใหญ่และจำนวนมากจนทำให้ท่ออุดตัน (Guest and Brown, 1997) การเกิดจะเป็นในระหว่างที่เชื้อโรคเข้าทำลายทางกลุ่มท่อลำเลียงเป็นส่วนมาก ในพืชพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคจะเกิด tylose ได้มากมายอย่างรวดเร็วก่อนที่

เชื้อจะลุกลามไป หากเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอเชื้อจะเจริญไปถึงก่อนแล้วจึงเกิด tylose ภายหลังทำให้สามารถกีดกันการลุกลามของเชื้อได้พืชจึงเป็นโรครุนแรง (รูปที่ 8) เช่นโรคเหี่ยวของมันเทศ (Sweet potato wilt) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas Blackhurst* และ Wood (1963) รายงานว่าพบเปอร์เซ็นต์ของการอุดตันในท่อลำเลียงเนื่องจากการเกิด tylose ภายหลังจากการบ่มเชื้อ *Verticillium albo-atrum* บนใบมะเขือเทศผ่านไป 19 วันพบว่ามีการเกิด tylose 36% ในพันธุ์ต้านทาน (Loran Blood) มากกว่าในพันธุ์อ่อนแอ (Ailsa Craig) พบเพียง 23% (Mehrotra and Aggarwal, 2003)



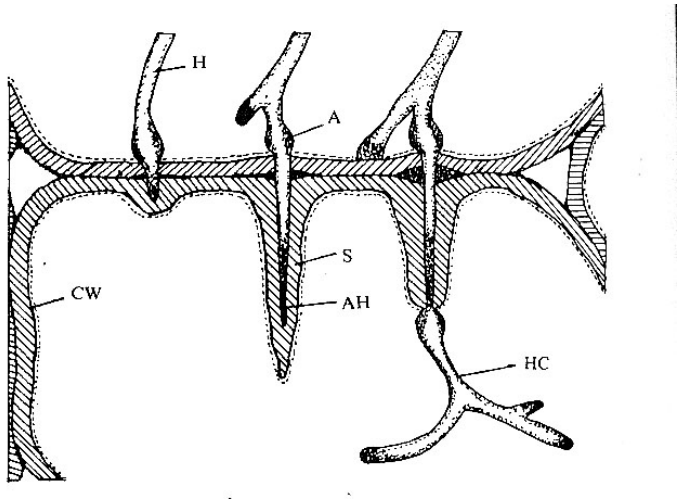
รูปที่ 8 การเกิด tylose ในท่อ xylem ก. ตัดตามยาว และ ข. ตัดตามขวาง : ภาพซ้ายมือเป็นพืชปกติ ภาพกลางเริ่มเกิด tylose และขวามือสุดท่อถูกอุดตันด้วย tylose, v = ท่อ xylem, xp = xylem parenchyma cell, T = tylose และ pp = ผนังกั้น
(ที่มา : Agrios, 1978)

1.5.1.1.4 การสะสมยางเหนียว (gum) ของเนื้อเยื่อพืช สร้างยางเหนียวขึ้นรอบบริเวณแผล ซึ่งอาจเป็นแผลที่เกิดขึ้นจากเชื้อโรคหรือสาเหตุอื่นๆโดยยางจะถูกสะสมอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์หรือภายในเซลล์ การสะสมของยางได้รวดเร็ว

รอบบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกเชื้อเข้าทำลายนั้น สามารถทำให้เชื้อบางชนิดชะงักการเจริญและขยายขอบเขตออกไปอีกไม่ได้เชื้อจะถูกจำกัดอยู่เฉพาะในแผล อัตราการสะสมยางมีความแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดและพันธุ์พืช (ประสาทพร, 2534) เช่นพบการสะสม gum ในข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรคใบไหม้ (Blast) จากเชื้อ *Piricularia oryzae* และโรคใบจุด จากเชื้อ *Helminthosporium oryzae* (Mehrotra and Aggarwal, 2003)

1.5.1.2 การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเซลล์ (cellular defense structures)

โครงสร้างป้องกันที่เกิดจากเซลล์ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของผนังเซลล์ ในระหว่างที่เซลล์ถูกเชื้อทำลายซึ่งมีกลไกที่มีขอบเขตจำกัด พบในโรคที่เกิดจากเชื้อรา 2 แบบคือ เกิดจากการโป่งออกของเซลล์อิพิเดอร์มิสและเซลล์ที่อยู่ใต้อิพิเดอร์มิส ในระหว่างที่เชื้อแทงผ่านพืชโดยตรงซึ่งอาจยับยั้งการแทงผ่านและการตั้งรกรากของเชื้อ และการเกิดเป็นปลอกห่อหุ้มเส้นใยของเชื้อที่เริ่มแทงผ่านเซลล์ (รูปที่ 9) (ไพโรจน์, 2525; ประสาทพร, 2534; Mehrotra and Aggarwal, 2003) เช่นพบการเกิดปลอกหุ้ม haustoria ในใบกาแฟพันธุ์ต้านทาน (*C. arabica* และ *C. congensis*) หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *H. vastatrix* (Silva *et al.,* 2002 a).



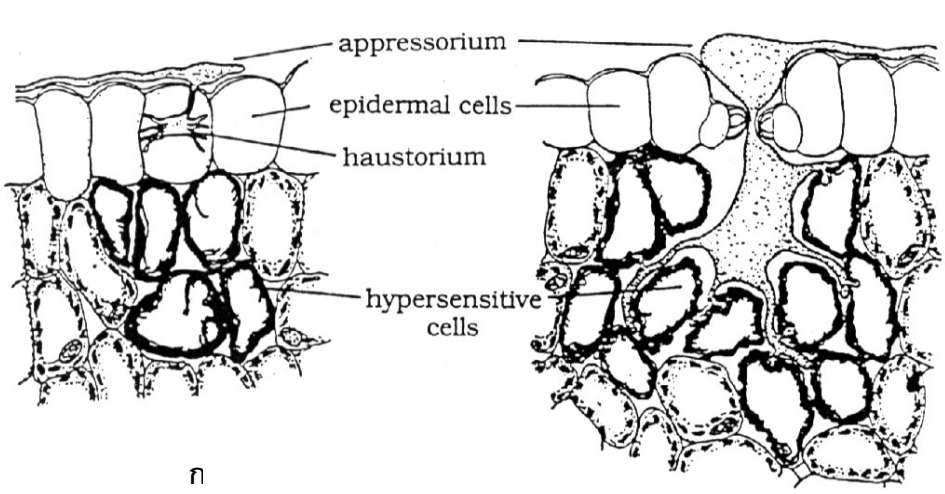
รูปที่ 9 การเกิดปลอกห่อหุ้มรอบเส้นใยที่แทงผ่านผนังเซลล์ CW = ผนังเซลล์, H = เส้นใย, A = appressorium, AH = เส้นใยที่แทงผ่านผนังเซลล์ซึ่งมีปลอกห่อหุ้ม, S = ปลอกห่อหุ้ม, HC = เส้นใยใน cytoplasm (ที่มา : Agrios, 1978)

1.5.1.3 การป้องกันที่เกิดจากปฏิกิริยาในไซโทพลาสซึม (cytoplasm)

cytoplasmไปคลุมกลุ่มของเส้นใย โดยนิวเคลียสของพืชจะเคลื่อนตามไปด้วย แล้วโปรโตพลาสม (protoplasm) จะเริ่มจางหายในขณะที่เส้นใยของเชื้อเจริญมากขึ้น บางครั้งเซลล์ที่เชื้อเข้าทำลาย cytoplasm และ nucleus จะขยายใหญ่ขึ้น ทำให้ cytoplasm กลายเป็นเมล็ดเด่นชัด เส้นใยของเชื้อสลายตัวเห็นเป็นส่วนๆ แล้วการเข้าทำลายก็หยุดลง (ไพโรจน์, 2525; Mehrotra and Aggarwal, 2003)

1.5.1.4 รอยไหม้ (necrosis) และการตายอย่างว่องไวของเซลล์ (hypersensitive cell death)

การเกิดรอยไหม้เป็นลักษณะที่เกิดจากการตายของเซลล์ตรงตำแหน่งที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อโรคหรือสารพิษต่างๆ โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล มักเป็นแบบแห้ง หรือมีแผลเป็นหย่อมๆ ถ้าพืชเกิดรอยไหม้อย่างว่องไวเมื่อถูกบุกรุกจากเชื้อก่อโรคจะเรียกการตอบสนองนี้ว่า “ hypersensitive ” (Guest and Brown, 1997) (รูปที่ 10) อาการรอยไหม้พบทั่วไปตามบริเวณส่วนของพืชที่เป็นโรค ได้แก่ ขน ใบ ต้น โคน ราก หัว ฝัก ผล ฯลฯ ขนาดของรอยไหม้จะมีขอบเขตกว้างหรือแคบ เกิดเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น ส่วนของพืช, ชนิดของพืชที่ถูกอาศัย, เชื้อที่บุกรุก, สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมต่างๆ อาการของรอยไหม้ที่พบทั่วไป เช่น อาการแบบเป็นจุด (spot) มักเกิดบนใบหรือผล ตามปกติมีขนาดแผลประมาณ 1 หรือ 2 มิลลิเมตรจนถึง 1 เซนติเมตรขึ้นไป (ไพโรจน์, 2525) มีรูปร่างกลม เนื้อเยื่อตรงกลางแผลซึ่งตายแล้วจะทำให้เห็นโซนรอบๆแผล อาจเป็นสีแดงหรือเหลือง เช่น โรคใบจุดนูน (*Colletotrichum* leaf spot) หรือลักษณะรอยไหม้ที่เป็นจุดนูนสีน้ำตาล ขอบแผลสีเหลืองลักษณะคล้ายรอยไหม้ แผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1–2 เซนติเมตรซึ่งเกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* หรือบางโรคอาจจะมีลักษณะเป็นรอยขีด (streak) ตามความยาวของใบ เส้นใบและลำต้น หรือไม่อาจมีลักษณะรอยไหม้เป็นจุดกลมและเป็นลายก้างปลาบนใบอ่อนและใบแก่เพราะเกิดการลุกลามไปตามเส้นใบ เป็นอาการของโรคใบจุดก้างปลา (*Corynespora* leaf disease) ที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (สถาบันวิจัยยาง, 2544 ข)



รูปที่ 10 แสดงลักษณะการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองแบบ hypersensitive cell death ของใบไม้เมื่อถูกบุกรุกจากเชื้อก่อโรค

ก. ลักษณะ hypersensitive cell death เมื่อเชื้อก่อโรคแทงเข้าไปในเซลล์พืชโดยตรง

ข. ลักษณะ hypersensitive cell death เมื่อเชื้อก่อโรคแทงผ่านเข้าไปในเซลล์ใบไม้โดยผ่านบริเวณปากใบ

(ที่มา : Guest and Brown, 1997)

Breton และคณะ (1997 a) ได้นำเชื้อรา *C. cassiicola* มาบ่มบนใบยางพาราพบว่า หลังจากบ่มเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง นีโครซีสที่เกิดขึ้นจากการเข้าทำลายใบยางด้วยสปอร์ มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างใบยางพันธุ์ต้านทาน (พันธุ์ GT1) กับพันธุ์อ่อนแอ (PB260) โดยที่นีโครซีสในใบยางพันธุ์ต้านทาน มีขนาดเล็กเป็นจุดๆซึ่งแสดงถึงการเกิด hypersensitive reaction ซึ่งตรงกันข้ามกับนีโครซีสในใบยางพันธุ์อ่อนแอที่พบว่ามีขนาดใหญ่ และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงนีโครซีสจะแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ จนทำให้เกิดรอยด่าง (discolor) บริเวณเส้นใบที่อยู่รอบๆบาดแผล ซึ่งแสดงถึงการเกิดโรคก้างปลา (fish bone) ทั้งนี้เนื่องจากใบยางพันธุ์ต้านทานแสดงถึงความสามารถในการกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียง ส่วนพันธุ์อ่อนแอการที่พบขนาดของนีโครซิสใหญ่และแผ่กว้างแสดงถึงการเกิดโรค คือเกิดปฏิกิริยา compatible ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อนแอ ส่วนปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์ต้านทาน เรียกว่า ปฏิกิริยา incompatible แต่

ถ้ามีการเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อโรคปฏิกิริยานี้ก็สามารถเปลี่ยนเป็น compatible ได้เช่นกัน ดังนั้นลักษณะของนีโครซีสที่เกิดจากการตอบสนองของใบยางต่อเชื้อก่อโรคสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ และท็อกซินจากเชื้อรา *C. cassiicola* สามารถทำให้ใบยางเกิดนีโครซีสได้และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการบ่มเชื้อลงบนใบยางด้วยสปอร์โดยตรง นอกจากนี้การบ่มใบยางพาราด้วย palmivorein ซึ่งเป็นอิลิซิเตอร์ที่มีขนาด 10 กิโลดาลตันของเชื้อรา *P. palmivora* ในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24, (ต้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) ทำให้เกิดนีโครซีสแตกต่างกันคือพันธุ์ที่ต้านทานพบนีโครซีสที่มีขอบเขตชัดเจนสีดำตามลักษณะของ hypersensitive cell death ส่วนพันธุ์อ่อนแอพบรอยไหม้เป็นสีน้ำตาลและแผ่กว้างออกไป ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิดโรค ทำให้สามารถนำท็อกซินของเชื้อราไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ยางได้ (นิลุบล, 2545)

1.5.1.5 **ไฟโตอเล็กซิน** (phytoalexin)

เป็นปฏิชีวนะสารที่พืชสร้างขึ้นและมีพิษต่อเชื้อรา (antimicrobial) มีมวลโมเลกุลต่ำ และมีธาตุคาร์บอน, ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบที่พบสะสมเฉพาะในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้น (stress) จากอิลิซิเตอร์ชนิดต่างๆทั้งไบโอติก (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)

1.5.1.5.1 คุณสมบัติของไฟโตอเล็กซิน

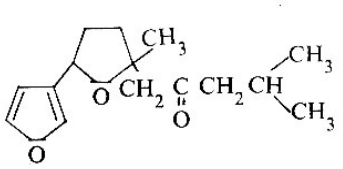
เป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะขึ้นอยู่กับพืชที่สร้างขึ้นจากการกระตุ้นของเชื้อ โดยไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งปฏิกิริยาเกิดในเนื้อเยื่อที่มีปรสิตอยู่และในเนื้อเยื่อของเซลล์ข้างเคียง อัตราการเกิดไฟโตอเล็กซินขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และกำเนิดในเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น (ไพโรจน์, 2525) รวมทั้งเชื้อ

ราที่เป็นสาเหตุโรคจะกระตุ้นให้พืชสร้างไฟโตอเล็กซินได้ในอัตราความเข้มข้นต่ำกว่าเชื้อที่ไม่ได้เป็นสาเหตุโรค ไฟโตอเล็กซินที่พืชอาศัยสร้างจะมีพิษต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนั้นน้อยกว่าเชื้อราอื่นๆที่ไม่ใช่สาเหตุโรค เช่น จากการศึกษาการสะสมไฟโตอเล็กซินบริเวณอีพิเดอร์มิสของใบถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อรา *Botrytis fabae* ที่ก่อให้เกิดโรคและเชื้อราที่ไม่ใช่สาเหตุโรคคือ *Botrytis cinerea* พบว่าถ้าเป็นเชื้อที่ก่อโรคเส้นใยของเชื้อราจะเจาะผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ได้เร็วและเกิดการตายของเซลล์พืชก่อนที่จะมีการสะสมไฟโตอเล็กซินได้มากพอเพื่อใช้ในการต้านทาน แต่เชื้อราที่ไม่ได้ทำให้เกิดโรคถูกหยุดการเจริญเติบโตทันทีเพราะมีการสะสมไฟโตอเล็กซินจำนวนมาก (Darvill and Albersheim, 1984) และนอกจากนี้เชื้อราที่แตกต่างกันจะมีปฏิกิริยาในระดับที่แตกต่างกัน ในพืชพันธุ์ต้านทานโรค หรือพืชที่เป็นโรคง่ายมีการเกิดไฟโตอเล็กซินคล้ายกันแต่แตกต่างกันที่อัตราการเกิดเท่านั้น อย่างเช่นที่พบในการปลูกเชื้อ *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* บนใบ plane tree ที่เป็นพันธุ์ต้านทาน (*platanus* occidentalis) และพันธุ์อ่อนแอ (*platanus acerifolia*) สามารถชักนำให้เกิดนีโครซีสและการสะสมไฟโตอเล็กซินได้สองชนิดคือ scopoletin และ umbelliferone โดยขนาดของนีโครซีสขยายกว้างและมีการสะสมไฟโตอเล็กซินได้เร็วในปฏิกิริยา incompatible (พันธุ์ต้านทาน) ซึ่งมากกว่าในปฏิกิริยา compatible (อ่อนแอ) ประมาณ 30 เท่าจากการหยดบนหลังใบ และประมาณ 120 เท่าในการสะสมภายในเนื้อเยื่อของเซลล์ (Modafar, 1995)

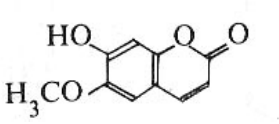
ไฟโตอเล็กซินสามารถแยกออกมาจาก ลำต้น, ราก, ใบ และผล ที่เกิดจากการติดเชื้อ มีโครงสร้างที่แตกต่างกันมากกว่า 350 แบบจากพืช 30 ชนิดซึ่งมากกว่า 130 แบบมาจากพืชวงศ์ *Leguminosae* พบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledons) และพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledons) (Kuc', 1995) และมีชื่อเฉพาะที่แตกต่างกันไป เช่น ipomeamarone และ scopoletin พบในมันเทศ, orchinol พบในกล้วยไม้ต่างๆ, pisatin พบในถั่วลันเตา, phaseolin พบในถั่วเมล็ดแบนต่างๆและ rishitin ที่พบในมันฝรั่ง (รูปที่ 11) (ไพโรจน์, 2525)

1.5.1.5.2 วิถีการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน

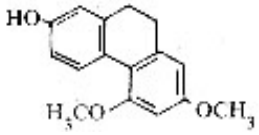
การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินในพืชทุกชนิดอาศัยวิถีของ shikimate, acetate-malonate และ acetate-mevalonate ซึ่งเป็นวิถีเมตาบอลิซึมแบบทุติยภูมิ (secondary metabolism pathways) โดยวิถี shikimate ถูกนำไปสังเคราะห์ chlorogenic acid, วิถี acetate-mevalonate ถูกนำไปสังเคราะห์ 6-methoxymellein และ wyerone ส่วนวิถี acetate-mevalonate ถูกนำไปสังเคราะห์ rishitin และ ipomeamarone สำหรับไฟโตอเล็กซินบางชนิดต้องอาศัยวิถีการสังเคราะห์ร่วมกันสองถึงสามวิถี ตัวอย่างเช่น จากวิถี acetate-mevalonate ร่วมกับวิถี shikimate ใช้สังเคราะห์ glycinol และ pisatin ส่วนวิถี acetate-malonate, acetate mevalonate และ shikimate วิถีทั้งสามทำให้เกิดการสังเคราะห์ kievitone, plaseollin และ glyceollin I เป็นต้น (รูปที่ 12) (Kuc', 1995)



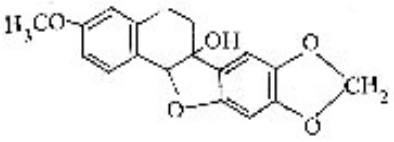
Ipomeamarone พบในมันเทศ



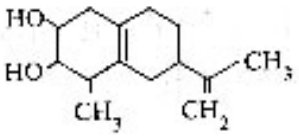
Scopoletin พบในมันเทศ และยางพารา



Orchinol พบในกล้วยไม้ต่างๆ

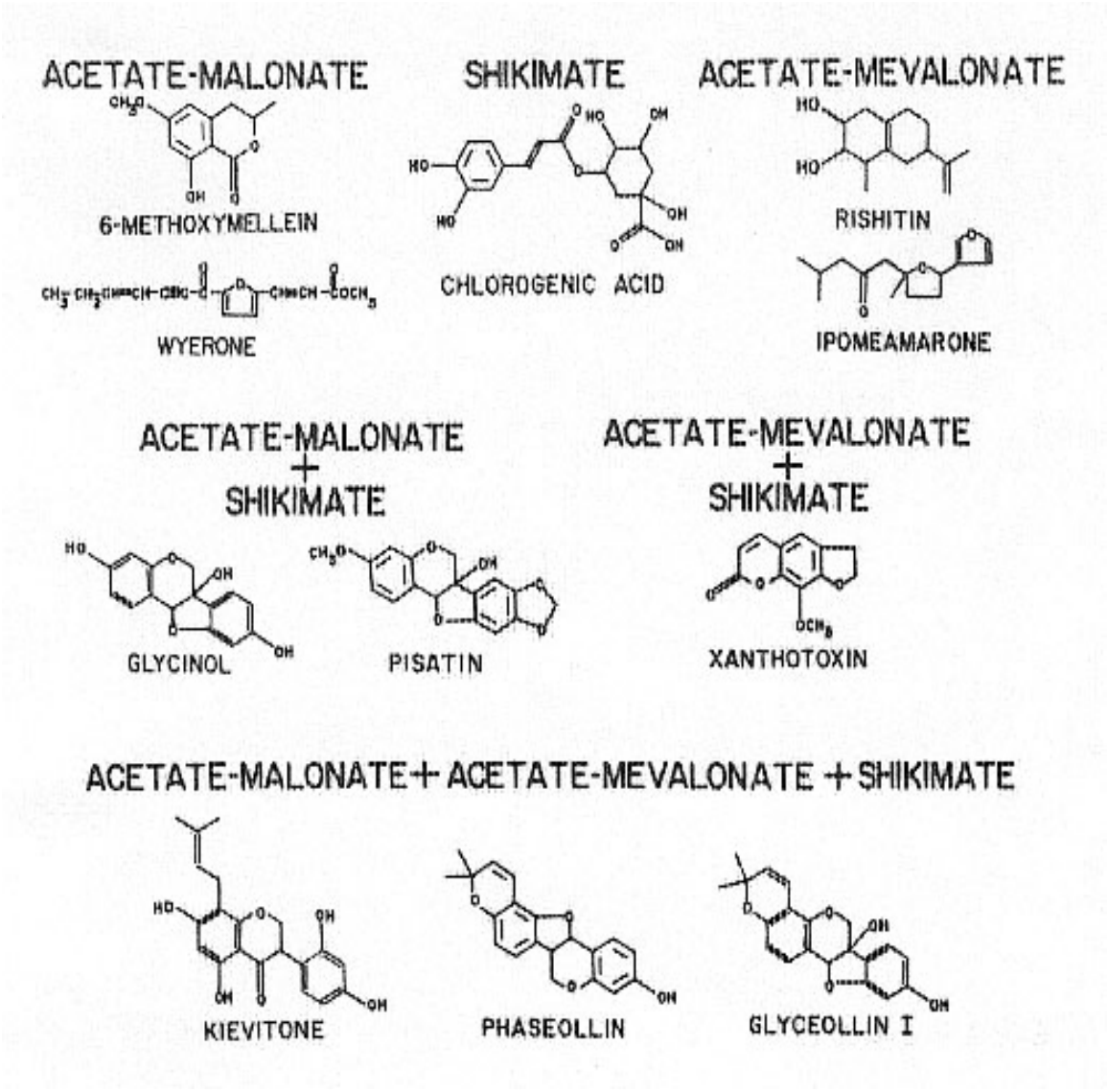


Pisatin พบในถั่วลันเตา



Rishitin พบในมันฝรั่ง

รูปที่ 11 ตัวอย่างโครงสร้างของไฟโตอเล็กซินที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบโต้การเข้าทำลายของเชื้อรา (ที่มา : ดัดแปลงจาก ไพโรจน์, 2525)



รูปที่ 12 ตัวอย่างวิถีที่นำไปสู่การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน
(ที่มา : Kuc', 1995)

สำหรับในยางพาราการตอบสนองในการป้องกันตัวเอง พบเป็นครั้งแรกโดย Tan และ Low ในปี 1975 โดยพบว่าเกิดสารเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตซึ่งเป็นสารประกอบสีฟ้าในเนื้อเยื่อใบภายใต้การตอบสนองการต้านทานต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ต่อมา Gieseman และคณะ (1986) พบสคอพอลิติน บนใบยางพาราเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Microcyclus ulei* ระดับการ

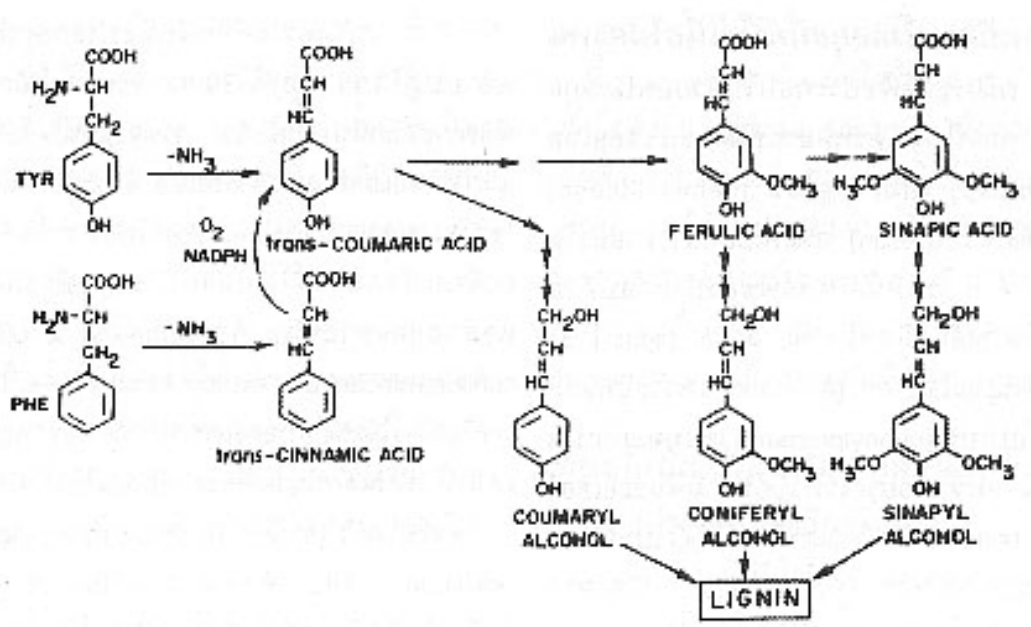
ต้านทานสัมพันธ์กับความเร็วและปริมาณการสะสมสคอพอลิติน โดยในพันธุ์ที่ต้านทานมีการสะสมสคอพอลิตินสูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Garcia *et al.,* 1995 b) รวมทั้งสร้างได้เร็วกว่าพันธุ์อ่อนแอ สคอพอลิตินสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของโคนิเดียม (conidium) ซึ่งเป็นสปอร์ของเชื้อรา *M. ulei* ได้ เช่นเดียวกับที่รายงานโดย Churngchow และ Rattarasarn (2001) โดยการบ่มเชื้อรา *P. palmivora* ลงบนใบยาง 4 พันธุ์ได้แก่ BPM-24, PB-235, RRIT251 และ RRIM600 สามารถบอกความแตกต่างของระดับความต้านทานโรคโดยอาศัยอัตราเร็วกับปริมาณของสคอพอลิตินที่เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อซึ่งพบว่าพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) และ PB235 (ค่อนข้างต้านทาน) สามารถสังเคราะห์ปริมาณไฟโตอเล็กซินได้เร็วและมีปริมาณในการสังเคราะห์สูงกว่าพันธุ์ RRIT251 (ค่อนข้างอ่อนแอ) และ RRIM600 (อ่อนแอ)

1.5.1.6 การสังเคราะห์ลิกนิน (lignification)

ผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป มี 2 ชนิด คือ ผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary wall) เกิดขึ้นครั้งแรกขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต เซลล์บางชนิด เช่น พาเรนไคมา (parenchyma) และคอลเลนไคมา (collenchyma) ประกอบด้วยสารเคมีพวกเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose), เพคตินและโปรตีน ชนิดที่สองคือผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary wall) เกิดขึ้นภายหลังผนังเซลล์ปฐมภูมิหลังจากที่เซลล์หยุดการเจริญแล้ว โดยจะพอกทับผนังเซลล์ปฐมภูมิให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น ประกอบด้วยสารเคมีพวกเซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งลิกนินนั้นเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ เกิดจากการรวมกันของสารประกอบแอลกอฮอล์เชิงซ้อน แอลกอฮอล์ที่พบว่าเป็นส่วนประกอบของลิกนินมากคือโคนิเฟอริล (conoferyl), ไซนาปิล (sinapyl) และคอมาริล (coumaryl) (ลัดดา, 2541) แอลกอฮอล์ทั้งสามเปลี่ยนแปลงมาจากกรดอะมิโนชื่อฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ด้วยเอนไซม์ฟีนิลอะลานีน แอมโมเนีย ไลเอส (phenylalanine ammonia lyase) ได้เป็นกรดซินนามิก (cinamic acid) หรือจากกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ด้วยเอนไซม์ไทโรซีน แอมโมเนีย ไลเอส (tyrosine ammonia lyase) ได้เป็นกรดคอมาริก (coumaric acid) ซึ่งกรดดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น

แอลกอฮอล์ทั้งสาม (รูปที่ 13) จากนั้นแอลกอฮอล์แต่ละชนิดจะมาเชื่อมต่อกันกลายเป็นลิกนิน

พืชจะตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์พืชและกักเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามหรือแพร่กระจายออกไป Friend และคณะ (1973) พบว่าการสร้างลิกนินในมันฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. infestans* ได้ ส่วนในยางพารานั้น Garcia และคณะ (1995 a) รายงานไว้ว่ามีการกักบริเวณไม่ให้เชื้อ *M. ulei* ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียง โดยการสร้างลิกนินเป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งในการต้านเชื้อราชนิดนี้ ซึ่งการสร้างลิกนินบริเวณผนังเซลล์จะแตกต่างกันไปตามระดับความต้านทานของยางพารา รวมทั้งยังรายงานไว้อีกว่า เมื่อทำการปลูกเชื้อรา *M. ulei* บนใบยางพาราเป็นเวลา 4 วัน ระดับการสร้างลิกนินจะแตกต่างกัน กล่าวคือใบยางพาราพันธุ์ที่มีความต้านทานสูงจะมีการสร้างลิกนินเฉพาะบริเวณที่มีการบุกรุกด้วยสปอร์ของเชื้อรา สำหรับใบยางพันธุ์ที่มีความต้านทานปานกลาง และพันธุ์อ่อนแอมีการสร้างลิกนินรอบๆบริเวณรอยแผลที่เกิดจากการลุกลามไปถึงของเชื้อรา โดยที่พันธุ์ยางที่ต้านทานปานกลางมีปริมาณการสร้างลิกนินมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ และไม่พบเส้นใยราซึ่งเป็นที่เกิดของสปอร์ (conidiophores) รอบๆบริเวณที่มีการสร้างลิกนิน แสดงว่าการสร้างลิกนินสามารถกักบริเวณไม่ให้เชื้อลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงซึ่งจะแตกต่างจากพันธุ์ยางในกลุ่มอ่อนแอที่ยังคงพบ coniodiophores ของเชื้อราในบริเวณที่มีการสร้างลิกนิน นอกจากนี้พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อต่อต้านเชื้อราของใบยางพันธุ์ต้านทานยังมีปริมาณสูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแออีกด้วย (Breton *et al.*,1997 b) แสดงว่ามีการสร้างลิกนินเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช



รูปที่ 13 วิถีการสังเคราะห์ลิกนินโดยสังเขป (ที่มา : มนตรี และคณะ, 2542)

1.5.2 การตอบสนองที่ต้องใช้เวลานานจึงจะเกิดขึ้น (delayed active defense)

1.5.2.1 การสังเคราะห์ pathogenesis–related protein (PR–proteins)

PR – protein เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีขนาดมวลโมเลกุล 10,000 – 40,000 ดาลตัน พบภายในพืชโดยทั่วไป โดยในพืชปกติมักพบ PR – proteins น้อยมากหรือไม่พบเลยแต่จะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเพื่อต่อต้านและยับยั้งการถูกบุกรุกจากเชื้อโรค หรือภายใต้สภาวะกดดันอื่นๆอีก เช่น การเกิดบาดแผล (wounding) และจากสารเคมี (chemical treatment) (Pierpoint, 1986) บางชนิดเช่น ethylene hormone (Boller, 1985) PR–proteins จะถูกสะสมนอกเซลล์ในขณะที่พืชติดเชื้อ โดยโปรตีนนี้จะทนทานต่อ proteolytic degradation ได้ดีและโปรตีนนี้มักจะมีค่า isoelectric point สูง

PR – proteins ที่พืชสร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่มีผลโดยตรงต่อเชื้อราคือเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucanase) เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ทำงานร่วมกันแบบ synergistic (Mauch *et al.,* 1988b) และพบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีการติดเชื้อ เช่น ใบยาสูบ, ข้าวบาร์เล่ย์และมันฝรั่ง เป็นต้น เอนไซม์ไคติเนสทำหน้าที่กระตุ้นการย่อยสลายไคติน

ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อรา ได้มีรายงานว่า ไคติเนสซึ่งเตรียมได้จากข้าวบาร์เลย์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma reesei*, *Alternaria alternaria, Phycomyces blakesleesasus* และ *Neurospora crassa* (Robert and Selitrennikoff,1986) ส่วนเอนไซม์เบต้า -1,3-กลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส คือเร่งปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำ จะทำหน้าที่สลายพันธะเบต้า-1,3-กลูแคน ตัวอย่างของเอนไซม์ในแหล่งอื่น เช่น *Arthrobactor luteus* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะสลายพันธะกลูแคนจากผนังยีสต์

Mauch และคณะ (1988a) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบคู่กับเอนไซม์ไคติเนสทำให้บริสุทธิ์จากฝักถั่วลันเตาที่ติดเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Fusarium phasioli* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 15 ชนิด จาก 18 ชนิด ที่ทดสอบ แต่ถ้าใช้เอนไซม์เบต้า-1,3 -กลูคาเนสเพียงอย่างเดียวจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น แสดงว่าเบต้า-1,3- กลูคาเนสและไคติเนสในถั่วสามารถทำงานร่วมแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา นอกจากจะทำงานร่วมกันแล้วยังถูกควบคุมด้วยกลไกที่คล้ายคลึงกันด้วย คือเอนไซม์ทั้งสองสามารถถูกยับยั้งการสร้างเมื่อใช้ auxin และ cytokinin (Shinshi *et al*., 1987)

Martin และคณะ (1991) ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไคติเนสจากน้ำยางพาราและพบว่ามีเอนไซม์ไคติเนสสูงถึง 20 % ของโปรตีนทั้งหมด ในขณะที่พืชทั่วๆไปมีไคติเนสเพียง 1–2 % ของโปรตีนทั้งหมดเท่านั้น นอกจากนี้ Churngchow และคณะ (1995) ยังมีการรายงานไว้อีกว่า เอนไซม์เบต้า–1,3-กลูคาเนส ก็มีปริมาณสูงเช่นเดียวกันโดยสูงถึง 15 % ของโปรตีน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากต้นยางถูกกรีดเกือบทุกวัน หน้ายางจะถูกเปิดออกทำให้เชื้อราผ่านเข้าไปตามท่อน้ำยางได้ง่าย ดังนั้นเพื่อป้องกันเชื้อรา เอนไซม์ทั้งสองจึงถูกสร้างขึ้นตลอดเวลาโดยไม่ต้องมีการกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อเหมือนในพืชอื่นๆ นอกจากนี้การเกิดบาดแผลจากการถูกกรีดบ่อยๆก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์ทั้งสองมีปริมาณสูง

สำหรับการทดลองเกี่ยวกับเชื้อรา *C. cassiicola* พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสก็ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ แต่ปริมาณการสังเคราะห์ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ เนื่องจากใบยางทั้งพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอถูกชักนำให้สร้างเอนไซม์ทั้งสองในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (Breton *et al*., 1997) ต่อมา Christopher และคณะ (2000) พบว่าเชื้อรา *Alternaria solani* ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ (blight) ในมะเขือเทศ สามารถชักนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งสองชนิดขึ้นและสามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอได้ โดยพันธุ์ที่ต้านทานสามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสองได้เร็วและมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ เช่นเดียวกับในใบแตงโมที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Sphaerotheca fusca* กล่าวคือใบแตงโมของพันธุ์ต้านทานสามารถสร้างเอนไซม์ เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่มีขนาด 33 กิโลดาลตัน ได้มากและเร็วกว่าพันธุ์ที่อ่อนแอ (Rivera *et al*., 2002)

1.5.2.2 กลไกที่จำเป็นในการต้านทานต่อโรค (systemic acquired resistance, SAR)

SAR เป็นปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างพืชและเชื้อก่อโรค (plant-pathogen interaction) ซึ่งเชื้อก่อโรคดังกล่าวคือพวกไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราที่สามารถชักนำให้เกิดการต้านทานโรคของพืชบางชนิด จากการรุกรานของเชื้อก่อโรคที่รุนแรงหรือเกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อ พื้นฐานของ SAR แตกต่างจากความจำเพาะระหว่างแอนติเจน (antigen) และ แอนติบอดี (antibody) ที่เป็นตัวกลางในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพราะการเกิด SAR ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่งและมีช่วงเวลาในการแสดงที่สั้นกว่าระบบภูมิคุ้มกัน (Oku, 1993) การเกิด SAR ทำให้เกิดการแผ่ขยายออกของนีโครซีสอย่างช้าๆซึ่งในพืชที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิด SAR ทำให้เกิดการตอบสนองในการป้องกันตัวเองที่เร็วและมากกว่าในพืชที่ไม่เคยได้รับการกระตุ้น ตัวถูกกระตุ้นดังกล่าว เช่น salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) และอิลิซิเตอร์อื่นๆ รวมทั้งอิลิซิติน (elicitin) (Guest and Brown, 1997)

จากการทดลองโดยการบ่มเชื้อ *P. nicotianae* บนลำต้นยาสูบที่ถูกกระตุ้นจากอิลิซิเตอร์มาก่อนทำให้เกิดนีโครซีสที่มีขอบเขตที่จำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดควบคุมซึ่งถูกกระตุ้นด้วยน้ำแทนอิลิซิเตอร์ พบว่าเชื้อยังคงสามารถลุกลามออกไปได้ (Ricci *et al*., 1989) และการบ่มใบยางด้วย tobacco necrosis virus (TNV) บนใบมะเขือเทศใบล่างสองใบสามารถชักนำให้เกิด SAR บนใบมะเขือเทศใบบนส่งผลให้ลดการเกิดโรคใบไหม้ของมะเขือเทศได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำแทน TNV และสามารถชักนำให้เกิด PR-protein ในใบที่ถูกบ่มเชื้อ (ใบที่ 1 และ 2) และใบที่สามที่อยู่บนใบที่ถูกบ่มเชื้อด้วย (Anfoka and Buchenauer, 1997) นอกจากนี้การประยุกต์ใช้ chitosan หรือ digandrin ชนิดใดชนิดหนึ่งกับต้นมะเขือเทศที่ถูกตัดยอดเพื่อกระตุ้นให้เกิด SAR ทำให้อาการที่รุนแรงของเชื้อ *Fusarium* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดควบคุม โดย 5 วันหลังจากมีการปลูกเชื้อ *Fusarium* ไม่พบอาการของโรคและจำนวนบาดแผลที่เกิดบริเวณรากยังลดลงอีกด้วย (Benhamou *et al*., 2001) เช่นเดียวกับเมื่อประยุกต์ใช้ probenazole (PBZ) และ 1,2-benzisothiadiazole -1,1-dioxide (BIT) บนใบยาสูบใบล่างผ่านไป 7 วันพบว่าเมื่อทำให้ติดเชื้อ tobacco mosaic virus (TMV) ขนาดแผลของใบบนมีขนาดเล็กกว่าที่เกิดจากในชุดควบคุมที่กระตุ้นใบยาสูบด้วยน้ำ (Nakashita *et al*., 2002)

ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่ก่อโรคกับการตายของเซลล์ (cell death) ของยาสูบนั้น พบว่าเมื่อเกิดการตายของเซลล์จากการบ่มเชื้อ *Thielaviopsis basicola* ต้องมีการกระตุ้นให้เกิด SAR ด้วย ในขณะที่การชักนำให้เกิด SAR จากตัวกระตุ้นภายนอก เช่น SA หรือ 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด cell death จากเหตุผลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารประกอบที่กระตุ้นวิถีการเกิด SAR อยู่ต่ำกว่าวิถีที่ทำให้เกิด cell death (Hunt *et al*., 1996)

1.6 **อิลิซิติน** (Elicitin)

อิลิซิติน เป็นชื่อเรียกโดยรวมของกลุ่มโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กพบในสารสกัดผนังเซลล์ของเชื้อรา หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ของเชื้อราในกลุ่มไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora*) โดยผลิตออกมานอกเซลล์ (Huet and Pernollet, 1989) อิลิซิตินจัดเป็นอิลิซิเตอร์ชนิดหนึ่งซึ่งอิลิซิเตอร์จะมีอยู่สองชนิดคือไบโอติกอิลิซิเตอร์ (biotic elicitor) และอไบโอติกอิลิซิเตอร์ (abiotic elicitor) พวกไบโอติกอิลิซิเตอร์จะเป็นสารที่มาจาก เชื้อรา, เซลลูโลสและโปรตีนจากเชื้อรา ถ้าจำแนกตามสูตรโครงสร้างจะมีทั้งที่เป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide), โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), ไกลโคโปรตีน (glycoprotein), ไคโตแซน (chitosan) และกรดไขมัน (fatty acid) (Darvill and Albersheim, 1984) ส่วนชนิดที่สองที่เป็นอไบโอติกอิลิซิเตอร์ เช่นแสง, รังสีอุลตร้าไวโอเล็ตและไอออนจากโลหะหนัก ดังนั้นอิลิซิตินจัดเป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์ที่มีโครงสร้างเป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide)

อิลิซิตินมีชื่อเรียกเฉพาะตามชนิดของเชื้อราเช่น cryptogein เป็นอิลิซิตินที่ผลิตจาก *P. cryptogea* (Ricci *et al.,* 1989), cinnamomin ผลิตจาก *P. cinnamomi* (Billard *et al.,* 1988), capsicien ผลิตจาก *P. capsici* (Huet and Pernollet, 1989), parasiticein ผลิตจาก *P. parasitica* (Ricci *et al.,* 1992; Moutom-Perronnet, 1995) Dreβ และ Dreα ผลิตจาก *P. drechsleri* (Huet *et al.,* 1992), MgMβ และ MgMα ผลิตจาก *P. megasperma megasperma* (Huet *et al.,* 1993 a.) และ palmivorein ผลิตจาก *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasarn, 2000) และ Devergne และคณะ (1994) ยังพบอีกว่าหลังจากบ่มเชื้อรา *P. cryptogea* บนยาสูบ (glycoprotein), ไคโตแซน (chitosan) และกรดไขมัน (fatty acid) (Darvill and Albersheim, 1984) ส่วนชนิดที่สองที่เป็นอไบโอติกอิลิซิเตอร์ เช่นแสง, รังสีอุลตร้าไวโอเล็ตและไอออนจากโลหะหนัก ดังนั้นอิลิซิตินจัดเป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์ที่มีโครงสร้างเป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide)

อิลิซิตินมีชื่อเรียกเฉพาะตามชนิดของเชื้อราเช่น cryptogein เป็นอิลิซิตินที่ผลิตจาก *P. cryptogea* (Ricci *et al.,* 1989), cinnamomin ผลิตจาก *P. cinnamomi*

(Billard *et al.,* 1988), capsicien ผลิตจาก *P. capsici* (Huet and Pernollet, 1989), parasiticein ผลิตจาก *P. parasitica* (Ricci *et al.,* 1992; Moutom-Perronnet, 1995) Dreβ และ Dreα ผลิตจาก *P. drechsleri* (Huet *et al.,* 1992), MgMβ และ MgMα ผลิตจาก *P. megasperma megasperma* (Huet *et al.,* 1993 a.) และ palmivorein ผลิตจาก *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasarn, 2000) และ Devergne และคณะ (1994) ยังพบอีกว่าหลังจากบ่มเชื้อรา *P. cryptogea* บนยาสูบผ่านไป 1 และ 2 วัน พบการสร้าง cryptogein ขึ้นบริเวณลำต้นและใบจากการตรวจวัดด้วยวิธี DAS-ELISA อิลิซิตินจากทุกสปีชี่ส์เป็นโปรตีนที่ยังไม่ถูกเติมน้ำตาล (non-glycosylated protein) และเป็นโปรตีนพิษที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กประมาณ 10 kDa โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 เรซิดิวส์ (residue) มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) 3 แห่ง โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นเกลียวอัลฟา (α-helix) ประมาณ 50% และเป็นแผ่นพลีทเบต้า (β-pleated sheet) น้อยมากหรือไม่พบเลย (Huet *et al.,* 1992; Nespoulous *et al.,* 1992) ซึ่งอิลิซิตินจากน้ำเลี้ยงของเชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* ทุกสปีชีส์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 เรซิดิวส์มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันประมาณ 10 kDa แต่แตกต่างกันที่ลำดับกรดอะมิโนจึงทำให้มีประจุสุทธิแตกต่างกัน (Bonnet *et al.,* 1996) เช่นที่พบในอิลิซิติน cryptogein, capsicein และ cinnamomin มีการจัดลำดับของกรดอะมิโนในโมเลกุลของอิลิซิตินที่มีความอนุรักษ์ (conserved) และคล้ายคลึงกันมากกว่า 80% โดยเฉพาะส่วนกลางของโมเลกุล (central core) ส่วนที่แตกต่างคือการเรียงตัวของกรดอะมิโนบริเวณปลาย NH_2 และ ปลาย COOH ของสายเปปไทด์ (Huet and Pernollet, 1989)

เมื่อมีการปลดปล่อยอิลิซิตินที่ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* พบว่าอิลิซิตินอยู่ในรูป hydrophobic และมีความจำเพาะกับสเตอรอล (sterol) ที่อยู่บริเวณด้านนอกของเยื่อหุ้มพลาสมาจนเกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนระหว่างอิลิซิตินและสเตอรอล (elicitin-sterol complex) เกิดเป็นปฏิกิริยาได้สองทิศทางคือ ในทิศทางแรก elicitin-sterol complex จับกับตัวรับของพืช (plant receptor) ที่ผนังด้านนอกของเยื่อ

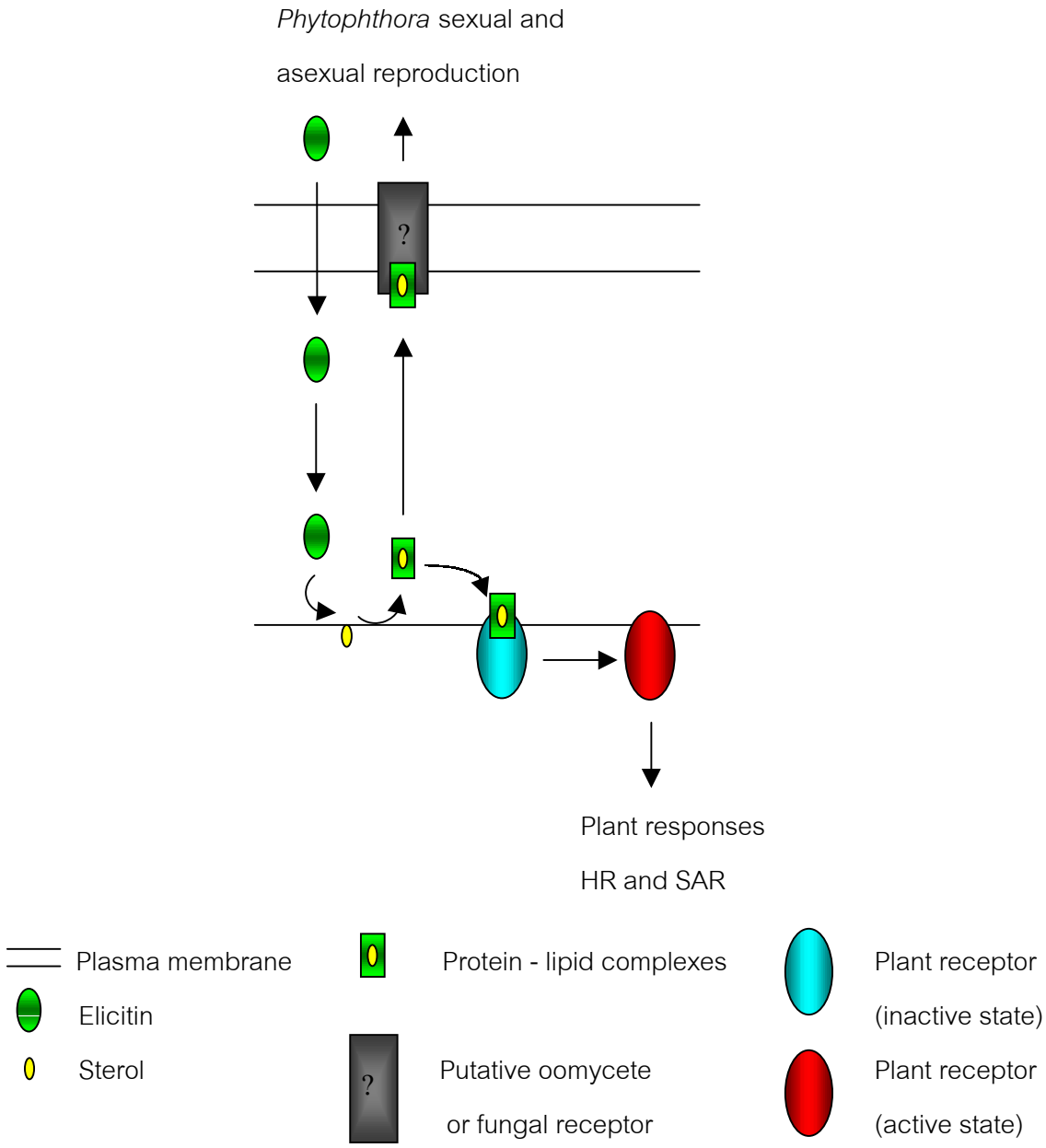
หุ้มพลาสมาและกระตุ้นให้พืชเกิดการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive response) และกลไกที่จำเป็นในการต้านทานโรค (systemic acquired resistance, SAR) ขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัวเองของพืชจากการรุกรานของเชื้อก่อโรค และในทิศทางที่สองนั้นพบว่าอิลิซิตินที่หลั่งจากเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* จะนำพาสเตอรอลจากบริเวณผนังด้านนอกของเยื่อหุ้มพลาสมาของพืชที่ถูกอาศัยไปยังตัวรับของเชื้อราเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ของเชื้อราต่อไป (Blein *et al*., 2002) (รูปที่ 14) การที่เชื้อราต้องนำสเตอรอลจากเซลล์พืชเพราะเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* ไม่สามารถสังเคราะห์สเตอรอลได้เอง (Hendrix, 1970)

1.6.1 ชนิดของอิลิซิติน

อิลิซิตินสามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มคือกลุ่มแอลฟา (α-class) และกลุ่มเบต้า (β-class) โดยอาศัยลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence), องค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition), จุดไอโซอิเล็กตริค (isoelectric point; pI), ดัชนีไฮโดรพาที (hydropathy index) ซึ่งบ่งชี้ถึงบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิกของโปรตีน โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ที่สอดคล้องกับความว่องไวทางชีวภาพ

1.6.1.1 กลุ่มแอลฟา

เป็นอิลิซิตินที่มีสภาพเป็นกรด (acidic elicitin) มีค่า pI ประมาณ 4.5 (Berre *et al.,* 1994) โดยตำแหน่งที่ 13 เป็นกรดอะมิโนแวลีน (valyl residue) (Donohue *et al*., 1995) ซึ่งตำแหน่งที่ 13 นี้สัมพันธ์กับความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิตินมากกว่าตำแหน่งอื่น จากการหาโครงสร้างของอิลิซิตินในสภาพสามมิติโดยอาศัยเทคนิค nuclear magnetic resonance พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 13 เป็นตำแหน่งที่มีบทบาทในการทำงาน และมีผลต่อดัชนีไฮโดรพาทีต่อบริเวณที่ทำงาน (active site) และบริเวณที่ควบคุม (regulatory site) (Huet *et al.,* 1992) ดังนั้นจึงมีผลต่อความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่างอิลิซิตินและตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์เป้าหมาย (Donohue *et al.,* 1995) อิลิซิตินในกลุ่มนี้ได้แก่ capsicein, parasiticein (Ricci *et al.,* 1992), Dreα (Huet *et al.,* 1992) และ MgMα (Huet *et al*., 1993 a)



รูปที่ 14 ความน่าจะเป็นของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพืชกับ oomycete และ พืชกับเชื้อรา โดยเกี่ยวข้องกับ protein - lipid complex และการจดจำตัวรับที่จำเพาะเจาะจง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อรา *Phytophthora* จะมีอิลิซิตินวิ่งไปวิ่งมาระหว่าง *Phytophthora* และเซลล์พืช โดยที่ elicitin - sterol complex สามารถจดจำทั้ง *Phytophthora* และเซลล์พืช นำไปสู่การตอบสนองทางชีวภาพ (biological responses)
(ที่มา : ดัดแปลงจาก Blein, 2002)

1.6.1.2 กลุ่มเบต้า

เป็นอิลิซิตินที่มีสภาพเป็นเบส (basic elicitin) มีค่า pI ประมาณ 8.5 (Borre *et al.,* 1994) มีกรดอะมิโนไลซีน (lysyl residue) ที่ตำแหน่ง 13 (Donohue *et al*., 1995) เช่น cryptogein, cinnamomin (Ricci *et al.,* 1992), Dreβ (Huet *et al.,* 1992) และ MgMβ (Huet *et al*., 1993 a)

ทั้งสองกลุ่มทำให้เกิดรอยไหม้ (necrosis) บนใบยาสูบได้เหมือนกันแต่พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของอิลิซิตินเท่ากันในการทดสอบใบยาสูบ อิลิซิตินในกลุ่มเบต้า (cryptogein) มีความว่องไวในการเกิดรอยไหม้มากกว่าอิลิซิตินในกลุ่มแอลฟา (capsicein) ถึง 100 เท่า (Zanetti *et al.,* 1992) เช่นเดียวกับที่ Nespoulous และคณะ (1992) พบว่าอิลิซิตินในกลุ่มเบต้า คือ cryptogein และ cinnamomin ทำให้เกิดรอยไหม้มากกว่าอิลิซิตินในกลุ่มแอลฟาคือ capsicein และ parasiticein ประมาณ 50-100 เท่า และจากการทดลองของ Kamoun และคณะ (1993) ยังยืนยันอีกว่าอิลิซิ-ตินในกลุ่มเบต้า (cryptogein) บนใบยาสูบและหัวผักกาด (radish) สามารถทำให้เกิดรอยไหม้ที่ไกลออกไปแบบ distal จากวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านมากกว่าอิลิซิตินในกลุ่มแอลฟา (parasiticein) แต่การเกิดรอยไหม้ตรงตำแหน่งที่สัมผัสอิลิซิตินโดยตรงแบบ local จากวิธีการหยดอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มบนหลังใบมีการเกิดรอยไหม้ไม่แตกต่างกัน แสดงให้ทราบถึงความว่องไวทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากการจัดลำดับของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลของอิลิซิตินที่แตกต่างกัน (Ricci *et al.,* 1989) จากการค้นพบของ Donohue และ คณะ (1995) รายงานว่าเมื่อทำการแทนที่ตำแหน่งที่ 13 ของ cryptogein จากกรดอะมิโนไลซีนเป็นกรดอะมิโนแวลีน ทำให้ระดับความว่องไวทางชีวภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากตำแหน่งที่ 13 ของอิลิซิตินในกลุ่มแอลฟาเป็นกรดอะมิโนแวลีนที่เป็นกรดอะมิโนชนิดอะลิฟาติก (aliphatic) แขนงข้าง (side chain) จึงไม่มีขั้ว (nonpolar) ไม่มีการแตกตัวและไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) แต่อิลิซิตินในกลุ่มเบต้าในตำแหน่งที่ 13 เป็นไลซีนที่เป็นกรดอะมิโนชนิดเบสิก แขนงข้างจึงมีลักษณะโพลาร์และแตกตัวได้ รวมทั้งมีลักษณะที่ชอบน้ำ (hydrophilic) จากลักษณะดังกล่าวทำให้อิลิซิตินในกลุ่มเบต้ามีความเป็นพิษมากกว่าในกลุ่มแอลฟา

อิลิซิตินมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองภายในพืช เช่น การเกิดรอยไหม้, การสะสมของ PR-proteins การสะสมไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) และลิกนิน (lignin) เป็นต้น เมื่อนำอิลิซิติน cryptogein มาทำการทดสอบกับเซลล์แขวนลอยยาสูบพบว่า cryptogein สามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมของเอทิลีน (ethylene) และแคปซิไดออล (capsidiol) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินชนิดหนึ่งของยาสูบ (Milat *et al.,* 1991) สำหรับการทดสอบในใบและต้นยาสูบจะเกิดรอยไหม้ร่วมกับการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินและการสร้าง PR-proteins (Huet *et al*., 1991) นอกจากอิลิซิตินจะสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองในยาสูบแล้วยังชักนำให้เกิดความต้านทานต่อ *P. parasitica* var. *nicotiana* ด้วย

ส่วนในยางพารา Churngchow และ Rattarasarn (2000) พบว่าอิลิซิติน (palmivorein) ที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงของเชื้อรา *P. palmivora* ทำให้ใบยางพาราเกิดรอยไหม้แบบ distal necrosis คือเกิดอาการเหี่ยวได้ โดยพบว่าในใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) จะเกิดอาการเหี่ยวมากกว่าใบยางพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) ซึ่งแสดงว่าในใบยางพันธุ์อ่อนแอไม่สามารถต้านทานโรคได้ (compatibility) ในขณะที่ใบยางพันธุ์ต้านทานมีการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive) ที่บ่งชี้ถึงการต้านทานโรค (incompatibility) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบอิซิตินดังกล่าวกับใบยาสูบด้วย ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกแบบ incompatible เนื่องจากยาสูบไม่ได้เป็นพืชอาศัย (non-host) ของเชื้อรา *P. palmivora*

1.6.2 การเตรียมอิลิซิตินให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา

โดยอาศัยมาตรฐานทางชีวเคมีนั่นคืออาศัยคุณสมบัติการละลาย, สมบัติทางประจุไฟฟ้าและขนาดของโมเลกุลของอิลิซิตินในการแยกให้บริสุทธิ์ เริ่มต้นจากนำน้ำเลี้ยงเชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นของเกลือ 90% เพื่อให้ไอออนของเกลือที่มากเกินพอแย่งจับน้ำจากโปรตีน ทำให้น้ำที่จับอยู่กับโปรตีนน้อยลง โปรตีนจึงรวมตัวกันและตกตะกอน ซึ่งในตะกอนเหล่านั้นจะมีอิลิซิตินรวมอยู่ด้วย จากนั้นนำอิลิซิตินที่ได้มาแยกโดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) ซึ่ง

ภายในคอลัมน์บรรจุโพลีเมอร์ที่มีประจุบวกหรือประจุลบได้แก่ diethylaminoethyl (DEAE) หรือcarboxymethyl (CM) เป็นต้น โปรตีนที่ประจุสุทธิตรงกันข้ามจะจับกับโพลีเมอร์ภายในคอลัมน์ได้และถูกชะออกมาเมื่อปรับ pH ให้โปรตีนที่แยกมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ หรือเติมเกลือลงในตัวชะ (elute) เพื่อสลายพันธะไอออนิก (ionic bond) ระหว่างโปรตีนกับโพลีเมอร์ภายในคอลัมน์ ต่อจากนั้นนำอิลิซิตินมาแยกโดยเทคนิคเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) และโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเอสดีเอส (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลสำหรับวิธี gel filtration เป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีการบรรจุเจล (gel) ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีรูเล็กๆ ลักษณะคล้ายฟองน้ำทำหน้าที่เหมือนตะแกรงแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกับโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะเข้าไปในเนื้อเจลไม่ได้และถูกชะออกจากหลอดแก้วก่อนโดยผ่านไประหว่างอนุภาคเจลเท่านั้น แต่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กสามารถเข้าไปข้างในเนื้อเจลได้ จึงสามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันได้ ส่วนเทคนิคที่ใช้อิเล็กโทรฟอรีซีสและ anionic detergent (SDS) ในการแยกโปรตีนขนาดต่างๆออกจากกัน โดยการนำโปรตีนมาต้มกับ SDS detergent ซึ่งจะจับกับโปรตีนในลักษณะไม่เป็นโควาเลนท์ ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ จำนวนประจุลบจึงเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนโปรตีน ในขณะเดียวกันโปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติและเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงแท่ง (rod shape) ที่มีความยาวเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนเช่นกัน ดังนั้นการทำอิเล็กโทรฟอรีซีสสามารถใช้คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างได้ 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. ศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้ (necrosis) ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางพา - ราด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* เพื่อจัดลำดับความต้านทานของยางพาราพันธุ์ต่างๆ
2. ศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางพารา ด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. palmivora* เพื่อจัดลำดับความต้านทานของยางพาราพันธุ์ต่างๆ
3. ศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางพารา ด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. palmivora*
4. นำผลการจัดลำดับความต้านทานของยางพาราในข้อ 1 และ 2 มาใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* ได้สูง