1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นลำดับต้นๆของประเทศไทย เนื่องจากผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่แปรรูปมาจากยางพาราเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้เข้าประเทศเป็นอย่างมากและในปัจจุบันประเทศไทยสามารถส่งออกยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยครั้งแรกยางพาราได้ถูกนำมาปลูกในเขตจังหวัดต่างๆทางภาคใต้ของไทย เพราะมีสภาพภูมิอากาศเหมาะสม ต่อมามีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังภาคอื่นๆของประเทศด้วย ได้แก่ ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ต้นยางพาราจะต้องใช้เวลาประมาณ 5-6 ปีจึงจะเริ่มกรีดเอาน้ำยางมาใช้ประโยชน์ได้และเมื่อต้นยางถูกกรีดเป็นประจำหน้ายางก็จะถูกเปิดออกเกือบทุกวัน ทำให้เชื้อโรคต่างๆผ่านเข้าไปทางบาดแผลที่ถูกกรีดก่อให้เกิดการติดเชื้อและเกิดโรคขึ้นได้ โดยเฉพาะภาคใต้ตอนล่างของไทยมีโอกาสเกิดการแพร่กระจายของโรคได้สูง เนื่องจากมีปริมาณความชื้นในอากาศสูงจึงเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ

เชื้อรา *Phytophthora botryosa* เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วง (leaf fall) และเส้นดำ (black stripe) ในยางพารา เชื้อราชนิดนี้ถูกค้นพบและแยกได้ครั้งแรกโดย Chee ในปีค.ศ. 1969 จากก้านใบยางพาราในประเทศมาเลเซียและประเทศไทย (Chee, 1969) ซึ่งในปัจจุบันโรคดังกล่าวกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรชาวสวนยางเป็นอย่างมาก เพราะเมื่อเกิดโรคแล้วผลเสียที่ตามมาคือใบร่วงก่อนเวลาอันควร หน้ายางเสียทำให้กรีดยากหรือกรีดไม่ได้ นั่นคือทำให้ผลผลิตลดลงส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมยางพาราในระดับประเทศ ด้วยเหตุนี้การเลือกต้นยางอ่อนไปปลูกจะต้องคำนึงถึงความต้านทานโรคด้วย ยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงและเป็นที่นิยมปลูกกันมากคือ พันธุ์ RRIM600 แต่ข้อเสียของยางพันธุ์นี้ก็คือมีความต้านทานต่อเชื้อราชนิดนี้ต่ำ ปัจจุบันยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงและต้านทานต่อเชื้อราชนิดนี้ได้ดีก็คือ พันธุ์ BPM-24 การใช้สารเคมีสามารถควบคุมเชื้อราได้เช่นกัน แต่มีผลในระยะสั้นเท่านั้น การควบคุมในระยะยาวคือการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานโรคสูงมาปลูกทดแทนซึ่งการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีนี้จะช่วยประหยัดเวลา ลดการสูญเสียของผลผลิตและลดต้นทุนในการผลิต ตลอดจนช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าพืชมีศัตรูอยู่มากมายได้แก่เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส รวมไปถึงไส้เดือนฝอย และพืชชนิดหนึ่งๆก็อาจเกิดโรคได้หลายโรคในเวลาเดียวกันจากเชื้อสาเหตุหลายชนิด แต่พืชก็สามารถมีชีวิตอยู่ได้ จะเห็นได้ว่าเมื่อพืชเกิดการติดเชื้อ (infection) พืชบางพันธุ์จะแสดงอาการอ่อนแอ บางพันธุ์แสดงอาการต้านทานและบางพันธุ์ไม่แสดงอาการใดๆเลยหรือแสดงอาการ แต่ต่อมาอาการของโรคลดลง แสดงว่าพืชแต่ละชนิดมีกระบวนการหรือกลไกในการป้องกันตนเองเพื่อต่อต้านการรุกรานของเชื้อโรคแตกต่างกัน เนื่องจากพืชไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรค ดังนั้นเมื่อเกิดการติดเชื้อจึงต้องพยายามปรับตัวเพื่อต้านทานการบุกรุกของเชื้อโรค โดยปฏิกิริยาตอบสนองของพืชมีสองลักษณะคือ เมื่อพืชพันธุ์อ่อนแอ (susceptible) ถูกรุกรานโดยเชื้อโรคที่รุนแรง (virulent pathogen) พืชก็จะตอบสนองด้วยการแสดงอาการของโรคหรือเป็นโรคนั่นเอง (compatible reaction) และเมื่อพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant) ถูกรุกรานโดยเชื้อโรคที่ไม่รุนแรง (avirulent pathogen) พืชก็จะตอบสนองด้วยการไม่แสดงอาการของโรค (incompatible reaction) แต่จะมีกลไกในการป้องกันตนเอง (defense mechanism) ซึ่งกลไกในการป้องกันตนเองของพืชมีหลายอย่างและแต่ละอย่างไม่ได้ให้ผลในการป้องกันโรคโดยลำพัง แต่กระบวนการเหล่านี้จะต้องสัมพันธ์กันด้วย (ประสาทพร สมิตะมาน, 2534)

ในธรรมชาติพืชจะมีโครงสร้างและส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคอยู่แล้ว เช่น มีขี้ผึ้งคลุมใบและผล หรือมีขนของผิวพืชที่หนาซึ่งสามารถป้องกันหยดน้ำไม่ให้เกาะติดผิวพืช ทำให้สปอร์ของเชื้อโรคที่อยู่บนผิวพืชไม่งอกหรือไม่มีความชื้นพอที่จะเพิ่มจำนวน ความหนาของคิวติน (cutin) และความเหนียวของผนังเซลล์ด้านนอก ก็ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจาะผ่านเข้าสู่พืชได้ รวมถึงความหนาและเหนียวของผนังเซลล์เนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) และเนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์สเคลอเรนไคมา (sclerenchyma) ด้วย นอกจากนี้ชนิดและโครงสร้างของปากใบตลอดจนเวลาการเปิด-ปิดปากใบก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำให้พืชต้านทานโรคด้วยเช่นกัน เช่น ปากใบของข้าวสาลีพันธุ์ต้านทานโรค จะเปิดเวลากลางวันแต่สปอร์ของเชื้อราสนิมจะงอกในหยดน้ำค้างเวลากลางคืนซึ่งปากใบข้าวสาลียังคงปิดอยู่ น้ำค้างจึงระเหยไปหมดก่อนปากใบพืชเปิด เป็นต้น

เมื่อเชื้อโรคสามารถเข้าสู่พืชได้โดยการเจาะผ่านโครงสร้างป้องกันตนเองของพืช พืชก็จะมีปฏิกิริยาโต้ตอบทางโครงสร้างในลักษณะต่างๆเพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อ ได้แก่ การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (histological defense structure) การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเซลล์ (cellular defense structure) และการเกิดปฏิกิริยาไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive reaction)

การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อ ได้แก่ การสร้าง cork layers, การเกิด abscission regions, การสร้าง tyloses และ gum เป็นต้น โดยการสร้าง cork layers จะช่วยกั้นหรือปิดไม่ให้เชื้อและสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นขยายวงกว้างออกไป นอกจากนี้ยังช่วยระงับการไหลเวียนของน้ำและอาหารจากเนื้อเยื่อปกติไปยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ทำให้เชื้อและเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วถูกจำกัดอยู่ในขอบเขตของแผลแยกส่วนจากเนื้อเยื่อปกติ ส่วนการเกิด abscission regions เป็นการแตกปริของเนื้อเยื่อเกิดเป็นช่องว่างระหว่างเซลล์รอบบริเวณติดเชื้อ ทำให้เนื้อเยื่อปกติถูกตัดขาดออกจากเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อป้องกันไม่ให้เชื้อและสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นลุกลามไปยังเนื้อเยื่อปกติ สำหรับการสร้าง tyloses เป็นการเจริญของ protoplasm ของเซลล์ parenchyma ที่อยู่ติดกับท่อ xylem เจริญเข้าไปภายในท่อ xylem ทำให้ท่อ xylem อุดตันกั้นการลุกลามของเชื้อ การสร้าง tyloses จะเกิดได้มากและเร็วในพืชพันธุ์ต้านทาน ส่วนพืชพันธุ์อ่อนแอเชื้อจะเจริญไปก่อนแล้วจึงเกิด tyloses ภายหลัง การสร้าง tyloses ส่วนใหญ่จะเกิดในระหว่างที่เชื้อโรคเข้าทำลายทางกลุ่มท่อลำเลียง นอกจากนี้การสะสมยางเหนียว (gum) ของเนื้อเยื่อพืชรอบบริเวณแผล ก็สามารถช่วยยับยั้งการขยายขอบเขตของเชื้อโรคได้ โดยยางจะถูกสะสมอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์หรือภายในเซลล์ อัตราการสะสมยางจะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดและพันธุ์ของพืช (ไพโรจน์ จ๋วงพานิช, 2525; ประสาทพร สมิตะมาน, 2534)

การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเซลล์ (cellular defense structure) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของผนังเซลล์ในระหว่างที่เซลล์ถูกทำลาย โดยเกิดการโป่งออกของเซลล์ epidermis และเซลล์ที่อยู่ใต้ epidermis ในขณะที่เชื้อแทงผ่านพืช หรือเกิดปลอกห่อหุ้ม (sheath) เส้นใยของเชื้อซึ่งปลอกที่ห่อหุ้มนี้มาจากการขยายตัวของผนังเซลล์ (ประสาทพร สมิตะมาน, 2534)

การเกิดปฏิกิริยาไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive reaction) เป็นกลไกป้องกันโรคที่สำคัญมากที่สุดแบบหนึ่ง ปฏิกิริยาจะยังสังเกตไม่เห็นในระหว่างการแทงผ่านของเชื้อโรคที่ผิวเซลล์ แต่เมื่อพืชติดเชื้อแล้วเซลล์ที่เป็นโรคและเซลล์ข้างเคียงของพืชพันธุ์ต้านทานจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีลักษณะเป็นรอยไหม้และเซลล์ก็จะตายอย่างรวดเร็ว (hypersensitive cell death) สามารถมองเห็นอาการได้ด้วยตาเปล่า ทำให้เชื้อโรคในเซลล์ของแผลที่ตายแล้วไม่ได้รับสารอาหารจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ดังนั้นเชื้อจึงหยุดการเจริญและตายไปพร้อมกับเซลล์บริเวณนั้นด้วย เป็นการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคโดยถูกจำกัดอยู่เฉพาะในขอบเขตของแผลเท่านั้นไม่ลุกลามต่อไป ทำให้พืชแสดงอาการของโรคเฉพาะแห่ง (local lesions) ส่วนเซลล์ที่เป็นโรคของพืชพันธุ์อ่อนแอจะ

มีอัตราในการเกิดปฏิกิริยาที่ช้ากว่าพันธุ์ต้านทานมากหรือบางชนิดอาจไม่มีเลย ทำให้ไม่สามารถหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้

ปฏิกิริยาไฮเปอร์เซนซิทีฟจะรวมไปถึงการสูญเสียความสามารถในการยอมให้ของเหลวไหลผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ การเพิ่มขึ้นของอัตราการหายใจ และการออกซิไดส์สารประกอบของฟีนอลในรูปต่างๆด้วย (ไพโรจน์ จ่วงพานิช, 2525; ประสาทพร สมิตะมาน, 2534)

นอกจากเชื้อโรคชนิดต่างๆแล้ว สารที่มาจากเชื้อโรคหรือจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเชื้อสาเหตุ (pathogen) กับพืชอาศัย (host) รวมทั้งแสง รังสีอุลตร้าไวโอเล็ต และไอออนของโลหะหนักบางชนิด ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดกลไกในการป้องกันตนเองของพืชด้วยเช่นกัน (Darvill and Albersheim,1984) ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ที่มีต่อเชื้อรา *P. botryosa* โดยเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบใบยางพาราด้วยอิลิซิตินบริสุทธิ์ (โปรตีนที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*) กับการบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ ทั้งนี้เพื่อให้เข้าใจกลไกการก่อโรคของเชื้อราชนิดนี้ในยางพารา และกลไกหลักในการป้องกันโรคของยางพารามากขึ้น นอกจากนี้อิลิซิตินที่เตรียมได้อาจนำไปใช้ในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานโรคต่อไปได้

การตรวจเอกสาร

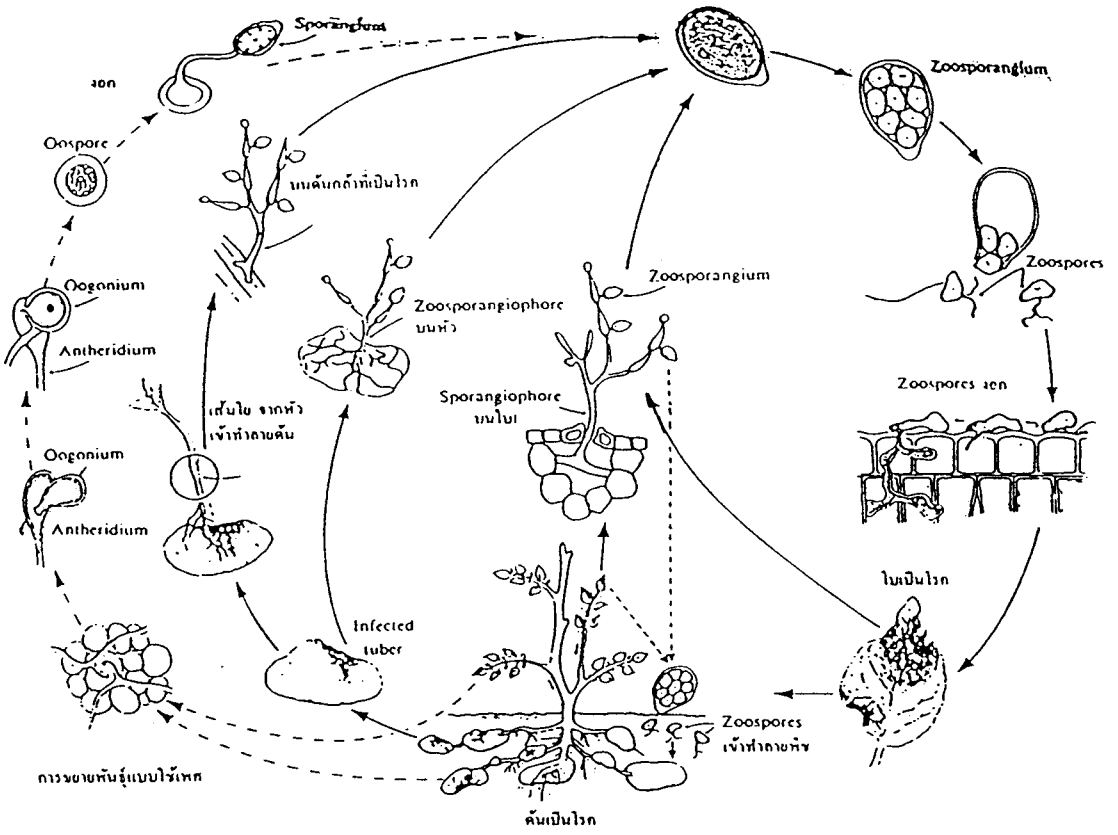
1.1 เชื้อราไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora*)

ไฟท็อปทอร่า เป็นเชื้อราในกลุ่มโอโอไมซิส (oomycetes) มีทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำและในดิน เส้นใย (mycelium) มีสีขาว ไม่มีผนังกั้นตามขวาง มีการขยายพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยแบบไม่อาศัยเพศเส้นใยจะแตกกิ่งก้านสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจีโอฟอร์ (sporangiophore) ภายหลังที่เจริญเป็นสปอร์แรงเจียมแล้ว สปอร์แรงจีโอฟอร์จะเจริญให้สปอร์แรงจีโอฟอร์ใหม่จากปลายอันเดิมและดันสปอร์แรงเจียมไปด้านข้างของสปอร์แรงจีโอฟอร์ โดยส่วนที่เป็นสปอร์แรงจีโอฟอร์นั้นจะมีลักษณะบวมพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียมมีรูปร่างลักษณะและขนาดแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ ทำหน้าที่ให้กำเนิดซูโอสปอร์ (zoospore) ซูโอสปอร์จะดันออกทางด้านปลายของสปอร์แรงเจียมที่มีลักษณะเป็นปุ่ม (papilla) เมื่อซูโอสปอร์ถูกปล่อยออกมาจะว่ายน้ำได้ระยะหนึ่ง จากนั้นจะหยุดนิ่งแล้วสร้างเกราะสำหรับห่อหุ้มตัวเอง (cyst) และเริ่มงอก โดยมีลักษณะเป็นท่อ (germ tube) เข้าทำลายพืชโดยตรง

สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male hypha) ซึ่งจะเจริญเป็นแอนเทอริเดียม (antheridium) แล้วสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gamete) อยู่ภายใน ส่วน

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (female hypha) จะเจริญเป็นโอโอโกเนียม (oogonium) มีรูปร่างกลม การผสมกันของนิวเคลียสของทั้งสองเพศจะเกิดขึ้นภายในโอโอโกเนียมและให้กำเนิดโอโอสปอร์ (oospore) ซึ่งจะงอกเป็นท่อแล้วเจริญเป็นเส้นใยหรือเจริญเป็นสปอร์แรงเจียมต่อไป เชื้อรา สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ในรูปของโอโอสปอร์กับในรูปของเส้นใยที่อยู่ในพืชที่เป็นโรค เมื่อสภาพความชื้นเหมาะสมก็จะเกิดสปอร์แรงเจียมให้ซูโอสปอร์ที่เคลื่อนที่ในน้ำหรือกระเด็นไปกับฝนแล้วไปงอกเพื่อทำลายพืชต่อไป ดังรูปที่ 1 (ไพโรจน์ จำวงพานิช, 2525)

ไฟท็อปทอร่าเป็นกลุ่มเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆในพืชมากกว่าร้อยชนิด ได้แก่ ไม้ล้มลุก ไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงไม้ยืนต้น ตัวอย่างเช่น สับปะรด มะละกอ ส้ม มะเขือเทศ ยาสูบ โกโก้ มันฝรั่ง ยางพารา ฯลฯ (Erwin and Riberio, 1996) เชื้ออาจมีพืชอาศัยกว้างขวาง หรือเพียงสองถึงสามชนิด แล้วแต่สปีชีส์ของเชื้อ หลายสปีชีส์เป็นสาเหตุของโรครากเน่า ลำต้นเน่า โคนเน่า บางสปีชีส์เกิดที่ตา หรือผล ทำให้เกิดใบไหม้ ทำลายกิ่งก้านและผล สำหรับโรคราก โคน และลำต้นเน่า อาการระยะแรกใบจะเหลืองซีด ใบร่วง กิ่งแห้งตายจากปลายใบเข้าสู่ต้น พืชบางชนิดอาจออกดอกมากกว่าปกติ แต่จะไม่ค่อยเจริญ เนื่องจากพืชส่วนบนได้รับอาหารและน้ำไม่เพียงพอ หากตา โคน หรือลำต้นเป็นโรคจะเห็นเนื้อเยื่อภายในของเปลือกมีสีน้ำตาลและอาจเน่าเป็นเมือกเยิ้ม โรคจะลุกลามไปรอบต้นแต่ไม่เข้าไปในเนื้อไม้ ส่วนอาการที่ราก เปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล รากหลุดออกง่ายและเน่าเป็นสีน้ำตาล ต้นจะโทรมและตายอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างเชื้อสาเหตุของโรค เช่น *P. parasitica var nicotianae* ทำให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่าของส้ม โรคยอดเน่าและรากเน่าของสับปะรด โรคเน่าดำของกล้วยไม้ โรคผลเน่าของมะเขือยาว โรคโคนเน่าระดับดิน ใบไหม้ และผลเน่าของมะเขือเทศ *P. palmivora* ทำให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำของยางพารา โรครากและโคนเน่าของทุเรียน *P. botryosa* ทำให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำของยางพารา *P. infestans* ทำให้เกิดโรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ เป็นต้น



รูปที่ 1 วงจรโรคใบไหม้ของมะเขือเทศและมันฝรั่งที่เกิดจาก *P. infestans*
(ไพโรจน์ จ่วงพานิช, 2525)

1.2 **อิลิซิตินจากเชื้อรา** *Phytophthora*

เมื่อเลี้ยงเชื้อราไฟท็อปทอร่าทุกสปีชีส์ในอาหารเหลวที่เหมาะสม เชื้อรากลุ่มนี้จะผลิตโปรตีนชนิดหนึ่งแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular protein) จึงพบโปรตีนชนิดนี้ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) และให้ชื่อรวมว่า อิลิซิติน (elicitins) (Huet and Pernollet, 1989) ยกเว้น *P. parasitica var nicotianae* ชนิดที่แยกได้จากต้นยาสูบซึ่งเป็นเชื้อที่รุนแรง (virulent) ของต้นยาสูบที่ไม่ผลิตอิลิซิติน (Kamoun *et al.*, 1994)

อิลิซิตินเป็นโปรตีนพิษ (toxin) โมเลกุลมีขนาดเล็ก โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 เรซิดิวซ์ (98 amino acid residue) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน มีพันธะไดซัลไฟด์ 3 แห่ง โมเลกุลของอิลิซิตินจะไม่ถูกเติมน้ำตาล และโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ประมาณ 50 เปอร์เซนต์เป็นเกลียวอัลฟา (α-helix) พบแผ่นพลีทบีตา (β-pleated sheet) น้อยมากหรือบางชนิดไม่พบเลย (Huet *et al.*, 1992; Nespoulous *et al.*, 1992; Huet and Pernollet, 1993) ซึ่งอิลิซิตินจากน้ำเลี้ยงของเชื้อรากลุ่มไฟท็อปทอร่าทุกสปีชีส์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 98 เรซิดิวซ์ มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันประมาณ 10 กิโลดาลตันแต่แตกต่างกันที่ลำดับของกรดอะมิโนในโมเลกุลอิลิซิตินเท่านั้น

cryptogein, capsicein และ cinnamomin เป็นอิลิซิตินกลุ่มแรกที่มีการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (amino acid composition) และการจัดลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) ในโมเลกุลของโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์โดยอิลิซิตินดังกล่าวเตรียมให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. cryptogea, P. capsici* และ *P. cinnamomi* ตามลำดับ (Huet and Pernollet, 1989; Ricci *et al.*, 1989) พบว่าการจัดลำดับของกรดอะมิโนในโมเลกุลของอิลิซิตินทั้งสามชนิดมีความอนุรักษ์ (conserved) และคล้ายคลึงกันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะบริเวณส่วนกลางของโมเลกุล (central core) ส่วนที่แตกต่างกันคือการเรียงตัวของกรดอะมิโนบริเวณปลาย NH_2 และปลาย COOH ของสายเปปไทด์

ต่อมานักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มก็สามารถสกัดแยกอิลิซิตินให้บริสุทธิ์และตรวจหาสมบัติของอิลิซิตินได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราไฟท็อปทอร่าสปีชีส์อื่นๆอีกมากมาย ตัวอย่างเช่น paraciticein จาก *P. parasitica* (Nespoulous *et al.*, 1992; Ricci *et al.*, 1992) Dre β และ Dre α จาก *P. drechsleri* (Huet *et al.*, 1992) MgMβ และ MgMα จาก *P. megasperma megasperma* (Huet *et al.*, 1993) cactorein จาก *P. cactorum* (Huet *et al.*, 1993; Dubery *et al.*, 1994) และ palmivorein จาก *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasarn, 2000) ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นโปรตีนที่มีจำนวนของกรดอะมิโนเท่ากับ 98 เรซิดิวซ์

น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตันแต่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนและการจัดลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีประจุสุทธิแตกต่างกัน (Bonnet *et al.*, 1996)

1.3 คุณสมบัติของอิลิซิติน

อิลิซิตินมีคุณสมบัติเป็นอิลิซิเตอร์ (elicitor) คือ สารซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองในพืช ได้แก่ การสะสมไฟโตอเล็กซิน การสังเคราะห์ pathogenesis related-protein (PR-proteins) และการตายของเซลล์หรือนีโครซีส เป็นต้น

อิลิซิเตอร์แบ่งเป็นสองชนิดคือ ไบโอติกอิลิซิเตอร์ (biotic elicitor) และ อไบโอติกอิลิซิเตอร์ (abiotic elicitor) สารที่มาจากเชื้อโรคหรือมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อก่อโรคจัดเป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์ ส่วนอไบโอติกอิลิซิเตอร์ได้แก่ แสง รังสีอุลตร้าไวโอเล็ต และไอออนของโลหะหนัก ได้มีการสกัดไบโอติกอิลิซิเตอร์จากเชื้อโรคต่างๆและจำแนกไบโอติกอิลิซิเตอร์เหล่านั้นตามสูตรโครงสร้าง พบว่ามีทั้งที่เป็น โพลีเปปไทด์ (polypeptide) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ไคโตแซน (chitosan) และกรดไขมัน (fatty acid) (Darvill and Albersheim, 1984)

อิลิซิตินจัดเป็นไบโอติกอิลิซิเตอร์ที่มีโครงสร้างเป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) เมื่อนำอิลิซิตินมาทดสอบกับเซลล์แขวนลอยของยาสูบ พบว่าอิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของยาสูบมีการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ (hypersensitive response) โดยกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของยาสูบมีระดับความเป็นด่างและทำให้คุณสมบัติในการนำไฟฟ้า (conductivity) เพิ่มขึ้นนอกจากนี้เซลล์แขวนลอยของยาสูบยังสามารถสังเคราะห์เอทิลีนและแคปซิไดออล (capsidiol) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซินชนิดหนึ่ง สำหรับการทดสอบในใบและต้นยาสูบจะเห็นอาการนีโครซีสรวมกับการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินและการสร้าง PR-proteins (Huet *et al.*, 1991; Marie *et al.*, 1991) ความว่องไวทางชีวภาพ (biological activity) ของอิลิซิตินถูกกำจัดได้โดยเอนไซม์โปรเนส (pronase) ของพืช นอกจากอิลิซิตินจะสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองในยาสูบแล้วยังสามารถชักนำให้ยาสูบเกิดความต้านทาน (acquired resistance) ต่อ *P. parasitica var nicotianae* เชื้อราสาเหตุของโรคแข้งดำในยาสูบ (black shank disease) ด้วย โดยสามารถป้องกันตนเองจากการรุกรานของเชื้อราชนิดนี้ (Ricci *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังชักนำให้หัวผักกาดแดง (radish) ต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุของโรคใบจุดในผักกาดอีกด้วย (Kamoun *et al.*, 1993)

อิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้พืชในตระกูลมะเขือ (Solanaceae) และกะหล่ำ (Cruciferae) ตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ โดยพืชตระกูล Solanaceae จะตอบสนองต่ออิลิซิตินเฉพาะกลุ่มที่มีความจำเพาะเจาะจงเท่านั้น เช่น กลุ่มยาสูบ (*Nicotiana*) ทุกสปีชีส์ ส่วนพืชตระกูล Cruciferae จะตอบสนองต่ออิลิซิตินเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น เช่น หัวผักกาดก้านขาว (turnip) และหัวผักกาดแดง (radish) แต่อิลิซิตินไม่สามารถกระตุ้นให้พืชในตระกูลเบญจมาศ (Compositae) พืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) และพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) เกิดการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ แสดงให้เห็นว่าอิลิซิตินเป็นอิลิซิเตอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย (Kamoun *et al.*, 1993)

Churngchow และ Rattarasarn (2000) รายงานว่า palmivorein ซึ่งเป็นอิลิซิตินที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* สามารถทำให้ใบยางพาราและใบยาสูบเกิดอาการเหี่ยว น้ำหนักของใบลดลง และเกิดอาการนีโครซีสได้ โดยอาการนีโครซีสที่เกิดขึ้นจะถูกจำกัดขอบเขตที่แน่นอนในใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และใบยาสูบ ทั้งนี้เนื่องจากพืชพันธุ์ต้านทานเมื่อถูกกระตุ้นจะมีการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟ บ่งชี้ถึงความสามารถในการต้านทานโรค (incompatibility) ส่วนใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ไม่สามารถควบคุมขอบเขตของนีโครซีสได้จึงตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วยการเกิดโรคหรือไม่สามารถต้านทานโรคได้ (compatibility) สำหรับใบยาสูบตอบสนองต่อ palmivorein ด้วยปฏิกิริยา incompatible นั้นเนื่องจากยาสูบไม่ใช่พืชอาศัย (non-host) ของเชื้อรา *P. palmivora*

1.4 ชนิดของอิลิซิติน

อิลิซิตินแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มแอลฟา (α-class) และกลุ่มเบต้า (β-class) โดยอาศัยเกณฑ์ต่อไปนี้:ลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (amino acid composition) จุดไอโซอิเล็กตริค (isoelectric point; pI) ดัชนีไฮโดรพาที (hydropathy index) ซึ่งจะแสดงถึงบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิกของโปรตีน โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ที่สอดคล้องกับความว่องไวทางชีวภาพ

1.4.1 กลุ่มแอลฟาอิลิซิติน

เป็นอิลิซิตินที่มีสภาพเป็นกรด (acidic elicitin) มีค่า pI ประมาณ 4.5 (Berre et al., 1994) มีกรดอะมิโนแวลีน (valyl residue) ที่ตำแหน่ง 13 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้แยกความแตกต่างของอิลิซิตินได้ดีที่สุด เนื่องจากแขนงข้าง (side chain) ของเรซิดิวซ์ตำแหน่งที่ 13 นี้สัมพันธ์กับความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิตินมากกว่าตำแหน่งอื่นๆ จากการหาโครงสร้างของอิลิซิตินในสภาพสามมิติโดยอาศัยเทคนิค nuclear magnetic resonance (Bouaziz *et al.*, 1994) พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 13 อยู่บริเวณผิวนอกของโมเลกุลซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของกรดอะมิโนในการทำงานของโปรตีน รวมถึงดัชนีไฮโดรพาทีและบริเวณที่ทำงานได้ (active site) หรือบริเวณควบคุม (regulatory site) (Huet *et al.*, 1992) ดังนั้นกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 13 จึงมีผลต่อความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่างอิลิซิตินกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์เป้าหมาย (Donohue *et al.*, 1995) ตัวอย่างของกลุ่มแอลฟาอิลิซิตินเช่น capsicein, parasiticein, palmivorein, Dreα, MgMα และ cactorein เป็นต้น

1.4.2 กลุ่มเบต้าอิลิซิติน

เป็นอิลิซิตินที่มีสภาพด่าง (basic elicitin) มีค่า pI สูงประมาณ 8.5 (Berre *et al.*, 1994) มีกรดอะมิโนไลซีน (lysyl residue) ที่ตำแหน่ง 13 (Donohue *et al.*, 1995) ตัวอย่างเช่น cryptogein, Dreβ, MgMβ และ cinnamomin

เมื่อใช้ความเข้มข้นของอิลิซิตินที่เท่ากันในการทดสอบกับใบยาสูบพบว่าอิลิซิตินกลุ่มเบต้าสามารถกระตุ้นให้ใบยาสูบเกิดการตอบสนองได้มากกว่าอิลิซิตินกลุ่มแอลฟาประมาณ 100 เท่า (Zanetti *et al.*, 1992) สังเกตได้จากรอยไหม้สีน้ำตาลหรือนีโครซีส โดยใบยาสูบที่ทดสอบด้วยอิลิซิตินกลุ่มเบต้าจะมีนีโครซีสขนาดใหญ่ แผ่บริเวณกว้าง ส่วนใบยาสูบที่ทดสอบด้วยอิลิซิตินกลุ่มแอลฟา จะมีนีโครซีสขนาดเล็ก (Kamoun *et al.*, 1993) แสดงให้เห็นถึงความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากลำดับของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกันนั่นเอง ดังนั้นการปรับเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนของอิลิซิตินจึงมีผลทำให้ความว่องไวทางชีวภาพเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Ricci *et al.*, 1989) จากผลการทดลองติดฉลากกัมมันตรังสี (radioactive label) บนโมเลกุลของอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของอิลิซิตินภายในเซลล์ของใบยาสูบ (in vivo) พบว่าอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มสามารถเคลื่อนที่จากบริเวณก้านใบเข้าไปยังบริเวณปลายใบได้โดยไม่ต้องอาศัยโมเลกุลใดๆในใบยาสูบเป็นตัวช่วยนำพาไป และสามารถเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วเดียวกันกับอัตราเร็วของของเหลวภายในเซลล์แม้ว่าอิลิซิตินจะทำให้เซลล์เสียสภาพสมดุลก็ตาม ดังนั้นการที่อิลิซิตินทั้งสองกลุ่มทำให้เกิดนีโครซีสที่แตกต่างกัน จึงไม่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของอิลิซิตินภายในเซลล์ แต่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มที่

แตกต่างกันโดยเฉพาะบริเวณที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์เป้าหมาย (Zanetti *et al.*, 1992) Donohue และคณะ (1995) รายงานว่าเมื่อเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 13 ของ cryptogein จากกรดอะมิโนไลซีนเป็นกรดอะมิโนแวลีน พบว่า cryptogein ที่ถูกเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนมีความว่องไวทางชีวภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากตำแหน่งที่ 13 ของอิลิซิติน กลุ่มแอลฟาเป็นกรดอะมิโนแวลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดอะลิฟาติก (aliphatic) แขนงข้าง (side chain) หรือ R group จึงมีลักษณะไม่โพลาร์ (nonpolar) และไม่มีคุณสมบัติการแตกตัว ดังนั้นจึงมักซ่อนอยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีน เพราะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ส่วนอิลิซิตินกลุ่มเบต้าตำแหน่งที่ 13 คือไลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดเบสิก แขนงข้างจึงมีลักษณะโพลาร์และแตกตัวได้ ค่า pKa ของไลซีนเท่ากับ 10.5 จึงมักพบอยู่ที่บริเวณผิวนอกของโปรตีน เพราะชอบน้ำ (hydrophilic) จึงมีผลทำให้อิลิซิตินกลุ่มเบต้ามีความเป็นพิษมากกว่าอิลิซิตินกลุ่มแอลฟา นอกจากตำแหน่งที่ 13 แล้ว ตำแหน่งที่ 2, 14, 72 และ 94 ก็มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความว่องไวของอิลิซิตินเช่นกันแต่น้อยกว่าตำแหน่งที่ 13 (Donohue *et al.*, 1995)

สำหรับการชักนำให้เกิดความต้านทาน (acquired resistance) พบว่าอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานได้ใกล้เคียงกัน (Ricci *et al.*, 1989) ต่อมา Donohue และคณะ (1995) เสนอแนะว่าการที่อิลิซิตินทั้งสองกลุ่มชักนำให้เกิดความต้านทานใกล้เคียงกันนั้นไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับความว่องไวทางชีวภาพของอิลิซิติน แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการตอบสนอง (defense reaction) ของพืชเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินมากกว่า โดยพืชจะต้องมีตัวรับ ที่จำเพาะเจาะจงกับอิลิซิตินเหมือนกันทั้งสองกลุ่ม จากนั้นจะส่งสัญญาณให้พืชรับรู้ว่ากำลังถูกรุกราน เพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดกลไกในการป้องกันตนเอง

จากการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบพบว่าอิลิซิตินทั้งสองกลุ่มจะมีกรดอะมิโนลูซีน (Leu) เซลีน (Ser) ธรีโอนีน (Thr) และอะลานีน (Ala) เป็นองค์ประกอบประมาณ 50 % ของสายเปปไทด์และไม่พบกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Trp) ฮิสติดีน (His) และอาร์จินีน (Arg) (Yu, 1995) เชื้อรา *Phytophthora* บางสปีชีส์จะผลิตเฉพาะแอซิดิกอิลิซิตินเพียงกลุ่มเดียว 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* (Churngchow and Rattarasarn, 2000) บางสปีชีส์ก็สามารถผลิตได้ทั้งสองกลุ่ม เช่น *P. drechsleri* สามารถผลิตอิลิซิตินได้สองไอโซฟอร์มเป็นแอซิดิก (Dreα) และเบสิก (Dreβ) อย่างละหนึ่งไอโซฟอร์ม ซึ่งมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนถึง 92 % แต่เบต้าอิลิซิตินกระตุ้นให้ใบยาสูบเกิดนีโครซีสมากกว่าแอลฟาอิลิซิติน (Huet *et al.*, 1992) ต่อมา Huet และคณะ

(1993) ได้รายงานว่า *P. megasperma megasperma* ก็สามารถผลิตอิลิซิตินได้สองไอโซฟอร์ม เช่นกันเป็นแอซิดิก (MgMα) และเบสิก (MgMβ) อย่างละหนึ่งไอโซฟอร์มมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน 86.7% และพบว่า MgMβ มีความเป็นพิษน้อยกว่าเบต้าอิลิซิตินตัวอื่นๆ จากการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของ MgMβ ทำให้ทราบว่าที่ตำแหน่ง 5, 57 และ 61 ของ MgMβ มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับแอลฟาอิลิซิติน ซึ่งทำให้ MgMβ มีความเป็นพิษน้อยลงแสดงว่าความว่องไวของอิลิซิตินไม่ได้ขึ้นกับตำแหน่งที่ 13 เพียงอย่างเดียวแต่ขึ้นกับตำแหน่งที่ 5 และ 57-65 ด้วย

นอกจากนี้ *P. cryptogea* ก็เป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตอิลิซิตินได้มากกว่าหนึ่งฟอร์มคือเป็นแอซิดิกสองฟอร์มและเบสิกอีกหนึ่งฟอร์ม โดยที่ 95% เป็นเบสิกอิลิซิติน เรียกว่า cryptogein B (มีค่า pI เท่ากับ 8.5) อีก 2 และ 3% เป็นแอซิดิกอิลิซิตินเรียกว่า cryptogein A_1 และ cryptogein A_2 ตามลำดับ (มีค่า pI เท่ากับ 4.5 และ 4.6) ทำนองเดียวกับ MgMβ และ MgMα คือ cryptogein B มีความเป็นพิษมากกว่า cryptogein A_1 และ A_2 แต่ยังไม่เคยพบเชื้อรา *Phytophthora* สปีชีส์ใดเลยที่หลั่งเฉพาะเบสิกกลุ่มเดียว (Berre *et al.*, 1994)

1.5 การเตรียมอิลิซิตินให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อราไฟท็อปทอร่า

เนื่องจากอิลิซิตินเป็นโปรตีนดังนั้นจึงสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยอาศัยวิธีมาตรฐานทางชีว-เคมี นั่นคืออาศัยสมบัติในการละลาย สมบัติทางประจุไฟฟ้า และขนาดของโมเลกุลของอิลิซิตินในการแยกให้บริสุทธิ์ โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อรากลุ่ม *Phytophthora* มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นของเกลือสูง เพื่อให้ไอออนของเกลือที่มากเกินพอแย่งจับน้ำจากโปรตีน ทำให้น้ำที่จับอยู่กับโปรตีนน้อยลง โปรตีนจึงตกตะกอน จากนั้นนำอิลิซิตินที่ได้มาแยกโดยอาศัยเทคนิคโครมาโตรกราฟีแบบแลกไอออน (ion-exchange chromatography) ซึ่งภายในคอลัมน์บรรจุโพลีเมอร์ที่มีประจุบวกหรือประจุลบ ได้แก่ diethylaminoethyl (DEAE) หรือ carboxymethyl (CM) เป็นต้น โปรตีนที่มีประจุสุทธิตรงกันข้ามจะจับกับโพลีเมอร์ภายในคอลัมน์ได้ และถูกชะออกมาเมื่อปรับ pH ให้โปรตีนที่จะแยกมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ หรือโดยการเติมเกลือลงในตัวชะ (eluate) เพื่อสลายพันธะไอออนิค (ionic bond) ระหว่างโปรตีนกับโพลีเมอร์ภายในคอลัมน์

ต่อจากนั้นนำอิลิซิตินที่ได้มาแยกโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของโมเลกุลด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชัน (gel filtration) และโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสแบบมีเอสดีเอส (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) สำหรับเจลฟิลเทรชัน

เป็นคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิดที่ใช้หลอดแก้วบรรจุเจล (gel) ซึ่งประกอบด้วยอนุภาคที่มีรูเล็กๆ ลักษณะคล้ายฟองน้ำทำหน้าที่เหมือนตะแกรงแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเข้าไปข้างในเนื้อเจลไม่ได้ และถูกชะออกจากหลอดแก้วก่อน โดยผ่านไประหว่างอนุภาคเจลเท่านั้น แต่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กสามารถเข้าไปข้างในเนื้อเจลได้ จึงถูกชะออกมาช้ากว่าเพราะต้องผ่านทั้งเนื้อที่ภายในเจล และเนื้อที่ระหว่างอนุภาคเจล จึงสามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันได้ ส่วนเทคนิคที่ใช้อิเล็กโทรฟอรีซีสและ anionic detergent (SDS) ในการแยกโปรตีนขนาดต่างๆออกจากกัน ทำได้โดยการนำโปรตีนมาต้มกับ SDS detergent ชนิดนี้จะจับกับโปรตีนในลักษณะไม่เป็นโควาเลนท์ ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ จำนวนประจุลบจึงเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนในโปรตีน ในขณะเดียวกันโปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติและเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงแท่ง (rod shape) ที่มีความยาวเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนเช่นกัน ดังนั้นการทำอิเล็กโทรฟอรีซีสสามารถใช้คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างได้ โดยเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ของโปรตีนกับอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน (Robyt and White, 1987; Huet and Pernollet, 1989; Huet *et al.*, 1992; Huet and Pernollet, 1993; Churngchow and Rattarasan, 2000)

1.6 เชื้อราไฟท็อปทอร่ากับยางพารา

มีเชื้อราไฟท็อปทอร่าหลายสปีชีส์ที่ก่อโรคในยางพารา ได้แก่ *P. palmivora, P. botryosa, P. hevea* และ *P. meadii* เป็นต้น สำหรับประเทศไทยจะพบ *P. palmivora* และ *P. botryosa* (Tsao *et al.*, 1975) เชื้อราทั้งสองชนิดนี้สามารถทำลายต้นยางพาราได้ทุกส่วนไม่ว่าจะเป็น ใบอ่อน ใบโตเต็มที่ ใบแก่ ก้านใบ ผลอ่อน ผลที่โตเต็มที่ และหน้ากรีดของยาง โดยก่อให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆของพืช เมื่อเชื้อราเข้าทำลายใบ จะก่อให้เกิดจุดแผลสีเทาเข้ม ค่อนข้างกลม ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้น มีลักษณะไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ เมื่อแผลมาชนกันก่อให้เกิดรอยแผลสีดำขนาดใหญ่ทำให้ใบเหี่ยวและร่วง จากนั้นอาการจะลุกลามไปยังก้านใบ เกิดรอยแผล เป็นทางดำที่ส่วนล่างของก้านใบและมีคราบน้ำยางบริเวณกลางแผล ทำให้ก้านใบร่วงหลุดจากต้น ถ้าอาการรุนแรงเชื้อจะเข้าทำลายยอดอ่อนทำให้ยอดเน่าเป็นสีน้ำตาลและเกิดอาการเน่าตายตามลงไป ในกรณีที่เป็นต้นยางอ่อนเชื้อราจะเข้าทำลายบริเวณยอดอ่อนทำให้เกิดแผลชุ่มน้ำสีดำ และเกิดการตายจากยอดจนถึงลำต้น จากนั้นเชื้อจะลุกลามเข้าทำลายก้านใบและแผ่นใบในที่สุด ถ้าเชื้อเข้าทำลายลำต้นจะทำให้เปลือกบวมพอง และแตกออกเห็นเป็นสะเก็ดแผลซึ่งเมื่อดึงเปลือกออกจะพบแผลสีน้ำตาลเข้มที่เนื้อไม้ บางครั้งแผลที่เปลือกจะเน่าเห็นเป็นสีดำ นอกจากนี้เชื้อสาเหตุสามารถเข้าทำลายผลยางพาราได้ทั้งผลแก่และผลอ่อน โดยก่อให้เกิดแผลเน่าสีดำชุ่มน้ำ

แล้วทำให้ผลหลุดร่วงจากลำต้น ต่อมาภายหลังจากเกิดโรคใบร่วงแล้วประมาณ 1 - 2 เดือน เชื้อราจะแพร่กระจายอยู่ทั่วไปและเข้าทำลายหน้ากรีดยางจนเกิดอาการเน่าเสียไม่สามารถทำการกรีดได้ สภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงนั้นพบว่าขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและจำนวนวันฝนตกเป็นปัจจัยสำคัญ โดยปกติโรคจะเกิดอย่างกว้างขวางและรุนแรงในระยะที่มีฝนตกหนักติดต่อกันเป็นเวลาหลายๆวันในบริเวณที่มีเชื้อราชนิดนี้ระบาดอยู่ (ประภา พัฒนกุล, 2532; พงษ์เทพ ขจรไชยกุล, 2523; สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2527)

1.7 กลไกการตอบสนองของยางพาราต่อเชื้อก่อโรค

ยางพารามีกลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเช่นเดียวกับพืชทั่วไป ปฏิกิริยาต่อต้านเชื้อโรคในยางพาราพบครั้งแรกโดย Tan และ Low (1975)

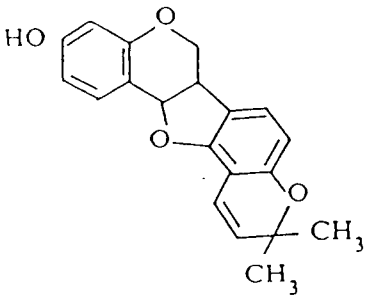
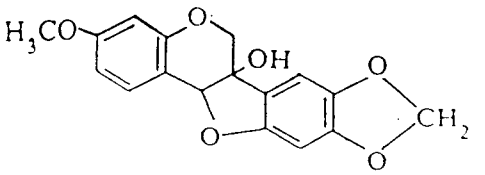
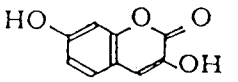
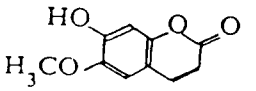
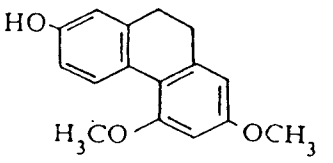
1.7.1 การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (Phytoalexin systhesis)

ไฟโตอเล็กซินเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ หรือถูกกดดัน (stress) จากอิลิซิเตอร์ชนิดต่างๆ โมเลกุลของไฟโตอเล็กซินมีขนาดเล็ก (low molecular weight) มีธาตุคาร์บอน, ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคหรือเป็นพิษต่อเชื้อโรคโดยตรง โดยปกติสารชนิดนี้จะไม่มีอยู่ในพืช พบเฉพาะบริเวณที่ถูกทำลาย โดยมีปฏิกิริยาไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง (non-specific) และเชื้อโรคที่แตกต่างกันจะมีปฏิกิริยาในระดับที่ต่างกันด้วย พืชพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอจะมีการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินที่เหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่อัตราเร็วในการสังเคราะห์เท่านั้นซึ่งอัตราการสร้างจะขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช ปฏิกิริยาการป้องกันโรคด้วยไฟโตอเล็กซินนี้จะเกิดในเนื้อเยื่อที่กำลังติดเชื้อและในเนื้อเยื่อของเซลล์ข้างเคียงเท่านั้น (Darvill and Albersheim, 1984)

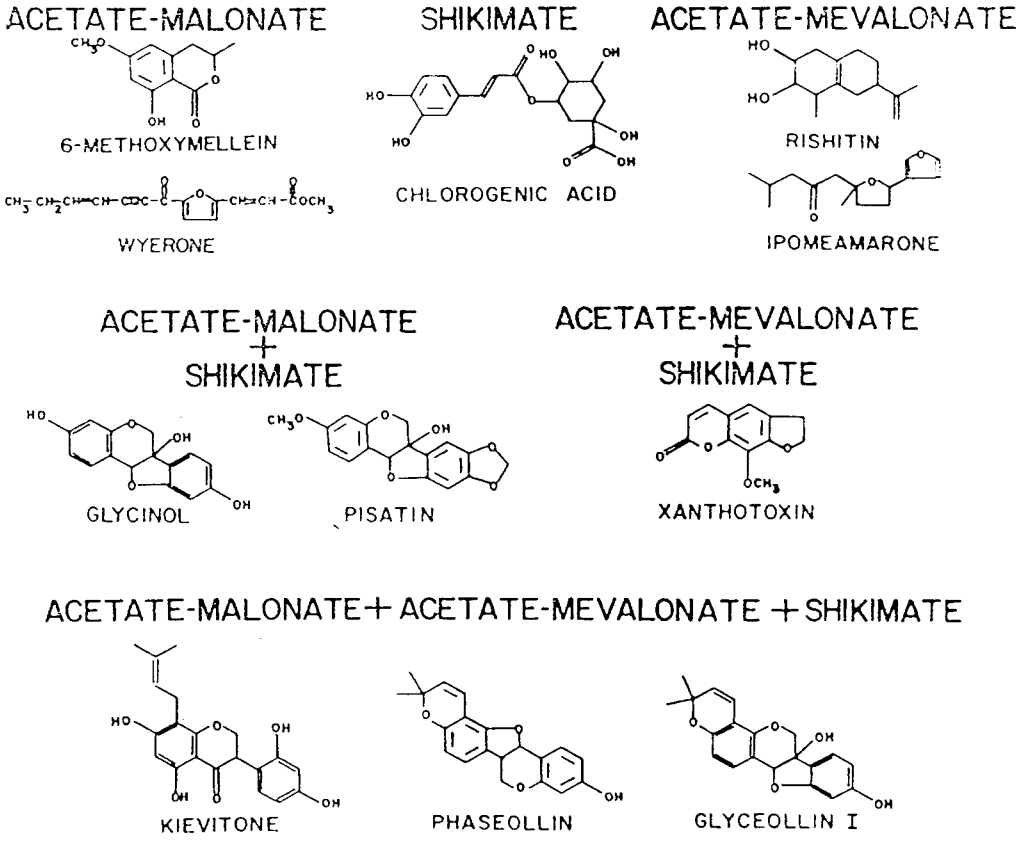
ไฟโตอเล็กซินมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของพืช ปัจจุบันได้มีการสกัดและศึกษาสมบัติทางเคมีของไฟโตอเล็กซินไปมากกว่า 350 ชนิด จากพืชกว่า 100 ชนิดทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ โดยสกัดมาจากลำต้น ราก ใบและผล แต่ไม่เสมอไปที่ส่วนต่างๆของพืชชนิดหนึ่งจะสร้างไฟโตอเล็กซินชนิดเดียวกัน ตัวอย่างของไฟโตอเล็กซิน เช่น phaseollin จากฝักถั่ว (bean pod) ipomeamarone, chlorogenic acid, umbelliferone และ scopoletin จากมันฝรั่ง (sweet potato) orchinol, hircinol และ loroglosol จากกล้วยไม้ (orchids), pisatin จากถั่วลันเตา (pea), phaseollin และ kievitone จากถั่วแขก (green bean), glyceollins จากถั่วเหลือง (soybean) และ 6 – methoxymellein จากแครอท เป็นต้น (Kuc′, 1995)

ไฟโตอเล็กซินแบ่งได้เป็น 3 ชนิดตามสูตรโครงสร้าง คือ ฟีนีลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid), ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) และ อะเซติลีน (acetylene) โดยปกติพืชที่ใกล้เคียงกันจะสร้างไฟโตอเล็กซินที่มีโครงสร้างคล้ายกัน เช่น พืชตระกูลถั่ว (leguminosae) สร้างฟีนีลโพรพานอยด์ ส่วนพืชตระกูล solanaceae สร้างไอโซพรีนอยด์ เป็นต้น ตารางที่ 1แสดงตัวอย่างของไฟโตอเล็กซินที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบโต้การเข้าทำลายของเชื้อโรค (ไพโรจน์ จ่วงพานิช, 2525)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของไฟโตอเล็กซิน

ไฟโตอเล็กซิน	โครงสร้าง	พืชอาศัย
Phaseollin		ถั่วเมล็ดแบนต่างๆ
Pisatin		ถั่วลันเตา
Umbelliferone		มันเทศ มันฝรั่ง
Scopoletin		มันเทศ มันฝรั่ง
Orchinol		กล้วยไม้ต่างๆ

วิถีการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (biosynthesis pathways) ในพืชทุกชนิดอาศัยวิถีของ shikimate, acetate-malonate และ acetate–mevalonate ซึ่งเป็นวิถีเมตาบอลิสมแบบทุติยภูมิ (secondary metabolism pathways) โดยวิถี shikimate จะถูกนำไปใช้สังเคราะห์ chlorogenic acid วิถี acetate-malonate ถูกนำไปใช้สังเคราะห์ 6–methoxymellein และ wyerone ส่วนวิถี acetate–mevalonate ถูกนำไปใช้สังเคราะห์ rishitin และ ipomeamarone สำหรับไฟโตอเล็กซินบางชนิดต้องอาศัยวิถีการสังเคราะห์ร่วมกันสองถึงสามวิถี ตัวอย่างเช่น glycinol และ pisatin สังเคราะห์จากวิถี acetate–malonate ร่วมกับวิถี shikimate สำหรับ xanthotoxin สังเคราะห์จากวิถี acetate–mevalonate ร่วมกับวิถี shikimate ส่วน kievitone, phaseollin และ glyceollin I สังเคราะห์จากการร่วมกันของวิถี acetate–malonate, acetate–mevalonate และ shikimate เป็นต้น ดังรูปที่ 2 (Darvill and Albersheim, 1984; Kuc′, 1995)



รูปที่ 2 ตัวอย่างวิถีการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (Kuc′, 1995)

สำหรับยางพารา Tan และ Low (1975) พบว่าหลังจากบ่มเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ลงบนใบยางพารา ใบยางพาราจะตอบสนองโดยการกระตุ้นให้เซลล์บริเวณที่กำลังติดเชื้อสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งไฟโตอเล็กซินที่ใบยางสังเคราะห์ขึ้นสามารถเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต ต่อมา Giesemann และคณะ (1986) ได้ทำการวิเคราะห์ไฟโตอเล็กซินที่ใบยางสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อต่อต้านเชื้อรา *Microcyclus ulei* พบว่าเป็นสคอพอลิติน (Scopoletin; Scp) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทไฮดรอกซีคูมาริน (Hydroxycoumarin) จากการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของใบยางพาราแต่ละพันธุ์ที่มีต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* และเชื้อ *M. ulei* สามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ โดยระดับความต้านทานโรคของยางพาราแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ผลิตขึ้นมา นั่นคือใบยางพันธุ์ต้านทานจะถูกกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินในปริมาณที่สูงกว่าใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (Garcia *et al*., 1995 b; Breton *et al*., 1994)

นอกจากนี้อัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินก็สัมพันธ์กับระดับความต้านทานโรคของยางพาราเช่นกัน โดยยางพาราพันธุ์ต้านทาน สังเคราะห์สคอพอลิตินภายใน 12–36 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อ ยางพาราพันธุ์ค่อนข้างต้านทาน (partially resistant, PR) สังเคราะห์สคอพอลิตินภายใน 36–120 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อและยางพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอจะสังเคราะห์สคอพอลิตินหลังจากการติดเชื้อไปแล้ว 120 ชั่วโมง (Garcia *et al*, 1995 a)

Churngchow และ Rattarasarn (2001) รายงานว่าหลังจากบ่มเชื้อรา *P. palmivora* ลงบนใบยาง 4 พันธุ์ ได้แก่ BPM-24, PB-235, RRIT251 และ RRIM600 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์หรือระดับความต้านทานโรคในแต่ละพันธุ์ยางได้ โดยอาศัยขนาดของบาดแผล (necrotic lesions) และอัตราเร็วกับปริมาณของสคอพอลิติน (rapidity and intensity) ที่เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อซึ่งพบว่าพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) และ PB-235 (ค่อนข้างต้านทาน) สามารถสังเคราะห์สคอพอลิตินได้เร็วและมีปริมาณในการสังเคราะห์สูงกว่าพันธุ์ RRIT251 (ค่อนข้างอ่อนแอ) และ RRIM600 (อ่อนแอ) นอกจากนี้ขนาดของบาดแผลรวมถึงอัตราเร็วและปริมาณการสังเคราะห์สคอพอลิตินยังแปรผันตามความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้ในการทดลองด้วย โดยสปอร์ที่ความเข้มข้นสูงสามารถกระตุ้นให้ใบยางสร้างสคอพอลิตินได้ในปริมาณสูงและเร็วกว่าสปอร์ที่ความเข้มข้นต่ำ ยกเว้นการทดลองกับเชื้อรา *Corynespora cassiicola* ซึ่งปริมาณสคอพอลิตินในใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอถูกกระตุ้นให้สร้างในปริมาณที่สูงกว่าในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานถึง 5 เท่า ดังนั้นการตอบสนองของใบยางพาราต่อเชื้อรา *C. cassiicola* โดยการสร้างสคอพอลิตินไม่แปรผันตามระดับความต้านทานของใบยาง (Breton *et al*., 1997) Breton และคณะ (1997)

เสนอแนะว่า การที่ความเข้มข้นของสคอพอลิตินในใบยางพันธุ์อ่อนแอถูกกระตุ้นให้สร้างในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์ต้านทานนั้น เนื่องมาจากใบยางพาราพันธุ์ต้านทานมีปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่สามารถใช้สคอพอลิตินเป็นสับสเตรทสูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอถึง 2 เท่าจึงทำให้มีการสะสมของ สคอพอลิตินในใบยางพันธุ์ต้านทานน้อยกว่าพันธุ์อ่อนแอ นอกจากนี้ระดับการสะสมของสคอพอลิตินยังขึ้นกับอัตราเร็วในการสร้างโดยพืชและอัตราการสลายโดยเชื้อโรคด้วย

1.7.2 **การสังเคราะห์** Pathogenesis – related proteins (PR-proteins)

PR–proteins เป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายให้กับตนเองจากการรุกรานของเชื้อโรคหรือจากการกดดันด้วยสารเคมี (chemical treatments) และฮอร์โมนพืชบางชนิด รวมถึงการถูกกดดันจากการเกิดบาดแผล (wounding) และอิลิซิเตอร์ต่างๆ โดยทั่วไปในพืชปกติมักพบ PR– proteins น้อยมากหรือไม่พบเลย แต่จะถูกชักนำให้สร้างขึ้นโดยเชื้อโรคหรือสารบางชนิด เพื่อทำหน้าที่ต่อต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคเช่นเดียวกับไฟโตอเล็กซิน

PR–proteins ที่พืชสร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ โดยการสร้างเอนไซม์สำหรับทำหน้าที่เป็น PR–proteins นั้นเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจงแต่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อหรือถูกกดดันเท่านั้นไม่ใช่มาจากการควบคุมปกติของยีนพันธุกรรม ส่วนใหญ่ป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์ปานกลางถึงต่ำ และมักไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคใด (Legrand *et al.*, 1987)

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส เป็น PR–proteins ที่มีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคในพืช สามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อราต่างๆ โดยการย่อยสลายผนังเซลล์ในส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคนและไคตินตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้พบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีการติดเชื้อ เช่น ใบยาสูบ, ข้าวบาร์เลย์และมันฝรั่ง เป็นต้น เอนไซม์ไคติเนสซึ่งเตรียมได้จากข้าวบาร์เลย์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma reesei, Alternaria alternaria, Phycomyces blakesleesasus* และ *Neurospora crassa* (Robert and Selitrennikoff, 1986) ตารางที่ 2 แสดงการศึกษา PR–proteins ในพืชต่างๆ

ตารางที่ 2 ตัวอย่าง PR – proteins ในพืช

พืชที่ศึกษา	เชื้อโรค/สารเคมี	ผลจากการศึกษา	อ้างอิง
ใบ, ราก และแคลลัสยาสูบ	Tobacco mosaic virus (TMV)	สร้าง PR – proteins 8 ชนิด แสดงคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ไคติ-เนส 5 ชนิดและเป็นเบต้า-1,3-กลูคาเนส 3 ชนิด	Tahiri – Alaoui *et al.*, 1990
ใบมันฝรั่ง	Salicylate	สร้าง PR – proteins 8 ชนิดมี 3 ชนิดเป็นเบต้า-1,3-กลูคาเนส อีก 5 ชนิดเป็นไคติเนส	Pierpoint *et al.*, 1990
ใบถั่วเหลือง	Polyacrylic acid และ mercuric chloride *P. megasperma megasperma*	สร้างเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มขึ้นมาก สร้างเอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น	Han *et al.*, 1991
ใบข้าวสาลี	*Puccinia graminis* Mercury treatment	สร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น 100 เท่า สร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น 2 เท่าส่วนไคติเนสเกิดขึ้นเล็กน้อย	Sock *et al.*, 1990

Central Library
Prince of Songkla University

Mauch และคณะ (1988) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่พบคู่กับเอนไซม์ไคติเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากฝักถั่วลันเตาที่ติดเชื้อรา *Fusarium solani* และ *F. phasioli* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 15 ชนิดใน 18 ชนิดที่ทดสอบ แต่ถ้าใช้เอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสเพียงอย่างเดียวจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เฉพาะเชื้อรา *F. solani* และ *F. pisi* เท่านั้น ดังนั้นเบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสในถั่วจึงสามารถทำงานร่วมกันแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Mauch *et al.*, 1988) และถูกยับยั้งการสร้างเมื่อใช้อ๊อกซินและไซโตไคนิน (Shinshi *et al.*, 1987) แสดงว่าเอนไซม์ทั้งคู่นอกจากจะทำงานร่วมกันแล้วยังถูกควบคุมด้วยกลไกที่คล้ายคลึงกัน

Martin และคณะ (1991) ได้เตรียมเอนไซม์ไคติเนสที่บริสุทธิ์จากน้ำยางพาราและพบว่ามีเอนไซม์ไคติเนสสูงถึง 20 % ของโปรตีนทั้งหมดในขณะที่พืชทั่วๆไปมีไคติเนสเพียง 1 – 2 % ของโปรตีนทั้งหมดเท่านั้น นอกจากนี้ Churngchow และคณะ (1995) รายงานว่าเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสก็มีปริมาณสูงเช่นเดียวกันโดยสูงถึง 15 % ของโปรตีนทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากต้นยางพาราถูกกรีดทุกวัน หน้ายางถูกเปิดออกทำให้เชื้อราผ่านเข้าไปตามท่อน้ำยางได้ง่าย ดังนั้นเพื่อป้องกันเชื้อรา เอนไซม์ทั้งสองจึงถูกสร้างขึ้นตลอดเวลาโดยไม่ต้องมีการกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อเหมือนในพืชอื่นๆ นอกจากนี้การเกิดบาดแผลจากการกรีดก็อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณโปรตีนดังกล่าวสูงกว่าพืชทั่วๆไป และจากการศึกษาพบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 2 ไอโซไซม์ในน้ำยางพันธุ์ RRIM600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคต่ำและให้ชื่อว่า GI และ GII ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ GT1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูงกว่า พบว่ามี 2 ไอโซ-ไซม์เช่นกันแต่พบในปริมาณที่แตกต่างกัน กล่าวคือพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณ GI : GII = 3 : 1 และพันธุ์ GT1 มีปริมาณ GI : GII = 1 : 7 ดังนั้น GII อาจเป็นไอโซไซม์ที่มีบทบาทในการต้านทานการเกิดโรคของต้นยางเช่นเดียวกับการศึกษาของ Mauch และคณะ (1988) ซึ่งพบว่ามีเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากถั่วเพียงหนึ่งไอโซไซม์ที่สามารถต้านเชื้อรา ส่วนอีกไอโซไซม์เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตเท่านั้น

การศึกษาของ Parijs และคณะ (1991) พบว่า hevein ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กในน้ำยางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ และเมื่อต้นยางเกิดบาดแผลหรือกระตุ้นด้วยเอทิลีนจะทำให้ยีนของ hevein แสดงออกมากขึ้น (Broekaert *et al.*, 1990) ส่วน Kush และคณะ (1990) พบว่ายีนของไคติเนสและยีนอื่นๆ 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 เมื่อต้นยางถูกทาด้วยสารเอเทรล (ethrel) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถปลดปล่อยก๊าซเอทิลีนออกมาหลังทา จากข้อมูลในยางพาราพอสรุปได้ว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสในน้ำยางถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นโดยสภาวะกดดันจากการเกิดบาดแผลหรือจากการกระตุ้นด้วยเอทิลีน และเอนไซม์ทั้งคู่อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของต้นยาง แม้ว่าในพืชบางชนิด เช่น มะเขือเทศ เอนไซม์ทั้งคู่เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อรา (Hedrick *et al.*, 1988) แต่บางไอโอไซม์ของเบต้า-1,3- กลูคาเนสและไคติเนสไม่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในพืชบางชนิด เช่น ถั่ว (Mauch *et al.*, 1988)

สำหรับการทดลองกับเชื้อรา *C. cassiicola* พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ แต่ปริมาณการสังเคราะห์ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน เนื่องจากใบยางพาราทั้งพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอถูกชักนำให้สร้างเอนไซม์ทั้งสองในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งมีบทบาทในการป้องกันตัวเองของพืชเช่นกันจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นในปริมาณที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใบยางพันธุ์ต้านทานมีปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอประมาณ 2 เท่า (Breton *et al.*, 1997)

1.7.3 **นีโครซีส** (Necrosis)

เป็นอาการที่เกิดจากการตายของเซลล์เมื่อถูกเชื้อโรคหรือสารพิษต่างๆเข้าทำลาย โดยทั่วไปเป็นแบบแห้งหรือมีแผลเป็นหย่อมๆ นีโครซีสจะมีขอบเขตใหญ่หรือเล็ก จะเกิดเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับส่วนของพืช ชนิดของพืชอาศัย เชื้อโรค สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมต่างๆ ปกติมีขนาดแผลประมาณ 1-2 มิลลิเมตรจนถึง 1 เซนติเมตรขึ้นไป เช่น โรคแอนแทรคโนสของถั่วฝักยาว แตงกวา แตงโม และฝ้าย นีโครซีสมีขนาดใหญ่กว่า 1 เซนติเมตร เป็นต้น อาการนีโครซีสที่พบทั่วไป เช่น อาการจุด (spot) มักเกิดบนใบหรือผล ปกติจะมีรูปร่างเป็นวงกลม บางโรคอาจจะมีมุมบ้าง เนื้อเยื่อตรงกลางแผลซึ่งตายแล้วจะทำให้เห็นโซนรอบๆแผลอาจเป็นสีเหลืองหรือสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายรอยไหม้ หรือเป็นรอยขีด (streak) ตามยาวของใบ เส้นใบ ลำต้น หรืออาการแผลไหม้ลามขยายกว้าง (blight) เป็นต้น

เมื่อปลูกเชื้อรา *C. cassiicola* บนใบยางพาราพบว่านีโครซีสที่เกิดจากการเจาะใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างใบยางพันธุ์ต้านทานกับใบยางพันธุ์อ่อนแอ โดยนีโครซีสในใบยางพันธุ์ต้านทานมีขนาดเล็กและมีขอบเขตชัดเจน แสดงถึงความสามารถในการกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ อาการดังกล่าวคือ hypersensitive response ของใบยางพันธุ์ต้านทานนั่นเอง ส่วนนีโครซีสในพันธุ์อ่อนแอ มีขนาด

ใหญ่และแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ แสดงถึงการเกิดโรคซึ่งปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อนแอคือปฏิกิริยา compatible ส่วนปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์ต้านทานเรียกว่าปฏิกิริยา incompatible แต่ถ้าเพิ่มปริมาณของเชื้อรามากขึ้นเรื่อยๆ ปฏิกิริยานี้ก็สามารถเปลี่ยนเป็น compatible ได้เช่นกัน ดังนั้นอาการนีโครซีสที่เกิดจากการตอบสนองของใบยางพาราต่อเชื้อก่อโรค สามารถใช้บอกระดับความต้านทานโรคได้ นั่นคือระดับความต้านทานแปรผกผันกับขนาดนีโครซีส (necrotic size) นอกจากนี้ท็อกซินจากเชื้อราชนิดนี้สามารถทำให้ใบยางเกิดนีโครซีสได้ และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการปลูกเชื้อลงบนใบยางด้วยสปอร์โดยตรงแสดงว่าท็อกซินจากเชื้อราชนิดนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ยางได้ด้วย ท็อกซินดังกล่าวได้มีการเตรียมให้บริสุทธิ์จากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อชนิดนี้ พบว่าท็อกซินเป็นไกลโคโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 17 เรซิดิวซ์ น้ำหนักโมเลกุล 7.5 กิโลดาลตัน (Breton *et al.*, 1997)

เชื้อรา *Phytophthora* บางสปีชีส์สามารถหลั่งไกลโคโปรตีนซึ่งมีขนาด 32 กิโลดาลตันออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อได้และไกลโคโปรตีน 32 กิโลดาลตันนี้ก็มีบทบาทในการเกิดปฏิกิริยา incompatible กับใบยาสูบเช่นกัน (Baillieul *et al.*, 1996) นอกจากนี้ Parker และคณะ (1991) พบว่าสามารถทำบริสุทธิ์ไกลโคโปรตีนขนาด 42 กิโลดาลตันจากน้ำเลี้ยงของเชื้อรา *P. megasperma megasperma* ซึ่งไกลโคโปรตีนชนิดนี้สามารถเป็นอิลิซิเตอร์ได้โดยกระตุ้นให้เซลล์แขวนลอยของผักชีฝรั่ง (parsley cell) มีการสะสมไฟโตอเล็กซินซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการตอบสนองของพืช เช่นเดียวกับ palmivorein ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 10 กิโลดาลตันจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ที่สามารถกระตุ้นให้ใบยางพาราและใบยาสูบเกิดอาการนีโครซีสได้

1.7.4 **การสังเคราะห์ลิกนิน** (lignification)

โดยปกติผนังเซลล์พืชมีชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบ คือ โพลีแซคคาไรด์ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน และลิกนินอยู่แล้ว แต่เมื่อพืชติดเชื้อโรค พืชก็จะตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินขึ้นอีกเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม Friend และคณะ (1973) พบว่าการสร้างลิกนินในมันฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. infestans* ได้ สำหรับในยางพาราการกักบริเวณไม่ให้เชื้อ *M. ulei* ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียง โดยการสร้างลิกนินเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งในการต้านเชื้อราชนิดนี้ ซึ่งการสร้างลิกนินบริเวณผนังเซลล์จะแตกต่างกันไปตามระดับความต้านทานของยางพารา Garcia และคณะ (1995) รายงานการสร้างลิกนินหลังจากการปลูกเชื้อรา *M. ulei* บนใบยางพารานาน 4 วัน พบว่าใบยางพาราพันธุ์ต้านทานสร้างลิกนินเฉพาะบริเวณที่ถูกบุกรุกด้วยสปอร์ของเชื้อรา แต่สำหรับใบยางพาราพันธุ์ค่อนข้างต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ การสร้างลิกนินจะเกิดรอบๆบริเวณ

รอยแผลที่สปอร์ของเชื้อราลุกลามไปถึงแล้วโดยที่ยางพาราพันธุ์ค่อนข้างต้านทานเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินมากกว่าพันธุ์อ่อนแอและไม่พบก้านของเส้นใยซึ่งเป็นที่เกิดของสปอร์ (conidiophores) ของเชื้อรารอบๆบริเวณที่มีการสร้างลิกนินแสดงว่าการสร้างลิกนินสามารถกักบริเวณไม่ให้เชื้อลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ซึ่งผลที่ได้ตรงข้ามกับยางพาราพันธุ์อ่อนแอที่พบ conidiophores ของเชื้อรา

การสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพันธุ์ต้านทานเพื่อต่อต้านเชื้อราในปริมาณที่สูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอ (Breton *et al.*, 1997) แสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินขึ้นในพันธุ์ต้านทานเพื่อเสริมความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสนี้เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ให้แก่พืช โดยเป็นตัวกลางผลิต hydrodiferulic acid ซึ่งเป็นสารที่เชื่อมโยงโพลีแซคคาไรด์ (Fry, 1982)

วัตถุประสงค์

1. เตรียมอิลิซิตินให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*
2. ศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้ (necrosis) ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยอิลิซิตินที่เตรียมได้ เปรียบเทียบกับการบ่มใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อรา
3. ศึกษาอัตราเร็วและปริมาณการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินซึ่งเกิดจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิตินที่เตรียมได้ เปรียบเทียบการบ่มใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อรา
4. ศึกษาการเพิ่มขึ้นของ PR-proteins (เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส) เมื่อกระตุ้นด้วยอิลิซิตินที่เตรียมได้ เปรียบเทียบกับการบ่มใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อรา
5. ศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินรอบๆรอยไหม้ที่ถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินที่เตรียมได้ เปรียบเทียบกับการบ่มใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อรา
6. ใช้ยางพาราที่มีความต้านทานโรคต่างกันในการทดลองข้อ 2-5 เพื่อหากลไกหลักในการป้องกันตนเองของยางพารา และเข้าใจถึงกลไกการก่อโรคของเชื้อราชนิดนี้ ซึ่งอาจใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานโรคสูงต่อไป