4. สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองต่างๆ ของใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ต่อซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ได้แก่ การเกิดรอยไหม้ (necrosis) การสะสมปริมาณสคอพอลิติน การสังเคราะห์ PR-proteins คือ เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และเปอร์ออกซิเดส รวมถึงลิกนิน สามารถใช้บอกระดับความต้านทานโรคของใบยางพาราได้ ซึ่งสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

4.1 การเกิดรอยไหม้ หลังบ่มใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ 72 ชั่วโมง ด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สังเกตความแตกต่างของขนาดรอยไหม้ได้ชัดเจนที่สุด โดยพันธุ์ RRIM600 เกิดรอยไหม้แผ่กว้าง จึงเห็นขนาดบาดแผลใหญ่กว่าพันธุ์ BPM-24 ซึ่งสามารถกักบริเวณรอยไหม้ได้ แสดงว่าซูโอสปอร์ความเข้มข้นนี้ทำให้ใบยางพันธุ์ RRIM600 เกิดโรคขึ้น (compatible) ส่วนพันธุ์ BPM-24 เกิดปฏิกิริยา incompatible ดังนั้นในการศึกษากลไกการป้องกันโรคของใบยางทั้งสองพันธุ์ที่สภาวะการเกิดปฏิกิริยาใกล้เคียงกันจะต้องใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ต่างกัน คือ ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับพันธุ์ RRIM600 และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับพันธุ์ BPM-24

4.2 การสะสมสคอพอลิตินของชิ้นใบยางสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร ที่แช่ในซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างกันดังที่ระบุในข้อที่ 1 พบว่า ปริมาณสคอพอลิตินแบบสร้างใหม่ และแบบเก็บสะสม จะมีการสะสมสคอพอลิตินสูงสุด 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกที่ 8-12 ชั่วโมง และครั้งที่ 2 ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งพันธุ์ BPM-24 จะมีการสะสมสคอพอลิตินสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายราได้ดีกว่า แต่พบว่าวิธีการสร้างใหม่ทำให้เกิด reinfection น้อย จึงกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินในพีคที่ 2 ได้น้อยกว่า เนื่องจากการสะสมสคอพอลิตินในช่วงแรกเกิดเร็วแต่สลายเร็วมาก จึงส่งผลต่อการศึกษาสคอพอลิตินแบบเก็บสะสม คือ สคอพอลิตินแบบเก็บสะสมในช่วงแรกถูกกระตุ้นให้สร้างมากในพันธุ์ BPM-24 แม้ว่าจะมีการสลายเร็วก็ยังคงเห็นพีคแรก ส่วนพันธุ์ RRIM600 จะเห็นเฉพาะพีคหลังที่ 48 ชั่วโมงเท่านั้น แล้วมีการสะสมสคอพอลิตินเพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง แล้วค่อยๆ ลดลง

4.3 การสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

4.3.1 การกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยวิธีการแช่ชิ้นใบ (ขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร) ในน้ำ พร้อมเขย่าตลอดเวลา ถือเป็นวิธีที่รุนแรงมาก ทำให้ใบยางทั้งสองพันธุ์เกิดโรค พบปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อใบลดลง เนื่องจากเซลล์ใบแตกจนปล่อย

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมาในน้ำแช่ใบจำนวนมาก ปฏิกิริยา compatible ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วนี้ ก็สามารถแยกระดับความต้านทานของโรคได้ โดยพันธุ์ BPM-24 ค่าความว่องไวของเอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้น เพื่อตอบโต้ทั้งการเจาะและการลามของซูโอสปอร์จึงเห็นเป็น 2 พีค ในขณะที่พันธุ์ RRIM600 ถูกสร้างเพื่อต้านการเจาะของซูโอสปอร์เพียงอย่างเดียวจึงเห็นพีคแรกพีคเดียว ฉะนั้นจึงไม่มีเซลล์ใบที่จะให้ซูโอสปอร์ลุกลาม

4.3.2 การกระตุ้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยวิธีการวางชิ้นใบ (ขนาด 1x1 ตารางนิ้ว) บนกระดาษกรองชื้น เป็นวิธีการที่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ และกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง กราฟที่เห็นคือพีคแรกที่พบในวิธีการแช่ชิ้นใบในน้ำ เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ในพันธุ์ BPM-24 มีปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 ซึ่งบ่งบอกถึงระดับความต้านทานโรคของยางพาราได้

4.4 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 เพียงบางส่วน ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และการใช้คอลัมน์ PD-10 พบว่า คอลัมน์ PD-10 สามารถกำจัดสีได้ดีกว่าการตกตะกอนโปรตีน ส่งผลให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาจากสภาพใบยาง 3 ช่วง ได้แก่ ใบยางช่วงปลอดเชื้อ ช่วงกำลังติดเชื้อและช่วงติดเชื้อเต็มที่ พบว่า ใบยางช่วงที่กำลังติดเชื้อมีตัวยับยั้งมากที่สุด เพราะมีการสะสมสารฟีนอลิก ทำให้วัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้น้อยกว่าความเป็นจริง สันนิษฐานว่าในสารสกัดใบยางมีตัวยับยั้งปะปนอยู่ น่าจะเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 5,000 ดาลตัน จึงสามารถแยกตัวยับยั้งดังกล่าวด้วยคอลัมน์ PD-10 (เป็น sephadex G-25)

4.5 ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา

การสกัดใบยาง (ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์) ด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris- HCl, pH 7.5 สามารถสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไซโทซอล ชนิดอะซิดิกเปอร์ออกซิเดส มีบทบาทในขบวนการสังเคราะห์ลิกนิน เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสแบบ native PAGE และ SDS-PAGE ให้ผลการทดลองเหมือนกัน คือ ตรวจพบความว่องไวได้ 3 ไอโซไซม์ (X, Y และ Z) ซึ่งมีไอโซไซม์ Y เท่านั้น ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค โดยจะทำหน้าที่โพลิเมอร์ไรซ์โมโนลิกนอลให้เป็นลิกนินชนิดต่างๆ กัน และไอโซไซม์ Y สามารถย้อมติดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยสับสเตรทหลายชนิด ได้แก่ *o*-dianisidine, guaiacol, scopoletin, coniferyl alcohol และ syringaldazine ซึ่ง coniferyl alcohol และ syringaldazine เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินโดยตรง โดยเฉพาะ syringaldazine สามารถย้อมติดทั้งไอโซไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้าง

ลิกนินตามธรรมชาติ (ไอโซไซม์ Z) และลิกนินที่เพิ่งสร้างใหม่หลังถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ (Y) ส่วนสคอพอลิตินเกี่ยวข้องกับสคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส ใช้กำจัดสคอพอลิติน และ *o*-dianisidine กับ guaiacol จะตรวจวัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั่วไปไม่จำเพาะเจาะจง แต่ guaiacol เป็นสับสเตรทที่ควรใช้ในการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวกับลิกนินร่วมกับเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันโรคของยางพาราด้วย เช่น เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซุปเปอร์ออกไซดิสมิวเทส แคตทาเลส แลคเคส และโพลีฟีนอลออกซิเดส เพื่อทำให้เข้าใจปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากขึ้น

4.6 การสังเคราะห์ลิกนิน สามารถศึกษาได้จากวิธีการบ่มใบยางแบบไม่รุนแรง เริ่มมีการสะสมลิกนิน 24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ วัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของลิกนินไธโอไกลคอลิกที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร พบปริมาณการสะสมลิกนินในพันธุ์ BPM-24 มากกว่าพันธุ์ RRIM600