1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชที่ให้น้ำยางมากที่สุดในบรรดาพืชที่ให้น้ำยาง 12,500 ชนิด เป็นไม้ยืนต้นซึ่งมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แต่ปัจจุบันทวีปเอเชียเป็นแหล่งที่ปลูกยางพารามากที่สุด และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งทำรายได้ให้แก่เกษตรกรไทยอย่างมหาศาล โดยมีการปลูกในภาคใต้มากที่สุด รองลงมาคือภาคตะวันออก (อโนทัย งานทวี, 2538) ในปี พ.ศ.2544 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพาราประมาณ 12.56 ล้านไร่ (สถาบันวิจัยยาง, 2545) และมีแนวโน้มจะผลิตเพิ่มขึ้นในปีต่อมา เนื่องจากมีการพัฒนาสวนยางพาราด้วยการปลูกยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงทดแทนยางพื้นเมืองที่เป็นสวนยางเก่าซึ่งให้ผลผลิตต่ำ ในอดีตยางพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกจะมีความแข็งแรงตามธรรมชาติทำให้ต้นยางสามารถต้านทานต่อการเกิดโรค แต่เมื่อมีการนำยางพันธุ์ดีมาปลูกทดแทนทำให้ประสบปัญหาโรคยางพาราเพิ่มขึ้นและจากการที่ภาคใต้มีฝนตกตลอดทั้งปีทำให้ต้นยางติดเชื้อราได้ง่าย เชื้อรา *Phytophthora* spp. ซึ่งทำให้เกิดโรคกับยางพารามีหลายชนิดที่แพร่กระจายในประเทศไทยเกิดจาก *P. palmivora* และ *P. botryosa* เชื้อราทั้งสองชนิดนี้สามารถเข้าทำลายยางพาราได้ทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นใบอ่อน ใบโตเต็มที่ ใบแก่ ก้านใบ ผลอ่อน ผลที่โตเต็มที่ และหน้ากรีดของยางพารา โดยก่อให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปตามส่วนของพืช เมื่อเชื้อราเข้าทำลายใบจะก่อให้เกิดจุดแผลสีเทาเข้มค่อนข้างกลม ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้นมีลักษณะไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ เมื่อแผลมาชนกันก่อให้เกิดแผลสีดำขนาดใหญ่ทำให้ใบเหี่ยวและร่วง ในกรณีอาการรุนแรงก็จะลุกลามไปถึงยอดและลำต้น ทำให้หน้ายางเสีย กรีดยากหรือกรีดไม่ได้ นั่นคือทำให้ผลผลิตลดลง (พจมาลย์ สุรนิลพงศ์, 2538) เชื้อรากลุ่มนี้แพร่ระบาดในพืชชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น มะเขือเทศ โกโก้ ทุเรียน และผลไม้เมืองร้อนบางชนิดในเอเชีย (เบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์, 2542) เช่น *Phytophthora infestans* ทำให้เกิดโรคใบไหม้ (late blight) ในมันฝรั่งและมะเขือเทศ (Levin *et al*., 2001), *Phytophthora sojae* ทำให้เกิดโรครากถั่วชื้น (damping off) และลำต้นเน่าเปื่อย (stem rot) (Dorrance *et al*., 2000) และ *Phytophthora capsici* ทำให้ฟักทองและพริกไทยในประเทศเกาหลี ฝรั่งเศส อิตาลีและสหรัฐอเมริกา เกิดโรคใบและรากชื้น ใบชีด (foliar blight) ลำต้นเป็นแผลและผลเน่าเปื่อย (Lee *et al*., 2001) เนื่องจากยางพาราต้องมีอายุ 5-6 ปี จึงจะกรีดเอาน้ำยางไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นการเลือกต้นยางอ่อนไปปลูกจะต้องคำนึงถึงผลผลิตที่ได้เป็นหลัก

ยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงและนิยมปลูกกันมากคือ พันธุ์ RRIM600 แต่ในบางพื้นที่ที่มีความชื้นสูง ต้นยางติดเชื้อได้ง่าย จึงต้องเลือกปลูกยางพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูงด้วย ปัจจุบันยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงและต้านทานต่อเชื้อราชนิดนี้ได้ดีคือ ยางพันธุ์ BPM-24 การใช้สารเคมีสามารถควบคุมเชื้อราได้ในระยะสั้นเท่านั้น วิธีควบคุมในระยะยาวคือการคัดเลือกพันธุ์ยางที่มีความต้านทานโรคสูงมาปลูกทดแทน การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรา *Phytophthora* spp. กับยางพาราจะทำให้เข้าใจถึงกลไกการป้องกันเชื้อราของยางพารา และจะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์ยางโดยนักปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

จากการที่ต้นยางพาราและพืชทั่วไปไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรค จึงมีวิวัฒนาการขึ้นมาป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของเชื้อโรคด้วยวิธีต่างๆ เช่น มีการสร้าง wax, cork หรือ cuticle เหนือผิวเซลล์ชั้นนอกสุด (epidermal cell), การเกิด active oxygen species (AOS) ได้แก่ ซุปเปอร์-ออกไซด์ไอออน (O_2^-), ไฮดรอกซี เรดิคอล ($^{\cdot}OH$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตาย เรียกว่า hypersensitive cell death (Pierpoint, 1983) โดยสังเกตเห็นเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis) หรือโดยการสร้างสารโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่ phytoalexins, phenol, tannin และ melanin ฯลฯ (Bell, 1981) เพื่อยับยั้งเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามต่อไปยังเซลล์ข้างเคียงและสร้าง pathogenesis related-proteins (PR-proteins) เพื่อต้านทานเชื้อโรคต่างๆ PR-proteins ดังกล่าวประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucanase) (Linthorst, 1991) เอนไซม์จะถูกกระตุ้นให้พืชสร้างมากขึ้นเมื่อมีเชื้อโรคมาบุกรุก โดยไคติเนสย่อยผนังเซลล์ในส่วนที่เป็นไคตินและเบต้า-1,3-กลูคาเนสย่อยผนังเซลล์ส่วนที่เป็นเบต้า-1,3-กลูแคน ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองจะทำงานร่วมกันแบบ synergistic ในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรค แต่ไม่ย่อยสับสเตรทดังกล่าวในพืช (Huynh *et al*., 1992)

นอกจากถูกกระตุ้นให้พืชสร้างมากขึ้นเมื่อเชื้อโรคบุกรุกแล้ว PR-proteins ยังถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในสภาวะกดดันบางอย่าง (stress condition) เช่น ต้นพืชเกิดบาดแผล หรือถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีบางชนิด ได้แก่ ethylene hormone (Mauch, 1992) , salicylic acid, polyacrylic acid และ mercuric chloride (Hen *et al*., 1991) PR-proteins อีกชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยพืชชนิดหนึ่งๆ จะมีการสร้างเปอร์ออกซิเดสขึ้นมาหลายไอโซไซม์เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ บางไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต และการขยายตัวของเซลล์, เมแทบอลิซึมของออกซิน, เมแทบอลิซึมของอัลคาลอยด์ โดย Pomar และคณะ (1997) พบว่าอะซิดิกและเบสิกเปอร์ออกซิเดส มีบทบาทเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของ

อัลคาลอยด์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสีผิวของผลไม้ ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ช่วยซ่อมแซมผนังเซลล์โดยจะเร่งกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน (lignin), ซูเบอริน (suberin) เพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อไม้ (Van Huystee and Zheng, 1993) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. infestans* ได้ (Friend *et al*., 1973) ในยางพาราการกักบริเวณไม่ให้เชื้อ *Microcyclus ulei* ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงโดยลิกนินเป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งในการต้านเชื้อรานี้ (Garcia *et al*., 1995b) เนื้อเยื่อพืชจะเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้แก่ การได้รับเชื้อโรคต่างๆ เช่น เชื้อรา เชื้อจุลินทรีย์ เชื้อไวรัส บักเตรี การเกิดบาดแผล การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่รุนแรง ความเค็มและรังสีอุลตร้าไวโอเลต มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของไอโซเปอร์ออกซิเดสซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช สัมพันธ์กับการศึกษาของ Chen และคณะ (2002) พบว่า เมื่อต้นเรดิชได้รับทองแดง (Cu^{2+}) เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ การเจริญเติบโตถูกยับยั้งเมื่อตรวจวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดของรากเรดิช ด้วยวิธี isoelectric focusing (IEF) พบว่าแอนไอออนิกและแคทไอออนิกเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น ซึ่งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ แอสคอเบท (Ascorbate) เปอร์ออกซิเดส มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ผลิตขึ้นจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเพื่อทำลายอนุมูลอิสระของซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนในกลุ่มของ AOS ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์พืช (Perez *et al*., 2002) สคอพอลิตินเปอร์ออกซิเดส ทำหน้าที่กำจัดสคอพอลิติน (Scp) ซึ่งเป็นไฟโตอเล็กซิน เพื่อป้องกันอันตรายจากพิษของสคอพอลิตินต่อเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ผลผลิตของไฟโตอเล็กซินเปอร์ออกซิเดส (phytoalexin peroxidation product) อาจมีพิษต่อเชื้อรามากกว่าไฟโตอเล็กซิน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Breton และคณะ (1997) ที่แสดงว่าสคอพอลิตินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Corynespora cassiicola* ต่ำ เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสคอพอลิตินได้ และจากการทดสอบ Scp peroxidation product พบว่า มีพิษต่อเชื้อรานี้ใกล้เคียงกับสคอพอลิติน ส่วนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน จะทำหน้าที่โพลิเมอร์ไรซ์ไฮดรอกซีซินนาปิลแอลกอฮอล์ 3 ชนิด ได้แก่ พาราคูมาริลแอลกอฮอล์ (*para*-coumaryl alcohol) โคนิเฟริลแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และซินนาปิลแอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) ในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลิกนิน (Campbell and Sederoff, 1996 และ Whetten and Sederoff, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Christensen และคณะ (1998) ที่สกัดแอนไอออนิกเปอร์ออกซิเดสจากไซเลมของต้นพอพลาร์ (poplar) ได้ 6

ไอโซไซม์ โดยมี 3 ไอโซไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ ไซริงกัลดาซีน (syringaldazine) ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ลักษณะคล้ายกับ sinapyl alcohol ที่ใช้ในการสร้างไซริงกิลลิกนิน (syringyl lignin) มีความสัมพันธ์กับการทดลองของ Candela และคณะ (1994) ที่พบว่าใบ *Capsicum annuum* ที่ติดเชื้อไวรัส cucumber mosaic virus (CMV) จะกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี IEF แล้วย้อมด้วยเบนซิดีน (benzidine) พบว่าปรากฏแถบของอะซิดิกและเบสิกเปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้ coniferyl alcohol จะย้อมติดแถบความว่องไวชนิดอะซิดิกได้ดีกว่าเบสิกเปอร์ออกซิเดส แสดงว่าอะซิดิกเปอร์ออกซิเดสสามารถออกซิไดซ์ coniferyl alcohol ซึ่งเป็นสับสเตรทที่จำเพาะกับการสร้างกัวเอซิลลิกนิน (guaiacyl lignin)

เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสพบเกือบทุกส่วนของพืชและมีหลายไอโซไซม์ทั้งชนิดอะซิดิกและเบสิก ซึ่งจำเพาะกับสับสเตรทแตกต่างกันตามหน้าที่ทางชีวภาพ ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาบทบาทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวกับการต้านทานโรคในใบยางพารา โดย Breton และคณะ (1997) พบว่าในใบยางพาราที่ถูกรุกรานด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (ก่อให้เกิดโรคใบจุดและใบร่วงในยางพารา) ทั้งอะซิดิกและเบสิกเปอร์ออกซิเดสมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของพันธุ์วศรี แสงสุวรรณ (2547) ที่สามารถย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของสารสกัดแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราด้วย *o*-dianisidine ตรวจพบแถบไอโซไซม์ 1 และ 2 แถบ จากแคลลัสพันธุ์ GT1 และ RRIM600 ตามลำดับ แต่ไม่พบไอโซไซม์นี้ในชุดควบคุม ซึ่งก็แสดงว่าไอโซไซม์ที่ถูกสร้างนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค แต่ไม่ทราบว่าไอโซไซม์ดังกล่าวมีกลไกการป้องกันโรคในใบยางอย่างไร ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ผ่านมายังศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในด้านการเกิดรอยไหม้และการสร้างไฟโตอเล็กซิน มีส่วนน้อยที่ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* และมีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา lignification เมื่อใช้สับสเตรทชนิดที่จำเพาะกับการสร้างลิกนินโดยตรง และความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาการป้องกันโรคอื่นๆ เพื่อทำให้เข้าใจบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่แน่นอนในการต้านทานโรคของยางพารา เพื่อเป็นแนวทางในการหาวิธีการป้องกันโรค ตลอดจนการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 ยางพารา *(Hevea brasiliensis)*

ต้นยางพาราเป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่มขนาดใหญ่ที่มีอายุยืนนาน มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปอเมริกาใต้ในป่าลุ่มน้ำอะเมซอนของประเทศบราซิล ลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างแปรปรวนขึ้นอยู่กับสภาพภูมิประเทศ ถ้าเป็นต้นที่สมบูรณ์และปลูกในที่ระบายน้ำได้ดีก็จะสูงถึง 40 เมตร แต่ถ้านำมาปลูกในทวีปเอเชียต้นก็จะเล็กลง โดยพบว่าต้นที่ปลูกด้วยเมล็ด ขนาดลำต้นจะโตกว่าต้นที่ปลูกด้วยวิธีการติดตาและความสูงจะลดลงเหลือประมาณ 15-20 เมตร ต้นยางพาราจะมีน้ำยางในทุกส่วนของต้น เปลือกของลำต้นจะเป็นบริเวณที่ให้น้ำยางมากที่สุด มีความหนาประมาณ 6.5-15 มิลลิเมตร กิ่งจะแยกตั้งประมาณ 45 องศาจากลำต้น ใบเรียงสลับกันค่อนข้างตรงกันข้าม ใบประกอบด้วย 3 ใบย่อยในแต่ละก้าน ขอบใบเรียบ แต่ละใบกว้างประมาณ 5-10 เซนติเมตร และยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร ในทางพฤกษศาสตร์ได้จัดอนุกรมวิธานของต้นยางพารา ดังนี้

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Rosidae

Order : Euphorbiales

Family : Euphorbiaceae

Genus : *Hevea*

Species : *Hevea brasiliensis*

(ที่มา : http://www.kanchanapisek.or.th/kpc/BOOK/chapter4/t3-4-l1.htm#sect1)

ในบรรดาต้นยางในสกุล *Hevea* พบว่า *Hevea brasiliensis* ซึ่งมีชื่อสามัญว่า rubber tree หรือ ต้นยางพารา เป็นชนิดที่ให้น้ำยางมากที่สุด และเนื้อยางมีคุณสมบัติทางวิทยาศาสตร์ดีกว่ายางชนิดอื่นๆ

ทางภาคใต้ ภาคตะวันออกและบางส่วนของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเหมาะที่จะปลูกยางพารา เนื่องมาจากต้นยางพาราชอบดินร่วนที่มีการระบายน้ำใต้ผิวดินดี มีความเป็นกรด (pH) ในช่วง 4-5.5 ฝนตกสม่ำเสมอตลอดปีมีความชื้นสูงและพบว่าไม่ควรปลูกในที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,000 ฟุต เพราะรากของต้นยางมีรากแก้วค่อนข้างตื้น ลึกลงดินไม่เกิน 1.5-2

เมตร มีรากแผ่ในผิวดินจึงมักล้มง่ายเมื่อโดนลมแรง ต้นยางสามารถกรีดให้น้ำยางได้เมื่ออายุประมาณ 5-6 ปี ถ้ากรีดด้วยความระมัดระวังก็สามารถกรีดเอาน้ำยางได้นานกว่า 30 ปี ดังนั้นในการปลูกยางพาราจึงต้องพิจารณาพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ โดยในปี พ.ศ.2546 สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตรได้ให้คำแนะนำแก่เกษตรกรถึงปัจจัยที่ต้องพิจารณาในการใช้พันธุ์ยาง เพื่อให้เกษตรกรได้รับผลตอบแทนที่สูงจากผลผลิตที่สูงขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาประเทศต่อไป

พันธุ์ยางที่สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาเกษตรได้แนะนำให้ปลูก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามวัตถุประสงค์ของการปลูก ดังนี้

กลุ่มที่ 1 พันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูงเป็นหลัก การเลือกปลูกพันธุ์ยางในกลุ่มนี้ควรมุ่งเน้นผลผลิตน้ำยาง ได้แก่ พันธุ์ยางชั้น 1 ซึ่งประกอบด้วย RRIM600, BPM-24, RRIT251 และ RRIT226 และพันธุ์ยางชั้น 2 ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ RRIT209, 214, 218, 225, 250, 319, 405, 406, RRIC100, RRIC101, PR302, PR305 และ Haiken 2

กลุ่มที่ 2 พันธุ์ยางที่ให้ทั้งผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ โดยให้ผลผลิตน้ำยางสูง และมีการเจริญเติบโตดี ลักษณะลำต้นตรง ให้ปริมาตรเนื้อไม้ในส่วนลำต้นสูง ได้แก่ พันธุ์ยางชั้น 1 ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ PB235, PB255, PB260, RRIC110 และพันธุ์ยางชั้น 2 ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ RRIT312, 325, 404, 407, 409 และ RRIC121

กลุ่มที่ 3 พันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูงเป็นหลัก มีการเจริญเติบโตดีมาก ลำต้นตรง ให้ปริมาตรเนื้อไม้ในส่วนลำต้นสูงมาก ผลผลิตน้ำยางจะอยู่ในระดับต่ำกว่าพันธุ์ยางในกลุ่มที่ 1 และ 2 เหมาะสำหรับเป็นพันธุ์ที่จะปลูกเป็นสวนป่าเพื่อการผลิตเนื้อไม้ ได้แก่ พันธุ์ยางชั้น 1 ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ฉะเชิงเทรา50, AVROS2037, BPM1 และพันธุ์ยางชั้น 2 ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ RRIT401, 403, RRII118 และ RRII203

ชื่อเต็มของคำย่อที่ใช้ในการกำหนดชื่อพันธุ์ยางพาราที่กล่าวมาข้างต้น

AVROS = Algemene Vereniging Rubberplanters Oostkust Sumatra

BPM = Balai Penelitian Perkebunan, Sungei Putih, Medan

GT = Gondang Tapen

LCB = ‘s Lands Caoutchouc Bedrijiven

PB = Prang Besar

PR = Proefstation voor Rubber

RRIC = Rubber Research Institute of Ceylon

RRII = Rubber Research Institute of India

RRIM = Rubber Research Institute of Malaysia

RRIT = Rubber Research Institute of Thailand (สถาบันวิจัยยาง)

Tjir = Tjirandji

1.2 โรคยางพาราที่พบในประเทศไทย

ความสูญเสียเนื่องจากการระบาดของโรคที่เกิดในยางพารา มีผลทำให้หน้ากรีดเน่าเสียไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ (รูปที่ 1) เช่น โรคเส้นดำที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. ถ้าเป็นรุนแรงเปลือกที่งอกใหม่จะเสียหายไม่สามารถกรีดยางซ้ำบนหน้าเดิมได้ ทำให้ระยะการให้ผลผลิตขาดระยะไปก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตยางพารา ซึ่งจะส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย โรคนี้พบระบาดครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2493 ที่อำเภอแกลง จังหวัดระยอง พบต้นยางพาราแสดงอาการใบร่วงเนื่องจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. ประมาณ 100,000 ต้น (นิยม จิ้วจิ้น และฤกษ์ ศยามานนท์, 2513) และจากการสำรวจโดย พงษ์เทพ ขจรไชยกุล ในปี พ.ศ. 2531 พบว่า โรคใบร่วงและตายจากยอดที่ติดเชื้อราชนิดนี้มีความสำคัญ คือเชื้อราเข้าทำความเสียหายต่อต้นยางเล็กในแปลงต้นกล้ายาง แปลงกิ่งตาขยายพันธุ์ยางและแปลงยางชำถุง โดยเฉพาะในเขตภาคใต้ตอนล่างซึ่งเป็นแหล่งผลิตพันธุ์ยางที่สำคัญของประเทศไทย และมีแนวโน้มการระบาดของโรคค่อนข้างมากโดยการสำรวจของศูนย์วิจัยยางสงขลาในปี พ.ศ. 2541 รายงานว่าแปลงขยายพันธุ์กิ่งยางและแปลงเพาะยางชำถุงจากพันธุ์ RRIM600 มีความอ่อนแอมากต่อเชื้อรา *Phytophthora* spp. ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อแปลงขยายพันธุ์กิ่งตายางและแปลงเพาะยางชำถุงเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงควรเข้าใจในเรื่องโรคยางพารา ไม่ว่าจะเป็นชนิดของโรค ลักษณะอาการ เชื้อราสาเหตุ การแพร่ระบาดและการป้องกันกำจัดอย่างถูกต้อง (ตารางที่ 1) เพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้น

รูปที่ 1 โรคในยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp.

ก. สวนยางที่เกิดโรคใบร่วงจากเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* spp.

ข. ใบและก้านใบที่เป็นโรคใบร่วง

ค. ลำต้นยางที่เป็นโรคเส้นดำ

(ที่มา : http://plantpro.doae.go.th/plantclinic/clinic/rubber/phytoph_3.html)

ตารางที่ 1 ชนิดของโรค ลักษณะอาการ เชื้อราสาเหตุ การแพร่ระบาดและการป้องกันกำจัดโรคของยางพาราที่พบในประเทศไทย
(ที่มา : สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร, 2544)

ชนิดของโรค	ลักษณะอาการ	เชื้อราสาเหตุ	การแพร่ระบาด	การป้องกัน
โรคราแป้ง (Odium leaf disease)	ปลายใบบิดงอ เน่า มีสีดำ แผลจะเห็นปุยเส้นใยสีขาวจน เป็นสีเทาบนด้านล่างของ แผ่นใบก่อนที่จะร่วงจากต้น	*Oidium hevea* Steinm.	กุมภาพันธ์ -มีนาคม โรคจะแพร่กระจายโดยลมและ แมลง ในช่วงยางผลิใบใหม่	ใช้สารเคมีฉีดพ่นใบยางก่อน ฤดูกาลโรคระบาด
โรคใบจุดก้างปลา (Corynespora leaf disease)	ใบเป็นจุดกลม แผลจะขยาย ลุกลามตามเส้นใบ ทำให้เห็น เป็นรูปก้างปลา มีสีซีดเหลือง ถึงน้ำตาล แล้วใบก็จะร่วง	*Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei	เมษายน-ธันวาคม โรคจะแพร่โดยลมและฝน ในระยะใบอ่อนจนถึงแก่	-ไม่ควรปลูกพืชอาศัยของเชื้อรา เช่น งา ถั่วเหลือง และมะละกอ เพื่อตัดวงจรของเชื้อรา -ใช้สารเคมีฉีดพ่นใบยางก่อน ฤดูกาลโรคระบาด
โรคใบจุดตานก (Bird's eye spot)	ในใบอ่อน จุดแผลที่เกิดจะ เห็นไม่ชัด ใบจะเหี่ยวย่น มีสี น้ำตาลดำ ส่วนในใบแก่แผล กลมคล้ายตานก แล้วร่วง	*Drechslera hevea* (Petech) M.B. Ellis	เมษายน-กรกฎาคม ดินทรายหรือดินที่มีความอุดม สมบูรณ์ต่ำ โรคนี้จะแพร่กระจาย โดยลม ฝนหรือจากการสัมผัส ระหว่างต้นยางที่เป็นโรค	-หลีกเลี่ยงการปลูกกล้ายางใน ดินทราย -ใช้สารเคมีพ่นใบยางก่อนโรค ระบาด

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของโรค	ลักษณะอาการ	เชื้อราสาเหตุ	การแพร่ระบาด	การป้องกัน
โรคใบร่วง (Leaf fall)	มีรอยช้ำสีดำบริเวณก้านใบและจุดกึ่งกลางใบของรอยช้ำมีหยดน้ำยางเกาะติดอยู่ เมื่อนำใบยางที่เป็นโรคมาสะบัดไปมาเบาๆ ใบย่อยจะหลุดง่าย	*Phytophthora botryosa* Chee, *P. palmivora* (Butler) Butler, *P. nicotianae* var. *parasitica* Breda de Itaan	มิถุนายน-ธันวาคม อากาศเย็น ฝนตกความชื้นสูงต่อเนื่องแสงแดดน้อย แพร่กระจายโดยลมและน้ำฝน	-ไม่ปลูกพืชอาศัยของเชื้อรา เช่น ทุเรียน ส้ม และพริกไทย -กำจัดวัชพืชให้อากาศถ่ายเทเพื่อลดความชื้นในสวนยาง -ใช้สารเคมี
โรคเส้นดำ (Black stripe)	ในระยะแรกบริเวณเหนือรอยกรีดช้ำมีสีผิดปกติ ระยะต่อมาจะกลายเป็นรอยบุ๋มสีดำหรือสีน้ำตาล ถ้าอาการรุนแรงเปลือกหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคปริเน่ามีน้ำยางไหล	*Phytophthora botryosa* Chee, *P. palmivora* (Butler) Butler	มิถุนายน-ธันวาคม ช่วงที่ฝนตกชุกมีความชื้นสูง แพร่กระจายโดยสปอร์ปลิวตามลมและน้ำฝน	-ไม่ควรปลูกพืชอาศัยของเชื้อราเป็นพืชแซม เช่น ทุเรียน โกโก้ ส้ม มะละกอ พริกไทยและยาสูบ -ทาสารเคมีป้องกันโรคก่อนฤดูระบาด

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของโรค	ลักษณะอาการ	เชื้อราสาเหตุ	การแพร่ระบาด	การป้องกัน
โรคเปลือกเน่า (Mouldy rot)	ระยะแรก เปลือกเหนือรอยกรีดฉ่ำน้ำ ต่อมามีรอยบุ๋ม ปรากฏเส้นใยของเชื้อราสีขาวเทา ตรงรอยแผล ทำให้เปลือกหน้ากรีดยางเน่าเหลือแต่เนื้อไม้สีดำ	*Ceratocystis fimbiata* Ellis & Halst.	มิถุนายน-ธันวาคม ช่วงฝนตกชุก ความชื้นสูง สปอร์ของเชื้อจะแพร่ระบาดโดยลมและมีแมลง	-ไม่ควรปลูกพืชอาศัยของเชื้อราเป็นพืชแซม เช่น กาแฟ โกโก้ มะม่วง มะพร้าวและมันฝรั่ง -กำจัดวัชพืชเพื่อลดความชื้นในสวนยาง -ทาสารเคมีบนหน้ากรีดจนหน้ากรีดแห้งเป็นปกติ
โรคราสีชมพู (Pink disease)	เปลือก ง่ามกิ่ง กิ่งก้านและลำต้นจะปริแตกมีน้ำยางไหล มีเส้นใยสีขาวของเชื้อราบนรอยแผลเห็นเป็นสีชมพู แล้วลุกลามไปยังลำต้น ทำให้เปลือกแตก	*Corticium salmonicolor* Berk.	มิถุนายน-ธันวาคม ช่วงฝนตกชุก ความชื้นสูง ระบาดโดยสปอร์ปลิวไปตามลมและละอองฝน	-ไม่ปลูกพืชอาศัยของเชื้อราเป็นพืชแซม เช่น กาแฟ ขนุน ชา ส้ม และเงาะ -กำจัดวัชพืชเพื่อลดความชื้นในสวนยาง -ทาสารเคมีบริเวณที่เป็นโรค

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของโรค	ลักษณะอาการ	เชื้อราสาเหตุ	การแพร่ระบาด	การป้องกัน
โรคตายจากยอด (Die back)	กิ่งก้านหรือยอดตายจากปลายกิ่งหรือยอดเข้าหาส่วนโคนลุกลามถึงโคนต้นในที่สุดต้นจะยืนต้นตาย	*Botryodiplodia theobromae*	ตลอดปี เมื่อเกิดสภาวะแห้งแล้ง	แก้ปัญหาตามสภาวะที่เกิดขึ้น
โรครากขาว (White root rot disease)	เชื้อราทำลายบริเวณรากทำให้ไม่สามารถดูดซึมน้ำและอาหารไปเลี้ยง ลำต้น ใบจะเหี่ยวแล้วต้นจะยืนต้นตาย	*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz	ตลอดปี โดยเฉพาะมิถุนายน-ธันวาคม ช่วงฝนตกชุก ความชื้นสูง ระบาดโดยสัมผัสกับรากของพืชที่เป็นโรค	-ปลูกยางในที่ปลอดโรคโดยการขุดตอยางเก่าออก -ไม่ปลูกพืชอาศัยแซม เช่น กาแฟ ส้ม ชา ไผ่ และลองกอง -ขุดคูล้อมบริเวณต้นที่เป็นโรค
โรครากแดง (Red root rot disease)	เชื้อราทำลายบริเวณราก ซึ่งจะปกคลุมด้วยเส้นใยของเชื้อราสีน้ำตาลแดง ทำให้ไม่ดูดซึมน้ำและอาหารไปเลี้ยงลำต้น ใบจะเหลือง แล้วร่วง	*Ganoderma pseudoferreum* (Wakef) Over. & Steinm	มิถุนายน-ธันวาคม ช่วงฝนตกชุก ความชื้นสูงเชื้อราแพร่กระจายโดยการสัมผัสกับรากที่เป็นโรค และสปอร์จะติดไปกับแมลงที่เป็นพาหะ	ใช้สารเคมีเทลงในร่องโคนต้น ทำซ้ำทุก 6 เดือน

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของโรค	ลักษณะอาการ	เชื้อราสาเหตุ	การแพร่ระบาด	การป้องกัน
โรครากน้ำตาล (Brown root disease)	เชื้อราเข้าทำลายรากและโคนต้น จนไม่สามารถดูดซึมน้ำและอาหารไปเลี้ยงลำต้น ต่อมาใบจะเหลืองแล้วร่วง	*Phellinus noxius* (Corner) G.H. Gunn	มิถุนายน-ธันวาคม ช่วงฝนตกชุก ความชื้นสูงเชื้อราระบาด โดยสปอร์ถูกลมพัดไปตกบนรอยหักของลำต้นแล้วลุกลามไปยังโคนต้น	ใช้สารเคมีเทลงในร่องโคนต้น

1.2 เชื้อราไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora*)

มีการศึกษาเชื้อรา *Phytophthora* ครั้งแรกในปี ค.ศ.1876 โดย Anton De Bary เชื้อรานี้เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ (late blight) ในมันฝรั่ง ต่อมาในปี ค.ศ.1995 Hawksworth และคณะ ได้จำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อราไฟท็อปทอร่า ดังนี้

Kingdom : Chromista

Class : Oomycetes

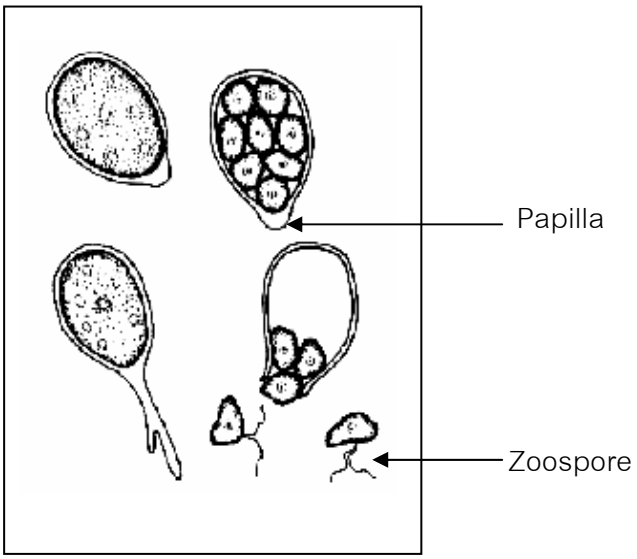
Order : Pythiales

Family : Pythiaceae

Genus : *Phytophthora*

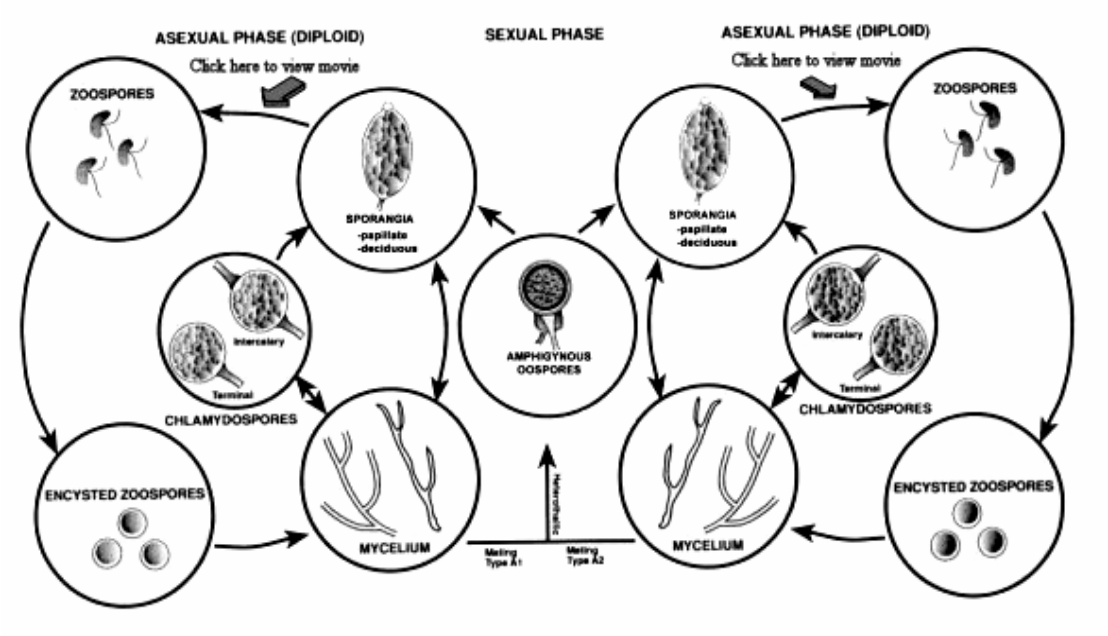
เชื้อราไฟท็อปทอร่า (*Phytophthora*) ในภาษากรีก แปลว่า ผู้ทำลายพืช จากการศึกษาและวิจัย พบว่า เชื้อราไฟท็อปทอร่าในปัจจุบันมีถึง 63 สปีชีส์ (Erwin and Ribeiro, 1996) มีทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำและดิน เป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้นตามขวาง ผนังเซลล์ประกอบด้วย cellulose-β-glucans จึงจัดอยู่ในอาณาจักรโครมิสตา (Chromista) เป็นพวกที่มีลักษณะรูปร่างและเจริญคล้ายรา (true fungi) อยู่ในกลุ่มโอโอไมซีส (Oomycetes) โดยเส้นใยเดี่ยวๆ (hypha) จะแตกกิ่งก้านเป็นกลุ่มเส้นใย (mycelium) สีขาวจนเป็นโคโลนี มีการสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจีโอฟอร์ (sporangiophore) ภายหลังที่เจริญเป็นสปอร์แรงเจียมแล้วสปอร์แรงจีโอฟอร์จะเจริญให้สปอร์แรงจีโอฟอร์ใหม่จากปลายอันเดิม และดันสปอร์แรงเจียมไปด้านข้างของสปอร์แรงจีโอฟอร์ โดยส่วนที่เป็นสปอร์แรงจีโอฟอร์นั้นจะมีลักษณะพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียมมีรูปร่างคล้ายไข่ไก่ตรงบริเวณฐานมีความกว้างกว่าส่วนบน ตรงปลายมีปุ่มซึ่งเป็นส่วนที่เปิดปล่อยให้ซูโอสปอร์ออกสู่ภายนอกทางด้านที่มีลักษณะเป็นปุ่ม (papilla) สามารถให้กำเนิดซูโอสปอร์ที่อุณหภูมิระหว่าง 12-15 °C และงอกลักษณะเป็นท่อ (germ tube) เข้าทำลายพืชได้โดยตรงที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 °C สำหรับโครงสร้างของซูโอสปอร์ (รูปที่ 2) เกิดจากการแบ่งตัวของโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ภายในสปอร์แรงเจียม เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ซูโอสปอร์มี 2 หาง หางหนึ่งเป็นลักษณะ tinsel ซึ่งมีขนอ่อนเป็นจำนวนมาก ที่ทำหน้าที่โบกให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้า อีกหางหนึ่งเป็นแส้หรือ whiplash ทำหน้าที่โบกถอยหลัง (Desjardin *et al*., 1969) เมื่อซูโอสปอร์ถูกปล่อยออกจากสปอร์แรงเจียมและว่ายน้ำได้ระยะหนึ่งก็จะหยุดการเคลื่อนไหว ปลดหางแล้วจึงเข้าเกราะ (encystment) ซึ่งจะเกิดขึ้นโดยการกระตุ้นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และการสั่นสะเทือน

หลังจากนี้ก็จะงอกเป็น germ tube โดยการสร้างเส้นใยเจริญและสร้างซูโอสปอร์ขึ้นได้อีก ซึ่งสามารถกระตุ้นการงอกของซูโอสปอร์ด้วยการเพิ่มออกซิเจน (O_2) ให้มากขึ้น



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora*
(ที่มา : http://www.tactri.gov.tw/htdocs/m//ee/phytophthora.html)

เชื้อราไฟท็อปทอร่า มีการขยายพันธุ์ทั้งแบบใช้เพศและไม่อาศัยเพศ การขยายพันธุ์แบบใช้เพศ เชื้อราสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male hypha) ซึ่งจะเจริญเป็นแอนเทอริเดียม (antheridium) ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (female hypha) จะเจริญเป็นโอโอโกเนียม (oogonium) ซึ่งมีรูปร่างกลม (globose) การผสมกันของนิวเคลียสของทั้งสองเพศจะเกิดภายในโอโอโกเนียม และให้กำเนิด oospore ซึ่งจะงอกเป็น germ tube และจะเจริญเป็นเส้นใยหรือเจริญเป็นสปอร์แรงเจียมต่อไป ส่วนแบบไม่อาศัยเพศสร้างซูโอสปอร์ในสปอร์แรงเจียมเรียกว่า zoosporangium ซึ่งเชื้อรา *P. palmivora* มีสปอร์ 2 ชนิด คือ ซูโอสปอร์ (zoospore) และคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) สปอร์ชนิดหลังเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ทำให้เกิดสปอร์ที่มีผนังหนาตรงปลายเส้นใยหรือระหว่างเส้นใยที่เชื่อมถึงกัน ความหนาของผนัง chlamydospore ประมาณ 4 ไมโครเมตร มีผิวเรียบ โปร่งแสง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 14-16 ไมโครเมตร (ดูวงจรชีวิตของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ในรูปที่ 3)

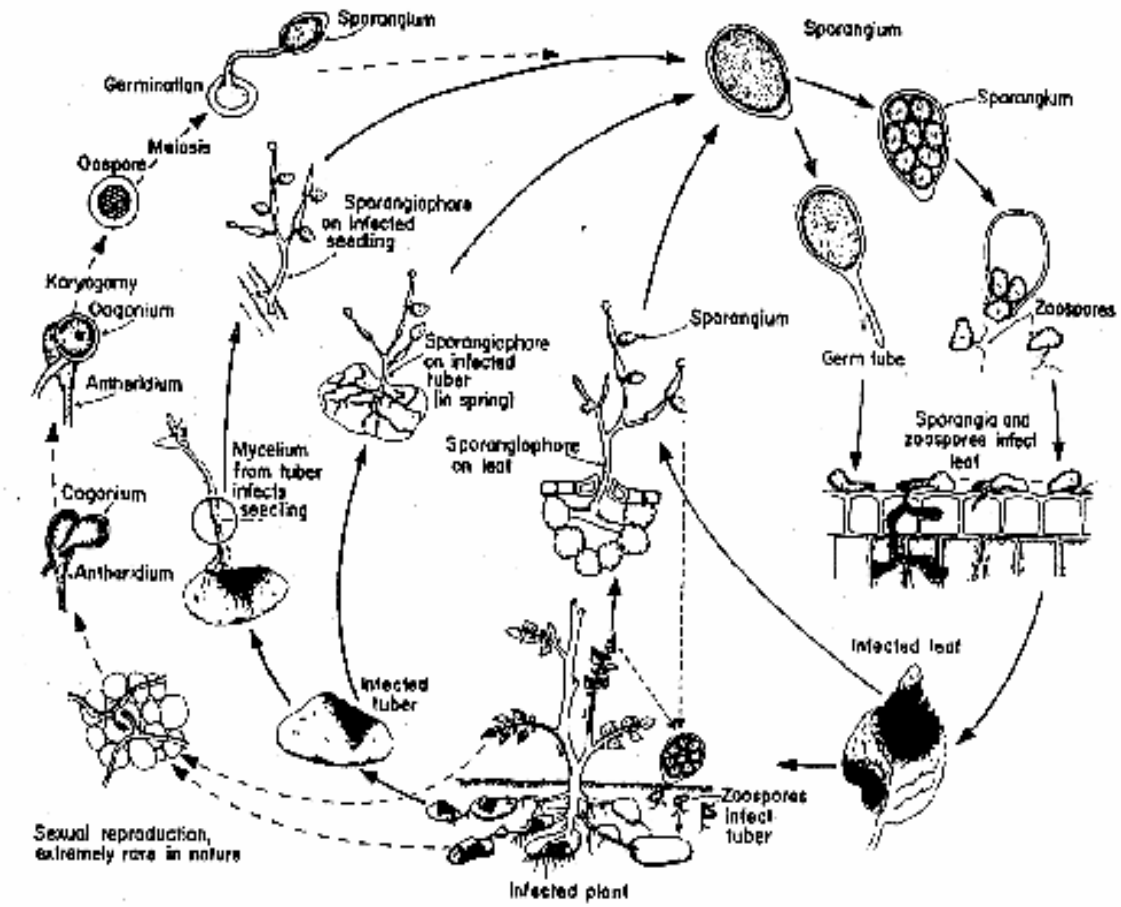


รูปที่ 3 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Phytophthora* spp.

(ที่มา : http://www.gebhardt.com.au/durian/phytophthora.html)

Phytophthora spp. เป็นเชื้อราสาเหตุทำให้เกิดโรคกับกล้าพืชหลายชนิด เช่น ผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ พืชล้มลุกต่างๆ รวมทั้งไม้ยืนต้น ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าที่ราก ลำต้นและหัว เช่น *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่า โคนเน่าของทุเรียน *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่าของส้มและยอดเน่าของสับปะรด *P. botryose* สาเหตุโรคใบร่วงของยางพารา *P. infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ *Phytophthora fragariae* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของสตรอเบอรี่

โรคใบไหม้ (late blight) ของมันฝรั่งและมะเขือเทศเกิดจากเชื้อรา *P. intestans* โดยเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ในเซลล์พืชและอยู่ระหว่างเซลล์พืชซึ่งจะแทง haustorium เข้าไปในเซลล์พืช อาการของโรคในผลมะเขือเทศจะปรากฏเป็นแผลสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมันฝรั่งจะปรากฏจุดสีม่วงเข้มหรือสีน้ำตาล เชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูในลักษณะที่เป็นเส้นใยติดมากับหัวมันฝรั่งและจะเจริญเข้าไปในหัว ตาและหน่อของมันฝรั่ง เมื่อนำไปขยายพันธุ์ ราจะเจริญเข้าสู่ลำต้นและส่วนต่างๆ ที่อยู่เหนือดิน จากนั้นจะเกิดสปอร์แรงจีโอฟอร์แทงออกมาทาง stomata ของใบและลำต้น สปอร์แรงเจียมที่ปลายเมื่อแก่เต็มที่จะหลุดไปกับฝน เมื่อตกลงบนใบหรือต้นที่มีน้ำพอสมควร ก็จะงอกเข้าไปทำลายทำให้เกิดโรค ถ้าเป็นโรครุนแรงต้นจะตาย ทำให้ผลผลิตของหัวมันฝรั่งลดลง ดังวงจรโรคนี้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4 วงจรโรคใบไหม้ของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestans*
(ที่มา : http://www.cesperi.it/art/phyto.html)

เชื้อราไฟท็อปทอร่า สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารามีอยู่หลายชนิด ได้แก่ *P. palmivora P. botryosa Phytophthora hevea Phytophthora meadii* และ *P. parasitica* ในประเทศไทยพบว่าสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารามี 3 ชนิด คือ *P. palmivora P. botryosa* และ *Phytophthora nicotianae* โดยเชื้อรา *P. palmivora* มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก มีพืชอาศัยที่สามารถทำลายได้มากกว่า 138 ชนิด (Chee, 1968) เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้บนดิน น้ำและอากาศ ทำลายพืชได้ทั้งส่วนราก ลำต้น กิ่ง ใบและผลของโกโก้ กล้วยไม้ ทุเรียน ยางพารา พริกไทย มันสำปะหลัง มะเขือเทศและยาสูบ เป็นต้น โดยเชื้อรานี้จะอาศัยอยู่ข้ามฤดูปลูกบนเศษซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรียวัตถุในดินหรือบนพืชอาศัยบางชนิด

1.4 กลไกการป้องกันโรคของพืช

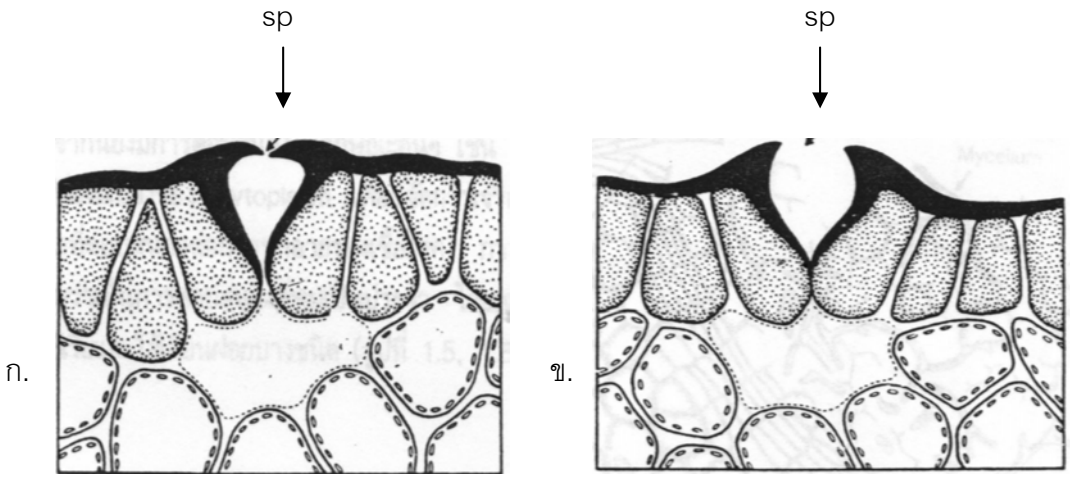
พืชชนิดหนึ่งๆ มีศัตรูมากมาย อาจเกิดโรคหลายโรคในเวลาเดียวกัน จึงมีกลไกในการป้องกันโรคหลายอย่างสำหรับต่อต้านการจู่โจมของเชื้อโรค ปฏิกิริยาโต้ตอบของพืชที่มีต่อเชื้อโรคอาจจะขึ้นกับชนิดของเชื้อโรคและสิ่งแวดล้อม หากสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของพืช แต่ไม่เหมาะต่อการเจริญของโรค พืชสามารถรอดพ้นจากการทำลายของเชื้อโรคได้ ในทางตรงกันข้าม หากสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโรค แต่ไม่เหมาะสมต่อพืช เชื้อโรคก็จะเจริญเติบโตและเข้าทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว

การป้องกันโรคของพืช อาจจะเกิดจากลักษณะโครงสร้างของพืชเองหรือปฏิกิริยาทางชีวเคมีในเซลล์และเนื้อเยื่อพืช โดยการสร้างสารซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อโรคหรือไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งมี 2 ลักษณะดังนี้

1.4.1 การป้องกันของพืชทางโครงสร้าง (structural defense)

กลไกการป้องกันตนเองของพืชมีโครงสร้างต่างๆ หลายขั้น โดยขั้นแรกที่เชื้อจะเข้าสู่พืช คือ ทางผิวของพืช เมื่อเชื้อเข้าไปแล้วจะเจริญเติบโตทำลายพืช โดยอาจจะทำลายที่ใดที่หนึ่งเฉพาะบริเวณที่มันเข้าไป (localized infection) หรือไปเจริญในท่อน้ำท่ออาหาร (vascular bundle) แล้วทำให้อาการของพืชไปแสดงที่อื่นด้วย (systemic infection) ลักษณะของการทำลายต่างๆ ที่เป็นผลจากเชื้อโรคซึ่งพืชมีโครงสร้างที่ใช้ป้องกัน (structural defense) ทั้งที่เกิดขึ้นก่อนหรือหลังการติดเชื้อ

1.4.1.1 โครงสร้างป้องกันก่อนเชื้อโรคเข้าทำลายพืช (preexisting defense structure) โครงสร้างส่วนแรกของพืชที่เป็นเกราะป้องกันการเจาะผ่านของเชื้อ คือ ผิว ซึ่งประกอบด้วย ไข (wax) ที่คลุมผิวพืช ขนของพืช ความหนาของ cuticle ซึ่งทั้งหมดนี้ช่วยในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค นอกจากนี้ความหนา (thickness) และความเหนียว (toughness) ของเซลล์ผิวของพืชก็เป็นปัจจัยในการทำให้พืชต้านทานโรค ช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ (stomata) ซึ่งเป็นช่องที่พืชใช้คายน้ำ เชื้อโรคก็สามารถผ่านเข้าไปได้ พืชบางชนิดที่ต้านทานโรคก็เพราะมีปากใบแคบและมีขอบยกสูงหนา เช่น ในส้มแมนดารินพันธุ์ Szinkum ซึ่งต้านทานต่อโรคแคงเคอร์ (canker) (ดังรูปที่ 5) นอกจากนี้ระยะเวลาปิดเปิดของปากใบมีส่วนในการทำให้พืชต้านทานโรคได้ เช่น ข้าวสาลีพันธุ์ต้านทานบางพันธุ์ ปากใบจะเปิดสายมาก ทำให้สปอร์ที่อยู่ในหยดน้ำใกล้ปากใบซึ่งงอกตั้งแต่เช้าถูกแดดเผาตายก่อนปากใบจะเปิด ทำให้น้ำหรือเชื้อที่แขวนลอยอยู่ในน้ำไม่สามารถเข้าไปได้



รูปที่ 5 ลักษณะของ stomata ของส้มแมนดาริน (Szinkum)

ก. ลักษณะที่ต้านทานต่อโรคแคงเคอร์

ข. แสดงพันธุ์อ่อนแอ

sp = ช่องเปิดของ stomata

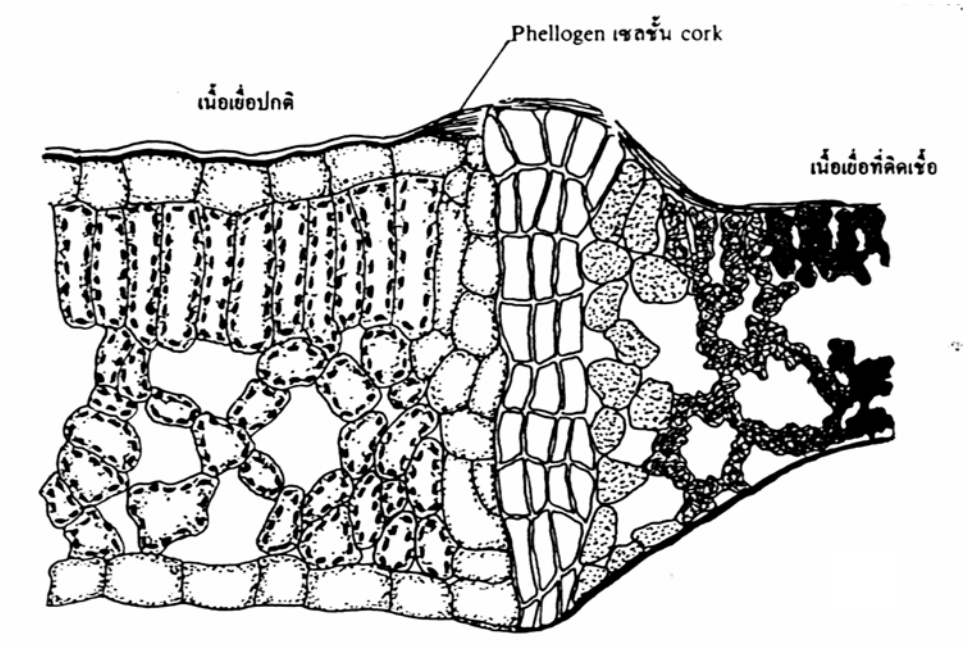
(ที่มา : Agrios, 1972)

1.4.1.2 **โครงสร้างป้องกันโรคหลังเชื้อเข้าสู่พืช** (defense structure formed after infection) สิ่งที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตนเองและการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค มีหลายวิธีดังนี้

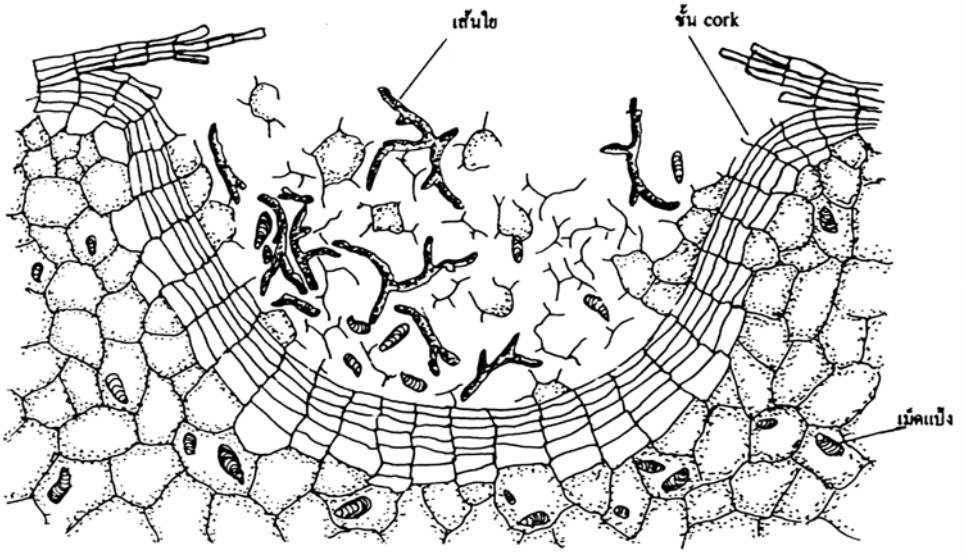
1.4.1.2.1 **การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อ** (histological defense structures)

ก. เนื้อเยื่อประกอบด้วยเซลล์เจริญเป็นชั้น (cork layers) การเจริญเป็นชั้นของเซลล์มักเกิดหลายๆ ชั้นเรียงซ้อนกัน เนื่องจากเซลล์บริเวณข้างเคียงที่ติดเชื้อได้รับการกระตุ้นจากสารที่เชื้อขับออกมา ชั้นที่เกิดขึ้นนี้ช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อและสารพิษที่เชื้อขับออกมาขยายวงกว้างออกไป และยังระงับการไหลเวียนของน้ำและอาหารจากเนื้อเยื่อปกติไปยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ทำให้เชื้อและเนื้อเยื่อพืชตาย และอยู่ในขอบเขตของแผลที่เห็นเป็นจุด หรือพองนูนแยกส่วนออกมาจากเนื้อเยื่อ (รูปที่ 6)

ก.



ข.



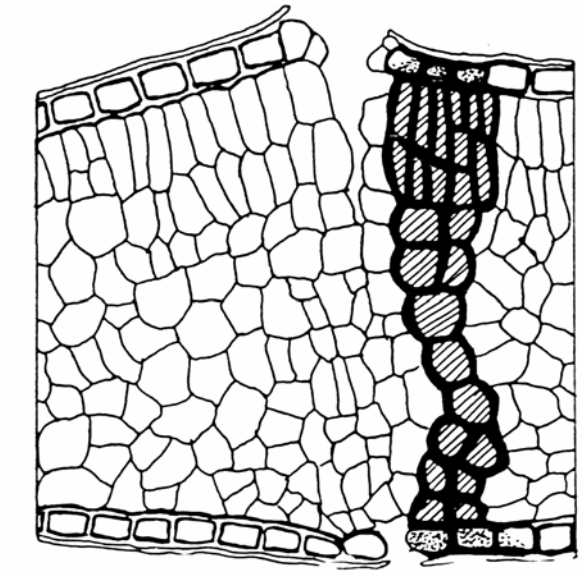
รูปที่ 6 การสร้าง cork layer กั้นระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรคหลังติดเชื้อรา *Rhizoctonia* spp.

ก. ใบมันฝรั่ง

ข. หัวมันฝรั่ง

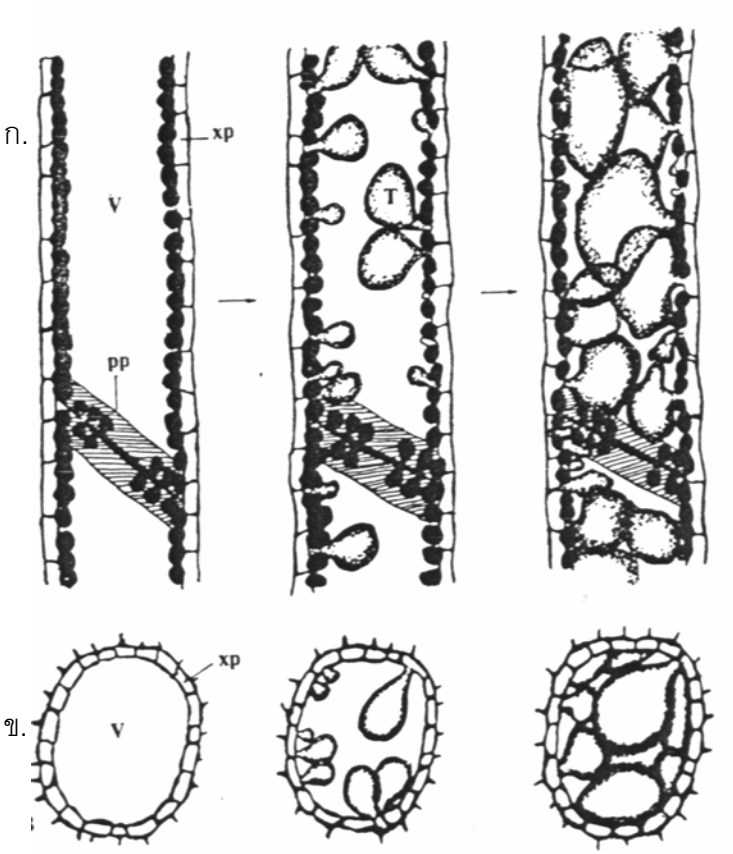
(ที่มา : Agrios, 1972)

ข. เนื้อเยื่อแตกปริออก (abscission region) การแตกปริของเนื้อเยื่อ เป็นช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เป็นชั้นทั้งสองข้างรอบบริเวณติดเชื้อของเนื้อเยื่อพืช (protective layers) เกิดกับใบอ่อนของไม้ผลบางชนิด โดย middle lamella ของเซลล์ที่อยู่ระหว่างชั้นทั้งสองนั้น ถูกย่อยตลอดตามความหนาของใบทำให้เนื้อเยื่อส่วนดีถูกตัดขาดออกจากบริเวณตัวเชื้อหรือแผลของพืชที่เป็นโรค ป้องกันโรคไม่ให้เชื้อโรคและสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นลุกลามไปยังเนื้อเยื่อปกติ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 การสร้าง abscission layer รอบๆ จุดที่เกิดการติดเชื้อบนใบพืช
(ที่มา : Agrios, 1972)

ค. การเกิด tylose ในท่อไซเลม (tylosis) การเกิด tylose เป็นการเจริญของโปรโตพลาสซึมของเซลล์ parenchyma ที่อยู่ติดกับท่อไซเลม มีขนาดใหญ่และจำนวนมาก จนทำให้ท่ออุดตัน โดยเกิดในระหว่างที่เชื้อโรคเข้าทำลายทางกลุ่มท่อลำเลียงเป็นส่วนมาก พืชพันธุ์ต้านทานต่อโรคจะเกิด tylose ได้มากและรวดเร็วก่อนที่เชื้อจะลุกลามไปถึง โดยเชื้อยังเจริญอยู่แค่ส่วนราก หากเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค เชื้อจะเจริญไปถึงก่อน แล้วจึงเกิด tylose ภายหลัง ทำให้ไม่สามารถกีดกั้นการลุกลามของเชื้อได้ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 การเจริญของ tylose ใน xylem vessels

ก. ภาพตามยาว ข. ภาพตัดตามขวาง

ภาพซ้ายสุดแสดงให้เห็นลักษณะที่มีในพืชปกติ กลางและขวาแสดง vessels ที่มี tyloses ภาพขวาสุด แสดง vessels ที่มี tyloses เจริญเต็มท่อ

v = ท่อ xylem, xp = xylem parenchyma cell, T = tylose, pp = ผนังกั้น

(ที่มา : Agrios, 1972)

ง. การสะสมยางเหนียว (gum) ของเนื้อเยื่อ พืชสร้างยางเหนียวขึ้นรอบบริเวณแผลที่เกิดจากเชื้อโรคหรือจากสาเหตุอื่นๆ โดยยางจะถูกสะสมอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์หรือภายในเซลล์ โดยการสะสมของยางจะเกิดอย่างรวดเร็วรอบบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย ทำให้เชื้อบางชนิดชะงักการเจริญเติบโต ไม่สามารถขยายขอบเขตออกไปได้อีก เชื้อจะถูกจำกัดอยู่เฉพาะในแผล ซึ่งอัตราการสะสมของยางมีแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดและพันธุ์พืช

1.4.2 **การป้องกันเกิดจากโครงสร้างของเซลล์** (cellular defense structure)

โครงสร้างป้องกันของเซลล์ ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์เมื่อถูกเชื้อเข้าทำลาย กลไกที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคแบบนี้มีขอบเขตจำกัด เท่าที่พบในโรคที่เกิดจากเชื้อรามี 2 แบบ คือ เกิดจากการโป่งออกของเซลล์ epidermis และเซลล์ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis ในระหว่างที่เชื้อแทงผ่านพืชโดยตรง ซึ่งอาจยับยั้งการแทงผ่านและการตั้งรกรากของเชื้อได้

1.4.3 **การป้องกันเกิดจากปฏิกิริยาของไซโตพลาสซึมของเซลล์** (cytoplasmic defense reaction)

ไซโตพลาสซึมไปปกคลุมกลุ่มของเส้นใย โดยนิวเคลียสของพืชจะเคลื่อนตามไปด้วย แล้วโปรโตพลาสซึมของเซลล์จะเริ่มหายไปในขณะที่เส้นใยของเชื้อเจริญเพิ่มขึ้น บางครั้งเซลล์ที่เชื้อเข้าทำลายจะสังเกตเห็นไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้น ไซโตพลาสซึมจะกลายเป็นเม็ดเด่นชัด เส้นใยของเชื้อสลายตัวเห็นเป็นส่วนๆ แล้วการเข้าทำลายก็หยุดลงในที่สุด

1.4.4 **การเกิด** hypersensitive reaction

Hypersensitivity เป็นปฏิกิริยาตอบสนองของกลไกการป้องกันโรคที่สำคัญ แสดงถึงความต้านทานโรคของพืช ในระหว่างการแทงผ่านของเชื้อโรคหรือถูกบุกรุกโดยสารพิษต่างๆ ที่บริเวณผิวเซลล์ ปฏิกิริยายังไม่เห็นทั้งในพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ แต่เมื่อพืชติดเชื้อแล้ว เซลล์พืชอาศัย (host plant) ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานจะเกิดรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis) อาจเป็นแบบแห้งหรือมีแผลเป็นหย่อมๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดจากการตายอย่างรวดเร็วหลังจากเชื้อเข้าเซลล์ พบมากในโรคที่เกิดจากเชื้อปรสิตถาวร ทำให้เชื้อโรคในเนื้อเยื่อไม่ได้รับสารอาหารจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งเป็นวิถีทางเดียวที่เชื้อใช้เพื่อการเจริญเติบโตและทวีจำนวนเชื้อ ดังนั้นเชื้อจะชะงักการเจริญเติบ โตและตายในที่สุด อาการของรอยไหม้พบโดยทั่วไปตามบริเวณส่วนของพืชที่เป็นโรค ได้แก่ ใบ ต้น โคนต้น ราก หัว ฝัก ผล เป็นต้น ขนาดของโรคจะมีขอบเขตกว้างหรือแคบขึ้นอยู่กับส่วนของพืช ชนิดของพืชอาศัย เชื้อโรคที่บุกรุก สภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมต่างๆ อาการของรอยไหม้ที่พบโดยทั่วไป เช่น แผลเป็นจุด (spot) มักเกิดบนใบหรือผล มีขนาดแผลประมาณ 1 หรือ 2 มิลลิเมตร จนถึง 1 เซนติเมตร ขึ้นไป มีรูปร่างเป็นวงกลม เนื้อเยื่อตรงกลางแผลจะตายเห็นรอบๆ แผลเป็นสีแดงหรือสีเหลือง (ไพโรจน์ จ่วงพานิช, 2525) เช่น โรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ของมะม่วง พริก ยาสูบ ซึ่งแผลมีลักษณะจุดขนาดเล็กหรือใหญ่ สีดำ แผลบุ๋มเล็กน้อยและขอบแผลนูน ที่ใบและผล ในพืชบางชนิดอาจมีอาการแบบ die back คือ อาการตายจากส่วนยอดลงมายังโคน โรคใบจุดและใบไหม้ (alternaria diseases) เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* พบในพืช ผักและไม้ดอกไม้ประดับ เช่น มันฝรั่ง คะน้า กะหล่ำต่างๆ ดอกบานชื่น

เบญจมาศ และไม้ผลบางชนิด เช่น ส้ม มะนาว ลักษณะรอยไหม้เป็นจุดสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลจะขยายใหญ่ขึ้น โดยจะเกิดจากใบล่างก่อนแล้วลามสู่ยอด ใบที่เป็นโรคจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและร่วงในที่สุด ถ้าเกิดแผลที่ลำต้นของกล้าพืชอาจเกิดอาการ canker คือ เกิดสเก็ดบนเนื้อเยื่อเปลือกของลำต้น ในกรณีของไม้ใหญ่จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้น หด ตาย ต่อมาแผลจะแตก ในปี พ.ศ. 2527 ประเทศไทยประสบปัญหาโรคฝ้าย มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *P. nicotianae* var. *parasitica* ทำให้เกิดโรคสมอดำฝ้าย โรคนี้มีอาการเป็นจุดและทางสีดำบนเปลือกและร่องกาบสมอ ทำให้สมอเน่า หรือบางโรคอาจจะมีลักษณะเป็นรอยขีด (streak) ตามความยาวของใบ เส้นใบและลำต้นหรือไม่อาจมีลักษณะรอยไหม้เป็นจุดกลมและเป็นลายก้างปลาบนใบอ่อน และใบแก่เพราะเกิดการลุกลามไปตามเส้นใบ เป็นอาการของโรคใบจุดก้างปลา (corynespora leaf disease) ที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (สถาบันวิจัยยาง, 2544)

Breton และคณะ (1997) ได้บ่มใบยางพาราด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* พบว่า หลัง 24 ชั่วโมง เชื้อรานี้ทำให้เกิดรอยไหม้สีน้ำตาลบนใบยาง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างใบยางพันธุ์ต้านทาน (GT1) กับพันธุ์อ่อนแอ (PB260) โดยขนาดรอยไหม้บนใบยางพันธุ์ต้านทานมีลักษณะเป็นจุด แสดงถึงการเกิด hypersensitive reaction ซึ่งตรงกันข้ามกับขนาดรอยไหม้ในใบพันธุ์อ่อนแอ ที่พบแผลสีน้ำตาลขนาดใหญ่ และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ขนาดรอยไหม้ก็แผ่ขยายลุกลามออกไป จนเกิดเป็นรอยด่าง (discolor) บริเวณเส้นใบที่อยู่รอบบาดแผล ซึ่งแสดงถึงการเกิดโรคก้างปลา (fish bone) ใบยางพันธุ์ต้านทานสามารถกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียง ส่วนพันธุ์อ่อนแอพบขนาดรอยไหม้ใหญ่และแผ่กว้าง แสดงถึงการเกิดโรค คือ เกิดปฏิกิริยา compatible ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อนแอ ส่วนปฏิกิริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์ต้านทาน เรียกว่า ปฏิกิริยา incompatible แต่ถ้ามีการเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อโรค ปฏิกิริยานี้ก็สามารถเปลี่ยนเป็น compatible ได้เช่นกัน ดังนั้นลักษณะของรอยไหม้ที่เกิดจากการตอบสนองของใบยางต่อเชื้อ ก่อโรคสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ เช่น การศึกษาการตอบสนองของใบยางพาราต่อเชื้อรา *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasarn, 2001) มีขนาดรอยไหม้ระหว่างพันธุ์ต้านทาน พันธ์ปานกลางและพันธุ์อ่อนแอแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนารถธิดา รอดโพธิ์ทอง (2546) ที่แสดงให้เห็นว่า ขนาดรอยไหม้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* บนใบยางพาราทั้ง 17 พันธุ์ พบว่า ขนาดรอยไหม้ ซึ่งเกิดขึ้นจากการเจาะใบยางด้วยเชื้อรานี้ มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน สามารถคัดแยกได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ต้านทานที่เห็นขนาดรอยไหม้เล็กบาดแผลมีขอบเขตชัดเจน แสดงว่าเซลล์ของใบยางพาราในกลุ่มนี้มีความสามารถในการกัก

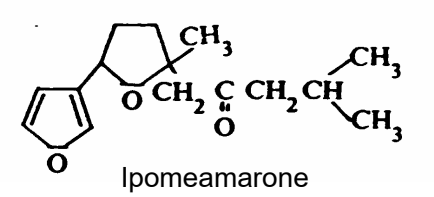
บริเวณของเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ กลุ่มพันธุ์ต้านทานปานกลางมีขนาดรอยไหม้ใหญ่กว่าในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน แต่มีขนาดเล็กกว่าในกลุ่มพันธุ์อ่อนแอที่มีขนาดรอยไหม้แผ่กว้างออกไปอย่างรวดเร็ว แสดงถึงความล้มเหลวของใบในการกักเชื้อโรคไว้

1.4.5 **การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน** (phytoalexin synthesis)

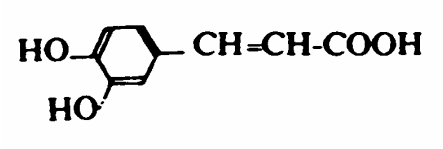
ไฟโตอเล็กซินเป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้นหลังจากเชื้อเข้าทำลายแล้ว และมีพิษต่อเชื้อโรค (antimicrobial) จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ มีมวลโมเลกุลต่ำ และมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ พบในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อโรคหรือถูกกระตุ้นจากอิลิซิเตอร์ต่างๆ ทั้งไบโอติก (biotic) และอไบโอติก (abiotic) ไฟโตอเล็กซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช แต่ไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง ปฏิกิริยานี้เกิดในเนื้อเยื่อที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อโรค และเนื้อเยื่อของเซลล์ข้างเคียง อัตราการเกิดไฟโตอเล็กซินขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และกำเนิดในเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น (ไพโรจน์ จ๋วงพานิช, 2525) เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรค กระตุ้นให้พืชสร้างไฟโตอเล็กซินได้ในอัตราความเข้มข้นต่ำกว่าเชื้อที่ไม่ได้เป็นสาเหตุโรค ไฟโตอเล็กซินที่พืชอาศัยสร้างจะมีพิษต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนั้นน้อยกว่าเชื้อราอื่นๆ ที่ไม่ใช่สาเหตุโรค เช่น จากการศึกษาการสะสมไฟโตอเล็กซิน บริเวณ epidermis ของใบถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา *Botrytis fabae* ที่ก่อให้เกิดโรคกับเชื้อราที่ไม่ใช่สาเหตุโรค คือ *Botrytis cinerea* พบว่าถ้าเป็นเชื้อที่ก่อโรค เส้นใยของเชื้อราจะเจาะผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ได้เร็ว และเกิดการตายของเซลล์พืชก่อนที่จะมีการสะสมไฟโตอเล็กซินได้มากพอ เพื่อใช้ในการต้านทาน แต่เชื้อราที่ไม่ได้ทำให้เกิดโรคถูกหยุดการเจริญเติบโตทันที เพราะมีการสะสมไฟโตอเล็กซินจำนวนมาก (Darvill and Albersheim, 1984)

การศึกษาในปัจจุบันได้ให้ความสนใจว่าไฟโตอเล็กซิน ก่อให้เกิดการต้านทานโรค (disease-resistance) และส่วนมากเป็นสารประกอบพวกฟีนอลิก ดังนั้นในพืชแต่ละชนิดจะมีการผลิตชนิดของไฟโตอเล็กซินที่แตกต่างกันออกไป มีมากกว่า 350 แบบ จากพืชกว่า 100 ชนิด พบมากในพืชวงศ์ *Leguminosae, Solanaceae, Malvaceae, Rosaceae, Convolvulaceae, Umbelliferae* และ *Compositae* แต่ไม่พบในพืชที่อยู่ในวงศ์ *Gramineae* และ *Cucurbitaceae* สามารถแยกจากลำต้น ราก ใบและผล ซึ่งแต่ละส่วนของพืชจะมีการสร้างไฟโตอเล็กซินได้ทั้งแบบเดียวหรือมากกว่า 1 แบบ เช่น ipomeamarone, caffeic acid, umbelliferone และ scopoletin จากมันเทศ orchinol, hircinol และ loroglossol จากกล้วยไม้ต่างๆ phloretin จากแอปเปิล rishitin จากมันฝรั่ง เป็นต้น (รูปที่ 9) (ไพโรจน์ จ๋วงพานิช, 2525)

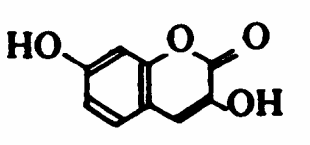
จากมันเทศ



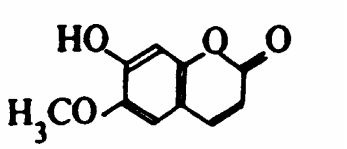
Ipomeamarone



Caffeic acid

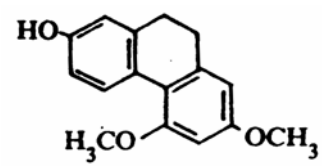


Umbelliferone

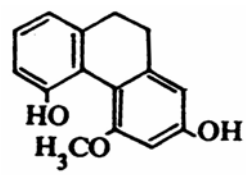


Scopoletin

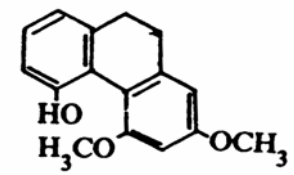
จากกล้วยไม้ต่าง ๆ



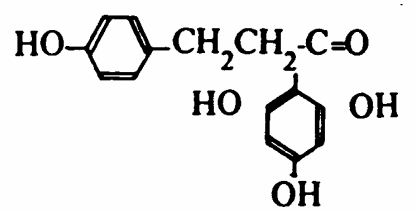
Orchinol



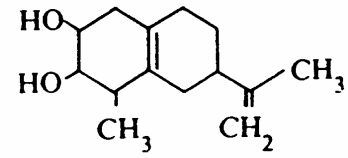
Hircinol



Loroglossol



Phloretin **จากแอปเปิล**



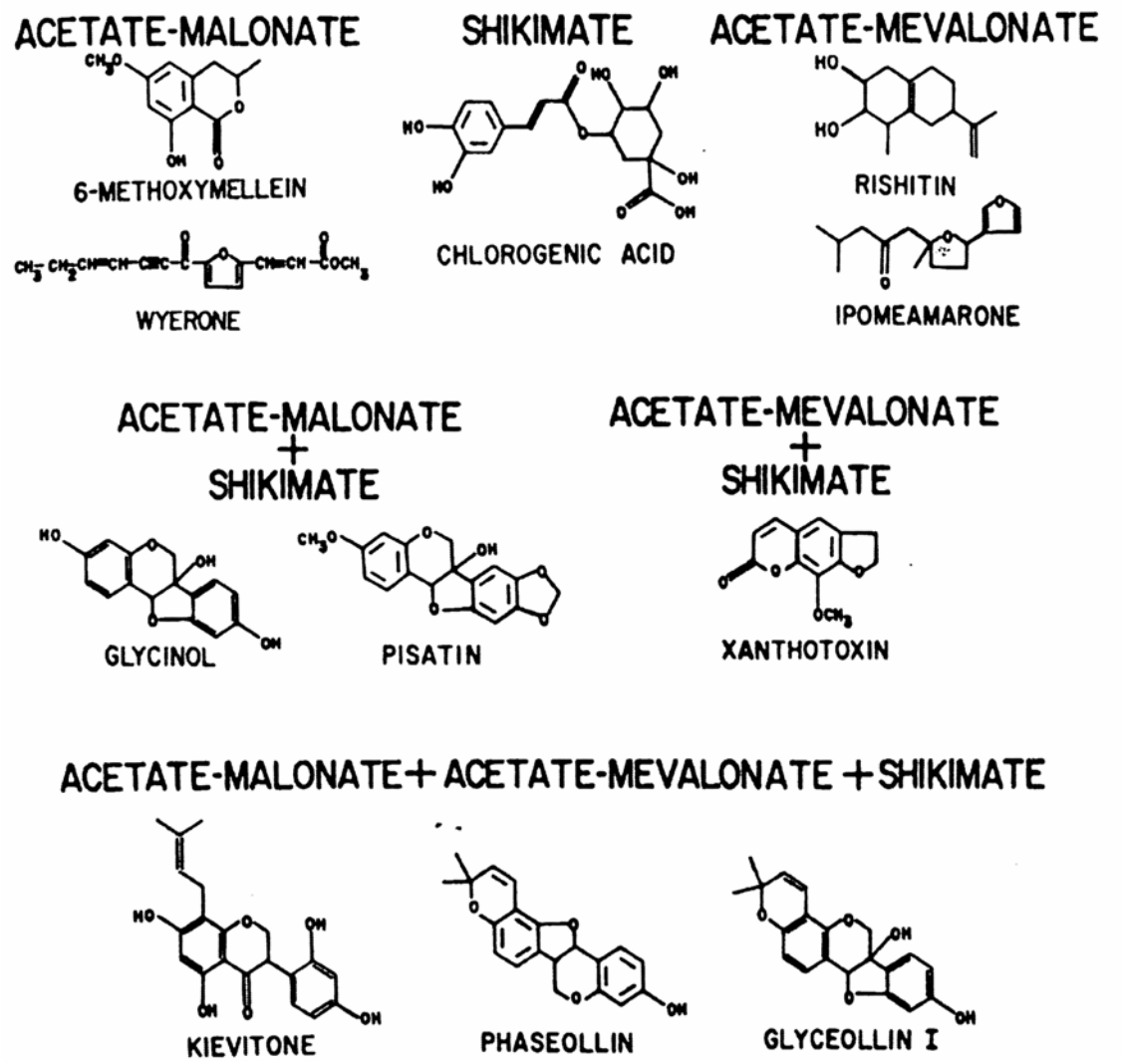
Rishitin **จากมันฝรั่ง**

รูปที่ 9 ตัวอย่างโครงสร้างของไฟโตอเล็กซินที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา

(ที่มา : ดัดแปลงจากไพโรจน์ จ่วงพานิช, 2525)

ในยางพารามีการศึกษากลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคเป็นครั้งแรกโดย Tan และ Low (1975) พบว่าหลังจากใบยางติดเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* จะมีการสะสมสารเรืองแสงสีน้ำเงิน (สารเดิมไม่มีสี) ต่อมาก็ได้มีการศึกษาเพิ่มเติม โดยนำใบยางพารามาบ่มด้วยเชื้อรา *Microcyclus ulei* พบว่าสารเรืองแสงดังกล่าวคือ hydroxyl coumarin และให้ชื่อว่าสคอพอลิติน (scopoletin) (Giesemann *et al*., 1986) ซึ่งการสะสมสคอพอลิตินจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Garcia *et al*., 1995b) แต่ใบยางที่ติดเชื้อรา *Corynespora cassiicola* สามารถวัดความเข้มข้นของสคอพอลิตินในใบยางพันธุ์อ่อนแอมีปริมาณสูงกว่าในพันธุ์ต้านทาน (Breton *et al*., 1997) ซึ่งตรงกันข้ามกับเชื้อก่อโรคในยางพาราตัวอื่นๆ เช่น เชื้อรา *P. palmivora* ที่เหนี่ยวนำให้ผลิตสคอพอลิตินในใบยางพารา 4 พันธุ์ แล้วสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ นั่นคือ พันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ PB235 (พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน) ผลิตสคอพอลิตินได้สูงกว่าพันธุ์ RRIT251 (พันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ) และพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) (Churngchow and Rattarasarn., 2001) เช่นเดียวกับการใช้อิลิซิเตอร์ (อิลิซิติน) ของเชื้อรานี้ที่สามารถกระตุ้นทั้งแคลลัสเมล็ดอ่อนและข้อปล้อง ให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินในพันธุ์ต้านทาน (GT1) มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และอัตราเร็วในการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ (พันธุ์วศรี แสงสุวรรณ, 2547) ซึ่งสอดคล้องกับการบ่มใบยางด้วยเชื้อรา *P. botryosa* ที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา พบว่า การสังเคราะห์สคอพอลิติน มีปริมาณและอัตราเร็วแปรผันตามความต้านทานโรคของใบยาง คือ พันธุ์ BPM-24 สูงกว่า พันธุ์ RRIM600 (นิลุบล บุญหวังช่วย, 2545)

วิถีการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน (biosynthesis pathway) ในพืชทุกชนิดอาศัยวิถีของ shikimate, acetate-malonate และ acetate-mevalonate ซึ่งเป็นวิถีเมแทบอลิซึมแบบทุติยภูมิ (secondary metabolic pathway) โดยวิถี shikimate ถูกนำไปสังเคราะห์ chlorogenic acid วิถี acetate-malonate ถูกนำไปสังเคราะห์ 6-methoxymellein และ wyerone ส่วนวิถี acetate-mevalonate ถูกนำไปสังเคราะห์ rishitin และ ipomeamarone สำหรับไฟโตอเล็กซินบางชนิดต้องอาศัยวิถีการสังเคราะห์ร่วมกันสองถึงสามวิถี acetate-malonate, acetate-mevalonate และ shikimate วิถีทั้งสามทำให้เกิดการสังเคราะห์ kievitone, phaseollin และ glyceollin I เป็นต้น (รูปที่ 10) (Kuc', 1995)



รูปที่ 10 ตัวอย่างวิถีที่นำไปสู่การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน
(ที่มา : Kuc', 1995)

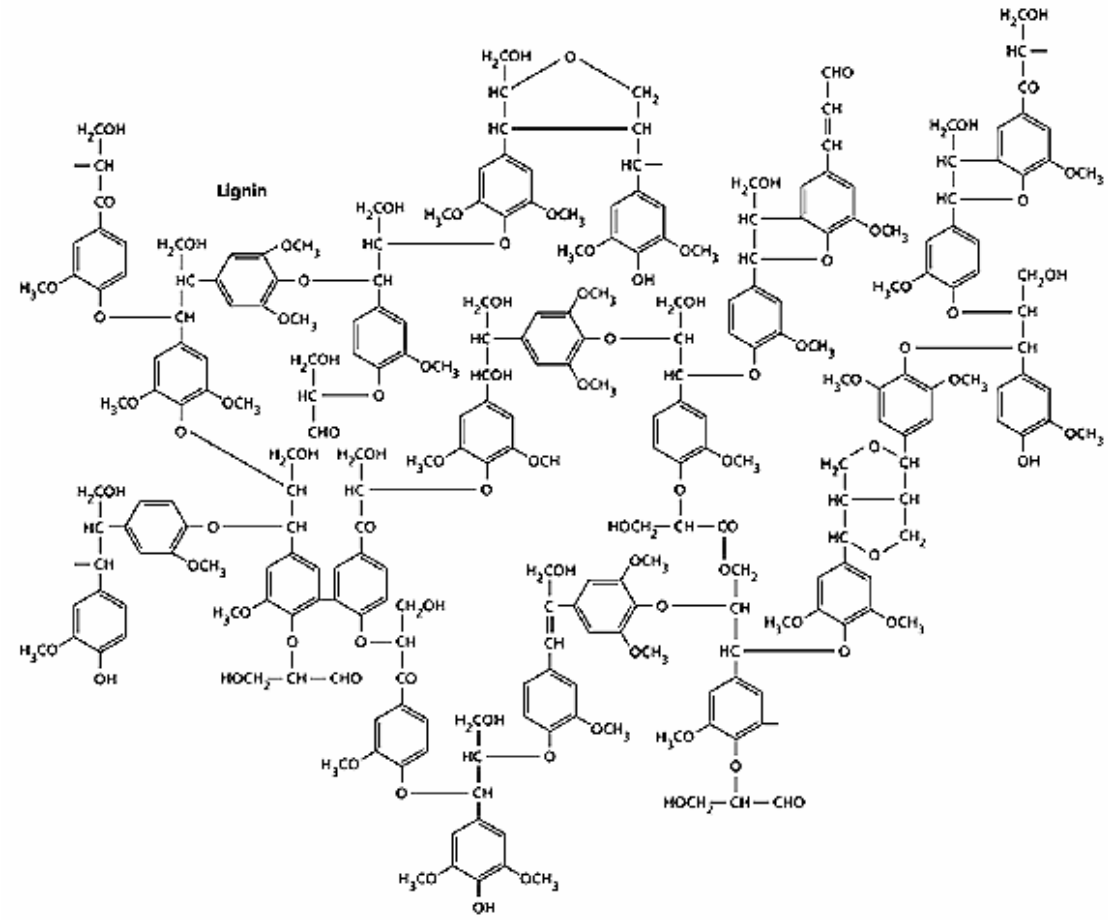
1.4.6 **การสังเคราะห์ลิกนิน** (Lignification)

ผนังเซลล์พืชประกอบด้วยมหโมเลกุลประเภทคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด เช่น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเพคติน (pectin) นอกจากนี้ยังมีลิกนิน (lignin) ซึ่งมีลักษณะเป็นอะโรมาติก (aromatic) ที่มีหน่วย phenylpropane เชื่อมต่อกันเป็นแพหลายหน่วยอย่างไร้ระเบียบ ด้วยพันธะโควาเลนต์ที่มีพันธะอีเธอร์ (ether bond, C-O-C) และพันธะระหว่างคาร์บอน (carbon bond, C-C) ซึ่งพันธะเหล่านี้ถูกย่อยสลายยาก จึงทำให้ลิกนินแข็งแรง และยังป้องกันไม่ให้ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทำให้บักเตรีหรือเชื้อราไม่สามารถใช้เซลลูโลส

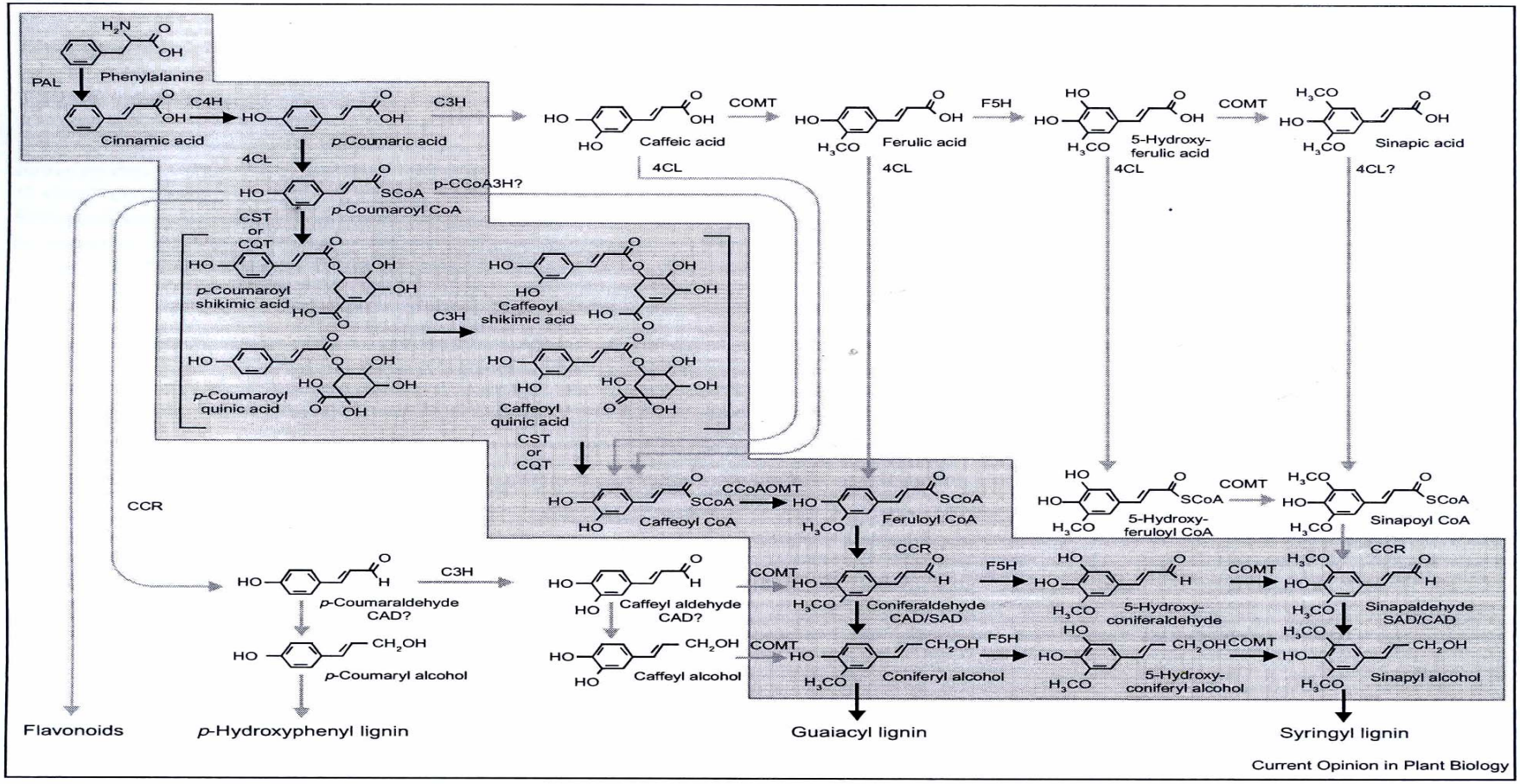
จากพืชได้ นอกจากนี้พบว่าลิกนินมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก ไม่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้ การสังเคราะห์ลิกนินในเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วยหลายปฏิกิริยา (รูปที่ 12) เริ่มต้นจากการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก คือ กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน จะถูกเปลี่ยนเป็น *trans*-cinnamic acid โดยเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (Phenylalanine ammonia lyase : PAL) ต่อจากนั้นก็จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบแอลกอฮอล์ 3 ชนิด ได้แก่ *para*-coumaryl alcohol coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol แล้วจึงเกิดกระบวนการโพลิเมอร์ไรซ์เป็นลิกนินโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) (Vance *et al*., 1980) ในการเร่งปฏิกิริยาทั้งหมดจนได้ลิกนินที่มีองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ ได้แก่ coumaryl guaiacyl และ syringyl ตามลำดับ ความแตกต่างในองค์ประกอบของลิกนินขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เนื้อเยื่อ ชนิดของเซลล์ รวมถึงระยะการเจริญเติบโตด้วย (Campbell and Sederoff, 1996) Higuchi (1985) รายงานว่า พืชในกลุ่มจิมโนสเปอร์ม ซึ่งเป็นไม้เนื้ออ่อน เช่น พืชจำพวกสน มีองค์ประกอบหลักของลิกนินเป็น guaiacyl ร่วมกับ *para*-hydroxyphenyl ส่วนพืชในกลุ่มแองจีโอสเปอร์ม ซึ่งเป็นไม้เนื้อแข็งและเป็นพืชที่เมล็ดมีเปลือกหุ้ม เช่น ต้นแอปเปิล ซึ่งยางพาราก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย มีองค์ประกอบหลักของลิกนินเป็น guaiacyl ร่วมกับ syringyl ในขณะที่ Nimz (1974) เคยรายงานว่า พืชทั้งกลุ่มจิมโนสเปอร์มและแองจีโอสเปอร์มสร้างลิกนินที่มีองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ทั้งสามชนิดแต่ต่างกันที่อัตราส่วนขององค์ประกอบของแอลกอฮอล์ คือ พืชกลุ่มจิมโนสเปอร์มมีองค์ประกอบส่วนมากเป็น coniferyl alcohol กับ *para*-coumaryl alcohol และมี sinapyl alcohol เพียงเล็กน้อย ส่วนพืชกลุ่มแองจีโอสเปอร์มมีองค์ประกอบหลักเป็น coniferyl alcohol กับ sinapyl alcohol และมี *para*-coumaryl alcohol น้อยมาก เช่น ในต้น European beech *(Fagus sylvatica*) มีลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของ coniferyl alcohol sinapyl alcohol และ *para*-coumaryl alcohol ในอัตราส่วน 100:70:7 แล้วได้ตั้งสมมติฐานโครงสร้างโมเลกุลลิกนินของ beech ดังในรูปที่ 11 ส่วน Chaing และ Funaoka (1990) ได้กล่าวเพิ่มอีกว่า ในไม้เนื้อแข็งมีโครงสร้างโมเลกุลขององค์ประกอบลิกนินเป็น syringyl ซึ่งมีหมู่เมทอกซี (-OCH_3) เป็นจำนวนมากจึงถูกไฮโดรไลซ์ในช่วงที่มีการสร้างเนื้อไม้ได้ง่าย แต่ไม้เนื้ออ่อนถูกไฮโดรไลซ์ยากกว่า เพราะโครงสร้างของ *para*-hydroxyphenyl ไม่มีหมู่เมทอกซี

จากการศึกษาของ Whetten และ Sederoff (1995) รายงานว่าจุดสำคัญที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินมี 3 จุด คือ เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) cinnamic CoA ligase (CAL) และ cinnamyl CoA dehydrogenase (CAD) นอกจากนี้ Morrison และคณะ (1994) พบว่า ส่วนข้อของต้นข้าวโพด (maize internode) ที่อยู่ในช่วง

เจริญเติบโต มีการชักนำการสร้างเอนไซม์ CAL เพิ่มขึ้น เพื่อใช้สร้างลิกนิน และในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของเมล็ดละหุ่ง (castor bean) *(Ricinus communis* L.) ที่บ่มด้วยอิลิซิเตอร์ (pectin fragment elicitor : PFE) มีการสะสมลิกนินอย่างรวดเร็ว และพบว่าในธรรมชาติพืชก็มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อใช้ในการโพลิเมอร์ไรซ์ลิกนินอยู่แล้ว เช่น Christensen และคณะ (1998) ซึ่งตรวจพบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากไซเลมของต้นพอพลาร์ (poplar) สามารถแยกได้ 5 ไอโซไซม์ โดยมีไอโซไซม์ PXP3-4 และ PXP5 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินเนื่องจากมีความจำเพาะกับ syringaldazine ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีลักษณะคล้ายกับโมโนเมอร์ของลิกนิน และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของกรดอะมิโนของทั้งสองไอโซไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ลิกนิน พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากทั้งในต้นพอพลาร์และต้นยาสูบ



รูปที่ 11 โครงสร้างโมเลกุลลิกนินของ European beech *(Fagus sylvatica*)
(ที่มา : Nimz, 1974)



รูปที่ 12 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลิกนินในเนื้อเยื่อพืช

(ที่มา : Humphreys and Chapple, 2002)

1.5 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

1.5.1 ความหมายของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส : Peroxidase (EC : 1.11.1.7 donor H_2O_2 oxidoreductase) เป็นฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ที่มีฮีมเกาะติดอยู่หรือเป็นหมู่พรอสเตติก (prosthetic group) จับกับเอนไซม์อย่างหนาแน่นด้วยพันธะโควาเลนต์ มีลักษณะเป็นวงแหวนเตตระไพรอล (tetrapyrole) จัดเป็นโปรโตพอร์ไฟรีน IX (protoporphyrin IX) มีรูปร่างแบนราบ (planar) ภายในโครงสร้างของวงแหวนจะประกอบด้วยไอออนของเหล็กหนึ่งอะตอม โดยทั่วไปเหล็กจะมีตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะได้ 6 ตำแหน่งด้วยกัน โดย 4 ตำแหน่งของเหล็กจะสร้างพันธะกับอะตอมของไนโตรเจนของวงแหวนพอร์ไฟรีน พันธะที่ 5 และ 6 ตั้งฉากกับระนาบของฮีม ซึ่งตำแหน่งที่ 5 จะสร้างพันธะกับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโนฮิสติดีนของโปรตีน และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถแสดงกิจกรรมต่างๆ ได้ โดยการแลกเปลี่ยนหมู่ต่างๆ ที่ตำแหน่งที่ 6 ของเหล็กทำให้เปอร์ออกซิเดสสามารถใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและออกซิไดซ์สารประกอบที่ให้อิเล็กตรอนกลายเป็นผลผลิตที่ให้สีออกมาได้ ดังสมการ

$$2HA + H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidase}} 2H_2O + 2A \text{ (Aให้สี)}$$

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีดังนี้

$$E + H_2O_2 \longrightarrow \text{compound I} + H_2O \qquad \text{สมการที่ 1}$$

$$\text{compound I} + AH_2 \longrightarrow \text{compound II} + AH \qquad \text{สมการที่ 2}$$

$$\text{compound II} + AH_2 \longrightarrow E + AH + H_2O \qquad \text{สมการที่ 3}$$

โดยที่ E คือ ferric enzyme ที่เป็นรูปแบบในระยะพัก (resting)

AH_2 คือ สับสเตรทในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์

AH คือ สับสเตรทที่ถูกออกซิไดซ์

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะออกซิไดซ์สับสเตรทได้ในสภาวะที่มี H_2O_2 และสามารถใช้สับสเตรทหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกเอมีนและสารประกอบอนินทรีย์ ส่วนการเรียกชื่อเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเรียกตามสับสเตรทที่ใช้ เช่น ถ้าใช้ guaiacol ซึ่งอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกเป็นสับสเตรท ก็จะเรียกว่า guaiacol peroxidase (Vianello *et al*., 1997) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสพบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น เชื้อรา โปรโตซัว สาหร่ายเซลล์เดียวจนถึงพืชชั้นสูงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถแบ่งกลุ่มเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนและความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ intracellular peroxidase กลุ่มที่ 2 คือ extracellular fungal

peroxidase และกลุ่มที่ 3 คือ secretory peroxidase จากพืชชั้นสูง (Sakharov and Sakharova, 2002)

จากการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (heme peroxidase) แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 intracellular peroxidase เช่น cytochrome C peroxidase (CCP) ในยีสต์ เป็นโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ พบที่ electron transport chain ในไมโทคอนเดรียและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากความเป็นพิษของเปอร์ออกไซด์ เช่น ascorbate peroxidase (AP) (Perez *et al*., 2002) ในพืชชั้นสูงเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่ย้ายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากคลอโรพลาสและไซโตซอล ส่วนในแบคทีเรียเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะทำงานร่วมกับเอนไซม์คะตาเลส (catalase) โดยป้องกันเซลล์จากสภาวะ oxidative stress

กลุ่มที่ 2 คือ secretory fungal peroxidase เช่น lignin peroxidase (LiP) และ manganese-peoxidase (MnP) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ของไกลโคโปรตีน โปรตีนกลุ่มนี้ประกอบด้วย disulphile bridges 4 ตำแหน่ง และ มี Ca^{2+} 2 โมเลกุล MnP พบในเชื้อราที่ย่อยสลายลิกนิน โดย MnP จะใช้ H_2O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและออกซิไดซ์ Mn^{2+} ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีอยู่ในเนื้อไม้ (Young *et al*., 2000 และ Kapich *et al*., 2005) ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$MnP + H_2O_2 \longrightarrow MnPI + H_2O$ ปฏิกิริยาที่ 1

$MnPI + Mn^{2+} \longrightarrow MnPII + Mn^{3+}$ ปฏิกิริยาที่ 2

$MnPII + Mn^{2+} \longrightarrow MnP + Mn^{3+} + H_2O$ ปฏิกิริยาที่ 3

โดยที่ MnP คือ Manganese peroxidase

Mn^{2+} คือ Mn ในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์

Mn^{3+} คือ Mn ในสภาวะที่ถูกออกซิไดซ์

สามารถพบเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในเชื้อราที่ก่อโรครากขาว (white-rot disease) เช่น เชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* ในฟางข้าวสาลี (Arora *et al*., 2002)

กลุ่มที่ 3 คือ secretory plant peroxidase มีหน้าที่จำเพาะกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เช่น เคลื่อนย้ายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากคลอโรพลาสและไซโตซอล ออกซิไดซ์สารประกอบที่เป็นพิษ สร้างผนังเซลล์ ตอบสนองในการป้องกันโรคจากบาดแผล ขบวนการสลาย indole-3-acetic acid (IAA) ขบวนการสังเคราะห์เอทธิลีนและอื่นๆ โปรตีนกลุ่มนี้เป็นโมโนเมอร์ของไกลโคโปรตีนเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 แต่ต่างกันที่ตำแหน่งของ disulphile bridges

(ที่มา : F:\InterProHeam peoxidase,plant-fungal-bacterial.html)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามประจุที่เป็นองค์ประกอบได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นอะซิดิกเปอร์ออกซิเดส (acidic peroxidase), กลุ่มที่ 2 เป็นนิวตรอลเปอร์ออกซิเดส (neutral peroxidase) และกลุ่มที่ 3 เป็นเบสิกเปอร์ออกซิเดส (strongly basic peroxidase)

1.5.2 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืช

ในพืชสามารถพบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในส่วนต่างๆ เช่น เมล็ด ราก ลำต้น เปลือกของลำต้น ใบ ผล และในส่วนต่างๆ ของเซลล์ เช่น ในผนังเซลล์ ไซโตซอล คลอโรพลาส โดยอาจจะอยู่ในรูปของสารละลายอิสระหรือจับกับผนังเซลล์ด้วยพันธะไอออนิกหรือโควาเลนต์ ซึ่งปล่อยออกมาจากเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์ ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสเหล่านี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างๆ กัน เช่น ascorbate pyrogallol *o*-dianisidine และ guaiacol เป็นต้น

จากงานวิจัยของ Vianello และคณะ (1997) รายงานว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสใน plasma membrane ของถั่วเหลือง เมื่อทำอิเล็กโตรโฟริซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) สามารถย้อมความว่องไวโดยใช้ guaiacol เป็นสับสเตรท พบว่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตรงกับแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 38 และ 48 kDa ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Dean และ คณะ ในปี 1994 ที่พบแอนไอออนิกเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้จากต้น sycamore maple

ในรายงานของ Shivakumar และคณะ (2003) แบ่งประเภทเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืชออกเป็น 2 ประเภท คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในผนังเซลล์เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidative burst ซึ่งนำไปสู่การเกิด hypersensitive cell death และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในไซโตซอล เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidative cross-linking ในกระบวนการสร้างลิกนินของเซลล์ การทดลองเดียวกันนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในไซโตซอลมีความว่องไวเพิ่มขึ้นหลังจากบ่มด้วยเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคราน้ำค้าง (downy mildew) ซึ่งค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับลิกนิน จึงสามารถหยุดเชื้อในการเข้าทำลายเซลล์ของพืช ดังนั้นกระบวนการนี้ทำให้พืชต้านทานโรคได้

นอกจากนี้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยังเกี่ยวข้องในหลายๆ กระบวนการ เช่น auxin catabolism การป้องกันโรค การสร้างลิกนินและซูเบอริน เป็นต้น เมื่อพิจารณาค่า pI ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถจัดได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แอนไอออนิก (anionic) และแคทไอออนิก (cationic) โดยไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสในกลุ่มแคทไอออนิกเกี่ยวข้องกับกระบวนการเร่งการ

สลาย indole-3-acetic acid (IAA) ในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืช (Christensen *et al*., 1998) ส่วนในกลุ่มแอนไอออนิกเกี่ยวข้องกับการโพลิเมอร์ไรเซชันเพื่อสร้างลิกนิน (Quiroga *et al*., 2000)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีส่วนในการสร้างลิกนินของผนังเซลล์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการ โพลิเมอร์ไรซ์สารประกอบฟีนอล ซึ่งมีสารตั้งต้น คือ hydroxycinnamyl alcohol หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวเป็นหน่วยของ phenylpropanoid แล้วสร้างลิกนินในช่วงที่พืชตอบสนองต่อการเกิดโรค การสะสมลิกนินและสารประกอบฟีนอลิกสัมพันธ์กับการต้านทานโรคของพืช ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Young และคณะ (1995) ที่พบการสะสมแคทไอออนิกเปอร์ออกซิเดส (PO-C1) มีค่า pI 8.6 หลังจากที่ต้นข้าวติดเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* ซึ่งถูกสะสมในอะโปพลาสของเซลล์มีโซฟิลล์ ผนังเซลล์และท่อลูเมนของไซเลมในช่วงที่ต้นข้าวเกิดปฏิกิริยา incompatible ต่อเชื้อ โดยค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นนี้ก็สามารถบอกระดับความต้านทานของต้นข้าว รวมถึงพืชอีกหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ฝ้าย ยาสูบ และพืชจำพวกบวบ

1.5.3 **ไอโซไซม์** (Isozyme)

ไอโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างต่างกันแต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกัน เอนไซม์บางตัวอาจมีไอโซไซม์ต่างกันในออร์แกเนลล์ (organelle) ต่างชนิดกัน เช่น ในไซโตซอล (cytosol) และในไมโทคอนเดรีย ไอโซไซม์แต่ละชนิดอาจมีคุณสมบัติเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมต่างกัน ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์เดียวกันก็สามารถใช้ไอโซไซม์ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชและตรวจสอบความแตกต่างของพืชปกติกับพืชที่เป็นโรคได้

ในการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอาจมีไอโซไซม์ต่างกันในเนื้อเยื่อต่างๆของพืช การศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้เริ่มมีการศึกษาครั้งแรกในหัวผักกาดขาวหรือฮอสเรดิช (horseradish) ต่อมาในปี ค.ศ.1966 Shannon และคณะ ได้ใช้เทคนิค ion exchange chromatography แยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ทั้งหมด 7 ไอโซไซม์ เมื่อใช้ CM-cellulose chromatography สามารถแยกได้ 5 ไอโซไซม์ ได้แก่ A, B, C, D และ E แล้วยืนยันผลด้วยเทคนิค DEAE-cellulose chromatography สามารถแยกไอโซไซม์ A ออกเป็น 3 ไอโซไซม์ย่อย ซึ่งเรียกว่า A_1, A_2 และ A_3 ในปี 1982 Aibara และคณะ ประสบผลสำเร็จในการแยกไอโซไซม์ B และ C ได้ 5 ไอโซไซม์ย่อย ได้แก่ B_1, B_2, B_3, C_1 และ C_2 ด้วย CM-cellulose chromatography ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวก็มีการแบ่งประเภทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามประจุที่เป็นองค์ประกอบได้ 3 ประเภท คือ

ประเภทที่ 1 เป็นอะซิดิกเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ ไอโซไซม์ A ประเภทที่ 2 เป็นนิวตรอลเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ ไอโซไซม์ B, C และประเภทที่ 3 เป็นเบสิกเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ D, E ส่วนการทดลองของพัชรากร รัตนภูมี (2543) ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยางพาราได้ 2 วิธี วิธีแรก ใช้เทคนิคการไลโอฟิไลซ์ ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ต่อด้วยการลงคอลัมน์ CM-cellulose และ Sephadex G-75 แต่วิธีนี้ไม่สามารถแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ได้ วิธีที่ 2 จึงลดบางขั้นตอนออกไป เหลือเพียงการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 40-80% แล้วทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ล้างคอลัมน์ด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.3 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม ปรากฏว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสออกมาในพีคแรก เช่นเดียวกับคอลัมน์ CM-cellulose ทั้งที่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสน่าจะจับกับคอลัมน์ DEAE-Sephacel ได้ เพราะมีประจุลบ อาจเนื่องมาจากผลของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่กำจัดออกไม่หมด เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย native PAGE พบแถบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 3 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 เป็นแถบที่ชัดเจน และ 125,000 กับ 140,000 ดาลตัน เป็นแถบที่จางๆ เมื่อทำ SDS-PAGE เห็นแถบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพียง 2 แถบแรกเท่านั้น อาจเป็นเพราะแถบ 140,000 ดาลตัน เป็นแถบที่มีค่าความว่องไวน้อยและหลุดออกในระหว่างที่ล้าง SDS ออกจากแผ่นเจลก็ได้ จากการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่านอกจากใช้เทคนิคคอลัมน์แล้ว ยังมีเทคนิคอิเล็คโตรโฟริซิส ซึ่งเป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักการว่าชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน โปรตีนมีประจุได้เนื่องจากการแตกตัวของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อื่นๆ ในสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่ค่า pH หนึ่งๆ สารละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจเป็น บวก ลบ หรือ ศูนย์ก็ได้ ในการแยกโปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้าม ขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน

วิธีการแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพตามธรรมชาติ สามารถศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสภาพที่เป็น oligomer ไม่ใช่เป็นหน่วยย่อย เช่น ในเซลล์แขวนลอยของเมล็ดละหุ่ง สามารถแยกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสชนิด extracelllular ได้ 6 ไอโซไซม์ ซึ่งแยกย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม anionic มี 2 ไอโซไซม์ ได้แก่ A_1และ A_2 ส่วนกลุ่ม cationic แยกได้ 4 ไอโซไซม์ ได้แก่ C_2, C_3, C_4 และ C_7 เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาบ่มด้วยอิลิซิเตอร์ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น และยังพบไอโซไซม์ใหม่อีก 3 ไอโซไซม์ ได้แก่ C_1, C_5 และ C_6 (Bruce and West., 1989)

ส่วนวิธีแบบ SDS-PAGE สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยใช้ sodium dodacyl sulfate (SDS) เป็นดีเทอร์เจนท์ ซึ่งมีประจุลบไปเกาะกับโปรตีนในลักษณะไม่ใช่โควาเลนต์ในอัตราส่วน 1 โมเลกุลของ SDS ต่อกรดอะมิโน 2-3 ตัว ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ ทำให้โปรตีนเสียสภาพและเปลี่ยนจากรูปทรงกลม (globular) ไปอยู่ในสภาพเหยียดตรง โปรตีนที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยเกาะกันอยู่ก็จะแยกออกเป็นหน่วยย่อย ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกจึงอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเท่านั้น ทำให้สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากการเทียบค่าระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว

ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการแยกไอโซไซม์ด้วยวิธีไอโซอิเล็คตริกโฟกัสซิ่ง หรือ IEF ซึ่งจะแยกโปรตีนตามความแตกต่างของค่า pI (Isoelectric point) คือ เมื่อโปรตีนอยู่ในตัวกลางที่มี pH gradient และถูกทำให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า โปรตีนบางตัวสูญเสียหรือรับโปรตอน ทำให้ประจุสุทธิและอัตราการเคลื่อนที่ลดลง โปรตีนจะเคลื่อนที่ช้าลงและในที่สุดจะหยุด ณ จุดที่ค่า pH gradient เท่ากับค่า pI ของโปรตีนนั้นๆ IEF เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้แยกโปรตีนที่มีค่า pI แตกต่างกันเพียง 0.02 หน่วย pH ได้ ซึ่งจะทำได้ทั้งการวิเคราะห์และแยกโปรตีนในปริมาณมาก รวมทั้งสามารถตรวจสอบสมบัติของโปรตีนได้ด้วย เช่น ในการศึกษาผลความเข้มข้นของคอปเปอร์ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากเรดิช (*Raphanus sativus*) พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากเรดิชได้แล้วยังสัมพันธ์กับค่าความว่องไวเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย คือ เกิดการเหนี่ยวนำไอโซไซม์แคทไอออนิก (pI 8.6) และไอโซไซม์แอนไอออนิก (pI 5.1) ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยทั้งสองไอโซไซม์มีความจำเพาะสูง (high affinity) เมื่อใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรท (Chen *et al*., 2002) จากการศึกษาของ Breton และคณะ (1997) พบว่าในใบยางพาราที่ถูกรุกรานด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* ซึ่งก่อให้เกิดโรคใบจุดในยางพารา เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย IEF พบว่าทั้งอะซิดิก และเบสิกเปอร์ออกซิเดสมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นในใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน (GT1) มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (PB260) ดังนั้นเปอร์ออกซิเดสจึงจัดว่ามีส่วนในการป้องกันตัวเองของพืชด้วย

1.5.4 บทบาทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการป้องกันตัวเองของพืช

พืชทั่วไปไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรค จึงมีวิวัฒนาการขึ้นมาป้องกันตัวเองจากสภาวะเครียดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสิ่งกระตุ้นที่ไม่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต (abiotic) เช่น อุณหภูมิ รังสียูวี การ

เกิดบาดแผล สารเคมี และสิ่งกระตุ้นที่ได้จากสิ่งมีชีวิต (biotic) เช่น เชื้อโรค ผนังเซลล์ของเชื้อโรค วิธีการต่างๆ ที่ใช้ป้องกันตัว ได้แก่ การสร้าง wax เหนือผิวเซลล์ชั้นนอกสุด ทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตาย เรียกว่า hypersensitive cell death (Pierpoint, 1983) เกิดเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis) หรือสร้างสารโมเลกุลขนาดเล็กพวกฟีนอล ไฟโตอเล็กซิน เพื่อยับยั้งเชื้อโรคไม่ให้ลุกลามต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง และสร้าง pathogenesis related-proteins (PR-proteins) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (β-1,3-glucanase) (Linthorst, 1991) รวมถึงเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย พืชจะมีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสขึ้นมาหลายไอโซไซม์ เพื่อประโยชน์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ช่วยซ่อมแซมผนังเซลล์ โดยจะเร่งกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น ลิกนิน (lignin) ซูเบอริน (suberin) เพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อไม้ (Van Huystee and Zheng, 1993) ในมันฝรั่งการสร้างลิกนินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา *P. infestans* ได้ (Friend *et al*., 1973) ในใบยางพาราหลังติดเชื้อรา *P. botryosa* ใบยางพันธุ์ต้านทานจะตอบสนองต่อเชื้อราชนิดนี้ โดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินขึ้นบริเวณผนังเซลล์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม ส่วนใบยางพันธุ์อ่อนแอเห็นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินไม่ชัดเจน ดังนั้นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินสามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ (นิลุบล บุญหวังช่วย, 2545) เช่นเดียวกับใบยางพาราที่ติดเชื้อรา *Microcyclus ulei* ที่ใช้ปริมาณการสร้างลิกนินบอกระดับความต้านทานโรค (Garcia *et al*., 1995a) รวมทั้งใบยางพาราที่ถูกบ่มด้วยเชื้อรา *P. palmivora* หลังจาก 24 จนถึง 72 ชั่วโมง สามารถตรวจวัดลิกนินตามเส้นใบหลักและเส้นใบย่อยของใบยางพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) แต่ในพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) พบการสร้างลิกนินในเส้นใบย่อยเท่านั้น (Rattarasarn, 2003) นอกจากพืชถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราแล้ว การกระตุ้นด้วยสารเคมี การเกิดบาดแผล ก็ทำให้พืชสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น ในต้น *Ebenus cretia* ที่ถูกตัดแล้วบ่มด้วยกรด indolic-3-butyric สามารถชักนำให้รากงอกเร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการสังเคราะห์ลิกนิน (Syros *et al.,* 2004) Chen และคณะ (2002) รายงานว่าทองแดง (Copper : Cu) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นของต้น radish แต่ถ้าได้รับมากเกินไปก็จะยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระพวก reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์พืช ดังนั้นพืชจึงตอบสนองด้วยการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสทั้ง cationic และ anionic เพื่อใช้กำจัด H_2O_2 และสร้างลิกนินตามลำดับ บางไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเกี่ยวข้องกับระดับความต้านทานของพืชด้วย โดย Mohammadi และ Kazemi (2002) พบว่า ในเมล็ดข้าวสาลีที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา

Fusarium graminearum มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (guaiacol-peroxidase) สูงสุดในช่วงน้ำนม (milk stage) มากกว่าช่วงออกรวง (flowering) ช่วงสร้างแป้ง (dough stage) และช่วงรวงแก่ (ripening) ตามลำดับ ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสก็สามารถบอกระดับความต้านทานของข้าวสาลีได้ด้วย คือ ข้าวสาลีพันธุ์ต้านทาน (sumai#3 และ Wang shui-bai) มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Falat และ Golestan)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสีของผลไม้และผัก Jicama *(Pachyrizus ersus* L. Urban) เป็นพืชกินหัวมีรสหวาน และเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศเม็กซิโกและอเมริกากลาง ซึ่งต้องอาศัยความระมัดระวังมากในการเก็บเกี่ยวและขนส่ง เพราะบาดแผลสีน้ำตาลตรงบริเวณขั้วก้าน และรอยไหม้สีน้ำตาลจากการกระทบกระแทกกัน ทำให้ราคาตกต่ำ โดยพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสตรงบริเวณดังกล่าวสัมพันธ์กับการสร้างลิกนิน (Aquino-Bolanos และ Marcado-Silva, 2004) ในลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) ซึ่งพบเอนไซม์ทั้งสองในส่วนของเปลือกหุ้มรังไข่ที่โตเต็มที่ทั้ง 3 ชั้น คือ epicarp mesocarp และ endocarp แสดงว่าเอนไซม์ดังกล่าวนี้มีความสำคัญในการเปลี่ยนสีผิว ทำให้ผลไม้มีสีน้ำตาล (Underhill and Critchley, 1995)

1.6 การสังเคราะห์เอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

Phenylalanine ammonia lyase (PAL : EC 4.3.1.5) เป็นเอนไซม์ตัวแรก (entry-point enzyme) ในขบวนการสังเคราะห์ phenylpropanoid เร่งปฏิกิริยาการกำจัดแอมโมเนีย โดยจะเปลี่ยน L-phenylalanine เป็น *trans*-cinnamate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการโพลิเมอร์ไรซ์เป็นลิกนิน PAL พบได้ในพืชชั้นสูง (Chen and McClure, 2000) ราและยีสต์ (D' Cunha *et al*., 1996) ความว่องไวของ PAL จะเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญเติบโต และเมื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น การได้รับเชื้อรา ทองแดง (Cu) อุณหภูมิ แสง การเกิดบาดแผลและฮอร์โมน

PAL มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคของพืช โดยสอดคล้องกับการเปลี่ยนของสารต่างๆ เช่น สารในกลุ่ม phenylpropanoid pyruvic acid รวมทั้งเอนไซม์ด้วยเช่น Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Cinnamyl CoA dehydrogenase (CAD), Polyphenol oxidase (PPO) และ Peroxidase (POD) จากในรายงานของ Jung และคณะ (2004) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (POD) โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) และฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL) ในพืชอาศัยที่บ่มด้วยเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในพริกไทย (*P. capsici*) แล้วเทียบกับชุด biocontrol ซึ่งบ่มด้วยเชื้อรา *P. capsici* ร่วมกับเชื้อ *Paenibacillus*

illinoisensis พบว่า ความว่องไวของเอนไซม์ PAL จะลดลงในช่วงแรก แล้วจะค่อยๆ เพิ่มหลังจาก 3 วันที่ติดเชื้อรา ซึ่งตรงกันข้ามกับเอนไซม์ PPO แต่สำหรับเอนไซม์ POD จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พืชใช้เอนไซม์ PAL เพื่อนำเข้าสู่ขบวนการ phenylpropanoid แล้วเกิดการโพลิเมอร์ไรซ์เพื่อสร้างลิกนินโดยเอนไซม์ POD

ในดอกทานตะวัน (sunflower) ที่ได้รับคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 50 ไมโครโมลาร์ ภายใน 5 วัน จะสูญเสียน้ำในราก ความยาวของรากสั้นลง ทำให้น้ำหนักลดลง หลังจาก 10 วัน ก็ส่งผลให้โปรตีนลดลง 53% เนื่องจาก Cu ทำให้เมแทบอลิซึมของโปรตีนผิดปกติโดยจะรบกวนการทำงานของสารกลุ่มไทออล ทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress เกิดสารพวก active oxygen species และ H_2O_2 พืชก็จะตอบสนองด้วยการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม antioxidant ได้แก่ SOD CAT POD รวมถึง PAL เพื่อกำจัดสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ (Jouili and Ferjani, 2003)

ส่วนในหัวหอม (onion) ที่เก็บเป็นเวลานาน 20 สัปดาห์ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน (4, 20 °C) จะเห็นการเปลี่ยนแปลงความว่องไวของเอนไซม์ PAL POD และการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก คือ ใน 2 สัปดาห์แรกความว่องไวของเอนไซม์ PALจะเพิ่มที่ 4 °C และลดลงที่ 20 °C แต่หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ เมื่อหัวหอมเริ่มแตกหน่อเอนไซม์ PAL ที่เก็บรักษาที่ 20 °C จะมีค่าความว่องไวสูงกว่าที่ 4 °C ส่วนความว่องไวของเอนไซม์ POD จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อหัวหอมเริ่มแตกหน่อ ส่วนการสะสมสารฟีนอลิกก็จะสูงขึ้นในช่วง 12 สัปดาห์แรก และในช่วงหลังซึ่งตรงกันข้ามกับการเจริญเติบโตของต้นอ่อน จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำสามารถกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ PAL เหนี่ยวนำให้มีการสร้างสารฟีนอลิกซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของหัวหอม (Benkeblia, 2000)

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบลักษณะและขนาดรอยไหม้ (necrosis) การสังเคราะห์สคอพอลิติน การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตลอดจนการสะสมลิกนิน ในใบยางพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *P. palmivora*
2. ตรวจหาไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา ในใบยางทั้งสองพันธุ์
3. ทำบริสุทธิ์ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา
4. ใช้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคมาศึกษาปฏิกิริยา lignification