บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

เปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) เป็นพืชสมุนไพรไทยในวงศ์ Euphorbiaceae จัดเป็นไม้พุ่มมีความสูงประมาณ 2 – 3.5 เมตร (ลีนา ผู้พัฒนพงศ์ และ ธวัชชัย วงศ์ประเสริฐ,2530) เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตศูนย์สูตร ได้แก่ ประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย พม่า ไทย และพื้นที่ทางตอนใต้ของประเทศจีน สำหรับในประเทศไทยสามารถพบเปล้าน้อยได้ในพื้นที่จังหวัดปราจีนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และ ตามแนวชายแดนของประเทศไทยกับพม่า ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เป็นต้น (ณรงค์ เพ็งปรีชา, 2530) ในการขยายพันธุ์เปล้าน้อยสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเพาะเมล็ด , การตอนกิ่ง , การทาบกิ่ง (Matsunaga , Horibe and Promdej , 1990) และการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Shibata et al. , 1996)

การใช้ประโยชน์จากเปล้าน้อยนั้น ในอดีตมีการใช้เพื่อรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ หรือ ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ (ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ , 2535) ต่อมาในปี ค.ศ. 1978 Ogiso และคณะ ได้รายงานการพบสารที่สกัดได้จากใบเปล้าน้อย คือ สารเปลาโนทอล (plaunotol) (Ogiso et al. , 1978) เปลาโนทอลเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่อยู่ในรูปอะไซคลิกไดเทอร์พีนแอลกอฮอล์ (acyclic diterpene alcohol) (Takahashi et al. , 1983) สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อมาบริษัทซังเกียวได้มีการผลิตสารเปลาโนทอลในระดับอุตสาหกรรมออกจำหน่ายในชื่อเคลแนค (Kelnac) และได้ผ่านการจดทะเบียนรับรองโดยองค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) ภายใต้โค้ด CS - 684 (ณรงค์ เพ็งปรีชา , 2530 ; นันทวัน บุณยะประภัศร , 2532) นอกจากการค้นพบสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อยแล้ว ยังมีรายงานการพบสารประกอบหลายกลุ่มที่สามารถสกัดได้จากใบเปล้าน้อย ได้แก่ ไดเทอร์พีนแลคโตน (Diterpene lactones) (Kitazawa et al.,1979) และ ฟูรานอยด์ไดเทอร์พีน (Furanoid diterpene) (Takahashi et al. , 1983) เป็นต้น

จากประโยชน์ของสารเปลาโนทอลดังกล่าว จึงมีผู้พยายามศึกษาหาวิธีการสังเคราะห์สารเปลาโนทอลในทางเคมีขึ้น เพื่อทำการผลิตสารเปลาโนทอลแทนการสกัดจากใบเปล้าน้อย แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ ปัจจุบันนี้การผลิตสารเปลาโนทอล ยังคงอาศัยใบเปล้าน้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยบริษัทชังเกียวจากประเทศญี่ปุ่นได้ทำการปลูกเปล้าน้อยในพื้นที่มากกว่า 7,000 ไร่ ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพื่อนำใบเปล้าน้อยไปใช้ทำการผลิตสารเปลาโนทอลในระดับอุตสาหกรรม (ณรงค์ เพ็งปรีชา , 2530)

เนื่องจากใบเปล้าน้อยเป็นวัตถุดิบที่สำคัญสำหรับการผลิตสารเปลาโนทอล จึงต้องมีการปลูกเปล้าน้อยเป็นจำนวนมาก การปลูกพืชชนิดเดียวในเขตพื้นที่เดียวกันเป็นจำนวนมากนั้น อาจทำให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคและแมลงได้ง่าย จากรายงานของ ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นลิน นิลอุบล (2540) พบโรคใบจุดของเปล้าน้อยที่เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ในเขตจังหวัดเพชรบุรี และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งรายงานดังกล่าวมิได้กล่าวถึงผลกระทบของการเกิดโรคใบจุดที่มีต่อปริมาณของสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโรคใบจุดที่มีสาเหตุจาก เชื้อรา *G. cingulata* ต่อปริมาณสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อย โดยคาดว่าผลที่ได้รับจากการศึกษา จะนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์เปล้าน้อยให้มีความต้านทานโรคและเพื่อหาแนวทางในการควบคุมโรคต่อไป

1.2. เปล้าน้อย

1.2.1. **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์** (ลีนา ผู้พัฒนพงศ์ และ ธวัชชัย วงศ์ประเสริฐ,2530)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Croton sublyratus* Kurz.

วงศ์ Euphorbiaceae

ลำต้น : เปล้าน้อยจัดเป็นไม้พุ่มผลัดใบขนาดเล็ก มีความสูง 2 – 3.5 เมตร ตามยอดอ่อนปกคลุมด้วยรังแคสีสนิม

ใบ : ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ใบเป็นรูปไข่หัวกลับ มีขนาดความกว้าง 4 – 6 เซนติเมตร ยาว 10 – 15 เซนติเมตร โคนใบสอบแคบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบจักเล็ก ๆ ไม่สม่ำเสมอ ปลายใบแหลม หรือ ทู่ เนื้อใบบาง ใบแก่เกลี้ยงหรือมีขนรูปดาวตามเส้นใบด้านล่าง ก้านใบยาว 6 – 12 มิลลิเมตร

ดอก : ดอกของเปล้าน้อยมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อเหนือรอยแผลใบใกล้ยอด ดอกเพศผู้ และ ดอกเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ลักษณะของดอกเพศผู้จะมีกลีบรองกลีบดอกได้ตั้งแต่ 4 – 6 กลีบ แต่ส่วนมากมี 5 กลีบ ลักษณะของกลีบรองดอกจะเป็นรูปหอกค่อนข้างกว้าง มีปลายแหลม ด้านนอกมีขนสีน้ำตาลอมเหลือง กลีบดอกมีประมาณ 5 กลีบ ขอบกลีบมีขน ฐานของดอกมีขนยาว เกสรตัวผู้มีประมาณ 15 – 20 อัน ลักษณะดอกเพศเมีย จะมีกลีบรองดอกที่มีลักษณะเหมือนดอกเพศผู้ แต่อาจมีจำนวนกลีบมากกว่า ไม่มีกลีบดอก รังไข่มีขนรูปดาวหนาแน่น ขนมีสีน้ำตาลอมเหลือง ปลายเกสรตัวเมียสั้น

ผล : ผลมีลักษณะเป็นลูกกลม ๆ โดยมี 3 ผลเล็ก ๆ อยู่รวมกัน ความยาวของผลประมาณ 3 – 5 มิลลิเมตร มีขนรูปดาวขึ้นปกคลุมผล

เมล็ด : ขนาดเมล็ดยาวประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร มีผิวเรียบ มีลายตามยาวเป็นสีขาวปนน้ำตาล

นิเวศวิทยา : เปล้าน้อยมีถิ่นที่อยู่ในบริเวณประเทศซึ่งตั้งอยู่ตามแนวชายฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่ อินโดนีเซีย , มาเลเซีย , ไทย และทางตอนใต้ของประเทศจีน สำหรับประเทศไทยได้มีการสำรวจพบในเขตป่าเบญจพรรณของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ปราจีนบุรี และ ตามแนวชายแดนของประเทศไทยกับพม่า ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เป็นต้น (ณรงค์ เพ็งปรีชา, 2530)

1.2.2 การปลูกและขยายพันธุ์เปล้าน้อย

สภาพพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเปล้าน้อย ควรเป็นพื้นที่ซึ่งมีความชื้นสูง และ ต้นเปล้าน้อยสามารถรับแสงในช่วงระหว่างวันได้นาน ลักษณะของดินที่ใช้ทำการปลูกเปล้าน้อย ควรเป็นดินร่วนปนทราย เนื่องจากลักษณะดินดังกล่าว มีคุณสมบัติที่ดีในเรื่องของการระบายน้ำ นอกจากนี้ระดับความเป็นกรดด่าง (pH) ของดินเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเปล้าน้อย โดยทั่วไประดับความเป็นกรดด่างของดินไม่ควรเป็นกรด เนื่องจากสภาพดินที่เป็นกรดจะมีผลเสียต่อการดูดซึมธาตุอาหารหลักของพืช ได้แก่ N , P , K , Ca , และ Mg เป็นต้น ดินที่มีค่าความเป็นกรดด่าง ประมาณ 4.7 จะมีผลทำให้พืชไม่สามารถนำธาตุ Ca และ Mg ไปใช้ได้ สามารถสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดจากการขาดธาตุอาหารได้จากใบ โดยใบเปล้าน้อยที่มีการขาดธาตุอาหารในกลุ่มดังกล่าว จะพบอาการเหลืองซีด(chlorosis) และ มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ (Matsunaga and Domethong , 1990 ; Matsunaga , Domethong and Boriboon , 1990)

การปลูกเปล้าน้อยเพื่อนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมการผลิตสารเปลาโนทอลนั้น จะมีการปลูกประมาณ 250 - 258 ต้นต่อพื้นที่ 1 ไร่ โดยมีระยะห่างระหว่างต้นประมาณ 2.5 x 2.5 เมตร การเก็บเกี่ยวจะทำเมื่อต้นเปล้าน้อยมีอายุ 3 ปีขึ้นไป และให้ผลผลิตเป็นเวลานานมากกว่า 10 ปี การเก็บใบเปล้าน้อยจะเก็บเฉพาะใบอ่อน ซึ่งสามารถเก็บได้ปีละ 2 - 3 ครั้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของต้น แต่โดยส่วนใหญ่แล้ว ในปีหนึ่ง ๆ จะสามารถให้ผลผลิตคิดเป็นน้ำหนักแห้งของใบประมาณ 625 - 750 กก.ต่อ ไร่ (ณรงค์ เพ็งปรีชา , 2530)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การขยายพันธุ์เปล้าน้อยสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเพาะเมล็ด , การตอนกิ่ง การปักชำ และ การทาบกิ่ง เป็นต้น จากรายงานของ Matsunaga et al (1990) พบว่า การขยายพันธุ์เปล้าน้อยโดยการทาบกิ่งนั้น เป็นวิธีการขยายพันธุ์เพื่อเตรียมต้นพันธุ์สำหรับผลิตใบเปล้าน้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเปลาโนทอลในอุตสาหกรรม การขยายพันธุ์วิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีในการผลิตใบที่มีคุณภาพ เนื่องจากการทาบกิ่งจะใช้กิ่งพันธุ์เปล้าน้อยพันธุ์ดีที่ต้องการขยายพันธุ์ มาทาบกิ่งกับต้นตอของเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb.) ข้อดีของการใช้ต้นตอเปล้าใหญ่ คือ มีการเจริญเติบโตดี ทำให้สามารถทำการผลิตใบเปล้าน้อยที่มีคุณภาพ คือ มีขนาดของใบใหญ่กว่าใบเปล้าน้อยที่ปลูกทั่ว ๆ ไป และมีปริมาณใบมาก นอกจากนี้รากของต้นเปล้าใหญ่สามารถต้านทานต่อการเกิดโรครากเน่า ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตใบเปล้าน้อย การขยายพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าวจะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารเปลาโนทอล

1.2.3 สรรพคุณของเปล้าน้อย

เปล้าน้อยเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของประเทศไทย ซึ่งในอดีตนิยมนำเปล้าน้อยมาใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด ได้แก่ ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ , ใช้เป็นยารักษาและป้องกันโรคผิวหนัง เป็นต้น หรือ อาจจำแนกการใช้ประโยชน์ของเปล้าน้อยตามส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ส่วนของต้น เปลือกไม้ และ ใบ มีการใช้เป็นยายับยั้งอาการโรคท้องร่วง และยังสามารถใช้เป็นตัวยาสำหรับช่วยให้การมาของรอบเดือนเป็นปกติ ในขณะที่ส่วนของดอกใช้เป็นยาสำหรับถ่ายพยาธิ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่กล่าวถึงการใช้ประโยชน์ของเปล้าน้อยร่วมกับเปล้าใหญ่เป็นยาสมุนไพร เช่น ยาช่วยย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร ยาถ่ายพยาธิ ยาเร่งประจำเดือน ยาขับลมในกระเพาะอาหาร และยากล่อมประสาท เป็นต้น (ประเสริฐ พรหมมณี , 2531 ; ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ , 2535)

ในปี ค.ศ. 1978 ได้มีคณะนักวิทยาศาสตร์ของญี่ปุ่น เข้ามาทำการสำรวจพันธุ์เปล้าน้อย และ ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเปล้าน้อยในประเทศไทย (ณรงค์ เพ็งปรีชา , 2530) จึงได้มีการค้นพบสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อย ซึ่งสารดังกล่าวพบมากในใบอ่อน (Ogiso et al. , 1978) สารเปลาโนทอล เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปราศจากอาการข้างเคียง เมื่อสารดังกล่าวออกฤทธิ์ จะทำให้อัตราการไหลเวียนของโลหิตในเยื่อบุกระเพาะอาหารเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังเพิ่มการสร้างสารเมือกและสารโพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) ในกระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้เยื่อบุผนังของกระเพาะอาหาร

สามารถต้านทานกรดและน้ำย่อยได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยลดการหลั่งของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น (Ushiyama et al. , 1987)

1.3 โรคใบจุดของเปล้าน้อย

จากรายงานของ ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นลิน นิลอุบล (2540) ซึ่งได้ทำการสำรวจต้นเปล้าน้อยในเขตอุทยานแห่งชาติหาดวนกร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในปี 2538 และ 2539 ได้พบการระบาดของโรคใบจุดที่เกิดกับเปล้าน้อยเป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยพบต้นที่เกิดโรคคิดเป็นร้อยละ 76 ของจำนวนต้นเปล้าน้อยที่ทำการสำรวจ นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคใบจุดกับต้นเปล้าน้อยในบริเวณเขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี จากการสำรวจโรคใบจุดของเปล้าน้อยทั้ง 2 แห่งข้างต้นพบว่า เชื้อสาเหตุของโรคใบจุดคือ เชื้อรา *Glomerella cingulata*

1.3.1 ลักษณะอาการของโรค

อาการเริ่มแรกของโรคใบจุด จะเกิดจุดสีเขียวซุ่มน้ำขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วบริเวณใบ ต่อมาอาการของโรคจะปรากฏแผลเป็นจุดกลมสีน้ำตาล ถึง สีดำ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร และมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบชัดเจน นอกจากนี้อาจพบแผลบนเส้นกลางใบมีสีดำ ภายในแผลพบฟรุตติ้งบอดี้ (fruiting body) ของเชื้อเป็นจุดสีดำขนาดเล็กกระจายอยู่บริเวณแผล อาการของโรคจะมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับความชื้นในบรรยากาศสูง (ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นลิน นิลอุบล , 2540)

1.3.2 การจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรค

จากรายงานของ ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นลิน นิลอุบล (2540) ที่ได้ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดเปล้าน้อย พบว่า เกิดจากเชื้อรา *G. cingulata* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (perfect stage) และพบระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *G. cingulata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากรายงานของ Hoog and Guarro (1995) ได้มีการจำแนกเชื้อรา *G. cingulata* ไว้ดังนี้

Division Ascomycota
Class Ascomycetes
Order Sphaeriales
Family Polystigmataceae
Genus *Glomerella*

ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้มีการจัดจำแนกไว้ตามรายงานของ Sutton (1980) ดังนี้

Division Coelomycota
Class Coelomycetes
Order Melanconiales
Family Melanconiaceae
Genus *Colletotrichum*

1.3.3 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา

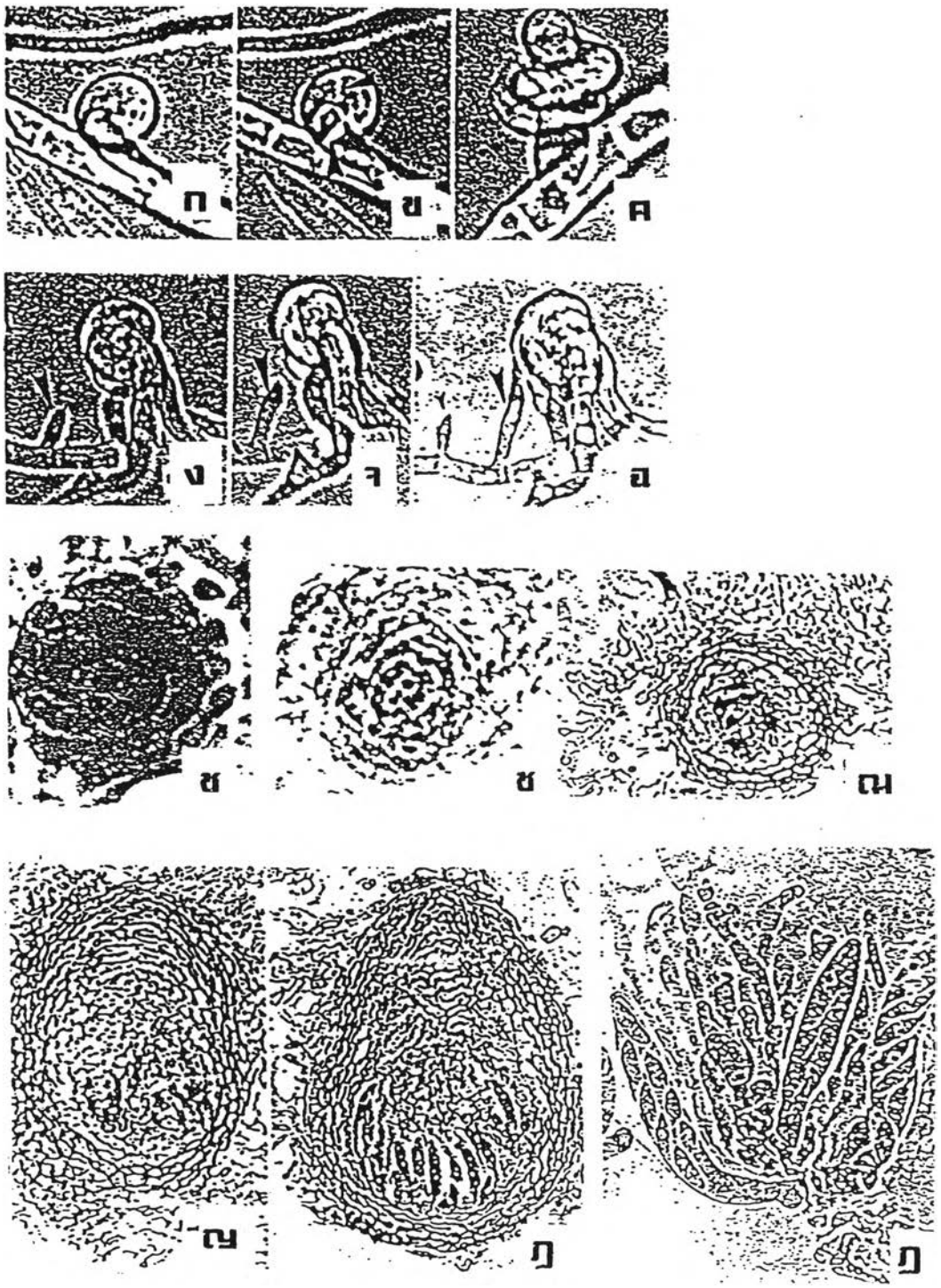
ลักษณะของเชื้อรา *G. cingulata* บนใบพืช เชื้อราจะสร้างฟรุตติ้งบอดี้แบบเพอริธิเชียม (perithicium) ที่มีรูปร่างคล้ายขวดรูปชมพู่ ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช มีความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 - 300 ไมโครเมตร ภายในเพอริธิเชียมเป็นที่กำเนิดของแอสคัส (ascus) ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปไข่ (ellipsoidal) ตรง หรือ โค้ง ขนาดประมาณ 55 - 70 x 10 - 14 ไมโครเมตร ภายในมี 8 แอสโคสปอร์ (ascospore) แอสโคสปอร์มีรูปร่างกลม รี ไม่มีสี (hyaline) ไม่มีผนังกั้น (non - septate) มีขนาดประมาณ 12 - 28 x 4 - 7 ไมโครเมตร (Dennis , 1968)

ส่วนลักษณะของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จะมีการสร้างฟรุตติ้งบอดี้แบบอะเซอร์วูไล (acervuli) บนอาหาร ภายในอะเซอร์วูไลจะมี

การสร้างโคนีเดีย (conidia) สีส้มอ่อน โคนีเดียมีรูปร่างทรงกระบอกตรง (cylindrical) มีขนาดประมาณ 12 - 17 x 3.5 - 6 ไมโครเมตร สีของโคโลนี(colony) ของเชื้อมีหลายสี ได้แก่ สีเทาขาว ถึง สีเทาดำ (Dennis , 1968)

1.3.4 การสร้างแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata*

การสร้างแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* (รูปที่ 1.1) เริ่มจากการสร้างส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ที่เรียกว่า แอสโคโกเนียม (ascogonium) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยบาง ๆ คล้ายกับเส้นใยทั่วไป ตำแหน่งที่สามารถพบแอสโคโกเนียม มักเป็นส่วนปลายเส้นใยบริเวณขอบโคโลนี เนื่องจากบริเวณนี้มีการพัฒนาของเส้นใยอย่างรวดเร็ว โดยภายหลังจากการปลูกเชื้อรา *G. cingulata* บนใบพืช เป็นเวลา 36 - 48 ชั่วโมง สามารถเห็นเส้นใยดังกล่าวเริ่มขดเป็นวงสั้นๆ (coil) จนกระทั่งขมวดเป็นปม(loop) ดังรูปที่ 1.1 (ก , ข) ในระยะต่อมาปมที่เกิดขึ้นจะถูกหุ้มด้วยเส้นใย ซึ่งจะเคลื่อนที่เข้ามาพันและหมุนไปรอบ ๆ ลักษณะการพันคล้ายก้นหอย (helix) จนกระทั่งหุ้มปมได้มิด การพันกันในลักษณะเช่นนี้ทำให้ยากต่อการสังเกตผนังกั้น (septum) ตามขวางของเส้นใย ส่วนของแอสโคโกเนียมจะค่อย ๆ ยืดตัวขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังรูปที่1.1 (ค) เมื่อเวลาของการทดลองผ่านไปประมาณ 1.30 ชั่วโมง เส้นใยที่อยู่ใกล้เคียงกับแอสโคโกเนียม จะมีการยืดตัวขึ้นและหุ้มส่วนของแอสโคโกเนียม โดยเส้นใยที่ยืดตัวในช่วงนี้ จะทำหน้าที่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่เรียกว่า แอนเธอริเดียม (antheridium) ดังรูปที่ 1.1 (ง , จ) เมื่อตัดชิ้นส่วนของตัวอย่างที่มีอายุ 4 วัน และ นำมาย้อมสีด้วยวิธี Giemsa stain จะสามารถเห็นแอสโคโกเนียมที่ถูกหุ้มด้วยเส้นใยได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 1.1 (ฉ) เมื่อการทดลองเข้าสู่วันที่ 5 จะสามารถเห็นชั้นของเส้นใยที่ห่อหุ้มแอสโคโกเนียมไว้มากกว่า 2 - 3 ชั้น ซึ่งลักษณะเช่นนี้แสดงให้เห็นว่า แอสโคโกเนียมมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งไม่สามารถแยกส่วนของเส้นใยที่มาห่อหุ้มในช่วงก่อนหน้านี้ได้ ดังรูปที่ 1.1 (ช) ในวันที่ 7 - 10 ของการทดลอง เมื่อทำการวัดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของยังแอสโคมาตา (young ascomata) พบว่ามีความยาวประมาณ 35 ไมโครเมตร และจะค่อย ๆ พัฒนาขนาดของยังแอสโคมาตาอย่างต่อเนื่อง จนมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตร จึงจะสามารถสังเกตชั้นของเส้นใยมีสีที่เข้มมากขึ้น ดังรูปที่ 1.1 (ช) ในการสังเกตผลการทดลองตั้งแต่วันที่ 14 เป็นต้นไป ผนังด้านนอกจะมีการยืดตัวซึ่งจะเริ่มเห็นเป็นคอขวด ดังรูปที่ 1.1 (ฌ - ฎ) ในขณะเดียวกันภายในก็จะมีการพัฒนาของแอสโคสปอร์อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 1.1 (ฎ) (Vecker , 1994)



รูปที่ 1.1 แสดงขั้นตอนการสร้างแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* (Vecker , 1994)

1.3.5 การงอกของสปอร์ (Germination) และ การสร้างแอปเพรสซอเรียม (Appressorium) เพื่อเข้าทำลายพืช

การเข้าทำลายพืชของเชื้อรา *G. cingulata* และ *C. gloeosporioides* พบว่า เชื้อจะมีการสร้างแอปเพรสซอเรียม(appressorium) ซึ่งเป็นเส้นใยของเชื้อราที่มีส่วนปลายโป่งสำหรับทำหน้าที่ยึดเกาะและแทงผ่านเข้าสู่พืชอาศัยทางการ์ดเซลล์ (guard cell) หรือ ทางปากใบ (stomata) ลักษณะแอปเพรสซอเรียมของเชื้อรามีหลายแบบ ได้แก่ แบบกระบอง (clavate) , แบบรูปไข่ (ovate) และ แบบกลีบ (lobed) มีขนาดประมาณ 6 - 20 x 4 - 12 ไมโครเมตร เมื่อแอปเพรสซอเรียมแทงเข้าสู่พืชอาศัยแล้ว เชื้อราจะทำให้เซลล์พืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Dennis , 1968) ในการงอกของสปอร์ และ การสร้างแอปเพรสซอเรียมของเชื้อรานั้น มีความสำคัญต่อการที่เชื้อจะเข้าสู่พืช จากการศึกษาเกี่ยวกับการงอกของสปอร์ หรือ การสร้างแอปเพรสซอเรียมเข้าสู่พืชตระกูลพริก โดยเชื้อรา *C. capsici* และ *G. cingulata* พบว่า กระบวนการทั้ง 2 จะเกิดขึ้นที่ผิวของผลพริก โดยจะเกิดกับผลพริกที่ยังมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ได้ดีกว่าผลพริกที่มีการเจริญเติบโตสมบูรณ์แล้ว ซึ่งผลพริกในขณะที่มีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่นั้น พบว่า ความเสียหายที่เกิดแก่ต้นและ ผลของพริก จะไม่ปรากฏอาการให้เห็นชัดเจน โดยเชื้อจะค่อย ๆ ทำลายผลพริก จนกระทั่งสามารถเห็นอาการต่าง ๆ ได้ชัดเจนก็ต่อเมื่อผลพริกมีการเจริญเติบโตเต็มที่ โดยปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถเกิดกับพืชชนิดอื่น ๆ ในลักษณะเดียวกันได้ เช่น กล้วย ละโวกาโด เป็นต้น (Adikaram , 1981 cited in Bailey and Jeger , 1992) สาเหตุที่สปอร์ของเชื้อราสามารถเจริญเติบโตและสร้างเส้นใยสำหรับยึดเกาะเพื่อแทงผ่านเข้าสู่พืชอาศัยที่มีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ได้ดีกว่าพืชที่มีการเจริญอย่างสมบูรณ์นั้น สามารถอธิบายได้จากรายงานของ Swinebum (1976) ; Harper and Swinebum (1979) cited in Bailey and Jeger (1992) ที่ทำการศึกษาการพัฒนาของเชื้อรา *C. museae* กับ กล้วย โดยผลจากการศึกษาที่ได้ พบว่า ผิวของกล้วยที่ยังมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่นั้น จะมีการสร้างสารชนิดหนึ่งขึ้น สารชนิดนี้เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงแล้ว จะมีผลในการกระตุ้นการสร้างแอปเพรสซอเรียมของเชื้อรา ซึ่งสารดังกล่าว คือ กรดแอนทรานิลิก (anthranilic acid) สารชนิดนี้สามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว และ เมื่อเกิดการสลายตัวขึ้นจะได้สาร 2 , 3 - dihydroxybenzoic acid ซึ่งเชื้อรา *C. museae* จะนำสารดังกล่าวไปใช้เพื่อทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายธาตุเหล็ก (Fe) ที่ผิวของผลกล้วย เมื่อสารดังกล่าวจับตัวกับธาตุเหล็ก ในรูป Iron - chealating agent แล้ว จะเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ และ ตามด้วยการสร้างแอปเพรสซอเรียมเพื่อแทงผ่านเข้าสู่พืชอาศัย จากผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับ

ผลการศึกษาของ Kolattukudy et al. (1995) ซึ่งรายงานเกี่ยวกับสารที่ผิวของผลอะโวคาโดที่มีผลทำให้เกิดการงอกของสปอร์ และ การสร้างแอปเพรสซอเรียมของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญอยู่บนผลอะโวกาโด ผลการศึกษาที่ได้ พบว่า สารขี้ผึ้ง (wax) ที่ผิวของผลอะโวคาโด จะมีผลต่อโคนีเดียของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในการสร้างแอปเพรสซอเรียมเพื่อยึดเกาะและแทงผ่านเข้าสู่พืชอาศัย เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสารขี้ผึ้ง จะไปกระตุ้นให้เชื้อสร้างแอปเพรสซอเรียมแทงผ่านเข้าสู่ผิวของผลอะโวกาโดที่ยังไม่สุก และ จากการศึกษาสภาวะโดยทั่วไปของการงอกของสปอร์ และ การสร้างแอปเพรสซอเรียมของเชื้อรา *G. cingulata* นั้น พบว่าสภาวะเหมาะสม คือ มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดด่าง ประมาณ 5.0 (Chakraborty , Das and Charkarborty , 1995)

1.3.6 การแพร่ระบาดของเชื้อรา *G. cingulata*

การแพร่ระบาดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช โดยทั่วไปจะเกิดในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของเชื้อรา เช่น การปลูกพืชในที่ร่มหรือปลูกใกล้ชิดกันมาก ทำให้มีการถ่ายเทอากาศน้อย และ มีความชื้นในบรรยากาศสูง ทำให้เชื้อราสามารถเข้าสู่พืชและทำลายพืชได้ง่ายกว่าการปลูกพืชที่มีระยะห่างกัน ทั้งนี้เนื่องจาก การปลูกพืชที่มีระยะปลูกชิดกันจนเกินไปนั้น ภายหลังจากการให้น้ำแก่ต้นพืชหรือภายหลังฝนตก พืชซึ่งปลูกชิด ๆ กัน จะเป็นบริเวณที่มีความชื้นสูงเป็นระยะเวลานาน และใบพืชยังคงเปียก สภาวะดังกล่าว จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการที่เชื้อจะเข้าสู่พืช โดยเชื้อสามารถเข้าสู่พืชทางช่องเปิดของพืชได้ง่าย ตลอดจนพืชยังไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้เพียงพอต่อการเจริญเติบโต พืชจึงมีความอ่อนแอ ดังนั้นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคจึงสามารถเข้าทำลายพืชได้ง่ายขึ้น เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชส่วนมากสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20 - 30 องศาเซลเซียส (ไพโรจน์ จ่วงพานิช , 2525)

จากรายงาน Makowski (1993) ได้ทำการศึกษาถึงสภาพที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เพื่อทำให้เกิดโรคกับพืช ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอย , อุณหภูมิ , ระยะเวลาการเกิดน้ำค้าง และ ระยะการเจริญเติบโตของพืช *Abutilon theophrasti* Medic และ *Malva pusilla* พบว่า ความเข้มข้นสปอร์แขวนลอย ที่เหมาะสมคือ $2 - 4 \times 10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 15 - 30 องศาเซลเซียส มีช่วงเวลาการเกิดน้ำค้างต่อเนื่องกันประมาณ 20 - 48 ชั่วโมง และมีอุณหภูมิในช่วงการเกิดน้ำค้างประมาณ

20 - 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ช่วงอายุของพืชที่เหมาะสมสำหรับการปลูกเชื้อ ควรเป็นช่วงที่พืชเริ่มมีใบเลี้ยง เนื่องจากเป็นช่วงที่พืชมีความไวต่อการเกิดโรคมากที่สุด

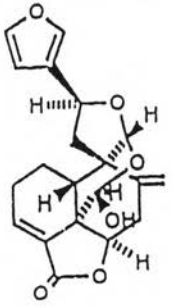
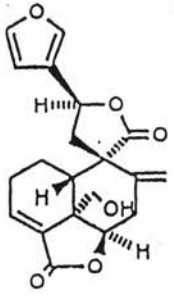
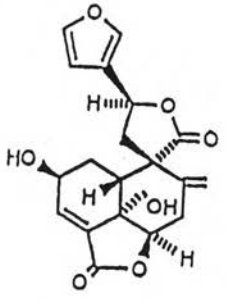
1.3.7 โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *G. cingulata*

เชื้อรา *G. cingulata* เป็นเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดความเสียหายแก่พืชหลายชนิด ได้แก่ โรคใบด่างและผลเน่าของแอปเปิ้ล (Taylor , 1971 ; Shane and Sutton , 1981 ; Latham and Williams , 1983) โรคแคงเกอร์ และ ใบด่าง ของต้น camellia (Dickens and Cook , 1989) โรคแอนแทรคโนสของผลสตรอเบอรี่ และ white bean (Howard and Albregts , 1984 ; Tu , 1990) และ โรคใบไหม้ของต้นชาพันธุ์ *Pestalotia longiseta* (Hirota , Horikawa and Fujiwara , 1993) เป็นต้น ซึ่งความเสียหายที่เกิดกับผลผลิตนั้น คิดเป็นมูลค่ามหาศาล

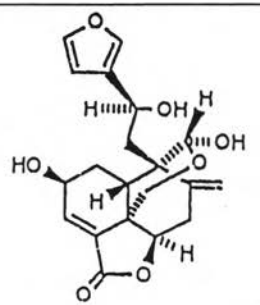
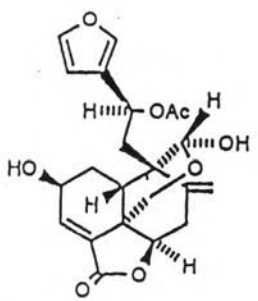
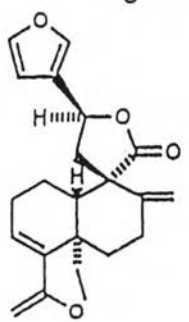
1.4. สารสำคัญในใบเปล้าน้อย

จากรายงานของ Ogiso et al. (1978) ที่ได้ทำการแยกสารจากใบเปล้าน้อย โดยสารสำคัญที่ค้นพบนั้น คือ สารเปลาโนทอล สารดังกล่าวมีความสำคัญ เนื่องจากมีการนำมาใช้เพื่อการรักษาในทางการแพทย์ นอกจากนั้นยังมีผู้ทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อจำแนกสารที่ได้จากเปล้าน้อย และจากผลของการศึกษา สามารถค้นพบสารประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.1

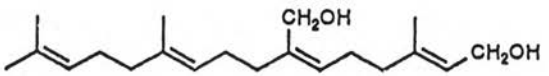
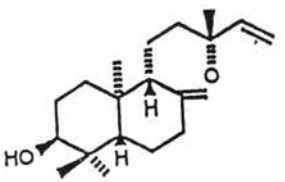
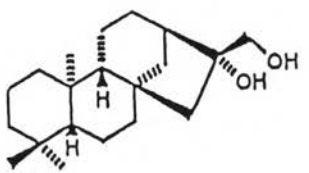
ตารางที่ 1.1 ชนิดของสารเคมี และ โครงสร้างทางเคมีของสารที่ทำการสกัดจากใบเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.)

กลุ่มสารเคมี	ชนิดของสารเคมี	โครงสร้างทางเคมี	เอกสารอ้างอิง
Diterpene lactone	Plaunol A		Kitazawa et al., 1979 Kitazawa et al., 1980
	Plaunol B		Kitazawa et al., 1979 Kitazawa et al., 1980
	Plaunol C		Kitazawa et al., 1980

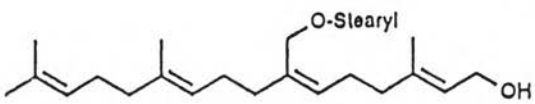
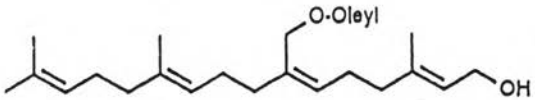
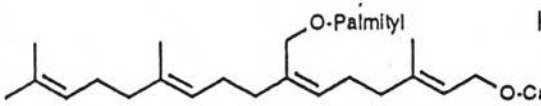
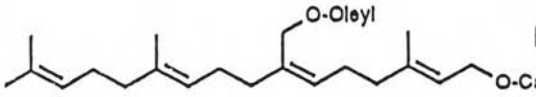
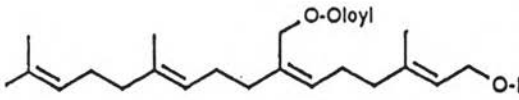
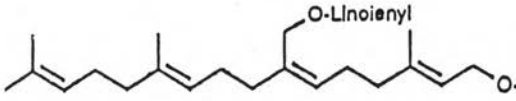
ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี	ชนิดของสารเคมี	โครงสร้างทางเคมี	เอกสารอ้างอิง
	Plaunol D		Kitazawa et al., 1980
	Plaunol E		Kitazawa et al., 1980
Furanoid diterpene	Plaunolide		Takahashi et al., 1983

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี	ชนิดของสารเคมี	โครงสร้างทางเคมี	เอกสารอ้างอิง
Diterpene alcohols	Plaunotol		Ogiso et al., 1978
	ent - 13α - hydroxy - 13 - epimanool		Kitazawa and Ogiso, 1981
	ent - 16β , 17 - dihydroxykaurane		Kitazawa and Ogiso, 1981

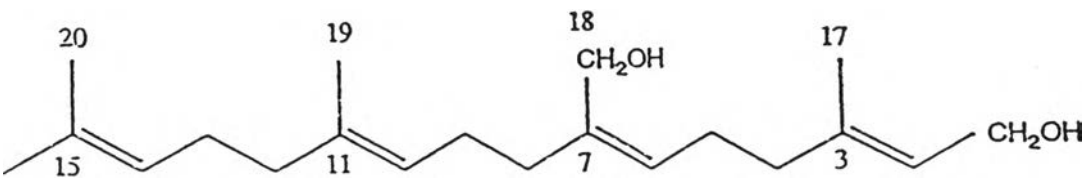
ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี	ชนิดของสารเคมี	โครงสร้างทางเคมี	เอกสารอ้างอิง
Ester of 18-hydroxygeranylgeraniol	Stearic acid		Kitazawa et al., 1982
	Oleic acid		Kitazawa et al., 1982
	Caprylic acid - pamitic acid		Kitazawa et al., 1982
	Caprylic acid - oleic acid		Kitazawa et al., 1982
	2-Palmitic - oleic acid		Kitazawa et al., 1982
	Linoleic acid - linolenic acid		Kitazawa et al., 1982

1.4.1 สารเปลาโนทอล (Plaunotol)

โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมี

เปลาโนทอลเป็นสารสำคัญที่มีอยู่ในใบเปล้าน้อย จัดเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มอะไซคลิกไดเทอร์พีน มีชื่อทางเคมีคือ (E , Z , E) - 7-hydroxymethyl - 3 , 11 , 15 - trimethyl - 2 , 6 , 10 , 14 - hexadecatetraen - 1 - ol หรือ 18 - hydroxygeranylgeraniol ซึ่งมีสูตรเคมีคือ $C_{20}H_{34}O_2$ และน้ำหนักโมเลกุลของสารเท่ากับ 306.256 (Ogiso et. al. , 1978 ; Takahashi et al. , 1983) สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1.2

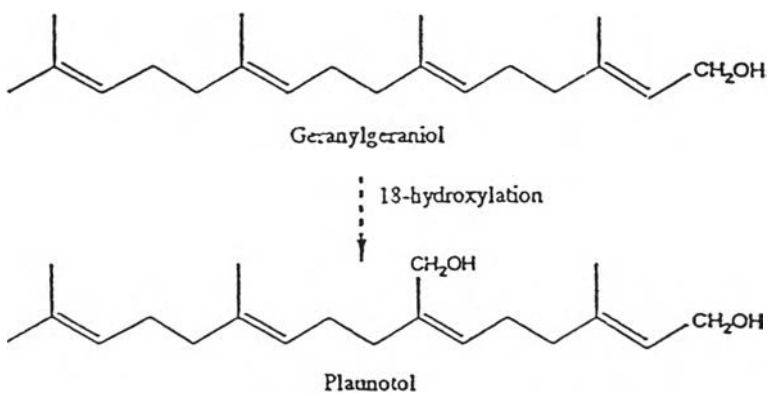


รูปที่ 1. 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเปลาโนทอล

คุณสมบัติทางเคมีของสารเปลาโนทอล จากรายงานของ Department of Medical Information , Sankyo Co., Ltd. (1993) สารเปลาโนทอลมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นมีสีเหลืองอ่อน ถึงน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเฉพาะตัว รสขม นอกจากนี้คุณสมบัติของการละลายพบว่าไม่สามารถละลายในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ เมทธานอล (methanol) , เอทธานอล (ethanol) , อะซิโตน (acetone) , เอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate) , ไดออกเซน (dioxane) , อีเธอร์ (ether) , คลอโรฟอร์ม (chloroform) , โทลูอีน (toluene) และน้ำมันพืช (vegetable oil) เป็นต้น

1.4.2 การสังเคราะห์เปลาโนทอลด้วยชีววิธี (Biosynthesis of Plaunotol)

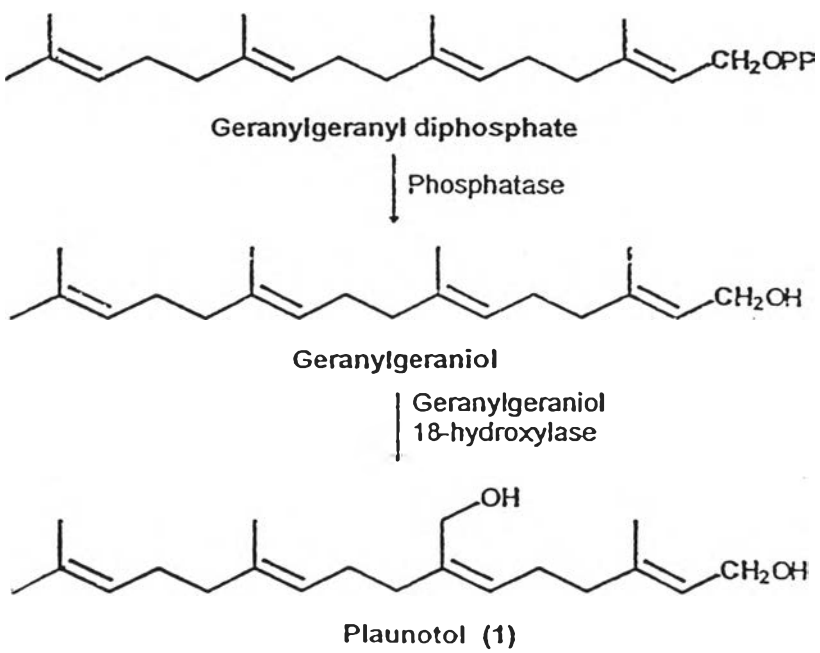
กระบวนการสังเคราะห์สารเปลาโนทอลในธรรมชาติ เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในใบเปล้าน้อย โดยยังไม่มีรายงานใดแสดงให้เห็นถึงขั้นตอนในการสังเคราะห์สารเปลาโนทอลในธรรมชาติ มีเพียงรายงานที่แสดงถึงสมมติฐานของการเกิดสารเปลาโนทอล ได้แก่ รายงานของ Kitaoka , Nagashima and Kamimura (1989) cited in Tansakul and De-Eknamkul (1998) ได้รายงานการค้นพบสารเจอรานิลเจอรานิออล (geranylgeraniol ; GGOH) ซึ่งเป็นสารที่มีการสะสมในขณะทำการทดลองเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของเปล้าน้อย สารดังกล่าวมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับรูปอย่างง่ายของสารเปลาโนทอล (18 - hydroxygeranylgeraniol) โดยเมื่อนำสารเจอรานิลเจอรานิออลมาผ่านกระบวนการ 18 - hydroxylation จะได้สาร 18 -hydroxygeranylgeraniol ซึ่งแสดงดังรูปที่ 1.3



รูปที่1.3 สมมติฐานการเกิดสารเปลาโนทอลจากเจอรานิลเจอรานิออล
(Tansakul and De-Eknamkul , 1998)

การศึกษาข้างต้นเป็นสมมติฐานที่อาจนำไปสู่การสังเคราะห์สารเปลาโนทอลด้วยกระบวนการทางชีววิธีที่อาจเป็นไปได้ เนื่องจากมีความสอดคล้องกับรายงานของ Loomis and Croteau (1981) cited in Tansakul and De - Eknamkul (1998) กล่าวถึงสารที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่นำไปสู่การสร้างสารไดเทอร์พินอยด์ (diterpenoid) ที่มีอยู่ในธรรมชาติทุกชนิด

สารตั้งต้นเหล่านั้นเป็นอนุพันธ์ของสาร GGOH เมื่อได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสาร GGOH พบว่า สาร GGOH เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นในธรรมชาติ และเป็นสารที่จะนำไปสู่วิถีทางของการเกิดเทอร์พินอยด์ (terpenoid) โดยมีสารเจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟต (geranylgeranyl diphosphate ; GGPP) เป็นสารตั้งต้นของการเกิดเทอร์พินอยด์ ดังนั้นจึงพอจะเป็นไปได้ที่สารเปลาโนทอลจะถูกสังเคราะห์จาก GGPP โดย GGPP จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัวแรกที่เข้ามาทำปฏิกิริยาด้วยการดึงกลุ่มฟอสเฟตออก เพื่อให้ได้สาร GGOH จากนั้นเอนไซม์ตัวที่สอง จะเข้าทำปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล ที่ C - 18 ก็จะได้สารเปลาโนทอล จากรายงานของ Tansakul and De-Eknamkul (1998) พบว่า เอนไซม์ตัวที่สอง ที่มีความเหมาะสมกับปฏิกิริยานี้ ควรเป็นเอนไซม์ geranylgeraniol - 18 - hydroxylase โดยได้ทำการทดลองเพื่อแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ geranylgeraniol - 18 - hydroxylase เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยานี้ซึ่งสามารถสกัดได้จากใบเปล้าน้อย และมีผลทำให้ได้สารที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับสารเปลาโนทอล ดังรูปที่ 1.4



รูปที่1.4 แสดงกระบวนการสังเคราะห์เปลาโนทอลด้วยกระบวนการทางชีววิธี

(Tansakul and De-Eknamkul , 1998)

1.5 มูลเหตุจูงใจ

เปล้าน้อย เป็นพืชที่มีความสำคัญในฐานะเป็นพืชสมุนไพรของไทยชนิดหนึ่ง ที่มีการใช้มาตั้งแต่อดีต ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเปล้าน้อยมาใช้ในการผลิตสารเปลาโนทอล ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปราศจากผลข้างเคียง โดยสารดังกล่าวสามารถทำการสกัดได้จากใบของเปล้าน้อย

เนื่องจากได้มีรายงานการเกิดโรคใบจุดขึ้นกับใบเปล้าน้อย หากใบที่นำมาใช้เกิดความผิดปกติขึ้น ก็อาจส่งผลต่อปริมาณสารเปลาโนทอลที่มีอยู่ในใบ ดังนั้นในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาผลของระดับความรุนแรงของโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *G. cingulata* ต่อปริมาณสาร เปลาโนทอลในใบโดยเปรียบเทียบกับปริมาณสารเปลาโนทอล ในใบเปล้าน้อยปกติต่อไป

1.6 ขอบเขตงานวิจัย

1. คัดเลือกและแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบจุด
2. ปลูกถ่ายเชื้อ และ ศึกษาระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่มีผลทำให้เกิดโรคใบจุดเปล้าน้อย
3. สกัดแยก และ วิเคราะห์หาปริมาณสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุดในระดับการเกิดโรคต่าง ๆ กัน และ ใบปกติ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของโรคและปริมาณสารเปลาโนทอลในใบ