บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของยางพารา

ผู้วิจัยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับละอองเกสรของดอกยางพารา เมล็ดอ่อน และข้อปล้องได้ และพบว่าแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากส่วนเมล็ดอ่อนของยางพารา มีลักษณะฟูใส สีเหลืองอ่อน เกาะกันหลวมๆ สามารถหลุดออกจากกันง่าย ขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักมากกว่าแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากอับละอองเกสรดอกยางพาราและข้อปล้อง และยังพบว่าอุณหภูมิ, สูตรอาหาร และชนิดแหล่งชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้ ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการสร้างการแคลลัส โดยแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากเมล็ดอ่อนนี้เหมาะสมที่นำมาใช้ในการทดสอบเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคในยางพาราอย่างยิ่ง แต่การนำแคลลัสชนิดนี้มาใช้ในการทดลองมีข้อจำกัดด้านวัตถุดิบ เนื่องจากเมล็ดอ่อนมีการติดผลเพียงปีละครั้งจึงทำให้ไม่สามารถทำงานวิจัยได้อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งไม่สามารถทำการทดสอบได้หลายพันธุ์ซึ่งต่างจากการใช้แคลลัสข้อปล้องที่สามารถทำได้หลากหลายพันธุ์ เพราะมีกิ่งพันธุ์เพียงพอ แต่แคลลัสที่ได้มีความสม่ำเสมอต่ำ จึงต้องทำการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงให้เหมาะสมต่อการชักนำต่อไป

ผลการศึกษาการสังเคราะห์ Scp โดยแคลลัส

จากการศึกษาการสังเคราะห์ Scp พบว่าแคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง) พันธุ์ต้านทานสามารถสังเคราะห์ Scp ได้มากกว่าแคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง) พันธุ์อ่อนแอ หลังถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิติน เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดอ่อนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์พบว่าแคลลัสมีการสร้าง Scp ต่ำกว่า เนื่องจากเมล็ดอ่อนมีลักษณะทางกายภาพที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน ซึ่งยากต่อการเจาะของซูโอสปอร์เชื้อราชนิดนี้ จึงทำให้เมล็ดอ่อนมีการสร้าง Scp ในปริมาณมากกว่าและมีอัตราเร็วในการสร้างช้ากว่าแคลลัสที่สามารถสร้างสูงสุดที่เวลา 16 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบด้วย
อิลิซิตินนั้นสามารถกระตุ้นให้แคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 มีการสร้าง Scp ได้มากกว่าพันธุ์ RRIM600 และมีอัตราเร็วในการสร้างสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง เร็วกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ เนื่องจากอิลิซิตินสามารถส่งสัญญาณโดยจับกับ receptor จึงทำให้แคลลัสมีการตอบสนองโดยสร้าง Scp อย่างรวดเร็วกว่าการเจาะของซูโอสปอร์จากเชื้อรา

สำหรับการทดสอบในแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากชิ้นส่วนพืชที่ต่างกันของยางพาราพบว่ามีการสังเคราะห์ Scp ในปริมาณที่แตกต่างกันและแปรผันตามระดับความต้านทานในแต่ละพันธุ์ โดยแคลลัสพันธุ์ต้านทานมีการสร้าง Scp มากกว่าพันธุ์อ่อนแอ ทั้งจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิติน แต่พบว่าแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) มีการสร้าง Scp (0.31 ± 0.01 μM) ต่ำกว่าแคลลัสข้อปล้อง (RRIM600) (0.56 ± 0.04 μM) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราเร็วในการสร้างที่เวลาเดียวคือที่เวลา 16 ชั่วโมง คาดว่าเนื้อเยื่อพืชน่าจะมีตัวรับที่ไวต่ออิลิซิเตอร์ (ซูโอสปอร์และอิลิซิติน) ได้ต่างกัน จึงทำให้เกิดการสร้าง Scp ในระดับที่ต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับ เมล็ดอ่อนและข้อปล้องพบว่า แคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง) มีอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ได้เร็วกว่าทั้งจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิติน สังเกตได้ว่าการทดสอบในแคลลัสสามารถลดความแปรปรวนจากชิ้นตัวอย่างได้มากกว่าการทดสอบในเมล็ดอ่อน, ข้อปล้องและใบซึ่งอาจมีการติดเชื้อในธรรมชาติมาก่อน

ผลการศึกษาการเกิด necrosis

แคลลัสเมล็ดอ่อนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 มีรอยไหม้สีน้ำตาลบริเวณรอบๆ แคลลัสซึ่งมีสีเข้มมากกว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 และการเกิดรอยไหม้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินมีลักษณะเดียวกับแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ รวมทั้งอิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้เกิดนีโครซีสได้เร็วกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์อีกด้วย

ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากการศึกษาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนส พบว่าอิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้แคลลัสพันธุ์ GT1 มีการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่าพันธุ์ RRIM600 และมากกว่าการถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ เนื่องจากอิลิซิตินมีการส่งสัญญาณโดยจับกับตัวรับ (receptor) ที่ plasma membrane จึงทำให้เซลล์พืชมีการตอบสนองได้อย่างรวดเร็วไม่เหมือนกับการเจาะของซูโอสปอร์ แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจนนัก และยังพบว่าอิลิซิตินสามารถกระตุ้นให้แคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยพบแถบไอโซไซม์ชัดเจนมากกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ และไม่พบการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าไอโซไซม์ที่ถูกสร้างนี้น่าเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค จากการศึกษาศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของแคลลัสที่มีต่อเชื้อรา *P. palmivora* เปรียบเทียบกับเมล็ดอ่อนและข้อ

ปล้องทำให้เข้าใจกลไกการเกิดโรคของยางพาราในระดับเซลล์ และน่าจะนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปศึกษาในระดับเซลล์ซัสเพนชันเพิ่มเติม เพื่อให้เข้าใจกลไกการเกิดโรคเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ในพืชชนิดอื่นๆ ให้มีความต้านทานโรคมากยิ่งขึ้น

ตารางสรุปการศึกษาการสังเคราะห์ Scp, PR-protein (เบต้า 1, 3-glucanase) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสเมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินจากเชื้อรา *P. palmivora*

พันธุ์ยาง	Scp (μM)		β 1,3-glucanase (μM /min/g)		Peroxidase (unit/ml)	
	zoospore	elicitin	zoospore	elicitin	zoospore	elicitin
GT1	2.17±0.11	0.38±0.07	0.32±0.02	0.38±0.02	642.67±141.42	2026.50±754.48
RRIM 600	0.31±0.01	0.10±0.03	0.22±0.01	0.19±0.01	69.67±11.79	326.94±213.94