การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) ที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *Phytophthora* สาเหตุโรคใบร่วงยางพารา

Selection of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) Cell Lines Resistance to a Culture Filtrate of Phytophthora Leaf Fall Agents

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์

Photchamarn Suraninpong

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science (Agriculture) Thesis in Plant Science

Prince of Songkla University

2538

เลขหมู่ SB608.H5 พ24 2538 ค.2

Bib Key 75525

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) ที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *Phytophthora* สาเหตุโรคใบร่วงยางพารา
ผู้เขียน	นางสาวพจมาลย์ สุรนิลพงศ์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสมอใจ ชื่นจิตต์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสมอใจ ชื่นจิตต์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) ที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *Phytophthora* สาเหตุโรคใบร่วงยางพารา
ผู้เขียน	นางสาวพจมาลย์ สุรนิลพงศ์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2537

บทคัดย่อ

การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) ที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อไฟทอปโทร่าสาเหตุโรคใบร่วงยางพารา ใช้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อน และเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* Butler. และเชื้อ *Phytophthora botryosa* Chee. ความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวิธีการเลี้ยงกระทำ 2 วิธี คือเลี้ยงโดยตรงในอาหารเติมสารจากเชื้อ และเขย่าเลี้ยงในอาหารเติมสารจากเชื้อที่ความเร็ว 55 รอบต่อนาที ก่อนเป็นเวลา 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ส่วนเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันใช้อายุและความหนาแน่นต่าง ๆ เลี้ยงโดยตรงในอาหารเติมสารจากเชื้อทั้งสองที่ระดับความเข้มข้นข้างต้น หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตรวจสอบความมีชีวิตของแคลลัสและกลไกการต้านทานทางชีวเคมีด้วยเทคนิคอิเลคโตรฟอริซีส

ผลการทดลองพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอายุ 3 สัปดาห์หลังย้ายเลี้ยง และเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 6 วัน หลังย้ายเลี้ยงมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเหมาะที่จะนำมาใช้เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ สารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนได้สูงที่สุด 75 และ 90.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สูงกว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 75 และ 25 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ 71.7 68.7 88.0 และ 82.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สารจากเชื้อ *P. botryosa* ทุกระดับความเข้มข้นยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 6 วัน และความหนาแน่น 1.5 มิลลิลิตร มีชีวิตรอดสูงที่สุดบนอาหารเติมสารจากเชื้อทุกระดับความเข้มข้น แต่เมื่อนำแคลลัสต้านทานที่ชักนำได้ไปศึกษาแถบโปรตีนและรูปแบบเอ็นไซม์พบว่าแถบโปรตีนและรูปแบบของเอ็นไซม์ไม่แตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบ ในขณะที่ผลการเขย่า

เลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวร่วมกับสารจากเชื้อทั้งสองก่อนย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารจากเชื้อเพิ่มขึ้นหรือเขย่าเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น สารจากเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส 73.67 และ 85.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความเข้มข้นและเวลาข้างต้นชักนำแคลลัสต้านทานให้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนได้ ซึ่งเมื่อศึกษารูปแบบไซโมแกรมเอ็นไซม์ peroxidase และเอ็นไซม์ acid phosphatase ระหว่างแคลลัสต้านทานและหน่วยทดลองเปรียบเทียบ พบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจน ในขณะที่แถบโปรตีนของสายพันธุ์แคลลัสต้านทานไม่แตกต่างจากแถบโปรตีนของหน่วยทดลองเปรียบเทียบ

Thesis Title	Selection of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) Cell Lines Resistance to a Culture Filtrate of Phytophthora Leaf Fall Agents
Author	Miss Photchamarn Suraninpong
Major Program	Plant Science
Academic Year	1994

Abstract

Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) cell lines resistance to a culture filtrate of phytophthora leaf fall agents was carried out by using embryogenic calli induced from integument and endosperm and embryogenic suspension derived from integument. The calli and suspension were cultured with culture filtrate of *Phytophthora palmivora* Butler. and *Phytophthora botryosa* Chee. at various concentrations. For the calli, 2 methods of co-culture were performed. One was cultured directly on medium containing culture filtrate. Another method, was pre-cultured in medium containing culture filtrate on shaker at 55 rpm for 12, 24, 48 and 72 hours and then transferred to culture on multiplication medium. In case of embryogenic suspension, various ages after subculture and densities were plated directly in medium containing culture filtrate. After culture with culture filtrate by above technique for 3 weeks, survival of calli was recorded and biochemical resistant mechanism of the calli was analysed by electrophoretic technique.

The results showed that embryogenic calli at 3 weeks after culture and embryogenic suspension at 6 days after subculture provided the best growth rate suited for treating with culture filtrate. Culture filtrate of *P. palmivora* at concentration 50% inhibited growth of integument-and endosperm-derived calli with 75.0% and 90.7% respectively, higher than concentrations 75% and 25% which inhibited growth with 71.7, 68.7, 88.0 and 82.7%, respectively. However, statistical difference was not found among those concentrations. Culture filtrate of *P. botryosa* at all concentrations inhibited growth of both calli with 100%. Embryogenic suspension at 6 days after subculture and density at 1.5 ml packed cell volume could survive the best when it was treated with *P. palmivora* at all

concentrations. However, survival calli showed no difference in protein and isoenzyme patterns in comparison with non-treated calli. By the way, pre-culture the calli with 50% culture filtrate of *P. botryosa* for 24 hours and 50% culture filtrate of *P. palmivora* for 48 hours before transferring to multiplication medium provided inhibition growth of the callus with 73.67 and 85.00%, respectively. These times and concentrations were able to induce mutation at gene level. From this study, it was clearly demonstrated that peroxidase and acid phophatase of treated and non-treated calli were distinguished. In case of crude protein, there was no difference between treated and non-treated calli.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต ท่านอาจารย์ที่ปรึกษาและผู้ประสิทธิประสาทวิชาการแขนงนี้แก่ข้าพเจ้า ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ทั้งในด้านการเรียน การดำเนินวิจัย การตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ กรรมการที่ปรึกษาและรองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ชวัญจิตร สันติประชา รวมถึงคณาจารย์ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา รวมถึงคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนบัณฑิตศึกษาในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ (NSTDA) และทุนอุดหนุนค้นคว้าวิจัยของนักศึกษาปริญญาโท ประจำปีงบประมาณ 2536 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล และอาบุหลัน เหล่าสุวรรณ สำหรับความกรุณา การดูแลเอาใจใส่ ตลอดถึงการให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาการศึกษา ขอขอบคุณอาจารย์เย็นจิตต์ ปียะแสงทอง และอาจารย์พรรณวดี จิตประสาน ที่ให้ความกรุณา ดูแลเอาใจใส่ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจในการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณกฤษณา กลับทับลังก์ คุณเมฆา ชาติกุล คุณอรุณี ม่วงแก้วงาม คุณสุภาณี ยงค์ คุณบุญมานพ พรหมทัตโต รวมถึงเจ้าหน้าที่ภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่-น้อง ญาติ ๆ และเพื่อน ๆ ที่สนิททุกท่าน ที่เป็นแรงกำลังใจให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ.....(3)

Abstract.....(5)

กิตติกรรมประกาศ.....(7)

สารบาญ.....(8)

รายการตาราง.....(9)

รายการภาพ.....(10)

ตัวย่อและสัญลักษณ์.....(12)

บทที่

1.บทนำ.....1

บทนำต้นเรื่อง.....1

การตรวจเอกสาร.....3

วัตถุประสงค์.....17

2.วิธีการวิจัย.....19

วัสดุ.....19

อุปกรณ์.....25

วิธีดำเนินการ.....26

3.ผล.....31

4.วิจารณ์.....62

5.สรุป.....68

เอกสารอ้างอิง.....70

ภาคผนวก.....81

ประวัติผู้เขียน.....86

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ชนิดและองค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดโปรตีน	29
2.	อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	31
3.	อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน	33
4.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน	36
5.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน	39
6.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด	42
7.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด	45
8.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด	50
9.	ผลของระยะเวลาการเขย่าเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	52
10.	ผลของอายุของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน	55
11.	ผลของความหนาแน่นของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน	57
12.	ผลของไอโซไซม์ต่อการตอบสนองการต้านทานต่อสารจากเชื้อเมื่อวิเคราะห์บนแผ่น polyacrylamide gel	60

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	การตัดและการวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนอายุ 8 สัปดาห์	20
2.	แคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	21
	ก. แคลลัสเริ่มแรกชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนอายุ 9 สัปดาห์	
	ข. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มอ่อนอายุ 9 สัปดาห์	
3.	ขั้นตอนการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและการย้ายเลี้ยง	22
4.	อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	32
5.	อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน	34
6.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิต ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน	37
7.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิต ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน	38
8.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาด ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน	40
9.	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ใหม่เจริญ ปกคลุมเซลล์เดิมซึ่งเป็นเซลล์ที่มีสีน้ำตาล	41
10.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด	43
11.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิต ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด	44
12.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาด ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด	46
13.	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสซึ่งประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ใหม่สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลมเกาะกันอย่างหลวม ๆ (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ)	48
14	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสซึ่งประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์สีเหลืองเข้ม เกาะกันแน่นและมีสารชีวเคมีสีขาวขุ่นบริเวณรอบแคลลัส	48

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15.	ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด	51
16.	ผลของระยะเวลาการแช่เลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	53
17.	ผลของอายุเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน	56
18.	ผลของความหนาแน่นเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน	58
19.	รูปแบบโปรตีนของแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง	59
20.	รูปแบบไซโมแกรมเอ็นไซม์ peroxidase ของแคลลัสเลี้ยงร่วมกับ *P.* spp. (ก) สารจากเชื้อ *P. botryosa* ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ข) สารจากเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่ต่างกัน	61
21.	รูปแบบไซโมแกรมเอ็นไซม์ (ก) proxidase (ข) acid phosphatase ของแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่ต่างกัน	61

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
3,4-D	=	3,4-dichlorophenoxyacetic acid
ACP	=	acid phosphatase
ADH	=	alcohol dehydrogenase
AKP	=	alkaline phosphatase
B5	=	Gamborg medium
BA	=	6-benzyladinine
DMRT	=	Duncan's Multiple Range Test
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
EST	=	esterase
GA_3	=	gibberellic acid
GDH	=	glutamate dehydrogenase
G-6PD	=	glucose-6-phosphatase dehydrogenase
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	indole-3-butyric acid
KN	=	kinetin
LM	=	Litvay medium
M	=	molarity
MB	=	Murashige and Borger medium
MDH	=	malate dehydrogenase
mM	=	millimolar
MS	=	Murashige and Skoog medium
MSO	=	methionine sulfoximine
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
N&N	=	Nitsch and Nitsch medium
NOA	=	2-naphtoxyacetic acid
PCV	=	packed cell volume

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

PDA	=	potato dextrose agar
PEG	=	polyethyleneglycol
PER	=	peroxidase
pH	=	-log hydrogen ion concentration
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RT	=	Rubber Tree medium
SH	=	Schenk and Hildebrandt medium
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชที่ให้น้ำยางมากที่สุดในบรรดาพืชให้น้ำยาง 12,500 ชนิด เป็นไม้ยืนต้นซึ่งมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แต่ปัจจุบันทวีปเอเชียเป็นแหล่งที่ปลูกยางพารามากที่สุด และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะประเทศไทย (เสริมลาภ วสุวัต, 2531) ในปี พ.ศ. 2535 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพารารวมทั้งสิ้น 10.97 ล้านไร่ พื้นที่จำนวนนี้เป็นพื้นที่ปลูกยางใน 14 จังหวัดภาคใต้ 9.71 ล้านไร่ พื้นที่ปลูกยางใน 3 จังหวัดภาคตะวันออก 1.07 ล้านไร่ และพื้นที่ปลูกยางในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 0.19 ล้านไร่ ผลผลิตยางรวมทั้งสิ้น 1.46 ล้านตันคิดเป็นมูลค่าประมาณ 30,000 ล้านบาท ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมากที่สุดเป็นอันดับหนึ่งของโลกเป็นปีที่สอง ผลิตเพิ่มขึ้นจากปี 2534 ซึ่งผลิตได้ 1.34 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 26,000 ล้านบาท (จำนงค์ คงศิลปี, 2536) และมีแนวโน้มที่จะผลิตเพิ่มขึ้นในปีต่อมา เนื่องจากการพัฒนาการปลูกยางพันธุ์ดีทดแทนพันธุ์พื้นเมือง การขยายพื้นที่ปลูกยางทางภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคยางพารา ตามโครงการป้องกันกำจัดโรคยางพารา เช่น โรคใบร่วงไฟทอปโทร่า โรคใบจุดก้างปลา โรคใบจุดคลอเลโทตริกัม โรคเปลือกแห้ง โรคเส้นดำ และโรคสีชมพู (จำนงค์ คงศิลปี, 2535)

เนื่องจากยางพาราเป็นพืชที่ให้น้ำยางได้เป็นเวลาถึง 30 ปี หากได้รับการดูแลรักษาที่ดี ดังนั้นต้นยางทุกสวนอาจแสดงอาการผิดปกติหรือเป็นโรคในระยะใดระยะหนึ่งได้ โรคยางพาราที่เกิดขึ้นเป็นประจำมีระดับความรุนแรงของโรคมากน้อยแตกต่างกันไปตามแหล่งปลูกและแตกต่างกันไปในแต่ละปี แต่โรคที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมยางพาราที่สำคัญของประเทศไทยคือโรคใบร่วง ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* Butler. และ *Phytophthora botryosa* Chee. เชื้อราทั้งสองชนิดนี้สามารถเข้าทำลายต้นยางพาราได้ทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นใบอ่อน ใบโตเต็มที่ ใบแก่ ก้านใบ ผลอ่อน ผลที่โตเต็มที่ และหน้ากรีดของยาง โดยก่อให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปตามส่วนของพืช เมื่อเชื้อราเข้าทำลายใบจะก่อให้เกิดจุดแผลสีเทาเข้มค่อนข้างกลม ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้นมีลักษณะไม่แน่นอน ขอบไม่เรียบ เมื่อแผลมาชนกันก่อ

ให้เกิดรอยแผลสีดำขนาดใหญ่ทำให้ใบเหี่ยวและร่วง จากนั้นอาการจะลุกลามไปยังก้านใบ เกิดรอยแผลเป็นทางดำที่ส่วนล่างของก้านใบ และมีคราบน้ำยางบริเวณกลางแผลทำให้ก้านใบร่วงหลุดจากต้น ถ้าอาการรุนแรงเชื้อจะเข้าทำลายยอดอ่อนทำให้ยอดเน่าเป็นสีน้ำตาลและเกิดอาการเน่าตายลามลงไป ในกรณีที่ต้นยางอ่อนเชื้อราจะเข้าทำลายบริเวณยอดอ่อนทำให้เกิดแผลชุ่มน้ำสีดำ และเกิดการตายจากยอดจนถึงลำต้น จากนั้นเชื้อจะลุกลามเข้าทำลายก้านใบและแผ่นใบในที่สุด ถ้าเชื้อเข้าทำลายลำต้นจะทำให้เปลือกบวมพอง และแตกออกเห็นเป็นสะเก็ดแผลซึ่งเมื่อดึงเปลือกออกจะพบแผลสีน้ำตาลเข้มที่เนื้อไม้ บางครั้งแผลที่เปลือกจะเน่าเห็นเป็นสีดำ นอกจากนี้เชื้อสาเหตุสามารถเข้าทำลายผลยางพาราได้ทั้งผลแก่และผลอ่อน โดยก่อให้เกิดแผลเน่าสีดำชุ่มน้ำแล้วทำให้ผลหลุดร่วงจากลำต้น ต่อมาภายหลังจากเกิดโรคใบร่วงแล้วประมาณ 1-2 เดือน เชื้อราจะแพร่กระจายอยู่ทั่วไป และเข้าทำลายหน้ากรีดยางจนเกิดอาการเน่าเสียทำการกรีดไม่ได้ สภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงนั้นพบว่าขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและจำนวนวันฝนตกเป็นปัจจัยสำคัญ โดยปกติโรคจะเกิดอย่างกว้างขวางและรุนแรงในระยะที่มีฝนตกหนักติดต่อกันเป็นเวลาหลาย ๆ วัน ในบริเวณที่มีเชื้อราชนิดนี้ระบาดอยู่ (ประภา พัฒนกุล, 2532; พงษ์เทพ ขจรไชยกุล, 2523; สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2527) พงษ์เทพ ขจรไชยกุล (2520) รายงานว่าในประเทศไทยพบต้นยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงระบาดมากระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายนของทุก ๆ ปี โดยสังเกตพบบริเวณจังหวัดชายฝั่งตะวันตก ซึ่งได้แก่ จังหวัดพังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และ สตูล ก่อนบริเวณจังหวัดชายฝั่งตะวันออก ซึ่งได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา ทั้งนี้เนื่องจากฤดูกาลของลมมรสุมที่เกิดขึ้นก่อนนั้นเอง สำหรับความรุนแรงของโรคนี้ในปี พ.ศ. 2519 มีรายงานว่ามีโรคใบร่วงระบาดอย่างกว้างขวางและรุนแรง เป็นพื้นที่มากกว่า 600,000 ไร่ (พงษ์เทพ ขจรไชยกุล, 2520) ในปี พ.ศ. 2522 ประมาณเดือนกรกฎาคม พบโรคผลเน่า และโรคใบร่วงเกิดขึ้นในระดับที่รุนแรงมากในพื้นที่ปลูกยางเขตจังหวัดระนองและพังงา เป็นพื้นที่ประมาณ 12,000 ไร่ และพบว่ายางพันธุ์ GT 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบร่วง เกิดอาการใบร่วงถึงร้อยละ 90 ของพุ่มใบปกติ คิดเป็นเนื้อที่มากกว่า 500 ไร่ (พงษ์เทพ ขจรไชยกุล, 2523) การป้องกันและรักษาโรคใบร่วงสำหรับต้นยางอายุน้อยกว่า 2 ปี แนะนำให้ใช้สารเคมี metalaxyl ผสมน้ำอัตราส่วน 2 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ฉีดพุ่มใบระหว่างที่เกิดโรคทุกสัปดาห์ ส่วนต้นยางขนาดใหญ่ให้ใส่ปุ๋ยเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน และเร่งความเจริญเติบโตของต้นยาง แต่วิธีที่ได้ผลดีที่สุด คือการใช้พันธุ์ต้านทานเช่น GT 1 (ประภา พัฒนกุล, 2532) อย่างไรก็ตามเนื่องจากพันธุ์ GT 1 ต้านทานต่อโรคได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราให้มีความต้านทานต่อโรคใบร่วงเพิ่มขึ้น การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราที่ยึดถือ

ปฏิบัติกันเป็นส่วนใหญ่ในขณะนี้เป็นการคัดเลือกพันธุ์และการผสมพันธุ์ วิธีดังกล่าวต้องใช้พื้นที่ปลูกมาก ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง และประสบผลสำเร็จต่ำคือ ต่ำกว่าร้อยละ 5 (Carron, *et al.* , 1989) การใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่เช่นการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ การผสมพันธุ์เซลล์โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ และการผสมผสานยีน ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดความแปรปรวนของเซลล์ร่างกาย ทำให้แหล่งของยีนกว้างขึ้นเพิ่มขอบเขตการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคมากขึ้น

ดังนั้นการทดลองนี้จึงมุ่งศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองให้ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *P. palmivora* Butler. และ *P. botryosa* Chee. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบร่วงโดยวิธีการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนร่วมกับสารจากเชื้อ ทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบโปรตีนของสายพันธุ์แคลลัสต้านทานด้วยวิธีอิเลคโตรฟอริซีส และชักนำสายพันธุ์แคลลัสต้านทานให้เป็นพืชต้นใหม่ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่เพิ่มความสำเร็จในการคัดเลือกพืชยืนต้นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจให้ต้านทานต่อโรค

การตรวจเอกสาร

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราในสภาพปลอดเชื้อ

ยางพาราเป็นพืชยืนต้นผสมข้ามสามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยวิธีอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการรวมตัวของยีนแบบสุ่ม ดังนั้นลูกผสมที่เกิดขึ้นจึงมีลักษณะแตกต่างไปจากพันธุ์เดิม ส่วนการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีไมโตรคัดติ้งและกระบวนการโซมาติคเอ็มบริโอเจนีซีส ผลิตพืชที่ตรงตามสายพันธุ์ ให้ผลผลิตสูง ปรับตัวได้ดีต่อระบบนิเวศที่ปลูกดั้งเดิม และเป็นที่มาของการศึกษาด้านพันธุวิศวกรรม

1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราเริ่มขึ้นครั้งแรกโดย Bouychou (1953) อ้างโดย Carron, *et al.* (1989) มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้แคลลัสเป็นเครื่องมือในการศึกษาระบบการผลิตน้ำยางในระดับเซลล์ ต่อมา Chua (1966) อ้างโดย Carron, *et al.* (1989) ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยงและลำต้นของต้นกล้ายางพาราบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog medium) และรายงานว่าความดันออสโมติคและ pH ของอาหารมีผลต่อการชักนำการเจริญเติบโตของแคลลัส อาหารเติมน้ำตาลซูโครสชักนำการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส แมนโนสหรือ

ฟรุกโตส Paranjothy และ Ghandimathi (1975) อ้างโดย Chen (1984) ทำการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้ายางพารา พบว่าแคลลัสที่ชักนำได้จากบางชิ้นส่วนไม่สูญเสียสภาพเมื่อย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารใหม่ และสังเกตเห็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร Wilson และ Street (1975) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นของต้นกล้ายางพาราบนอาหารวุ้นสูตร MS เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย KN (Kinetin) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด สภาพการเลี้ยงนี้สามารถรักษาแคลลัสไว้ได้ 4-5 สัปดาห์ แคลลัสที่ชักนำได้ประกอบด้วยเซลล์สีเหลืองอ่อนซึ่งเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์สีน้ำตาลซึ่งเป็นเซลล์ที่ตาย เรียกแคลลัสนี้ว่า แคลลัสโอ (O callus) แคลลัสนี้อายุ 21 วัน เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยง ได้เซลล์ที่แตกเป็นก้อนเล็ก ๆ ซึ่งเมื่อย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารวุ้นอีกครั้ง พบว่าสามารถชักนำแคลลัสชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยเซลล์สีเหลืองอ่อนมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเรียกแคลลัสนี้ว่า แคลลัสอาร์ (R callus) ซึ่งเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม วางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3-6 เดือน เซลล์บางเซลล์มีการแบ่งตัวเป็นกลุ่มก้อนคล้ายเอ็มบริออยด์ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถชักนำเอ็มบริออยด์เหล่านี้ให้เป็นพืชต้นใหม่ได้ Wilson, *et al.* (1976) รายงานว่าการเขย่าเลี้ยงแคลลัสยางพาราในอาหารเหลวเติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน สามารถรักษาสภาพดิพลอยด์ของเซลล์ไว้ได้ ช่วงเวลาการเลี้ยงที่นานกว่านี้ทำให้ชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากปกติมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่เพาะเลี้ยง จากการศึกษาที่ผ่านมาแม้ว่าจะไม่ประสบผลสำเร็จในการชักนำยางพาราให้เป็นพืชต้นใหม่ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อยางพารายังคงดำเนินต่อไป ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์ยางพาราในอนาคต

1.2 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตพืชสายพันธุ์แท้ (inbred line) และสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line) ทั้งนี้เพื่อต้องการเพิ่มวัสดุพืชไว้ใช้ในการคัดเลือกหรือนำไปผสมกับพันธุ์อื่นเพื่อให้ได้พันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะดีเด่นเหนือพ่อแม่ (heterosis) การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพาราเริ่มโดย Satchuthananthavale และ Irugalbandara (1972) อ้างโดย Chen (1984) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสได้จากการวางเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารเป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ แคลลัสที่ชักนำได้สามารถมีชีวิตได้เป็นเวลามากกว่า 6 เดือน เมื่อทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ เดือน Chen, et al. (1978) รายงานว่าหลังจากเริ่มทำการ

วางเลี้ยงอับละอองเกสรในปี ค.ศ. 1973 ผลการทดลองประสบผลสำเร็จในปี ค.ศ. 1979 ได้พืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จำนวน 5 ต้น ต่อมา Wang, *et al.* (1980) รายงานว่าพืชต้นใหม่ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรจำนวน 113 ต้น มีกำเนิดมาจากผนังอับละอองเกสรไม่ใช่ละอองเกสรอย่างที่เข้าใจ Chen, *et al.* (1982) พบว่าองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ชักนำแคลัสและเอ็มบริออยด์จากอับละอองเกสรมีผลต่อการชักนำพืชต้นใหม่ หากมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหารบางตัว โดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตให้มีระดับความเข้มข้นสูงในอาหารสูตรชักนำแคลัสและลดความเข้มข้นให้ต่ำลงในอาหารสูตรชักนำเอ็มบริออยด์ ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณเอ็มบริออยด์ Guo, *et al.* (1982) อ้างโดย Chen (1984) ประสบผลสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่ที่มีโครโมโซม 1 ชุด จากการวางเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมบนอาหารสูตร MS หรือ MB (Murashige and Borger medium) เติม KN เข้มข้น 2.3-5.5 ไมโครโมลาร์ 2,4-D เข้มข้น 2.3-5.4 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 149-292 มิลลิโมลาร์ และน้ำมะพร้าวเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 เป็นเวลา 50-60 วัน แคลลัสที่ชักนำได้เมื่อย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม KN เข้มข้น 2.3-4.6 ไมโครโมลาร์ และ NAA (1-naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 0-11.0 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 60 วัน ชักนำเอ็มบริออยด์ได้และเมื่อย้ายเอ็มบริออยด์ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม GA_3 (gibberellic acid) เข้มข้น 1.4-7.2 ไมโครโมลาร์ ชักนำการงอกได้ Chen, *et al.* (1983) รายงานว่าการเก็บดอกยางไว้ที่อุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงส่งเสริมการชักนำการสร้างแคลลัสจากละอองเกสร และยับยั้งการสร้างแคลลัสจากผนังอับละอองเกสร สมปอง เตชะโต และวัทนา เอ้งย่อง (2531) รายงานว่าการเก็บดอกยางพาราช่วงที่มีการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ uninucleate ถึง late uninucleate ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งเสริมการชักนำแคลลัสได้ดีกว่าการตัดแยกแล้ววางเลี้ยงทันที นอกจากนี้ได้รายงานความสำเร็จในการชักนำละอองเกสรยางพาราพันธุ์ PR 225 และ RRIM 600 ให้เป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ สุเทพ ชูช่วย (2534) รายงานว่าสามารถชักนำอับละอองเกสรให้เป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ โดยวางเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตร RT (Rubber Tree medium) เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และเจลไรท์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม KN เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ชักนำเอ็มบริออยด์ได้ และเมื่อย้ายเอ็มบริออยด์ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงเติม BA (6-benzyladenine) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถ

ชักนำต้นที่สมบูรณ์ได้

1.3 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตพืชที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ (south american leaf blight) ที่เกิดจากเชื้อ *Microcyclus ulei* โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Hevea pauciflera* ซึ่งเป็นยางพาราที่มียีนต้านทานต่อเชื้อ กับ *H. brasiliensis* ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่มีลักษณะทางเศรษฐกิจตามที่ต้องการ (Chen, 1984) Cailloux และ Lleras (1979) อ้างโดย Carron, *et al.* (1989) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของ *H. pauciflera* และ *H. brasiliensis* โดยใช้เอ็นไซม์ เซลลูเลสโอโนซูกะ R-10 ไดรเซลูเลส และ มาเซอโรไซน์ R-10 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้นำมารวมกันโดยใช้ PEG (polyethyleneglycol) 4,000 เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ได้โปรโตพลาสต์ลูกผสมประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ของโปรโตพลาสต์ทั้งหมด แต่ไม่ประสบผลสำเร็จในการชักนำโปรโตพลาสต์ให้เป็นพืชต้นใหม่ Othman และ Paranjothy (1980) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อไส้กลาง (pith) ของยอดอ่อน และจากแคลลัสที่ชักนำจากอับละอองเกสรโดยใช้เอ็นไซม์เพคติเนส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส โปรโตพลาสต์ที่แยกได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติมเคซีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมไนเตรทเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และแมนนิทอลเข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ pH 6.8 แต่ไม่มีรายงานความสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่

1.4 การเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

การชักนำยางพาราให้เป็นพืชต้นใหม่โดยผ่านกระบวนการโซมาติคเอ็มบริโอเจนีซีส (somatic embryogenesis) เป็นการนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชมาวางเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำพืชต้นใหม่ โดยผ่านขั้นตอนของแคลลัส และเอ็มบริออยด์ การศึกษาการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารารายงานโดย Carron, *et al.* (1984) บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA (indole-3-acetic acid) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ชักนำได้เมื่อย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเติม NOA (2-naphtoxyacetic acid) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5-6 เดือน โดยไม่ทำการย้ายเลี้ยง สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จในการชักนำพืชต้นใหม่ Carron และ Enjalric (1985) รายงานความสำเร็จในการชักนำยางพาราต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของผลอ่อนยางพาราอายุ 45-75 วัน หลังผสมเกสรบนอาหาร 3 สูตร สูตรชักนำแคลลัสคือสูตร MH1 ซึ่งเป็นสูตรดัดแปลง MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2

มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ สูตรชักนำเอ็มบริออยด์คือสูตร MH2 ลดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสลงเหลือ 3 เปอร์เซ็นต์ และสูตรชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์คือสูตร MH3 เติม NOA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำต้นที่สมบูรณ์ Michaux-Ferriere และ Carron 1989) รายงานการชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 20-30 วัน เมื่อย้ายแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมอีกครั้งสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ ในขณะที่การวางเลี้ยงบนอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 40 วัน ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาต่อไปได้ Auboiron, *et al.* (1990) รายงานว่าก๊าซเอทธิลีนมีผลยับยั้งพัฒนาการของแคลลัสและกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส ดังนั้นการลดปริมาณก๊าซเอทธิลีนและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการพัฒนาของแคลลัสส่งเสริมความสำเร็จในการชักนำแคลลัสยางพาราให้เป็นพืชต้นใหม่ El Hadrami, *et al.* (1991) รายงานว่าสามารถชักนำยางพาราต้นใหม่ได้จากการวางเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอายุ 40 วัน บนอาหารสูตร MH1 เติม 3,4-D (3,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ BA ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 4.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 วัน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้เมื่อย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH2 ลดความเข้มข้นของ 3,4-D และ BA ลงเหลืออย่างละ 0.45 ไมโครโมลาร์ วางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 40 วัน โดยทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 20 วัน สามารถชักนำพืชต้นใหม่ได้จำนวนมาก และเสนอแนะว่าสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารแต่ละระยะการพัฒนาของแคลลัสมีผลต่อการชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส El Hadrami และ D' Auzac (1992) รายงานว่าสามารถชักนำยางพาราต้นใหม่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอายุ 40 วัน ที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด บนอาหารสูตร MH1 เติม 3,4-D และ BA ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 4.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 40 วัน โดยทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 20 วัน จากนั้นย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH2 เติม NOA เข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย BA เข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 40 วัน โดยทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 20 วัน สามารถชักนำต้นที่สมบูรณ์ได้ Michaux-Ferriere, *et al.* (1992) เพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MH1 เป็นเวลา 90 วัน โดยทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 30 วัน สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 30-40 เปอร์เซ็นต์ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้มีกำเนิดมาจากกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญบริเวณผิวของแคลลัส Montora, *et al.* (1993) พบว่าแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH หรือ MS เติม 3,4-D และ BA ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.45 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น

351 มิลลิโมลาร์และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 50 วัน แล้วทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 25 วัน ประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งเหมาะต่อการนำไปชักนำเซลล์ซัสเพนชัน สมปอง เตชะโต และเมฆา ชาติกุล (2537) รายงานว่าสามารถชักนำแคลลัสจากการวางเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราอายุ 8 สัปดาห์ หลังผสมเกสรบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D และ BA ความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน เมื่อย้ายแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมลดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสลงเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ และย้ายเลี้ยงทุก ๆ 30 วัน เป็นเวลา 60 วัน ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ และเมื่อย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทและโปตัสเซียมไนเตรทลงครึ่งหนึ่ง ใช้น้ำตาลกลูโคสแทนน้ำตาลซูโครส ส่งเสริมการสร้างเอ็มบริออยด์ เมื่อย้ายเอ็มบริออยด์ระยะสร้างใบเลี้ยงไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่งเติมผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตรเดียวกันปราศจากผงถ่าน เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย KN เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์เป็นต้นที่สมบูรณ์

1.5 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อเป็นการนำชิ้นส่วนที่ประกอบด้วยตาข้าง มาวางเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้มีการแตกตาเป็นยอดใหม่ ดังนั้นต้นใหม่ที่ชักนำได้จึงเป็นต้นที่ตรงตามพันธุ์ เทคนิคพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อมีรายงานโดย Enjalric และ Carron (1982) นำชิ้นส่วนข้อซึ่งประกอบด้วยข้อ 1 ข้อ ของต้นกล้าอายุ 1-3 ปี ซึ่งปลูกและดูแลในเรือนทดลอง มาฟอกฆ่าเชื้อครั้งแรกในแอลกอฮอล์ ครั้งที่สองในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ชิ้นส่วนที่ได้เมื่อนำไปวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงพบว่ามีการปนเปื้อน 60-100 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ ต่อมา Carron, *et al.* (1984) นำชิ้นส่วนยอดขนาด 30-40 มิลลิเมตร ซึ่งเพาะจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาจุ่มแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย IBA (indole-3-buytric acid) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนยอดไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมผงถ่านเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ยอดรวมที่ชักนำได้ตัดแยกออกเป็นยอดเดี่ยวแล้วนำมาจุ่มแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย IBA และ NAA เข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และลดความเข้มข้นของ

ผงถ่านลงเหลือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำราก วิธีดังกล่าวสามารถชักนำพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ในเวลา 3-4 เดือน Chen (1984) รายงานว่าการวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของลำต้นยางพาราบนอาหารสูตร N&N (Nitsch and Nitsch medium) ดัดแปลงเติม โปตัสเซียมไนเตรทเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมการพัฒนาของตายอด การวางเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของต้นกล้าอายุ 2-4 สัปดาห์ ที่เพาะจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS เติม เคซีนไฮโดรไลเซท ส่งเสริมการชักนำราก ปัทมา ชนะสงคราม และภัทธาวุธ จิวตระกูล (2535) วางเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของต้นกล้ายางพาราบนอาหารสูตร MB เติม IBA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1-2 เดือน จากนั้นตัดแยกต้นมาจุ่มแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย IBA และ NAA เข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 วัน ย้ายต้นไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและเติมหรือไม่เติมผงถ่านเพื่อชักนำราก รากที่ชักนำได้เป็นระบบรากแขนงมากกว่าระบบรากแก้ว สมปอง เตชะโต และอรุณี ม่วงแก้วงาม (2535) รายงานว่าจากการวางเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดและชิ้นส่วนข้อยางพาราพันธุ์ GT 1 PB 5/51 และพันธุ์พื้นเมือง บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 3.37-5.63 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3-4 ยอดต่อชิ้นส่วนที่เลี้ยง ยอดที่ได้เมื่อย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารเติม IBA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำราก และได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์

2. กลไกของความต้านทานโรคในพืช

การเกิดโรคของพืชต้องประกอบด้วยปัจจัย 3 ประการ ที่เรียกว่า สามเหลี่ยมแห่งการเกิดโรค คือ พืชที่อ่อนแอ เชื้อโรคที่รุนแรง และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม มามีความสัมพันธ์กันภายใต้เวลาและสถานที่ที่เหมาะสม ดังนั้นกลไกในการเกิดโรคจึงเป็นผลมาจากปฏิกิริยาสัมพันธ์ร่วมกันเพื่อความอยู่รอดระหว่างพืชและเชื้อโรค ผลของปฏิกิริยาปรากฏออกมาให้เห็นเป็นอาการของโรคและความเสียหายของพืช เมื่อเชื้อโรคมาสัมผัสที่ผิวของพืช เชื้อโรคจะสร้างและปล่อยเอ็นไซม์ออกมาย่อยผนังเซลล์พืช พืชบางชนิดมีกลไกการป้องกันและยับยั้งการเข้าไปอาศัยอยู่ของเชื้อในพืช ในขณะที่พืชบางชนิดไม่มี เมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในพืชพืชมีสัญญาณรับรู้สิ่งแปลกปลอมดังกล่าวแล้วกระตุ้นกิจกรรมภายในเซลล์ให้เปลี่ยนไปจากปกติ สัญญาณที่กล่าวข้างต้นคือ mRNA ภายในเซลล์แปลรหัสการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสมสารประเภท ลิกนิน ฟีนอล และเซลล์ลูโลส สะสมที่ผนังเซลล์เพื่อยับยั้งการแพร่ของเชื้อไปยังเซลล์อื่น ๆ หรือสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือเป็นพิษต่อเชื้อโดยตรง (phytoalexin) ซึ่งเป็นสารที่โดยปกติ

ไม่มีอยู่ในพืช สารเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยยีนควบคุมปฏิกิริยาความต้านทานโรคของพืช เมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อซึ่งมีพันธุกรรมที่ควบคุมเกี่ยวกับความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเท่านั้น ปฏิกิริยาการรวมกันได้และการรวมกันไม่ได้ของโปรตีนจากเชื้อที่เหนี่ยวนำให้พืชสร้างโปรตีนขึ้นตามกระตุ้นให้พืชอาศัยต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุของโรค เนื่องจากกลไกความต้านทานโรคของพืชหนึ่ง ๆ ถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นความสามารถในการชักนำพืชอ่อนแอให้มียีนที่ก่อให้เกิดลักษณะที่ต้านทานต่อโรค จึงเป็นแนวทางหนึ่งของโครงการปรับปรุงพืชให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรค (ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, 2522; ไพโรจน์ จ๋วงพานิช, 2522; ณรงศ์ สิงห์บุระอุดม, 2529)

3. การคัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคในสภาพปลอดเชื้อ

โดยทั่วไปรายงานความสำเร็จในการปรับปรุงพืชให้ต้านทานต่อโรคนิยมเพาะเลี้ยงแคลลัสหรือซัสเพนชันเซลล์ร่วมกับเชื้อสาเหตุของโรค สารจากเชื้อ สารพิษจากเชื้อ และสารเคมีซึ่งเป็นสารอนุพันธุ์ของเชื้อ

3.1 การคัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุ

การคัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุในสภาพปลอดเชื้อ โดยส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช ศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสภายหลังปลูกเชื้อ Holliday และ Klarman (1979) ทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *sojae* โดยใช้สปอร์ของเชื้อจำนวน 10 สปอร์ต่อแคลลัส ปลูกบนแคลลัสของถั่วเหลืองขนาด 1.0 2.5 5.0 และ 10.0 มิลลิเมตร ซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 (Gamborg medium) เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 2 6 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 16 และ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสต้านทานคือการนำแคลลัสขนาด 5 มิลลิเมตร มาวางเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 6 หรือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส Miller, *et al.* (1984) ทำการปลูกเชื้อ *P. megasperma* f. sp. *medicaginis* โดยใช้เส้นใยของเชื้อ บนแคลลัสของอัลฟัลฟาซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารสูตร SH (Schenk and Hildebrandt medium) เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN 4 ระดับความเข้มข้นคือ 0.5 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน พบว่าระดับความต้านทานของแคลลัสต่อเชื้อขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ KN ในอาหาร แคลลัสมีระดับความต้านทานลดลงเมื่อความเข้มข้นของ KN ในอาหารลดลง KN ระดับความเข้มข้นต่ำ 2

มิลลิกรัมต่อลิตร จำเป็นสำหรับการแสดงออกถึงความต้านทานของแคลลัสผู้วิจัยยังเสนอแนะว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ สามารถนำมาศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการคัดเลือกแคลลัสอัลฟัลฟาให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคได้ Vidhyasekaran, *et al.* (1991) ทำการปลูกเชื้อ *Helmithosporium oryzae* โดยใช้สปอร์จำนวน 2 4 6 8 และ 10 สปอร์ต่อแคลลัส บนแคลลัสของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 10 20 และ 30 มิลลิเมตร ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสต้านทานคือการปลูกสปอร์จำนวน 2 สปอร์ต่อแคลลัส บนแคลลัสขนาด 5 หรือ 10 มิลลิเมตร และเสนอแนะว่าความสำเร็จในการคัดเลือกแคลลัสข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ให้ต้านทานต่อเชื้อ *H. oryzae* ขึ้นอยู่กับจำนวนสปอร์ต่อแคลลัส ขนาดของแคลลัส และระยะเวลาการปลูกเชื้อ ต่อมา Jang และ Tainter (1991) ทำการปลูกเชื้อ *P. cinnamoni* โดยใช้เส้นใย บนแคลลัสของ Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตร ซึ่งวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และสูตร LM (Litvay medium) เติม 2,4-D BA หรือ NAA ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 24 26 หรือ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 10^{-5} ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับชักนำแคลลัสต้านทานและเสนอแนะว่าความสำเร็จในการคัดเลือกพืชต้านทานต้นใหม่ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง

3.2 การคัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อสารจากเชื้อ

Behnke (1979, 1980 a and b) ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกแคลลัสซึ่งชักนำจากใบอ่อนของมันฝรั่งให้ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *P. infestans* และ เชื้อ *Fusarium oxysporum* พืชต้านทานต้นใหม่ที่ชักนำได้มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุในสภาพแปลงปลูกเพิ่มขึ้น และแคลลัสที่ชักนำได้จากพืชต้านทานต้นใหม่มีความต้านทานต่อสารจากเชื้อคงเดิมเมื่อนำมาคัดเลือกในรอบที่ 2 ในทำนองเดียวกัน Hartman, *et al.* (1984) รายงานว่า 1) แคลลัสซึ่งชักนำจากรังไข่ของช่อดอกอัลฟัลฟาวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* สามารถรักษาลักษณะต้านทานต่อสารจากเชื้อได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารจากเชื้อ 2) แคลลัสที่ชักนำจากพืชต้านทานต้นใหม่มีระดับความต้านทานคงเดิม 3) พืชต้านทานต้นใหม่มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุในสภาพแปลงปลูกเพิ่มขึ้น ส่วน Gray, *et al.* (1986) พบว่าแคลลัสของถั่วเหลืองที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *Phialophora gregata* สายเชื้อรุนแรงและสายเชื้ออ่อนแอตอบสนองต่อสารเชื้อในลักษณะเดียวกับความต้านทานในสภาพแปลงปลูก ในขณะที่แคลลัสของยาสูบวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อตัวเดียวกันนี้ และแคลลัสของถั่วเหลืองที่วาง

เลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุไม่ตอบสนองต่อสารจากเชื้อ และเสนอแนะว่าการเกิดโรคเป็นปฏิกิริยาที่เฉพาะระหว่างพืชกับเชื้อสาเหตุ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อสามารถนำมาใช้ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างพืชกับเชื้อได้ Vardi, *et al.* (1986) รายงานการใช้แคลลัสส้มเป็นเครื่องมือคัดเลือกพืชต้านทาน แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ ทั้งนี้เนื่องจากความต้านทานของแคลลัสส้ม 4 พันธุ์ คือ Sour orange Murcott mandarin Shamouti orange และ Villafrance lemon ต่อสารจากเชื้อ *P. citrophthora* ในสภาพปลอดเชื้อเกิดขึ้นตรงข้ามกับในสภาพแปลงปลูกต่อมา Arcioni, *et al.* (1987) ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกแคลลัสอัลฟัลฟาให้ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* และรายงานว่าพืชต้านทานต้นใหม่มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุในสภาพแปลงปลูกเพิ่มขึ้น Toyoda, *et al.* (1989) รายงานว่าพืชต้นใหม่ที่ชักนำจากแคลลัสของใบมะเขือเทศวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สายเชื้อ U-10 มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุในระยะแรกของการวางเลี้ยงเท่านั้น ในขณะที่พืชรุ่นที่ 2 (R2) ซึ่งชักนำจากแคลลัสของพืชต้านทานรุ่นที่ 1 (R1) เมื่อนำมาผสมตัวเองในสภาพแปลงปลูก มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุสายเชื้อ U-10 และ KK 101 อย่างถาวร และเสนอแนะว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อสามารถก่อให้เกิดความแปรปรวนของเซลล์ร่างกายในระดับยีนได้จึงก่อให้เกิดลักษณะที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรค Binarova, *et al.* (1990) รายงานว่าพืชต้านทานต้นใหม่ซึ่งชักนำจากเอ็มบริโอเจนนิกเซลล์ซัสเพนชันของอัลฟัลฟา เมื่อนำมาวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *F. oxysporum F. solani* และ *F. avenaceum* ในสภาพปลอดเชื้ออีกครั้ง มีความต้านทานเพิ่มขึ้นร้อยละ 12-20 Pijut, *et al.* (1990) รายงานว่าแคลลัสซึ่งชักนำจากใบอ่อนของ Elm (*Ulmus americana*) พันธุ์อ่อนแอมีการเพิ่มน้ำหนักและสูญเสียความมีชีวิตหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *Ceratocystis ulmi* แคลลัสที่ชักนำจากพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ต้านทานปานกลางถูกยับยั้งการเจริญเติบโต แต่ยังคงชีวิตอยู่ได้ และเสนอแนะว่าแคลลัสมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมของ Elm ให้ต้านทานต่อสารจากเชื้อ อย่างไรก็ตามการชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสต้านทานไม่ประสพผลสำเร็จ Ludwig, *et al.* (1992) พบว่า แคลลัสของ *Allium cepa* L. จำนวน 12 สายพันธุ์ ตอบสนองต่อสารจากเชื้อ *Pyrenochaeta terrestris* ในทำนองเดียวกับการตรวจสอบความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุในสภาพแปลงปลูก และเสนอแนะว่าการคัดเลือกพืชในสภาพปลอดเชื้อสามารถนำมาใช้ประเมินความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ Arai และ Takeuchi (1993) พบว่าสารจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* สายเชื้ออ่อนแอไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสคาร์เนชั่นพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานได้ ในขณะที่สายเชื้อรุนแรงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและความมีชีวิตของ

แคลลัสพันธุ์อ่อนแอได้ ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับของการตอบสนองของคาร์เนชั่นทั้งสองสายพันธุ์ต่อสายเชื้อนี้ในสภาพแปลงปลูก และเสนอแนะว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้คัดเลือกคาร์เนชั่นให้ต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium* ได้

3.3 การคัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อสารพิษที่ผลิตจากเชื้อสาเหตุของโรค

Ling, *et al.* (1985) รายงานว่าการชักนำพืชต้านทานต้นใหม่จากแคลลัสข้าวพันธุ์ IR8 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเติม H-toxin สารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *H. oryzae* สายเชื้อ 46 เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับแคลลัสข้าวพันธุ์ IR54 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารพิษ (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ) และเสนอแนะว่าประสิทธิภาพของการคัดเลือกพืชต้านทานต้นใหม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารพิษจากเชื้อ ระยะเวลาการเลี้ยงร่วม และความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของแคลลัสต้านทาน Rines และ Luke (1985) วางเลี้ยงแคลลัสของข้าวโอ๊ตที่ชักนำจากต้นที่มียีนต้านทานต่อเชื้อ *Puccinia coronata* (*VbVb*) และต้นที่มียีนอ่อนแอต่อเชื้อ (*Vbvb*) บนอาหารเติม victorin สารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *H. victoriae* เป็นเวลา 45 วัน พบว่าสามารถชักนำพืชต้านทานต้นใหม่ได้จากแคลลัสของต้นที่มียีน *Vbvb* เท่านั้น ดังนั้นลักษณะที่ต้านทานต่อเชื้อ *H. victoria* ในข้าวโอ๊ตจึงถูกควบคุมด้วยยีน *Vbvb* Furusawa (1988) ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกยาสูบให้ต้านทานต่อเชื้อ *Alternaria alternata* โดยวิธีวางเลี้ยงแคลลัสยาสูบซึ่งชักนำจากโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบบนอาหารเติม AT-toxin สารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *Alternaria alternata* เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-6 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกอีกครั้ง และเสนอแนะว่าการวางเลี้ยงแคลลัสบนอาหารเติมสารพิษ 2 ครั้ง เพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกพืชต้านทานต้นใหม่ ส่วน Ishida และ Kumashiro (1988) รายงานการเลี้ยงซัสเพนชันของยาสูบอายุ 3 วัน ความหนาแน่น 0.1 มิลลิลิตร ในอาหารเติม AT-toxin เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และเลี้ยงโปรโตพลาสต์อายุ 0 2 และ 4 วัน ที่แยกได้จากใบอ่อน ร่วมกับสารพิษ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ใหม่ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไร้ผนังเซลล์ไม่สามารถมีชีวิตรอดในอาหารเติมสารจากเชื้อได้ ในขณะที่โปรโตพลาสต์อายุ 4 วัน ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์สามารถตอบสนองต่อสารพิษได้ในทำนองเดียวกับซัสเพนชันเซลล์ จึงเสนอแนะว่าซัสเพนชันเซลล์เหมาะสำหรับนำมาใช้เลี้ยงร่วมกับสารพิษมากกว่าโปรโตพลาสต์เพราะเป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์ การเตรียมเซลล์ทำได้ง่าย เซลล์ส่วนใหญ่มีพัฒนาอยู่ในระยะเดียวกัน

3.4 การคัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อสารเคมีซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของเชื้อ

รายงานความสำเร็จเป็นครั้งแรกในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคในสภาพปลอดเชื้อ เริ่มต้นโดย Carlson (1973) ซึ่งประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ยาสูบ

ให้ต้านทานต่อโรค wild fire โดยใช้แคลลัสซึ่งชักนำจากโปรโตพลาสต์จากใบมาเลี้ยงบนอาหารเติม methionine sulfoximine (MSO) สารเคมีซึ่งเป็นสารอนุพันธุ์ของ tab toxin สารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas tabaci* และพบว่า ลักษณะต้านทานต่อ MSO สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ และถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ ที่มีอิทธิแบบข่ม ความสำเร็จในครั้งนี้ก่อให้เกิดแนวความคิดในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคในสภาพปลอดเชื้อ ต่อมา Furusawa (1988) ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกแคลลัสที่ชักนำจากโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบยาสูบให้ต้านทานต่อ paraquat สารเคมีซึ่งเป็นสารอนุพันธุ์ของ cercosporin สารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *Cercospora* และเสนอแนะว่าถ้ากลไกการทำงานของสารเคมีคล้ายกับสารพิษที่ผลิตจากเชื้อสาเหตุของโรคแล้ว สามารถนำสารเคมีมาใช้คัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อโรคได้

4. การตรวจสอบสายพันธุ์ต้านทาน

การตรวจสอบสายพันธุ์ต้านทานสามารถทำได้หลายระดับดังนี้คือ

4.1 การปลูกเชื้อในสภาพแปลงปลูก

Concibido, *et al.* (1994) ทำการปลูกเชื้อ *Verticillium albo-atrum* โดยวิธีทำแผลที่รากต้นกล้ามันฝรั่งลูกผสมอายุ 1 สัปดาห์ หลังย้ายปลูกในดิน แล้วให้คะแนนต้นกล้าที่เกิดโรค ผลการทดลองพบว่ามันฝรั่งลูกผสมระหว่าง *Solanum gourlayai* และ *S. chacoense* ไม่แสดงอาการของโรค ดังนั้นลูกผสมระหว่างพันธุ์ทั้งสองเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มันฝรั่งต่อไป Kellerhals และ Furrer (1994) ทำการฉีดพ่นและหยดสารละลายของเชื้อ *Venturia inaequalis* ลงบนใบอ่อนของต้นกล้าแอปเปิ้ล 19 สายพันธุ์ จากนั้นนำต้นกล้าทั้งหมดไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสูง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วให้คะแนนใบที่แสดงอาการของโรค ผลการทดลองพบว่า พันธุ์ Florina ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มียีนต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคไม่แสดงอาการของโรค ในขณะที่พันธุ์อื่น ๆ ซึ่งไม่มียีนต้านทานแสดงอาการของโรค Lateur และ Populer (1994) ทำการปลูกเชื้อ *V. inaequalis* โดยใช้สปอร์ซึ่งมีความเข้มข้น 3×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แก่ต้นกล้าแอปเปิ้ลจำนวน 1,200 พันธุ์ ที่ปลูกและดูแลในเรือนทดลอง ต้นกล้าที่ไม่แสดงอาการของโรคย้ายลงปลูกในแปลงทดลอง และทำการปลูกเชื้อ *Podosphaera leucotricha* ที่ใบ ผลการทดลองพบว่า พันธุ์ President Roulin ไม่แสดงอาการของโรคทั้งสอง ดังนั้นพันธุ์นี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์แอปเปิ้ลให้มียีนที่ต้านทานต่อโรคทั้งสอง Scheewe (1994) ทำการฉีดพ่นสารละลาย zoospore ของเชื้อ *P. fragariae* ความหนาแน่น $1.2\text{-}2.3\times10^4$ zoospore ต่อมิลลิลิตร ที่บริเวณรอยตัดของรากต้นกล้าสตอร์เบอรี่พันธุ์ต่าง ๆ อายุ 4

เดือน ซึ่งปลูกและดูแลในเรือนทดลอง หลังจากนำต้นกล้ามาปลูกที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วตรวจนับจำนวน oospore ที่เกิดขึ้นบนราก พบว่าพันธุ์ Saladin Redgauntlet Climax และ Yaquina B ไม่แสดงอาการของโรค และสรุปว่าพันธุ์ทั้ง 4 มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์สตอร์เบอรี่ให้ต้านทานต่อเชื้อ *P. fragariae* Pastor-Corrales, *et al.* (1995) ทำการปลูกเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum* บนต้นกล้าถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) จำนวน 20,144 พันธุ์ให้คะแนนอาการของโรคที่เกิดขึ้นที่ฝักตั้งแต่เริ่มติดฝักถึงเก็บเกี่ยว ในปีที่ 1 พบว่า 4,939 พันธุ์ (24.5%) ต้านทานต่อโรค ในปีที่ 2 ทำการปลูกเชื้อให้กับต้นกล้าในเรือนทดลองพบว่า 1,270 พันธุ์ (6.30%) ต้านทานต่อโรค และในปีที่ 3 เมื่อทำการปลูกและคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางเศรษฐกิจตามที่ต้องการในสภาพแปลงปลูก พบว่ามีเพียง 68 พันธุ์ (0.34%) มีลักษณะตามต้องการ

4.2 การตรวจสอบโครโมโซม

Latunde-Data และ Lucas (1983) ทำการตรวจสอบชุดของโครโมโซมของอัลฟัลฟ่าต้นใหม่ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ โดยวิธีการย้อมสีรากด้วย Feulgen พบว่า พืชต้นใหม่ที่ต้านทานต่อ *Verticillium albo-atrum* ในสภาพแปลงปลูก มีชุดของโครโมโซม 6 หรือ 8 ชุด ในขณะที่อัลฟัลฟาพันธุ์ปลูกทั่วไปมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด Hartman, *et al.* (1984) ทำการตรวจสอบชุดของโครโมโซมของอัลฟัลฟาต้นใหม่ที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยงแคลลัสร่วมกับสารพิษจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *Medicaginis* โดยวิธีย้อมสีรากด้วย propiono-carmine พบว่าพืชต้านทานที่ชักนำได้มีจำนวนโครโมโซม 6 หรือ 8 ชุด Alicchio, *et al.* (1984) ทำการตรวจสอบชุดของโครโมโซมของมะเขือยาว (*Solanum melongena*) ต้นใหม่ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *V. dahliae* โดยวิธีการย้อมสีรากด้วย aceto-orcein พบว่าพืชต้านทานที่ชักนำได้มีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้น และเสนอแนะว่าการเปลี่ยนแปลงของชุดโครโมโซมเกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการคัดเลือก และ/หรือผลการแสดงออกของยีนโดยตรง Arcioni, *et al.* (1987) ทำการตรวจสอบชุดของโครโมโซมของอัลฟัลฟาต้นใหม่ที่ชักนำได้จากการวางเลี้ยงแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* โดยวิธีย้อมสีรากด้วย Feulgen พืชต้านทานที่ชักนำได้มีจำนวนชุดของโครโมโซมคงเดิม ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาการเลี้ยงแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อเป็นระยะเวลาช่วงสั้น ๆ จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม

4.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์และการทำงานของยีน

Retig (1974) รายงานว่าหลังจากปลูกเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ให้กับมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase และ polyphenoloxidase ในปริมาณที่สูงในพันธุ์ต้านทาน แต่เมื่อทำการวิเคราะห์แถบเอ็นไซม์ด้วยวิธีอิเลคโตรฟอริซีส ไม่พบความแตกต่าง Hunt และ Barnes (1982) ทำการเปรียบเทียบสารละลายโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของถั่วลันเตา 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์หนึ่งต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *pisi* อีกสายพันธุ์หนึ่งอ่อนแอต่อโรค ด้วยวิธีอิเลคโตรฟอริซีสบนตัวกลางโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นแบบต่อเนื่อง พบว่าแถบโปรตีนของสารละลายโปรตีนทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อใช้วิธีการย้อมสีที่จำเพาะ หรือการวิเคราะห์เอ็นไซม์ พบว่าไซโมแกรมเอ็นไซม์ esterase แสดงความแตกต่าง ในขณะที่ไซโมแกรมของเอ็นไซม์ peroxidase ไม่แสดงความแตกต่าง และเมื่อศึกษาถึงปริมาณเอ็นไซม์พบว่าสามารถสกัดเอ็นไซม์ esterase จากพันธุ์ต้านทานได้ในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ McComb, *et al.* (1987) พบว่าเมื่อปลูกเชื้อ *P. cinnamoni* โดยใช้เส้นใยบนแคลลัสของ Jarrah (*Eucalyptus marginata*) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 และ 15 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสต้านทานมีการสร้าง callose ตอบสนองต่อเชื้อ ในปริมาณที่สอดคล้องกับระดับความต้านทานของแต่ละพันธุ์ในแปลงปลูก และเสนอแนะว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อสามารถยืนยันระดับความต้านทานในสภาพแปลงปลูกได้ Calderon, *et al.* (1992) รายงานว่าใบและลำต้นขององุ่น (*Vitis vinifera* cv. *muscat*) พันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ *Plasmopara vitticola* อายุ 1 เดือน ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ 4-hydroxystibene-oxidizing isoperoxidase เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร viniferin ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองความต้านทานโรคของพืชหลายชนิด Gentile, *et al.* (1993) รายงานว่าอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงซัสเพนชันส้มและมะนาวพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ *Phoma tracheiphila* ซึ่งคัดเลือกได้โดยวิธีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารพิษจากเชื้อ มีปริมาณ chitinase สูงกว่าอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงซัสเพนชันพันธุ์อ่อนแอ และจากการวิเคราะห์ไซโมแกรมเอ็นไซม์ chitinase ที่สกัดได้จากใบ พบว่ามีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ การตรวจพบปริมาณ chitinase ในระดับที่สูงเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานโรคของส้มและมะนาว Koller, *et al.* (1994) ใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ตรวจหายีน *Vf* ซึ่งต้านทานต่อเชื้อ *V. inaequalis* ในแอปเปิ้ล โดยใช้ primer ขนาด 10 base จำนวน 400 primer ซึ่งแยกมาจาก genomic DNA ของแอปเปิ้ลพันธุ์ลูกผสมพันธุ์ต่าง ๆ

พบว่า primer M18/900 และ U1/400 มีความเหมาะสมในการตรวจสอบยีน *Vf* Oh, *et al.* (1994) ใช้วิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ RAPD ตรวจสอบยีน *Shs* ซึ่งต้านทานต่อเชื้อ *Sporisorium relianum* ในข้าวฟ่างพันธุ์ต่าง ๆ โดยสกัด DNA จากใบลูกผสมรุ่นที่3 (F3) ซึ่งเป็นลูกของ F2 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *S. relianum* และรายงานว่า probe pSbTX560 และ pSbTX1294 และ primer OPG5 เข้าคู่กับชิ้น DNA ของพันธุ์ SC325 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อ *S. relianum* ดังนั้น probe ทั้งสอง และ primer ดังกล่าวเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบยีน *Shs* Morpurgo, *et al.* (1994) รายงานว่าปลายยอดต้นกล้วยวางเลี้ยงในอาหารเติมสารจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *cubense* มีระดับกิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 12 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์นี้พบว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุของโรค Mouradov, *et al.* (1994) รายงานการนำ RNA ที่แยกได้จากใบอ่อนข้าวบาร์เล่ย์พันธุ์ Psaknon 4 (F14) ซึ่งปลูกเชื้อด้วยเชื้อ *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* มาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี southern blot โดยใช้ PRb-1 cDNA sequence เป็น probe พบว่าลักษณะต้านทานต่อเชื้อนี้ถูกควบคุมด้วยยีน *MIP*

จากรายงานความสำเร็จในการคัดเลือกพืชต้านทานต้นใหม่ รวมถึงวิธีการที่นำมาใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ต้านทานข้างต้น ก่อให้เกิดแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์ยางพาราที่ต้านทานต่อเชื้อ *Phytophthora* สาเหตุโรคใบร่วงยางพารา โดยวิธีการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ โดยตรงและเขย่าเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อก่อนย้ายไปเลี้ยงบนอาหารปราศจากสารจากเชื้อ และทำการตรวจสอบสายพันธุ์แคลลัสต้านทานซึ่งเป็นแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเติมสารจากเชื้อด้วยวิธีอิเลคโตรฟอริซีส

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการเลี้ยงแคลลัสและซัสเพนชันเซลล์ร่วมกับสารจากเชื้อ *Phytophthora* เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แคลลัสต้านทาน
2. ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *Phytophthora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสหลังเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *Phytophthora* ด้วยวิธีอิเลคโตรฟอริซีส

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. วัสดุพืช

1.1 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและซัสเพนชัน

เก็บรวบรวมผลยางพารา อายุ 6-8 สัปดาห์ หลังผสมเกสรตามธรรมชาติจากต้นยางพารา พันธุ์พื้นเมือง บริเวณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลามายังห้องปฏิบัติการเพื่อเตรียมการทดลองดังต่อไปนี้

1.1.1 การชักนำแคลลัส

จุ่มผลยางพาราในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วินาที นำไปลนไฟ เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอก ตัดแยกเมล็ดออกจากผล ผ่าเมล็ดออกเป็น 2 ซีกแต่ละซีกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน นำชิ้นส่วนเมล็ดยางพารามาวางเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรชักนำแคลลัส วางเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 1)

1.1.2 การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและการเพิ่มปริมาณ

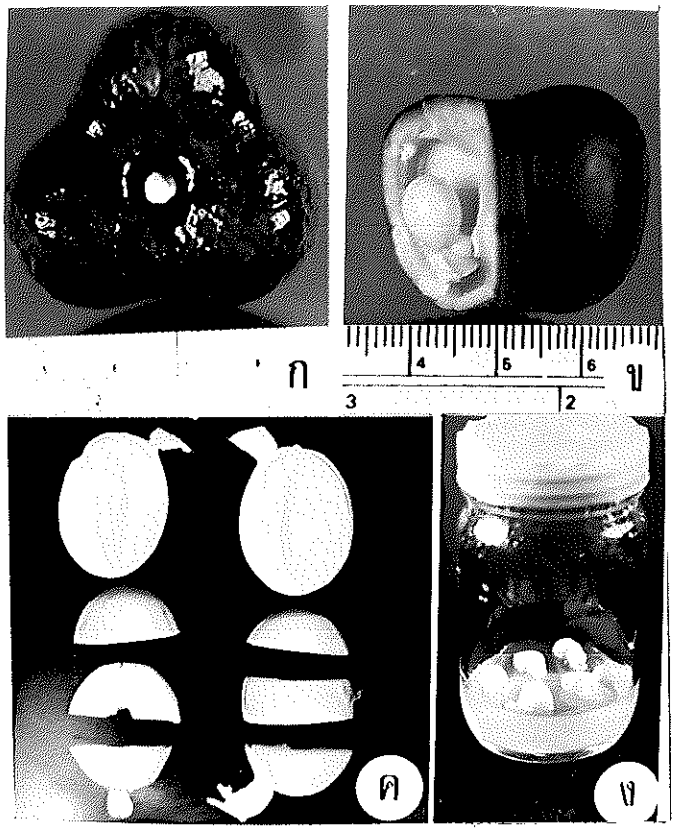
ตัดแยกแคลลัสจากส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส วางเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ดูแลรักษาโดยการย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 2)

1.1.3 การชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด ขนาด 5×5 มิลลิเมตร จำนวน 3-5 แคลลัส มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเขย่าเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 55 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการกรองเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันผ่านกรวยกรองที่รองด้วยไนลอนเมชขนาด 60 ไมครอน นำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ผ่านกรวยกรองมาแบ่งใส่หลอดปั่นปรับปริมาตรตะกอนเซลล์ (packed cell volum, PCV) ให้ได้ 1.0 มิลลิลิตร ย้ายตะกอนเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม ดูแลรักษาโดยการวางเลี้ยงในสภาพเดิมและทำการย้ายเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 7 วันเป็นเวลา 21 วัน

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 การตัดและการวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนอายุ 8 สัปดาห์

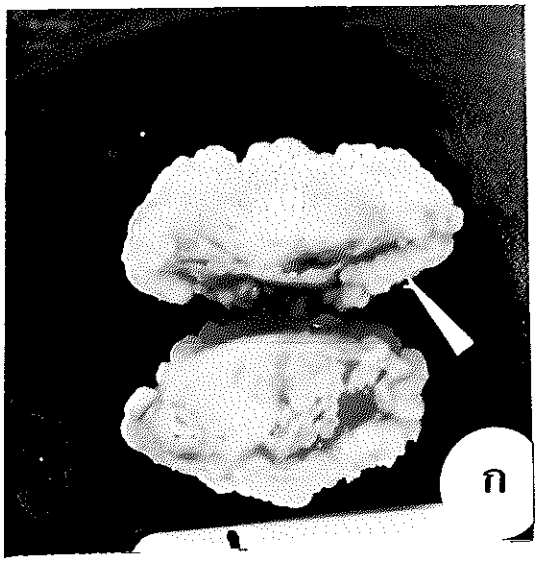
ก. ผลอ่อน

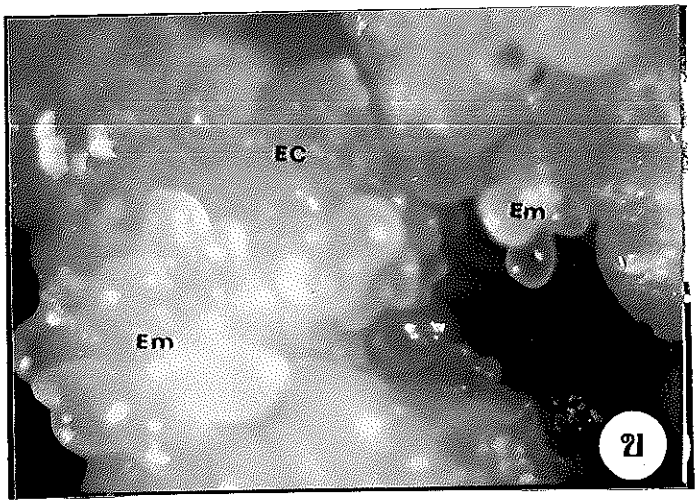
ข. เมล็ดอ่อนภายในผล

ค. ผ่าเมล็ดออกเป็น 2 ซีก แต่ละซีกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน

ง. การวางเลี้ยง

ที่มา : เมฆา ชาติกุล, 2536





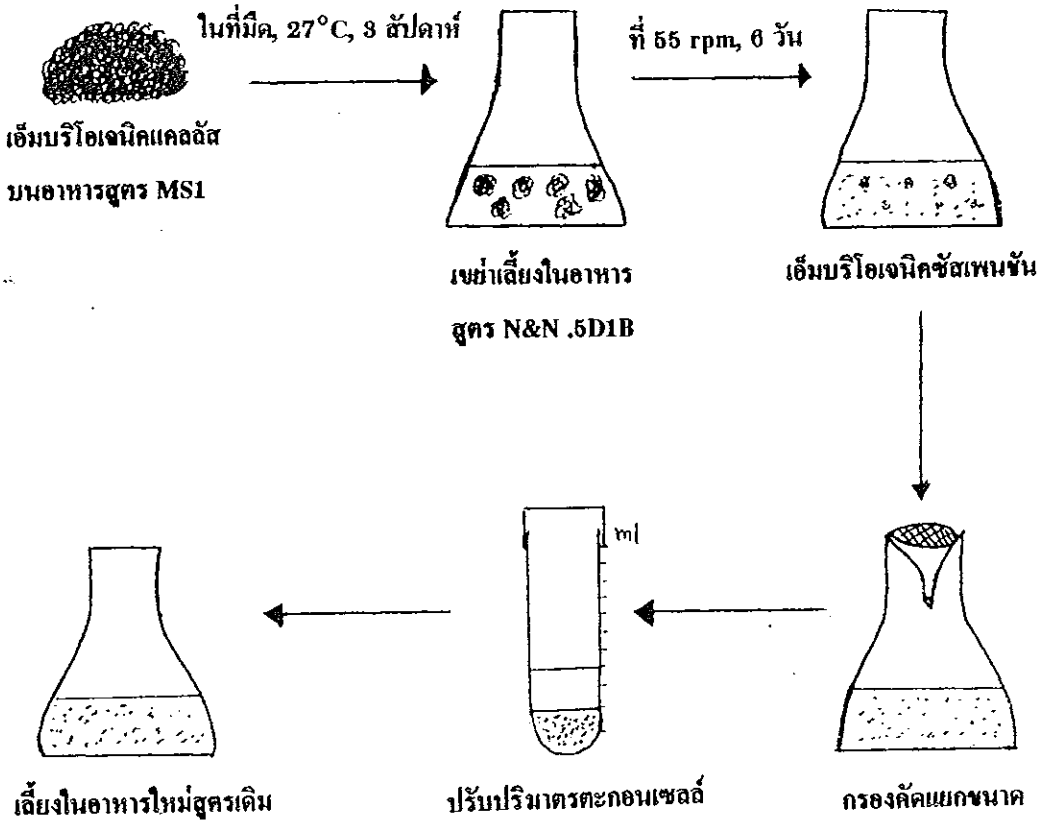
ภาพที่ 2 แคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

ก. แคลลัสเริ่มแรกชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนอายุ 3 สัปดาห์

ข. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนอายุ 9 สัปดาห์

EC = เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส, EM = เอ็มบริออยด์

ที่มา : เมฆา ชาติกุล, 2536



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและการย้ายเลี้ยง

2. สารจากเชื้อ *Phytophthora*

สารจากเชื้อสามารถเตรียมได้โดยตัดชิ้นส่วนก้านใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงเนื่องจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ให้มีขนาด 2×3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกด้วยการจุ่มแช่ในคลอร็อกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-4 นาที จากนั้นย้ายชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร PDA (potato dextrose agar) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียสให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน บ่มเชื้อไว้ 3 วัน ตัดแยกส่วนปลายเส้นใยไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากบ่มเชื้อต่อไปเป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borrer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Henniger (1963) จำนวน 7 ชิ้นต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการกรองเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงด้วยเครื่อง suction flask นำสารละลายที่กรองได้ซึ่งเป็นสารจากเชื้อมาผ่านเครื่องกรองความเข้มข้นแบบ ultra filtration เพื่อปรับความเข้มข้นเป็น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์

3. อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม

สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในการศึกษามีดังนี้

3.1 สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ชักนำแคลลัส คือ อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 8.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.8 เติมผงวุ้น (agar-agar) เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เรียกสูตรอาหารนี้ว่า MS1 องค์ประกอบของอาหารแสดงในภาคผนวกที่ 1

3.2 สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพิ่มปริมาณแคลลัส คือ อาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.8 เติมผงวุ้น (agar-agar) เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เรียกสูตรอาหารนี้ว่าMS2

3.3 สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน คืออาหารเหลวสูตร N&N (Nitsch & Nitsch, 1969) เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 องค์ประกอบของอาหารแสดงในภาคผนวกที่ 1

3.4 สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* คืออาหารวุ้นสูตร PDA ซึ่งประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร Dextrose เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และวุ้น (bacto-agar) เข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร

3.5 สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* คืออาหารเหลวสูตร Henniger (1963) องค์ประกอบของอาหารแสดงในภาคผนวกที่ 2

3.6 สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันร่วมกับสารจากเชื้อ คือสูตร MS2 ที่เพิ่มองค์ประกอบของธาตุอาหารเป็นสองเท่าปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารจากเชื้อ *Phytophthora* เข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขณะที่อาหารอุ่น เรียกสูตรอาหารนี้ว่า MS3 ส่วนหน่วยทดลองเปรียบเทียบใช้สูตร MS2 ปกติปริมาตร 10 มิลลิลิตร

อาหารทุกสูตรผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้ ยกเว้นสูตร Henniger ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. วัสดุอื่น ๆ

4.1 วัสดุที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ไปเปต ฟลาสก์

4.2 วัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ แอลกอฮอล์ บีกเกอร์ จานเพาะเลี้ยง มีดผ่าตัด และปากคีบ

4.3 วัสดุสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

4.3.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร (ภาคผนวกที่ 1 และ 2)

4.3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต

4.3.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน คือ 2,4-D

4.3.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโทไคนิน คือ BA

4.4 วัสดุสารเคมีที่ใช้ในการแยกแถบโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

4.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน ได้แก่ Tris-HCl, 2-mercaptoethanol

4.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม loading buffer ได้แก่ Tris-HCl, EDTA, glycerol, 2-mercaptoethanol, sodium dodecyl sulfate, bromophenol blue

4.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมแผ่นเจล ได้แก่ Acrylamide, N,N-methylenebisacrylamide,Tris-HCl, sodium dodecyl sulfate, ammonium persulfate

4.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม electrode buffer ได้แก่ Tris-HCl, glycine, sodium dodecyl sulfate

4.4.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมโปรตีน ได้แก่ Coomassie Blue R-250, acetic acid, methanol

4.4.6 สารเคมีที่ใช้ย้อมไอโซไซม์ แสดงในภาคผนวกที่ 3

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1.1 เครื่องชั่งสารเคมี 2 และ 4 ตำแหน่ง

1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.3 หม้อนึ่งความดัน

1.4 เตาอบไมโครเวฟ

1.5 ตู้อบ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยง

2.1 ตู้ย้ายเลี้ยง

2.2 เครื่องเขย่าความเร็ว 80 ถึง 110 รอบต่อนาที

2.3 ชั้นวางเลี้ยง

2.4 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบ Digital counting scale DC-1200

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์แคลลัสต้านทาน

3.1 โกร่ง (ใช้บดแคลลัส)

3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง TOMY MC-150

3.3 เครื่องเตรียมแผ่นเจล LKB 2050 Midget Electrophoresis Unit

3.4 เครื่องแยกโปรตีน LKB 2051 Midget Multi-Blot Electrophoretic Transfer Unit

3.5 เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า Pharmacia GPS 200/400

วิธีดำเนินการ

การศึกษาที่ 1 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

1.1 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ตัดแบ่งเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนของผลอ่อนยางพาราอายุ 6 สัปดาห์ มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 20 ชิ้น วางเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ศึกษาอัตราการเพิ่มน้ำหนักและอัตราการเพิ่มขนาด (ตามสูตรข้างล่าง) ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทุกสัปดาห์เพื่อดูแบบการเจริญ (growth pattern)

$$\text{อัตราการเพิ่มน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ x 100}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

$$\text{อัตราการเพิ่มขนาด} = \frac{\text{ขนาดที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ x 100}}{\text{ขนาดเริ่มต้น}}$$

1.2 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

ย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำได้จากเปลือกหุ้มเมล็ด ขนาด 5x5 มิลลิเมตร จำนวน 3-5 แคลลัส มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสค์ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อฟลาสค์ นำฟลาสค์ไปเขย่าเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 55 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 900 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการกรองคัดแยกขนาดเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันผ่านไนลอนเมชขนาด 60 ไมครอน ปรับปริมาตรตะกอนเซลล์ให้ได้ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นย้ายเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม (ภาพที่ 3) วางเลี้ยงในสภาพเดิม ทำการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 12วัน

การศึกษาที่ 2 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนและเปลือกหุ้มเมล็ดร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa*

2.1 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเติมสารจากเชื้อโดยตรง

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนและเปลือกหุ้มเมล็ดอายุ 9 สัปดาห์ ขนาด 2×2 มิลลิเมตร มาวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* เข้มข้น 0 (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ) 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงจำนวน 20 ชิ้นต่อจานเพาะเลี้ยง ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ในกรณีการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสภายหลังเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อแต่ละระดับความเข้มข้น ส่วนกรณีการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* วัดอัตราการเพิ่มขนาด (ตามสูตรในการศึกษาที่ 1.1) เปรียบเทียบกันในแต่ละสัปดาห์ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 15 ซ้ำ ซ้ำละ 20 จานเพาะเลี้ยง

2.2 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ ก่อนการเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสขนาด 2×2 มิลลิเมตร จำนวน 40 แคลลัส มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N&N เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ร่วมด้วยสารจากเชื้อ *P. botryosa* เข้มข้น 0 (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ) 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ หรือสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 0 (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ) และ 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 55 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 900 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณวางเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละหน่วยทดลองเปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 แคลลัส

การศึกษาที่ 3 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora*

3.1 ผลของอายุของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

ดูดเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งดูแลในอาหารเหลวอายุ 2 4 6 8 และ 10 วัน มาปั่นตกตะกอนเพื่อปรับปริมาตรตะกอนเซลล์ เป็น 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายอาหารตอนบนทิ้งไป ดูดสารจากเชื้อเข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงไปในเอ็มบริโอเจนนิกเซลล์ ดูดเป่าเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ให้เป็นสารแขวนลอย จากนั้นเติมอาหารสูตร MS3 ซึ่งผ่านการหลอมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามลงไป สำหรับหน่วยทดลองเปรียบเทียบดูดเฉพาะอาหารสูตร MS2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงไป เทส่วนผสมของสารและเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำไปวางเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตรวจนับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละอายุและความเข้มข้นของสารจากเชื้อเปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 จานเพาะเลี้ยง

3.2 ผลของความหนาแน่นของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

ดูดเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งดูแลในอาหารเหลวอายุ 6 วัน มาปั่นตกตะกอนเพื่อปรับปริมาตรตะกอนเซลล์ เป็น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายอาหารตอนบนทิ้งไป ดูดสารจากเชื้อเข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงไปในเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ ดูดเป่าเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ให้เป็นสารแขวนลอย จากนั้นเติมอาหารสูตร MS3 ซึ่งผ่านการหลอมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามลงไป สำหรับหน่วยทดลองเปรียบเทียบดูดเฉพาะอาหารสูตร MS2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงไป เทส่วนผสมของสารและเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ นำไปวางเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตรวจนับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละความหนาแน่นและความเข้มข้นของสารจากเชื้อเปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยการทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 จานเพาะเลี้ยง

การศึกษาที่ 4 การตรวจสอบสายพันธุ์แคลลัสต้านทาน

4.1 การตรวจหาปริมาณโปรตีน

4.1.1 การสกัดโปรตีนจากแคลลัส

นำสายพันธุ์แคลลัสในหน่วยการทดลองเปรียบเทียบ มาบดในสาร

ละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (ตารางที่ 1) โดยใช้แคลลัสต่อสารละลายบัฟเฟอร์อัตราส่วน 1 : 1 1 : 2 และ 1 : 3 ทำการบดในโกร่งที่เย็นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายใสส่วนบนซึ่งเรียกว่าสารสกัดสายพันธุ์แคลลัสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) (ภาคผนวกที่ 4) จากนั้นนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมาสกัดโปรตีนจากสายพันธุ์แคลลัสต้านทาน สารสกัดสายพันธุ์แคลลัสที่ได้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ชนิดและองค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดโปรตีน

ชนิดของบัฟเฟอร์	องค์ประกอบ
1	10% glycerol
	0.1 M Tris-HCl, pH 7.5
	0.5% 2-mercaptoethanol
2	1 M Tris-HCl, pH 8.8
	20 mM 2-mercaptoethanol
3	0.1 M Tris-HCl, pH 7.5
	1 mM EDTA

4.1.2 การเตรียมแผ่นเจล

เตรียม polyacrylamide gel จากสารละลาย acrylamide เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ bis-acrylamide เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แผ่นเจลประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนล่าง เรียกว่า running gel เตรียมให้มีความเข้มข้น 7.5-10.0 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl, pH 8.8 เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ส่วนบนเรียกว่า stacking gel เตรียมให้มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl, pH 6.8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยใช้เครื่อง Midget Multicast รุ่น 2050-200

4.1.3 การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

นำสารสกัดสายพันธุ์แคลลัสต้านทานมาผสมกับ loading buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl, pH 6.8 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ glycerol เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ sodium dodecyl

sulfate เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ bromophenol blue เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำการแยกแถบโปรตีนบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ด้วยเครื่อง LKB 2050 Midget Electrophoresis ใช้สารละลาย electrode buffer ที่ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร glycine เข้มข้น 14.4 กรัมต่อลิตร และ sodium dodecyl sulfate เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์

4.2 การวิเคราะห์โปรตีน

แกะแผ่นเจลมาจุ่มแช่ในสารละลายสีย้อม ที่ประกอบด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ละลายในกรดอะซิติคเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วยเมทธานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแผ่นเจลที่ผ่านการย้อมสีมาล้างครั้งที่ 1 ในสารละลายที่ประกอบไปด้วยเมทธานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติคเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างครั้งที่ 2 ในสารละลายเมทธานอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติคเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ จนแผ่นเจลใส จากนั้นทำการวัดแถบโปรตีนที่ย้อมติดสีบนแผ่นเจล

4.3 การวิเคราะห์เอ็นไซม์

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ ทำโดยการนำสารสกัดสายพันธุ์แคลลัสในหน่วยทดลองเปรียบเทียบและสายพันธุ์ต้านทานซึ่งบดในในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ Tris-HCl, pH 7.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ 2-mercaptoethanol เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 4.1.1 มาเคลื่อนที่บนแผ่นเจลที่เตรียมตามวิธีในข้อ 4.1.2 โดยใช้เครื่อง LKB 2050 Midget Electrophoresis และ electrode buffer ชนิดเดียวกันกับวิธีในข้อ 4.1.3 จากนั้นแกะแผ่นเจลมาจุ่มแช่ในสารละลายสีย้อมเอ็นไซม์ดังนี้ peroxidase (PER) acid phosphatase (ACP) esterase (EST) alcohol dehydrogenase (ADH) alkaline phosphatase (AKP) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PD) malate dehydrogenase (MDH) และ Glutamate dehydrogenase (GDH) องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ย้อมเอ็นไซม์แต่ละชนิดแสดงในภาคผนวกที่ 3

บทที่ 3

ผล

การศึกษาที่ 1 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

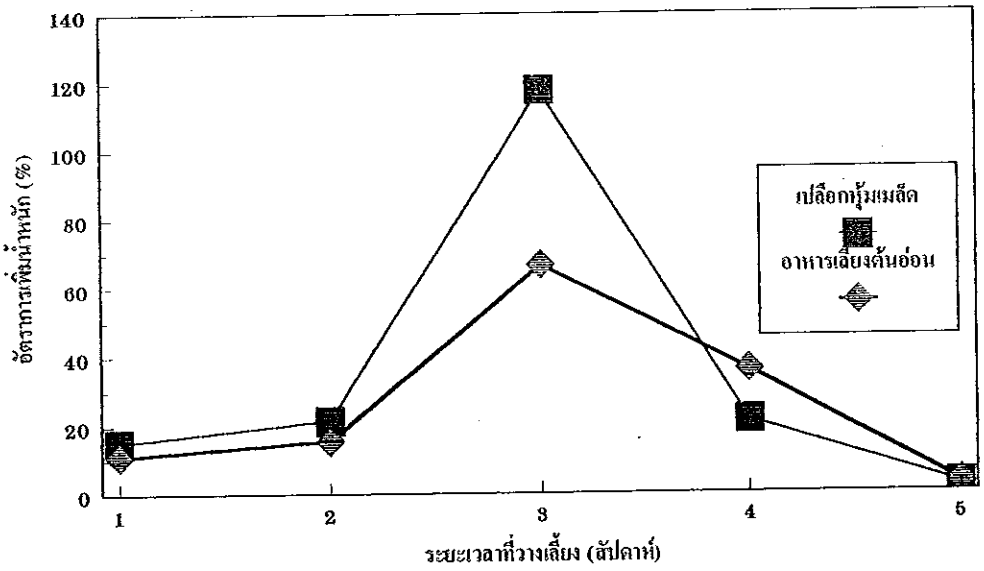
1.1 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS2 ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีอัตราการเจริญเติบโตทั้งขนาดและน้ำหนักสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 2 และ 3 การวางเลี้ยงเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 2 ชิ้นส่วน ในสัปดาห์ที่ 3 แคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด เมื่อวางเลี้ยงต่อไปในสัปดาห์ 4 และ 5 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนลดลง (ตารางที่ 2 ภาพที่ 4) ช่วงเวลาดังกล่าวสังเกตเห็นเอ็มบริโอเจนิกเซลล์สีน้ำตาลกระจายทั่วแคลลัส

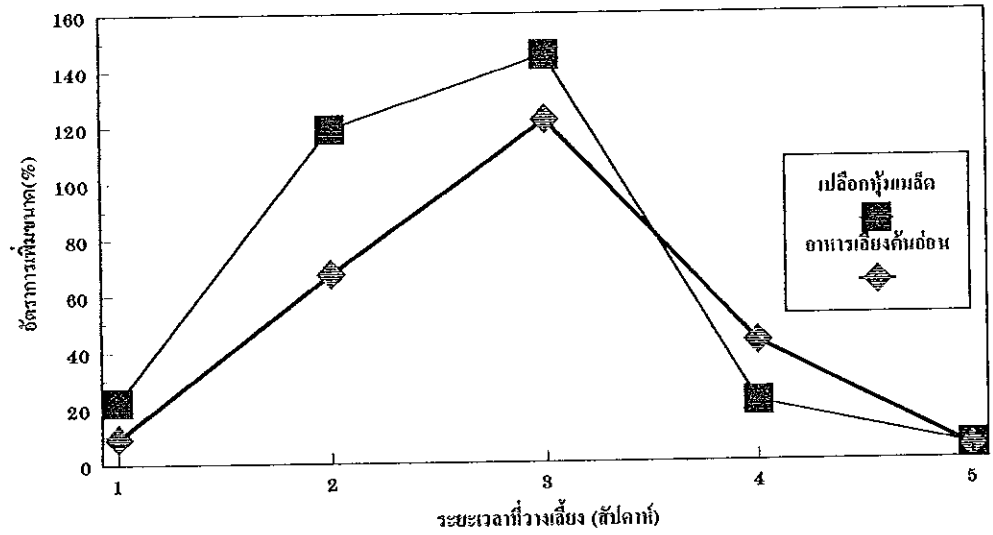
ตารางที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ระยะเวลา	อัตราการเพิ่มน้ำหนัก (%)		อัตราการเพิ่มขนาด (%)	
(สัปดาห์)	เปลือกหุ้มเมล็ด	อาหารเลี้ยงต้นอ่อน	เปลือกหุ้มเมล็ด	อาหารเลี้ยงต้นอ่อน
1	15.00±0.16	11.00±0.11	22.22±0.55	9.18±0.49
2	21.43±0.45	15.38±0.12	119.29±0.46	67.43±0.46
3	117.64±0.74	66.67±0.07	145.30±0.46	122.18±0.68
4	21.32±0.59	36.00±0.97	21.21±1.99	42.70±0.76
5	2.22±0.87	2.90±1.50	5.03±0.95	4.32±0.85

± = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ก. อัตราการเพิ่มน้ำหนัก



ข. อัตราการเพิ่มขนาด

ภาพที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

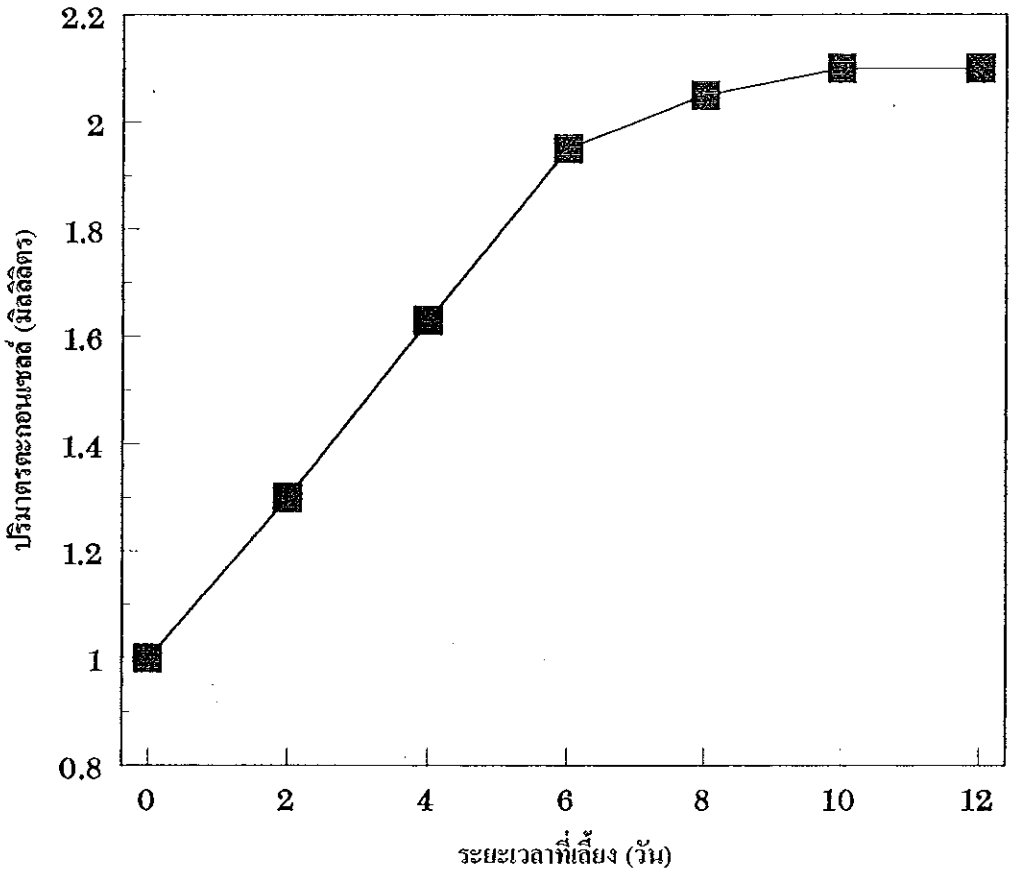
1.2 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

จากการวัดปริมาตรตะกอนเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 12 วัน พบว่าหลังจากเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในอาหารเป็นเวลา 2-8 วัน เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันมีปริมาตรตะกอนเพิ่มขึ้นหรือมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้เป็น 2 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น หลังจากเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน (ตารางที่ 3 ภาพที่ 5) แต่หลังจากวางเลี้ยงต่อไปพบว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันไม่มีการเพิ่มขนาดหรือมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ และสังเกตพบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเริ่มมีสีขุ่นหลังจากเขย่าเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเป็นเวลา 8 วัน เพราะฉะนั้นการเพิ่มปริมาตรเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน สามารถทำได้โดยการย้ายเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม วางเลี้ยงในสภาพเดิมทุก ๆ 6 วัน

ตารางที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร)
0	1.00±0.03
2	1.30±0.16
4	1.63±0.19
6	1.95±0.13
8	2.05±0.06
10	2.10±0.05
12	2.10±0.06

±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

การศึกษาที่ 2 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนและเปลือกหุ้มเมล็ดร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa*

2.1 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสบนอาหารเติมสารจากเชื้อโดยตรง

2.1.1 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน

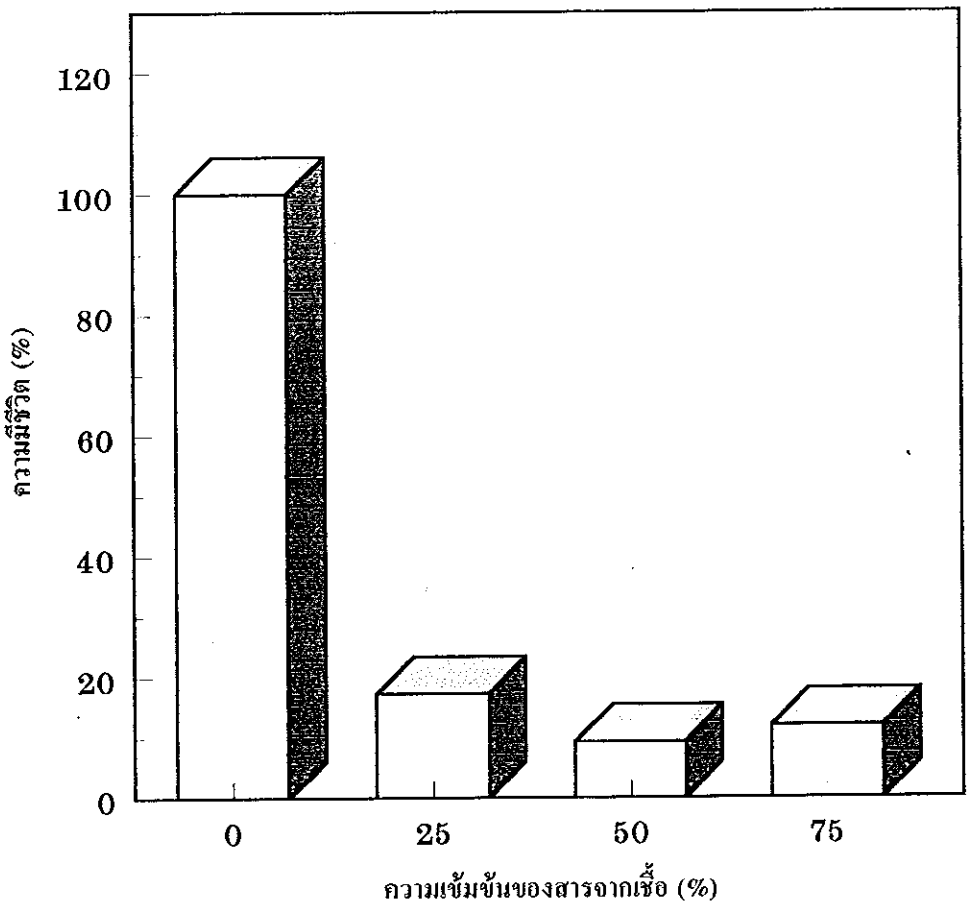
สารจากเชื้อ *P. palmivora* และสารจากเชื้อ *P. botryosa* ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนอายุ 3 สัปดาห์ ได้แตกต่างกันคือสารจากเชื้อ *P. botryosa* ทุกระดับความเข้มข้นยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารจากเชื้อ *P. palmivora* แต่ละระดับความเข้มข้นยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้แตกต่างกันดังนี้ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสขนาด $2.12\pm0.15\times2.25\pm0.34$ มิลลิเมตร ที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 25 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหน่วยทดลองเปรียบเทียบมีการเจริญเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 17 วัน เมื่อสังเกตเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในหน่วยทดลองเปรียบเทียบประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์รูปร่างกลมสีเหลืองอ่อนขนาดเล็กจำนวนมาก ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์สีน้ำตาลบริเวณฐาน และเซลล์สีเหลืองเข้มเกาะกันแน่นบริเวณส่วนบนของแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยเซลล์สีน้ำตาลจำนวนมากกระจายทั่วแคลลัส และสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์บางกลุ่มมีการแบ่งเซลล์ในลักษณะเป็นเส้น ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์สีเหลืองเข้มเกาะกันแน่น มีสารชีวเคมีสีขาวขุ่นบริเวณรอบ ๆ และกระจายทั่วแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 21 วัน พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหน่วยทดลองเปรียบเทียบยังคงเจริญเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าของขนาดเริ่มต้น ($4.65\pm0.35\times4.54\pm0.41$ มิลลิเมตร) เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ที่ชักนำได้ใหม่มีลักษณะกลม มีสีเหลืองอ่อนเกาะกันอย่างหลวม ๆ ปกคลุมชิ้นส่วนเดิม ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่รอดชีวิตได้ 17.3 9.3 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4 ภาพที่ 6 และ 7)

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน

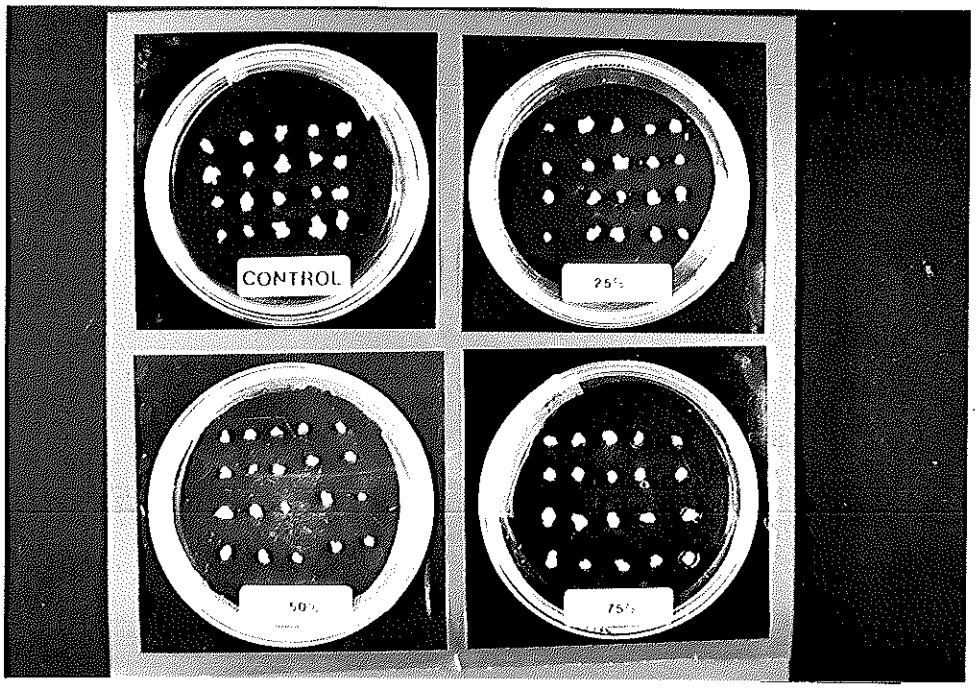
ความเข้มข้นของสารจากเชื้อ (%)	ความมีชีวิต (%)
0	100.0[a]
25	17.3[b]
50	9.3[b]
75	12.0[b]
F - test	*
CV (%)	12.4

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)



ภาพที่ 6 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน



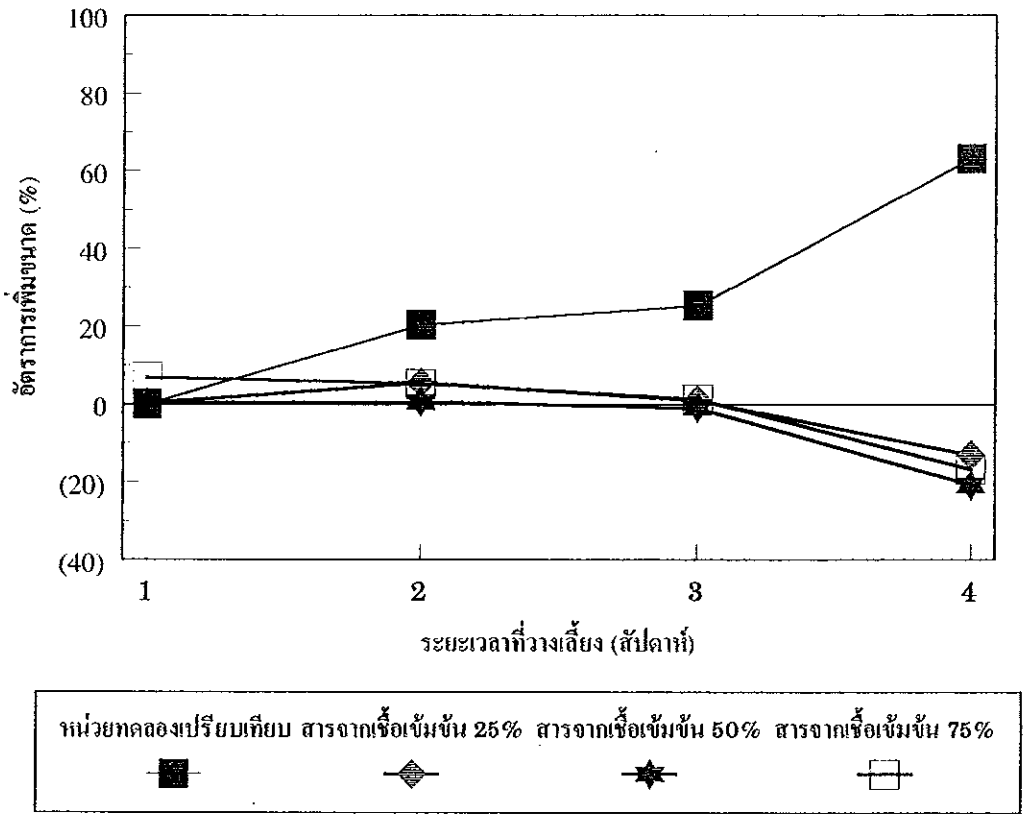
ภาพที่ 7 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน

เนื่องจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. botryosa* เข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงไม่สามารถคัดเลือกแคลลัสต้านทานได้จากการทดลองนี้ และจากการศึกษาอัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสภายหลังเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการเพิ่มขนาดน้อยมาก แคลลัสส่วนใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทุกหน่วยทดลองมีอัตราการเพิ่มขนาดสูงขึ้น แต่หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 และ 4 สัปดาห์ อัตราการเพิ่มขนาดของแคลลัสลดลง แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและแห้งตาย ในขณะที่หน่วยทดลองเปรียบเทียบมีอัตราการเพิ่มขนาดสูงขึ้น (ตารางที่ 5 ภาพที่ 8)

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน

ความเข้มข้นของ	อัตราการเพิ่มขนาด (%) หลังวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเป็นเวลา			
สารจากเชื้อ (%)	1	2	3	4 (สัปดาห์)
0	0	20.38±0.39	25.35±0.31	63.18±0.11
25	0.38±0.11	5.48±0.15	0.97±0.21	-13.14±0.18
50	0.23±0.17	0.57±0.07	-1.00±0.21	-20.79±0.25
75	6.99±0.09	5.22±0.35	1.24±0.25	-16.81±0.34

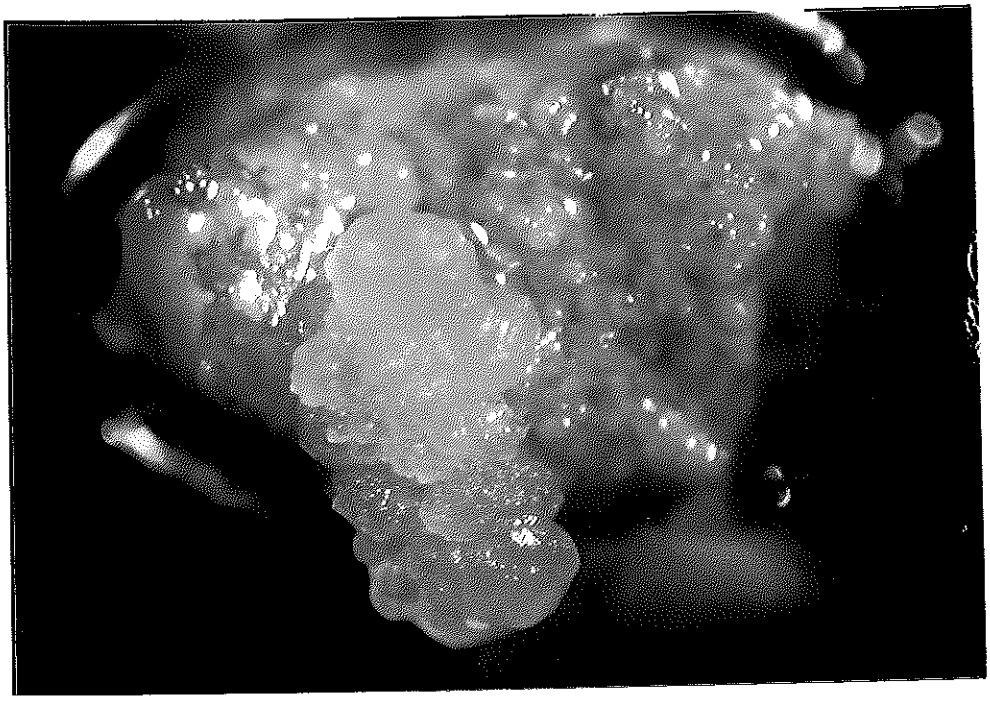
± = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 8 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน

2.1.2 เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด

ความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* และสารจากเชื้อ *P. botryosa* เป็นไปในทำนองเดียวกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนคือ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสขนาด 2.21 $\pm$0.34$\times$2.31$\pm$0.21 มิลลิเมตร ที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และเมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน ทำการสังเกตเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบนอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสส่วนใหญ่มีเซลล์สีน้ำตาลกระจายทั่วแคลลัส ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์สีน้ำตาลจำนวน 1-2 เซลล์ต่อชิ้นส่วน เซลล์อื่น ๆ ประกอบด้วยเซลล์สีเหลืองเข้มมีสารชีวเคมีสีเหลืองอ่อนปกคลุมเป็นบางส่วน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจำนวนเล็กน้อยมีสารชีวเคมีสีเหลืองอ่อนล้อมรอบแคลลัส และบางแคลลัสมีเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ใหม่เจริญปกคลุมเซลล์เดิมเพียงบางส่วน (ภาพที่ 9) ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหน่วยทดลองเปรียบเทียบส่วนใหญ่ประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ใหม่สีเหลืองอ่อนรูปร่างกลมเกาะกันอย่างหลวม ๆ เจริญปกคลุมเซลล์เดิม



ภาพที่ 9 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ใหม่เจริญปกคลุมเซลล์เดิมซึ่งเป็นเซลล์ที่มีสีน้ำตาล

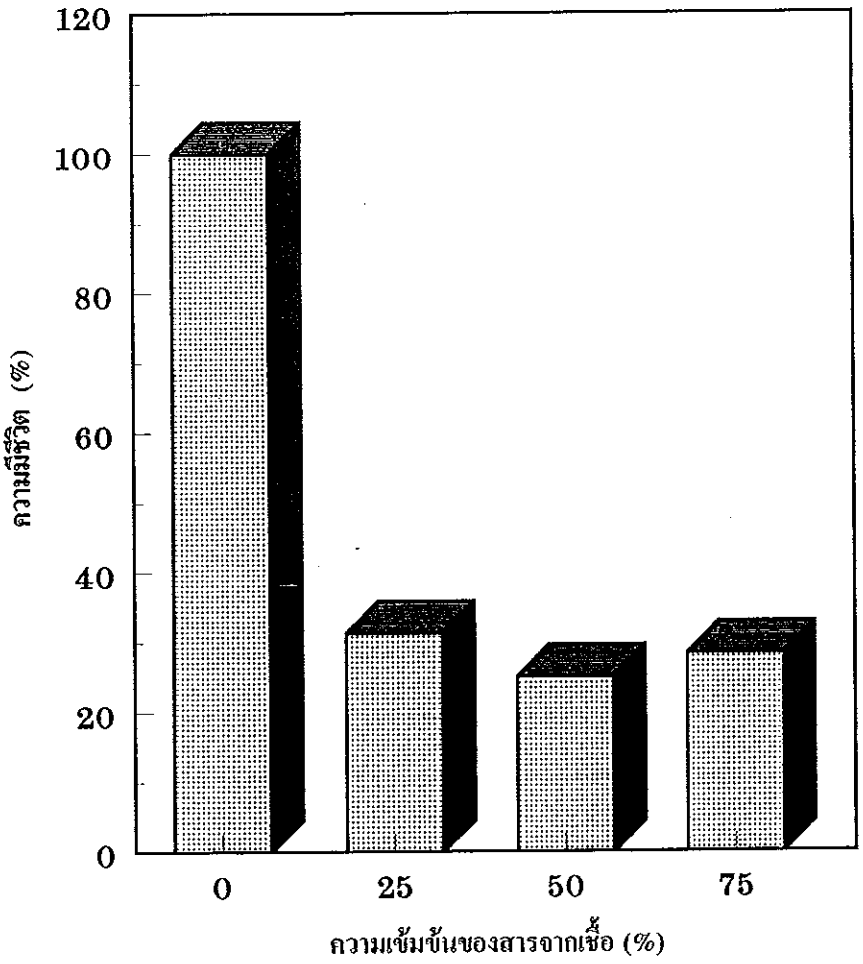
หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 21 วัน พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหน่วยทดลองเปรียบเทียบสามารถเจริญเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มขนาดขึ้นประมาณ 2.5 เท่าของขนาดเริ่มต้น ($5.56\pm0.74\times6.04\pm1.19$ มิลลิเมตร) ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ มีชีวิตรอดได้ 31.3 25.0 และ 28.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6 ภาพที่ 10 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด

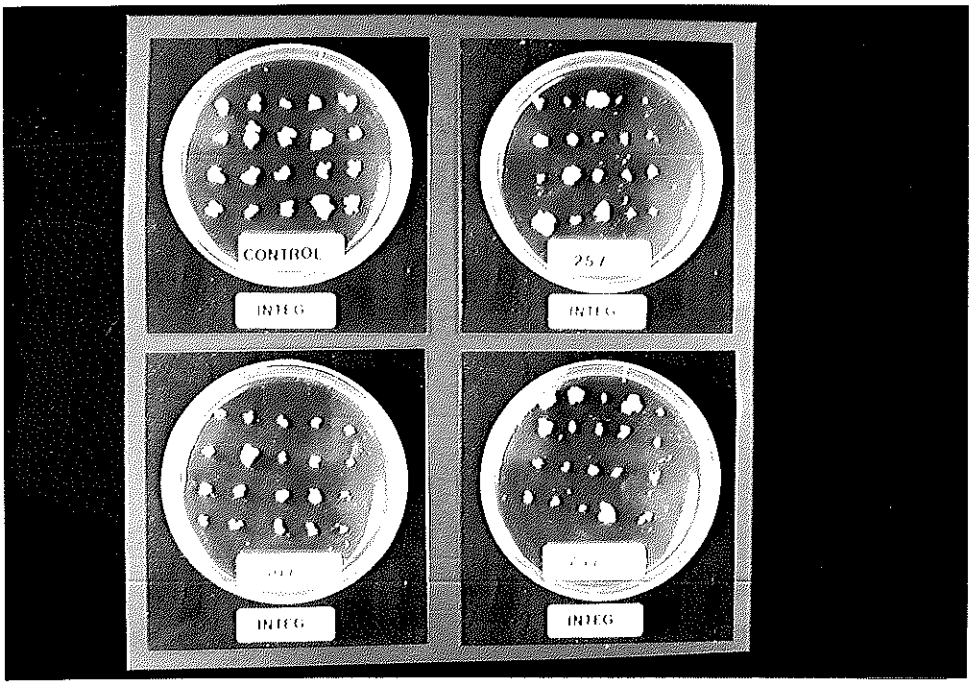
ความเข้มของสารจากเชื้อ (%)	ความมีชีวิต (%)
0	100.0[a]
25	31.3[b]
50	25.0[b]
75	28.3[b]
F-test	*
CV(%)	20.56

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด



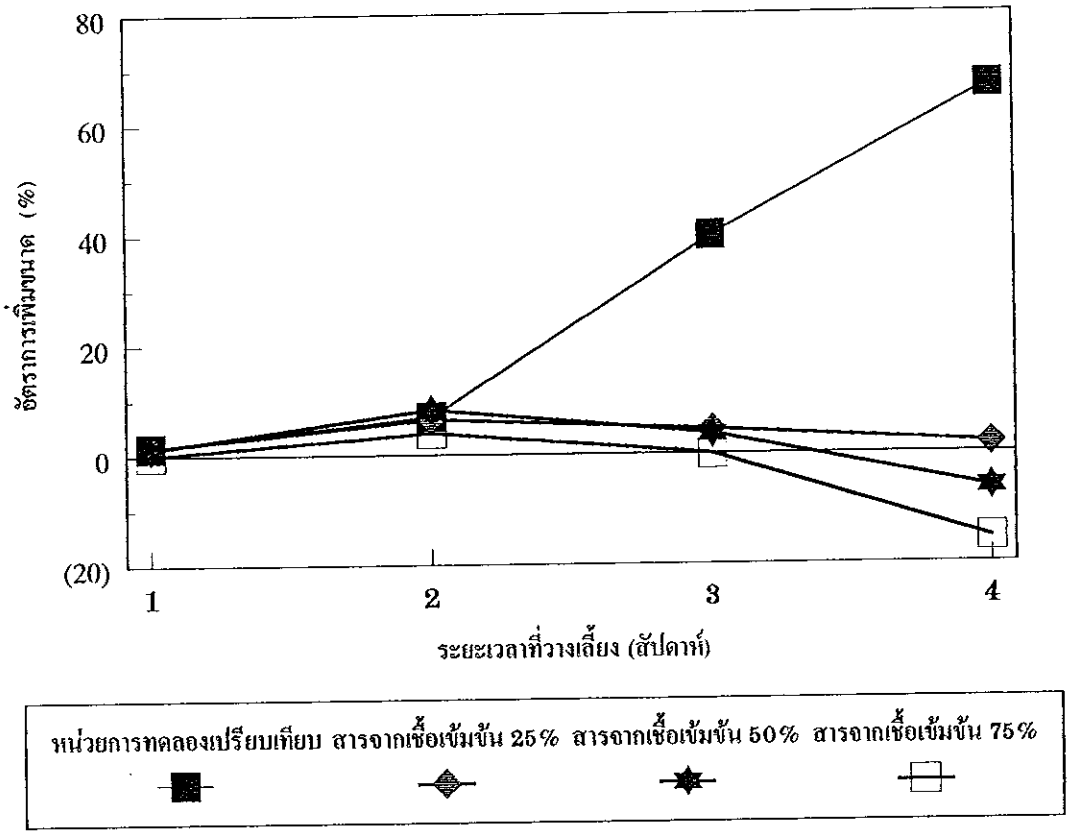
ภาพที่ 11 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด

ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. botryosa* เข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงไม่สามารถคัดเลือกแคลลัสต้านทานได้จากการทดลองนี้ และจากการศึกษาอัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสภายหลังเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการเพิ่มขนาดน้อยมาก เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสส่วนใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีอัตราการเพิ่มขนาดสูงขึ้น แต่หลังจากวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์ อัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลดลง เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นและแห้งตายในสัปดาห์ที่ 4 ของการวางเลี้ยง ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในหน่วยทดลองเปรียบเทียบมีอัตราการเพิ่มขนาดสูงขึ้นในแต่ละสัปดาห์ของการวางเลี้ยง และประกอบไปด้วยเซลล์สีเหลืองรูปร่างกลมขนาดเล็กจำนวนมากเจริญปกคลุมชิ้นส่วนเดิมเมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 7 ภาพที่ 12)

ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด

ความเข้มข้นของ	อัตราการเพิ่มขนาด (%) หลังวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อเป็นเวลา			
สารจากเชื้อ (%)	1	2	3	4 (สัปดาห์)
0	1.45±0.05	39.78±0.02	6.96±0.04	66.92±0.38
25	1.42±0.01	6.52±0.29	4.44±0.57	1.75±0.94
50	1.16±0.27	8.16±0.72	3.61±0.49	-6.26±0.65
75	0	4.00±0.98	0	-15.38±0.67

± = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



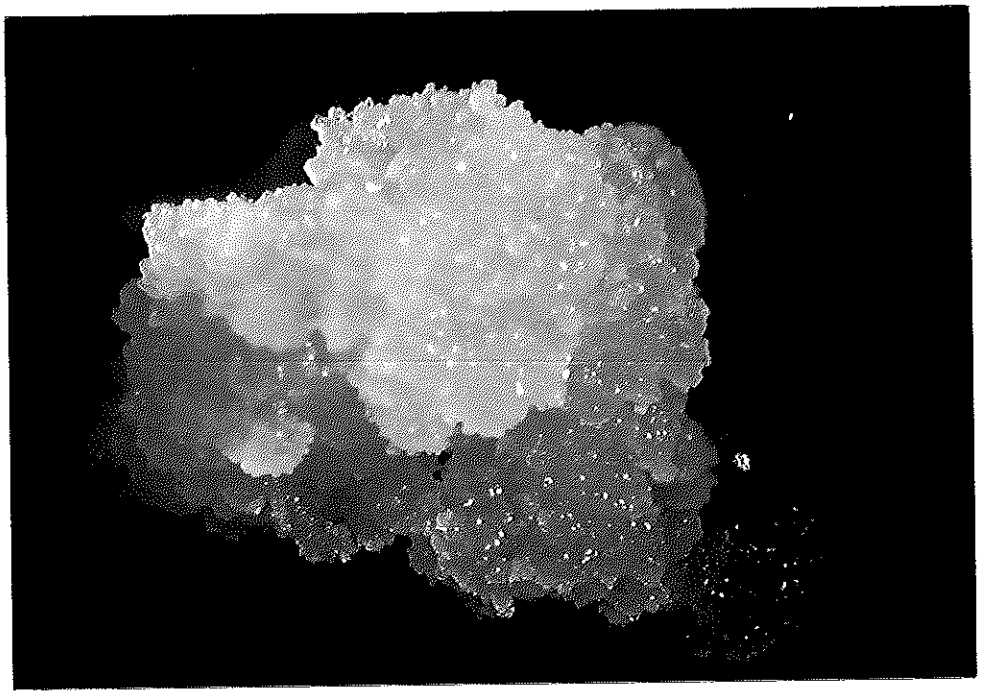
ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* ต่ออัตราการเพิ่มขนาดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด

จากการสังเกตเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนและเปลือกหุ้มเมล็ดที่มีชีวิตรอดบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 2 ลักษณะ ดังนี้

1. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสซึ่งประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ใหม่สีเหลืองอ่อนรูปร่างกลมเกาะกันอย่างหลวม ๆ (ภาพที่ 13)

2. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซึ่งประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์สีเหลืองเข้มเกาะกันแน่นมีสารชีวเคมีสีขาวปกคลุมหรือมีเอ็มบริโอเจนิคเซลล์สีน้ำตาลซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายกระจายอยู่ทั่ว (ภาพที่ 14)

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนและเปลือกหุ้มเมล็ดวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 25 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนแปลงเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทั้ง 2 ลักษณะ ในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลักษณะที่ 2 มากกว่า และเมื่อย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเหล่านี้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสซึ่งปราศจากสารจากเชื้อเป็นเวลา 21 วัน พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลักษณะที่ 1 สามารถเจริญเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสลักษณะที่ 2 สามารถเจริญเติบโตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสทั้ง 2 ลักษณะ ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอก พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ เอ็มบริโอเจนิคเซลล์แห้งตายหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน



ภาพที่ 13 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสซึ่งประกอบด้วยเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ใหม่สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลมเกาะกันอย่างหลวม (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ)

ภาพที่ 14 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์สีเหลืองเข้มเกาะกันแน่นและมีสารชีวเคมีสีขาวขุ่นบริเวณรอบแคลลัส

2.2 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อก่อนการเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

2.2.1 สารจากเชื้อ *P. botryosa*

ความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อก่อนย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส แตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อ ความเข้มข้นของเชื้อและระยะเวลาการเขย่าเลี้ยงดังนี้ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารจากเชื้อสูงขึ้น หรือเขย่าเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น สารจากเชื้อเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งความมีชีวิตเอ็มบริโอเจนิคของแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แตกต่างกันทางสถิติกับการเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง เป็นไปในทำนองเดียวกับสารจากเชื้อเข้มข้น 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง และพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อทุกระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่มีชีวิตรอดได้ในระดับที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสต้านทาน (ตารางที่ 8 ภาพที่ 15)

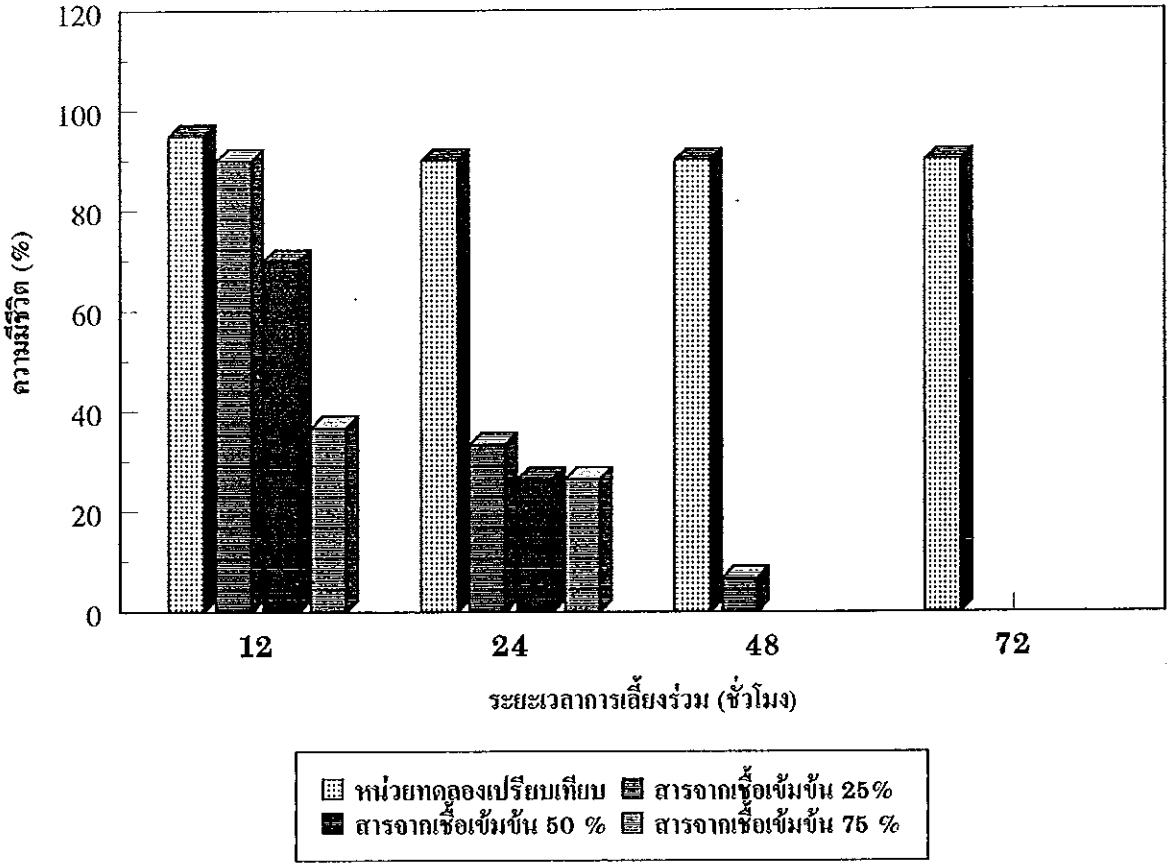
ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด

ระยะเวลาที่เลี้ยงร่วม	ความมีชีวิตของแคลลัส (%) ภายหลังเขย่าเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเข้มข้น					
(ชั่วโมง)	0	25	50	75 (%)	F-test	CV (%)
12	95.00^{aA}	90.00^{aA}	70.00^{aA}	36.67^{bA}	*	19.13
24	90.00^{aB}	33.33^{bB}	26.33^{bB}	26.33^{bA}	*	24.73
48	90.00^{aB}	6.67^{bC}	0^{bC}	0^{bB}	*	10.21
72	90.00^{aB}	0^{bC}	0^{bC}	0^{bB}	*	8.06
F-test	*	*	*	*		
CV (%)	1.10	18.31	15.80	18.88		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. botryosa* และระยะเวลาการเลี้ยงร่วมต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด

2.2.2 สารจากเชื้อ *P. palmivora*

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เขย่าเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 9 ภาพที่ 16 เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงที่สุดคือ 41.00 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติกับเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตต่ำที่สุดคือ 15.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตไม่แตกต่างกันคือ 17.50 เปอร์เซ็นต์

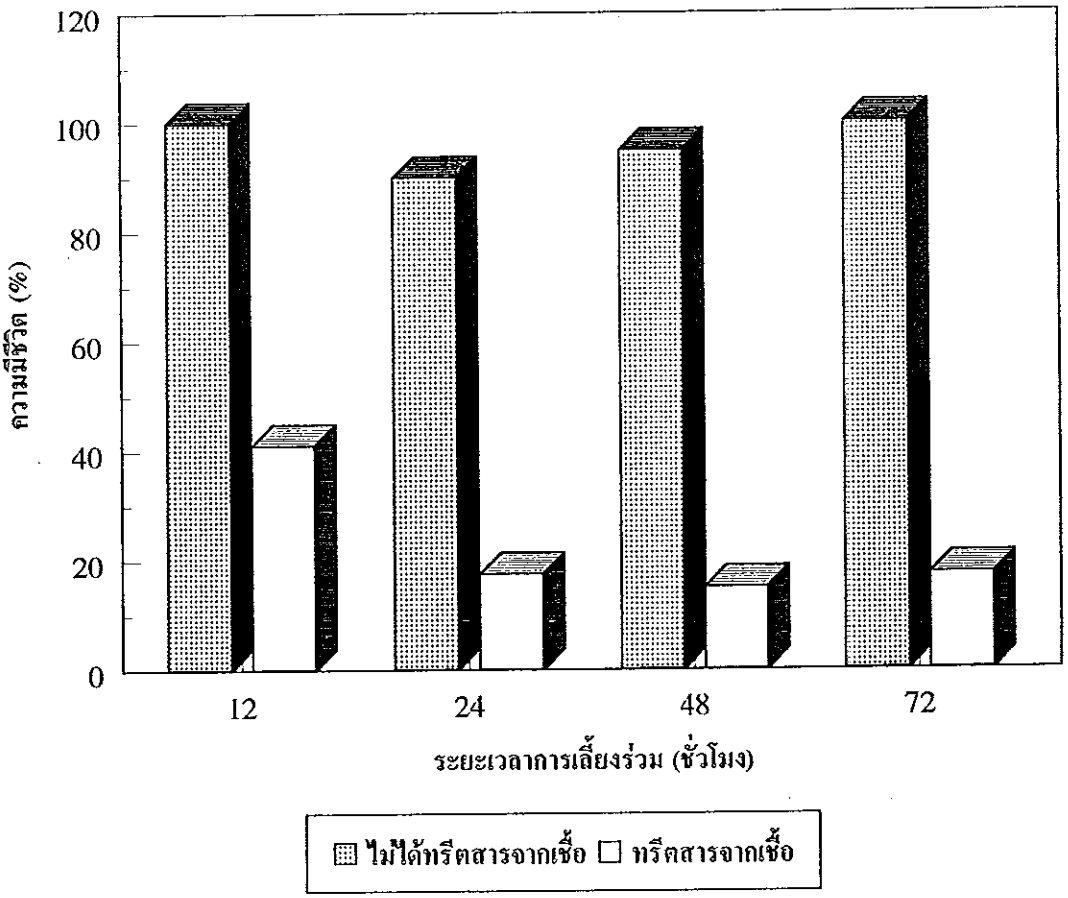
ตารางที่ 9 ผลของระยะเวลาการเขย่าเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

ระยะเวลาการเลี้ยงร่วม (ชั่วโมง)	ความมีชีวิตของแคลลัส (%)	
	ไม่ได้ทรีตสารจากเชื้อ	ทรีตสารจากเชื้อ
12	100	41.00[a]
24	90	17.50[b]
48	95	15.00[c]
72	100	17.50[b]
F-test	ns	*
CV (%)	11.98	24.40

* แตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 16 ผลของระยะเวลาการเขย่าเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

การศึกษาที่ 3 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora*

3.1 ผลของอายุของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 2 4 6 8 และ 10 วัน หลังย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่ เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมในอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 0 (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ) 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในหน่วยทดลองเปรียบเทียบทุกช่วงอายุ สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณได้ 73.20-88.37 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ชักนำได้ประกอบไปด้วยเซลล์สีเหลืองรูปร่างกลมขนาดเล็กจำนวนมากปกคลุมเซลล์เดิม ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันทุกช่วงอายุที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเมื่อวางเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 2 วัน มีอัตรารอดชีวิตสูงสุดในอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 6 วัน มีอัตรารอดชีวิตสูงสุดในอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เอ็มบริโอเจนนิกซัสเพนชันอายุ 2 4 8 และ 10 วัน มีอัตรารอดชีวิตลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารจากเชื้อเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้สูงกว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกช่วงอายุของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน (ตารางที่ 10 ภาพที่ 17)

ตารางที่ 10 ผลของอายุของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

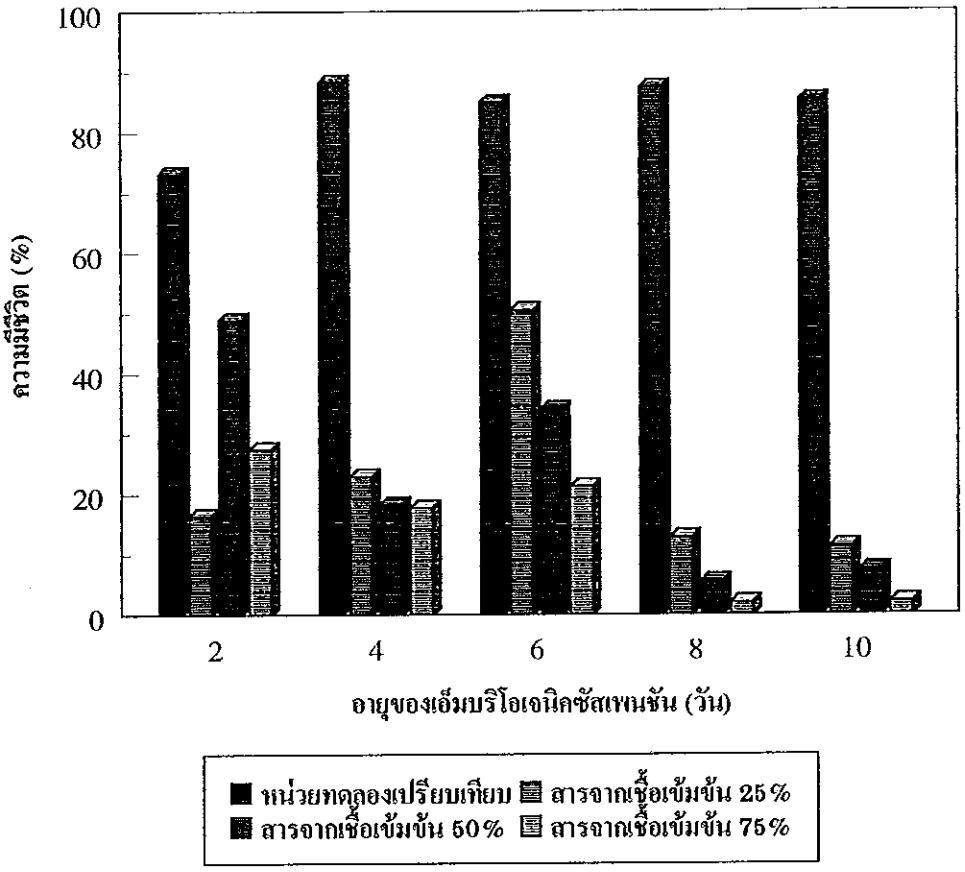
อายุ (วัน)	ความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน (%) ในอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น					
	0	25	50	75 (%)	F-test	CV (%)
2	73.20^{a}	16.45^{cB}	48.92^{bA}	27.45^{bc}	*	28.61
4	88.37^{a}	22.88^{bB}	18.33^{bAB}	17.72^{b}	*	40.40
6	84.97^{a}	50.56^{bA}	34.15^{bAB}	21.25^{b}	*	40.55
8	87.49^{a}	12.83^{bB}	5.54^{bB}	1.99^{b}	*	31.47
10	85.39^{a}	11.25^{bB}	7.40^{bB}	2.07^{b}	*	26.61
F-test	ns	*	*	ns		
CV (%)	8.26	40.54	41.78	44.99		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 17 ผลของอายุเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

3.2 ผลของความหนาแน่นของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

จากการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันความหนาแน่น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร ร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 0 (หน่วยทดลองเปรียบเทียบ) 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันในหน่วยทดลองเปรียบเทียบมีอัตรารอดชีวิต 82.80-85.41 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างกลมขนาดเล็กสีเหลืองจำนวนมาก ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงขึ้นเมื่อความหนาแน่นของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 11 ภาพที่ 18) อย่างไรก็ตามเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันความหนาแน่น 1.5 มิลลิลิตร มีชีวิตรอดสูงกว่าความหนาแน่น 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร และนอกจากนี้พบว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้สูงกว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

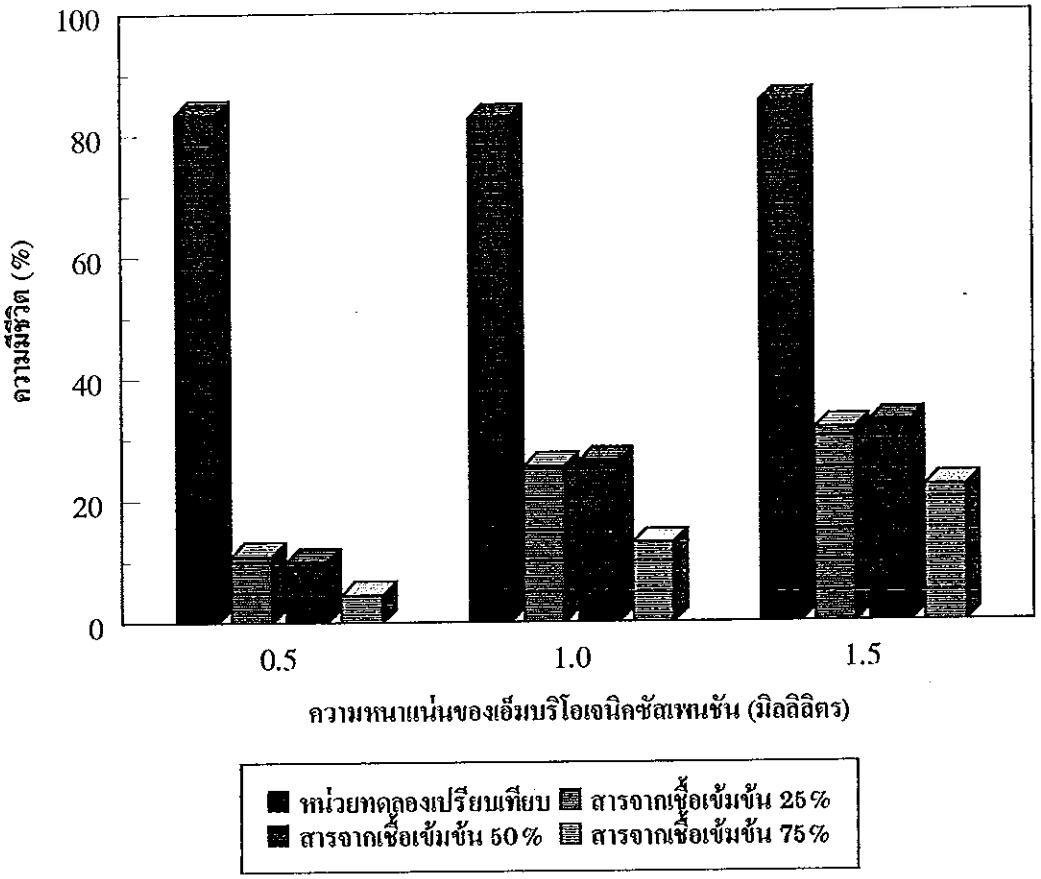
ตารางที่ 11 ผลของความหนาแน่นของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

ความหนาแน่น (มิลลิลิตร)	ความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน (%) ในอาหารเติมสารจากเชื้อเข้มข้น					
	0	25	50	75 (%)	F-test	CV (%)
0.5	83.58[a]	11.00[b]	10.00[b]	4.54[b]	*	36.10
1.0	82.80[a]	25.60[b]	26.41[b]	13.00[b]	*	42.73
1.5	85.41[a]	31.76[b]	32.76[b]	22.20[b]	*	48.83
F-test	ns	ns	ns	ns		
CV (%)	10.41	49.58	32.68	59.42		

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 18 ผลของความหนาแน่นเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันและความเข้มข้นของสารจากเชื้อ *P. palmivora* ต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

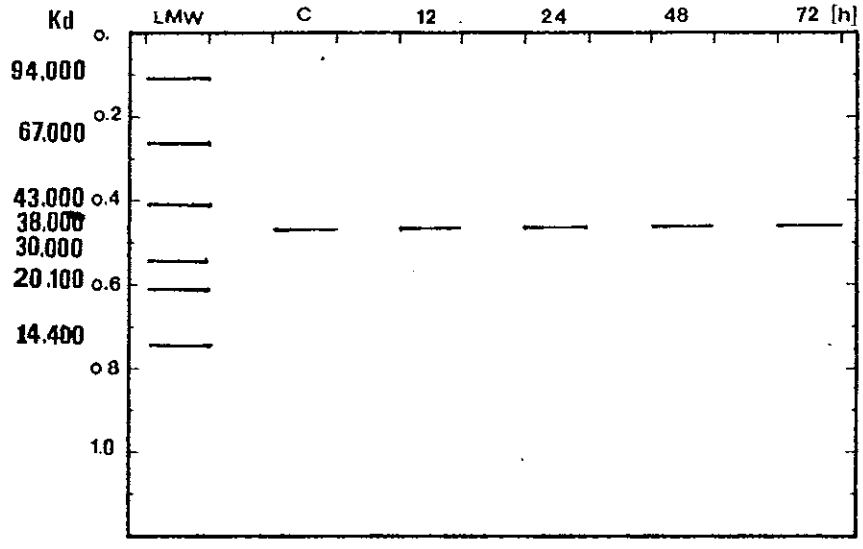
การศึกษาที่ 4 การตรวจสอบสายพันธุ์แคลลัสต้านทาน

4.1 การตรวจหาปริมาณโปรตีน

การตรวจหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดสายพันธุ์แคลลัสตามวิธีของ Bradford ไม่สามารถทำได้สำเร็จเนื่องจากปริมาณของสารสกัดสายพันธุ์แคลลัสที่ได้จากการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในแต่ละครั้งของการทดลองมีปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ และจากการนำสารสกัดสายพันธุ์แคลลัสที่สกัดได้โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ในอัตราที่แตกต่างกัน มาทำการแยกแถบโปรตีนบนแผ่นเจลพบว่า แถบโปรตีนมีตำแหน่งและขนาดของแถบไม่แตกต่างกัน และย้อมติดสีในระดับความเข้มที่เท่ากัน ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ในอัตราที่แตกต่างกันสามารถสกัดปริมาณโปรตีนได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน

4.2 การวิเคราะห์โปรตีน

จากการวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยวิธีอิเลคโตรฟอรีซีส พบว่าแถบโปรตีนของแคลลัสที่ต้านทานซึ่งเขย่าเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อทุกระดับความเข้มข้น และทุกระยะเวลาการเลี้ยงร่วมไม่แตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบ โปรตีนที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 Kd (ภาพที่ 19)



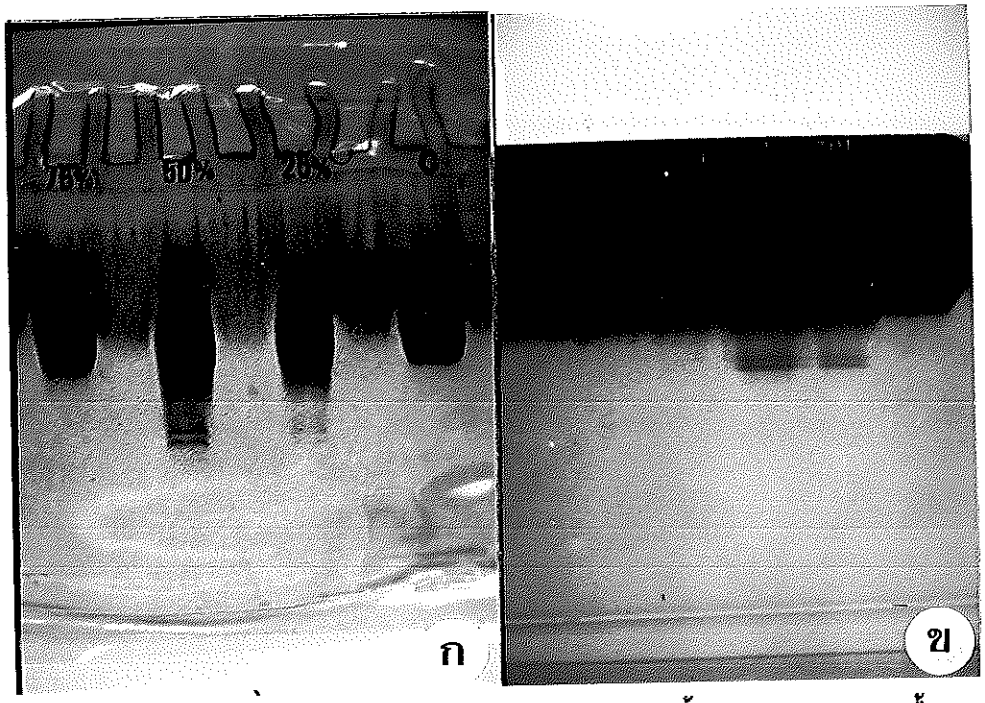
ภาพที่ 19 รูปแบบโปรตีนของแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง

4.3 การวิเคราะห์เอ็นไซม์

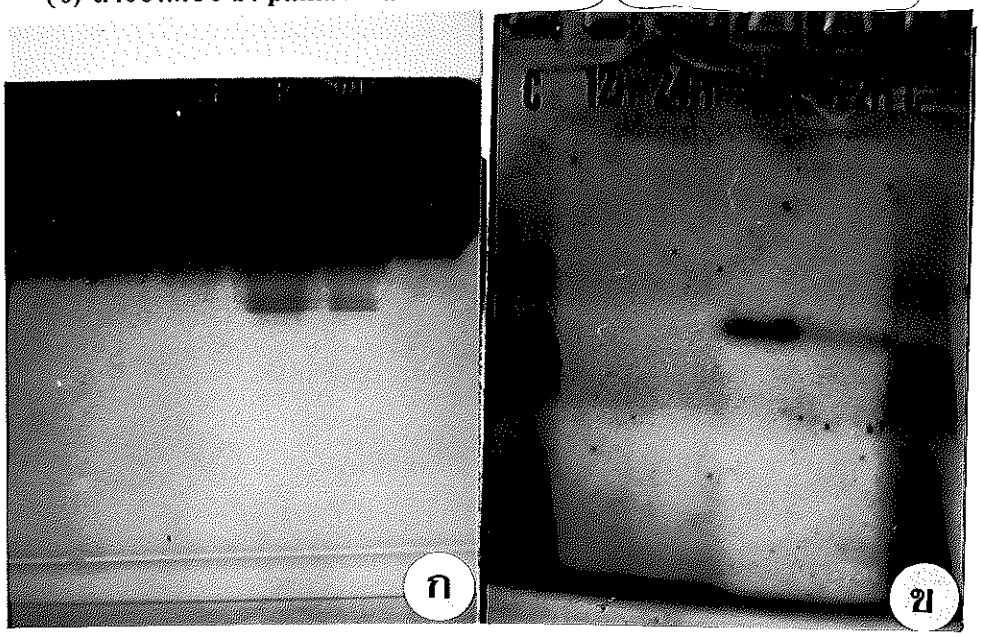
เมื่อนำแผ่นเจลมาศึกษารูปแบบไซโมแกรมของเอ็นไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่าเฉพาะเอ็นไซม์ peroxidase และ acid phosphatase มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 12 ภาพที่ 20 และภาพที่ 21) ไซโมแกรมเอ็นไซม์ peroxidase ของแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* ทุกระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงความแตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบ โดยเฉพาะแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบเทียบอย่างเด่นชัด เป็นไปในทำนองเดียวกับแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนไซโมแกรมเอ็นไซม์ acid phosphatase นั้น ตรวจพบเฉพาะแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เท่านั้น

ตารางที่ 12 ผลของไอโซไซม์ต่อการตอบสนองการต้านทานต่อสารจากเชื้อเมื่อวิเคราะห์บนแผ่น polyacrylamide gel

ชื่อเอ็นไซม์	ปฏิกิริยาของเอ็นไซม์	
	ไม่ได้ทรีตสารจากเชื้อ	ทรีตสารจากเชื้อ
Peroxidase	2 แถบ	4 หรือ 6 แถบ
Acid phosphatase	ไม่มีปฏิกิริยา	1 แถบ
Esterase	ไม่มีปฏิกิริยา	ไม่มีปฏิกิริยา
Alcohol dehydrogenase	ไม่มีปฏิกิริยา	ไม่มีปฏิกิริยา
Alkaline phosphatase	ไม่มีปฏิกิริยา	ไม่มีปฏิกิริยา
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	ไม่มีปฏิกิริยา	ไม่มีปฏิกิริยา
Malate dehydrogenase	ไม่มีปฏิกิริยา	ไม่มีปฏิกิริยา
Glutamate dehydrogenase	ไม่มีปฏิกิริยา	ไม่มีปฏิกิริยา



ภาพที่ 20 รูปแบบไซโมแกรมเอ็นไซม์ peroxidase ของแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *Phytophthora* spp.
(ก) สารจากเชื้อ *P. botryosa* ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
(ข) สารจากเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่ต่างกัน



ภาพที่ 21 รูปแบบไซโมแกรมเอ็นไซม์ (ก) peroxidase (ข) acid phosphatase ของแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่ต่างกัน

บทที่ 4

วิจารณ์

การศึกษาที่ 1 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

1.1 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักและขนาดสูงกว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ เมฆา ชาติกุล (2536) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันย่อมมีอัตราการเจริญเติบโตหรือพัฒนาการที่แตกต่างกัน (สมปอง เตชะโต, 2536) นอกจากนี้พบว่าสามารถชักนำยางพาราให้เป็นพืชต้นใหม่ได้ โดยวิธีการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ด (สมปอง เตชะโต และ เมฆา ชาติกุล, 2537; Carron and Enjalric, 1985; Michaux-Ferriere, *et al.* , 1992) ดังนั้นแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้คัดเลือกสายพันธุ์ต้านทาน และเนื่องจากระยะเวลาที่วางเลี้ยง 3 สัปดาห์ สามารถชักนำอัตราการเจริญเติบโตได้สูงที่สุด หลังจากวางเลี้ยงต่อไปอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสจะลดลงเป็นไปในทำนองเดียวกับผลการทดลองของ Michaux-Ferriere และ Carron (1989) คือหลังจากย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แคลลัสประกอบด้วยเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว แต่หลังจากวางเลี้ยงต่อไปแคลลัสประกอบด้วยเซลล์ที่มีสีน้ำตาลซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายแล้วกระจายอยู่ทั่วไป ดังนั้นการใช้แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ วางเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อแล้วจึงตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเพื่อคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทาน นับว่ามีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูง และเนื่องจากการทดลองครั้งนี้นำสารจากเชื้อสาเหตุของโรคมาใช้คัดเลือกแคลลัสต้านทาน ดังนั้นการเจริญเติบโตของแคลลัสบนอาหารเติมสารจากเชื้อจึงขึ้นอยู่กับขนาดของแคลลัสที่วางเลี้ยง ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเชื้อราผลิตสารพิษแล้วปลดปล่อยออกมา สารพิษสามารถเคลื่อนย้ายเข้าสู่แคลลัสได้ยาก เพื่อให้ได้แคลลัสที่ต้านทานจึงจำเป็นต้องใช้แคลลัสขนาดเล็ก ในการทดลองครั้งนี้ใช้แคลลัสที่มีขนาด 2×2 มิลลิเมตร เพราะแคลลัสที่มีขนาดเล็กกว่านี้ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ สอดคล้องกับการคัดเลือกแคลลัสมันฝรั่งที่ต้านทานซึ่งใช้แคลลัสขนาด 1

มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารพิษจากเชื้อ *P. infestans* แคลลัสขนาดเล็กกว่านี้ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่ปราศจากสารพิษได้ (Behnke, 1979)

1.2 อัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน

การเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวในสภาพเขย่าเลี้ยง ทำให้เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ที่มีการกระจายตัวในอาหารเหลวได้รับธาตุอาหารและอากาศในปริมาณที่เพียงพอ ดังนั้นเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ทุกเซลล์จึงมีพัฒนาการไปในทิศทางเดียวกัน (สมปอง เตชะโต, 2536) และเนื่องจากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเป็นเซลล์เดี่ยว และกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กจึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ชักนำสายพันธุ์เซลล์ต้านทาน จากการวัดปริมาตรตะกอนเซลล์พบว่าเอ็มบริโอเจนิคเซลล์มีรูปแบบการเจริญเติบโต 3 ช่วง ช่วงที่หนึ่งระหว่าง 0-2 วัน หลังจากเลี้ยงเป็นระยะที่เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ดูดน้ำและธาตุอาหารเพื่อกิจกรรมการแบ่งเซลล์ ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นน้อยมาก ช่วงที่สองระหว่าง 2-6 วัน หลังจากเลี้ยงเป็นระยะที่เอ็มบริโอเจนิคเซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ปริมาณตะกอนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าหลังจากเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน และช่วงที่สามระหว่าง 8-12 วัน หลังจากเลี้ยง เป็นระยะที่เอ็มบริโอเจนิคเซลล์หยุดการแบ่งตัวเพราะมีการธาตุอาหารจำกัด ปริมาตรตะกอนเซลล์จึงคงที่ ดังนั้นการเพิ่มปริมาตรเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันสามารถทำได้โดยการย้ายเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมวางเลี้ยงในสภาพเดิมทุก ๆ 6 วัน และพบว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันระยะที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วคืออายุ 2-6 วัน หลังย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเหมาะสำหรับนำมาใช้เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อในทำนองเดียวกับการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของอัลฟัลฟาซึ่งพบว่าระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ 8 วัน หลังย้ายเลี้ยงเหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงร่วมกับอาหารเติมสารจากเชื้อ *Fusarium spp.* เพราะพืชต้านทานต้นใหม่ที่ชักนำได้มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุในสภาพแปลงปลูกเพิ่มขึ้น ดังนั้นการนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันมาเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อสามารถเพิ่มความหลากหลายของหน่วยทดลองได้ (Binarova, *et al.* , 1990)

การศึกษาที่ 2 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa*

เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนและเปลือกหุ้มเมล็ดของเมล็ดอ่อน อายุ 9 สัปดาห์ วางเลี้ยงบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีชีวิตรอดได้ 9-32 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* เข้มข้น 25 50

และ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตายหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงไม่ได้รับแคลลัสต้านทานต่อสารจากสายเชื้อนี้ อย่างไรก็ตามสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดและอาหารเลี้ยงต้นอ่อนได้สูงกว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 75 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* มีอัตราการเพิ่มขนาดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารจากเชื้อเพิ่มขึ้น ส่วนผลการเขย่าเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่าความมีชีวิตของแคลลัสลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารจากเชื้อสูงขึ้นหรือเขย่าเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น แคลลัสเขย่าเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง และแคลลัสเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* ทุกระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสต้านทาน จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นเห็นได้ว่าสารจากเชื้อ *P. palmivora* และสารจากเชื้อ *P. botryosa* มีผลต่อความมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้แตกต่างกันแม้ว่าใช้วิธีการเลี้ยงร่วมที่เหมือนกันก็ตาม ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเชื้อแตกต่างกันผลิตสารพิษได้แตกต่างกัน เชื้อที่มีระดับความรุนแรงต่อพืชสูงสามารถผลิตสารที่มีความเป็นพิษต่อพืชต่อแคลลัสและต่อเซลล์ซัสเพนชันได้สูง (Binarova, 1990) สอดคล้องกับผลการทดลองในมะเขือเทศซึ่งพบว่าสารจากเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สายเชื้อ U-10 มีความรุนแรงมากกว่าสายเชื้อ U-10A สายเชื้อ U-10 ทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่เจริญเติบโต หลังจากเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 40 วัน (Toyoda, *et al.* , 1989) ในทำนองเดียวกับผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าสารจากเชื้อ *P. botryosa* มีความรุนแรงของสารพิษสูงกว่าสารจากเชื้อ *P. palmivora*

การศึกษาที่ 8 การเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora*

จากการศึกษาอายุของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเมื่อเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 6 วัน สามารถมีชีวิตรอดได้สูงที่สุด เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันช่วงอายุดังกล่าวมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง เอ็มบริโอเจนิคเซลล์จึงมีความแข็งแรงทำให้เซลล์มีชีวิตรอดในอาหารเติมสารจากเชื้อสูงตามไปด้วย

ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุมากกว่า 6 วัน เมื่อเอ็มบริโอเจนิคเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น แต่ปริมาณอาหารมีจำกัด และมีการปลอดปล่อยของเสียออกนอกเซลล์เป็นผลให้ความแข็งแรงของเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ลดลง ความมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ในอาหารเติมสารจากเชื้อจึงลดลง ส่วนเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 2 และ 4 วัน เอ็มบริโอเจนิคเซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่จึงอ่อนแอต่อสารจากเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 2 วัน เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อเข้มข้น 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ มีชีวิตรอดสูงกว่าเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 4 6 8 และ 10 วัน ซึ่งเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อความเข้มข้นระดับเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 2 วัน ซึ่งเป็นเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ที่อยู่ในระยะปรับตัว มีการสะสมสารต่าง ๆ ไว้ใช้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวน สามารถนำอาหารเติมสารจากเชื้อซึ่ง Pegg (1976) และ Yoder (1980) เสนอแนะว่าประกอบด้วยสารพิษ สารชีวเคมี สารควบคุมการเจริญเติบโต และสารยับยั้งการเจริญเติบโต ชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันไปใช้ได้อย่างเต็มที่ ส่งผลให้เซลล์มีกิจกรรมภายในเซลล์สูง เซลล์จึงมีชีวิตรอดสูง

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันต่อความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชัน พบว่าความมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความหนาแน่นในหน่วยทดลองเปรียบเทียบไม่มีผลต่อความมีชีวิตและอัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ อย่างไรก็ตามสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้สูงกว่าความเข้มข้น 50 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้แตกต่างจากผลการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันของอัลฟัลฟาร่วมกับสารจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* ซึ่งพบว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันได้สูงกว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 1.0 5.0 7.5 15.0 และ 25.0 เปอร์เซ็นต์ (Binarova, *et al.* , 1990) ส่วนในกรณีการเลี้ยงแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* นั้นพบว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงกว่าสารจากเชื้อเข้มข้น 75 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการเลี้ยงแคลลัสอัลฟัลฟาบนอาหารเติมสารจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* ซึ่งพบว่าสารจากเชื้อความเข้มข้นสูงคือ 25 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งความมีชีวิตของแคลลัสได้สูงกว่าสารจากเชื้อความเข้มข้นต่ำคือ 1.0 5.0 7.5 10.0 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ (Arcioni, *et al.* , 1987) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นของผลการทดลองอาจเกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างของ วัสดุพืช อายุ ความหนาแน่น และขนาดของวัสดุพืช ดังนั้นความ

สามารถในการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการแบ่งเซลล์ของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันบนอาหารเติมสารจากเชื้อจึงแตกต่างกัน

การศึกษาที่ 4การตรวจสอบสายพันธุ์ต้านทาน

จากการนำสารสกัดสายพันธุ์แคลลัสต้านทานที่ชักนำได้จากทุกหน่วยทดลองมาศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนด้วยวิธีอิโตรฟอริซีส พบว่าแถบโปรตีนไม่แตกต่างกัน โปรตีนที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 Kd (เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Barna, *et al.* (1975) ซึ่งทำการสังเกตโปรตีนข้าวสาลีด้วยวิธีอิเลคโตรฟอริซีส แล้วพบว่าโปรตีนที่แยกออกมาไม่สามารถบอกถึงความต้านทานต่อโรคราสนิมได้ ทั้งนี้เนื่องจากความซับซ้อนของแถบโปรตีน อย่างไรก็ตาม Vanderplank (1978) เสนอแนะว่าหากใช้วิธีการย้อมสีที่จำเพาะหรือการวิเคราะห์แถบเอ็นไซม์ ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่า "เอ็นไซม์วิกฤติ" (critical enzyme) มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารชีวเคมีเบื้องต้นในพืช การเปลี่ยนรูปของเอ็นไซม์ทำให้เกิดสารชีวเคมีเบื้องต้นที่แตกต่างกันจำนวนมาก ซึ่งอาจจะรวมกันได้หรือรวมกันไม่ได้กับสารเคมีที่เชื้อสาเหตุของโรคสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความต้านทานโรคของพืช จึงทำการศึกษารูปแบบของเอ็นไซม์ต่าง ๆ แต่จากผลการทดลอง พบว่าเฉพาะเอ็นไซม์ peroxidase และ acid phosphatase เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสารจากเชื้อ มีรายงานศึกษาเอ็นไซม์ peroxidase พบว่าเอ็นไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองความต้านทานโรคของพืช (Sako and Stahman, 1972; Retig, 1974; Birecka, *et al.* , 1975) เอ็นไซม์ peroxidase เกิดขึ้นเนื่องจาก 1) เชื้อสาเหตุของโรคชักนำให้เกิดขึ้น 2) เป็นผลกระทบจากการตอบสนองของพืชอันเนื่องมาจากมีบาดแผล (Johnson and Lee, 1978; Nadolny and Sequeira, 1980) แต่ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าความแตกต่างของแถบเอ็นไซม์ peroxidase ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารจากเชื้อและระยะเวลาการเลี้ยงร่วมเท่านั้น ไซโมแกรมของแคลลัสเขย่าเลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ แตกต่างจากแคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้ออย่างเด่นชัด ดังนั้นข้อมูลนี้สนับสนุนว่าเอ็นไซม์ peroxidase เกิดขึ้นเนื่องจากกลไกการตอบสนองความต้านทานของแคลลัสต่อสารจากเชื้อสาเหตุของโรค ส่วนเอ็นไซม์ acid phosphatase นั้น มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความต้านทานโรคของพืชได้ (Hunt and Barnes, 1982) จากการทดลองพบว่าเฉพาะแคลลัสที่เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เท่านั้นที่มีไซโมแกรมเอ็นไซม์ acid phosphatase แตกต่างจากแคลลัสที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ

ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้ พบว่าความต้านทานโรคของแคลลัสต้านทานที่ชักนำได้เกิดขึ้นเนื่องจากสารจากเชื้อสร้างโปรตีนเหนี่ยวนำให้แคลลัสสร้างเอ็นไซม์ peroxidase และ acid phosphatase ขึ้น ปฏิกิริยาสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นกระตุ้นให้แคลลัสต้านทานต่อสารจากเชื้อ ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐาน gene for gene ของความต้านทานโรคของพืชที่เสนอแนะโดย Vanderplank (1978)

บทที่ 6

สรุป

จากการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์แคลลัสยางพาราที่ต้านทานต่อสารจากเชื้อ *Phytophthora* สาเหตุโรคใบร่วงยางพารา สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักและขนาดสูงกว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ดังนั้นจึงเป็นระยะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อเพื่อชักนำแคลลัสต้านทาน

2. เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสขนาด 2x2 มิลลิเมตร เหมาะสำหรับนำมาใช้เลี้ยงร่วมกับสารจากเชื้อ *Phytophthora* เอ็มบริโอเจนิกแคลลัสขนาดเล็กกว่านี้ไม่สามารถนำมาใช้ได้เพราะไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณได้ ในขณะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสขนาดใหญ่กว่านี้มีผลทำให้ประสิทธิภาพการคัดเลือกแคลลัสต้านทานลดลง แต่อย่างไรก็ตามการใช้เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันมีความเหมาะสมในการนำมาใช้คัดเลือกแคลลัสต้านทานมากที่สุดเพราะเป็นเซลล์เดี่ยวและกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่มีผนังเซลล์ และเซลล์มีความสม่ำเสมอมีทิศทางการพัฒนาที่เหมือนกัน จึงตอบสนองต่อสารจากเชื้อมากที่สุด

3. สารจากเชื้อ *P. botryosa* มีระดับความรุนแรงของสารพิษสูงกว่าสารจากเชื้อ *P. palmivora* จึงสามารถยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์

4. สารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งความมีชีวิตของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ชักนำจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนและเปลือกหุ้มเมล็ดได้สูงที่สุดคือ 90.7 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับจากสารจากเชื้อเข้มข้น 75 และ 25 เปอร์เซ็นต์

5. สารจากเชื้อ *P. botryosa* และสารจากเชื้อ *P. palmivora* เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งความมีชีวิตของแคลลัสได้ 73.67 และ 85.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิธีการเลี้ยงร่วมดังกล่าวรวมถึงความเข้มข้นและเวลาข้างต้นชักนำแคลลัสต้านทานให้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้คัดเลือกแคลลัสต้านทาน

6. การเลี้ยงแคลลัสร่วมกับสารจากเชื้อก่อนการเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณ ชักนำการต้านทานได้ดีกว่าการเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติมสารจากเชื้อ

7. เอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชันอายุ 6 วัน ความหนาแน่น 1.5 มิลลิลิตร เหมาะสมต่อการนำมาใช้คัดเลือกแคลลัสต้านทาน

8. แถบโปรตีนของแคลลัสต้านทานไม่แตกต่างจากหน่วยทดลองเปรียบทียบโปรตีนที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 Kd

9. เอ็นไซม์ peroxidase และ acid phosphatase เกี่ยวข้องกับความต้านทานของแคลลัส ดังนั้นจึงตรวจพบเอ็นไซม์ทั้งสองนี้ในแคลลัสที่ต้านทาน

เอกสารอ้างอิง

จำนงค์ คงศิลปี. 2535. ตลาดกลางยางพารา. วารสารยางพารา 12 : 1.

จำนงค์ คงศิลปี. 2536. อุตสาหกรรมยางสดใส. วารสารยางพารา 13 : 1.

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2529. พันธุ์กรรมของเชื้อ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2522. สรีรวิทยาและพันธุกรรมในกลไกการเกิดโรค. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปัทมา ชนะสงคราม และ ภัทธาวุธ จิวตระกูล. 2535. การขยายพันธุ์ยางโดยการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อตา. วารสารยางพารา 12 : 23-28.

ประภา พัฒนกุล. 2532. โรคในยางพารา. เอกสารประกอบคำบรรยายในการสัมมนาเรื่อง "โรคยางพารา" . ณ ศูนย์วิจัยยางสงขลา. ระหว่างวันที่ 29-31 สิงหาคม 2532. 22 หน้า (อัดสำเนา).

พงษ์เทพ ขจรไชยกุล. 2520. การระบาดของโรคใบร่วงไฟท้อฟโทร่าของยางพาราในปี 2519. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 10 : 436.

พงษ์เทพ ขจรไชยกุล. 2523. โรคและศัตรูยางพาราในประเทศไทยปี 2522. วารสารยางพารา 1 : 12-19.

ไพโรจน์ จ๋วงพานิช. 2522. หลักวิชาโรคพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เมฆา ชาติกุล. 2536. การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต และ เมฆา ชาติกุล. 2537. การเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อยางพารา : ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ด. ว. สงขลานครินทร์ 15 : 227-233.

สมปอง เตชะโต และ เมฆา ชาติกุล. 2537. การเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อยางพารา : การชักนำกระบวนการโซมาติคเอ็มบริโอเจนีซีสและพืชต้นใหม่จากเปลือกหุ้มเมล็ด. ว. สงขลานครินทร์ 15 : 235-241.

สมปอง เตชะโต และ วัทนา เอ้งย่อง. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ในยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ 10 : 1-6.

สมปอง เตชะโต และอรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อยางพารา I : การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. 14 : 123-132.

สุเทพ ชูช่วย. 2534. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2527. โรคยางพารา. ใน โรคพืชทั่วไปและบทปฏิบัติการ เอกสารประกอบการสอนวิชาโรคพืชทั่วไป (ร. 112) ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 201-203.

เสริมลาภ วสุวัต. 2531. สถานการณ์การผลิตและการตลาดของยางพาราของประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร. 12 หน้า (อัดสำเนา).

Alicchio, R. , Antonioli, C. and Palenzona, D. 1984. Karyotypic variability in plants of *Solanum melongena* regenrated from callus grown in presence of culture filtrate of *Verticillium dahliae*. Theor. Appl. Genet. 67 : 261-267.

Arai, M. and Takeuchi, M. 1993. Influence of *Fusarium* wilt toxin (s) on carnation cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 : 287-293.

Arcioni, S. , Pezzotti, M. and Dámiani, F. 1987. *In vitro* selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Theor. Appl. Genet. 74 : 700-705.

Auboiron, E. , Carron, M. P. and Nicole, M. F. 1990. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21 : 31-37.

Barna, B. , Balazs, E. and Kiraly, Z. 1975. Proteins and resistance of wheat to stem rust : non-involvement of some serologically and electrophoretically determined proteins. Phys. Plant Path. 6 : 137-143.

Behnke, M. 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plant. Theor. Appl. Genet. 55 : 69-71.

Behnke, M. 1980a. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrate of *Phytophthora infestans*. Theor. Appl. Genet. 56 : 151-152.

Behnke, M. 1980b. Selection of dihaploid potato callus for resistance to culture filtrate of *Fusarium oxysporum*. Z. Pflanzenzucht 85 : 254-258

Binarova, P. , Nedelnik, J. , Fellner, M. and Nedbalkova, B. 1990. Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22 : 191-196.

Birecka, H., Catalfamo, J. L. and Garraway, M. O. 1975. Cell wall protoplast isoperoxidase of corn leaves in relation to cut injury and infection with *Helminthosporium maydis*. Plant Physiol. 55 : 607-610.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye bining. Anal. Biochem. 72 : 248-259.

Calderon, A. A. , Zapata, J. M. , Pedreno, M. A. , Muuoz, R. and Barcelo, A. R. 1992. Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidase related to constitutive disease resistance in *in vitro*-cultured grapevine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29 : 63-70.

Carlson, P. S. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. Science 180 : 1366-1368.

Carron, M. P. and Enjalric, F. 1985. Studies on vegetative somatic embryogenesis and *in vitro* microcutting. Proceeding 5th International Congress Plant Tissue and Cell Culture : Plant Tissue Culture. (ed. A. Fujiwara) Tokyo, pp. 751-752.

Carron, M. P. , Enjalric, F. and Deschamps, A. 1984. Progress of Research into *in vitro* Vegetative Propagation of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. IRCA, CR Coll Exp. Phys. Am. Hevea IRRDB, IRCA, Montpellier, pp. 427-435.

Carron, M. P. , Enjalric, F. , Lardet, L. and Deshamps, A. 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed. Y. P. S. Bajaj) Vol. 5, pp. 222-245. Berlin : Springer Verlag.

Chen, C. H. , Chen, F. T. , Chien, C. F. , Wang, C. H. Chang, S. J. , Hsu, H. E. , Ho, Y. T. and Lu, T. M. 1978. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Proceedings of Symposium on Anther Culture. China , pp. 11-22

Chen, Z. , Quian, C. , Xu, X. and Deng, Z. 1982. Anther culture techniques of rubber tree and sugarcane. Proceeding 5th International Congress. Plant Tissue and Cell Culture. (ed. A. Fujiwara) Tokyo, pp. 533-534.

Chen, Z. 1983. Microscopic observation of *Hevea brasiliensis* culture. Proceedings of Workshop Cosponsored by The Institute of Genetics. Academia Sinica and The International Rice Research Institute : Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. International Rice Reseach Institute of Manila. China, pp. 47-54.

Chen, Z. 1984. Rubber (*Hevea*) *In* Handbook of Plant Cell Culture. (eds. W. R. Sharp, D. A. Evan, P. V. Ammirato and Y. Yamada) Vol. 3, pp. 546-563, New York : Macmillan Publishing Co.

Concibido, V. C. , Secor, G. A. and Jansky, S. H. 1994. Evaluation of resistance to *Verticllium* wilt in diploid, wild potato interspecific hybrids. Euphytica 76 : 145-152.

El Hadrami, I. , Carron, M. P. and Auzac, J. D. 1991. Influence of exogenous hormones on somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Ann. Bot. 67 : 511-515.

El Hadrami, I. and Auzac, J. D. 1992. Effects of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus. Ann. Bot. 69 : 323-325.

Enjalria, F. and Carron, M. P. 1982. Plant physiology : *in vitro* microcutting of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.) young plants. C. R. Acad. Sc. Paris. 3 : 259-264.

Furusawa, I. 1988. Production of disease resistant plants using somaclonal variations. *In* Cell and Tissue Culture in Field Crop Improvement (ed. C. H. Hung) No. 38, pp. 5-12. Taipei : Shutter Printing Co. , Ltd.

Gentile, A. , Tribulato, E. , Deng, Z. N. , Fluhr, R. and Vardi, A. 1993. Nucellar callus of "Femminello" lemon, selected for tolerance to *Phoma tracheiphila* toxin, shows enhanced release of chitinase and glucanase into the culture medium. Theor. Appl. Genet. 86 : 527-532.

Gray, L. E. Guan, Y. Q. and Widholm, J. M. 1986. Reaction of soybean callus to culture filtrate of *Phialophora gregata*. Plant Science 47 : 45-55.

Hartman, C. L. , McCoy, T. J. and Knous, T. R. 1984. Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin (s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Plant Science Letters 34 : 183-194.

Henniger, H. 1963. Zur Kultur von *Phytophthora infestans* auf voll-synthetischen Nahrsubstraten. Z. Allgem. Mikrobiol. 3 : 126-135.

Holliday, M. J. and Klarman, W. L. 1979. Expression of disease reaction types in soybean callus from resistant and susceptible plants. Phytopathology 69 : 576-578.

Hunt, J. S. and Barnes, M. F. 1982. Molecular diversity and plant disease resistance : an electrophoretic comparison of near-isogenic lines of wilt-resistance or susceptible *Pisum sativum* L. cv. William Massey. Euphytica 31 : 341-348.

Ishida, Y. and Kumashiro, T. 1988. Expression of tolerance to the host-specific toxin of *Alternaria alternata* (AT toxin) in cultured cells and isolated protoplasts of tobacco. Plant Disease 72 : 892-895.

Jang, J. C. and Tainter, F. H. 1991. Optimum tissue culture conditions for selection of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in pine callus tissue. Plant Cell Reports 9 : 488-491.

Johnson, L. B. and Lee, R. F. 1978. Peroxidase changes in wheat isolines with compatible and incompatible leaf rust infections. Phys. Plant Path. 13 : 173-181.

Kellerhals, M. and Furrer, B. 1994. Approaches for breeding apples with durable disease resistance. Euphytica 77 : 31-35.

Koller, B. , Gianfranceschi, L. , Seglias, N. , McDermott, J. and Gessler, C. 1994. DNA markers linked to *Malus floribunda* 821 scab resistance. Plant Mol. Biol. 26 : 597-602.

Lateur, M. and Populer, C. 1994. Screening fruit tree genetic resources in Belgium for disease resistance and other desirable characters. Euphytica 77 : 147-153.

Latunde-Dada, A. O. and Lucas, J. A. 1983. Somaclonal variation and reaction to *Verticillium* wilt in *Medicago sativa* L. plants regenerated from protoplasts. Plant Science Letters 32 : 205-211.

Ling, D. H. , Vidhyasehsaharan, P. , Borromeo, E. S. , Zapata, F. J. and Mew, T. W. 1985. *In vitro* screening of rice germplasm for resistance to brown spot disease using phytotoxin. Theor. Appl. Genet. 71 : 133-135.

Ludwig, A. C. , Hubstenberger, T. F. and Phillips, G. C. 1992. Screening of *Allium* tester lines *in vitro* with *Pyrenochaeta terrestris* filtrates. HortScience 27 : 166-168.

McComb, J. A. , Hinch, J. M. and Clarke, A. E. 1987. Expression of field resistance in callus tissue inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 77 : 346-351.

Michaux-Ferriere, N. and Carron, M. P. 1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* : The importance of timing of subculture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19 : 245-256.

Michaux-Ferriere, N. , Grout, H. and Carron, M. P. 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). Amer. J. Bot. 79 : 174-180.

Miller, S. A. , Davidse, L. C. and Maxwell, D. P. 1984. Expression of genetic susceptibility, host resistance, and nonhost resistance in alfalfa callus tissue inoculated with *Phytophthora megasperma*. Phytopathology 74 : 346-351.

Montora, P. , Etienne, H. , Michaux-Ferriere, N. and Carron, M. P. 1993. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 331-338.

Morpurgo, R. , Lopato, S. V. , Afza, R. and Novak, F. T. 1994. Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* race 1 and race 4 on diploid banana (*Musa acuminata* Colla). Euphytica 75 : 121-129.

Mouradov, A. , Mouradova, E. and Scott, K. T. 1994. Gene family encoding basic pathogenesis-related 1 proteins in barley. Plant Mol. Biol. 26 : 503-507.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15 : 473-497.

Nadolny, L. and Sequeira, L. 1980. Increases in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. Phys. Plant Path. 16 : 1-8.

Nitsch, J. P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163 : 85-87.

Oh, B. J. Frederiksen, R. A. and Magill, C. W. 1994. Identification of molecular markers linked to head smut resistance gene (*Shs*) in sorghum by RFLP and RAPD analyses. Phytopathology 84 : 830-833.

Othman, R. B. and Paranjothy, K. 1980. Isolation of *Hevea* protoplasts. J. Rubber. Res. Inst. Malaysia 28 : 61-66.

Pastor-Corrales, M. A. , Otoya, M. M. , Molina, A. and Singh, S. P. 1995. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. Plant Disease 79 : 63-67.

Pegg, G. F. 1976. Endogenous auxins in healthy and disease plant. *In* Encyclopedia of plant physiology (eds. R. Heitfuss and P. H. Williams) Vol.4, pp. 560-581, Berlin : Springer-Verlag .

Pijut, P. M. , Domir, S. C. , Lineberger, R. D. and Schreiber, L. R. 1990. Use of culture filtrate of *Ceratocystis ulmi* as a biossay to screen for disease tolerant *Ulmus americana*. Plant Science 70 : 191-196.

Retig, N. 1974. Changes in peroxidase and PPO associated with natural and induced resistance of tomato to *Fusarium* wilt. Phys. Plant Path. 4 : 145-150.

Rines, H. W. and Luke, H. H. 1985. Selection and regeneration of toxin-insensitive plants from tissue culture of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Heminthosporium victoriae*. Theor. Appl. Gent. 71 : 16-21.

Sako, N. and Stahman, M. A. 1972. Multiple molecular forms of enzymes in barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Phys. Plant Path. 2 : 217-226.

Scheewe, P. 1994. Identification of pathogenic races of *Phytophthora fragariae* Hickman in Germany. Euphytica 77 : 25-29.

Toyoda, H. Shimizu, K. , Chatani, K. , Kita, N. and Matsuda, Y. 1989. Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture. Plant Cell Reports 8 : 317-320.

Vanderplank, J. E. 1978. Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Berlin : Springer-Verlag, pp 167 .

Vardi, A. , Epstein, E. and Breiman, A. 1986. Is the *Phytophthora citrophthora* culture filtrate a reliable tool for the *in vitro* selection of resistant *Citrus* variants ? Theor. Appl. Genet. 72 : 569-574.

Vidhyasekaran, P. , Borromeo, E. S. , Ling, D. H. and Mew, T. M. 1991. Relationship between growth rate of *Helminthosporium oryzae* isolates on callus of rice cultivars and their disease reaction on rice plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24 : 237-241.

Wang, Z. , Zeng, X. , Chen, C. , Wu, H. , Li, O. , Fan. G. and Lu, W. 1980. Induction of rubber plantlets from anthers of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *in vitro*. Chinese Journal of Tropical Crops 1: 25-26.

Wilson, H. M. and Street, H. E. 1975. The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension culture of *Hevea brasiliensis*. Ann. Bot. 39 : 671-682.

Wilson, H. M. , Eiza, M. Z. and Irwin, S. W. B. 1976. The effects of agitated liquid medium on *in vitro* cultures of *Hevea brasiliensis*. Physiol Plant 36 : 399-402.

Yoder, O. C. 1980. Toxins in pathogensis. Ann. Rev. Phytopathol. 18 : 103-129.

ภาคผนวกที่ 1

องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบ	ปริมาณธาตุอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสูตร	
	MS	N&N
ธาตุอาหารหลัก		
NH_4NO_3	1,650.00	720.00
KNO_3	1,900.00	950.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00	166.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00	185.00
$KH_2PO_4.H_2O$	170.00	68.00
ธาตุอาหารรอง		
KI	1.70	—
H_3BO_3	12.40	10.00
$MnSO_4.H_2O$	33.80	25.00
$ZnSO_4.7H_2O$	21.00	10.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.50	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.05	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.05	—
ธาตุเหล็ก		
Na_2-EDTA	18.60	27.80
$FeSO_4.7H_2O$	13.90	37.30
สารอินทรีย์		
Thiamine-HCl	5.00	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50	0.50
Nicotinic acid	0.50	0.50
Glycine	2.00	5.00
Myo-inositol	500.00	2.00
Biotin	—	0.50
Folic acid	—	0.50
Sucrose	8 %	3 %
สารควบคุมการเจริญเติบโต		
2,4-D	2.00	0.50
BA	2.00	1.00
อื่น ๆ		
Agar-agar	0.80 %	—
pH	5.7	5.5

อาหารทุกสูตรนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวกที่ 2

องค์ประกอบในอาหารสูตร Henniger

สารเคมี	จำนวนมิลลิกรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.40
$NaNO_3$	0.40
$CaCl_2$	0.10
$MgCO_3$	0.10
$(NH_4)_2SO_4$	0.10
$FeSO_4.7H_2O$	0.02
Succinic acid	0.20
Asparagine acid	0.40
Glutamic acid	0.40
Alanine	0.10
Arginine	0.20
Leucine	0.10
Glycine	0.20
Cysteine hydrochloride	0.15
Tri-amoniumchloride	0.001
Dextrose	10.00
Saccharose	5.00
deionised water	1000.00 ml

ปรับ pH 5.0-5.2 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ภาคผนวกที่ 3

การย้อมสีปฏิกิริยาเอ็นไซม์

สารเคมี	PER	ACP	AKP	EST	ADH	GDH	MDH	G6PD
สารตั้งต้น	solution A	—	—	—	95% ethanol 3ml	glucose-6-P 5ml	2 M Malic a 5ml	glutamic a 800 mg
Tris-A buffer	—	—	—	—	40ml	5ml	35ml	—
Tris-D buffer	—	—	40ml	—	—	—	—	—
Acetate-B buffer	—	40ml	—	—	—	—	—	—
0.1 M Tris-HCl pH 4.0	80ml	—	—	—	—	—	—	—
0.1 M Tris-HCl pH 7.5	—	—	—	—	—	—	—	100ml
100 mM Na-phosphate pH 6.0	—	—	—	50ml	—	—	—	—
10 mM $CaCl_2$								0.2 ml
0.5 M $MgCl_2$			0.6ml		0.2ml	2ml	0.3ml	
0.25 M $MnCl_2$	—	—	1.2ml	—	—	—	—	—
α-Naphthyl acid phosphate	—	50mg	50mg	—	—	—	—	—
α-Naphthyl acetate	—	—	50mg	25mg	—	—	—	—
β-Naphthyl acetate	—	—	—	25mg	—	—	—	—
Fast Blue BB	—	5omg	—	—	—	—	—	—
Fast Garnet GBC	—	—	—	50mg	—	—	—	—
NAD/NADP	—	—	—	—	NAD 2 ml	NADP 0.2 ml	NAD 2 ml	NAD 30 mg
1% NBT	—	—	—	—	1ml	0.1ml	1ml	20 mg
1% MTT	—	—	—	—	0.3ml	0.1ml	1ml	4 mg
1% PMS	—	—	—	—	0.5ml	0.3ml	0.5ml	
3% Hydrogenperoxide	1ml	—	—	—	—	—	—	—

solution A ประกอบด้วย 210 mg 3 Amino-9-ethylcarbazole, 145 mg 2-napthol ละลายใน acetone 100 ml

Tris-A buffer ประกอบด้วย 100 mg EDTA, 30.25 g Tris-HCl ละลายในน้ำ 250 ml, pH 8.0

Tris-D buffer ประกอบด้วย 1.51 g Tris-HCl, 825 μl 1 N HCl, 1.675 g NaCl ละลายในน้ำ 250 ml

Acetate-B buffer ประกอบด้วย 1.33 ml Glacial acetic acid, 0.56 g NaOH ละลายในน้ำ 100 ml

ภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

NBT = Nitro Blue Tetrazolium

MTT = Thiazolyl Blue formazane

PMS = Phenazine methosulphate

ภาคผนวกที่ 4

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
(Bradford Protein Determination)

1. เตรียมสารละลาย Bradford ซึ่งประกอบด้วย Coomassie Blue G-250 ปริมาตร 100 มิลลิกรัม ละลายใน ethanol เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนเบา ๆ จนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมกรด phosphoric เข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามลงไป ปรับให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 สารละลายที่ได้นำไปเก็บในขวดสีชา

2. เจือจางสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumine (BSA) ด้วยน้ำกลั่น โดยวิธี serial dilution เพื่อให้ได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 2.0 1.0 0.5 0.25 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ดูดสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นและสารสกัดสายพันธุ์เซลล์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมลงในสารละลาย Bradford ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบกับ Blank (ΔA_{595}) ด้วยเครื่อง spectrophotometer Model 690 โดย blank ประกอบด้วยสารละลายที่ใช้สกัดโปรตีน 5 ไมโครลิตร และสารละลาย Bradford ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

5. เปลี่ยนค่า ΔA_{595} ที่ได้เป็นมิลลิกรัมโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวพจมาลย์ สุรนิลพงศ์

วัน เดือน ปีเกิด 30 เมษายน 2511

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2534

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนบัณฑิตศึกษาในประเทศ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ