

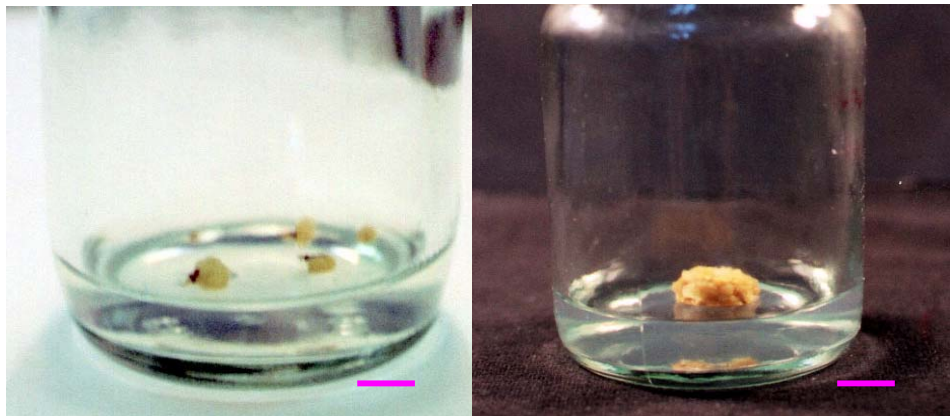
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

3.1 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของยางพาราเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

3.1.1 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับละของเกสรยางพารา (anther callus)

อับละของเกสรที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคนิติน (kinetin) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้เวลา 3-4 อาทิตย์ ลักษณะแคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อน เนื้อเยื่อเกาะกันอย่างหลวม ๆ หลุดออกจากกันง่าย (friable callus) (ดังแสดงในรูปที่ 17ก) จากนั้นจึงย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ลดปริมาณน้ำตาลลง 50% เพื่อเพิ่มขนาดของแคลลัส (รูปที่ 17ข) จากการทดลองผู้วิจัยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับละของเกสรได้ แต่มีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการทดสอบ รวมทั้งมีปัญหากับแหล่งวัสดุที่นำมาใช้ เนื่องจากดอกยางพารามีฤดูกาลออกดอกปีละ 1 ครั้ง ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้พยายามหาส่วนอื่นของยางพาราที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสสำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป



รูปที่ 17 (ก) แคลลัสอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ที่เกิดจากการชักนำจากอับละของเกสรเพศผู้ ในอาหารสูตร MS ดัดแปลงร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและไคนิตินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (bar = 0.5 ซม.)

(ข) แคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากย้ายเลี้ยงในอาหารเพิ่มขนาด (MS-2) (bar = 1.0 ซม.)

จากการศึกษาการสร้างแคลลัสจากอับละของเกสรยางพารา และการเจริญของ แคลลัสจากยางพันธุ์ที่ปลูกกันทั่วไป คือ พันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 พบว่า ความสามารถในการสร้างแคลลัสขึ้นกับพันธุ์ยางที่ใช้ทดลอง โดยยางพันธุ์ RRIM600 มีอัตราการเจริญของแคลลัส อับละของเกสรสูงกว่ายางพันธุ์ GT1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของสมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ็งย่อง (2531) และพบว่าความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากอับละของเกสร ในช่วงแรกเป็นไปได้ด้วยดี แต่เมื่อทำการย้ายเลี้ยงแคลลัสจะชะงักการเจริญไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยแคลลัสบางส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลต่อนั้นแคลลัสจึงจะเจริญต่อไป หลังจากทำการ ย้ายเลี้ยงในสูตรอาหารที่เพิ่มจำนวนแคลลัส (MS-2) 3 ครั้ง ก็สามารถนำแคลลัสที่ได้มาทดสอบ หรืออาจจะชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) ต่อ ไป

ในการทดลองนี้ใช้ดอกยางพาราพันธุ์ GT1 และ RRIM600 ที่มีขนาด 3.0 ถึง 3.5 มิลลิเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของดอกยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่สุเทพ ชูช่วย (2534) ได้ รายงานไว้และพบว่าดอกยางพาราพันธุ์ RRIM600 ดังกล่าวมีขนาดเท่ากับขนาดของดอกยางพารา พันธุ์ 64-1, Reh-keen17 และ Reh-keen 207 ที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะนิวเคลียสเดี่ยวตอน ปลาย (Chen *et al.*, 1978) และจากการทดลองผู้วิจัยเลือกใช้ความเข้มข้น 2,4-D เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากอับละของเกสรของสมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ็งย่อง (2531) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากอับละของเกสรและทำให้มีขนาดใหญ่ได้ เช่นเดียวกับการชักนำแคลลัสจากอับละของเกสรของพืชหลายชนิด ประสบความสำเร็จเนื่องจากการเติม 2,4-D ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง เช่น มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum L.*), ข้าวโพดและข้าว สาดี (Dunwell and Sunderland, 1973 ; Miao *et al.*, 1978 ; Haung and Sunderland. 1982)

การเก็บดอกยางพาราไว้ที่อุณหภูมิ 10 ± 1 °C ก่อนการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ช่วย ในการพัฒนาไปเป็นแคลลัสของอับละของเกสร ช่อดอกยางพาราที่เก็บไว้นานเกินไปจะเหี่ยวเนื่องจากช่อดอกสูญเสียน้ำทำให้เนื้อเยื่อและเซลล์ตาย มีผลทำให้จำนวนอับละของเกสรที่สามารถ พัฒนาไปเป็นแคลลัสมีจำนวนน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในมันสำปะหลังเพราะเมื่อนำ อับละของเกสรของมันสำปะหลังไปเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง พบว่าสามารถ ชักนำแคลลัสได้ถึง 90% แต่เมื่อนำอับละของเกสรของยางพาราที่ผ่านการเก็บไว้ที่อุณหภูมิเดียวกันเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง มาชักนำแคลลัสจะมีอัตราการเกิดแคลลัสที่ต่ำกว่าเดิม ส่วนอับ ละของเกสรที่ตัดมาใหม่ เมื่อนำมาชักนำแคลลัสพบว่าชักนำแคลลัสได้ในปริมาณน้อย เนื่องจาก

อับละของเกสรยางพาราที่ไม่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิตำระยะเวลาหนึ่ง สามารถปล่อยสารบางชนิดออกมาและสารเหล่านั้นอาจยับยั้งการเกิดแคลลัส (สมปอง เตชะโตและวันทนา เอ่งย่อง, 2531)

จากการนำอับละของเกสรของยางพารา 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 มาชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่า อัตราการเกิดแคลลัสต่างกันไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า นอกจากองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงแล้วพันธุ์ยางพาราก็มีผลต่ออัตราการเกิดแคลลัส อัตราการเกิดแคลลัสต่างกัันนี้ตรวจพบได้ในการเพาะเลี้ยงอับละของเกสรของพืชชนิดอื่นด้วย เช่น อับละของเกสรของข้าวพันธุ์ D-5 พัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดจากข้าวที่นำมาทดลองทั้งหมด 11 พันธุ์ (Song *et al.*, 1978)

แคลลัสที่ผ่านการย้ายเลี้ยงในอาหารที่ชักนำแคลลัสไปนานๆ ไม่สามารถนำมาชักนำเอ็มบริอยด์ได้ (สุเทพ ชูช่วย, 2534) แคลลัสมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลที่เรียกว่า browning เกิดขึ้น จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ รวมทั้งเซลล์มีความผิดปกติและเกิดปรากฏการณ์เอ็นโดไมโตซิสคือ การที่เซลล์มีการแบ่งนิวเคลียสแต่ไม่มีการแบ่งไซโตพลาสซึมส่งผลให้การชักนำเอ็มบริอยด์จากแคลลัสเหล่านี้เกิดขึ้นได้ยาก

3.1.2 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสเมล็ดอ่อน (integument-derived callus)

เมล็ดอ่อนที่มีอายุประมาณ 6-8 อาทิตย์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยการนำมาวางเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ 2,4-D และ BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส 8% ปรับ pH ในอาหารเท่ากับ 5.8 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูง แล้วเติมไฟตาเจล (phytagel) ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.25% จากนั้นนำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ในที่มืดเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ผู้วิจัยสามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ภายในเวลา 30 วัน โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะฟูใส มีสีเหลืองอ่อน เกาะกันหลวมๆ หลุดออกจากกันง่าย (friable callus) มีขนาดใหญ่และน้ำหนักมากกว่าแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากอับละของเกสร หรือข้อปล้องของยางพารา (ดังแสดงในรูปที่ 17 และรูปที่ 19) ซึ่งเหมือนกับรายงานของ Te-chato and Chartikul (1995) และยังพบว่าอัตราการสร้างแคลลัสเมล็ดอ่อนยางพาราในยางพันธุ์ RRIM600 สูงกว่ายางพันธุ์ GT1 ซึ่งเหมือนกับอัตราการสร้างของแคลลัสอับละของเกสรที่ขึ้นกับชนิดของพันธุ์ยาง เมื่อทำการย้ายเลี้ยงแคลลัส โดยนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันแต่ลดความเข้มข้นของซูโครสเหลือ 5% (MS-2) เพื่อเพิ่มขนาดของแคลลัสพบว่า เซลล์ของแคลลัสมีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อนบางส่วนจะเป็นสีน้ำตาลต่อนั้นแคลลัสจะเจริญต่อไป (รูปที่ 18ข) อีกปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแคลลัสคือเมื่อทำการย้ายเลี้ยงแคลลัสจะเกิดบาดแผลขึ้น ทำให้เกิดแรงเครียด (stress physiology) (www.hos.ufl.edu/mooreweb/TissueCulture/class7/recalcitrance.pdf)

ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสื่อน้ำตาลของชิ้นส่วนพืช โดยส่วนใหญ่แล้วจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ขึ้น จากการศึกษาของสมปอง เตชะโต (2534) พบว่า สามารถแก้ไขโดยการนำแคลลัสไปวางเลี้ยงในที่มืดเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนทำการย้ายเลี้ยงซึ่งจะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้

Michaux-Ferriere and Carron (1989) ได้รายงานว่าช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในช่วงแรกและระยะเวลาของการย้ายเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอ และจากที่ผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดอ่อนซึ่งพบว่า หากนำเมล็ดอ่อนที่มีอายุระหว่าง 45-75 วัน หลังการผสมเกสร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่หากนำเมล็ดอ่อนที่มีอายุมากกว่าช่วงระยะเวลาดังกล่าวก็จะมีผลต่อความสามารถในการเจริญเป็นแคลลัส หากสามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ก็จะใช้ระยะเวลาในการชักนำนานกว่าเมล็ดที่มีอายุอ่อน ดังนั้นจึงต้องพิถีพิถันในการคัดเลือกเมล็ดที่นำมาใช้ให้อยู่ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวนอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองนำแคลลัสเมล็ดอ่อนที่เตรียมได้มาย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน (cell suspension) แต่ได้ปริมาณเซลล์แขวนลอยเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจะต้องทำการดัดแปลงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงให้เหมาะสม รวมทั้งสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ อัตราเร็วในการเขย่าเลี้ยงด้วย เพื่อจะได้เซลล์ซัสเพนชันซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาระดับเซลล์ได้ โดยจะเป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยที่สามารถทำได้ต่อเนื่องจากงานวิจัยชิ้นนี้ แต่ในขณะนี้ทางผู้วิจัยทำการศึกษาในระดับของแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และ/หรืออิลิซิดิน เพื่อดูปริมาณและอัตราเร็วของสคอพอลิดิน (Scp) ที่ถูกสร้างขึ้น ไม่ได้ศึกษาในระดับเซลล์ซัสเพนชันและพบว่าจากการศึกษาในแคลลัสให้ค่าความแปรปรวนต่ำ รวมทั้งลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อโรคในธรรมชาติได้ดีกว่าการศึกษาในใบยางพาราที่ได้มีรายงานไว้ โดยเมธินี รัตธสาร (2546), นิลุบล บุญหวังช่วย (2545) และนารธิตา รอดโพธิ์ทอง (2546)



รูปที่ 18 (ก) แคลลัสเมื่อดอกอ่อนของยางพาราอายุประมาณ 4 สัปดาห์
 (ข) แคลลัสเมื่อดอกอ่อนของยางพาราอายุประมาณ 8 สัปดาห์
 ในอาหารสูตรเพิ่มขนาดแคลลัส MS-2 (bar =1 ซม.)

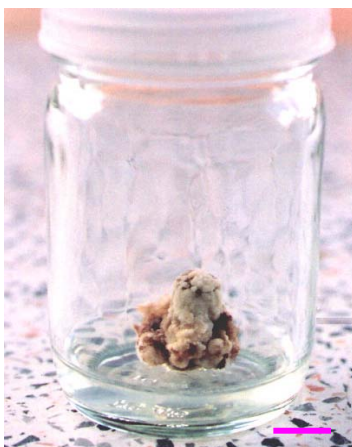
3.1.3 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสข้อปล้อง (internodal stem callus)

ผู้วิจัยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสข้อปล้อง โดยการนำข้อปล้องขนาด 1 เซนติเมตรที่ปลอดเชื้อ มาวางเลี้ยงบนอาหาร MS medium ดัดแปลงร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคนิตินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีของ Arak Jantasilp (1991) เพื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัส Wilson and Street (1975) รายงานว่าการเจริญของแคลลัสข้อปล้องของยางพาราขึ้นกับระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ซึ่งที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกระตุ้นการเกิดแคลลัสในช่วงแรกๆ และช่วยในการเจริญเติบโตของแคลลัสด้วย ส่วนการใช้น้ำตาลซูโครสควรมีเปอร์เซ็นต์สูงถึง 8% จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ดี ทางผู้วิจัยสามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสโดยใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้มีสีเหลืองอ่อน มีลักษณะฟูเหมือนหิมะ (ดังแสดงในรูปที่ 19) ซึ่งจะแตกต่างจากแคลลัสที่ชักนำจากอับละของเกสรและเมล็ดอ่อนที่มีความสม่ำเสมอของเซลล์มากกว่า จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ PB235 มีอัตราการเกิดแคลลัสคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้สูงสุด คือ 61% รองลงมาคือ ยางพันธุ์ RRIT251 คิดเป็น 58 %, ยางพันธุ์ PB255 คิดเป็น 35%, ยางพันธุ์ RRIM600 คิดเป็น 27% และยางพันธุ์ BPM-24 คิดเป็น 21% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เนื่องจากพันธุ์พืชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะจะ

เป็นตัวกำหนดความสามารถในการเกิด organogenesis หรือ embryogenesis ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสมปอง เตชะโต และวันทนา เอ็งย่อง 2531

นำแคลลัสที่ได้ไปย้ายเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มขนาด MS-2 เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์เพื่อใช้ในการทดสอบ และพบว่าเมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสไประยะหนึ่งแคลลัสจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและลักษณะเนื้อเยื่อมีสีขาวขุ่น ซึ่งสอดคล้องกับ Arak Jantasilp (1991) ที่กล่าวว่า แคลลัสข้อปล้องของยางพาราภายหลังย้ายเลี้ยงจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและมีรูปร่างกลมสีขาว รวมทั้งมีลักษณะฟูเหมือนหิมะ โดยเนื้อเยื่อมีการแตกออกจากกัน บางส่วนของแคลลัสมีสีน้ำตาลหรือที่เรียกว่า necrotic นอกจากนี้แคลลัสยังมีการรวมกลุ่มกันหนาแน่นเมื่อผ่านการย้ายเลี้ยงมาแล้ว ดังนั้นจึงไม่ควรย้ายเลี้ยงนานจนเกินไปและหากทำการย้ายเลี้ยงต่อไป ควรคัดแยกเอาชิ้นส่วนของแคลลัสที่มีความสมบูรณ์เท่านั้น

การนำยางพาราซึ่งเป็นไม้เนื้อแข็ง (woody plants) มาทำการศึกษาทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มักประสบปัญหาคือการปนเปื้อนจากชิ้นส่วนพืช (explants) ความมีชีวิตของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ และความสมบูรณ์ของต้นแม่พันธุ์ ปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียที่ติดมาจากเนื้อเยื่อที่ปลูกอยู่ในแปลงทดสอบ เป็นปัญหาที่แก้ไขได้ยากโดยเฉพาะอย่างยิ่ง endogeneous bacteria ที่เกิดขึ้นระหว่าง ก่อน หรือหลังทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การแก้ไขโดยการให้ antibiotic ก็ไม่สามารถแก้ไขปัญหานี้ได้หมด และลักษณะที่พบได้โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากไม้ยืนต้นซึ่งเป็นพืชที่สร้างน้ำยางก็คือ มีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ซึ่งจะเกิดสีน้ำตาลหรือเนื้อเยื่อมีสีดำและเมื่อทำการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่บ่อยๆ ก็จะมีสีน้ำตาลขึ้นได้อีก ซึ่งเป็นลักษณะของการหยุดการเจริญเติบโตและเป็นสาเหตุของการตายของเนื้อเยื่อในที่สุด



รูปที่ 19 แคลลัสข้อปล้องของยางพาราอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ในอาหารสูตรชักนำแคลลัส
(bar =1 ซม.)

ตารางที่ 6 แสดงอัตราการเกิดแคลลัสข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600

พันธุ์ยางพารา	อัตราการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนข้อปล้อง (%)
PB235	61
RRIT251	58
PB255	35
RRIM600	27
BPM-24	21

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลอง

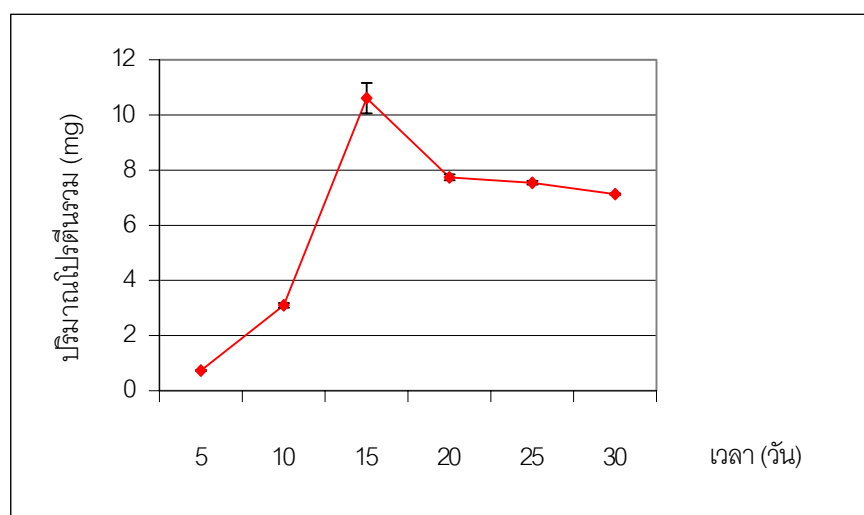
3.2 ผลการเตรียมอิลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora*

เขย่าเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ในอาหารเหลว (Henninger) (Bonnet, 1985) ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C จากนั้นตรวจหาปริมาณโปรตีนรวม (total protein) ในน้ำเลี้ยงเชื้อราทุก 5 วัน ด้วยวิธีของ Bradford จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าโปรตีนรวมในน้ำเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และให้ค่าโปรตีนสูงสุดในวันที่ 15 หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนจะลดลง ดังนั้นจึงเลือกเก็บน้ำเลี้ยงในวันที่ 15 ไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 20

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ในอาหารเหลว (Henninger)

จำนวนวัน	ปริมาณโปรตีนรวม (mg)
5	0.7 \pm 0.01
10	3.1 \pm 0.08
15	10.6 \pm 0.55
20	7.7 \pm 0.11
25	7.5 \pm 0.06
30	7.1 \pm 0.02

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm S.D)



รูปที่ 20 แสดงการเพิ่มขึ้นของโปรตีนรวมในอาหารเหลว (Henninger) สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora*

3.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ขึ้นของอิลิซิติน (partial purified elicitin)

ผู้วิจัยได้เตรียมอิลิซิตินจากเชื้อรา *P. palmivora* ในอาหารเหลว (Henninger) แทนการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เนื่องจากให้โปรตีนปริมาณใกล้เคียงกับการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB ซึ่งมีราคาสูงกว่า และเชื้อรามีการผลิตอิลิซิตินได้รวดเร็วกว่าการเลี้ยงแบบเดิม (ตารางที่ 7 และตารางที่ 8) โดยพบว่า อิลิซิตินมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีปริมาณโปรตีนสูงสุดในวันที่ 15 ของการเลี้ยง จากนั้นปริมาณโปรตีนจะลดลงและเริ่มคงที่ ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ต้องใช้เวลาประมาณ 21 วัน จึงจะสามารถนำเอามาใช้ได้ ที่นิลุบล บุญหวังช่วย (2545) และนารฤติดา รอดโพธิ์ทอง (2546) ได้รายงานไว้

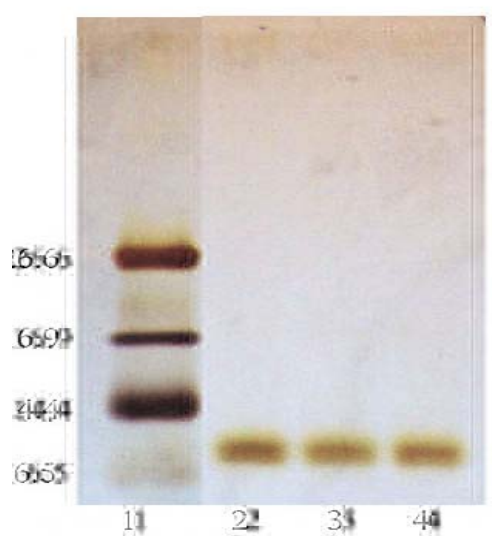
เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวมาหาค่าปริมาณโปรตีน จากการทำการทดลอง 3 ครั้ง พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวมเริ่มต้น 125.00 ± 1.66 มิลลิกรัม คิดเป็น 100% จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จากนั้นตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 90% แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายกลับในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาหาค่าปริมาณโปรตีนพบว่ามีปริมาณโปรตีนรวม 42.76 ± 2.58 มิลลิกรัม คิดเป็น 34.20% นำไปกำจัดเกลือออกด้วยคอลัมน์ PD-10 พบว่าปริมาณโปรตีนเหลือ 38.86 ± 2.35 มิลลิกรัม คิดเป็น 31.09% จากปริมาณเริ่มต้น รวมหลอดที่มีค่าโปรตีนสูงจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (หลอดที่ 3 และ 4) ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมเจดด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่ามีแถบโปรตีนหลักซึ่งมีแถบสีเข้มและหนาที่มากกว่าโปรตีนชนิดอื่นอย่างชัดเจน โดยเมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลของแถบบ่งกล่าวเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานพบว่า เป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน แสดงว่าเป็นโปรตีนหลักที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตออกมาในน้ำเลี้ยงซึ่งก็คือ อิลิซิตินที่มีชื่อเฉพาะว่า palmivorein เหมือนกับ palmivorein ที่พบโดย Churngchow และ Rattarasarn (2000) แต่แตกต่างกันที่ palmivorein ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้เป็นเพียง palmivorein ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนเท่านั้นเพราะยังมีแถบโปรตีนอื่นปะปนอยู่ (รูปที่ 21) แต่จากการนำอิลิซิตินที่เป็น partial purified มาทดสอบกับแคลลัสพันธุ์ BPM-24 (ด้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ Scp ในพันธุ์ด้านทานได้มากกว่าในพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Churngchow และ Rattarasarn (2000) ที่พบว่าอิลิซิตินบริสุทธิ์สามารถใช้ในการบอกระดับความต้านทานได้เพราะอิลิซิตินทำให้เกิดการสร้าง Scp ในพันธุ์ BPM-24 ได้มากกว่าที่พบในพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงเลือกใช้อิลิซิตินที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนในการทดสอบกับแคลลัสหรือส่วนต่างๆ ของยางพาราเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อไป แต่การเตรียมเชื้อรา *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์และการย้ายโคโลนีของเชื้อราลงบนอาหารเหลวต้องปราศจากการปนเปื้อน

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนรวมและ % yield ในขั้นตอนต่างๆ ของการเตรียมอิลิซิทิน ให้บริสุทธิ์ขึ้นจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา Henninger และ PDB ปริมาตร 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	ปริมาณโปรตีนรวม (mg)		Yield (%)	
	Henninger	PDB	Henninger	PDB
น้ำเลี้ยงเชื้อรา	125.00±1.66	120.23±6.82*	100.00	100.00*
ตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	42.43±2.58	42.53±5.21*	34.20	35.37*
คอลัมน์ PD-10	38.19±2.35	39.15±4.34*	31.09	32.50*

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm S.D)

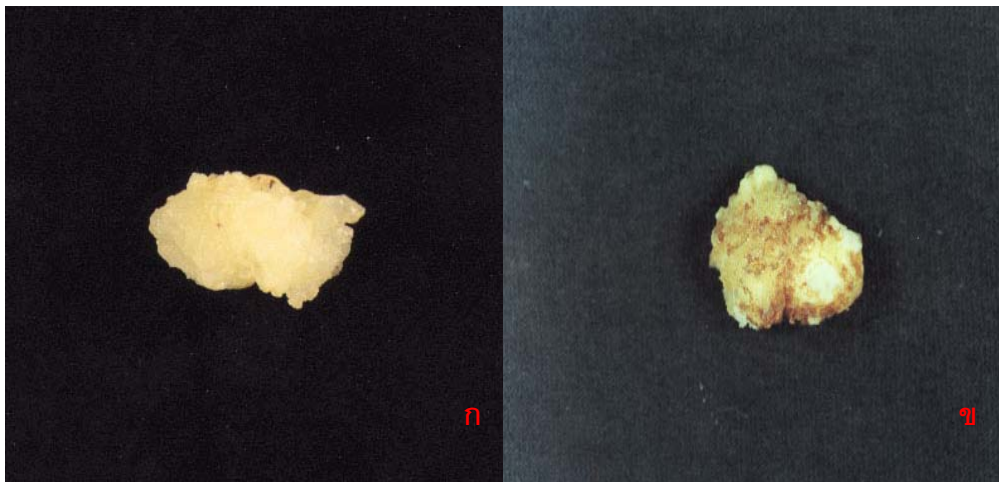
* ค่าที่ได้จากการศึกษาโดยนางสาวนารัตติดา รอดโพธิ์ทอง (2546)



- รูปที่ 21 แบบแผนของแถบโปรตีนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบเอสดีเอสของอิลิ-
ซิดินที่บริสุทธิ์ขึ้นจากการย่อยเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต
แถบที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย Triocephosphate isomerase 26.6
kDa, Myoglobin 16.9 kDa, α -lactalbumin 14.4 kDa และ Aprotinin 6.5 kDa
แถบที่ 2, 3 และ 4 แถบโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ PD-10 จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.4 ผลการศึกษาการเกิดนิโครซิส

นำแคลลัสที่บ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรหรืออิลิซิดินที่
เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์เกิดรอยไหม้สีน้ำตาล
บริเวณรอบๆ แคลลัส (รูปที่ 22) และมีรอยไหม้สีเข้มมากกว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 ลักษณะการเกิด
รอยไหม้ดังกล่าว มีลักษณะเดียวกับที่พบในแคลลัสที่ถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดิน ซึ่งสอดคล้องกับราย
งานการบ่มแคลลัสยางพาราด้วยเชื้อรา *P. palmivora* ทำให้เกิดการตายของเซลล์ โดยพบว่าแคล
ลัสพันธุ์ต้านทานมีอัตราการอยู่รอดมากกว่าแคลลัสพันธุ์อ่อนแอ (Te-chato *et al.*, 1995a) การ
ศึกษาการเกิดนิโครซิสบนใบยางเมื่อบ่มด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* พบว่า ใบยางพาราพันธุ์ต้าน
ทานมีขนาดนิโครซิสที่เกิดจากการเจาะของเชื้อราชนิดนี้ มีขนาดเล็กและมีขอบเขตชัดเจน แสดงถึง
ความสามารถในการกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ อาการดังกล่าวคือ
hypersensitive response ของใบยางพันธุ์ต้านทานนั่นเอง ส่วนนิโครซิสในพันธุ์อ่อนแอ มีขนาด
ใหญ่และแผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ แสดงถึงการเกิดโรคซึ่งปฏิกริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์อ่อน
แอคือ ปฏิกริยา compatible ส่วนปฏิกริยาระหว่างเชื้อก่อโรคกับพืชพันธุ์ต้านทานเรียกว่าปฏิกริยา
incompatible แต่ถ้าเพิ่มปริมาณของเชื้อรามากขึ้นเรื่อยๆ ปฏิกริยานี้ก็สามารถเปลี่ยนเป็น
compatible ได้เช่นกัน ดังนั้นอาการนิโครซิสที่เกิดจากการตอบสนองของใบยางพาราต่อเชื้อก่อ
โรค สามารถใช้บอกระดับความต้านทานโรคได้นั้นคือระดับความต้านทานแปรผันตรงกับขนาดนิ
โครซิส (necrotic size) (Breton *et al.*, 1997) และจากการทดลองพบว่าแคลลัสมีการตอบสนอง
ต่อเชื้อราชนิดนี้ โดยเกิดรอยไหม้เพื่อป้องกันการลุกลามจากเชื้อดังกล่าวไม่ให้แพร่กระจายไปยัง
เซลล์ข้างเคียง ดังนั้นลักษณะการเกิดรอยไหม้สามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้



รูปที่ 22 แคลลัสพันธุ์ GT1 (ก) และ RRIM600 (ข) ที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์/อิลิซิดินเกิดรอยไหม้สีน้ำตาลบริเวณรอบๆ แคลลัส

3.5 ผลการศึกษาการสังเคราะห์ Scp ที่เกิดจากการกระตุ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราซึ่งได้แก่ callus (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง), เมล็ดอ่อนและข้อปล้องด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

3.5.1 ผลการกระตุ้นและวิเคราะห์หาปริมาณ Scp ของแคลลัสเมล็ดอ่อนด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

หลังจากการบ่มแคลลัสด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* และดูดสารละลายกลับคืนที่เวลา 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Scp เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิติน (Scp) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 2.5 μM โดยเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของแคลลัสทั้งสองพันธุ์ ผลการ

วิเคราะห์พบว่า ความเข้มข้นของสปอร์ที่เหมาะสม คือ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพราะสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ Scp ซึ่งใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) (ข้อมูลที่ได้ถูกวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ดังแสดงในตารางที่ 9 และ รูปที่ 23 ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการทดสอบต่อไป จากการทดลองพบว่าแคลลัสทั้งสองพันธุ์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสปอร์ ทำให้มีการสร้าง Scp เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม โดยแคลลัสพันธุ์ GT1 มีการสร้าง Scp มากกว่าและมีอัตราเร็วในการสร้างสูงกว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 อย่างชัดเจน โดยที่แคลลัสทั้งสองพันธุ์มีการสร้าง Scp สูงสุดที่เวลาเดียวกันคือ 16 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณการสร้างจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 10 และ รูปที่ 24) โดยจุดที่มีการสร้าง Scp สูงสุดนี้ พบว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 มีปริมาณ Scp ($2.17 \pm 0.11 \mu\text{M}$) สูงกว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ($0.31 \pm 0.01 \mu\text{M}$) ถึง 7 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบในใบที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราชนิดเดียวกันนี้ พบว่าใบยางพาราพันธุ์ GT1 มีการสร้าง Scp สูงสุดอยู่ 2 จุดคือ ที่เวลา 8 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงมีปริมาณ Scp สูงกว่าจุดแรก (8 ชั่วโมง) และสูงมากกว่าใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 2-3 เท่า (นารธิตา รอดโพธิ์ทอง, 2546) เช่นเดียวกับการศึกษาใบ plane tree ที่เป็นพันธุ์ต้านทาน (*Plantanus occidentalis*) และพันธุ์อ่อนแอ (*Plantanus acerifolia*) ที่บ่มด้วยเชื้อ *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Plantain* สามารถชักนำให้เกิดนิโคตินิกและสารสะสมไฟโตเอเล็กซิน (scopoletin และ umbelliferone) ในปฏิกิริยา incompatible (ต้านทาน) มากกว่าในปฏิกิริยา compatible (อ่อนแอ) ประมาณ 30 เท่า จากการหยดบนหลังใบ และประมาณ 120 เท่าในการสะสมภายในเนื้อเยื่อของเซลล์ (Modafar, 1995) และรายงานของ Chungchow และ Rattarasam (2001) ทำการบ่มเชื้อรา *P. palmivora* โดยใช้ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 หลังการติดเชื้อพบว่าใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) สามารถสังเคราะห์ปริมาณ Scp ได้เร็วและมีปริมาณในการสังเคราะห์สูงกว่าใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) 1.8 เท่า จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ต้านทานโรคได้น้อยกว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 ดังนั้นการสังเคราะห์ Scp ในแคลลัสสามารถใช้บอกระดับความต้านทานโรคได้ โดยระดับความต้านทานแปรผันตรงกับอัตราเร็วและปริมาณการสังเคราะห์ Scp ซึ่งสอดคล้องกับปฏิกิริยาการตอบสนองของใบยางพาราแต่ละพันธุ์ที่มีต่อเชื้อ *M. ulei* และ *C. gloesporioides* สามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ โดยระดับความต้านทานโรคของยางพาราแปรผันตรงกับความเข้มข้นของ Scp ที่ผลิตขึ้นมานั้นคือ ใบ

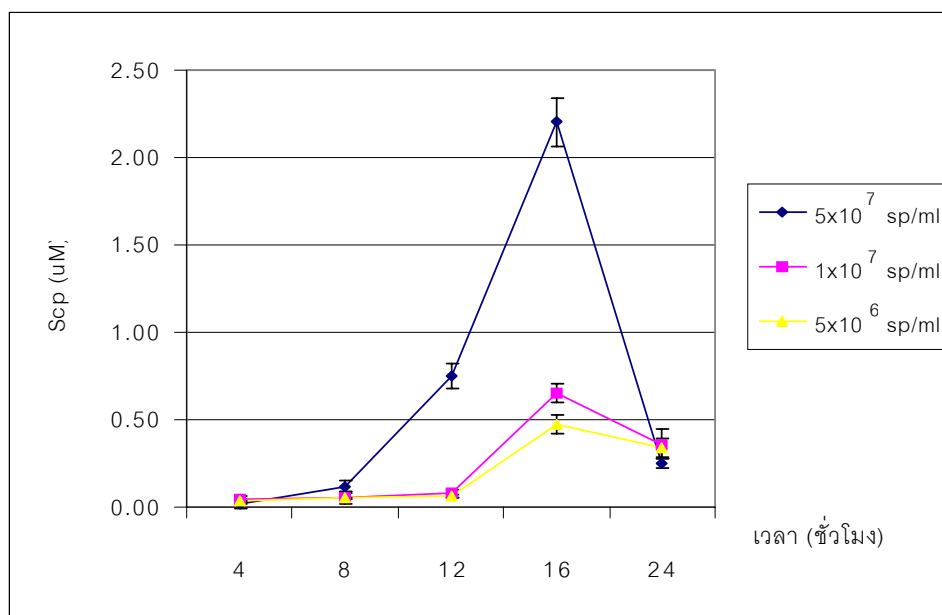
ยางพันธุ์ต้านทานจะถูกกระตุ้นให้สร้าง Scp ในปริมาณสูงกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอ (Garcia *et al.* 1995b, Breton *et al.* 1997a)

ตารางที่ 9 แสดงการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆ โดยแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ GT1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยชูโสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 5×10^6 ชูโสปอร์ต่อมิลลิเมตร, 1×10^7 ชูโสปอร์ต่อมิลลิเมตร และ 5×10^7 ชูโสปอร์ต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นโดยแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ GT1 (μM)		
	5×10^6 sp/ml	1×10^7 sp/ml	5×10^7 sp/ml
4	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02
8	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03	0.12 \pm 0.03
12	0.06 \pm 0.01 ^c	0.08 \pm 0.02 ^b	0.75 \pm 0.07 ^a
16	0.47 \pm 0.05	0.65 \pm 0.05	2.20 \pm 0.14
24	0.37 \pm 0.03	0.32 \pm 0.05	0.25 \pm 0.03

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ \pm S.D

a, b และ c = ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

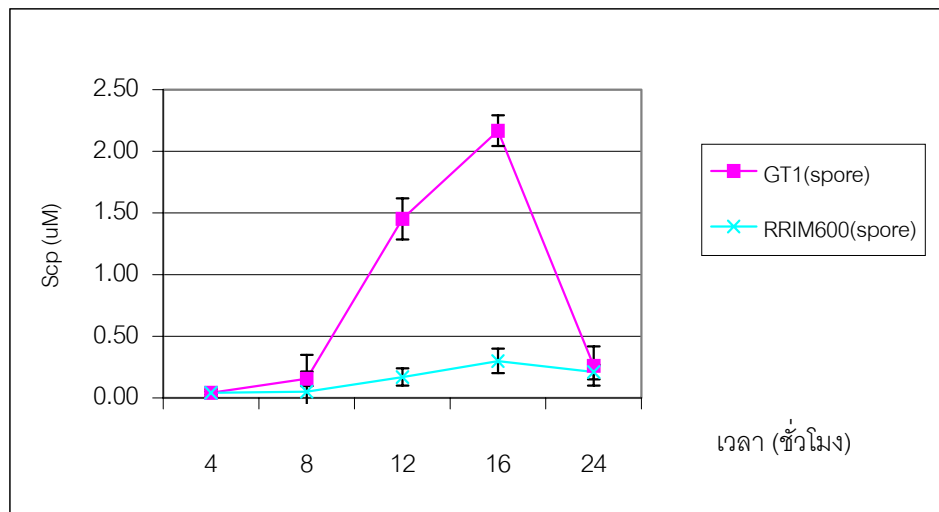


รูปที่ 23 เปรียบเทียบผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆ โดยแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพารา พันธุ์ GT1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสปอร์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร, 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์ Scp โดยแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นโดยแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 (μM)	
	GT1(spore)	RRIM600(spore)
4	0.04±0.02	0.04±0.03
8	0.16±0.02	0.05±0.03
12	1.45±0.10	0.17±0.07
16	2.17±0.11	0.31±0.01
24	0.26±0.12	0.21±0.08

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm S.D)



รูปที่ 24 เปรียบเทียบผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆ โดยแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.5.2 ผลการกระตุ้นและวิเคราะห์หาปริมาณ Scp แคลลัสข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

ที่เวลา 4 ชั่วโมง หลังกระตุ้นแคลลัสด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เริ่มมีการเรืองแสงเกิดขึ้น แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ หลังจากนั้นอีก 8 ชั่วโมง (ที่เวลา 12 ชั่วโมง) แคลลัสพันธุ์ BPM-24 มีการเรืองแสงสูงสุดซึ่งสามารถสังเกตการเรืองแสงได้ภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร รองลงมาคือ แคลลัสพันธุ์ PB235, RRIT251 และ PB255 ส่วนแคลลัสพันธุ์ RRIM600 มีการเรืองแสงน้อยสุดและเกิดการเรืองแสงช้ากว่าแคลลัสพันธุ์อื่นๆ ในชุดควบคุมไม่พบการเรืองแสง

หลังบ่มแคลลัสด้วยซูโอสปอร์และดูดสารละลายกลับคืนที่เวลา 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฟโตอเล็กซิน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิติน (Scp) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 2.5 μM โดยเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของแคลลัส ผลการวิเคราะห์พบว่า แคลลัสข้อปล้องที่นำมาทดสอบด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้แคลลัสมีการเรืองแสงรอบเนื้อเยื่อของแคลลัสที่มีการสัมผัสกับซูโอสปอร์ ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่

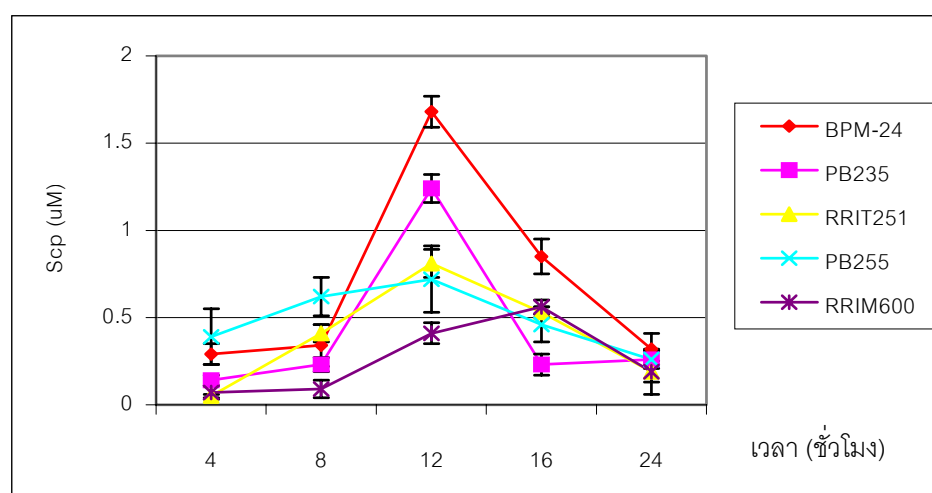
เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตได้ แม้ว่าจะใช้แคลลัสน้ำหนักเพียง 0.2 กรัม เนื่องจากแคลลัสที่ได้บางชิ้นส่วนเกิดสีน้ำตาลขึ้น และบางส่วนของเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต จึงต้องคัดเลือกเนื้อเยื่อที่มีความสมบูรณ์มาใช้ในการทดสอบ และยังพบว่าแคลลัสสามารถสังเคราะห์ Scp และมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับพันธุ์ยางที่ใช้ในการทดสอบ โดยพบว่า แคลลัสพันธุ์ BPM-24 (ซึ่งเป็นตัวแทนของยางพันธุ์ด้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora*) มีการสร้าง Scp สูงสุดถึง $1.68 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ที่เวลา 12 ชั่วโมง รองลงมาคือ แคลลัสพันธุ์ PB235 เท่ากับ $1.24 \pm 0.08 \mu\text{M}$, แคลลัสพันธุ์ RRIT251 เท่ากับ $0.81 \pm 0.28 \mu\text{M}$, แคลลัสพันธุ์ PB255 เท่ากับ $0.72 \pm 0.49 \mu\text{M}$ และแคลลัสพันธุ์ RRIM600 เท่ากับ $0.56 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ตามลำดับ โดยมีอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ยกเว้นแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ที่มีปริมาณและมีอัตราเร็วในการสร้าง Scp ต่ำและช้ากว่าแคลลัสพันธุ์อื่นๆ คือ มีปริมาณการสร้าง Scp สูงสุดที่เวลา 16 ชั่วโมง (ตารางที่ 11 รูปที่ 25) จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณ Scp ที่แคลลัสสร้างขึ้นแปรผันตรงกับระดับความต้านทานของพันธุ์ยางที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการจัดลำดับความต้านทานโดยสถาบันวิจัยยางปี 2542 ที่ทดสอบกับยางพาราทั้ง 5 พันธุ์ (ในระดับ field test) ซึ่งเป็นพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสร้าง Scp ในแคลลัสข้อปล้อง พบว่า แคลลัสพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) มีปริมาณการสร้าง Scp สูงมากกว่าแคลลัสเมล็ดอ่อน (RRIM600) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และมีอัตราเร็วในการสร้างที่เวลาเดียวกันคือ ที่เวลา 16 ชม. เป็นที่น่าสังเกตว่าเนื้อเยื่อพืชน่าจะมีตัวรับ (receptor) ที่ไวต่ออิลิซิเตอร์ที่ต่างกัน จึงทำให้เกิดการตอบสนองที่แตกต่างกันไป แม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกันก็ตาม สอดคล้องกับรายงานของ Hrazdina (2003) ที่พบว่า เนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ (ลำต้น ราก และใบ) ของแอปเปิ้ลสามารถสะสมปริมาณไฟโตลิกซิน (phloridzin และ phloretin) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดยีสต์ จากการทดลองพบ phloridzin ในลำต้นและรากเท่านั้น แต่ไม่พบในใบ และพบสารประกอบไดเบนโซฟูเรน (dibenzofuran) ในเซลล์ชั้นเพนชันของแอปเปิ้ลพันธุ์ด้านทานแต่ไม่พบในส่วนลำต้น ราก และใบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนต่างๆ ของพืชและเซลล์ชั้นเพนชันมีการตอบสนองต่ออิลิซิเตอร์ได้ต่างกัน

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์ Scp โดยแคลลัสข้อปล้องของยางพารา พันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย ซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นโดยแคลลัสข้อปล้องพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 (μM)				
	BPM-24	PB235	RRIT251	PB255	RRIM600
4	0.29 \pm 0.06	0.14 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.12 \pm 0.16	0.07 \pm 0.04
8	0.34 \pm 0.12	0.23 \pm 0.04	0.41 \pm 0.17	0.38 \pm 0.11	0.09 \pm 0.05
12	1.68 \pm 0.09 ^a	1.24 \pm 0.08 ^b	0.81 \pm 0.28 ^c	0.49 \pm 0.19 ^d	0.41 \pm 0.06 ^e
16	0.85 \pm 0.10	0.23 \pm 0.06	0.53 \pm 0.29	0.30 \pm 0.10	0.56 \pm 0.04
24	0.32 \pm 0.09	0.26 \pm 0.05	0.19 \pm 0.13	0.13 \pm 0.05	0.19 \pm 0.06

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ \pm S.D

a, b, c, d และ e = ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัย
สำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 25 แสดงปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์ Scp โดยแคลลัสข้อปล้องยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

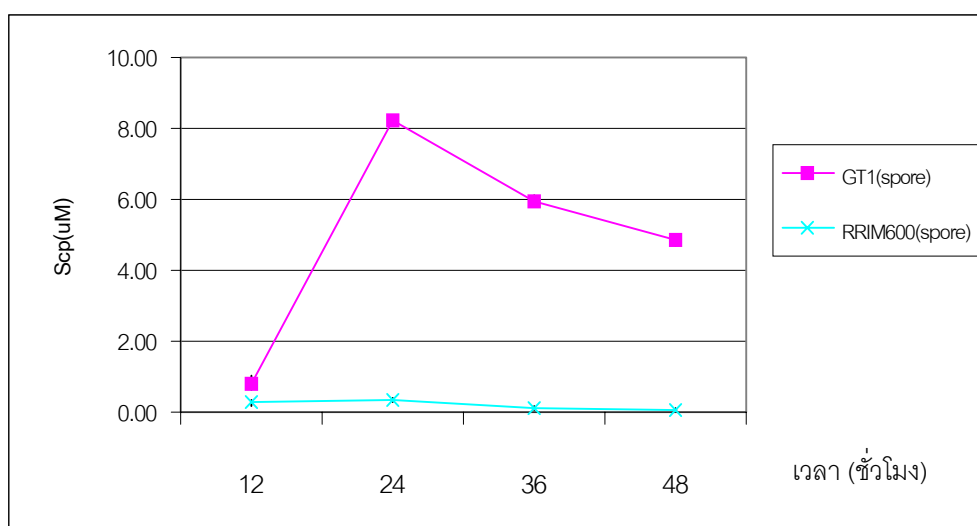
3.4.3 ผลการกระตุ้นเมล็ดอ่อนของยางพันธุ์ GT1 และเมล็ดอ่อนของยางพันธุ์ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

หลังจากบ่มเมล็ดอ่อนด้วยซูโอสปอร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถสังเกตเห็นการเรืองแสงในสารละลายตัวอย่างได้อย่างชัดเจน โดยนำไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตและสามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ ทำการเก็บผลทุก 12 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบหาปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของเมล็ดอ่อนทั้งสองพันธุ์ ผลการวิเคราะห์พบว่าเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 มีการสร้าง Scp สูงสุด ที่เวลา 24 ชั่วโมงมีปริมาณ Scp เท่ากับ $8.24 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ส่วนเมล็ดอ่อนพันธุ์ RRIM600 มีการสร้าง Scp สูงสุดที่เวลาเดียวกัน คิดเป็น Scp $0.34 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ซึ่งต่ำกว่าเมล็ดอ่อน GT1 ถึง 24 เท่า (ตารางที่ 12 รูปที่ 26) การที่เมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 มีปริมาณ Scp สูงอาจเนื่องจากเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 มีลักษณะเปลือกหุ้ม (seed coat) บางกว่าเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพันธุ์ RRIM600 จึงทำให้เชื้อสามารถบุกเจาะเข้าทำลายเมล็ดได้ง่าย โอกาสที่เซลล์พืชมีการสัมผัสต่อเชื้อโรคมสูงจึงเกิดการตอบสนองต่อการบุกรุก รวมทั้งความสามารถในการต้านทานโรคของยางพันธุ์ดังกล่าวที่มีอยู่สูงกว่าพันธุ์ RRIM600 และจากการทดลองยังพบว่าเมล็ดอ่อนบางเมล็ดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร มีการสร้าง Scp ในชุดควบคุมสูงกว่าชุดทดสอบ (ดังแสดงในรูปที่ 27) เนื่องจากเมล็ดดังกล่าวผ่านการติดเชื้อบริเวณขั้วฝักในธรรมชาติมาก่อน เพื่อให้ผลการทดลองที่มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น จึงควรคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ไม่มีรอยขีดข่วนหรือรอยบาดแผลใดมาใช้ในการทดลอง และการสร้าง Scp ในส่วนต่างๆ ของยางพาราที่ระดับแตกต่างกันนั้น ขึ้นกับโอกาสที่ส่วนต่างๆ ของพืชมีการสัมผัสกับเชื้อได้มากน้อยแตกต่างกัน และยังพบว่าใบจากแปลงปลูกมีโอกาสติดเชื้อในธรรมชาติได้มากที่สุด รองลงมาคือ ขั้วปล้องและเมล็ดอ่อนซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าความแปรปรวนในแต่ละการทดลอง

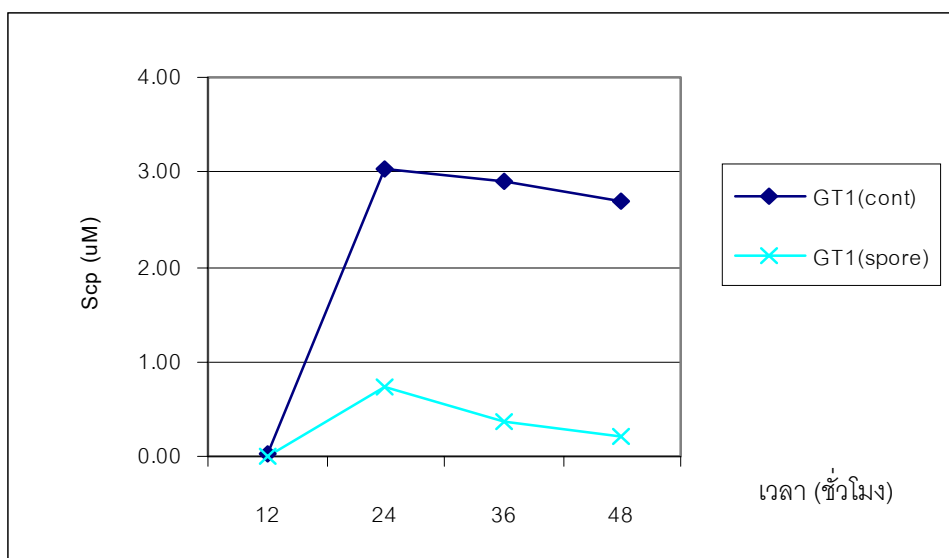
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์ Scp โดยเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และ
เมล็ดอ่อนพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอส
ปอร์ต่อมิลลิลิตร

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นโดยเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 (μM)	
	GT1(spore)	RRIM600 (spore)
12	0.82 \pm 0.20	0.27 \pm 0.07
24	8.24 \pm 0.05	0.34 \pm 0.08
36	5.97 \pm 0.12	0.12 \pm 0.03
48	4.85 \pm 0.19	0.08 \pm 0.05

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm S.D)



รูปที่ 26 เปรียบเทียบผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆ โดยเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และพันธุ์
RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 27 แสดงปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์ Scp โดยเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 ซึ่งผ่านการติดเชื้อมาแล้ว เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.4.4 ผลการศึกษาการสังเคราะห์การสร้าง Scp โดยข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

ข้อปล้องของยางพาราทั้ง 5 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 ที่ผ่านการทำความสะอาดฆ่าเชื้อ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีการสร้างและปล่อยสารเรืองแสงออกมาในน้ำ จึงทำการเก็บผลทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เก็บได้ที่เวลาต่างๆ ไปวิเคราะห์หาปริมาณไฟโตอเล็กซินเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิติน (Scp) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 2.5 μM เปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของข้อปล้องที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าเนื้อเยื่อจากข้อปล้องของยางพันธุ์ BPM-24 มีการสร้าง Scp เท่ากับ $2.17 \pm 0.21 \mu\text{M}$ รองลงมาคือ พันธุ์ PB235 เท่ากับ $1.24 \pm 0.09 \mu\text{M}$, RRIT251 เท่ากับ $1.07 \pm 0.01 \mu\text{M}$, พันธุ์ PB255 เท่ากับ $0.67 \pm 0.06 \mu\text{M}$ และพันธุ์ RRIM600 เท่ากับ $0.46 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างระหว่างพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) และพบว่าข้อปล้องของยางพาราทั้ง 5 พันธุ์มีอัตราเร็วในการสร้าง Scp สูงสุดที่เวลาเดียวกันคือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณ Scp เริ่มลดลง (ดังแสดงในตารางที่ 13 รูปที่ 28) จะเห็นได้ว่าอัตราเร็วในการสร้าง Scp ในข้อปล้องช้ากว่าแคลลัสข้อปล้องถึง 12 ชั่วโมง รวมทั้งเมล็ดอ่อนและแคลลัสเมล็ดอ่อน เนื่องจาก

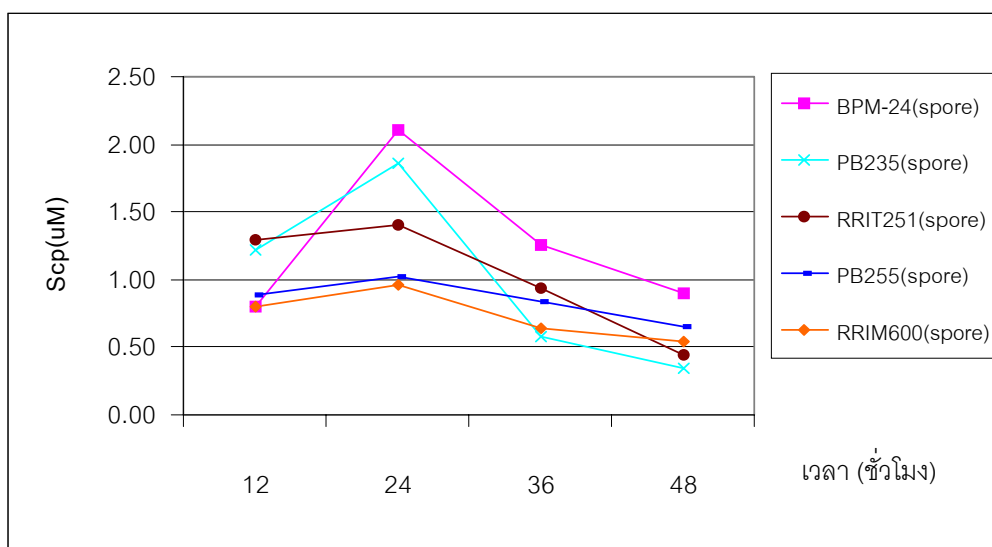
องค์ประกอบของเซลล์ที่ต่างกัน โดยข้อปด็องมีหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญของเซลล์แบบ mitosis เพื่อพัฒนาเป็นลำต้นที่สมบูรณ์ (www.jic.bbsrc.ac.uk) จึงทำให้มีองค์ประกอบของเซลล์ที่มีความซับซ้อนและการมีสิ่งกีดขวางทางกายภาพสูงมากกว่าแคลลัส (ข้อปด็องและเมล็ดอ่อน) ซึ่งมีเพียงเซลล์พาเรโนไคมาและเวคคิวโอล ทำให้ยากต่อการเจาะผ่านเข้าทำลายเซลล์พืช จึงมีการสร้าง Scp ซ้ำกว่า และพบว่า การทดสอบข้อปด็องและเมล็ดอ่อนด้วยชูโอสปอร์มีความแปรปรวนสูงกว่า การทดสอบในแคลลัส (ข้อปด็องและเมล็ดอ่อน) ตามลำดับ เนื่องจากข้อปด็องและเมล็ดอ่อนมีการติดเชื้อมาก่อน และจากการศึกษาการสร้าง Scp ในส่วนต่างๆ ของยางพาราทั้งใน whole plants และแคลลัสที่ถูกกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์จากเชื้อรา *P. palmivora* พบว่าในแต่ละส่วนของพืชมีการตอบสนองต่อการบุกรุกโดยสร้าง Scp ในปริมาณที่ต่างกัน ซึ่งขึ้นกับโอกาสในการสัมผัสเชื้อ จึงทำให้แต่ละส่วนมีการสังเคราะห์ Scp ต่างกัน และปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นแปรผันตรงกับระดับความต้านทานของยางพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ จากการทดลองให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบกับใบยางพาราจึงน่าจะนำข้อปด็องมาใช้ทดสอบแทนการทดสอบในใบยาง เนื่องจากสามารถทดสอบได้หลายพันธุ์และทำการทดลองได้ตลอดปี และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อศึกษาปฏิบัติการตอบสนองต่อเชื้อโรค และประยุกต์วิธีการทดสอบให้เหมาะกับพืชชนิดอื่นๆ ได้

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp โดยข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นในข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ต่างๆ (μM)				
	BPM-24	PB235	RRIT251	PB255	RRIM600
12	0.68±0.10	0.56±0.14	0.60±0.06	0.36±0.09	0.043±0.07
24	2.17±0.21 ^a	1.24±0.09 ^b	1.07±0.01 ^c	0.67±0.06 ^d	0.46±0.07 ^e
36	1.14±0.26	0.34±0.09	0.62±0.03	0.44±0.06	0.23±0.08
48	0.81±0.35	0.33±0.07	0.32±0.07	0.19±0.08	0.17±0.04

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ ± S.D

a, b, c, d และ e = ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 28 แสดงปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp โดยข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.6 ผลการศึกษาการสังเคราะห์ Scp ที่เกิดจากการกระตุ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราซึ่งได้แก่ แคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง), เมล็ดอ่อนและข้อปล้องด้วยอิลิซิตินของเชื้อรา *P. palmivora*

3.6.1 ผลการกระตุ้นและวิเคราะห์หาปริมาณ Scp แคลลัสเมล็ดอ่อนด้วยอิลิซิติน ปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม

เมื่อครบ 4 ชั่วโมง หลังจากกระตุ้นแคลลัสในสารละลายอิลิซิติน ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแคลลัส 1 กรัม สังเกตผลการเรืองแสงโดยนำไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม แคลลัสทั้งสองพันธุ์มีการปลดปล่อยสารเรืองแสงออกมาในน้ำ สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจน ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ไม่พบการเรืองแสงเกิดขึ้น และไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ (ตารางที่ 14) แสดงว่าปริมาณ Scp ที่แคลลัสสร้างขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของอิลิซิตินที่ใช้และเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมงการเรืองแสงลดลง ส่วนในชุดควบคุมไม่พบการเรืองแสง ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของอิลิซิตินเท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม ในการทดลองเพื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต่อไป

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์ Scp โดยแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติน 1.0 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแคลลัส 1 กรัม

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่สร้างขึ้นโดยแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ GT1 (μM)			
	GT1(control)	GT1(elicitin 0.5 μg)	GT1(control)	GT1(elicitin 1.0 μg)
4	0.01 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
8	0.01 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.08 \pm 0.04
12	0.02 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0.09 \pm 0.07	0.38 \pm 0.07
16	0.02 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
24	0.02 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm S.D.

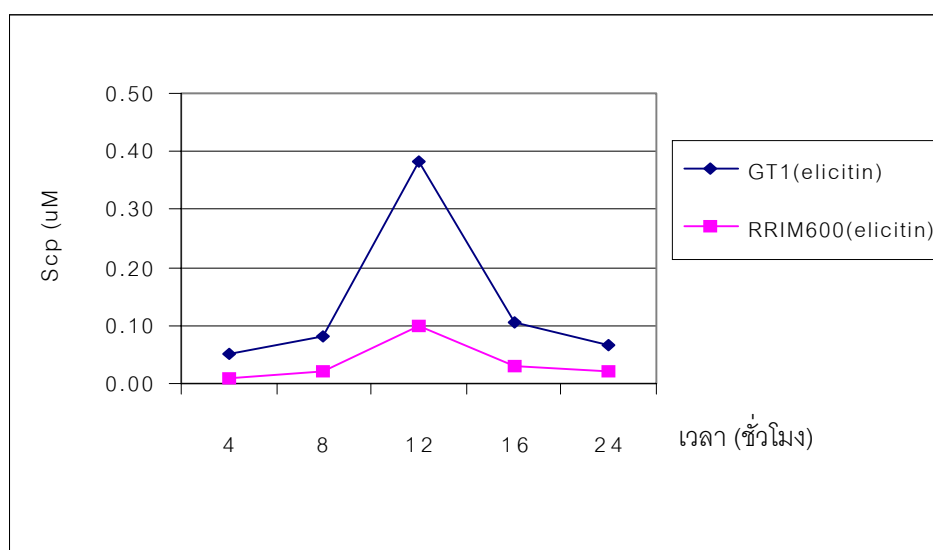
หลังจากกระตุ้นแคลลัสด้วยอิลิซิดิน แล้วดูดสารละลายตัวอย่างเก็บ 1 มิลลิลิตร กลับคืนมาที่เวลา 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ปริมาณไฟโตเอเล็กซิน เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิติน (Scp) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 2.5 μM โดยเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของแคลลัสทั้งสองพันธุ์ ผลการวิเคราะห์พบว่าอิลิซิดิน 1.0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแคลลัส 1 กรัม สามารถกระตุ้นแคลลัสทั้งสองพันธุ์ให้มีการสังเคราะห์ Scp ตั้งแต่เวลา 4 ชั่วโมง และแคลลัสทั้งสองพันธุ์มีการสังเคราะห์ Scp สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณการสร้างจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 16 และ 24 ชั่วโมง และที่จุดสูงสุดของการสร้าง Scp นี้ จะเห็นได้ว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 มีปริมาณการสังเคราะห์ Scp ($0.38 \pm 0.07 \mu\text{M}$) มากกว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ($0.10 \pm 0.03 \mu\text{M}$) ประมาณ 4 เท่า (ตารางที่ 15 และ รูปที่ 29)

และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสังเคราะห์ Scp ที่เกิดจากการกระตุ้นแคลลัส เมล็ดอ่อนด้วยชูโอสปอร์กับอิลิซิดิน พบว่าปริมาณ Scp ในแคลลัสทั้งสองพันธุ์ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์จะมีปริมาณการสังเคราะห์สูงกว่ามาก และมีระยะเวลาในการสังเคราะห์ที่ยาวนานกว่าการกระตุ้นด้วยอิลิซิดินอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากการบ่มด้วยชูโอสปอร์จะทำให้แคลลัสติดเชื้ออยู่ตลอดเวลา เพราะเมื่อชูโอสปอร์จะผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วสามารถเคลื่อนที่แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น Scp จึงถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์และสะสมอยู่บริเวณที่มีการติดเชื้อตลอดเวลาต่างกับอิลิซิดินซึ่งเป็นโปรตีนพิษที่มาจากเชื้อรา เมื่อแทรกเข้าสู่ภายในเซลล์ได้แล้วจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองโดยการสังเคราะห์ Scp จากนั้นความว่องไวทางชีวภาพ (biological activity) ของอิลิซิดินก็จะถูกกำจัดไปโดยเอนไซม์ในพืช (Kamoun *et al.*, 1993) จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังเซลล์บริเวณข้างเคียงได้ ดังนั้นปริมาณการสังเคราะห์จึงต่ำกว่าและมีระยะเวลาในการสังเคราะห์สั้นกว่าด้วย และจากการจัดอันดับโดยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ที่ทดสอบใบยางพาราพันธุ์ GT1 จากแปลงทดสอบ (field tested) ด้วยเชื้อก่อโรคในยางพาราพบว่า ยางพันธุ์ดังกล่าวจัดอยู่ในระดับความต้านทานโรคปานกลาง แต่จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 สามารถสร้าง Scp ได้และมีปริมาณมากกว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ได้แตกต่างอย่างชัดเจนมากกว่าการทดสอบใน leaf disc (นารธิตา รอดโพธิ์ทอง, 2546) แม้จะถูกจัดระดับความต้านทานให้อยู่ในกลุ่มที่มีระดับความต้านทานปานกลางก็ตาม ดังนั้นน่าจะสามารถใช้ปริมาณ Scp ที่แคลลัสสังเคราะห์ขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ระดับความต้านทานของพันธุ์ยางพาราได้อีกทางหนึ่ง

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณและอัตราเร็วของการสังเคราะห์ Scp โดยแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติน 1.0 ไมโครกรัม/1 กรัมแคลลัส

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นในแคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ GT1 และ พันธุ์ RRIM600 (μM)	
	GT1(elicitin)	RRIM600 (elicitin)
4	0.05 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
8	0.08 \pm 0.04	0.02 \pm 0.01
12	0.38 \pm 0.07	0.10 \pm 0.03
16	0.11 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02
24	0.07 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm S.D



รูปที่ 29 เปรียบเทียบผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆ โดยแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/1กรัมแคลลัส

3.6.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ Scp หลังการกระตุ้นแคลลัสข้อปล้องด้วยอิทธิพลดินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม/1 กรัมแคลลัส

หลังบ่มแคลลัสด้วยอิทธิพลดินและดูดสารละลายกลับคืนที่เวลา 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไฟโตเอเล็กซินเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิติน (Scp) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 2.5 μM โดยเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของแคลลัส ผลการวิเคราะห์พบว่าแคลลัสทั้งสองพันธุ์มีการสังเคราะห์ Scp ตั้งแต่ 4 ชั่วโมงแรก และสามารถสังเกตความแตกต่างของปริมาณ Scp ระหว่างแคลลัสทั้งสองพันธุ์ได้อย่างชัดเจน และมีปริมาณ Scp สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 16 และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแคลลัสข้อปล้องและเมล็ดอ่อนพบว่า แคลลัสข้อปล้องของยางพันธุ์ BPM-24 มีปริมาณการสร้าง Scp เท่ากับ $1.61 \pm 0.08 \mu\text{M}$ และแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ที่มีปริมาณ Scp เท่ากับ $0.44 \pm 0.04 \mu\text{M}$ โดยแคลลัสพันธุ์ BPM-24 มีปริมาณ Scp มากกว่าประมาณ 3.65 เท่า (ดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 30) ส่วนแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิทธิพลดินที่ความเข้มข้นเดียวกัน มีการสร้าง Scp เท่ากับ $0.10 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ซึ่งมีปริมาณและอัตราเร็วในการสร้าง Scp ต่ำกว่าแคลลัสข้อปล้องประมาณ 4 เท่า (ตารางที่ 17 รูปที่ 31) ซึ่งให้เห็นว่าแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากส่วนที่ต่างกันจะให้ค่าการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นได้ต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของนารธิตา รอดโพธิ์ทอง (2546) พบว่าใบยางพาราพันธุ์ต้านทาน BPM-24 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิทธิพลดินจากเชื้อรา *P. palmivora* มีตัวรับที่ทำให้ต้านทานโรค (R receptor) จำนวนมากกว่าตัวรับที่ทำให้เกิดโรค (S receptor) จึงทำให้มีความสามารถในการสร้าง Scp มากกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอ RRIM600

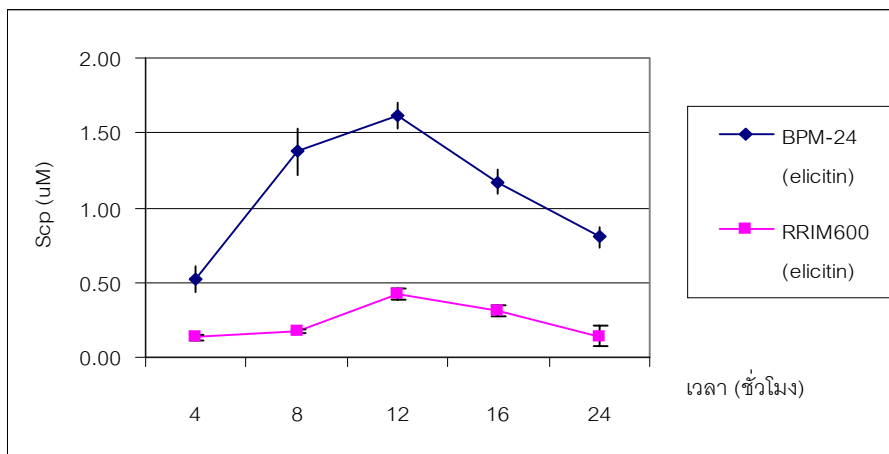
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากชิ้นส่วนพืชที่ต่างกัน เมื่อนำมาทดสอบเพื่อศึกษาปริมาณ Scp ในแคลลัส ผู้วิจัยพบว่าแคลลัสเมล็ดอ่อนมีลักษณะทางกายภาพ (physical characteristic) สมบูรณ์ และมีความสม่ำเสมอสูงกว่าแคลลัสข้อปล้องของยางพารา แต่เมื่อเปรียบเทียบแคลลัสเมล็ดอ่อนกับเมล็ดอ่อน เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ พบว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 มีการสร้าง Scp ต่ำกว่าเมล็ดอ่อนเนื่องจากแคลลัสเกิดการตายของเซลล์จำนวนมาก จึงทำให้มีการสร้าง Scp ในปริมาณต่ำ ต่างจากเมล็ดอ่อนซึ่งมีเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ทำให้เชื้อไม่สามารถเจาะทำลายเซลล์ที่อยู่ภายในได้ รวมทั้งความสามารถในการต้านทานเชื้อที่มีอยู่ก่อนแล้ว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากชิ้นส่วนพืชที่ต่างกัน มีปฏิกิริยาการตอบสนองต่อสิ่งเร้า (อิทธิพลดิน) ได้แก่ ซูโอสปอร์และอิทธิพลดินได้ต่างกัน จากการทดลองยังพบว่า แคลลัสเมล็ดอ่อนและข้อปล้องให้ค่าความแปรปรวนต่ำ แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการเตรียมวัสดุ ดิบ รวมทั้งปัญหาเกี่ยวกับเมล็ดพันธุ์ที่มีฤดูกาลออกดอกเพียงปีละครั้ง โอกาสของการติดผลของ

พันธุ์ต้านทาน BPM-24 มีอัตราต่ำมาก ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการทำงานวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ส่วนการเลือกใช้แคลลัสข้อปล้องแม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้หลายพันธุ์มากกว่าเมล็ดแต่เนื้อเยื่อที่ได้มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์เท่าที่ควร จึงจำเป็นต้องพิถีพิถันในการเตรียมและเลือกใช้แคลลัสที่จะนำมาใช้ในการทดสอบเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามแคลลัสข้อปล้องน่าจะนำมาศึกษาแทนการการศึกษานโยบายพารา ที่มีการปนเปื้อนในธรรมชาติค่อนข้างสูงได้

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณ Scp ที่สร้างขึ้นโดยแคลลัสข้อปล้องพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติน 1.0 ไมโครกรัม/1กรัมแคลลัส

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นโดยแคลลัสข้อปล้องพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 ที่ถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติน 1.0 ไมโครกรัม /1กรัมแคลลัส	
	BPM-24 (elicitin)	RRIM600 (elicitin)
4	0.55±0.09	0.17±0.01
8	1.40±0.15	0.20±0.01
12	1.61±0.08	0.44±0.04
16	1.19±0.08	0.35±0.04
24	0.83±0.07	0.18±0.07

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± S.D)



รูปที่ 30 ปริมาณ Scp ที่สร้างขึ้นโดยแคลลัสข้อปล้องยางพาราพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม/1กรัมแคลลัส

3.6.3 ผลการศึกษาการสังเคราะห์การสร้าง Scp โดยเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ GT1 และ RRIM600 ด้วยอิลิซิตินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม

ไม่ได้นำมาทดสอบด้วยอิลิซิติน เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยข้อปล้อง เนื่องจากในช่วงที่ทำการวิจัยเมล็ดอ่อนเริ่มมีเปลือกแข็งและก่อนหน้านี้มีฝนตกชุกจึงมีการติดเชื้อ ดังนั้นในการทดลองชุดเดียวกันควรเลือกใช้เมล็ดอย่างพิถีพิถัน เพื่อลดความแปรปรวนของผลการทดลอง เช่น เลือกใช้เมล็ดชุดควบคุมและชุดทดลองจากผลเดียวกัน ไม่ใช้เมล็ดที่มีรอยแผลซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อในช่วงติดดอก

3.6.4 ผลการศึกษาการสังเคราะห์การสร้าง Scp โดยข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 ด้วยอิลิซิดินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม ข้อปล้องของยางพันธุ์ BPM-24 ที่ปลอดเชื้อเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าข้อปล้องมีการสร้างและปล่อยสารเรืองแสงออกมาในน้ำ จึงทำการเก็บผลทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เก็บได้ที่เวลาต่างๆ ไปวิเคราะห์หาปริมาณ Scp เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Scp ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 2.5 μM เปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของข้อปล้องที่ถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม ผลการวิเคราะห์พบว่า ข้อปล้องของยางพันธุ์ BPM-24 มีการสร้าง Scp ได้และมีปริมาณ Scp เท่ากับ $1.76 \pm 0.05 \mu\text{M}$ รองลงมาคือ พันธุ์ PB235 มีปริมาณ Scp เท่ากับ $1.38 \pm 0.06 \mu\text{M}$, พันธุ์ RRIT251 มีปริมาณ Scp เท่ากับ $0.66 \pm 0.01 \mu\text{M}$, พันธุ์ PB255 มีปริมาณ Scp เท่ากับ $0.33 \pm 0.01 \mu\text{M}$ และพันธุ์ RRIM600 มีปริมาณ Scp เท่ากับ $0.25 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ตามลำดับ และพบว่าข้อปล้องและแคลลัสข้อปล้องของยางพาราทุกพันธุ์มีอัตราเร็วในการสร้าง Scp สูงสุดที่เวลาเดียวกันคือ ที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณ Scp เริ่มลดลง (ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 31) ไม่เหมือนกับการทดสอบด้วยซูโอสปอร์ซึ่งขึ้นกับสิ่งกีดขวางทางกายภาพภายในข้อปล้อง (physical barrier) จึงใช้เวลานานกว่าอิลิซิดิน เนื่องจากในธรรมชาติซูโอสปอร์จะเจาะเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เป็นอันดับแรก หลังจากนั้นเชื้อราจึงจะสร้างอิลิซิดินออกมา และอิลิซิดินที่ถูกสร้างมีหน้าที่ในการนำเอาสเตรอลออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของเซลล์เจ้าบ้านมาใช้ในการสร้างสปอร์แรงเฉื่อยเพื่อขยายพันธุ์ (Blein *et al.*, 2002) และจากการที่อิลิซิดินสามารถกระตุ้นให้ข้อปล้องและแคลลัสข้อปล้องของยางพาราให้มีการตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งสามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ จึงน่าจะนำอิลิซิดินมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการจัดระดับความต้านทานโรคในยางพาราโดยการทดสอบในส่วนอื่นๆ แทนการศึกษาในใบยางที่มีการปนเปื้อนในธรรมชาติสูง

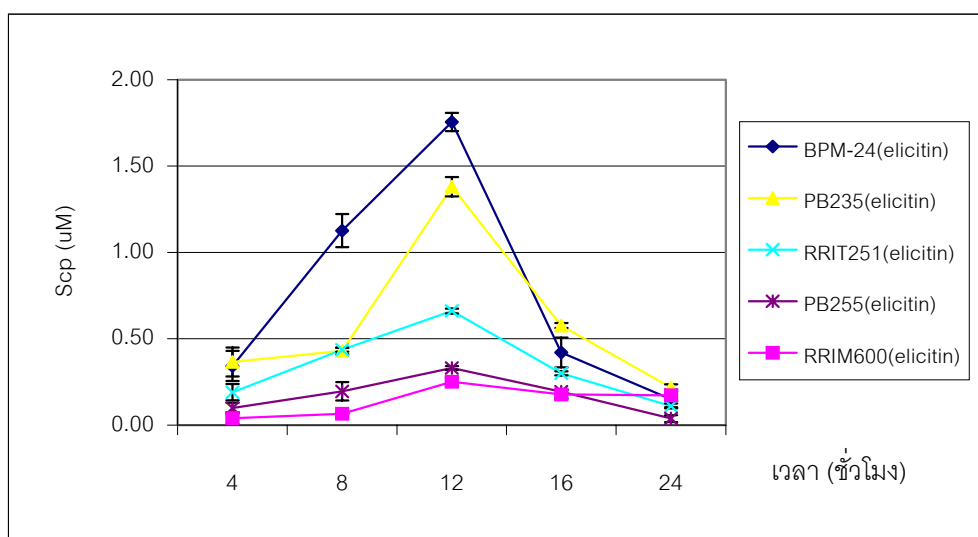
ตารางที่ 17 แสดงปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp โดยข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติน 1.0 ไมโครกรัม

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นในข้อปล้องยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 (μM)				
	BPM-24	PB235	RRIT251	PB255	RRIM600
4	0.34±0.09	0.37±0.08	0.19±0.05	0.10±0.03	0.04±0.04
8	1.13±0.25	0.43±0.02	0.44±0.01	0.20±0.05	0.07±0.00
12	1.76±0.05 ^a	1.38±0.06 ^b	0.66±0.01 ^c	0.33±0.01 ^d	0.25±0.02 ^e
16	0.42±0.09	0.58±0.01	0.30±0.01	0.19±0.01	0.18±0.02
24	0.15±0.05	0.22±0.02	0.11±0.01	0.04±0.02	0.17±0.03

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ \pm S.D

a, b, c, d และ e = ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



รูปที่ 31 ปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ในข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติน 1.0 ไมโครกรัม

3.7 ผลศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เบต้า-1, 3-กลูคาเนส) ที่เกิดจากการกระตุ้นแคลลัสด้วยชูโสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. palmivora*

นำแคลลัสเมล็ดอ่อนที่ป่มด้วยชูโสปอร์และอิลิซิตินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เบต้า-1, 3-กลูคาเนส) เท่านั้น เนื่องจากมีแคลลัสปริมาณจำกัด โดยนำแคลลัสชุดทดสอบและชุดควบคุมไปกำจัดน้ำตาล (internal sugar) ออกไปก่อน มาตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 90% จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA และกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

จากการวัดปริมาณโปรตีนจากสารสกัดจากแคลลัสทั้งสองพันธุ์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยชูโสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ชูโสปอร์ต่อมิลลิเมตรและอิลิซิตินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA พบว่าสารสกัดจากแคลลัสพันธุ์ GT1 มีปริมาณโปรตีนมากกว่าสารสกัดของแคลลัสพันธุ์ RRIM600 (ดังแสดงในตารางที่ 18 และ 19) จากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน ให้ผลสอดคล้องกับค่าความว่องไวของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น และพบว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยชูโสปอร์และอิลิซิตินมีค่าความว่องไวของเอนไซม์สูงกว่าความว่องไวของเอนไซม์ในแคลลัสพันธุ์ RRIM600 (ตารางที่ 20 และ 21) แต่มีปริมาณเอนไซม์ต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยอิลิซิติน เนื่องจากอิลิซิตินมีการส่งสัญญาณโดยจับกับตัวรับ (receptor) ที่ plasma membrane ของเซลล์ (Blein *et al.*, 2002) ทำให้เซลล์แคลลัสมีการตอบสนองโดยสร้างเอนไซม์ในปริมาณมากและรวดเร็วกว่าการกระตุ้นด้วยชูโสปอร์ ที่จะต้องเจาะเข้าไปในเซลล์แล้วจึงจะสร้างอิลิซิตินออกมาซึ่งใช้ระยะเวลาเวลานานมากกว่า แต่จากการทดลองไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจนมากนัก อาจเนื่องมาจากยังไม่ถึงจุดที่แคลลัสสามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด โดยในการศึกษาครั้งนี้เป็นการตอบสนองที่เกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อจึงต้องใช้เวลาในการศึกษา ซึ่งต่างจากการศึกษาการสังเคราะห์ Scp ที่เซลล์พืชมีการตอบสนองทันทีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติเตอร์ (ชูโสปอร์และอิลิซิติน) จึงสามารถใช้ค่า Scp บอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ และจากการทดลองให้ผลสอดคล้องกับการทดลองด้วยเชื้อรา *C. cassicola* ที่พบว่าเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสและไคติเนส ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ แต่ปริมาณการสังเคราะห์ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ Scp เนื่องจากไบบางพาราทั้งพันธุ์ด้านทานและพันธุ์อ่อนแอถูกชักนำให้สร้างเอนไซม์ในปริมาณใกล้เคียงกัน (Breton *et al.*, 1997b)

ตารางที่ 18 ปริมาณโปรตีนของแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และ RRIM600 (ไมโครกรัม/กรัม แคลลัส) หลังถูกกระตุ้นด้วยซุโสปอร์ที่ความเข้มข้น 5×10^7 ซุโสปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง

พันธุ์ยาง	ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากแคลลัส ($\mu\text{g/g}$) หลังถูกกระตุ้นด้วยซุโสปอร์	
	control	zoospore
GT1	15.00 \pm 0.00	35.00 \pm 0.00
RRIM600	10.00 \pm 0.00	20.00 \pm 0.01

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.D)

ตารางที่ 19 ปริมาณโปรตีนของแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 และ RRIM600 (ไมโครกรัม/กรัม แคลลัส) หลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมแคลลัส ที่เวลา 24 ชั่วโมง

พันธุ์ยาง	ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากแคลลัส ($\mu\text{g/g}$) หลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิติน	
	control	elicitin
GT1	15.00 \pm 0.00	55.00 \pm 0.00
RRIM600	15.00 \pm 0.00	40.00 \pm 0.01

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.D)

ตารางที่ 20 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (ไมโครโมล/นาที/กรัมแคลลัส) หลังบ่มแคลลัสเมล็ดก่อนด้วยซุโอสปอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600

พันธุ์ยาง	ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (ไมโครโมล/นาที/กรัมแคลลัส)	
	control	zoospore
GT1	0.07±0.01	0.32±0.02
RRIM600	0.01±0.00	0.22±0.01

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± S.D)

ตารางที่ 21 แสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (ไมโครโมล/นาที/กรัมแคลลัส) หลังจากบ่มแคลลัสเมล็ดก่อนด้วยอิลิซิตินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมแคลลัสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ GT1 และพันธุ์ RRIM600

พันธุ์ยาง	ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (ไมโครโมล/นาที/กรัมแคลลัส)	
	control	elicitin
GT1	0.05±0.00	0.38±0.02
RRIM600	0.05±0.01	0.19±0.01

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± S.D.)

3.8 ผลการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วย ซุโอสปอร์และอิลิซิดินจากเชื้อรา *P. palmivora*

3.8.1 ผลการสังเคราะห์เอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซุโอ สปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร

นำสารสกัดจากแคลลัสที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 90% มา
วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส ที่ความยาวคลื่น 460
นาโนเมตร จากการทดลองพบว่าแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์ GT1 เมื่อบ่มด้วยซุโอสปอร์ เป็นเวลา 24
ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 102.99 ± 28.00 ไมโครกรัมต่อกรัม และแคลลัสพันธุ์ RRIM600
เพิ่มขึ้นเป็น 92.45 ± 11.74 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยการทดลองชุดควบคุมในแคลลัสพันธุ์ GT1 และ
พันธุ์ RRIM600 มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 11.25 ± 0.25 และเท่ากับ 13.67 ± 0.29 ไมโครกรัมต่อกรัม
ตามลำดับ สำหรับค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแคลลัสพันธุ์ GT1 เท่ากับ
 642.67 ± 141.42 ยูนิต และ RRIM600 มีความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสเท่ากับ
 69.67 ± 11.79 ยูนิต แต่ไม่พบความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในชุดควบคุม ดังแสดงในตา
รางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงปริมาณและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแคลลัสเมล็ดอ่อนพันธุ์
GT1 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซุโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซุโอสปอร์ต่อ
มิลลิลิตร

พันธุ์ยาง	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g/g}$)		ค่าความว่องไวของเอนไซม์ของ เอนไซม์เปอร็อกซิเดส (unit/ml)	
	control	zoospore	control	spore
GT1	11.25 ± 0.25	102.99 ± 28.00	-	642.67 ± 141.42
RRIM600	13.67 ± 0.29	92.45 ± 11.74	-	69.67 ± 11.79

3.8.2 ผลการศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดิน

นำสารสกัดของแคลลัสเมล็ดอ่อนทั้งสองพันธุ์ มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าแคลลัสพันธุ์ GT1 มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 117.38 ± 6.63 ไมโครกรัมต่อกรัมแคลลัส และ RRIM600 เท่ากับ 113.04 ± 4.54 ไมโครกรัมต่อกรัมแคลลัส ส่วนการทดลองในชุดควบคุมของแคลลัสพันธุ์ GT1 มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 14.50 ± 1.00 และ RRIM600 เท่ากับ 16.67 ± 0.77 ไมโครกรัมต่อกรัมแคลลัส ตามลำดับ ส่วนค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสพันธุ์ GT1 เท่ากับ 2026.50 ± 754.48 ยูนิต และ RRIM600 เท่ากับ 326.94 ± 213.45 ยูนิต แต่ไม่พบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 23

เมื่อเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดินและซูโอสปอร์ พบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดินมีค่าความว่องไวของเอนไซม์มากกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ เนื่องจากอิลิซิดินเป็นสารที่มาจากเชื้อรา โมเลกุลมีขนาดเล็กจึงแทรกเข้าสู่ภายในเซลล์แคลลัสได้ง่ายกว่าการเจาะของซูโอสปอร์ (Kamoun *et al.*, 1993) รวมทั้งอิลิซิดินยังมีการส่งสัญญาณให้เซลล์แคลลัสมีการสร้างเอนไซม์ได้อีกทางด้วย และเมื่อพิจารณาการสังเคราะห์การสร้าง Scp ในแคลลัสหลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดิน พบว่ามีปริมาณ Scp ต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ เนื่องจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เพิ่มขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดิน จะไปสลาย Scp โดยเอนไซม์ Scp peroxidase (Breton *et al.*, 1997b) ทำให้ Scp มีปริมาณต่ำ การสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพื่อต้านการบุกรุกจากเชื้อโรค เป็นกลไกการป้องกันโรคของพืชอย่างหนึ่ง (Shivakumar *et al.*, 2003) และจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสพันธุ์ GT1 มีปริมาณมากกว่าแคลลัสพันธุ์ RRIM600 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Breton และคณะ (1997a) ที่พบว่าใบยางพาราเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *C. cassiicola* มีปริมาณอะซิดิกและเบสิกเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น โดยที่เปอร์ออกซิเดสในใบยางพันธุ์ด้านทานมีปริมาณมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ รวมทั้งการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเมล็ดข้าวสาลี เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Fusarium graminearum* พบว่า เมล็ดข้าวสาลีพันธุ์ด้านทาน (Sumai #3 และ Wang shui-bai) มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (guaiacol-peroxidase, POX) เพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงสร้างน้ำนม (milk stage) มากกว่าช่วงออกทรง (flowering) และสร้างแป้ง (dough) และพบว่ามีค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (Mohammadi and Kazemi, 2002)

ตารางที่ 23 แสดงปริมาณและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแคลลัสพันธุ์ GT1 และ RRIM600 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัม แคลลัส

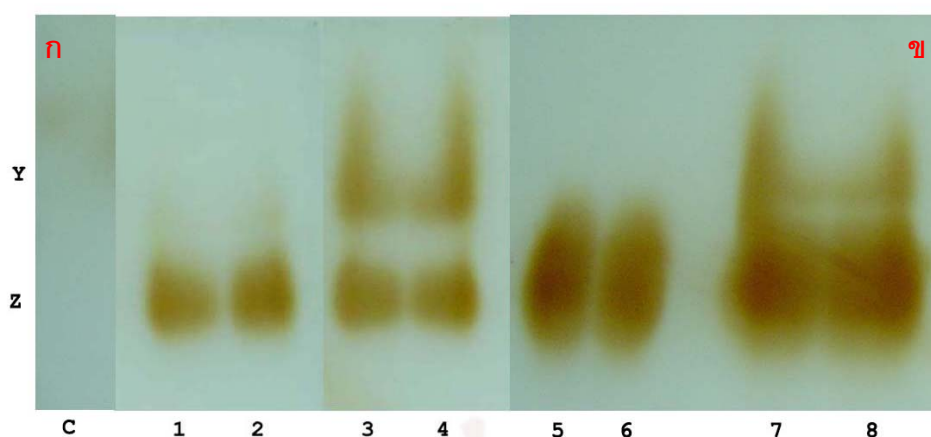
พันธุ์ยาง	ปริมาณโปรตีน (mg)		ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดส (unit/ml)	
	control	elicitin	control	elicitin
GT1	14.50±1.00	117.38±6.63	-	2026.50±754.48
RRIM600	16.67±0.77	113.04±4.54	-	326.94±213.45

3.8.2 ผลการตรวจหาความว่องไวของปริมาณเปอร็อกซิเดสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

จากผลการศึกษาพบว่าแคลลัสเมล็ดอ่อนทั้งสองพันธุ์มีจำนวนไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสแตกต่างกัน โดยแคลลัสพันธุ์ GT1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์มีจำนวนไอโซไซม์ 1 ไอโซไซม์ (z) ส่วนแคลลัสพันธุ์ RRIM600 มีไอโซไซม์ 2 ไอโซไซม์ (y และ z) (รูปที่ 32 ก) สอดคล้องกับรายงานของพัชรากร รัตนภูมิ (2543) ที่พบว่าเอนไซม์เปอร็อกซิเดสของสารสกัดใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม มีแถบเปอร็อกซิเดส 2 แถบ และจากการศึกษาของ Te-chato และคณะ (1995) พบว่า เมื่อเลี้ยงแคลลัสร่วมกับสารจาก culture filtrate ของเชื้อรา *P. palmivora* เข้มข้น 50% ไปเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณและเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจสอบความว่องไวของเอนไซม์พบว่ามีความว่องไวของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสในแคลลัสต้านทาน 4-6 แถบ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองต่างกัน เนื่องจากมีวิธีการสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายต่างกัน รวมทั้งการเลือกใช้พันธุ์ในการเตรียมแคลลัสที่ต่างพันธุ์กัน แต่มีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์ที่มีความคล้ายคลึงกัน คือมีการสร้างเอนไซม์เปอร็อกซิเดสที่เวลา 48 ชั่วโมง

ส่วนการทดสอบด้วยอิลิซิตินพบว่า แคลลัสทั้งสองพันธุ์มีค่าความว่องไวมากกว่าการกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 32ข และมีแบบแผนของเอนไซม์ลักษณะเดียวกับการกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์ เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์ เพราะเมื่อชูโอสปอร์เจาะผ่านเข้าไปยังภายในเซลล์ได้ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (cell death) ขึ้น จึงทำให้เซลล์สร้างเอนไซม์เปอร็อกซิเดสได้น้อยกว่า และไม่พบแถบโปรตีนของ

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดควบคุม เนื่องจากผู้วิจัยเก็บสารตัวอย่างไว้นานจึงทำให้สูญเสีย แอคติวิตี จากการทดลองให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Shivakumar และคณะ (2003) รายงานว่า เมล็ดข้าวฟ่างพันธุ์ต้านทานเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสปอร์ของเชื้อรา *Sclerospora graminicola* (เชื้อก่อโรคราแป้ง, downy mildew) ความเข้มข้น 4×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงสุดมากกว่าเมล็ดข้าวฟ่างพันธุ์อ่อนแอ การพบไอโซไซม์ในแคลลัส ทั้งสองพันธุ์ (GT1 และ RRIM600) แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในชุดควบคุม ก็แสดงให้เห็นว่าไอโซไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค ดังนั้นน่าจะใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเครื่องบ่งชี้ในการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในพืชชนิดอื่น เพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อโรคมายิ่งขึ้น



รูปที่ 32 ผลการตรวจสอบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสแบบแปลงสภาพ SDS-PAGE จากสารสกัดของแคลลัสเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ก) และอิลิซิดินปริมาณ 1.0 ไมโครกรัมต่อ 1 กรัมแคลลัส (ข) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

c = control (ชุดควบคุม)

ช่องที่ 1, 2, 5 และ 6 = สารสกัดของแคลลัสพันธุ์ GT1

ช่องที่ 3, 4, 7 และ 8 = สารสกัดของแคลลัสพันธุ์ RRIM600