

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

ตารางที่ 1 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิต

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.05	Merck
Acetic anhydride	102.09	Merck
Acrylamide	71.1	Merck
Agar	-	วิทยาศาสตร์
Ammonium sulfate	132.14	Merck
Ammonium persulfate	228.7	Merck
Bovine serum albumin	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Coomassie brilliant blue G250	854.0	Sigma
Cupric sulfate	249.68	Sigma
Ethanol	46.07	Merck
Glycine	960.9	Sigma
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	34.02	Sigma
2-mercaptoethanol	78.13	Merck
Mercuric chloride	271.50	Sigma
Methanol	32.04	Carlo Erba
N,N-methylene bisacrylamide	154.2	Merck
N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED)	116.2	Merck
o- dianisidine (3, 3'- dimethoxybenzidine)	317.2	Sigma
Phosphoric acid	98.0	Baker Analyzed

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Potassium sodium tartrate	282.2	Sigma
Potato dextrose agar	-	Difco
Phytigel	-	Sigma
Sephadex G-50	-	Sigma
Silver stain kit	-	Biorad
Sodium acetate anhydrous	82.03	Sigma
Sodium azide (NaN ₃)	65.01	Merck
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	84.01	Merck
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	105.99	Merck
Sodium chloride (NaCl)	105.99	BDH
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	288.4	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40	Merck
Sodium hypochlorite (NaOCl)	-	Cao Industrial
Tricine	179.18	Fluka
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121.1	Merck
Tween-20	-	Fluka Chemika
V ₈	-	Campbell Soup

อุปกรณ์

1. ขวด Duran ขนาด 0.1, 0.25, 0.5, และ 1 ลิตร
2. ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 6 ออนซ์
3. ปากคิปปลายแหลมความยาว 120 -150 มิลลิเมตร
4. ด้ามมีดผ่าตัด
5. ใบมีดผ่าตัด
6. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 และ 11 เซนติเมตร
7. กล้องถ่ายรูป Nikon (Japan) และ Olympus SC 35 (Japan)
8. ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave SS-320 Tomy Japan)
10. คอลัมน์ PD-10 (Pharmacia)
11. เครื่องชั่งสองตำแหน่ง Diethelm model 12909657 (Japan)
12. Orbital shaker incubator, Paton scientific model 013422 (South Australia)
13. Centrifuge J2-21 operation, Beckamn (USA)
14. Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
15. pH meter Cyberscan 1000 (Singapore)
16. Power supply model 1000/500, Biorad (USA)
17. Electrophoresis appartatus, ATTA Cooperation (Japan)
18. Shimadzu UV-Vis recording spectrophotometer model UV160A (Japan)
19. Spectroofluorophotometer RF-1501 Shimadzu (Japan)
20. Freeze dryer และ Deep-freeze refrigerator, Sanyo (Japan)
21. UV box, Vilber Lourmat (France)

วิธีการทดลอง

2.1 การชักนำส่วนต่างๆ ของยางพาราซึ่งได้แก่ อับละอองเกสร (anther) เมล็ดอ่อน (immature seed) และข้อปล้อง (internodal stem) ให้เกิดแคลลัส

2.1.1 แคลลัสอับละอองเกสรยางพารา (anther callus)

2.1.1.1 การเลือกใช้พันธุ์ของอับละอองเกสรมาชักนำให้เกิดแคลลัส

จากที่ได้เสนอในโครงร่างวิทยานิพนธ์ (บว.3) เลือกใช้ดอกยางพารา 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ BPM-24 และพันธุ์ RRIM600 มาชักนำให้เกิดแคลลัส ปรากฏว่ามีปัญหาเกี่ยวกับต้นพันธุ์ที่มีการติดผลน้อยคือเกือบจะไม่มีผลติดของยางพาราพันธุ์ BPM-24 ในช่วงปี 2545-2546 ซึ่งเป็นช่วงที่ผู้วิจัยอยู่ในระหว่างการทำงานวิจัย มีเพียงยางพาราพันธุ์ GT1 ที่มีการติดดอกทั้งๆ ที่พันธุ์นี้มีความต้านทานระดับปานกลาง ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องใช้ดอกยางพันธุ์ GT1 แทน พันธุ์ BPM-24 นอกจากนี้การติดดอกเพียงปีละครั้ง จึงทำให้การทำงานวิจัยมีข้อจำกัด ส่วนดอกยางพาราพันธุ์ RRIM600 มีการติดดอกจึงไม่มีปัญหาทางด้านวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการทดลอง รวมทั้งยังเป็นพันธุ์ที่หาง่าย เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรทางภาคใต้นิยมปลูก โดยใช้อับละอองเกสรยางพาราเพศผู้ (ที่มีไมโครสปอรัสระยะนิวเคลียสเดี่ยวตอนปลายที่มีสีเขียวอมเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 10)



รูปที่ 10 ลักษณะช่อดอกอ่อนของยางพารา

(ก), (ข) อับละอองเกสรยางพาราอายุประมาณ 4 สัปดาห์

(ค) อับละอองเกสรเพศผู้ (bar = 1.0 ซม.)

(ที่มา (ก) : www.pharmazie.uni-greifswald.de/gallery/yamasaki.htm)

2.1.1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสของเกสรยางพารา

นำอับละของเกสรยางพาราเพศผู้ (สีเขียวอมเหลืองอ่อน รูปที่ 11) มาชักนำให้เกิดแคลลัสโดยเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS medium (สมปอง เตชะโต, 2531) ร่วมกับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคเนติน (kinetin) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร pH 5.8 (ตารางที่ 2) ก่อนการเพาะเลี้ยงเก็บดอกยางพาราไว้ที่อุณหภูมิ $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยรวบรวมดอกดังกล่าวประมาณ 100–200 ดอกใส่ในผ้าก๊อซ ผูกด้วยด้ายเย็บผ้าแล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที และฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 20% และทวิน (Tween20) 0.05% เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวทำในตู้ย่ำเลี้ยง คีบถุงผ้าก๊อซไปวางในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. แกะด้ายที่ผูกออก ใช้ปากคีบปลายแหลมคีบดอกมาวางในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้มีดผ่าตัดกรีดกลีบดอกเบา ๆ 2 รอยตรงกันข้ามเพื่อเปิดดอกออก แล้วใช้ใบมีดตัดฐานอับละของเกสรออก ก็จะได้กลุ่มอับละของเกสรซึ่งมี corolla tube และอับละของเกสร 10 – 12 อัน หลังจากนั้นนำกลุ่มอับละของเกสรไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำแคลลัส เมื่อได้แคลลัสจึงทำการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS-2 (สมปอง เตชะโต, 2531) เพื่อเพิ่มขนาดแคลลัสต่อไป แต่เนื่องจากได้แคลลัสขนาดเล็กและมีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการทดลอง จึงไม่สามารถนำแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของดอกยางพาราดังกล่าวมาทำการทดลองได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงพยายามหาชิ้นส่วนอื่นของยางพารามาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแทน เช่น ช่อบัลดอง และเมล็ดอ่อน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสที่จะใช้ในการทดสอบต่อไปได้

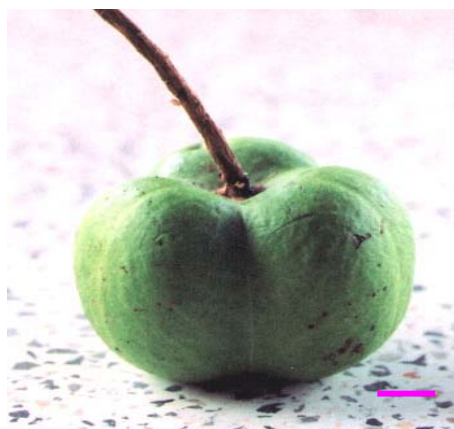
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับละของเกสรยางพารา (สมปอง เตชะโต, 2531)

องค์ประกอบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชักนำแคลลัส	เพิ่มปริมาณ
KNO ₃	950	950
NH ₄ NO ₃	1648	1648
MgSO ₄ ·7H ₂ O	368	368
KH ₂ PO ₄	338	338
Na ₂ EDTA	503	503
FeSO ₄ ·7H ₂ O	40.94	40.94
MnSO ₄ ·4H ₂ O	30.58	30.58
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.30	8.30
H ₃ BO ₃	11.17	11.17
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.024	0.024
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.24	0.24
KI	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	-
Thiamine.HCl	0.5	0.5
Pyridoxine.HCl	0.49	0.49
Nicotinic acid	0.49	0.49
Glycine	2.25	2.25
Folic acid	0.48	0.48
Biotin	48.8	48.8
KN	1.0	1.0
2,4-D	1.0	-
NAA	1.0	0.3
GA ₃	-	0.5
Myo-inositol	100	100
Coconut water (%)	5	-
Sucrose (%)	7	7
pH	5.8	5.8

2.1.2 แคลลัสเมลิค่อน (integument-derived callus)

2.1.2.1 การคัดเลือกใช้พันธุ์ของเมลิค่อน

ใช้เมลิค่อนของยางพารา 2 พันธุ์ 1) พันธุ์ GT1 (ต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora* ปานกลาง) แทนเมลิค่อนของยางพาราพันธุ์ BPM-24 เนื่องจากยางพาราพันธุ์ดังกล่าวไม่มีการติดดอก (ข้อ 2.1.1) และ 2) พันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอต่อเชื้อ *P. palmivora*) อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ หลังจากผสมเกสร (ดังแสดงในรูปที่ 11) นำมาล้างทำความสะอาดส่วนผลด้วยน้ำประปาและนำเข้าสู่ปลอดเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วลนไฟ ทำเช่นนี้ 1-2 ครั้งจนแน่ใจว่าผิวภายนอกสะอาดปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดกรีดรอบผล และผ่าผลเพื่อเอาเมลิค่อนออกเป็นส่วนๆ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

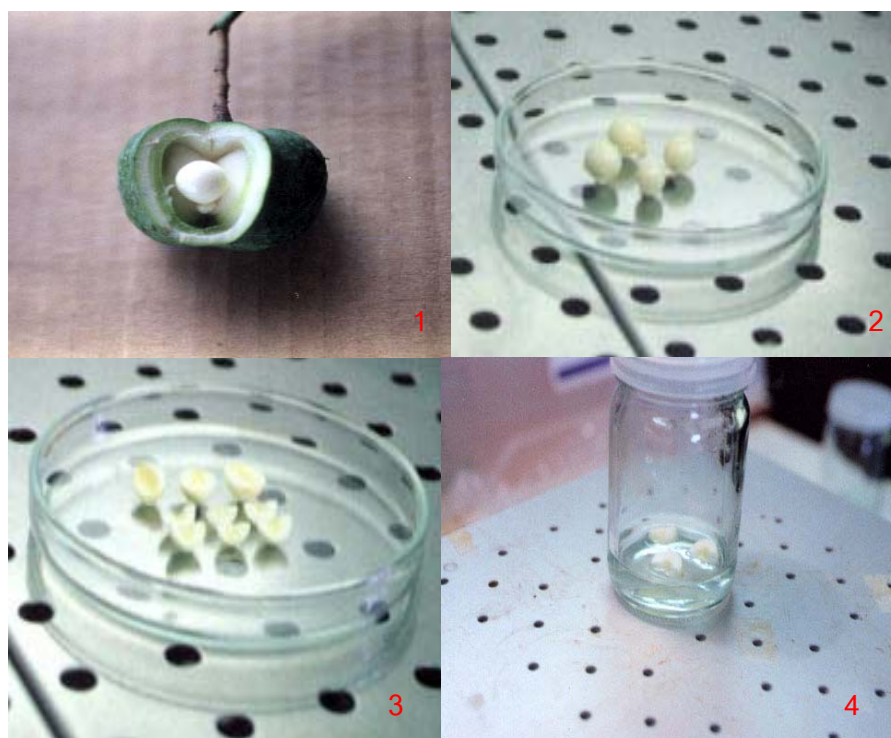


รูปที่ 11 ผลอ่อนยางพาราอายุประมาณ 60 วัน ภายหลังจากการผสมเกสร (bar = 1 ซม.)

2.1.2.2 การชักนำแคลลัสเมลิค่อนยางพารา

นำผลยางที่มีอายุ 6 - 8 สัปดาห์หลังจากผสมเกสร มาล้างทำความสะอาดที่ผิวผลโดยถูอย่างแรงด้วยสก็อชโบรท์และน้ำยาล้างจานชั้นไลท์ ผึ่งในที่ร่มสักครู่เพื่อให้แห้ง จากนั้นนำเข้าสู่ตู้ย่ำเลี้ยงเนื้อเยื่อ จุ่มแช่ผลในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% แล้วลนไฟ ทำเช่นนี้ 1 - 2 ครั้งจนแน่ใจว่าผิวภายนอกสะอาดปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ปากคีบตรึงผลให้แน่นด้วยมือซ้าย ใช้มือขวาจับมีดผ่าตัดกรีดพูของผลออกเป็นรอยขนานกัน 2 แนวในแนวตั้ง แล้วกรีดอีกแนวตามบนซึ่งขวางกับรอยตัดเดิม เปิดเปลือกผลออกจะเห็นเมลิค่อนรูปร่างกลมขนาดเล็กติดอยู่กับรก (funiculus) ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดแยกเมลิค่อนออกจากผล ผ่าครึ่งเมลิค่อนตามยาวเพื่อแบ่งเมลิค่อนออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วผ่าเมลิค่อนอีกครั้งตามขวางเพื่อแบ่งเมลิค่อนออกเป็น 3 ส่วน

เมล็ด 1 เมล็ดสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ส่วน นำเมล็ดที่ตัดแบ่งเป็นส่วน ๆ ไปเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัส (ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแสดงในรูปที่ 12) วางเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C แคลลัสใช้เวลาในการงอกประมาณ 3-4 สัปดาห์ เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงทำการย้ายเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มขนาดแคลลัส MS-2 (ดังแสดงในตารางที่ 3) ทุก 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 ครั้ง



รูปที่ 12 แสดงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดอ่อนยางพารา เรียงตามลำดับขั้นที่ 1, 2, 3 และ 4

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา

องค์ประกอบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชักนำแคลลัส (MS-1)	เพิ่มปริมาณ (MS-2)
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
Na ₂ EDTA	18.60	18.60
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.90	13.90
MnSO ₄ ·4H ₂ O	33.80	33.80
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	21.00	21.00
H ₃ BO ₃	12.40	12.40
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.50	0.50
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.50	0.50
KI	1.70	1.70
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.50	0.50
Thiamine.HCl	5.00	5.00
Pyridoxine.HCl	0.50	0.50
Nicotinic acid	0.50	0.50
Glycine	2.00	2.00
Myo-inositol	500	500
BA	2.0	2.0
2,4-D	2.0	2.0
Sucrose (%)	8	5
pH	5.8	5.8

(ที่มา : <http://sut2.ac.th/AgriTech/cybertool/tikresearch/sura7.html>)

2.1.2.3 การเลือกใช้แคลลัสเมล็ดอ่อนยางพารา

ในการทดสอบใช้แคลลัสเมล็ดอ่อนของยางพารา 2 พันธุ์ 1) พันธุ์ GT1 และ 2) พันธุ์ RRIM600 โดยใช้แคลลัสที่ผ่านการย้ายเลี้ยงในอาหารที่ได้ชักนำให้มีการเพิ่มขนาดแล้ว ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 0.2-0.5 กรัม เลือกใช้แคลลัสชุดควบคุมและแคลลัสชุดทดลองที่ผ่านการย้ายเลี้ยงมาพร้อมๆ กันน้ำหนักใกล้เคียงกันมาใช้ในการทดลองเพื่อลดความแปรปรวน สังเกตได้ว่าแคลลัสเมล็ดอ่อนมีลักษณะฟูใส สีเหลืองอ่อน มีความสม่ำเสมอมากกว่าแคลลัสข้อปล้อง แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถทำการชักนำให้เกิดแคลลัสได้หลายพันธุ์ซึ่งต่างจากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนข้อปล้องที่มีต้นพันธุ์จำนวนมากและสามารถทำการทดลองได้ตลอดปี ไม่เหมือนดอกและผลที่มีเพียงปีละครั้งเท่านั้น

นอกจากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต่างๆ ของยางพาราแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากแคลลัสเมล็ดอ่อนในอาหารเหลว (เซลล์ซัสเพนชัน) โดยนำแคลลัสที่มีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี 2,4-D และ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่มีขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 1 เดือน นำเซลล์ซัสเพนชันที่ได้ย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก 10 วัน โดยพบว่ามีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้น 2-3 เท่าของปริมาตรเซลล์เริ่มต้น แต่ทางผู้วิจัยไม่ได้นำเซลล์ซัสเพนชันดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบ อีกทั้งเซลล์ซัสเพนชันที่ได้มีปริมาณไม่เพียงพอ จึงควรปรับปรุงสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อใช้ในงานวิจัยด้านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

2.1.3 แคลลัสข้อปล้อง (internodal stem callus)

2.1.3.1 การเลือกใช้พันธุ์ของข้อปล้องยางพารามาชักนำให้เกิดแคลลัส

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้ข้อปล้องของยางพารา 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ BPM-24 (ใช้เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์ด้านทาน), PB235 (ใช้เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์ค่อนข้างด้านทาน), พันธุ์ RRIT251 (ใช้เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์ด้านทานปานกลาง), พันธุ์ PB255 (ใช้เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ) และ พันธุ์ RRIM600 (ใช้เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์อ่อนแอ) ที่แตกยอดใหม่ (ฉัตรแรกของยอด) จากต้นพันธุ์เดิม อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ จากแปลงปลูกของสถาบันวิจัยยางจังหวัดสงขลา (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 ข้อปล้องของยางพาราพันธุ์ RRIM600 ที่เกิดจากการแตกยอดใหม่ อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ (ฉัตรแรก)

2.1.3.2 การชักนำแคลลัสข้อปล้องของยางพารา

นำข้อปล้องที่แตกยอดใหม่อายุประมาณ 4 สัปดาห์ มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปแช่สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.5% เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 20% ที่เติม Tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เป็นเวลา 6-7 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนย้ายเข้าตู้ปลอดเชื้อ ตัดชิ้นส่วนพืชโดยห่างจากส่วนยอดประมาณ 10 เซนติเมตร ให้มีความยาวท่อนละประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร ลอกเปลือกออกจะได้ส่วนที่เป็นแคมเบียมซึ่งจะเจริญเป็นแคลลัสต่อไป โดยนำมาวางบนอาหารแข็งซึ่งมีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคนนินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับ pH ของอาหารให้มีความเท่ากับ 5.7 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยวางชิ้นส่วนพืชในแนวตั้งเพื่อให้พืชมีการดูดซึมน้ำอาหารได้สูงสุด แล้วนำไปวางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Arak Jantasilp, 1991) ใช้ระยะเวลา 30 วัน ในการชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากนั้นจึงย้ายเลี้ยงแคลลัสลงในอาหารใหม่ซึ่งมีสูตรอาหารดังแสดงในตารางที่ 4

2.1.3.3 การเลือกใช้แคลลัสข้อปล้องของยางพารา

โดยใช้แคลลัสที่ผ่านการย้ายเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มขนาด มาแล้ว ประมาณ 3-4 สัปดาห์ น้ำหนักอยู่ในช่วง 0.2-0.5 กรัม ซึ่งอาจมีสีน้ำตาล แคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากส่วนข้อปล้อง อาจมีข้อเสียเนื่องจากลักษณะของแคลลัสที่ได้มีความสม่ำเสมอต่ำ จึงควรคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะฟูและมีสีเหลืองอ่อนมาใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ใช้เพาะเลี้ยงข้อปล้องของยางพารา

องค์ประกอบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชักนำแคลลัส	เพิ่มปริมาณ
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
Na ₂ EDTA	18.60	18.60
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.90	16.90
MnSO ₄ ·4H ₂ O	33.80	33.80
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	21.00	21.00
H ₃ BO ₃	12.40	12.40
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.05	0.05
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.50	0.50
KI	1.70	1.70
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.05	0.05
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440
Thiamine.HCl	5.00	5.00
Pyridoxine.HCl	0.50	0.50
Nicotinic acid	0.50	0.50
Glycine	2.00	2.00
KN	0.5	0.5
2,4-D	4.0	4.0
Myo-inositol	500	500
Sucrose (%)	7	5
pH	5.8	5.8

ที่มา : (Arak Jantasip, 1991)

2.2 การเลือกใช้ส่วนต่างๆ ของพันธุ์ยางพาราซึ่งได้แก่ เมล็ดอ่อนและข้อปล้องเพื่อใช้ในการทดสอบด้วยชุดไฮสปอร์และอิลิซิติน

2.2.1 การคัดเลือกใช้เมล็ดอ่อน

ใช้วิธีการคัดเลือกดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.1.2.1 โดยใช้เมล็ดอ่อนที่อยู่ภายในผลอ่อน เพื่อใช้ในการทดสอบด้วยชุดไฮสปอร์แต่ไม่ได้นำมาทดสอบด้วยอิลิซิติน เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยข้อปล้อง เนื่องจากในช่วงที่ทำการวิจัยเมล็ดอ่อนเริ่มมีเปลือกแข็งและก่อนหน้านี้นี้มีฝนตกชุกจึงมีการติดเชื้อ ดังนั้นในการทดลองชุดเดียวกันควรเลือกใช้เมล็ดอย่างพิถีพิถัน เพื่อลดความแปรปรวนของผลการทดลอง เช่น เลือกใช้เมล็ดชุดควบคุมและชุดทดลองจากผลเดียวกัน ไม่ใช้เมล็ดที่มีรอยแผลซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อในช่วงติดดอก

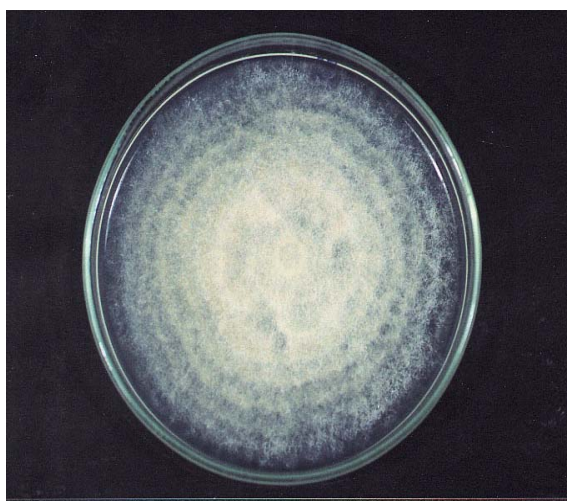
2.2.2 การคัดเลือกใช้ข้อปล้อง

ในการทดสอบเลือกใช้ข้อปล้องของยางพารา 5 พันธุ์ คือ 1) พันธุ์ BPM-24 (เป็นตัวแทนของพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora* สูงสุด), 2) พันธุ์ PB235 (เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์ค่อนข้างต้านทาน), 3) พันธุ์ RRIT251 (เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์ต้านทานปานกลาง), 4) พันธุ์ PB255 (เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ) และ 5) พันธุ์ RRIM600 (เป็นตัวแทนของยางพาราพันธุ์อ่อนแอ) เป็นข้อปล้องที่เกิดจากการแตกยอดใหม่ อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ (ฉัตรแรก) จากแปลงปลูกของศูนย์วิจัยยางสงขลา

หมายเหตุ: ในการทดลองนี้ควรใช้ข้อปล้องพันธุ์ GT1 ด้วย เพราะทางผู้วิจัยได้ใช้เมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ดังกล่าว ในการชักนำให้เกิดแคลลัสเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของแคลลัสที่มีต่อเชื้อก่อโรค แต่เนื่องจากพันธุ์ GT1 ที่ศูนย์วิจัยยางมีเฉพาะต้นที่โตเต็มที่เท่านั้น (10-15 ปี) จึงทำให้ขาดแคลนกิ่งพันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ยางพารา 5 พันธุ์ดังกล่าวข้างต้นในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อที่จะสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

2.3 การเตรียมเชื้อรา *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์

P. palmivora เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำ (Chee, 1969) ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราดังกล่าวจากสถาบันวิจัยยางสงขลาซึ่งได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรค) ผู้วิจัยนำเชื้อรา *P. palmivora* ที่ได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง จากนั้นนำมาวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน จึงสามารถนำมาใช้งานได้ (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 เชื้อรา *P. palmivora* ในอาหารแข็ง PDA ซึ่งเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ อายุ 7 วัน พร้อมใช้งาน

2.4 การเตรียมซุโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

ถ่ายเชื้อรา *P. palmivora* จากที่เลี้ยงในอาหาร PDA มาเลี้ยงใน V_8 agar เป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 15) เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้าง sporangium ซึ่งสามารถสกัดซุโอสปอร์ออกมาได้โดยการเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 มิลลิลิตร ลงบนสายรา แล้วนำไปปรมที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที สปอร์แรงเจียมของเชื้อราจะแตกออกปล่อยให้ซุโอสปอร์ที่อยู่ข้างในว่ายน้ำออกมาได้ แล้วนับจำนวนสปอร์โดยใช้เครื่อง haemocytometer แต่จำนวนซุโอสปอร์ที่นับได้มีจำนวนมากเกินไป จึงต้องทำการเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ คือ 5×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร วิธีการหาความเข้มข้นของซุโอสปอร์ทำได้โดยการหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซุโอสปอร์ผสมอยู่ลงบน Petroft Hauser counting chamber และนับซุโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของซุโอสปอร์ซึ่งทำได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ใน 1 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนซุโอสปอร์ทั้งหมดในพื้นที่} \times 1000}{\text{ปริมาตรบน Petroft Hauser}}$$

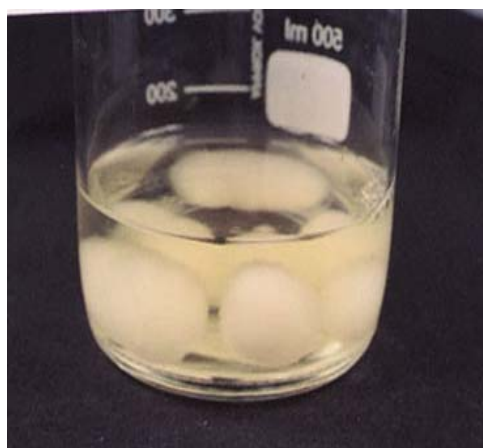
(ปริมาตรบน Petroft Hauser คือ 4×10^{-3} ไมโครลิตร)



รูปที่ 15 ลักษณะของเชื้อรา *P. palmivora* ในอาหารแข็ง V_8 agar เป็นเวลา 5 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์แรงเจียม

2.5 การเตรียมอิลลิซิดินจากเชื้อรา *P. palmivora*

ใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบนอกของเชื้อราที่กำลังเจริญเติบโตดีบน PDA ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 15 ชิ้น แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อรา (ภาคผนวก; Henninger) ตามวิธีของ Bonnet (1985) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยนำไปเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ในที่มืด เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เชื้อรา *P. palmivora* จะค่อยๆ ผลิตอิลลิซิดินออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ตรวจสอบปริมาณโปรตีนรวม (total protein) ทุก ๆ 5 วัน โดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford) เมื่อตรวจพบว่าโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อมีปริมาณโปรตีนที่คงที่จึงเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 16) ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อเตรียมอิลลิซิดินต่อไป



รูปที่ 16 เชื้อรา *P. palmivora* อายุ 15 วัน ในอาหารเหลว (Henninger) อายุ 15 วัน พร้อมนำไปเตรียมอิลลิซิดิน

2.6 การเตรียมอิลลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์ขึ้น

นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* จากข้อ 2.5 ปริมาตร 1 ลิตร มากรองเอาสายราออกด้วยเครื่อง suction flask จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 90% แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวต์ JA-21 ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกำจัดเกลือออกโดยผ่านคอลัมน์ PD-10 เก็บ fraction ของหลอดที่ 3-4 เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูงจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และเป็น fraction ที่ทดสอบแล้วว่ามีอิลลิซิดินโดยทดสอบกับใบยางแล้วทำให้เกิดการเหี่ยว (dehydration) ตามวิธีของ Chungchow and Rattarasarn (2000) รวมหลอดที่ 3-4 เข้าด้วยกัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -4 °C เพื่อใช้ในการทดสอบแคลลัสต่อไป

2.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิลลิซิดิน

ผู้วิจัยได้ดัดแปลงจากวิธีของ Schagger และ Jagow (1987) และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

2.7.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด 7x8 เซนติเมตร หนา 0.75 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (seperating gel) มีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (16.5%)
Acrylamide-bisacrylamide	0.5 ml	5 ml
3.0 M Tris-HCl, pH 8.45+0.3% SDS	1.55ml	5 ml
10% Ammonium persulfate	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Deionized water	4.2 ml	5 ml
Total volume	6.3 ml	15 ml

2.7.2 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน ทำการผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15% sucrose, 5% SDS (Sodium dodecyl sulphate), 2% β -mercaptoethanol และ 0.1% bromophenolblue ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นที่ต้องการ เตรียมโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีการเดียวกัน ก่อนการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสนำสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที

2.7.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในเจลแต่ละช่อง ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris - 0.1 M Tricine - 0.1% SDS, pH 8.25 เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA เป็นเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง สีโบรมีฟีนอลบลูจะเคลื่อนที่มากจนเกือบถึงขอบล่างของเจล (ห่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร) ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

2.7.4 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

แช่เจลในสารละลายผสมระหว่าง 40% เมทานอลกับ 10% กรดอะซิติก นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลายออกซีไดเซออร์ 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน 3 ครั้ง เป็นเวลา 15 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต นาน 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออนอีกครั้ง แล้วแช่ในสารละลายดีเวลอปเปอร์จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 5% กรดอะซิติก ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออนและเก็บเจลใน 50% เมทานอล

2.8 ศึกษาการเกิด necrosis

บันทึกภาพและขนาดรอยไหม้ที่เกิดจากการกระตุ้นแคลล์ด้วยสปอร์หรืออิลิซิตินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.9 การบ่มส่วนต่างๆ ของยางพารา ซึ่งได้แก่ แคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง), เมล็ดอ่อนและข้อปล้องด้วยชูโสปอร์และอิทธิฤทธิ์ของเชื้อรา *P. palmivora*

2.9.1 การบ่มด้วยชูโสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* (inoculation)

2.9.1.1 แคลลัสเมล็ดอ่อน (integument-derived callus)

นำแคลลัสน้ำหนักใกล้เคียงกัน (ประมาณ 0.2 - 0.5 กรัม) ในการทดสอบชุดเดียวกัน ทั้งนี้เพื่อลดความแปรปรวน จากนั้นนำแคลลัสใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมชูโสปอร์ที่มีความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที เพื่อให้แคลลัสสัมผัสกับชูโสปอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาสปอร์ออก แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ แล้วนำไปเขย่าต่อ ส่วนการทดลองในชุดควบคุมมีวิธีการทดสอบในลักษณะแบบเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสปอร์สังเกตผลการเรืองแสงทุก 4 ชั่วโมง โดยนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร)

2.9.1.2 แคลลัสข้อปล้อง (internodal stem callus)

วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบในแคลลัสเมล็ดอ่อนข้อ 2.9.1.1

2.9.1.3 เมล็ดอ่อน (immature seed)

นำเมล็ดอ่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อตามวิธีที่ได้กล่าวแล้วในข้อ 2.1.2.1 มาใส่หลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมชูโสปอร์ที่มีความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที เพื่อให้เมล็ดอ่อนสัมผัสกับชูโสปอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาชูโสปอร์ออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่แล้วนำไปเขย่าต่อ ส่วนการทดลองในชุดควบคุมมีวิธีการทดสอบในลักษณะแบบเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสปอร์ สังเกตผลการเรืองแสงทุก 4 ชั่วโมง โดยนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร)

2.9.1.4 ข้อปล้อง (internodal stem)

นำข้อปล้องมาล้างทำความสะอาดฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอก ด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 70% และนำเข้าตู้ย่ำยเลี้ยง แล้วแช่ในสารละลายไฮโปคลอไรท์ 20% เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วลอกเอาเปลือกออกและตัดแบ่งออกเป็น 4 ท่อน โดยมีความยาวท่อนละ 1.5-2 เซนติเมตร ใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมชูโสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ชูโสปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที เพื่อให้ข้อปล้องสัมผัสกับชูโสปอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาชูโสปอร์ออก แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1

มิลลิลิตรลงไปแทนที่แล้วนำไปแช่อย่างต่อเนื่อง ส่วนการทดลองในชุดควบคุมมีวิธีการทดสอบในลักษณะแบบเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสปอร์ สังเกตผลการเรืองแสงทุก 4 ชั่วโมงโดยนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร)

2.9.2 การทดสอบด้วยอิลิซิดิน

2.9.2.1 แคลลัสเมลิต์อ่อน (integument-derived callus)

นำอิลิซิดินที่เตรียมได้จากข้อ 2.5 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 5, 1.0 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อแคลลัส 1 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายแต่ละความเข้มข้น ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีแคลลัสน้ำหนัก 0.2-0.5 กรัม สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารละลายอิลิซิดิน จากนั้นนำไปแช่ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที เพื่อให้แคลลัสสัมผัสกับอิลิซิดินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาอิลิซิดินออกแล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ นำไปแช่อย่างต่อเนื่อง สังเกตผลการเรืองแสงทุก 4 ชั่วโมงโดยการนำแคลลัสไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร)

2.9.2.2 แคลลัสข้อปล้อง (internodal stem callus)

วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบในข้อ 2.8.2.1

2.9.2.3 เมลิต์อ่อน (immature seed)

ทางผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบเมลิต์ด้วยอิลิซิดิน เนื่องจากในช่วงที่ทำงานวิจัยเมลิต์เกือบหมดและมีการติดเชื้อบริเวณข้อปล้องของเมลิต์อ่อนเป็นจำนวนมาก จึงไม่สามารถทำการทดลองได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองโดยการใส่ข้อปล้องแทนเพราะมีต้นพันธุ์เพียงพอเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อในข้อปล้องและเมลิต์อ่อนต่อไป

2.9.2.4 ข้อปล้อง (internodal stem)

นำข้อปล้องที่ผ่านการฆ่าเชื้อทำความสะอาดตามวิธีที่ได้กล่าวแล้ว ในข้อ 2.7.1 ที่ลอกเอาเปลือกออกและตัดแบ่งออกเป็นท่อนๆ โดยมีความยาวท่อนละ 1.5-2 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมอิลิซิดิน 10 ไมโครกรัม ลงไป นำไปแช่ด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที เพื่อให้ข้อปล้องสัมผัสกับอิลิซิดิน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาอิลิซิดินออก แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ นำไปแช่อย่างต่อเนื่อง ส่วนการทดลองในชุดควบคุมมีวิธีการทดสอบในลักษณะแบบเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทน สังเกตผลการเรืองแสงทุก 4 ชั่วโมงโดยนำมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร)

2.10 **ศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน (Scp) ที่เกิดจากการกระตุ้นส่วนต่างๆ ของ ยางพารา ซึ่งได้แก่ แคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง), เมล็ดอ่อนและข้อปล้องด้วย ซูโอสปอร์**

2.10.1 **การวิเคราะห์หาปริมาณสคอพอลิติน (Scp) ที่ได้จากการกระตุ้นแคลลัส เมล็ดอ่อนและแคลลัสข้อปล้องด้วยซูโอสปอร์**

เมื่อครบ 4 ชั่วโมงหลังจากการบ่มแคลลัสด้วยซูโอสปอร์ ดูดสารละลายตัวอย่าง ที่ได้ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ จากนั้น จึงทำการเก็บสารละลายตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันเมื่อครบชั่วโมงที่ 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำสารละลายตัวอย่างมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของแคลลัสพันธุ์ GT1 และแคลลัสพันธุ์ RRIM600 (ในส่วนของทดสอบแคลลัสเมล็ดอ่อน) และแคลลัส ข้อปล้องซึ่งได้แก่ แคลลัสพันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และพันธุ์ RRIM600 ตาม ลำดับ

2.10.2 **การวิเคราะห์หาปริมาณสคอพอลิติน (Scp) ที่ได้จากการกระตุ้นเมล็ด อ่อนพันธุ์ GT1 และ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์**

เมื่อครบ 12 ชั่วโมงหลังจากการบ่มเมล็ดอ่อนด้วยซูโอสปอร์ ดูดสารละลายตัว อย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C และเก็บสารละลายตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันเมื่อครบชั่วโมงที่ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาวัดค่าการเรืองแสง ด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และ ความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการ หาปริมาณ Scp ที่ได้จากการกระตุ้นแคลลัสด้วยซูโอสปอร์ในหัวข้อ 2.10.1

2.10.3 **การวิเคราะห์หาปริมาณสคอพอลิติน (Scp) ที่ได้จากการกระตุ้นข้อปล้อง พันธุ์ BPM-24, PB235, RRIT251, PB255 และ RRIM600 ด้วยซูโอสปอร์**

เมื่อครบ 12 ชั่วโมงหลังจากการบ่มข้อปล้องด้วยซูโอสปอร์ ดูดสารละลาย ตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปแทนที่อีก 1 มิลลิลิตร และทำ การเก็บสารละลายตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันเมื่อครบชั่วโมงที่ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของข้อปล้องของยางพาราทั้ง 5 พันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

2.11 ศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน (Scp) ที่เกิดจากการกระตุ้นส่วนต่างๆ ของ

ยางพารา ซึ่งได้แก่ แคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง) และ ข้อปล้องด้วยอิลิซิทิน

2.11.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสคอพอลิติน (Scp) ที่ได้จากการกระตุ้นแคลลัส (เมล็ดอ่อนและข้อปล้อง) ด้วยอิลิซิทิน

เมื่อครบ 4 ชั่วโมงหลังจากการบ่มแคลลัสด้วยอิลิซิทิน 1.0 ไมโครกรัม ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C และทำการเก็บสารละลายตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันเมื่อครบชั่วโมงที่ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่างมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Scp ของข้อปล้องของยางพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาใช้ในการทดสอบ

2.11.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสคอพอลิติน (Scp) ที่ได้จากการกระตุ้นข้อปล้องด้วยอิลิซิทิน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.11.1

2.12 ศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เบต้า-1,3-กลูคาเนส) ที่เกิดจากการกระตุ้น

แคลลัสด้วยชูโอสปอร์และอิลิซิทินของเชื้อรา *P. palmivora*

2.12.1 การสังเคราะห์ PR-proteins ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นแคลลัสด้วยชูโอสปอร์

บ่มแคลลัสด้วยชูโอสปอร์ ของเชื้อรา *P. palmivora* ที่ความเข้มข้น 5×10^7 ชูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดูชูโอสปอร์ออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เก็บแคลลัสที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อบรรเทาสกัดตามวิธีในข้อ 2.12.3 ต่อไป

2.12.2 การสังเคราะห์ PR-proteins ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นแคลลัสด้วยอิลิซิทิน

เจือจางอิลิซิทินในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แช่แคลลัสลงในสารละลายดังกล่าว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงดูด

อิทธิขิตินออกแล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงไปแทนที่ การทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนอิทธิขิตินเมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำแคลลัสไปเก็บที่ -20°C เพื่อรอการสกัดตามวิธีในข้อ 2.12.3 ต่อไป

2.12.3 การสกัดโปรตีนจากแคลลัส

นำแคลลัสชุดควบคุมและชุดทดลอง ทั้งที่บ่มด้วยซูโอสปอร์และทดสอบด้วยอิทธิขิตินพันธุ์ละ 1 กรัม ใส่ในครกขนาดเล็ก จากนั้นเติมไนโตรเจนปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดแล้วเติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 50 mM โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 โคลกให้เข้ากัน ตักสารทั้งหมดลงในกระบอกฉีดขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีสำลีสบรวจอยู่ คั้นเอาเฉพาะน้ำออกมาจนได้สารละลาย 0.8 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ทั้งส่วนที่เป็นตะกอน วัดปริมาตรส่วนใส แล้วนำสารสกัดจากแคลลัสไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด จากนั้นกำจัดน้ำตาลออกไปตามวิธีการในข้อ 2.12.4 ก่อนนำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส

2.12.4 การกำจัดน้ำตาลในสารสกัดจากแคลลัส

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสคือน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นจึงต้องนำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.12.3 มากำจัดน้ำตาลภายในสารละลาย (internal sugar) ออกไปเสียก่อน เพื่อไม่ให้รบกวนวิธีการตรวจวัดความว่องไวของเอนไซม์โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 70% จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายกลับใน 50 mM โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตรวจหาปริมาณโปรตีนอีกครั้งวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford) แล้วจึงนำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส

2.12.5 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

ความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส ใช้วิธีการตรวจวัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Bruner (1964) คือ ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารละลายกับกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) กำหนดให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิตเท่ากับ 1 ไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคส ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยลามินารินด้วยเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส เป็นเวลา 1 นาที ใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 35°C ศึกษาปริมาณในการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยใช้สารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรผสมกับลามินารินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แช่และเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3

นาที่ แล้วนำมาเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 0.2 มิลลิลิตร และ 0.1 M โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ pH 5.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.9 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหา ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2.13 ศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแคลลัสเมล็ดอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วยซิวโอสปอร์และอิลิซิดิน

2.13.1 เตรียมสารสกัดจากแคลลัสพันธุ์ GT1 และ RRIM600

เตรียมสารสกัดจากแคลลัสพันธุ์ GT1 และ RRIM600 ทั้งที่บ่มด้วยซิวโอสปอร์และอิลิซิดินของเชื้อรา *P. palmivora* และแคลลัสชุดควบคุม โดยนำมาบดในไนโตรเจนเหลวและละลายใน 0.05 M บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต, pH 7.5 ในอัตราส่วน 0.5 เท่าของน้ำหนักแคลลัส 1 กรัม และกรองโดยใช้กระบอกชีดยา แล้วนำ homogenate ไป centrifuge ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปเก็บที่ -20 °C นำสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร แล้ววัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและเก็บสารตัวอย่างนี้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2.13.2 การวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

การวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ o-dianisidine ตามวิธีของ Shannon และคณะ (1966) ทำการทดลองโดยการนำสารสกัดแคลลัส (crude extract) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (อาจจะต้องเจือจางให้เหมาะสมก่อนนำมาทดสอบ) ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมบัฟเฟอร์ 0.05 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์, pH 5.4 ปริมาตร 2.775 มิลลิลิตร และ 0.25% o-dianisidine ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 0.1 M H₂O₂ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร ด้วย UV-VIS spectrophotometer บันทึกค่าทุกๆ 15 วินาที จนถึง 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยให้ 1 ยูนิต ของค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีค่าเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสง 460 นาโนเมตร เปลี่ยนไป 0.1 หน่วยต่อนาที ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ o-dianisidine เป็นสับสเตรต

2.13.3 การตรวจหาไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค

ตรวจหาไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดแคลลัส โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด 7x8 เซนติเมตร หนา 0.75 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (seperating gel) มีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ซึ่งมีส่วนประกอบของเจلدังแสดงในตารางที่ 5 จากนั้นนำสารสกัดจากแคลลัสตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE 1 ส่วน ใส่สารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรต่อเจล 1 ช่อง (โดยไม่ต้องคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนก่อน) เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA เป็นเวลาประมาณ 5 ชั่วโมง สีโบรมีฟีนอลบลูจะเคลื่อนที่มาจากขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์, pH 5.4 เพื่อขจัด SDS ออก แล้วนำเจลไปย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของเจلدัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (3%)	Separating gel (7%)
30% Acrylamide - 0.8% bisacrylamide	0.5 ml	3.0 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.25 ml
5% Ammonium persulfate	50 µl	200 µl
TEMED	10 µl	13 µl
Distilled water	3 ml	6 ml
Total volume	5 ml	13 ml

2.13.4 การย้อมความว่องไวของเปอร์ออกซิเดส

นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.05% o-dianisidine ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร, 0.05 M โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5.4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ 0.1 M H₂O₂ 1.50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นนำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ตีรังเจล

ด้วยสารละลาย 50% เมทานอล แลบโปรตีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแอกติวิตีจะมีสีน้ำตาล
แดง-ส้ม