

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

3.1 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างซุโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* กับใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ

3.1.1 ผลการศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้ (นีโครซีส) หลังจากการกระตุ้นใบยางด้วยซุโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

3.1.1.1 ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราตามลำดับความสามารถในการต้านทานโรค

ในขั้นแรกนำใบยางพาราพันธุ์ต่างๆที่มีความสามารถในการต้านทานโรคแตกต่างกัน คือพันธุ์ BPM-24 จัดเป็นพันธุ์ต้านทานโรค, RRIT251 จัดเป็นพันธุ์ปานกลางและ RRIM600 จัดเป็นพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งถูกจัดลำดับความต้านทานโรคโดยสถาบันวิจัยยาง มาทดลองกับซุโอสปอร์ที่ความเข้มข้น 5×10^6 , 1×10^7 และ 5×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อปรมใบยางทิ้งไว้พบว่ามียอยไหม้เกิดขึ้นในลักษณะและขนาดต่างๆกัน ที่ความเข้มข้น 5×10^6 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรทำให้เกิดรอยไหม้ที่ลุกลามอย่างไม่มีขอบเขตหรือเกิดอาการของโรคเฉพาะในพันธุ์ RRIM600 เท่านั้น ส่วนที่ความเข้มข้น 1×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าในพันธุ์ BPM-24 และ RRIT251 เกิดรอยไหม้แบบการตายอย่างว่องไวของเซลล์ (hypersensitive cell death) และในพันธุ์ RRIM600 เกิดรอยไหม้ได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 5×10^6 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ซุโอสปอร์ความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 5×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรพบความแตกต่างของยางพาราทั้งสามพันธุ์อย่างชัดเจน โดยรอยไหม้ของยางพันธุ์ BPM-24 มีลักษณะการเกิดแบบ hypersensitive cell death ส่วนในพันธุ์ RRIT251 และ RRIM600 เป็นรอยไหม้แบบการเกิดโรค แต่ขนาดของรอยไหม้ในพันธุ์ RRIT251 เล็กกว่าในพันธุ์ RRIM600 แสดงว่าการลุกลามของเชื้อโรคในพันธุ์ RRIT251 ช้ากว่าในพันธุ์ RRIM600

จากการสังเกตขอบเขตการเกิดรอยไหม้เมื่อใช้ความเข้มข้นของ ซูโอสปอร์แตกต่างกัน พบว่าที่ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรทำให้สามารถ แยกพันธุ์อย่างทั้งสามพันธุ์ออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยที่พันธุ์ BPM-24 ที่เป็นพันธุ์ ต้านทานมีขนาดของรอยไหม้เล็กที่สุดเพราะสามารถกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจาย ไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ รองลงมาคือพันธุ์ RRIT251 ที่ต้านทานต่อโรคในระดับปาน กลางคือสามารถกักเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายได้ดีกว่าพันธุ์อ่อนแอแต่ก็ไม่สามารถกัก บริเวณได้มากเท่ากับพันธุ์ต้านทาน และสุดท้ายพันธุ์ RRIM600 รอยไหม้มีการขยายแผ่ กว้างอย่างไม่มีขอบเขตเป็นลักษณะของพันธุ์ยางที่อ่อนแอต่อโรคจึงไม่สามารถกัก บริเวณการลุกลามของเชื้อราได้ ดังนั้นที่ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรจึง เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการคัดเลือกพันธุ์ออกเป็นสามกลุ่มอย่างคร่าวๆต่อไป ส่วนที่ความเข้มข้น 5×10^6 และ 1×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรไม่สามารถแยกความ แตกต่างของขนาดรอยไหม้ในพันธุ์ BPM-24 และ RRIT251 ได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ ในการคัดเลือกพันธุ์

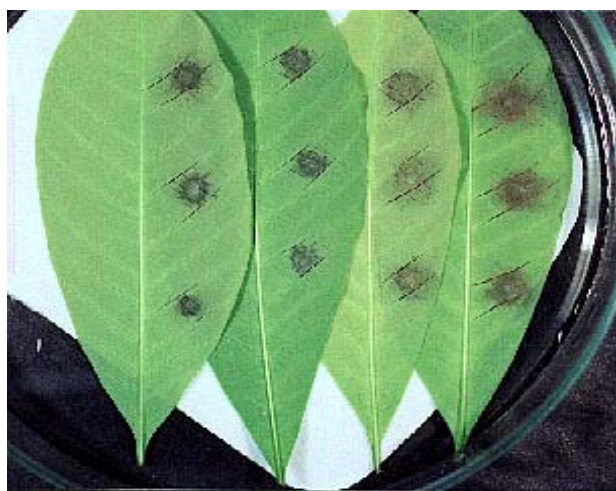
3.1.1.2 การบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์เพื่อคัดเลือกพันธุ์ยางออก เป็นสามกลุ่มอย่างคร่าวๆตามระดับความต้านทาน

จากผลการศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้บนใบยางพารา ที่เวลา 72 ชั่วโมง ทำให้สามารถแบ่งพันธุ์ยางอย่างคร่าวๆออกเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มอ่อน แอ, กลุ่มปานกลางและกลุ่มต้านทาน โดยทั้งสามกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัย สำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P < 0.05$) (ข้อมูลที่ได้ถูกวิเคราะห์ความแตกต่างโดย ใช้ One-Way ANOVA และทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Scheffe ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 %) ในกลุ่มแรกคือกลุ่มพันธุ์ต้านทานใช้พันธุ์ยาง BPM-24 ที่มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ 0.34 เซนติเมตรเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่ามีทั้งหมด 3 พันธุ์ ได้แก่ BPM-24, PB-235 และ RRIC110 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้เล็กที่สุด อยู่ในช่วง 0.30–0.40 เซนติเมตร (รูปที่ 26, 27 และตารางที่ 5) การที่มีรอยไหม้ขนาด เล็กและมีขอบเขตชัดเจนแน่นอนเป็นการแสดงความสามารถของพันธุ์ยางกลุ่มต้าน

ทานที่สามารถกักบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงจึงทำให้เกิดรอยไหม้เป็นแบบ incompatible หรือ hypersensitive cell death ในกลุ่มปานกลางใช้พันธุ์ยาง RRIT251 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ 1.27 เซนติเมตรเป็นตัวเปรียบเทียบ กลุ่มนี้วัดขนาดของรอยไหม้ได้อยู่ในช่วง 1.20–1.60 เซนติเมตรมีจำนวน 11 พันธุ์ซึ่งจำแนกเป็นสองกลุ่มย่อยคือยางพันธุ์ PB311, RRIT251, RRIT250 และ PB260 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้อยู่ในช่วง 1.20-1.30 เซนติเมตร จัดเป็นพันธุ์ในกลุ่มปานกลางที่มีแนวโน้มไปทางต้านทาน ส่วนพันธุ์ BPM1, PR305, KRS25, PR302, PB255, GT1 และ PR255 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้อยู่ในช่วง 1.40-1.60 เซนติเมตร (รูปที่ 26 , 27 และ ตารางที่ 5) จัดเป็นพันธุ์ในกลุ่มปานกลางที่มีแนวโน้มไปทางอ่อนแอ ในกลุ่มสุดท้ายคือพันธุ์ยางในกลุ่มอ่อนแอใช้พันธุ์ยาง RRIM600 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ 2.74 เซนติเมตรเป็นตัวเปรียบเทียบ กลุ่มนี้วัดขนาดของรอยไหม้ได้อยู่ในช่วง 2.50-2.70 เซนติเมตร มีทั้งหมด 3 พันธุ์ประกอบด้วยพันธุ์ RRIM600, KRS156 และ KRS163 (รูปที่ 26 , 27 และ ตารางที่ 5) พันธุ์ยางในกลุ่มนี้แสดงลักษณะการเกิดรอยไหม้เป็นแบบ compatible หรือ หรือแบบ การเกิดโรค กล่าวคือรอยไหม้มีลักษณะแผ่กว้างอย่างไม่มีขอบเขต ส่วนผลการทดลองในชุดควบคุมไม่พบการเกิดรอยไหม้หลังจากหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อบนหลังใบยางทั้ง 17 พันธุ์แม้ว่าจะทิ้งไว้นาน 72 ชั่วโมงก็ตาม



ด้านทาน



ปานกลาง



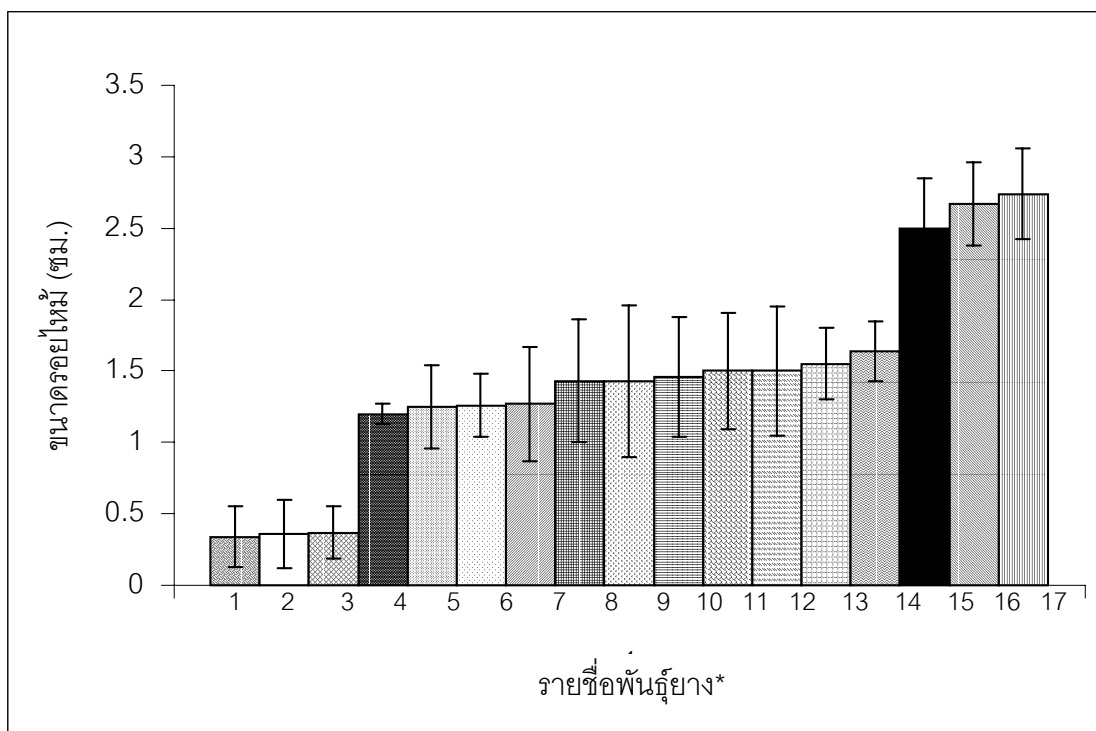
อ่อนแอ

รูปที่ 26 เปรียบเทียบตัวอย่างการเกิดรอยไหม้ หลังบ่มใบยางพาราในกลุ่มพันธุ์ที่มีระดับการต้านทานโรคแตกต่างกัน (ด้านทาน, ปานกลาง และ อ่อนแอ) ด้วยสารละลายสปอร์เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ (นีโครซีส) หลังจากบ่มใบยางทั้ง 17 พันธุ์ด้วยซุโ-
สปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซุโสปอร์ต่อมิลลิเมตรของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*
ที่เวลา 72 ชั่วโมง

รายชื่อพันธุ์ยาง	ขนาดของรอยไหม้ ในใบ ยางพารา (ซม.)	รายชื่อพันธุ์ ยาง	ขนาดของรอยไหม้ในใบ ยางพารา (ซม.)
BPM-24	0.34 ± 0.21^a	KRS25	1.46 ± 0.42^c
PB-235	0.36 ± 0.24^a	BPM1	1.50 ± 0.41^c
RRIC110	0.37 ± 0.18^a	PR255	1.50 ± 0.45^c
RRIT250	1.20 ± 0.07^b	PR305	1.55 ± 0.25^c
PB311	1.25 ± 0.29^b	PB255	1.64 ± 0.21^c
PB260	1.26 ± 0.22^b	KRS163	2.50 ± 0.35^d
RRIT251	1.27 ± 0.40^b	KRS156	2.67 ± 0.29^d
GT1	1.43 ± 0.43^c	RRIM600	2.74 ± 0.32^d
PR302	1.43 ± 0.53^c		

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองอย่างน้อย 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ \pm SD
a, b, c และ d = ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งเดียวกันของขนาดรอยไหม้ แสดงว่าค่า
เฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



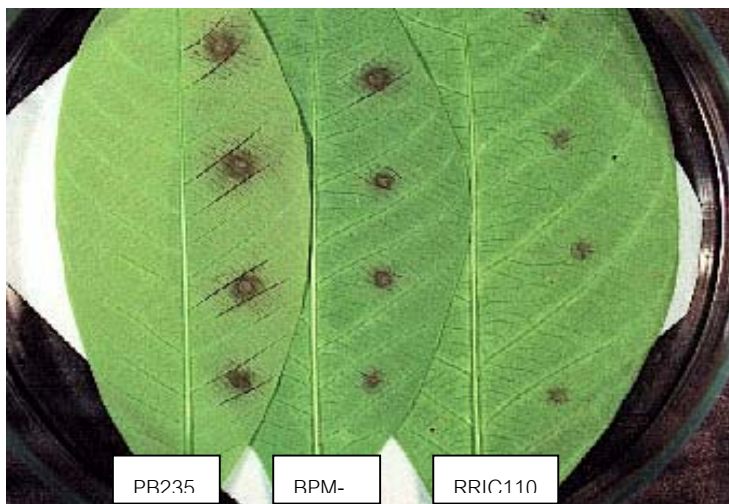
รูปที่ 27 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยใหม่หลังจากบ่มใบยางทั้ง 17 พันธุ์ ด้วย
 เชื้อโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 เชื้อโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora*
palmivora ที่เวลา 72 ชั่วโมง

* (1=BPM-24, 2=PB-235, 3=RRIC110, 4=RRIT250, 5=PB311, 6=PB260, 7=RRIT251, 8=GT1, 9=PR302, 10=KRS25, 11=BPM1, 12=PR255, 13=PR305, 14=PB255, 15=KRS163, 16=KRS156, 17=RRIM600)

3.1.1.3 ผลการจัดลำดับพันธุ์ยางในกลุ่มต้านทานอย่างละเอียดด้วย เชื้อโอสปอร์

เมื่อคัดเลือกพันธุ์ยางอย่างคร่าวๆโดยการนำเชื้อโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 เชื้อโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ยางได้สามกลุ่มอย่างคร่าวๆแล้ว ต่อมาจึงนำพันธุ์ยางในกลุ่มต้านทานมาทดสอบอย่างละเอียดโดยการเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อโอสปอร์ให้สูงขึ้นเป็น 1×10^8 เชื้อโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร พันธุ์ที่มีความต้านทานสูงกว่าย่อมมีลักษณะของรอยใหม่ที่มีขอบเขตของบาดแผลชัดเจนและมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์ที่มี

ความต้านทานรองลงมา จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ RRIC110 มีขนาดของรอยไหม้เล็กที่สุด ส่วนพันธุ์ BPM-24 และ PB-235 มีขนาดของรอยไหม้ใหญ่ขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 28, 29 และ ตารางที่ 6) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสปอร์จาก 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรเป็น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรพบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ของสายพันธุ์ RRIC110 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (0.37 และ 0.39 เซนติเมตรตามลำดับ) ขณะที่เส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ของใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 และ PB-235 จะแปรผันตามความเข้มข้นของสปอร์ โดยมีขนาดรอยไหม้ที่ความเข้มข้นของสปอร์ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 0.57 และ 1.10 เซนติเมตร ซึ่งใหญ่กว่าที่ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (0.34 และ 0.36 เซนติเมตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ การที่ขนาดของรอยไหม้ในกลุ่มต้านทานใหญ่ขึ้นตามความเข้มข้นของสปอร์ที่เพิ่มขึ้นก็แสดงปฏิกิริยา incompatible สามารถเปลี่ยนเป็น compatible ได้ หรือกล่าวได้อีกอย่างหนึ่งว่าทำให้ความต้านทานของใบยางลดลง



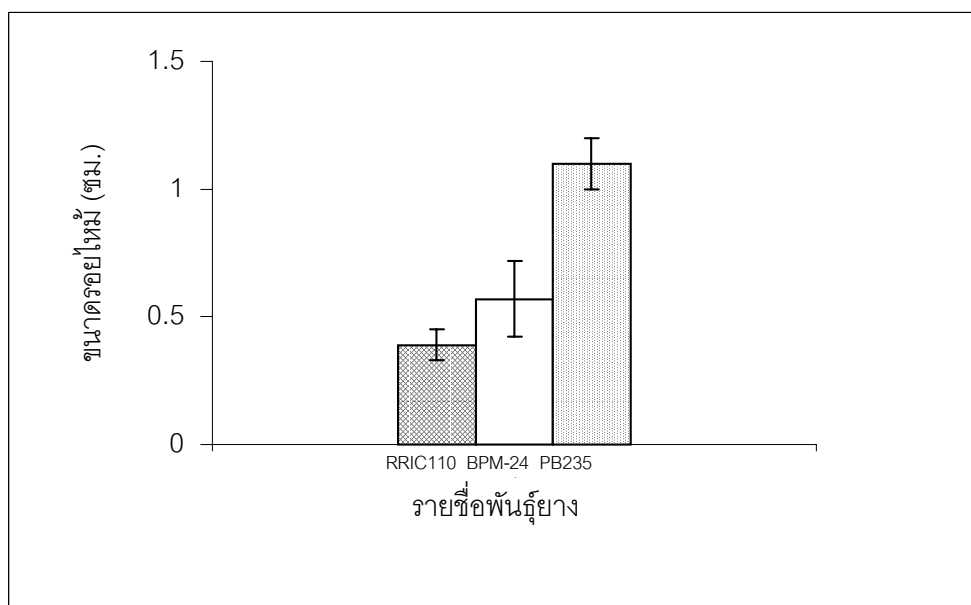
รูปที่ 28 เปรียบเทียบการเกิดรอยไหม้หลังบ่มใบยางพาราในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน (PB-235, BPM-24 และ RRIC110) ด้วยความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง เพื่อจัดลำดับความต้านทานอย่างละเอียด

ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ในกลุ่มยางพันธุ์ด้านทานหลังจากบ่มใบยางด้วยชูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 และ 1×10^8 ชูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 72 ชั่วโมง (sp/ml = ชูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร)

รายชื่อพันธุ์ยาง	ขนาดของรอยไหม้หลังจากบ่มใบยางพาราความเข้มข้นต่าง ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ซม.)	
	5×10^7 sp/ml	1×10^8 sp/ml
RRIC110	0.37 ± 0.18^a	0.39 ± 0.06^a
BPM-24	0.34 ± 0.21^a	0.57 ± 0.15^b
PB-235	0.36 ± 0.24^a	1.10 ± 0.10^c

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ \pm SD

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



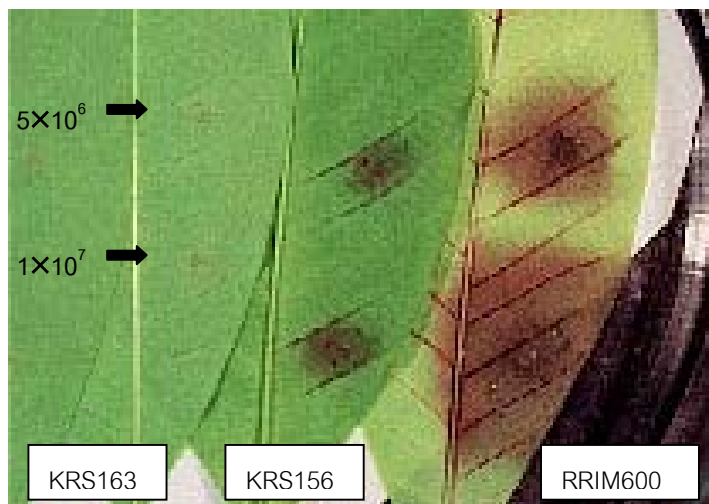
รูปที่ 29 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ในกลุ่มยางพันธุ์ด้านทาน หลังจากบ่มใบยางด้วยชูโอสปอร์ความเข้มข้น 1×10^8 ชูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

3.1.1.4 ผลการจัดลำดับพันธุ์ภายในกลุ่มอ่อนแออย่างละเอียด โดยการใช้ซูอิสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

จากการทดลองในข้อ 1.1.2 สามารถคัดเลือกพันธุ์ภายในกลุ่มอ่อนแอได้อย่างหยาบๆ 3 พันธุ์ ประกอบด้วย KRS156, KRS163 และ RRIM600 ด้วยการใส่ซูอิสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยขนาดของรอยไหม้มีการลุกลามอย่างรวดเร็วซึ่งสามารถสรุปได้ว่าใช้ความเข้มข้นของซูอิสปอร์มากเกินไป เพื่อต้องการให้เห็นความแตกต่างของการลุกลามของเชื้อโรคซึ่งแสดงด้วยขนาดของรอยไหม้ จึงได้ลดความเข้มข้นของซูอิสปอร์จาก 5×10^7 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตรเป็น 5×10^6 และ 1×10^7 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตรซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นเดิม 10 และ 5 เท่าตามลำดับ เพื่อให้เกิดความแตกต่างของขนาดของรอยไหม้ในพันธุ์ยางพาราในแต่ละพันธุ์ชัดเจนมากขึ้นจนสามารถจัดลำดับความอ่อนแอต่อโรคได้ พบว่าขนาดของรอยไหม้เมื่อใช้ความเข้มข้นของซูอิสปอร์ 1×10^7 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตร มีขนาดเรียงตามลำดับจากขนาดเล็กไปขนาดใหญ่ได้ดังนี้คือพันธุ์ KRS163 (0.30 เซนติเมตร), KRS156 (0.75 เซนติเมตร) และ RRIM600 (2.52 เซนติเมตร) ตามลำดับ (รูปที่ 30, 31 และ ตารางที่ 7) ขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของซูอิสปอร์ 5×10^6 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตรก็ให้ผลในทำนองเดียวกับที่ความเข้มข้นของซูอิสปอร์ 1×10^7 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตร

จากขนาดของรอยไหม้ที่เกิดขึ้นกับพันธุ์ KRS163 และ KRS156 บ่งชี้ว่าเมื่อลดความเข้มข้นของซูอิสปอร์ลงทำให้ใบยางพาราเปลี่ยนการตอบสนองต่อเชื้อโรคจาก compatible เป็น incompatible ได้ แต่สำหรับพันธุ์ RRIM600 ที่จัดเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อการต้านทานโรค พบว่าทั้งสองความเข้มข้นของซูอิสปอร์ (5×10^6 และ 1×10^7 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตร) ในการทดลองครั้งนี้ยังมากเกินไปเพราะขนาดของรอยไหม้ยังคงมีลักษณะแผ่กว้างซึ่งแสดงถึงการเกิดโรคหรือเกิดปฏิกิริยา compatible นั่นเอง แต่ขนาดของรอยไหม้ที่เกิดจากความเข้มข้นของซูอิสปอร์ 5×10^6 ซูอิสปอร์ต่อมิลลิลิตร (1.60 เซนติเมตร) มีขนาดเล็กกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของซูอิสปอร์ 1×10^7

ชูอิสปอร์ตต่อมิลลิลิตร (2.52 เซนติเมตร) ประมาณ 1.5 เท่า จึงมีแนวโน้มว่าถ้าความเข้มข้นของชูอิสปอร์ตลดลงก็สามารถเปลี่ยนเป็นปฏิกิริยา incompatible ได้เช่นกัน



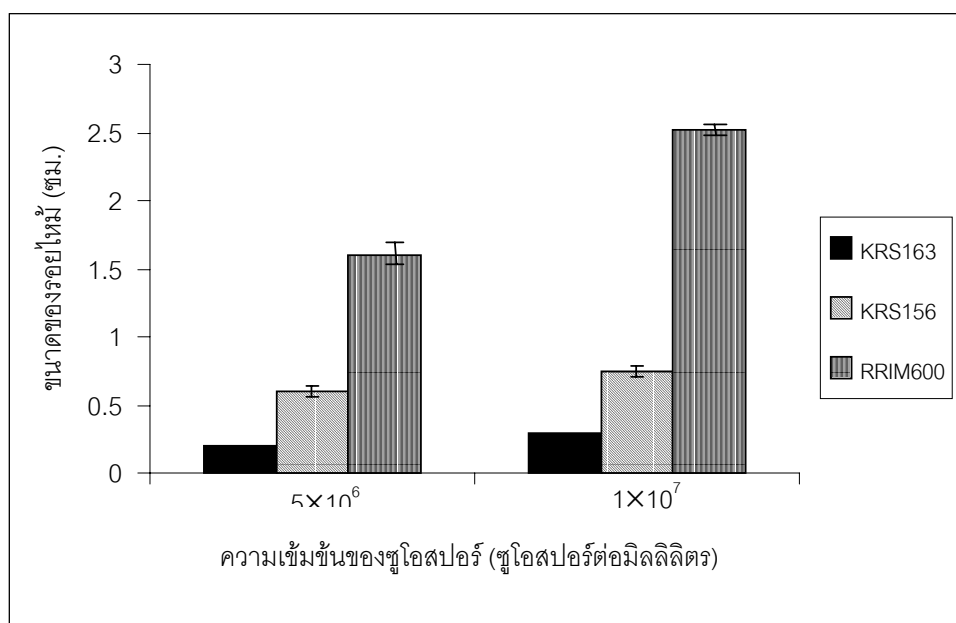
รูปที่ 30 เปรียบเทียบการเกิดรอยไหม้หลังบ่มใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (KRS163, KRS156 และ RRIM600) ด้วยชูอิสปอร์ตความเข้มข้น 5×10^6 และ 1×10^7 ชูอิสปอร์ตต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้หลังจากบ่มไບียงพาราในกลุ่มอ่อนแอ (KRS163, KRS156 และ RRIM600) ด้วยซุโสปอร์ความเข้มข้นต่างๆคือ 5×10^6 , 1×10^7 และ 5×10^7 ซุโสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 72 ชั่วโมง (sp/ml = ซุโสปอร์ต่อมิลลิลิตร)

พันธุ์ยาง	ขนาดของรอยไหม้หลังจากบ่มไບียงพารา ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ซม.)		
	5×10^6 sp/ml	1×10^7 sp/ml	5×10^7 sp/ml
KRS163	0.20 ± 0.00^a	0.30 ± 0.00^a	2.50 ± 0.35^b
KRS156	0.60 ± 0.02^c	0.75 ± 0.05^c	2.67 ± 0.29^b
RRIM600	1.60 ± 0.07^d	2.52 ± 0.03^b	2.74 ± 0.32^b

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ \pm SD

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



รูปที่ 31 เปรียบเทียบขนาดของรอยไหม้หลังบ่มไບียงพาราพันธุ์อ่อนแอ (KRS163, KRS156 และ RRIM600) ด้วยซุโสปอร์ความเข้มข้น 5×10^6 และ 1×10^7 ซุโสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ผลจากการทดลองข้อ 3.1.1.2 แสดงว่าเมื่อปมเชื้อรา *P. palmivora* บนใบยางพาราทั้ง 17 พันธุ์ ขนาดของรอยไหม้ซึ่งเกิดขึ้นจากการเจาะใบยางด้วยชูโอสปอร์ของเชื้อราดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน สามารถคัดแยกอย่างคร่าวๆ ได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นพันธุ์ต้านทานซึ่งจะเกิดรอยไหม้ขนาดเล็กและบาดแผลมีขอบเขตชัดเจนแสดงว่าเซลล์ของใบยางพาราในกลุ่มนี้มีความสามารถในการกักบริเวณของเชื้อไม่ให้เกิดการลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของชูโอสปอร์ก็สามารถจัดลำดับความต้านทานได้ละเอียดมากขึ้นโดยมีขนาดของรอยไหม้ใหญ่ขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของชูโอสปอร์ เป็นการแสดงแนวโน้มของพันธุ์ยางพาราในกลุ่มนี้ที่จะเปลี่ยนการเกิดปฏิกิริยาจาก incompatible เป็น compatible ได้ ส่วนในกลุ่มปานกลางมีขนาดของรอยไหม้ใหญ่กว่าในกลุ่มต้านทานแต่มีขนาดเล็กกว่าในกลุ่มอ่อนแอแสดงถึงความสามารถในการกักบริเวณของเชื้อได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งถ้ามีการเพิ่มความเข้มข้นของชูโอสปอร์จะทำให้ขนาดของรอยไหม้ใหญ่ขึ้นใกล้เคียงกับพันธุ์อ่อนแอได้ การเกิดรอยไหม้ในพันธุ์ปานกลางสามารถแยกย่อยออกได้สองกลุ่มคือพันธุ์ปานกลางที่มีแนวโน้มไปทางต้านทานและมีแนวโน้มไปทางอ่อนแอ ในกลุ่มสุดท้ายคือพันธุ์อ่อนแอมีขนาดของรอยไหม้แผ่กว้างออกไปอย่างรวดเร็วแสดงให้เห็นถึงความล้มเหลวของใบในการกักเชื้อโรคไว้ อย่างไรก็ตามหากลดความเข้มข้นของชูโอสปอร์ลงทำให้ขนาดของรอยไหม้เล็กลงจนมีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์จึงสามารถทำให้จัดลำดับความอ่อนแอต่อโรคได้ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนปฏิกิริยาจาก compatible เป็น incompatible ในพันธุ์ยางกลุ่มอ่อนแอ

ดังนั้นขนาดของรอยไหม้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยชูโอสปอร์บนใบยางทั้ง 17 พันธุ์ สามารถนำมาใช้บอกระดับความต้านทานโรคได้ โดยระดับความต้านทานแปรแบบผกผันกับขนาดของรอยไหม้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาการตอบสนองของใบยางพาราต่อเชื้อรา *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasam, 2001) นั่นคือขนาดของรอยไหม้ระหว่างพันธุ์ต้านทาน พันธุ์ปานกลางและพันธุ์อ่อนแอแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการบ่มใบยางพาราคือพันธุ์ GT1 (ต้านทาน) และ PB260 (อ่อนแอ) ด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* พบว่าขนาดของรอยไหม้

ที่เกิดจากการเจาะใบยางด้วยสปอร์ของเชื้อราดังกล่าวทำให้ใบยางพันธุ์ต้านทาน (GT1) เกิดรอยไหม้ขนาดเล็กและมีขอบเขตชัดเจนมากกว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอ (PB260) ซึ่งขนาดของรอยไหม้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและสามารถนำมาใช้จัดลำดับความต้านทานโรคได้ (Breton *et al.*, 1997 b)

3.1.2 ผลการย้อมเซลล์ใบยางด้วยสี Trypan blue หลังจากบ่มใบยางด้วย ซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

การเกิดรอยไหม้จากการหยดซุโอสปอร์บนใบยางด้วยวิธีข้างต้นเกิดจากการเจาะของซุโอสปอร์ผ่านผิวใบ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาหาตำแหน่งและจำนวนเซลล์ของใบยางที่ถูกแทงผ่าน (penetration site) โดยการย้อมด้วยสี trypan blue เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทาน, ปานกลาง และอ่อนแอต่อโรค พบว่ามีจำนวนการถูกเจาะโดยซุโอสปอร์ผ่านผิวใบและซุโอสปอร์ที่เหลือหลุดรอดจนเกิดการลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงได้น้อยมาก จึงไม่สามารถตรวจวัดการงอกของสายราและการสร้างสปอร์แรงเจียมในใบยางได้ ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนแปลงวิธีการทดลองโดยการช่วยลดเครื่องกีดขวางทางกายภาพ (physical barrier) ลง โดยการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตร แล้วแช่ในซุโอสปอร์ซึ่งจะทำให้ซุโอสปอร์สามารถเจาะขอบใบที่เป็นแผลจากรอยตัดได้ง่ายขึ้น ส่วนผิวใบบริเวณตรงกลางยังคงถูกเจาะได้เช่นเดียวกับเมื่อหยดบนหลังใบ ผลการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue พบว่ามีการตายของเซลล์ โดยตำแหน่งและจำนวนของซุโอสปอร์ที่แทงผ่านเข้าไปในเซลล์ใบยางแตกต่างกันไปตามระดับความต้านทานของใบยางแต่ละพันธุ์ เมื่อนำชิ้นใบยางที่ถูกกระตุ้นด้วยซุโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมงมาย้อมด้วยสี trypan blue พบว่าในพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) แต่ละตำแหน่งที่ถูกเจาะมีซุโอสปอร์หลายตัวเกาะกลุ่มอยู่ซึ่งติดสีน้ำเงินเข้มอย่างชัดเจนและเซลล์บริเวณรอบๆย้อมติดสีน้ำเงินที่อ่อนกว่าบริเวณตำแหน่งที่ถูกเจาะ (รูปที่ 32) แสดงถึงการตายของเซลล์เมื่อถูกเจาะด้วยซุโอสปอร์และพบว่าตำแหน่งที่ถูกเจาะจะกระจายอยู่ทั่วไปตามชิ้นใบยาง ส่วนในพันธุ์ RRIT251 (ปานกลาง) พบว่าแต่ละตำแหน่งที่ถูกเจาะมีจำนวนซุโอสปอร์หลายตัวเช่นเดียวกับที่

พบในพันธุ์ RRIM600 ทำให้ทราบตำแหน่งที่ซุโอสปอร์เจาะบนชิ้นใบยางว่ามีน้อยกว่าในพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) และบางบริเวณพบเซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำเงินจางๆอยู่รอบตำแหน่งที่ถูกเจาะ (รูปที่ 32) ทำให้ทราบว่าบริเวณที่ซุโอสปอร์เจาะสามารถเกิดการตายของเซลล์ที่อยู่รอบๆรอยเจาะซึ่งบริเวณที่ถูกเจาะมีจำนวนน้อยกว่าที่พบในพันธุ์ RRIM600 แต่เมื่อสังเกตผลการทดลองในช่วงเวลาที่ 12 พบว่าในพันธุ์ RRIT251 เกิดการตายของเซลล์กระจายอยู่รอบๆตำแหน่งที่เจาะ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับที่เกิดในพันธุ์ RRIM600 แต่ในพันธุ์ RRIT251 มีขอบเขตพื้นที่ของเซลล์ตายชัดเจนมากกว่าพันธุ์ RRIM600 ต่อมาในพันธุ์ RRIC110 (ต้านทาน) พบว่าแต่ละตำแหน่งที่ถูกเจาะติดสีน้ำเงินเข้มเพียงหนึ่งจุดบริเวณปากใบ โดยที่มีการตายของเซลล์บริเวณรอบๆตำแหน่งที่ถูกเจาะอย่างมีขอบเขตที่ชัดเจนมากกว่าที่พบในพันธุ์ปานกลางและอ่อนแอ โดยมีความแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆคือในบางตำแหน่งพบว่าเกิดเป็นจุดสีดำซึ่งเป็นการแสดงถึงความสามารถในการกักบริเวณของเชื้อไว้ไม่ให้ลุกลามออกไปได้ (รูปที่ 32) รวมทั้งจำนวนซุโอสปอร์ที่เจาะบนใบยางพันธุ์ต้านทานยังพบน้อยกว่าในพันธุ์ปานกลางและอ่อนแอ ซึ่งเป็นการแสดงว่าในพันธุ์ต้านทานมีสิ่งกีดขวางทางกายภาพสูงกว่าพันธุ์ปานกลางและอ่อนแอตามลำดับ

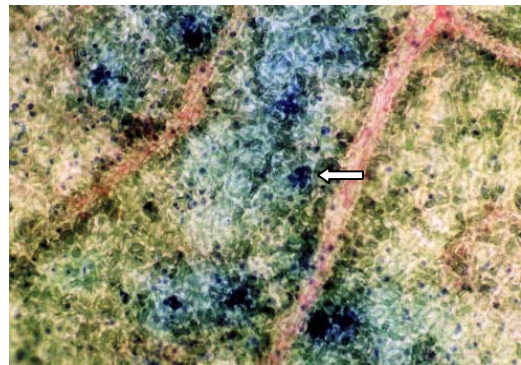
นอกจากการเจาะของซุโอสปอร์ที่เกิดขึ้นจากบริเวณปากใบแล้วยังพบว่าเกิดการเจาะของซุโอสปอร์บริเวณเส้นใบด้วย โดยพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์อย่างชัดเจนในช่วงเวลาที่ 24 การที่ซุโอสปอร์ใช้เวลาในการเจาะเส้นใบมากกว่าบริเวณปากใบอาจเนื่องมาจากเซลล์บริเวณเส้นใบมีความหนากว่าบริเวณเนื้อใบ จึงทำให้ความสามารถในการเจาะผ่านของซุโอสปอร์ต้องใช้เวลาที่นานกว่าซึ่งมีลักษณะของการเจาะแตกต่างกันตามระดับความต้านทานอย่างชัดเจน ดังนี้คือลักษณะจุดดำที่เกิดจากการเจาะด้วยซุโอสปอร์ของยางพันธุ์ RRIM600 มีการแผ่กระจายไปตามเส้นใบโดยไม่มีขอบเขตซึ่งเป็นลักษณะที่แสดงถึงการเกิดโรค ในขณะที่ยางพันธุ์ RRIT251 (ปานกลาง) ในช่วงเวลาที่ 24 เส้นใบเกิดเป็นจุดดำเล็กๆบริเวณที่ถูกเจาะด้วยซุโอสปอร์เท่านั้น แสดงว่าสามารถกักบริเวณของเชื้อเอาไว้ไม่ให้เกิดการแพร่กระจายได้ดีกว่าที่เกิดขึ้นใน RRIM600 ส่วนในพันธุ์ RRIC110 (ต้านทาน) ไม่พบตำแหน่งการถูกเจาะของซุโอสปอร์

เข้าไปในบริเวณเส้นใบ (รูปที่ 33) ซึ่งแสดงถึงสิ่งกีดขวางทางกายภาพที่หนากว่าในพันธุ์อื่นๆ

ตำแหน่งและจำนวนของชูโอสปอร์ที่เจาะบนใบยางบริเวณปากใบและเส้นใบของใบยางทั้งสามพันธุ์พบว่ามีความถี่ที่ถูกเจาะด้วยชูโอสปอร์แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างพันธุ์ด้านทาน, ปานกลาง และอ่อนแอ โดยเป็นสัดส่วนผกผันกับระดับความต้านทาน



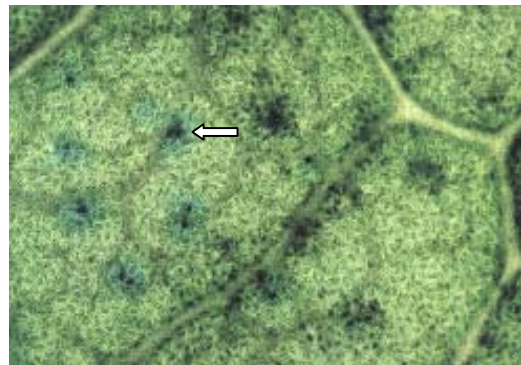
ชุดควบคุม



RRIM600

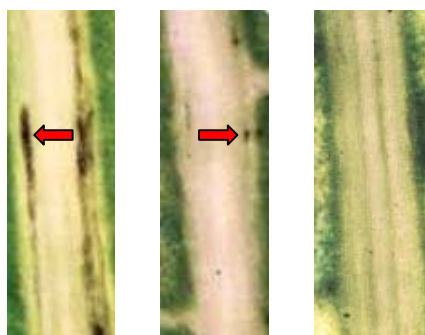


RRIT251



RRIC110

รูปที่ 32 การตายของเซลล์ ตำแหน่ง และ จำนวนของซุโสปอร์ที่เจาะบนใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 (อ่อนแอ), RRIT251 (ปานกลาง) และ RRIC110 (ต้านทาน) หลังจากปมด้วย ซุโสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซุโสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 8 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (กำลังขยาย 40 เท่า)



RRIM600

RRIT251

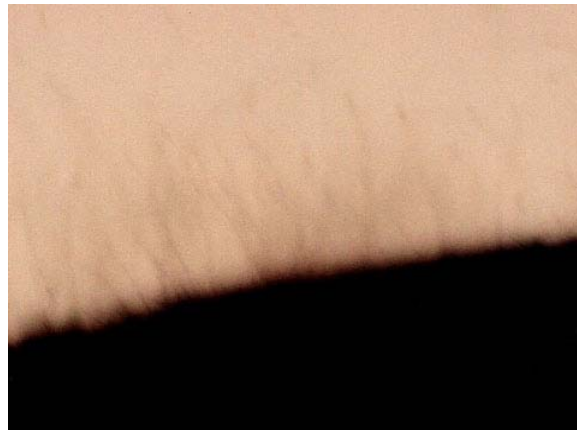
RRIC110

รูปที่ 33 แสดงการตายของเซลล์และตำแหน่งที่ถูกเจาะ ด้วยชูโสปอร์บนเส้นใบยางพันธุ์ต่างๆ (RRIM 600 (อ่อนแอ), RRIT251 (ปานกลาง) และ RRIC110 (ต้านทาน)) หลังจากบ่มใบยางพาราด้วยชูโสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ชูโสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)

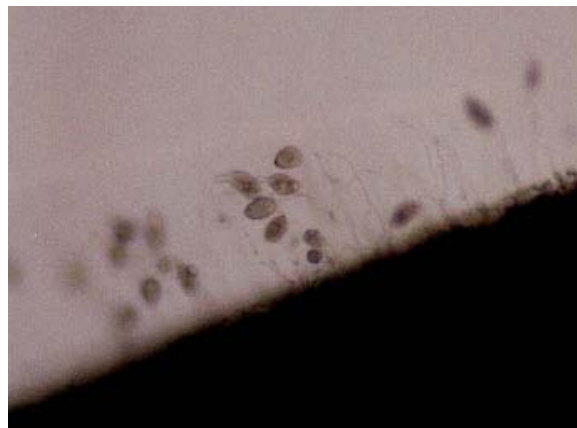
3.1.3 ผลการเปรียบเทียบลักษณะของสายรา และการสร้างสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ในพันธุ์ยางพาราที่มีความต้านทานแตกต่างกัน

เมื่อทำการทดสอบจำนวนของตำแหน่งที่ถูกเจาะด้วยชูโสปอร์ไบบี ยางพาราขนาด 1×1 เซนติเมตรแล้ว ซึ่งพบว่าจำนวนการถูกเจาะเพิ่มขึ้นตามลำดับความต้านทานที่ลดลง ดังนั้นจึงทำการศึกษาลักษณะของสายราและการสร้างสปอร์แรงเจียม เพื่อศึกษาความแตกต่างที่เกิดขึ้นในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน, ปานกลาง และอ่อนแอ โดยใช้พันธุ์ RRIC110, RRIT251 และ RRIM600 ที่มีระดับความต้านทานมาก, กลาง และน้อยตามลำดับ พบว่าลักษณะการงอกของสายราในชั่วโมงที่ 12 ในพันธุ์อ่อนแอมีสายราราวขนาดยาวและมีปริมาณสายราที่หนาแน่นอย่างสม่ำเสมอตลอดขอบใบยางที่เป็นรอยตัดมากกว่าที่พบในพันธุ์ปานกลาง ในขณะที่พันธุ์ต้านทานพบการงอกของสายราไม่สม่ำเสมอตลอดรอยตัด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wonder และคณะ (1998) ที่พบว่าหลังจากบ่มเชื้อ *P. palmivora* และ *P. nicotiana* ในรากส้มมีการสร้างสายราขึ้นในชั้น cortex โดยพบในส้มพันธุ์อ่อนแอ (*Citrus aurantifolium*) มากกว่าในส้มพันธุ์ต้านทาน (*Poncirus trifoliata*)

จากลักษณะการงอกของสายราเป็นการแสดงผลที่สัมพันธ์กับการศึกษาจำนวนการถูกเจาะด้วยชูโสปอร์ซึ่งปริมาณสายราที่พบแปรผันตรงกับจำนวนการถูกเจาะ โดยในพันธุ์อ่อนแอมีตำแหน่งที่ถูกเจาะบริเวณผิวใบและปริมาณสายราที่เกิดขึ้นบริเวณรอยตัดมากกว่าที่พบในพันธุ์ปานกลางและต้านทาน และจากการที่พบว่าในพันธุ์ต้านทานมีจำนวนชูโสปอร์ที่เจาะผ่านผนังเซลล์ของใบได้น้อยกว่าและลูกกลมได้น้อยกว่า แสดงว่าถึงแม้ดสิ่งกีดขวางทางกายภาพของผิวใบโดยวิธีการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ก็ยังมีความแตกต่างของผนังเซลล์ของใบยางพาราแต่ละพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อบ่มใบยางพาราด้วยชูโสปอร์ผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่าในพันธุ์อ่อนแอเริ่มมีการสร้างสปอร์แรงเจียมจำนวนมากกว่าพันธุ์ปานกลาง ในขณะที่พันธุ์ต้านทานมีลักษณะของสายราที่ยาวหักงอไม่สมบูรณ์ และแทบไม่พบสปอร์แรงเจียมเลย (รูปที่ 34)



RRIC110



RRIT251



RRIM600

รูปที่ 34 การสร้างสายราและสปอร์แรงเจียมหลังจากบ่มใบยางพาราพันธุ์ RRIC110, RRIT251 และ RRIM600 ด้วยเชื้อสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิตรของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)

การที่สาหร่ายในพันธุ์ด้านทานมีลักษณะหงิกงอและมีการสร้างสปอร์แรงเจียมน้อยอาจเป็นผลจากการมีสคอพอลิตินตรงตำแหน่งที่มีการเจาะของชูโอสปอร์และสคอพอลิตินเหล่านี้ได้ถูกปลดปล่อยลงสู่น้ำที่แช่ขึ้นใบยางจนส่งผลกระทบต่อการงอกของสาหร่าย จากรายงานโครงการของพิรุณรัตน์ (2545) เรื่องผลของสปอร์และอิลิซิตินของ *Phytophthora* spp. ต่อใบยางพารา โดยสังเกตจากวิธี Scanning Electron Microscope ยังสนับสนุนได้ว่าในชั่วโมงที่ 24 พันธุ์ด้านทานมีการแตกหลุดของผนังเซลล์ของชูโอสปอร์และสาหร่าย ในขณะที่ชูโอสปอร์และสาหร่ายบนใบยางพันธุ์อ่อนแอยังมีสภาพดี รวมทั้งจากการทดลองของนิอร (2546) นักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาชีวเคมี ในที่ปรึกษาของศาสตราจารย์ ดร.นันทา เขิงเขาว์ ได้ทำการทดลองโดยการนำสาหร่ายและสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* มาใส่ลงในสารละลายสคอ-พอลิตินที่เจือจางความเข้มข้นเป็น 0.2, 1, 2, 5 และ 25 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของสคอพอลิตินในช่วง 2-5 ไมโครโมลาร์เริ่มมีการยับยั้งการสร้างสาหร่ายและสาหร่ายที่สร้างใน 12 ชั่วโมงแรกมีลักษณะหงิกงอ แต่หลังจาก 12 ชั่วโมงสาหร่ายมีสภาพดีขึ้นและสร้างสปอร์แรงเจียมได้เล็กน้อย เมื่อใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินสูงขึ้นคือ 25 ไมโครโมลาร์พบว่าสาหร่ายมีลักษณะหงิกงอจนถึงชั่วโมงที่ 24 จึงจะมีสภาพดีขึ้นและมีการสร้างสปอร์แรงเจียมในเวลาต่อมา (จากทุกความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ใช้ในการทดลองเมื่อเปลี่ยนจากสารละลายสคอพอลิตินเป็นน้ำกลั่นปลอดเชื้อสามารถเกิดการสร้างสาหร่ายได้ใหม่โดยมีสภาพที่สมบูรณ์ไม่หงิกงอพร้อมที่จะสร้างสปอร์แรงเจียมได้ต่อไป) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าปริมาณของสคอพอลิตินในน้ำที่แช่ขึ้นใบยางพันธุ์ด้านทานและปานกลางมีจำนวนมากเพียงพอที่จะมีผลต่อการงอกของสาหร่ายและการสร้างสปอร์แรงเจียม ในขณะที่พันธุ์อ่อนแอมีปริมาณของสคอพอลิตินไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการงอกของสาหร่ายและการสร้างสปอร์แรงเจียม สังเกตได้จากเมื่อมีการลดปริมาณสคอพอลิตินลงโดยใช้วิธีเพิ่มความถี่ในการเปลี่ยนน้ำที่แช่ใบยางเป็นทุก 1 ชั่วโมงจากเดิมทุก 4 ชั่วโมง หรือจากการแช่ขึ้นใบยางในน้ำปริมาตร 3 มิลลิลิตรเปลี่ยนเป็น 15 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการลดความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่จะสัมผัสกับสาหร่ายจนเกิดการยับยั้งการสร้างสาหร่ายและสปอร์แรงเจียม พบว่าสาหร่ายในพันธุ์ด้านทานและ

ปานกลางจะมีสภาพดีขึ้นและเริ่มมีการสร้างสปอร์แรงเจียมขึ้นมาในชั่วโมงที่ 24 ได้เช่นเดียวกับในพันธุ์อ่อนแอ และนอกจากนี้ยังพบว่าหากนำชิ้นใบยางที่มีการสร้างสปอร์แรงเจียมอยู่รอบๆขอบใบยางอยู่แล้วไปแช่ในสคอพอลิตินความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.0, และ 1.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 0.25-0.50 มิลลิโมลาร์ สปอร์แรงเจียมเริ่มมีการหลุดออก แต่หลังจากทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงสายรากก็สามารถกลับมาสร้างสปอร์แรงเจียมได้ใหม่ ความเข้มข้นที่สปอร์แรงเจียมหลุดออกและไม่มีการสร้างใหม่อีก (recover) คือที่ความเข้มข้น 1.0 – 1.5 มิลลิโมลาร์ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถแน่ใจได้ว่าปริมาณสคอพอลิตินมีผลต่อสายรากและสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* จริงและแปรผันตรงกับปริมาณสคอพอลิตินอีกด้วย เช่นเดียวกับการสร้างสคอพอลิตินที่เกิดจากการบ่มใบยางพันธุ์ต้านทานด้วย *Microcyclus ulei* สามารถยับยั้งการงอกสายรากและการสร้าง conidium ของเชื้อ *M. ulei* ได้ โดยแปรผันตามระดับความเข้มข้นของสคอพอลิติน (Gracia et al., 1995 b) รวมทั้งสคอพอลิตินที่เกิดจากการบ่มใบยางพันธุ์ต้านทาน (GT1) ด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* ก็สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของสายราก *C. cassiicola* ได้เช่นเดียวกัน (Breton et al., 1997 b)

3.1.4 ผลการหาวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สคอพอลิตินในใบยางพาราจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์

3.1.4.1 ผลการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่เกิดจากการบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์จากวิธีการหยดบนหลังใบ

Churngchow และ Rattarasarn (2001) รายงานว่าเมื่อทำการทดสอบใบยางที่อยู่ในชั้นเพลสลาต ด้วยวิธีการหยดซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ (5×10^5 , 5×10^6 และ 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร) บนหลังใบยาง และวิเคราะห์หาปริมาณสคอพอลิตินที่เวลา 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์สูงสุด (5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร) สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ยางที่ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอได้ชัดเจนที่สุดทั้งในด้านปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิติน ซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นระดับปานกลางในการทดลองนี้ ถึงแม้จะมีปริมาณการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่น้อยและช้ากว่าที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรแต่ก็ยังสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอได้เช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5×10^5 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ยางที่ต้านทานกับพันธุ์ยางที่อ่อนแอได้อย่างมีนัยสำคัญ

จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรเพราะสามารถแสดงความแตกต่างของความเข้มข้นและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอได้มากกว่าที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์อื่นๆ จากการวิเคราะห์หาสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในน้ำบริเวณที่หยดเชื้อทุก 4 ชั่วโมงจนถึง 36 ชั่วโมงโดยเปลี่ยนน้ำกลั่นปลอดเชื้อไปแทนที่ทุกครั้ง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง การสังเคราะห์สคอพอลิตินในใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 มีการสร้างสคอพอลิตินได้สูงสุด (2.88 ± 0.16 ไมโครโมลาร์) มากกว่าใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (1.00 ± 0.06 ไมโครโมลาร์) ประมาณ 3 เท่า ต่อมาระดับการ

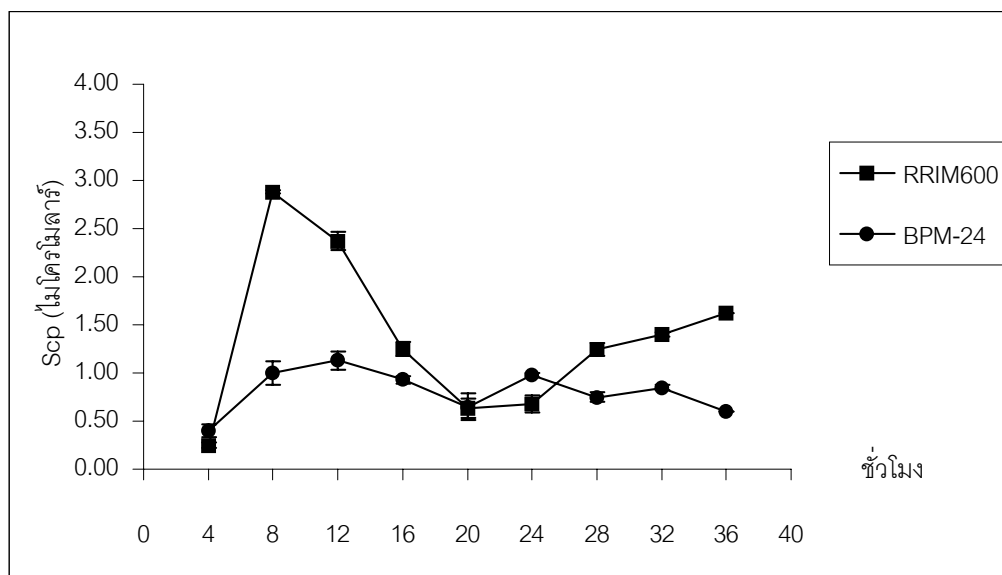
สร้างสคอพอลิตินของ RRIM600 เริ่มลดลงในช่วงโม่งที่ 12 และมีแนวโน้มสูงขึ้นอีกในช่วงโม่งที่ 36 แต่ไบยางพาราพันธุ์ BPM-24 จะมีการสังเคราะห์ของสคอพอลิตินค่อนข้างต่ำ และคงที่ตั้งแต่ช่วงโม่งที่ 16-36 ส่วนในชุดควบคุมไม่พบการสังเคราะห์สคอพอลิติน (ตารางที่ 8 และรูปที่ 35)

จากผลการทดลองให้ผลตรงข้ามกับที่เคยมีรายงานไว้ซึ่งอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของอายุไบยางที่นำมาใช้ในการทดลองเพราะ Churngchow และ Rattarasarn (2001) ได้เลือกใช้ไบยางที่อยู่ในชั้นเพลลาดเป็นใบที่มีอายุ 8-10 วัน ลักษณะหลังใบมีสีม่วงแดงซึ่งต้องอาศัยความชำนาญในการคัดเลือกใบสูง ส่วนการทดลองนี้ผู้วิจัยจำเป็นต้องใช้ใบที่มีอายุมากกว่าชั้นเพลลาดเพราะต้องทำการทดสอบการเกิดนี้โครซีสในวันเดียวกันด้วย ทั้งนี้เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของข้อมูลอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม สาเหตุที่ต้องใช้ใบที่มีอายุมากกว่าเพราะถ้าหลังใบมีสีเขียวทำให้สามารถสังเกตเห็นขอบเขตของรอยไหม้ได้ชัดเจนกว่าใบที่มีสีม่วงแดง และการที่ปริมาณสคอพอลิตินของพันธุ์ BPM-24 ในใบสีเขียวน้อยกว่าในใบสีม่วงแดงเนื่องมาจากในใบสีเขียวมีสิ่งกีดขวางทางกายภาพสูงกว่า

ตารางที่ 8 ปริมาณการสังเคราะห์สคอพอลิติน ที่เวลาต่างๆในใบยางพันธ์ BPM-24 (ด้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) เมื่อถูกบ่มด้วยเชื้อโฮสเปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 เชื้อโฮสเปอร์ ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากวิธีการหยดบนหลังใบ

เวลา (ชั่วโมง)	Scp ที่ถูกสร้างขึ้นในใบยางพันธ์ BPM-24 และ RRIM600 (ไมโครโมลาร์)	
	BPM-24	RRIM600
4	0.40 ± 0.08	0.25 ± 0.08
8	1.00 ± 0.06	2.88 ± 0.16
12	1.13 ± 0.18	2.37 ± 0.26
16	0.93 ± 0.16	1.25 ± 0.08
20	0.65 ± 0.13	0.63 ± 0.12
24	0.98 ± 0.03	0.68 ± 0.07
28	0.75 ± 0.13	1.25 ± 0.17
32	0.85 ± 0.26	1.40 ± 0.12
36	0.60 ± 0.10	1.62 ± 0.17

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 35 เปรียบเทียบการสังเคราะห์สคอพอลิติน ที่เวลาต่างๆในใบยางพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) และพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ) เมื่อถูกบ่มด้วยเชื้อโฮสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 โฮสปอร์ต่อมิลลิเมตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากวิธีการหยดบนหลังใบ

3.1.4.2 ผลการวิเคราะห์หาสคอพอลิตินหลังจากการบ่มใบยางด้วยเชื้อโฮสปอร์จากวิธีการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc)

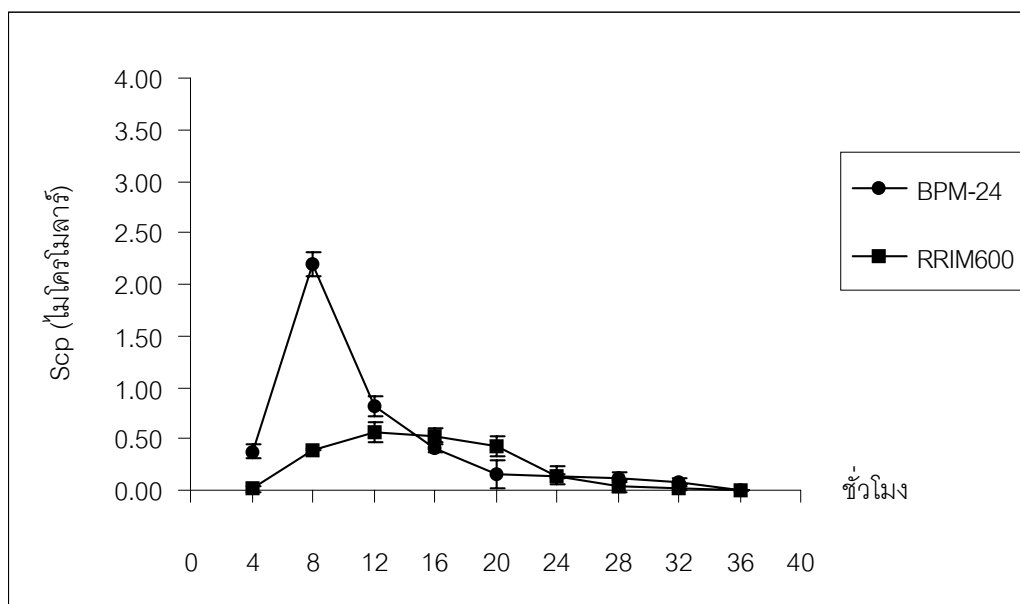
ผู้วิจัยเลือกทดสอบการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆเปรียบเทียบกับวิธีการหยดบนหลังใบเพราะคาดว่าจะการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตรจะสามารถช่วยลดสิ่งกีดขวางทางกายภาพของใบ เนื่องจากใบที่ถูกตัดทำให้เกิดบาดแผลทั้งสี่ด้านเชื้อโฮสปอร์จึงสามารถเจาะผ่านเข้าไปในเซลล์ใบยางพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก จากผลการทดลองพบว่าในชั่วโมงที่ 8 ใบยางพันธุ์ BPM-24 สามารถสร้างสคอพอลิตินได้สูงสุด (2.19 ± 0.12 ไมโครโมลาร์) โดยสร้างได้สูงกว่าใบยางพันธุ์ RRIM600 (0.40 ± 0.02 ไมโครโมลาร์) ประมาณ 5 เท่า จากนั้นชั่วโมงที่ 12 ระดับการสร้างสคอพอลิตินของใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 จะเริ่มลดลงเรื่อยๆ (ตารางที่ 9 และ รูปที่ 36) จะเห็นได้ว่าเมื่อกระตุ้นใบยางพาราใบเดียวกันด้วยวิธีที่ต่างกัน การสร้างสคอพอลิตินในพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) ที่สร้างจากการกระตุ้นโดยวิธีการหยดบนหลังใบจะมีความเข้มข้นต่ำกว่าการกระตุ้น

ด้วยวิธีตัดเป็นชิ้น (leaf disc) แสดงว่าเมื่อลดสิ่งกีดขวางทางกายภาพให้พันธุ์ต้านทานแล้ว ทำให้ชูโอสปอร์สามารถเจาะเข้าไปในพันธุ์ต้านทานได้เต็มที่จึงทำให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นของพันธุ์ต้านทาน BPM-24 มีจำนวนมากขึ้นและสามารถปล่อยสคอพอลิตินออกมาสู่ภายนอกได้ง่ายขึ้น จึงทำให้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินในพันธุ์ต้านทานมากกว่าในพันธุ์อ่อนแอ นอกจากนี้ความเข้มข้นของชูโอสปอร์ที่ใช้ในวิธีการหยดน้อยเกินไปจึงทำให้เกิดปฏิกิริยา incompatible ทั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยเลือกใช้ใบยางที่มีอายุมากกว่าที่ Churngchow และ Rattarasarn (2001) ได้รายงานไว้จึงทำให้เซลล์ถูกเจาะน้อยกว่า นอกจากนี้สคอพอลิตินเป็นสารปฏิชีวนะที่ใบยางพาราพันธุ์ต้านทานสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทำให้เชื้อราไม่ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียง เป็นผลให้เซลล์ไม่ถูกกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินจึงทำให้ปริมาณสคอพอลิตินลดลง ในขณะที่ใบยางพันธุ์อ่อนแอสร้างสคอพอลิตินได้ในปริมาณที่น้อยกว่าจึงไม่สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อราไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ ทำให้เซลล์ข้างเคียงถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราให้มีการสร้างสคอพอลิตินต่อไปเรื่อยๆ ส่วนในชุดควบคุมไม่พบการสร้างสคอพอลิติน

ตารางที่ 9 การสังเคราะห์สคอพอลิตินที่เวลาต่างๆในใบยางพันธ์ BPM-24 (ด้านทาน) และ RRIM 600 (อ่อนแอ) เมื่อถูกบ่มด้วยสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากวิธีการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc)

เวลา (ชั่วโมง)	Scp ที่ถูกสร้างขึ้นในใบยางพันธ์ BPM-24 และ RRIM600 (ไมโครโมลาร์)	
	BPM-24	RRIM600
4	0.38 ± 0.07	0.02 ± 0.03
8	2.19 ± 0.12	0.40 ± 0.02
12	0.82 ± 0.10	0.57 ± 0.09
16	0.40 ± 0.04	0.53 ± 0.08
20	0.16 ± 0.14	0.43 ± 0.10
24	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.09
28	0.12 ± 0.05	0.04 ± 0.07
32	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.02
36	0	0

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลอง \pm SD)



รูปที่ 36 เปรียบเทียบการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่เวลาต่างๆในใบยางพันธุ์ BPM-24 (ด้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) เมื่อถูกบ่มด้วยชูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ชูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากวิธีการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้งสองวิธีผู้วิจัยเลือกใช้วิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ ในการคัดเลือกพันธุ์ยางที่ด้านทาน เพื่อไม่ให้มีสิ่งกีดขวางทางกายภาพ (ความหนาบางของใบ) การที่มีสิ่งกีดขวางทางกายภาพทำให้ปริมาณของชูโอสปอร์ที่จะไปกระตุ้นเซลล์น้อยกว่าความเป็นจริง ในพันธุ์ที่มีสิ่งกีดขวางทางกายภาพต่ำ มีชูโอสปอร์ที่จะไปกระตุ้นเซลล์มากกว่า ทำให้จำนวนของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินมีจำนวนแตกต่างกันเป็นผลให้การสร้างสคอพอลิตินของพันธุ์ที่มีสิ่งกีดขวางสูงมีความเข้มข้นน้อยกว่าความเป็นจริงที่พืชสามารถสร้างได้ หากจำนวนชูโอสปอร์เข้าไปกระตุ้นในพันธุ์ที่มีสิ่งกีดขวางสูงมีจำนวนมากขึ้น ความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นก็จะมากขึ้นด้วย ซึ่งวิธีหยดบนหลังใบจะทำให้สิ่งกีดขวางทางกายภาพของพันธุ์อ่อนแอและด้านทานต่างกัน หรือกล่าวได้ว่าใบยางพันธุ์อ่อนแอสร้างสคอพอลิตินด้วยจำนวนเซลล์ที่มากกว่าพันธุ์ด้านทานหลายเท่า และนอกจากนี้วิธีการตัดใบเป็นชิ้นยังทำให้ลดข้อจำกัดเรื่องจำนวนใบที่สามารถใช้ในการทดลอง (หมายเหตุ : ใน 1 ช่อมีใบในชั้นเพลลาดประมาณ

6 ใบเท่านั้น) และวิธีการหยดบนหลังใบต้องใช้ความชำนาญเฉพาะตัวในการเลือกใบสูง เนื่องจากถ้าเลือกใบที่ไม่ใช่ชั้นเพลสดมาใช้ในการทดลองอาจคลาดเคลื่อนได้ เพราะใบยางพาราพันธุ์ใดที่ผิวใบหนากว่าเช่นใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 หนากว่าใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 จะทำให้เข้าใจว่ามีการสร้างสคอพอลิตินที่น้อยกว่า

3.1.5 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เหมาะสม สำหรับการทดลองด้วยวิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc)

จากการทดลองที่ 2.1.4 ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตรในการทดลอง ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาทางด้านสิ่งกีดขวางทางกายภาพและการขาดแคลนใบยางพาราที่จะใช้ในการทดลอง จากนั้นจึงหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ดังต่อไปนี้คือ 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 และ 1×10^8 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร มาทดลองกับพันธุ์ RRIC110 ที่เป็นตัวแทนพันธุ์ด้านทาน และใช้พันธุ์ RRIM600 เป็นตัวแทนพันธุ์อ่อนแอ โดยจะมีการสังเกตปริมาณการเจาะของซูโอสปอร์, ลักษณะของสายราและการสร้างสปอร์แรงเฉยไปพร้อมๆกัน พบว่าที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 5×10^6 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นจากพันธุ์ยางทั้งสองมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งในชั่วโมงที่ 8 พันธุ์ด้านทานมีการสร้างสคอพอลิตินปริมาณมากกว่าพันธุ์อ่อนแอเล็กน้อย หลังจากนั้นระดับการสร้างสคอพอลิตินในพันธุ์อ่อนแอก็จะสร้างขึ้นมาได้พอกๆกับในพันธุ์ด้านทาน จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 มีแนวโน้มที่พันธุ์ด้านทานจะมีการสร้างสคอพอลิตินได้สูงกว่าในพันธุ์อ่อนแอ (รูปที่ 37ก) และเมื่อศึกษาลักษณะของสายราและการสร้างสปอร์แรงเฉยไปพร้อมๆกัน พบว่าในพันธุ์ด้านทานมีการเกิดสายราและการสร้างสปอร์แรงเฉยน้อยกว่าในพันธุ์อ่อนแอมาก (รูปที่ 38) ทั้งนี้เนื่องจากสคอพอลิตินที่ถูกสร้างในพันธุ์ด้านทานต่อหนึ่งเซลล์ใบยางมีความเข้มข้นมากพอในการยับยั้งการลุกลามของเชื้อได้ แม้ว่าความเข้มข้นรวมของสคอพอลิตินในน้ำที่วิเคราะห์ได้จะมีค่าใกล้เคียงกับที่ปล่อยออกมาจากใบยางพันธุ์อ่อนแอ และการที่แนวโน้มการสร้างสคอพอลิตินของพันธุ์ RRIC110 มีค่าสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 48 อาจเนื่องมาจากเกิดการตอบสนอง

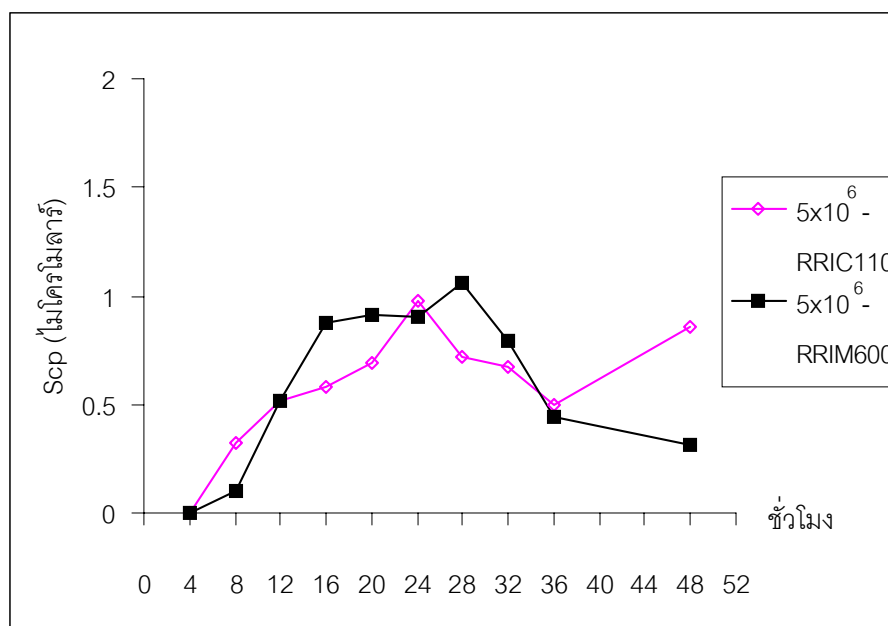
แบบไฮเปอร์เซนซิทีฟซึ่งเซลล์ที่ถูกซุโอสปอร์เจาะสามารถส่งสัญญาณไปยังเซลล์ข้างเคียงเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินได้ ทำนองเดียวกับการเกิด SAR บนใบยาสูบ ใบบนที่ได้รับสัญญาณ SAR ในใบยาสูบใบล่างที่ถูกกระตุ้นจาก PBZ และ BIT ให้สร้างสัญญาณ SAR (Nakashita. *et al.*, 2002) ในขณะที่เซลล์ของพันธุ์ RRIM600 เมื่อถูกเจาะด้วย ซุโอสปอร์มีการผลิตสคอพอลิตินต่อหนึ่งเซลล์ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าจึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสายรา ทำให้เกิดการลุกลามได้มากกว่าในพันธุ์ต้านทาน นอกจากนี้ยางพาราพันธุ์อ่อนแอยังมีโอกาสได้รับการกระตุ้นครั้งที่สอง (reinfection) เพราะในชั่วโมงที่ 24 มีการปลดปล่อยซุโอสปอร์ออกจากสปอร์แรงเจียมที่ถูกสร้างขึ้นจากสายราที่เจริญบนใบยางพาราที่ใช้ในการทดลอง (รูปที่ 38)

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซุโอสปอร์เป็น 1×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการสร้างสคอพอลิติน, ลักษณะของสายราและการสร้างสปอร์แรงเจียมคล้ายกับการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ 5×10^6 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 39) แต่สคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในชั่วโมงที่ 8 และ 12 มีความเข้มข้นมากกว่าที่ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ 5×10^6 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 37ข และ 39) แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่ถูกเจาะมากกว่า ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ถูกเจาะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของซุโอสปอร์

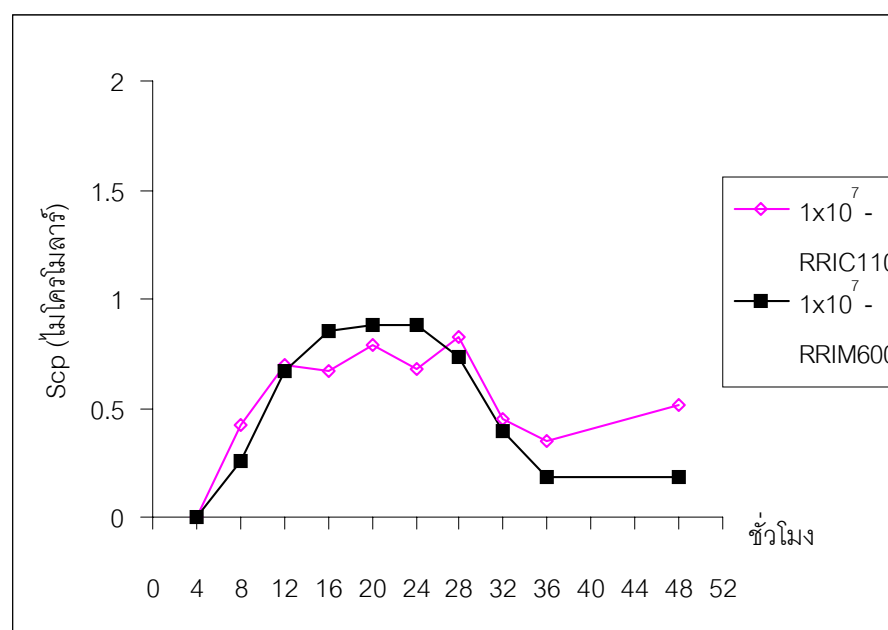
ที่ความเข้มข้น 5×10^7 และ 1×10^8 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร สคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นมีความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างพันธุ์ต้านทาน (RRIC110) และอ่อนแอ (RRIM600) ในชั่วโมงที่ 8 พันธุ์ต้านทานมีการสร้างสคอพอลิตินในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอประมาณ 4 และ 5 เท่าตามลำดับ และสูงกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของซุโอสปอร์ 5×10^6 และ 1×10^7 ซุโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 37ค และ 37ง) แสดงว่าจำนวนเซลล์ที่ถูกเจาะมีมากขึ้นในพันธุ์ต้านทาน ขณะที่ในพันธุ์อ่อนแอเองถึงแม้จะมีจำนวนเซลล์ที่เจาะมากกว่า แต่ความเข้มข้นสคอพอลิตินที่ตรวจวัดได้กลับมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากัน ทั้งนี้เมื่อใช้ความเข้มข้นของซุโอสปอร์มากขึ้นในการทดลองกับใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ทำให้เกิดปฏิกิริยา compatible ได้อย่างรวดเร็วจนทำให้เกิดการแตกของเซลล์จำนวนมากจึงมีการปลดปล่อยสารชนิดอื่น ๆ มาพร้อมกับสคอพอลิตินด้วย ซึ่ง

อาจเป็นเอนไซม์ที่พืชใช้ในการย่อยสลายสคอพอลิตินโดยการใส่สคอพอลิตินเป็นสับเสตรททำให้ปริมาณสคอพอลิตินต่ำกว่าความเป็นจริง เอนไซม์ Scp-peroxidase (ใส่สคอพอลิตินเป็นสับเสตรท) ซึ่งได้เคยถูกตรวจพบในใบยางหลังจากปมใบยางด้วยเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Breton *et al.*, 1997b) แม้แต่ในพันธุ์ RRIC110 การสร้างสคอพอลิตินลดน้อยลงจาก 1.4 ไมโครโมลาร์ เป็น 0.9 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปลี่ยนจากความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 5×10^7 เป็น 1×10^8 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 37ค และ 37ง) นั้นแสดงว่าที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 1×10^8 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร พันธุ์ RRIC110 เริ่มมีการตอบสนองแบบ compatible เช่นกัน นอกจากนี้พบว่าลักษณะของสายราที่ถูกสร้างขึ้นในพันธุ์ RRIC110 มีลักษณะคดงอและยืดยาวออกไปอย่างไม่เป็นระเบียบ ที่ความเข้มข้นของ ซูโอสปอร์ 5×10^7 และ 1×10^8 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 40 และ 41) รวมทั้งพบว่าการสร้างสปอร์แรงเฉยมต้องใช้เวลามากขึ้น (ชั่วโมงที่ 48) ซึ่งนานกว่าการสร้างสปอร์แรงเฉยมจากการทดลองด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^6 และ 1×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (ชั่วโมงที่ 24) การสร้างสปอร์แรงเฉยมที่ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 1×10^8 มีจำนวนน้อยกว่าที่ 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องมาจากใบยางพาราถูกทำลาย และทำให้ปริมาณของสเตอรอลจากใบยางพาราลดลงจนปริมาณไม่เพียงพอต่อการที่ซูโอสปอร์จะนำมาใช้ในการสร้างสปอร์แรงเฉยม

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรในการทดลองกับวิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ สำหรับการศึกษาปริมาณการสังเคราะห์สคอพอลิตินต่อไปเพราะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม และสามารถแยกความแตกต่างในการสร้างสคอพอลิติน, การเกิดสายราและการสร้างสปอร์แรงเฉยมระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอได้ชัดเจนมากที่สุด

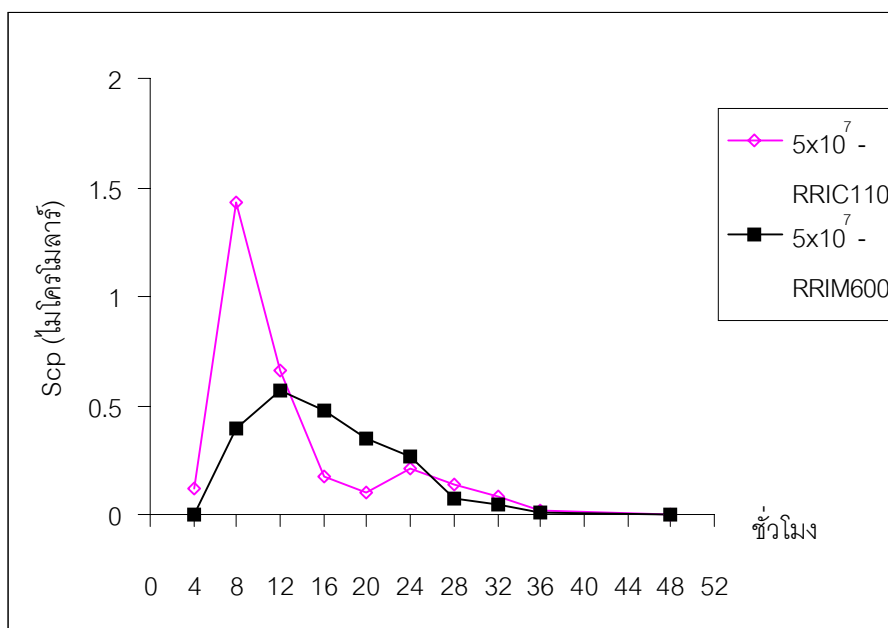


ก

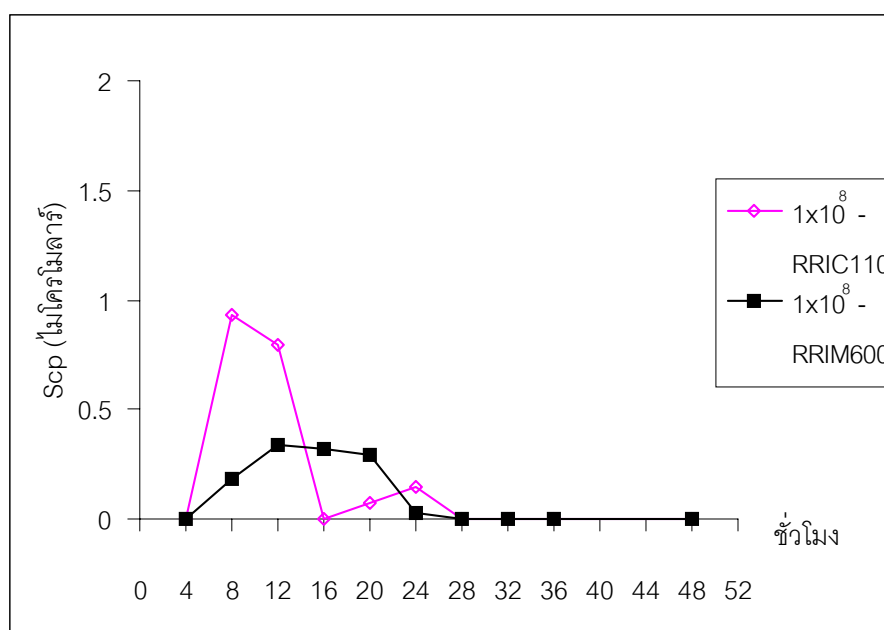


ข

- รูปที่ 37 เปรียบเทียบการสังเคราะห์สคอพอลิตินบนใบยางพาราขนาด 1×1 เซนติเมตรของพันธุ์ RRIC110 (ต้านทาน) และ RIM600 (อ่อนแอ) จากการกระตุ้นด้วยเชื้อสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง
- ก. ความเข้มข้นของเชื้อสปอร์ 5×10^6 เชื้อสปอร์ต่อมิลลิลิตร
- ข. ความเข้มข้นของเชื้อสปอร์ 1×10^7 เชื้อสปอร์ต่อมิลลิลิตร



ค

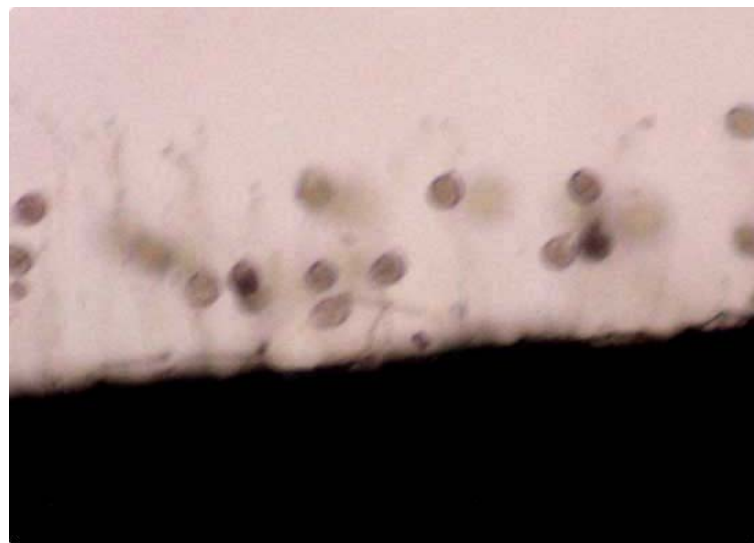
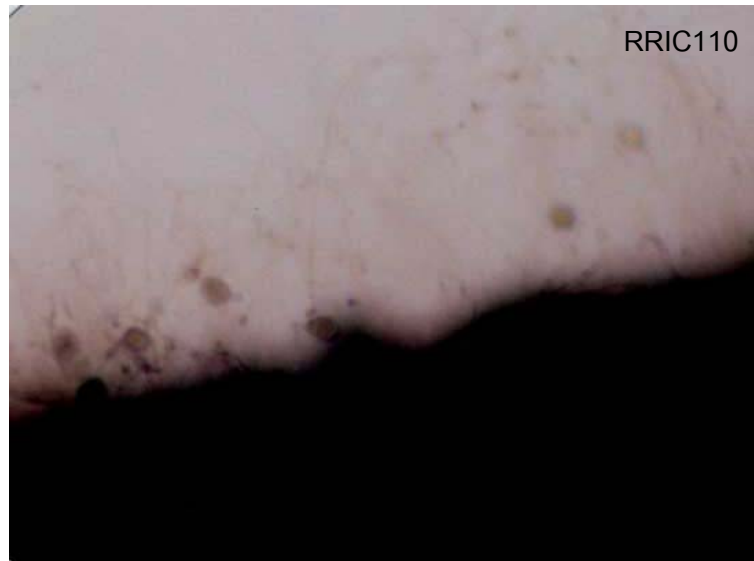


ง

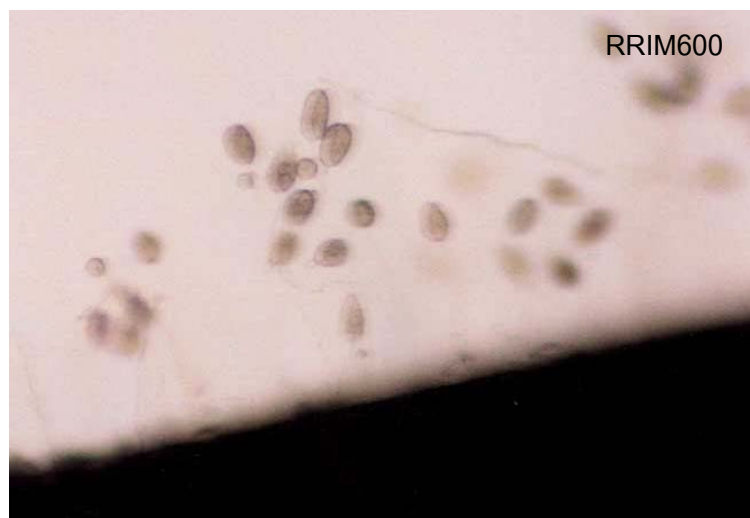
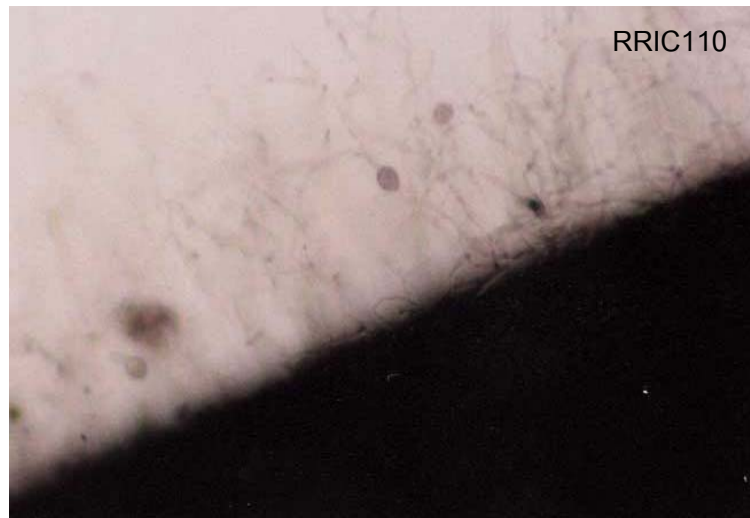
รูปที่ 37 (ต่อ) เปรียบเทียบการสังเคราะห์สคอพอลิตินบนใบยางพาราขนาด 1×1 เซนติเมตรของพันธุ์ RRIC110 (ต้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) จากการกระตุ้นด้วยสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง

ค. ความเข้มข้นของสปอร์ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

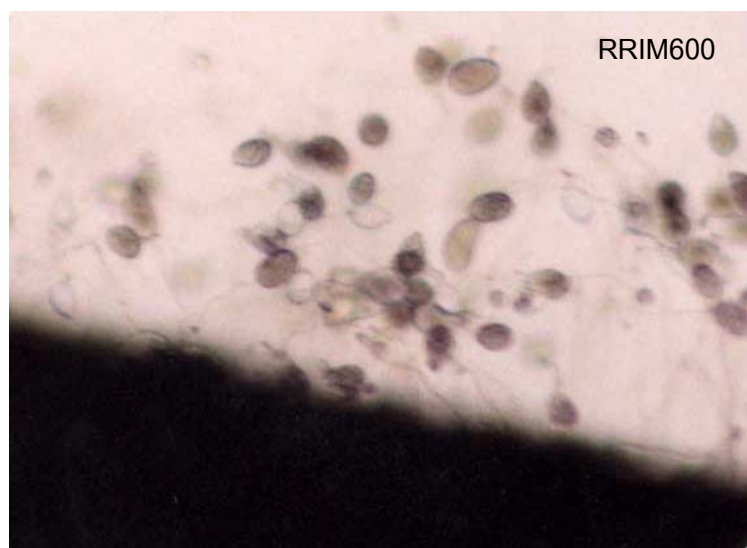
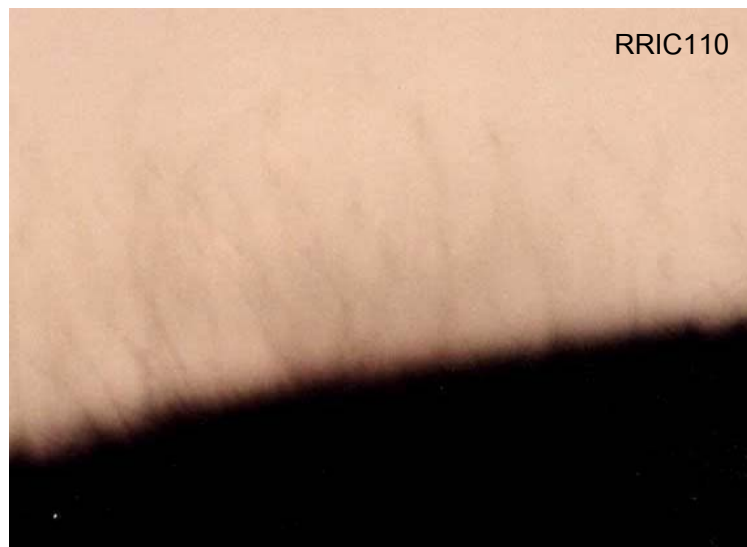
ง. ความเข้มข้นของสปอร์ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร



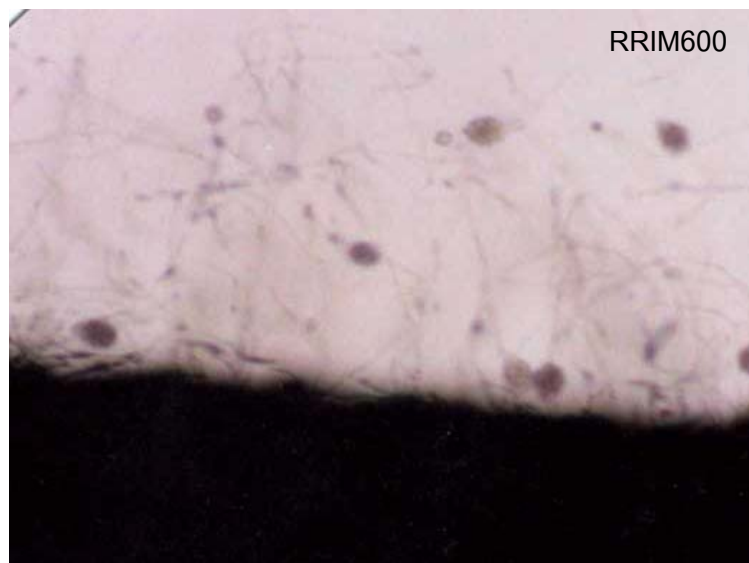
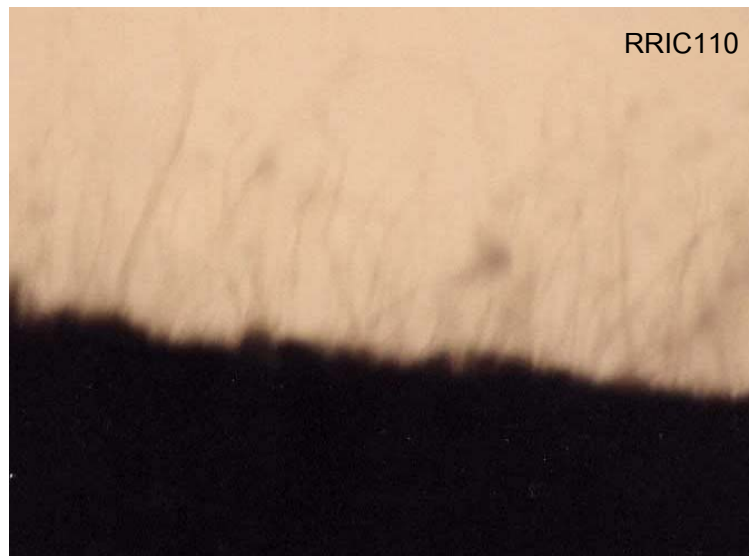
รูปที่ 38 การสร้างสลายาและการเกิดสปอร์แรงเจียม หลังจากบ่มใบยางพันธุ์ RRIC110 (รูปบน) RRIM600 (รูปล่าง) ด้วยเชื้อสปอร์ความเข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)



รูปที่ 39 การสร้างสายราและการเกิดสปอร์แรงเจียม หลังจากบ่มใบยางพันธุ์ RRIC110 (รูปบน) และ RRIM600 (รูปล่าง) ด้วยเชื้อสปอร์ความเข้มข้น 1×10^7 เชื้อสปอร์ต่อมิลลิเมตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)



รูปที่ 40 การสร้างสายราและการเกิดสปอร์แรงเจียม หลังจากบ่มใบยางพันธุ์ RRIC110 (รูปบน) และ RRIM600 (รูปล่าง) ด้วยชุดสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ชุดสปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)

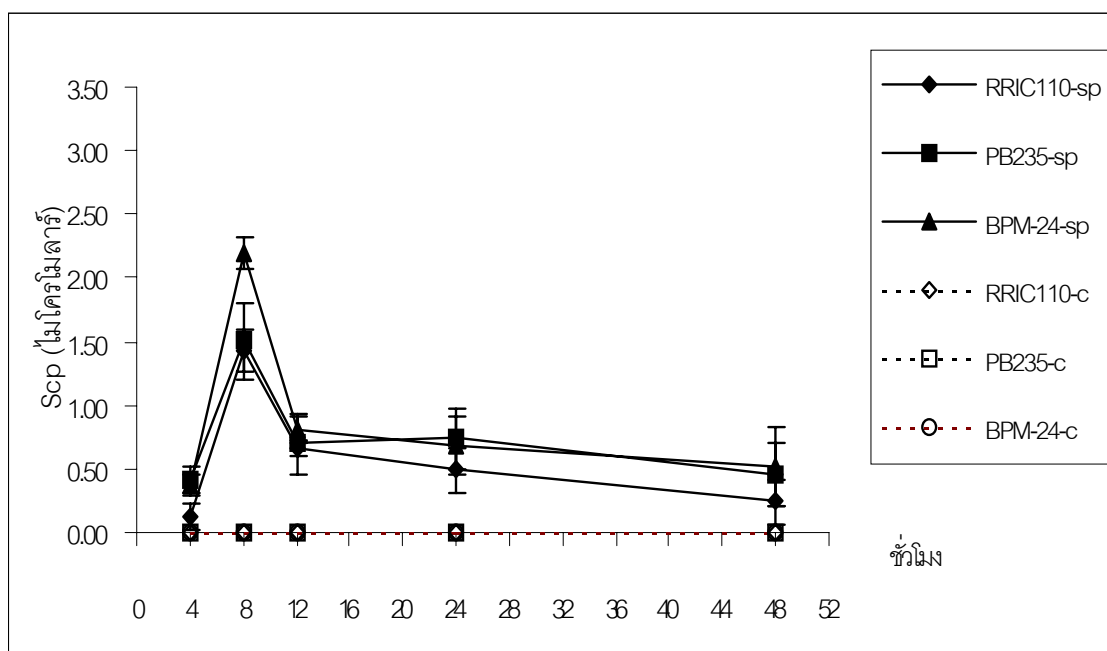


รูปที่ 41 การสร้างสายราและการเกิดสปอร์แรงเจียม หลังจากป่มไปยางพันธุ์ RRIC110 (รูปบน) และ RRIM600 (รูปล่าง) ด้วยสปอร์ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)

3.1.6 ผลการสังเคราะห์สคอพอลิตินเมื่อกระตุ้นไบบางพารา ด้วยซูโอสปอร์ ปอร์ ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

จากผลการทดลองข้อ 3.1.5 จึงใช้ซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรมาศึกษาการสร้างสคอพอลิตินเพื่อนำมาแยกความต้านทานต่อโรคระหว่างกลุ่มต้านทานและอ่อนแอ จากผลการทดลองสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ต้านทานและปานกลางออกจากกลุ่มพันธุ์อ่อนแอได้ชัดเจน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ปานกลางออกจากกลุ่มต้านทานได้ โดยพบว่าในชั่วโมงที่ 8 ซึ่งมีการสร้างสคอพอลิตินได้สูงสุดในกลุ่มพันธุ์ต้านทานนั้นมีปริมาณมากกว่ากลุ่มอ่อนแอประมาณ 2-3 เท่า แต่มีการสร้างสคอพอลิตินความเข้มข้นเท่าๆกันหรือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับพันธุ์ภายในกลุ่มปานกลาง ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นจัดกลุ่มได้โดยตรง อย่างไรก็ตามจากการเก็บผลการทดลองที่เวลา 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำให้ทราบว่ารูปแบบการสร้างสคอพอลิตินในชั่วโมงต่างๆของกลุ่มพันธุ์ต่างๆทั้งสามมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนกล่าวคือในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน (RRIC110, BPM-24 และ PB-235) จะมีการสร้างสคอพอลิตินสูงที่สุดเพียงตำแหน่งเดียว ณ ชั่วโมงที่ 8 โดยมีความเข้มข้นของสคอพอลิตินประมาณ 1.5-2.5 ไมโครโมลาร์ จากนั้นการสร้างสคอพอลิตินจะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป (รูปที่ 42) แสดงว่าความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นจากพันธุ์ภายในกลุ่มนี้น่าจะเพียงพอต่อการยับยั้งการลุกลามของเชื้อราไปยังเซลล์ข้างเคียงและยับยั้งการสร้างสปอร์แรงเจียมได้ ซึ่งจากการศึกษาลักษณะขนาดของรอยไหม้พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นซูโอสปอร์เดียวกันกับการทดลองนี้ รอยไหม้ที่เกิดขึ้นไม่มีการลุกลามของเชื้อรา

ในกลุ่มปานกลางจะมีการสร้างสคอพอลิตินที่มีจุดสูงสุด 2 ตำแหน่ง กลุ่มแรกมีการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่ 8 ชั่วโมงสูงมากและลดต่ำลงในชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นการสังเคราะห์สคอพอลิตินสูงขึ้นอีกในชั่วโมงที่ 24 แต่ความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นไม่ได้มากกว่าในชั่วโมงที่ 8 ดังที่พบในบางพันธุ์ RRIT250, RRIT251, PB311 และ PB260 ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับขนาดของรอยไหม้พบว่าเป็นพันธุ์ภายในกลุ่มปานกลางที่ค่อนข้างต้านทานต่อโรค (รูปที่ 43ก) ส่วนในกลุ่มที่สองปริมาณสคอ-

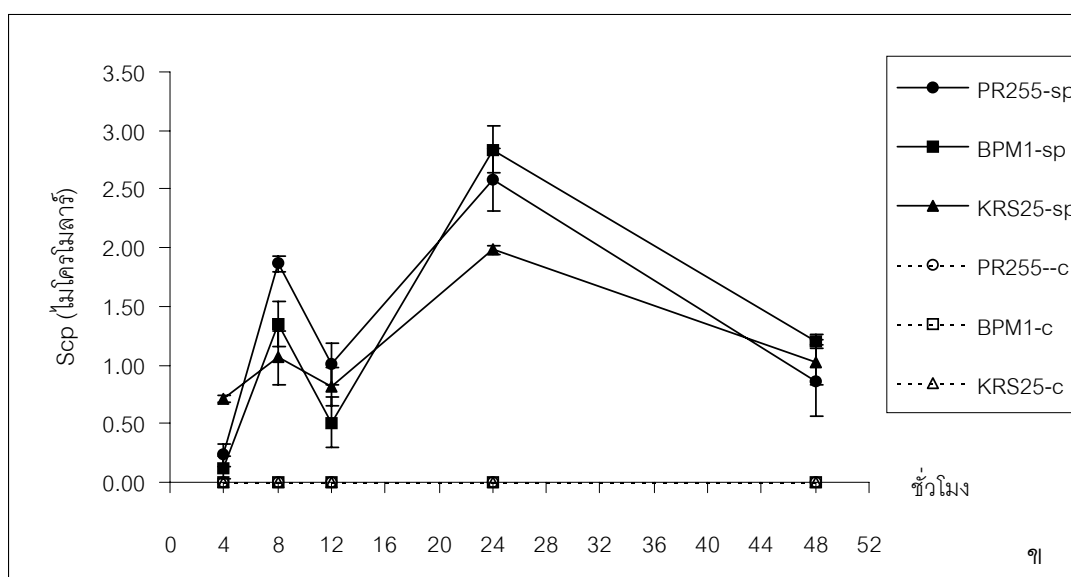
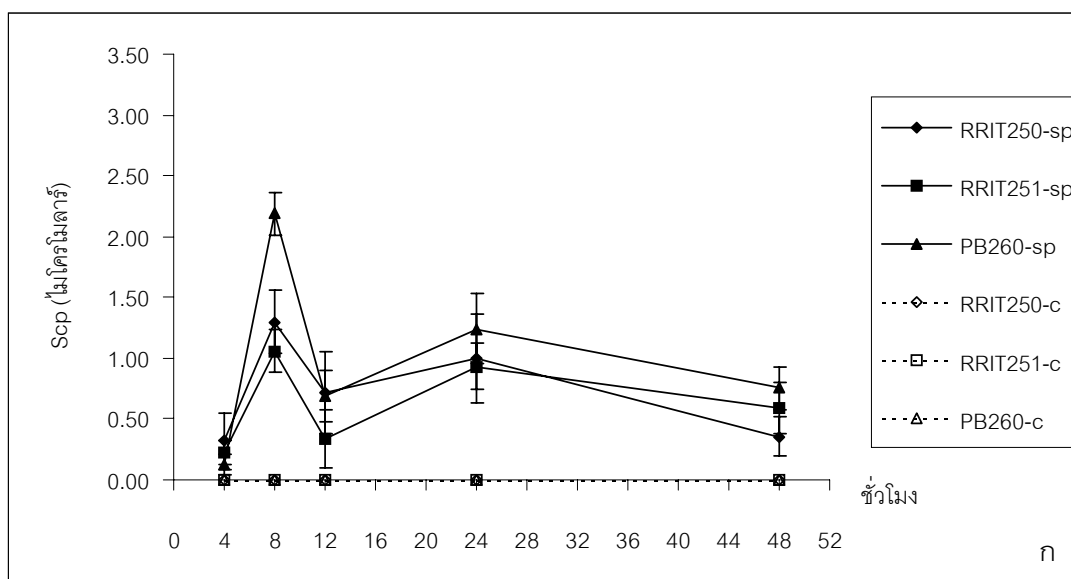


รูปที่ 42 รูปแบบกราฟในการสังเคราะห์สคอพอลิติน ที่เวลาต่างๆในใบยางกลุ่มพันธุ์ต้านทานคือ พันธุ์ RRIC110, PB-235 และ BPM-24 เมื่อป่มด้วยเชื้อราความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

พอลิตินที่ 8 ชั่วโมงสูงและลดลงจนต่ำลงในชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นมีการสร้างสคอพอลิตินสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 24 และสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นมีความเข้มข้นมากกว่าในชั่วโมงที่ 8 ดังที่พบในยางพันธุ์ BPM1, KRS25, PB255, GT1, PR302, PR305, และ PR255 (รูปที่ 43ข) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับขนาดของรอยไหม้จัดเป็นพันธุ์ปานกลางที่ค่อนข้างอ่อนแอ

ดังนั้นจากผลการทดลองที่กล่าวมาแสดงว่าในตำแหน่งแรกที่ 8 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของสคอพอลิตินในช่วง 1.0-2.5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่าในพันธุ์ต้านทานและไม่เพียงพอสอดรับการลุกลาม เพราะว่ายังมีการสร้างสคอพอลิตินได้อีกในชั่วโมงที่ 24 และจากในชั่วโมงที่ 8 ของรูปที่ 42, 43ก และรูปที่ 43ข ดูเหมือนว่าสคอพอลิตินที่ถูกปล่อยลงในน้ำมีความเข้มข้นใกล้เคียงกันแต่สคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นแต่ละเซลล์ในพันธุ์ต้านทานสูงกว่ามากเพราะจำนวนการถูกเจาะน้อยกว่า ทำให้พันธุ์ต้านทานสามารถทำลายเชื้อที่เข้ามาบุกรุกได้ในทันทีที่มีการสร้างสคอพอลิติน แต่ในพันธุ์

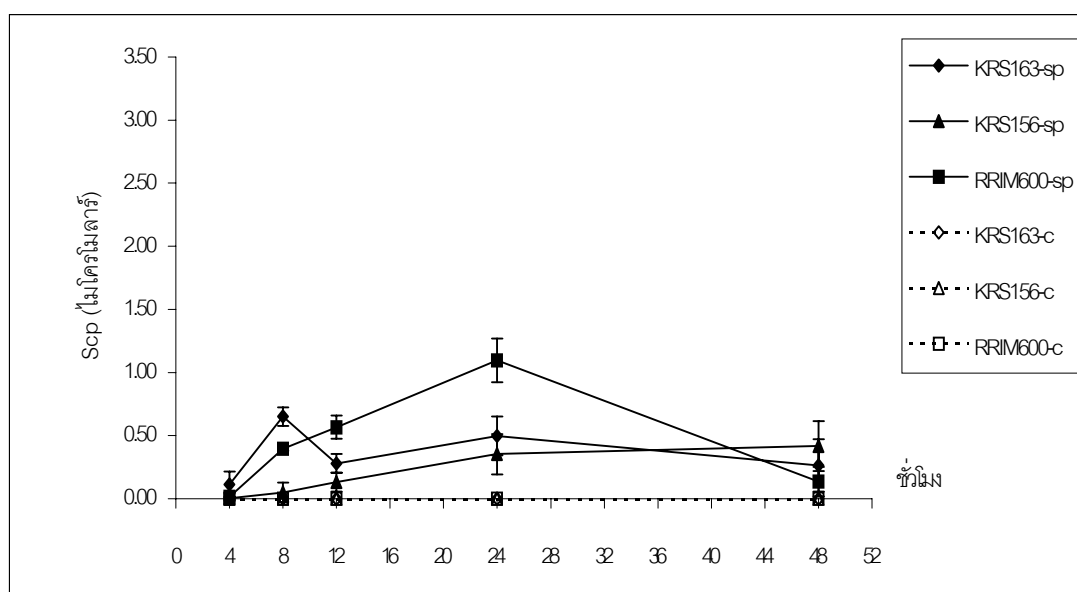
ปานกลางสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นแต่เซลล์มีความเข้มข้นต่ำกว่าจึงไม่สามารถทำลายหรือกักบริเวณเชื้อได้ทั้งหมดจึงทำให้เกิดการลุกลามจนเกิดกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินขึ้นอีกในชั่วโมงที่ 24 แต่ความเข้มข้นสคอพอลิตินจะสูงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของใบ จากรูปที่ 43ก แสดงการสร้างสคอพอลิตินในพีคหลังต่ำแสดงว่ามีสิ่งกีดขวางทางกายภาพสูงคือถูกเจาะได้น้อยกว่าและลุกลามได้น้อยกว่ารูปที่ 43ข ซึ่งมีพีคหลังสูง รวมทั้งยังเกิดการ reinfection ของซุโสปอร์ในชั่วโมงที่ 24 ทำให้เกิดการกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินได้อีก โดยถ้ามีพีคหลังสูงแสดงว่าเกิดการสร้างซุโสปอร์เป็นจำนวนมากจนกระตุ้นให้เกิดการ reinfection ได้มากกว่าที่มีพีคหลังต่ำ



รูปที่ 43 รูปแบบกราฟในการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่เวลาต่างๆ ในใบยางกลุ่มพันธุ์ปานกลางเมื่อ บ่มด้วยฟูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ฟูโอสปอร์ต่อมิลลิตรของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* มี 2 รูปแบบ คือ

- ก. ลักษณะกราฟตัวอย่างยางพันธุ์ปานกลาง (RRIT250, RRIT251 และ PB260) มีจุด สูงสุด 2 จุด ซึ่งจุดแรก (8 ชั่วโมง) สูงกว่าจุดที่สอง (24 ชั่วโมง)
- ข. ลักษณะกราฟตัวอย่างยางพันธุ์ปานกลาง (PR255, KRS25 และ BPM1) มีจุดสูงสุด 2 จุด ซึ่งจุดแรก (8 ชั่วโมง) ต่ำกว่าจุดที่สอง (24 ชั่วโมง)

ในกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มอ่อนแอ (KRS156, RRIM600 และ KRS163) มีการสร้างสคอพอลิตินในอัตราที่ต่ำอย่างคงที่ หรือในบางพันธุ์ เช่น KRS163 สร้างได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 8 แต่ต่ำกว่าในกลุ่มต้านทานประมาณ 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับสคอพอลิตินที่ ถูกสร้างขึ้นในกลุ่มต้านทาน (รูปที่ 44) จึงไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการลุกลามหรือกักขัง เชื้อโรคไม่ให้เกิดการแพร่กระจาย การที่กลุ่มอ่อนแอมีการสร้างสคอพอลิตินน้อยไม่ได้ หมายความว่าเซลล์ในพันธุ์อ่อนแอมีการสร้างสคอพอลิตินได้น้อยแต่เกิดจากการตาย ของเซลล์จำนวนมากอย่างรวดเร็วจนทำให้เอนไซม์ Scp-peroxidase แตกออกมานอก เซลล์และย่อยสลายสคอพอลิตินที่ปลดปล่อยออกมาจากชั้นใบยางได้เพราะจากการ ทดสอบพันธุ์ RRIM600 กับเชื้อโฮสเปอร์ความเข้มข้น 5×10^6 โฮสเปอร์ต่อมิลลิลิตร ก็ สามารถสร้างสคอพอลิตินได้ในปริมาณใกล้เคียงกับในพันธุ์ต้านทาน



รูปที่ 44 รูปแบบกราฟในการสังเคราะห์สคอพอลิตินที่เวลาต่างๆในใบยางกลุ่มพันธุ์อ่อนแอ (KRS 163, KRS156 และ RRIM600) เมื่อบ่มด้วยเชื้อโฮสเปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 โฮสเปอร์ต่อ มิลลิลิตร ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

จากการทดลองสามารถแบ่งระดับความต้านทานตามรูปแบบของกราฟ ออกได้เป็น 4 ระดับคือ พันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มต้านทานมากได้แก่พันธุ์ BPM-24, PB-235 และ RRIC110 ซึ่งมีรูปแบบกราฟที่มีจุดสูงสุดที่ 8 ชั่วโมงเพียงจุดเดียว หลังจากนั้นการ สร้างสคอพอลิตินจะต่ำลงอย่างคงที่ กลุ่มปานกลางที่ค่อนข้างต้านทานได้แก่ PB311, RRIT250, RRIT251 และ PB260 มีรูปแบบกราฟที่มีจุดสูงสุดของกราฟ 2 จุดคือที่ 8 และ 24 ชั่วโมง โดยจุดแรกสูงกว่าจุดที่สอง กลุ่มปานกลางที่ค่อนข้างอ่อนแอได้แก่ PR255, BPM1, KRS25, PB255, PR302, PR305 และ GT1 มีรูปแบบกราฟที่มีจุดสูงสุด 2 จุดเช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มปานกลางที่ค่อนข้างต้านทาน แต่จุดที่สอง (12 ชั่วโมง) สูงกว่าจุดแรก (8 ชั่วโมง) และสุดท้ายในกลุ่มอ่อนแอได้แก่ KRS156, KRS163 และ RRIM600 มีรูปแบบกราฟที่อัตราการสร้างสคอพอลิตินต่ำอย่างคงที่ ซึ่งทั้ง 17 พันธุ์ให้ผลสอดคล้องกับขนาดของรอยไหม้ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3.1.7 ผลการศึกษาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางพารา ด้วย สารละลายซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

เนื่องจากสคอพอลิตินที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์มีความสอดคล้องอย่างมากกับขนาดของรอยไหม้จึงอนุมูลได้ว่าปริมาณลิกนินจะเป็นไปในทางเดียวกันด้วย ผู้วิจัยจึงไม่ได้ทดสอบลิกนินทุกพันธุ์ประกอบด้วยต้นพันธุ์ยางติดโรคมากและเริ่มทรุดโทรม พันธุ์ยางหลายพันธุ์ต้องไปเอากิ่งตาที่สถานีทดลองยางยะลาจึงเลือกทดลอง เฉพาะบางพันธุ์ที่ปลูกที่ศูนย์วิจัยยางสงขลา โดยพันธุ์ยางที่นำมาทดลองได้คือพันธุ์ BPM-24 และ PB-235 เป็นตัวแทนพันธุ์ต้านทาน, พันธุ์ RRIT251 เป็นตัวแทนพันธุ์ปานกลางและพันธุ์ RRIM600 เป็นตัวแทนพันธุ์อ่อนแอ

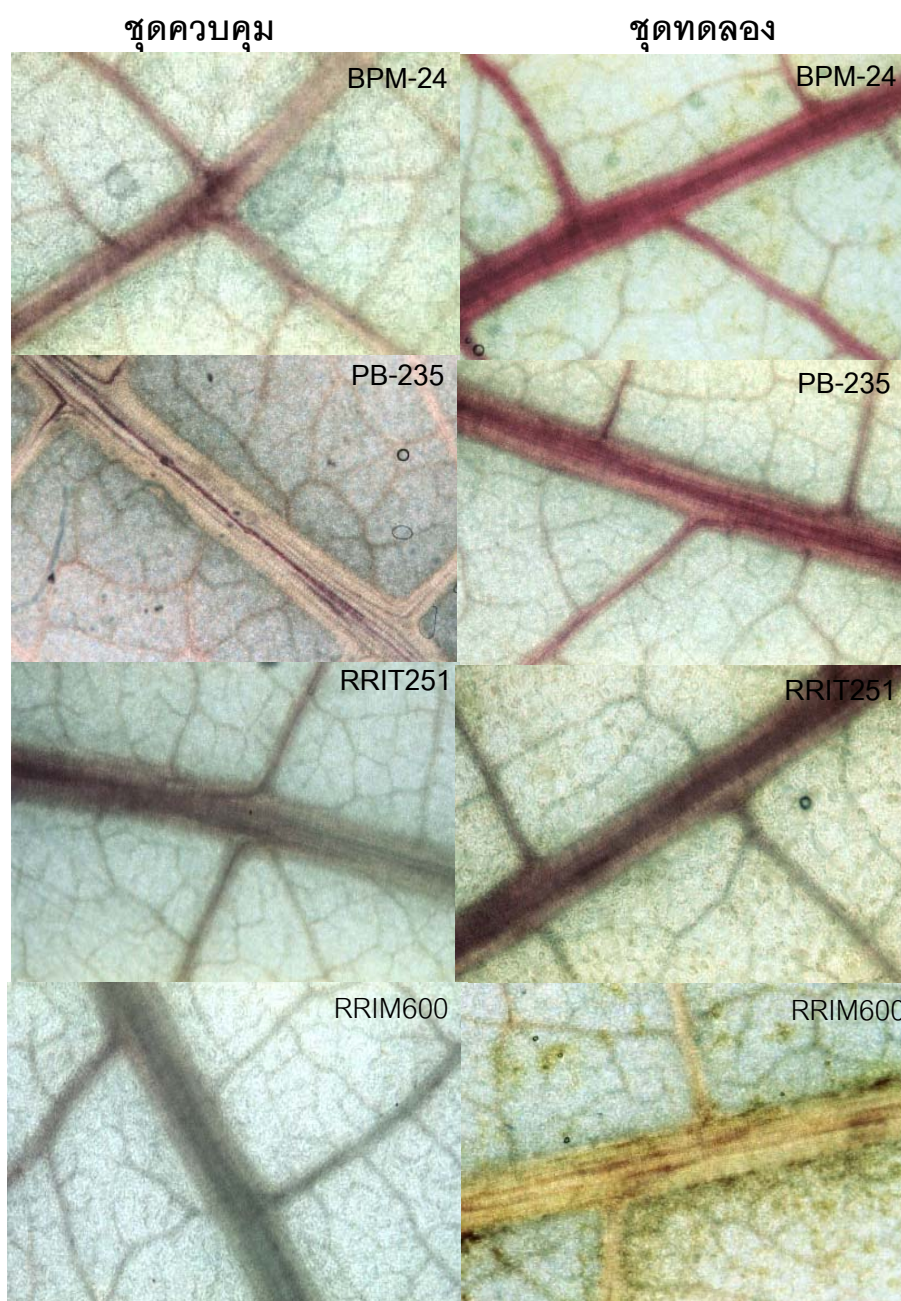
นำชิ้นใบยางขนาด 1×1 เซนติเมตรมาวางบนกระดาษกรอง หลังจากบ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรเมื่อเวลาผ่านไปทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 36 ชั่วโมง นำชิ้นใบยางในแต่ละช่วงเวลาทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบมาทำปฏิกิริยากับ 2% Phloroglucinol เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำมาทำให้เป็นกรดด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น ถ้าเกิดการสร้างลิกนินขึ้นลิกนินจะทำปฏิกิริยา

กับกรดเห็นเป็นสีแดงโดยใช้วิธีการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการทดลองพบว่า ไบยางที่เป็นตัวแทนในกลุ่มพันธุ์ด้านทานคือพันธุ์ BPM-24 และ PB-235 เกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินชัดเจนที่สุดในชั่วโมงที่ 24 หลังจากการบ่มด้วยเชื้อรา *P. palmivora* ลิกนินที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเป็นสีแดงตรงบริเวณเส้นใบของไบยางพารา โดยพบการสร้างลิกนินในพันธุ์ BPM-24 ชัดเจนมากกว่าที่พบในพันธุ์ PB-235 และในชุดควบคุมของไบยางพาราทั้งสองพันธุ์มีปฏิกิริยาการสร้างลิกนินบ้างเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดทดสอบที่มีการสร้างลิกนินปริมาณมาก การที่พบการสร้างลิกนินในชุดควบคุม อาจเป็นลักษณะเฉพาะของไบยางพาราในกลุ่มพันธุ์ด้านทานที่มีการสะสมลิกนินอยู่ตลอดเวลาเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อรา ส่วนในไบยางพาราของกลุ่มตัวแทนพันธุ์ปานกลางคือพันธุ์ RRIT251 พบปฏิกิริยาการสร้างลิกนินบ้างเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับในชุดควบคุมที่ไม่พบการสร้างลิกนิน ส่วนในตัวแทนกลุ่มพันธุ์อ่อนแอคือพันธุ์ RRIM600 ทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุมไม่พบปฏิกิริยาการสร้างลิกนิน (รูปที่ 45) ดังนั้นการทดลองนี้สอดคล้องกับขนาดของนิโคโรซีสและปริมาณสคอพอลิติน

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในพันธุ์ด้านทาน (BPM-24 และ PB-235) จะตอบสนองต่อเชื้อรา *P. palmivora* โดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินขึ้นเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ไบยางพารา และปฏิกิริยาการสร้างลิกนินเริ่มลดลงตามระดับความต้านทานที่ต่ำลงของไบยางพาราจนกระทั่งไม่พบการสร้างลิกนินในพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินสามารถใช้บอกระดับความต้านทานของไบยางพาราได้ ซึ่งสอดคล้องกับการบ่มไบยางพาราด้วยเชื้อรา *M. ulei* (Garcia et al., 1995 a)

การศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินจากตัวแทนพันธุ์ภายในกลุ่มต่างๆ (ด้านทาน, ปานกลางและอ่อนแอ) มีการสร้างลิกนินตามระดับความต้านทาน จึงอนุมานว่าพันธุ์ต่างๆในแต่ละกลุ่มพันธุ์น่าจะจะมีปฏิกิริยาการสร้างลิกนินเป็นไปในทางเดียวกันด้วย แต่ถึงอย่างไรก็ตามวิธีการทดลองดังกล่าวไม่สามารถแสดงผลในรูปแบบของตัวเลขได้ ทำให้ไม่สามารถแสดงความแตกต่างได้ชัดเจนมากนัก ดังนั้นถ้ามีการทดลองต่อไป

จึงควรหาวิธีที่สามารถวัดปริมาณลิกนินได้ เช่นใช้วิธีการสกัดใบที่ได้รับการกระตุ้นจาก
 ชูไฮสปอร์และนำมาหาค่าปริมาณลิกนินตามวิธีของ Bruce และ West (1989) ซึ่งวิธีนี้
 จะใช้วิธีวัดปริมาณลิกนินที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer แล้ววัดค่าการดูด
 กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร



รูปที่ 45 ปฏิกริยาการสร้างลิกนินของใบยางพาราพันธุ์ต่างๆหลังจากบ่มใบยางพาราด้วยชูไฮสปอร์
 ความเข้มข้น 5×10^7 ชูไฮสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)

3.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอิลิซิดินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* กับใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ

3.2.1 การเตรียมอิลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

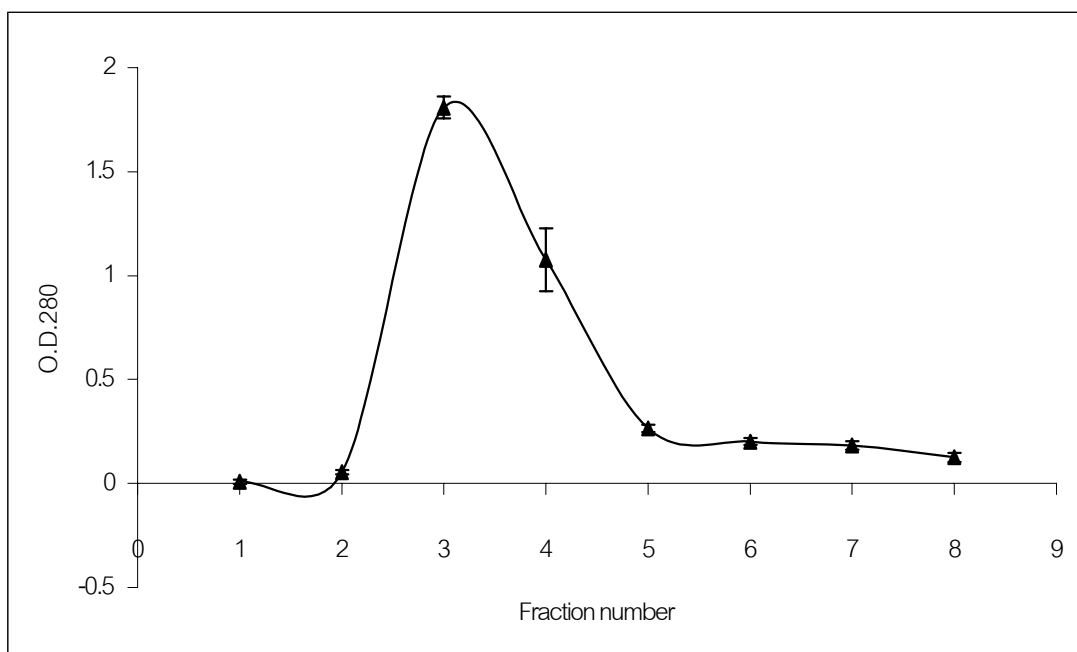
นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ปริมาตร 1 ลิตร มาหาค่าปริมาณโปรตีนโดยวิธีกรดไบซินโคนิคเนื่องจากอิลิซิดินมีกรดอะมิโนชนิดเบสเช่นไลซีนน้อยมากจึงทำให้มีความไวต่อ Bradford reagent ต่ำ จากการทดลอง 3 ครั้งพบว่าปริมาณโปรตีนรวม 120.23 ± 6.82 มิลลิกรัมคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา 1 ลิตร จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความอิ่มตัว 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายกลับในน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตรนำมาหาค่าปริมาณโปรตีนพบว่าปริมาณโปรตีนรวม 42.53 ± 5.21 มิลลิกรัมคิดเป็น 35.37 เปอร์เซ็นต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา 1 ลิตร ต่อมานำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปกำจัดเกลือออกโดยการใส่คอลัมน์ PD-10 พบว่ามีสารละลายโปรตีนถูกชะออกมา 1 पीค รวมหลอดที่มีค่าโปรตีนสูงโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (หลอดที่ 3 และ 4) (รูปที่ 46) ซึ่งเป็นพีคที่เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ (major peak) มีปริมาณโปรตีน 39.15 ± 4.34 มิลลิกรัมคิดเป็น 32.56 เปอร์เซ็นต์จากโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีนรวมและ % yield ในขั้นตอนต่างๆของการเตรียมอิลิซิดินจากน้ำเลี้ยง

เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ปริมาตร 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	ปริมาณโปรตีนรวม (mg)	Yield (%)
น้ำเลี้ยงเชื้อรา	120.23 ± 6.82	100.00
ตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	42.53 ± 5.21	35.37
คอลัมน์ PD-10	39.15 ± 4.34	32.56

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลอง \pm SD)



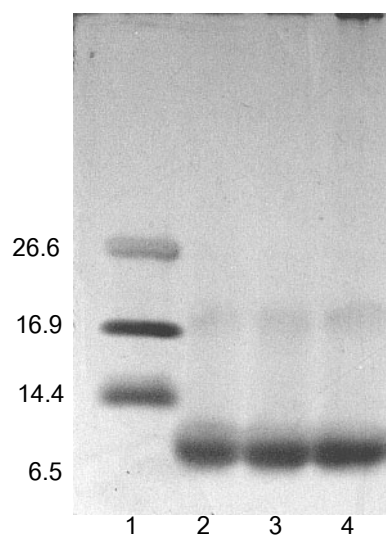
รูปที่ 46 แสดงการแยกสารละลายอิลิซิทินจากน้ำเลี้ยงเชื้อราปริมาณ 1 ลิตรโดยคอลัมน์ PD-10; จากการตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 90 % นำตะกอนละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ PD-10 ครั้งละ 1 มิลลิลิตร ๕ คอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยเก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร (ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 การทดลอง \pm SD)

3.2.2 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิลิซิทิน

ในการติดตามการทำให้อิลิซิทินบริสุทธิ์เพียงบางส่วน (partially purify) จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์แล้วละลายตะกอนกลับ จากนั้นนำมากำจัดเกลือออกด้วยการใช้คอลัมน์ PD-10 รวมหลอดที่มีค่าโปรตีนสูงจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (หลอดที่ 3 และ 4) ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบ Tricine-SDS-PAGE และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่ามีแถบโปรตีนหลัก 2 แถบ ซึ่งเมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลของแถบบางแถบลำดับเทียบกับแถบโปรตีน

มาตรฐานพบว่าเป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน และแถบที่สองมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18 กิโลดาลตัน ซึ่งที่น้ำหนักโมเลกุล 10 กิโลดาลตันเป็นแถบสีเข้มและหนาที่บอกว่าโปรตีนชนิดอื่นอย่างชัดเจนแสดงว่าเป็นโปรตีนหลักที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตออกมาในน้ำเลี้ยงซึ่งก็คืออิลิซิดินที่มีชื่อเฉพาะว่า palmivorein เหมือนกับ palmivorein ที่พบโดย Churngchow และ Rattarasarn (2000) แต่แตกต่างกันที่ palmivorein ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้เป็นเพียง palmivorein ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนเท่านั้นเพราะยังมีแถบโปรตีนอื่นปะปนอยู่ (รูปที่ 47) แต่จากการนำอิลิซิดินที่เป็น partial purify มาทดสอบกับไบยางพาราพันธุ์ BPM-24 (ต้านทาน) และ RRIM600 (อ่อนแอ) ก็สามารถทำให้เกิดรอยไหม้ได้โดยพบขนาดของรอยไหม้ในพันธุ์ต้านทานน้อยกว่าในพันธุ์อ่อนแอซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Churngchow และ Rattarasarn (2000) ที่พบว่าอิลิซิดินบริสุทธิ์สามารถใช้ในการบอกระดับความต้านทานได้เพราะอิลิซิดินทำให้เกิดรอยไหม้ในพันธุ์ BPM-24 ได้น้อยกว่าที่พบในพันธุ์ RRIM600 (อ่อนแอ)

ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงเลือกใช้อิลิซิดินที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนในการทดสอบกับพืชเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อไป แต่ทั้งนี้การเตรียมเชื้อรา *P. palmivora* ให้บริสุทธิ์และการย้ายโคโลนีของเชื้อราลงบนอาหารเหลวต้องปราศจากการปนเปื้อน



รูปที่ 47 แบบแผนของแถบโปรตีนโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอสของอิลิซิดินที่บริสุทธิ์เพียงบางส่วน จากการแยกด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

แถบที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย Tiosephosphate isomerase 26.6 kDa, Myoglobin 16.9 kDa, α -lactalbumin 14.4 kDa และ Aprotinin 6.5 kDa ตามลำดับ

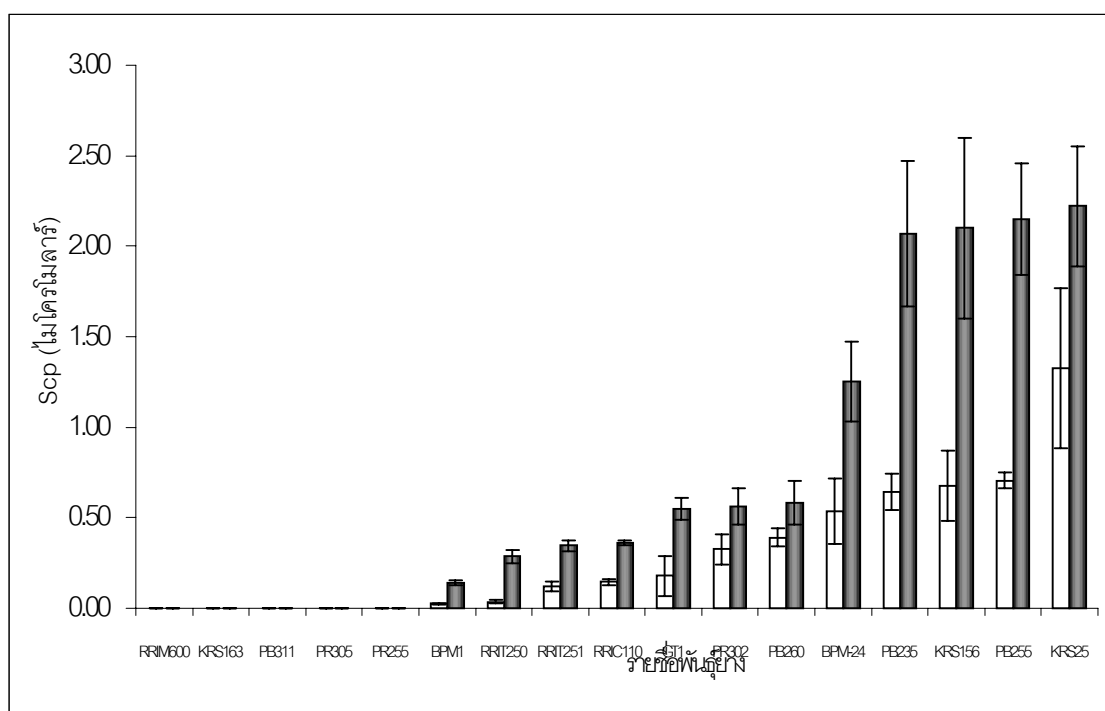
แถบที่ 2, 3 และ 4 แถบโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ PD-10 จากการทดลองซ้ำสามครั้ง

3.2.3 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน จากการกระตุ้นใบยางพารา ด้วยอิลิซิดินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

อิลิซิดินถูกดูดเข้าทางก้านใบเป็นวิธีที่ทำให้ใบยางพาราได้รับการกระตุ้นจากอิลิซิดินโดยตรง โดยไม่ต้องผ่านชั้นต่อนที่เกิเกิดขึ้นจริงในธรรมชาติ เพราะในสภาพธรรมชาตินั้นต้องเริ่มต้นจากการที่ซุโอสปอร์เจาะเข้าไปในเซลล์พืชแล้วจึงจะมีการสร้างอิลิซิดินจากเชื้อรา อิลิซิดินที่ถูกสร้างขึ้นมีหน้าที่ในการนำเอาสเตอรอลจากเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของเซลล์ใบยางมาใช้ในการสร้างสปอร์แรงเฉยเพื่อการขยายพันธุ์ต่อไป โดยอิลิซิดินจะจับกับสเตอรอลที่เป็นองค์ประกอบของ plasma membrane ของเซลล์พืชเจ้าบ้าน (Blein *et al.*, 2002) ดังนั้นการศึกษาผลของอิลิซิดินในการกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินจากพืชเจ้าบ้านจึงใช้เวลานานกว่าซุโอสปอร์ เนื่องจากซุโอสปอร์กระตุ้นได้ทันทีที่มีการเจาะ ในขณะที่การกระตุ้นด้วยอิลิซิดินต้องมีเจริญเติบโตของซุโอสปอร์เป็นสายรากอยู่ระยะหนึ่งก่อนจึงจะผลิตอิลิซิดินออกมาเพื่อไปกระตุ้นเซลล์พืช นอกจากนี้ในพันธุ์ยางแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างของสิ่งกีดขวางทางกายภาพของใบ ทำให้ส่งผลถึงความสามารถของซุโอสปอร์ที่จะเจาะผ่านเข้าสู่เซลล์ของใบยาง ในกรณีที่มีสิ่งกีดขวางทางกายภาพหนาทำให้การเจาะผ่านผนังเซลล์ของซุโอสปอร์ทำได้น้อยกว่าผนังเซลล์ที่บาง จึงทำให้ปริมาณของสายรากน้อยกว่าเป็นผลให้ปริมาณอิลิซิดินที่พบน้อยกว่าด้วย ดังนั้นการที่ผู้วิจัยใช้วิธีการดูดอิลิซิดินที่ทราบปริมาณที่แน่นอนเข้าไปในก้านใบโดยตรง จึงเป็นการลดขั้นตอนและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองของพืชเจ้าบ้าน รวมทั้งยังทำให้ง่ายต่อการควบคุมปริมาณอิลิซิดินให้พืชได้รับในปริมาณที่เท่ากัน ทำให้สามารถศึกษาได้ว่าพันธุ์ใดถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดินซึ่งเป็นอิลิซิดินเตอร์จากเชื้อราได้ดีกว่า จึงเป็นการศึกษากลไกการตอบสนองที่เกิดขึ้นของใบยางในการต้านทานต่อโรคในช่วงหลังของการติดเชื้อ

จากการทดลองเพื่อศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินโดยกระตุ้นใบยางด้วยปริมาณอิลิซิดินของเชื้อรา *P. palmivora* ที่แตกต่างกันคือ 5 และ 10 ไมโครกรัม พบว่าปริมาณสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นสามารถแบ่งพันธุ์ยางออกเป็นสามกลุ่มโดยใช้พันธุ์ BPM-24 (ด้านทาน) เป็นตัวเปรียบเทียบ ในกลุ่มแรกมีการสร้างสคอพอลิตินมาก

กว่าในพันธุ์ BPM-24 ประกอบด้วยพันธุ์ PB-235, KRS156, PB255 และ KRS25 กลุ่มที่สองสร้างสคอพอลิตินได้น้อยกว่าพันธุ์ BPM-24 ประกอบด้วยพันธุ์ PB260, PR302, GT1, RRIC110, RRIT251, RRIT250 และ BPM1 ในกลุ่มสุดท้ายไม่พบการสร้างสคอพอลิติน ประกอบด้วยพันธุ์ PR255, PR305, PB311, KRS163 และ RRIM600 (ตารางที่ 11 และ รูปที่ 48) นอกจากนี้พบว่าพันธุ์ยางทุกพันธุ์สร้างสคอพอลิตินแปรผันตามปริมาณของอิลิซิทิน กล่าวคือปริมาณอิลิซิทิน 10 ไมโครกรัมสามารถกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินได้มากกว่าการถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิทิน 5 ไมโครกรัม ซึ่งการกระตุ้นไบบางด้วยอิลิซิทิน 10 ไมโครกรัมสามารถแสดงความแตกต่างในการสังเคราะห์สคอพอลิตินได้ชัดเจนมากกว่าการกระตุ้นด้วยอิลิซิทิน 5 ไมโครกรัม



รูปที่ 48 เปรียบเทียบผลการสังเคราะห์สคอพอลิตินในชั่วโมงที่ 12 บนไบบางพันธุ์ RRIM600, KRS163, PB311, PR305, PR255, BPM1, RRIT250, RRIT251, RRIC110, GT1, PR302, PB260, BPM-24, PB-235, KRS156, PB255 และ KRS25 เมื่อถูกป้อนด้วยอิลิซิทินปริมาณ 5 และ 10 ไมโครกรัม

ตารางที่ 11 การสังเคราะห์สคอพอลิตินในชั่วโมงที่ 12 บนใบยางพารา 17 พันธุ์จากการกระตุ้นด้วยอิลิซิทินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ปริมาณ 5 และ 10 ไมโครกรัม

รายชื่อพันธุ์ยาง	ความเข้มข้นของ Scp (ไมโครโมลาร์)	
	5 ไมโครกรัม	10 ไมโครกรัม
RRIM600	0	0
KRS156	0	0
PB311	0	0
PR305	0	0
PR225	0	0
BPM1	0.03 ± 0.01	0.14 ± 0.02
RRIT250	0.04 ± 0.01	0.29 ± 0.04
RRIT251	0.12 ± 0.03	0.35 ± 0.03
RRIC110	0.15 ± 0.02	0.36 ± 0.02
GT1	0.18 ± 0.11	0.55 ± 0.06
PR302	0.33 ± 0.09	0.56 ± 0.10
PB260	0.39 ± 0.05	0.58 ± 0.12
BPM-24	0.54 ± 0.18	1.25 ± 0.22
PB-235	0.65 ± 0.10	2.07 ± 0.40
KRS156	0.68 ± 0.20	2.10 ± 0.50
PB255	0.71 ± 0.05	2.15 ± 0.31
KRS25	1.33 ± 0.44	2.22 ± 0.33

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยอย่างน้อยจาก 3 การทดลองต่อหนึ่งพันธุ์ ± SD)

เมื่อทำการพิจารณาผลของการศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตินจากวิธีการดูอิลิซิทินเข้าทางก้านใบพบว่า ในพันธุ์ยางบางพันธุ์เช่น BPM-24, RRIC110 และ RRIT251 มีความสามารถในการสร้างสคอพอลิตินค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี

การทดสอบด้วยซูโอสปอร์ และในพันธุ์ยางบางพันธุ์ที่มีการทดลองด้วยซูโอสปอร์มีการสร้างสคอพอลิตินได้น้อยเช่น KRS156 กลับมีการสร้างสคอพอลิตินได้สูงเมื่อทดสอบด้วยวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้าน ดังนั้นผู้วิจัยจึงคิดว่าผลของการสังเคราะห์สคอพอลิตินโดยการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้าน และตัดขึ้นใบยางไปวิเคราะห์หาสคอพอลิติน (จากผลการทดลองในรูปที่ 48) ไม่น่าจะเป็นความสามารถทั้งหมดในการสร้างสคอพอลิตินของพันธุ์ยางแต่ละพันธุ์ จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้วิธีการกรีดบริเวณหลังใบยางและวางหยดอิลิซิตินปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อหยดตรงตำแหน่งที่มีการกรีดควบคุมไปกับวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านใบ เพื่อสังเกตการสร้างสคอพอลิตินบริเวณจุดสัมผัสคือตรงตำแหน่งที่หยดอิลิซิตินจากวิธีการกรีดกับบริเวณก้านจากวิธีการดูดอิลิซิติน และการเรียงแสงของสคอพอลิตินบริเวณเซลล์ข้างเคียงคือบริเวณเซลล์รอบๆ ตำแหน่งที่หยดอิลิซิตินโดยวิธีการกรีดกับบริเวณเซลล์ภายในเนื้อใบที่อยู่ไกลออกไปจากก้านโดยวิธีการดูด อิลิซิติน แล้วสังเกตการเรียงแสงของสคอพอลิตินภายใต้แสงยูวีเพื่อใช้ในการแปรผลความน่าจะเป็นของการสร้างสคอพอลิตินภายในเนื้อใบของวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านที่แสดงในรูปที่ 48 ว่าเป็นความสามารถทั้งหมดในการสร้างสคอพอลิตินของพันธุ์ยางแต่ละพันธุ์หรือไม่ ซึ่งเลือกทดลองในพันธุ์ยางพาราบางพันธุ์เพื่อเป็นตัวแทนในการทดลองเท่านั้น คือใช้พันธุ์ BPM-24 เป็นตัวแทนพันธุ์ด้านทาน, ใช้ KRS156 และ PB255 เป็นตัวแทนในกลุ่มที่มีการสร้างสคอพอลิตินมากกว่าพันธุ์ BPM-24, ใช้พันธุ์ RRIT251 และ RRIC110 เป็นตัวแทนพันธุ์ที่มีการสร้างสคอพอลิตินน้อยกว่าพันธุ์ BPM-24 และใช้พันธุ์ RRIM600 เป็นตัวแทนพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างสคอพอลิติน พบว่าในแต่ละพันธุ์นั้นทั้งวิธีการหยดอิลิซิตินและวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านใบมีการตอบสนองของเซลล์พืชตรงตำแหน่งที่สัมผัสอิลิซิตินโดยตรงที่เหมือนกัน และในบริเวณเซลล์ข้างเคียงของทั้งสองวิธีก็ให้ผลไปในทำนองเดียวกันด้วย นอกจากนี้วิธีการกรีดยังทำให้สามารถแสดงความแตกต่างของบาดแผล (รอยไหม้) ระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะการเกิดโรคที่ต่างกันด้วย ซึ่งในแต่ละกลุ่มพันธุ์ยางให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้คือ

ผลการทดลองของตัวแทนพันธุ์ด้านทาน (BPM-24) พบว่าจากวิธีการหยดพบการเรียงแสงของสคอพอลิตินตรงตำแหน่งของเซลล์ที่มีการสัมผัสกับอิลิซิตินโดยตรง

มากกว่าเซลล์ข้างเคียงหรือเซลล์ที่อยู่ห่างออกไป ซึ่งให้ผลเหมือนกับวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านใบที่พบสคอพอลิตินจากบริเวณก้านที่สัมผัสกับอิลิซิตินโดยตรงสูงกว่าในบริเวณเนื้อใบที่อยู่ไกลออกไป ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์หาสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ข้างเคียงจากวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านจึงมีความเข้มข้นต่ำกว่าความสามารถทั้งหมดในการสร้างสคอพอลิตินของยางพาราพันธุ์ BPM-24 ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้โดยสมมุติฐานที่ว่าความสามารถในการต้านทานโรคขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวรับที่ทำให้เกิดการต้านทาน (R receptor) กับตัวรับที่ทำให้เกิดโรค (S receptor) โดยที่ R receptor มีสัมพรรคภาพ (affinity) สูงกว่าสัมพรรคภาพของ S receptor ด้วย ผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานดังกล่าวขึ้นเนื่องจากการค้นพบว่ามี receptor อยู่หลายชนิดในบริเวณ plasma membrane เช่น จากการศึกษาของ Felix และคณะ (1999) พบว่ามี R receptor อยู่หลายชนิดในบริเวณ plasma membrane และ receptor เหล่านี้สามารถรับตัวกระตุ้นได้แตกต่างกัน เช่นเมื่อกระตุ้นเซลล์แขวนลอยของมะเขือเทศด้วยตัวกระตุ้นต่างๆคือ fungus-derived glycopeptides, chitin, ergosterol, เอนไซม์ bacterial xylanase หรือ flagellin เขาพบว่าตัวกระตุ้นบางตัวถูกจดจำด้วย receptor ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของตัวกระตุ้น และจากการค้นพบ receptor บริเวณ plasma membrane ในต้นถั่วเหลือง ซึ่งใช้เป็นตัวรับที่มีสัมพรรคภาพต่อ β -glucans ซึ่งเป็นอิลิซิเตอร์จากผนังเซลล์ของเชื้อรา *P. megasperma* f. sp. *glycinea* ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในเซลล์พืชเจ้าบ้านเพื่อใช้ในการป้องกันตัวเองของพืช (Yoshikawa *et al.*, 1988; Cosio *et al.*, 1990) ซึ่งในส่วนของ R receptor นั้น ได้มีผู้ค้นพบแล้ว เช่น Wendehenne (1995) พบว่ามี การจดจำ cryptogin ซึ่งเป็นอิลิซิตินของเชื้อรา *P. cryptogea* ด้วย R receptor ที่มีสัมพรรคภาพกับ cryptogin สูงตรงบริเวณ plasma membrane ของเซลล์ยาสูบนำไปสู่การตอบสนองเพื่อป้องกันตัวเองของพืช และการพบ R gene ของมะเขือเทศที่มีความจำเพาะกับ avr gene ของเชื้อรา *Cladosporium fulvum* ทำให้เกิดการตอบสนองแบบ hypersensitive (De Wit *et al.*, 1993 และ Kooman-Gersmann *et al.*, 1998) จากการค้นพบเหล่านี้จึงสามารถแน่ใจได้ว่ามี receptor ตรงบริเวณ plasma membrane จริงโดยเฉพาะ R receptor ซึ่ง

แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของตัวกระตุ้น ส่วน S receptor นั้นเป็นการสันนิษฐานขึ้นของผู้วิจัยที่พบว่าพืชสามารถเกิดการตอบสนองในลักษณะที่เกิดโรค ดังนั้นน่าจะมีตัวรับอีกตัวหนึ่งซึ่งส่งผลทำให้เกิดโรคได้ และน่าจะมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกับ R receptor เนื่องจาก R receptor ที่พบในปัจจุบันน่าจะเกิดขึ้นจากวิวัฒนาการของลักษณะความอ่อนแอของพืชซึ่งก็ควรจะเป็น S receptor และจากการเพิ่มปริมาณอิลิซิทินในพันธุ์ด้านทานพบว่าลักษณะการตอบสนองแบบ hypersensitive สามารถเปลี่ยนเป็นการตอบสนองแบบการเกิดโรคได้ ดังนั้นจึงน่าจะมี S receptor อยู่จริง ซึ่งมี affinity ต่ำกว่า R receptor ด้วย เพราะมีการตอบสนองแบบ hypersensitive ก่อนการเกิดโรคขึ้น โดยสันนิษฐานว่าในพันธุ์ด้านทานมี R receptor จำนวนมากและมี affinity สูงกว่า S receptor ดังนั้นเมื่อเซลล์มีการสัมผัสกับอิลิซิทินโดยตรงก็สามารถจับกับ R receptor ได้จำนวนมาก ทำให้เหลืออิลิซิทินเพียงเล็กน้อยในการเข้าทำปฏิกิริยากับตัวรับของเซลล์ข้างเคียง จึงมีการสร้างสคอพอลิตินจากเซลล์ที่มีการสัมผัสโดยตรงมากกว่าเซลล์ที่อยู่ห่างออกไป นอกจากนี้บาดแผลที่พบในพันธุ์ BPM-24 (ด้านทาน) ที่เกิดจากการกรีดมีขนาดเล็กสีเข้มซึ่งเป็นการตอบสนองแบบ hypersensitive อาจเนื่องมาจากอิลิซิทินเข้าจับกับ R receptor ที่มีอยู่จำนวนมากทำให้เหลืออิลิซิทินเพียงเล็กน้อยที่จะเข้าจับกับ S receptor จึงพบลักษณะของการเกิดโรคน้อยมาก (รูปที่ 49ก.)

ผลการทดลองของตัวแทนพันธุ์ที่มีการสร้างสคอพอลิตินในเนื้อใบจากวิธีการดูดอิลิซิทินเข้าทางก้านและตัดขึ้นใบข้างไปวิเคราะห์หาสคอพอลิตินซึ่งมีการสร้างสคอพอลิตินมากกว่าในพันธุ์ BPM-24 (รูปที่ 48) โดยใช้พันธุ์ PB-235 และ KRS156 เป็นตัวแทนกลุ่ม พบว่าจากวิธีการหยุดพบการเรืองแสงของสคอพอลิตินตรงตำแหน่งที่มีการสัมผัสกับอิลิซิทินโดยตรงน้อยกว่าที่พบในเซลล์ข้างเคียงหรือเซลล์ที่อยู่ไกลออกไป ซึ่งให้ผลเหมือนวิธีการดูดอิลิซิทินเข้าทางก้านที่พบสคอพอลิตินจากบริเวณก้านที่สัมผัสกับอิลิซิทินโดยตรงน้อยกว่าในบริเวณเนื้อใบที่อยู่ไกลออกไป ดังนั้นการทดลองตัดขึ้นใบจากวิธีการดูดอิลิซิทินและนำไปวิเคราะห์หาสคอพอลิตินที่ถูกรสร้างขึ้นในใบจึงมีความเข้มข้นมากกว่าที่พบในพันธุ์ BPM-24 (รูปที่ 48) สามารถอธิบายในสมมุติฐานของตัวรับได้ว่าในพันธุ์ดังกล่าวน่าจะมี R receptor น้อยกว่าในพันธุ์ด้านทาน ดังนั้นเมื่อ

เซลล์สัมผัสกับอิลิซิตินโดยตรงจึงสามารถจับกับอิลิซิตินได้บางส่วน จนเหลืออิลิซิตินจำนวนมากที่สามารถเข้าจับตัวรับของเซลล์ข้างเคียง ทำให้เกิดการสร้างสคอพอลิตินจากเซลล์ที่สัมผัสโดยตรงน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ห่างออกไป และพบว่าบริเวณที่สัมผัสอิลิซิตินโดยตรงจากวิธีการกรีดมีการตอบสนองแบบการเกิดโรค สังเกตได้จากการมีบาดแผลที่มีลักษณะช้ำน้ำตรงตำแหน่งที่สัมผัสกับอิลิซิติน จึงน่าจะเป็นไปได้ว่ามีการจับกับ S receptor ตรงตำแหน่งที่สัมผัสกับอิลิซิตินโดยตรงควบคู่ไปกับการจับกับ R receptor ด้วย จึงส่งผลให้เกิดการตอบสนองก้ำกึ่งระหว่างการตอบสนองแบบต้านทานและการตอบสนองแบบการเกิดโรค (รูปที่ 49ข.) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการตอบสนองแบบพันธุ์ปานกลาง

ส่วนในพันธุ์ที่เป็นตัวแทนในกลุ่มที่มีการสร้างสคอพอลิตินในเนื้อเยื่อจากวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านและตัดชิ้นเนื้อไปวิเคราะห์หาสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นซึ่งมีความเข้มข้นของสคอพอลิตินน้อยกว่าพันธุ์ BPM-24 (รูปที่ 48) โดยใช้พันธุ์ RRIC110 และ RRIT251 เป็นตัวแทนของกลุ่ม พบว่าจากวิธีการกรีดมีการเรืองแสงของสคอพอลิตินตรงตำแหน่งที่มีการสัมผัสกับอิลิซิตินโดยตรงมากกว่าที่พบในเซลล์ข้างเคียง เช่นเดียวกับผลการทดลองจากวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้าน ที่พบสคอพอลิตินจากบริเวณก้านซึ่งเป็นสัมผัสโดยตรงมากกว่าที่พบในเซลล์ข้างเคียงที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อ และการเรืองแสงที่พบในจุดสัมผัสโดยตรงของทั้งสองวิธีนั้นมากกว่าที่พบในพันธุ์ BPM-24 แต่การเรืองแสงที่พบในเซลล์ข้างเคียงทั้งสองวิธีมีค่าน้อยกว่าที่พบในพันธุ์ BPM-24 ทำให้เมื่อวิเคราะห์หาสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในเนื้อเยื่อจากการตัดเป็นชิ้นจากวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านจึงมีความเข้มข้นน้อยกว่าพันธุ์ BPM-24 ดังแสดงในรูปที่ 48 อธิบายในสมมุติฐานของตัวรับที่ได้กล่าวแล้วข้างต้นว่า อาจมี R receptor มากกว่าที่พบในพันธุ์ BPM-24 ทำให้ตรงตำแหน่งที่สัมผัสกับอิลิซิตินโดยตรงนั้น อิลิซิตินสามารถจับ R receptor ไปได้จำนวนมากหรือเกือบทั้งหมด ส่งผลให้เหลืออิลิซิตินเพียงเล็กน้อยในการกระตุ้นเซลล์ข้างเคียงให้สร้างสคอพอลิติน ทำให้เมื่อวิเคราะห์หาสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นในเนื้อเยื่อจากวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านจึงมีความเข้มข้นน้อยกว่าพันธุ์ BPM-24 และบาดแผลที่เกิดขึ้นมีการตอบสนองแบบ hypersensitive จึงน่าจะเป็นไป

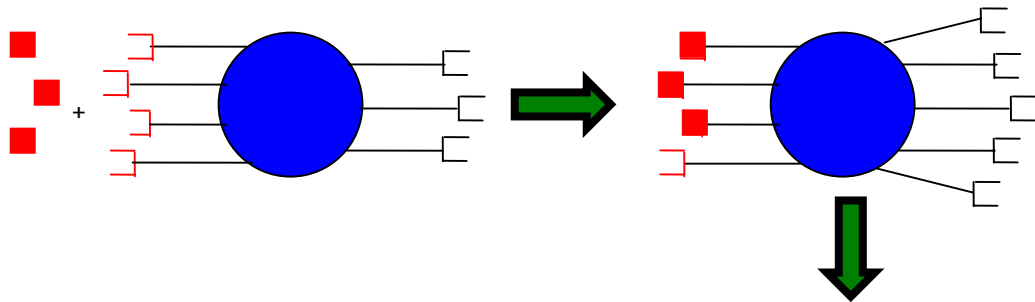
ได้ว่ามี R receptor ตรงตำแหน่งที่สัมผัสกับฮิสติดีนโดยตรงอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้ไม่มีการแสดงผลของ S receptor ที่ทำให้เกิดโรคเลย (รูปที่ 49ก) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในพันธุ์ต้านทาน

สุดท้ายในกลุ่มพันธุ์ยางที่ไม่พบการสร้างสคอพอลิตินจากวิธีการตัดขึ้นใบจากการดูฮิสติดีนเพื่อวิเคราะห์หาสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้น (รูปที่ 48) โดยใช้พันธุ์ RRIM600 เป็นตัวแทนในการศึกษา พบว่าจากการกรีดพบการเรืองแสงตรงตำแหน่งที่สัมผัสโดยตรงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับพันธุ์ BPM-24 และไม่พบการเรืองแสงของสคอพอลิตินบริเวณเซลล์ข้างเคียง ส่วนวิธีการดูเข้าทางก้านใบนั้นพบว่าทั้งในบริเวณก้านและเซลล์ข้างเคียงที่อยู่ในเนื้อใบไม่พบการเรืองแสงของสคอพอลิติน ทำให้เมื่อวิเคราะห์หาสคอพอลิตินภายในเนื้อใบจากวิธีการตัดใบเป็นชิ้นจึงไม่พบการสร้างสคอพอลิติน (รูปที่ 48) นอกจากนี้ยังเกิดบาดแผลลักษณะช้ำน้ำและแผ่ขยายกว้างของบริเวณที่สัมผัสกับฮิสติดีนโดยตรงจากวิธีการกรีด ซึ่งแสดงถึงลักษณะการเกิดโรคที่พบในพันธุ์อ่อนแอ สามารถอธิบายสมมุติฐานของตัวรับได้ว่า อาจมี R receptor อยู่จำนวนน้อยทำให้ฮิสติดีนสามารถจับกับ S receptor ได้จำนวนมากจนส่งผลให้เกิดโรค (รูปที่ 49ค) ถึงแม้จะมี R receptor อยู่บ้างเล็กน้อยที่สามารถทำให้เกิดการสร้างสคอพอลิตินได้ แต่เมื่อมีการแตกของเซลล์ที่มีสาเหตุมาจากการเกิดโรคทำให้เกิดการปลดปล่อย Scp-peroxidase (Breton *et al.*, 1997 b) จนเกิดการ degradation ของสคอพอลิตินได้ ทำให้พบปริมาณสคอพอลิตินที่คงเหลืออยู่มีอยู่น้อยมากหรือไม่พบเลย ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวถูกจัดเป็นพันธุ์อ่อนแอ

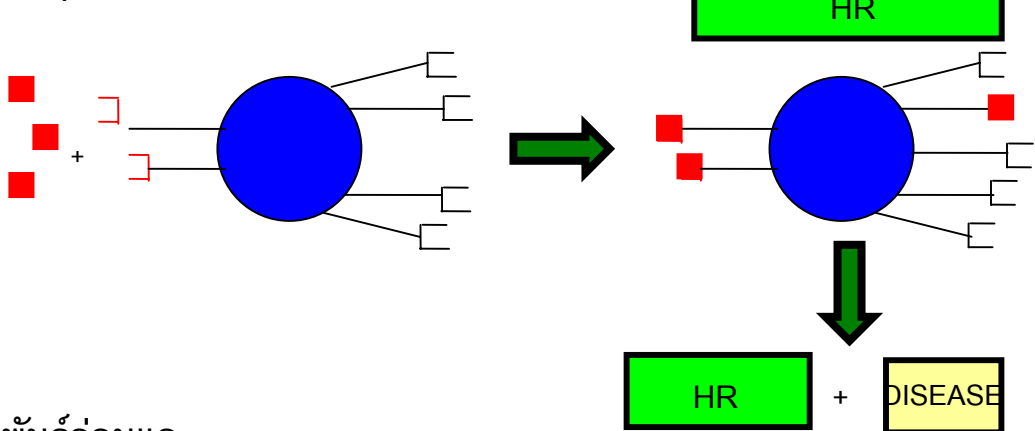
พันธุ์ยางแต่ละกลุ่ม (ต้านทาน, ปานกลางและอ่อนแอ) มีความแตกต่างในการสร้างสคอพอลิติน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณฮิสติดีนที่ได้รับกับตัวรับทั้งสอง R receptor และ S receptor โดยที่ R receptor มี affinity สูงกว่า S receptor ด้วย กล่าวคือระดับความต้านทานขึ้นอยู่กับปริมาณของ R receptor ที่แตกต่างกันไปตามลำดับการต้านทานโรค กล่าวคือพันธุ์ยางที่มีระดับความต้านทานโรคนั้นจะมี R receptor จำนวนมากกว่าพันธุ์ยางที่มีระดับความต้านทานรองลงมา จึงส่งผลให้เกิดการตอบสนองแบบ hypersensitive ส่วนในพันธุ์อ่อนแอมิ R receptor ในปริมาณน้อยทำให้

อิทธิพลจับกับ S receptor มากขึ้นจึงส่งผลทำให้เกิดโรค ในกรณีพันธุ์ปานกลางมี R receptor อยู่จำนวนน้อยกว่าที่พบในพันธุ์ต้านทานทำให้มีผลของ S receptor มากกว่าที่พบในพันธุ์ต้านทาน จึงทำให้ปฏิกริยานี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของอิทธิพลด้วยกล่าวคือ ถ้ามีอิทธิพลในปริมาณต่ำก็จะเลือกจับ R receptor ส่งผลให้เกิดการตอบสนองแบบ hypersensitive ก่อน เมื่อมีอิทธิพลมากขึ้นก็จะจับกับ S receptor ทำให้เกิดอาการของโรค แม้แต่พันธุ์ BPM-24 ถ้าเพิ่มอิทธิพลมากขึ้นจะพบอาการซ้ำน้ำบริเวณกรีดเช่นกัน ผลการทดลองนี้ทำให้ผู้วิจัยค่อนข้างมั่นใจว่าในเซลล์ใบยางมี receptor สำหรับอิทธิพลทั้งสองชนิด ดังนั้นจากปฏิกริยา incompatible ที่ทำให้เกิดการต้านทานโรคและ compatible ที่ทำให้เกิดโรคเป็นปฏิกริยาที่ต่อเนื่องกัน ไม่ได้แบ่งแยกชัดเจนเหมือนทฤษฎี gene-for-gene (Staskawicz *et al.*, 1995) ที่เชื่อโรคหนึ่งชนิดจะมี avirulence (*Avr*) gene หรือ virulence (*V*) gene อย่างไม่อย่างหนึ่งเท่านั้น ซึ่งเชื่อโรคที่มี *Avr* gene มีการจดจำ *R* gene ในพืช ทำให้มีการตอบสนองในการต้านทานต่อโรค ถ้าขาด *R* gene หรือ *Avr* gene จะส่งผลทำให้เกิดโรคขึ้นในพืช แต่จากการทดลองสรุปได้ว่าอิทธิพลเพียงหนึ่งชนิดสามารถเป็น avirulent factor สำหรับ R receptor แต่จัดเป็น pathogenic factor สำหรับ S receptor ในพืชเพียงชนิดเดียวแต่มีระดับความต้านทานที่แตกต่างกัน ซึ่งคล้ายกับทฤษฎีของ Keen และคณะ (1990) ที่พบว่า hypersensitive response and pathogenicity (*hrp*) gene ในแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวจะถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด โดย *Avr* protein เท่านั้นที่จะจับกับ R receptor และทำให้มีการตอบสนองแบบ hypersensitive แต่ถ้าไม่มี R receptor ดังที่พบในพันธุ์อ่อนแอ ทำให้ผลิตภัณฑ์ของกลุ่ม *hrp* gene ดังกล่าวไปกดดันการแสดงออกแบบ hypersensitive ในพันธุ์อ่อนแอจนส่งผลให้เกิดโรค เช่นเดียวกับที่พบในมะเขือเทศที่มีการตอบสนองทั้งแบบ hypersensitive และการเกิดโรค ขึ้นอยู่กับตัวกระตุ้นคือ *Avr* gene ที่ทำให้เกิดการตอบสนองแบบ hypersensitive แต่ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ (mutant) ของ *Avr* gene ในเชื้อก่อโรคก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ (De Wit *et al.*, 1993 และ Kooman-Gersmann *et al.*, 1998)

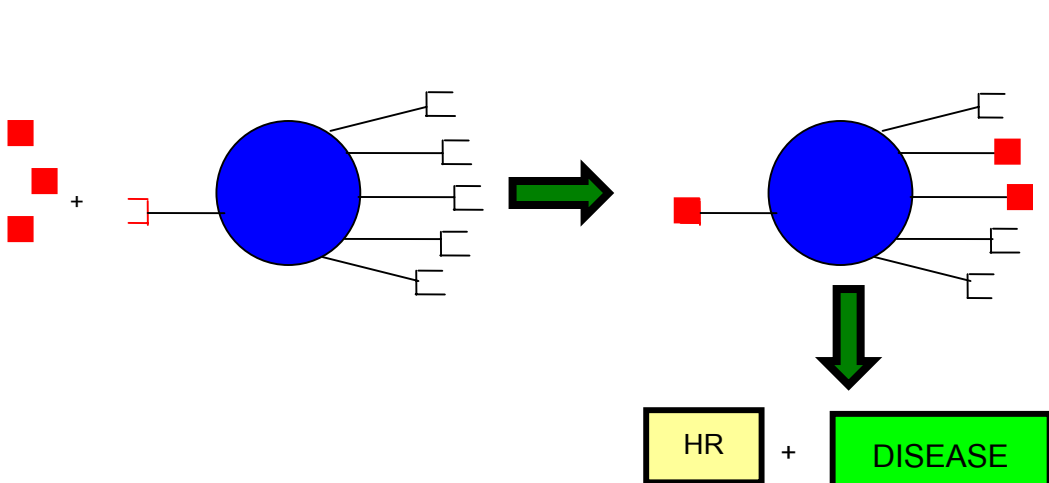
ก. พันธุ์ต้านทาน



ข. พันธุ์ปานกลาง



ค. พันธุ์อ่อนแอ



รูปที่ 49 แสดงรูปแบบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างอิลิซิดิน (■) กับตัวรับ 2 ชนิดคือ R receptor (□) และ S receptor (□) บน plasma membrane (●) ในพันธุ์ต้านทาน (ก), ปานกลาง (ข) และอ่อนแอ (ค)

HR = hypersensitive response

3.2.4 ผลการศึกษาปฏิบัติการสร้างลิกนิน ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยาง ด้วยอิลิซิตินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

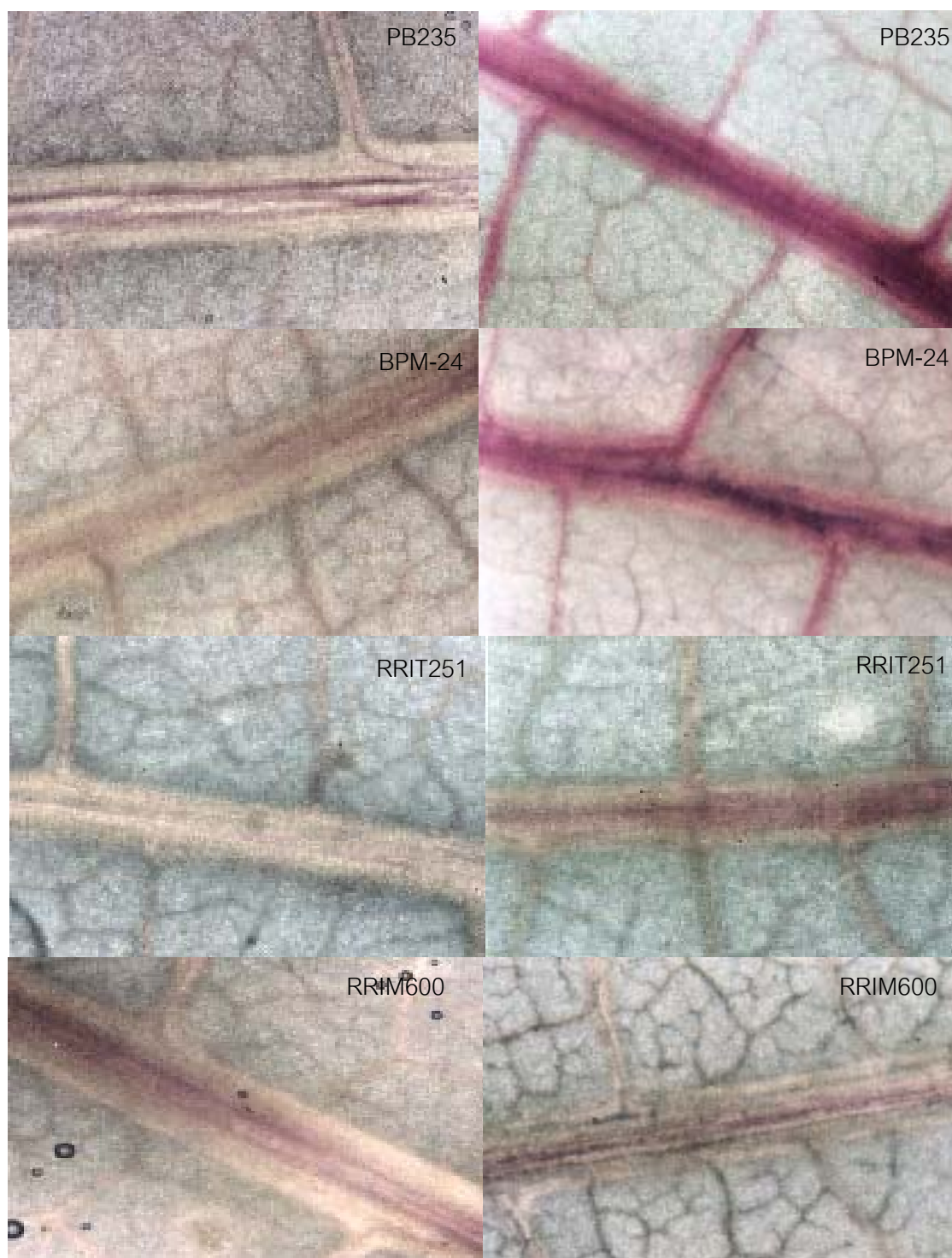
ในการทดลองครั้งนี้ ผู้วิจัยไม่ได้ทดลองปฏิบัติการสร้างลิกนินครบทั้ง 17 พันธุ์ เนื่องจากพันธุ์ยางหลายพันธุ์ติดโรคและเริ่มทรุดโทรม รวมทั้งพันธุ์ยางหลายพันธุ์ ต้องไปเอากิ่งตาที่สถานีทดลองยางยะลา จึงเลือกทดลองเฉพาะบางพันธุ์ที่ปลูกที่ศูนย์วิจัยยางสงขลา โดยพันธุ์ยางที่นำมาทดลองได้คือพันธุ์ BPM-24 และ RRIT251 เป็นตัวแทนพันธุ์ด้านทาน, พันธุ์ PB-235 เป็นตัวแทนพันธุ์ปานกลาง และพันธุ์ RRIM600 เป็นตัวแทนพันธุ์อ่อนแอ (จากการจัดลำดับความต้านทานด้วยการทดสอบกับอิลิซิตินจากข้อ 3.2.3 จะเห็นว่าพันธุ์ RRIT251 และ PB-235 มีลำดับความต้านทานไม่ตรงกับที่จัดด้วยขนาดของรอยไหม้ ดังเหตุผลที่กล่าวแล้วในข้อ 3.2.3 ดังนั้นการเลือกตัวแทนของกลุ่มจึงไม่ตรงกับการเลือกตัวแทนที่ทำการทดลองในข้อ 3.1.7) พบว่าเมื่อนำอิลิซิตินมาทดสอบกับใบยางพาราโดยวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านใบปริมาณ 10 ไมโครกรัม ต่อหนึ่งกรัมใบไม้ แล้วเก็บผลทุก 2 ชั่วโมงจนครบ 12 ชั่วโมง พบว่าพันธุ์ PB-235, BPM-24 และ RRIT251 จะเกิดปฏิบัติการสร้างลิกนินตั้งแต่ 1 ชั่วโมงแรกหลังจากการได้รับอิลิซิติน เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมงจะเห็นปฏิบัติการสร้างลิกนินที่ชัดเจนมากที่สุดโดยพบในพันธุ์ PB-235 มากกว่า BPM-24 และ RRIT251 ตามลำดับ ลิกนินที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเห็นสีแดงเข้มบริเวณเส้นใบและเมื่อเวลาผ่านไป 8-12 ชั่วโมง ปฏิบัติการสร้างลิกนินจะค่อยๆลดลงตามลำดับ การสร้างลิกนินเกิดขึ้นเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม ส่วนในชุดควบคุมพบการสร้างลิกนินเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบ และในใบยางพันธุ์ RRIM600 จะเห็นปฏิบัติการสร้างลิกนินไม่ชัดเจนในทุกๆช่วงเวลา ไม่พบปฏิบัติการสร้างลิกนินในการทดลองชุดควบคุมด้วย ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 50 ต่อไปอาจใช้วิธีการสกัดลิกนินออกมาจากใบไม้และวิเคราะห์หาปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร (Bruce and West, 1989) เพราะมีการแสดงผลในรูปของตัวเลขเพื่อให้เห็นความแตกต่างของลิกนินในใบยางแต่ละพันธุ์ได้ชัดเจนมากขึ้น โดยสรุปพบว่าตัวอย่างของพันธุ์ยางที่นำมาศึกษาปฏิบัติการสร้าง

ลิกนินสอดคล้องกับการสร้างสคอพอลิตินจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิติน กล่าวคือพันธู์ปานกลาง (PB-235) จะพบการสร้างลิกนินในเนื้อใบมากกว่าในพันธู์ต้านทาน (BPM-24 และ RRIT251) และพันธู์ RRIT251 ซึ่งมีความต้านทานสูงกว่า BPM-24 เล็กน้อย (ดูจากการสร้างสคอพอลิตินในเนื้อใบที่ต่ำกว่าในรูปที่ 48) ก็จะมีการสร้างลิกนินต่ำกว่า BPM-24 ด้วย ส่วนพันธู์อ่อนแอ (RRIM600) ก็จะไม่มีการสร้างลิกนินเหมือนกับการสร้างสคอพอลิติน ดังนั้นสมมุติฐานเรื่อง R receptor และ S receptor จะใช้อธิบายได้ทั้งการสร้างสคอพอลิตินและการสร้างลิกนิน เพราะเหตุนี้ทั้งคู่เป็น downstream ที่เกิดขึ้นหลังจากอิลิซิตินจับกับ Receptor โดยลิกนินจะพบสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง ส่วนสคอพอลิตินพบสูงสุดที่ 8 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับ Guest และ Brown (1997) ที่แสดงลำดับการตอบสนองของพืชที่ถูกบุกรุกจากเชื้อก่อโรคคือมีการสร้างลิกนินก่อนการสร้างสคอพอลิติน และเหตุการณ์ทั้งคู่จัดเป็น early responses ของพืชเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้าง PR-proteins และ SAR

การทดลองด้วยอิลิซิตินพบลิกนินในท่อลำเลียงเป็นส่วนใหญ่ เวลาที่พบลิกนินสูงสุดคือที่เวลา 6 ชั่วโมงเร็วกว่าการบ่มด้วยชูโอสปอร์ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะอิลิซิตินเข้าสู่เซลล์พืชได้เร็วอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งใบ ในขณะที่ชูโอสปอร์ต้องใช้เวลาในการปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์และแทงผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อ เพื่อกระตุ้นการตอบสนองในการป้องกันตัวเองของพืชรวมทั้งการสร้างลิกนินด้วย (Kombrink *et al.*, 1988) ดังนั้นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยชูโอสปอร์จึงใช้เวลานานกว่าที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิติน

ชุดควบคุม

ชุดทดลอง



รูปที่ 50 ปฏิกริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นไบโอยางพันธุ์ต่างๆ ด้วยอิลิซิดินปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัมใบไม้ ที่เวลา 6 ชั่วโมง (กำลังขยาย 40 เท่า)