

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการเตรียมอิลลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*

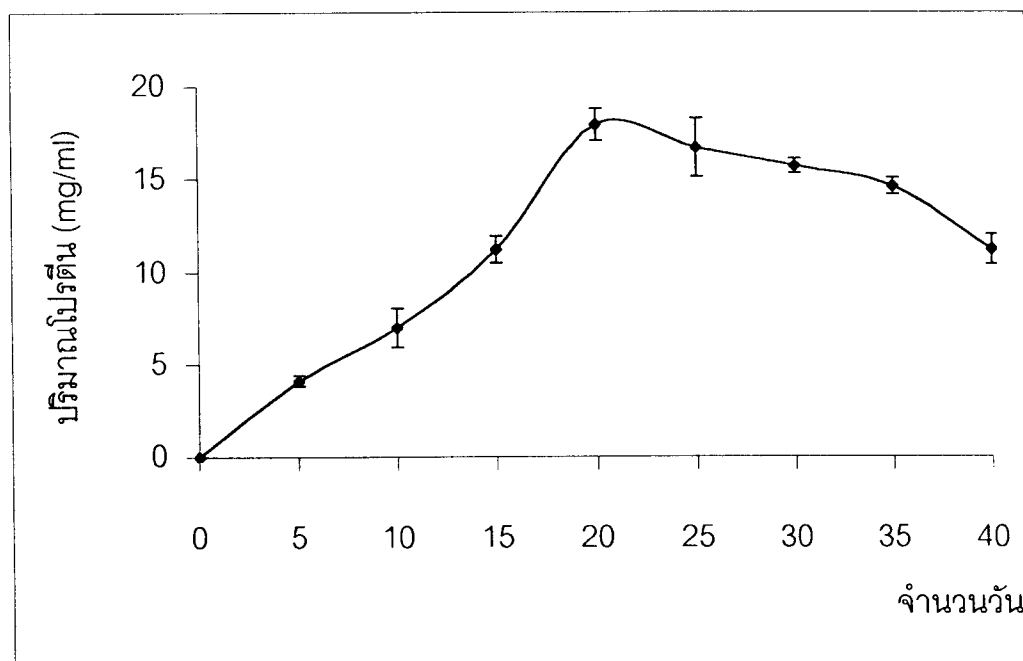
เลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa* ในอาหารเหลว PDB โดยเขย่าด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นตรวจหาปริมาณโปรตีนรวม (total protein) โดยวิธีของแบรดฟอร์ด ในน้ำเลี้ยงเชื้อราทุกๆ 5 วัน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าโปรตีนรวมในน้ำเลี้ยงเชื้อราจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และคงที่หลังจากเลี้ยงไปประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นเริ่มลดลงเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 เดือน ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 8 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้น้ำเลี้ยงเชื้อราที่เวลา 3 สัปดาห์ในการเตรียมอิลลิซิดินให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนรวมใน PDB ที่ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*

จำนวนวัน	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
5	4.1 ± 0.25
10	7.0 ± 0.85
15	11.2 ± 0.59
20	17.9 ± 0.70
25	16.7 ± 1.30
30	15.7 ± 0.34
35	14.6 ± 0.37
40	11.2 ± 0.67

ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

mg/ml = มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

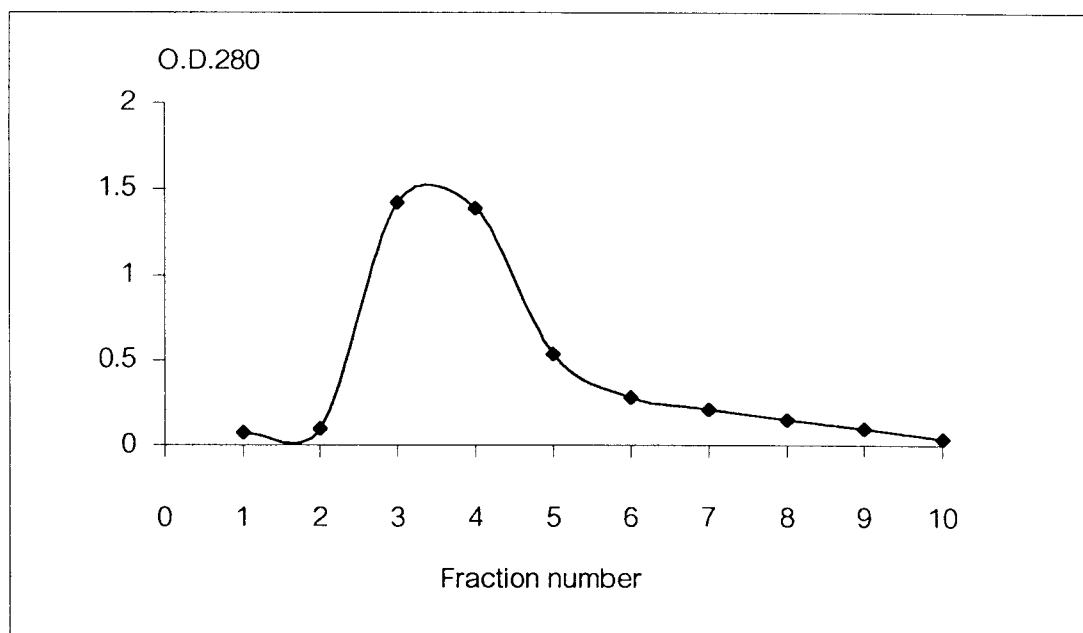


รูปที่ 8 กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของโปรตีนรวมใน PDB ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*

3.2 ผลการเตรียมอิลลิซิดินให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*

3.2.1 ผลการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอน

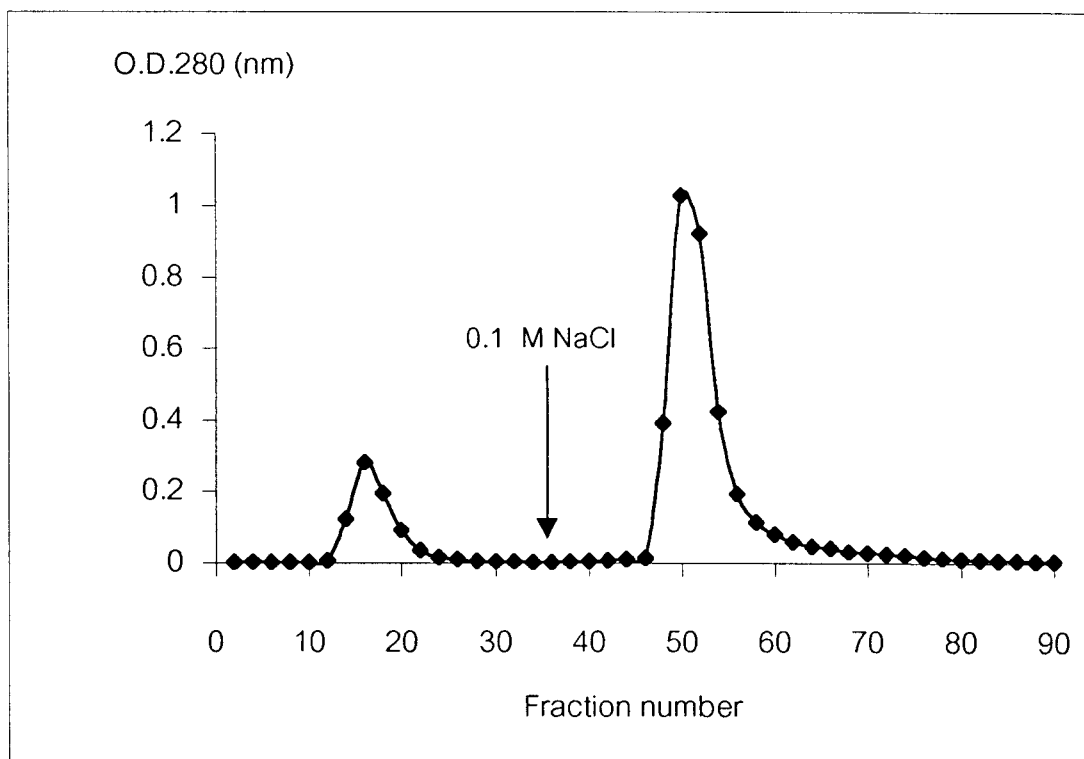
เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราปริมาตร 1 ลิตร มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 90% จากนั้นหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีกรดไบซินโคนิคเนื่องจากอิลลิซิดินมีกรดอะมิโนชนิดเบส เช่น ไลซีนน้อยมาก จึงทำให้มีความไวต่อ Bradford reagent ต่ำ จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวม 134.3 ± 5.90 มิลลิกรัม คิดเป็น 100% จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา 1 ลิตร จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายกลับใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วจึงกำจัดเกลือออกไปด้วยคอลัมน์ PD-10 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค (รูปที่ 9) ซึ่งเป็นพีคที่เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ (major peak) และมีความเป็นพิษ (toxicity) คือ เมื่อนำไปทดสอบกับไบบางแล้วทำให้ไบบางเกิดนิโคริซิสได้ พบว่ามีปริมาณโปรตีน 125.3 ± 4.0 มิลลิกรัม คิดเป็น 93.3 % จากโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4)



รูปที่ 9 กราฟแสดงการแยกสารละลายอิธิซิทินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา ปริมาตร 1 ลิตร โดยคอลัมน์ PD-10: นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายกลับใน 10 มิลลิลิตรของ 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ผ่านลงในคอลัมน์ PD-10 ครั้งละ 1 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส ชะคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร

3.2.2 ผลการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose

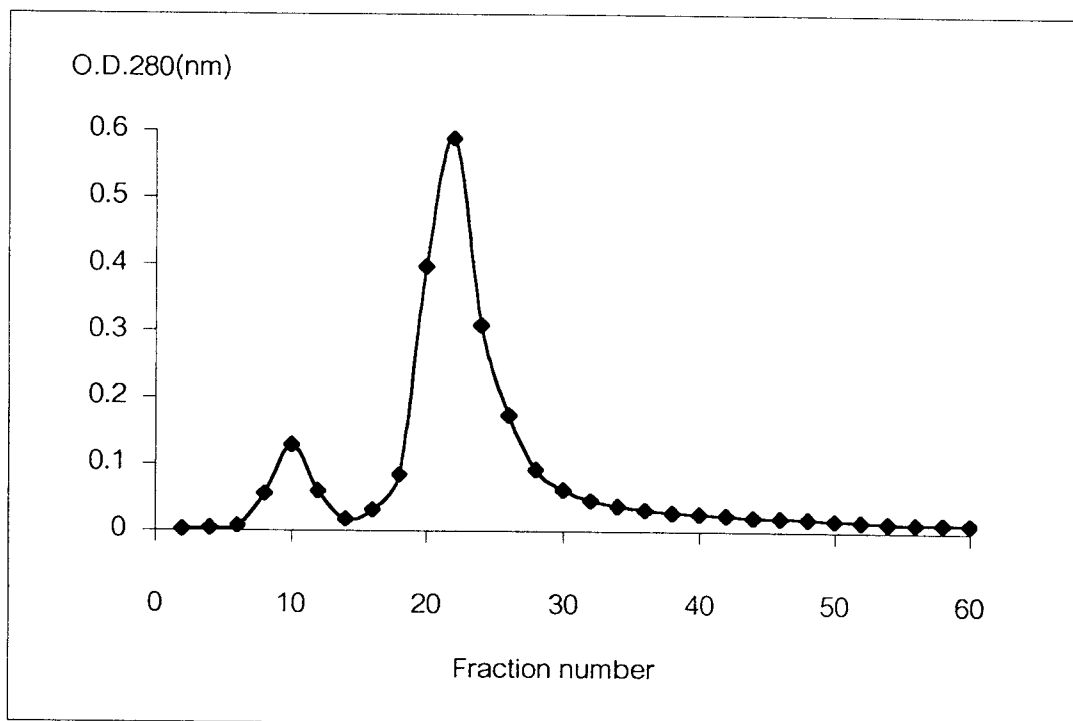
เมื่อนำสารละลายอิธิซิทินที่แยกได้จากคอลัมน์ PD-10 ปริมาณ 125.3 ± 4.0 มิลลิกรัม (จากข้อ 3.2.1) ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose แล้วชะคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 จนค่า O.D. 280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ต่อด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 1 พีค (รูปที่ 10) เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงและสามารถทำให้โบบางพาราเกิดนิโครซิสได้เข้าด้วยกัน (fraction 48-60) แล้วหาปริมาณโปรตีนรวม พบว่าสารละลายที่ได้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 72.9 ± 10.4 มิลลิกรัม คิดเป็น 54.0% จากโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4) จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหิดแห้ง เพื่อทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยคอลัมน์ Sephadex G-50



รูปที่ 10 กราฟแสดงการแยกสารละลายอีลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 ลิตร โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose : นำสารละลายโปรตีน 125.3 ± 4.0 มิลลิกรัมผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose (2.5×25 เซนติเมตร) ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้น้ำบัฟเฟอร์ด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ด้วยอัตราไหลผ่านคอลัมน์ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงจนค่า O.D.280 เข้าใกล้ศูนย์แล้วจะต่อด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิมเก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร

3.2.3 ผลการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-50

เมื่อนำสารละลายโปรตีนเข้มข้นที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose ปริมาณ 72.5 ± 4.0 มิลลิกรัม (จากข้อ 3.2.2) ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-50 แล้วจะคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค (รูปที่ 11) พีคที่เป็นโปรตีนส่วนใหญ่และสามารถทำให้ไบยางเกิดนีโครซิสได้ มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15.8 ± 3.4 มิลลิกรัม คิดเป็น 11.8 % จากโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 4) รวมสารละลายหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงและทำให้ไบยางเกิดนีโครซิสเข้าด้วยกัน (fraction 18-30) จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหิดแห้ง เพื่อนำไปใช้งานต่อไป



รูปที่ 11 กราฟแสดงการแยกสารละลายอีลิซิดินจากน้ำเลี้ยงเชื้อราปริมาณ 1 ลิตรโดยคอลัมน์ Sephadex G-50 : นำสารละลายโปรตีน 72.5 ± 10.4 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-50 (1.5×150 เซนติเมตร) ที่ 4 องศาเซลเซียส ๒๕ คอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ด้วยอัตราไหลผ่านคอลัมน์ 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า O.D. 280 เข้าใกล้ศูนย์ เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร

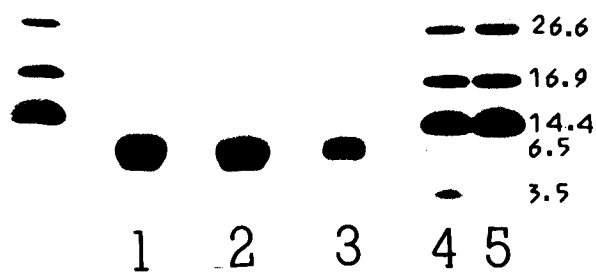
ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีนรวมและ % yield ในขั้นตอนต่างๆของการเตรียมอีลิซิดินให้บริสุทธิ์ จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา ปริมาตร 1 ลิตร

Purification steps	Total protein (mg)	Yield (%)
Ammonium sulfate precipitation	134.3 ± 5.9	100
PD-10 column	125.3 ± 4.0	93.3
DEAE-cellulose	72.5 ± 10.4	54.0
Sephadex G-50	15.8 ± 3.4	11.8

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)

3.2.4 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิลิซิดิน

ในการติดตามการทำอิลิซิดินให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa* ซึ่งตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 90% แล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-50 ตามลำดับ รวมถึงการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิลิซิดินก่อนนำไปใช้งานด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (Tricine-SDS-PAGE) แล้วย้อมเจลดด้วยซิลเวอร์ไนเตรต พบว่าขั้นตอนต่างๆที่ใช้สามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆออกไปจนเหลือเฉพาะอิลิซิดินในสารละลายเท่านั้นเนื่องจากปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ (รูปที่ 12) และเมื่อนำน้ำหนักโมเลกุลของแถบอิลิซิดินโดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน พบว่าอิลิซิดินจากเชื้อรา *P. botryosa* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 ดาลตันสอดคล้องกับ palmivorein ซึ่งเป็นอิลิซิดินที่ทำบริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* (Chungchow and Rattarasam, 2000) และงานวิจัยอื่นๆที่ได้กล่าวมาแล้ว รูปที่ 12 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการเตรียมอิลิซิดินให้บริสุทธิ์



รูปที่ 12 แบบแผนของแถบโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอสของอิทธิ-
ตินบริสุทธิ์ ย้อมเจดด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

แถวที่ 1 คือแถบโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วกำจัด
เกลือออกด้วยคอลัมน์ PD-10 (1.6 μ g)

แถวที่ 2 คือแถบโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ DEAE-cellulose (1.2 μ g)

แถวที่ 3 คือแถบโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ Sephadex G-50 (0.5 μ g)

แถวที่ 4 คือแถบโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย Triosephosphate isomerase 26.6
kDa, Myoglobin 16.9 kDa, α -lactalbumin 14.4 kDa, Aprotinin 6.5 kDa
ตามลำดับ รวมทั้งอินซูลินขนาด 3.5 kDa

แถวที่ 5 คือแถบโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย Triosephosphate isomerase 26.6
kDa, Myoglobin 16.9 kDa, α -lactalbumin 14.4 kDa, Aprotinin 6.5 kDa
ตามลำดับ

3.3 ผลการศึกษาลักษณะและขนาดของนิโครซิสหลังจากกระตุ้นไบบางพาราด้วย ชูโอสปอร์และอิลิซิดินที่เตรียมได้จากเชื้อรา *P. botryosa*

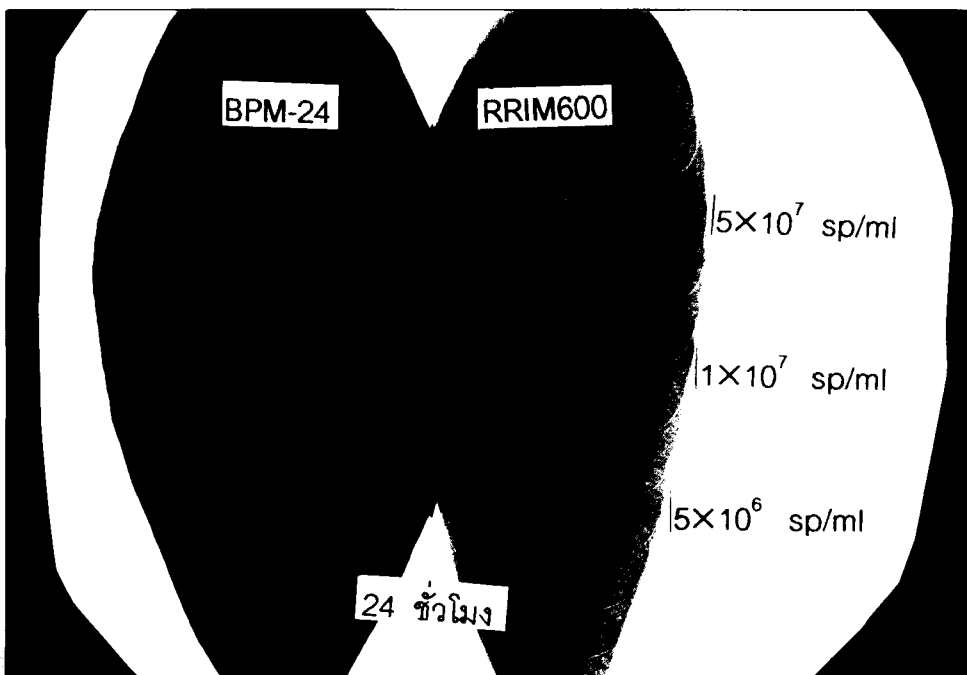
3.3.1 ผลการเตรียมชูโอสปอร์จากเชื้อรา *P. botryosa*

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa* บนอาหาร PDA พบว่ามีการสร้างสปอร์แรงเจียมในอาหารชนิดนี้น้อยมาก ดังนั้นจึงต้องถ่ายเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร Lima bean agar เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์แรงเจียมมากขึ้น (Chee, 1969) แต่เมื่อทำการสกัดชูโอสปอร์ออกมา พบว่ามีปริมาณไม่มากพอสำหรับการทดลองเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อรานั้นงาน ถ้าใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จะได้ชูโอสปอร์เข้มข้นเพียง 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรเท่านั้น และ Lima bean agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพงมากจึงต้องถ่ายเชื้อรานี้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ซึ่งในการทดลอง ผู้วิจัยได้นำ ถั่วแดง ถั่วลิสง ถั่วเขียว (ถั่วชิก) ถั่วเหลือง และแครอท มาใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแทน Lima bean agar โดยการเจือจางอาหารต่างๆ ให้ความเข้มข้นเป็น 5 % 10 % และ 20 % ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 10% ถั่วชิกกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์แรงเจียมมากที่สุด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 10 % ถั่วชิกหนึ่งงาน เมื่อใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร จะได้ชูโอสปอร์มากถึง 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพียงพอสำหรับการนำไปใช้งานต่อไป ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นๆ สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์แรงเจียมเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อสกัดชูโอสปอร์ออกมา พบว่ามีปริมาณน้อยกว่า 10% ถั่วชิก ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 10% ถั่วชิกในการเตรียมชูโอสปอร์จากเชื้อรา *P. botryosa*

3.3.2 ผลการศึกษาลักษณะและขนาดนิโครซิสหลังจากกระตุ้นไบบางพาราด้วยชูโอสปอร์

เมื่อนำชูโอสปอร์ (จากข้อ 3.3.1) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5×10^6 , 1×10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แล้วนำมาหยดบนไบบาง พบว่าทั้งสามความเข้มข้นของชูโอสปอร์ที่นำมาใช้สามารถกระตุ้นให้เซลล์บริเวณที่ทำการปลูกเชื้อไบบางพันธุ์ BPM-24 เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำคล้ายรอยไหม้ (นิโครซิส) มีขอบเขตของบาดแผลที่ชัดเจน โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลแปรผันตามความเข้มข้นของชูโอสปอร์ที่ใช้และนอกจากนี้ยังแปรผันตามเวลาที่บ่มอีกด้วย (ตารางที่ 5 และ รูปที่ 13-15) เห็นได้จากที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมงขนาดของบาดแผลโตขึ้นกว่าเดิมและเริ่มแผ่บริเวณกว้างออกไป ส่วนไบบางพาราพันธุ์ RRIM600 นิโครซิสมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอ่อน ขอบเขตของบาดแผลไม่ชัดเจน ที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมงรอยไหม้แผ่กว้างออกไปเรื่อยๆ ลูกกลมเกือบทั้งใบจนไม่สามารถวัดขนาดของบาดแผลได้ และเมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 96 ชั่วโมง พบว่ารอยไหม้จะลูกกลมตลอดทั้งใบ จนสังเกตเห็นอาการเน่าของ

ไบและมีการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราบนไบอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงถึงการเกิดโรคหรือเกิดปฏิกิริยา compatible นั้นเอง ในขณะที่ไบยี่ห้อ BPM-24 มีความสามารถกับบริเวณเชื้อราไม่ให้แพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้หรือเกิดปฏิกิริยา incompatible แต่ที่ความเข้มข้นสูงคือ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลในชั่วโมงที่ 72 แตกต่างกับชั่วโมงที่ 96 อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5 รูปที่ 15) ซึ่งให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อราให้มากขึ้นก็อาจเปลี่ยนเป็นปฏิกิริยา compatible ได้ และในการทดลองชุดควบคุมไม่พบการเกิดนีโครซิส



รูปที่ 13 การเกิดนีโครซิสหลังบ่มด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างไบยี่ห้อพาราพันธุ์ต้านทาน/อ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)



BPM-24

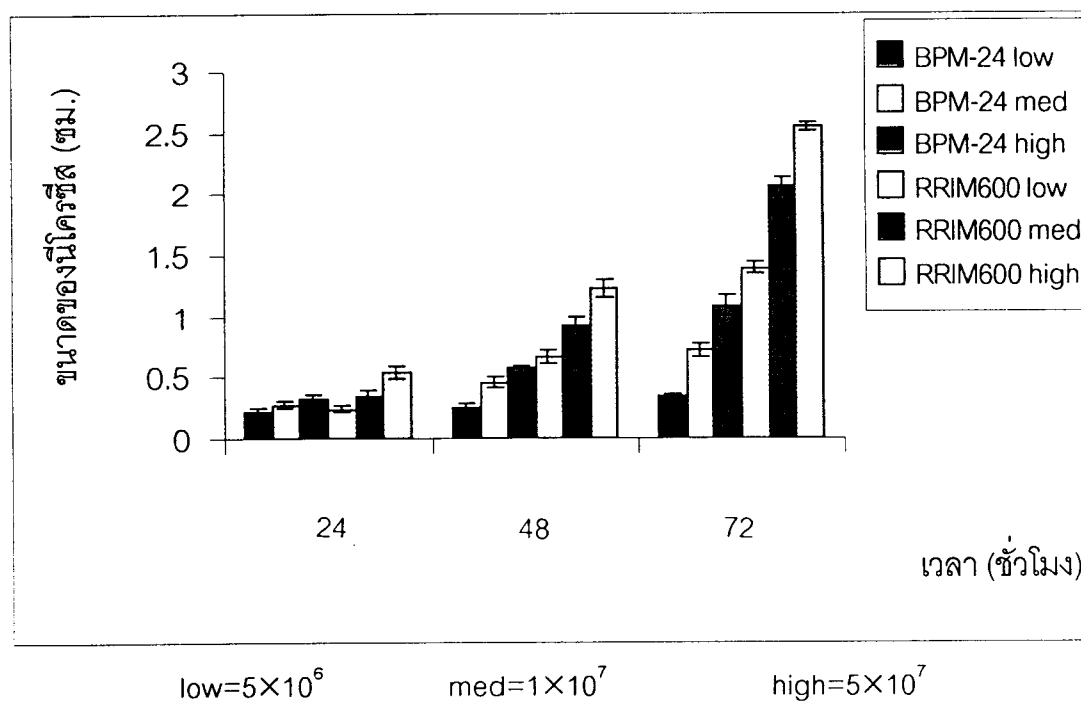
RRIM-600

รูปที่ 14 การเกิดนิโคโรซิสหลังบ่มด้วยซูเปอร์ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างโบยางพาราฟันรู้ด้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ตารางที่ 5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของนีโครซิสหลังจากบ่มไบบางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) ด้วยซูโอสปอร์

เวลา (ชม.)	ขนาดของนีโครซิสในไบบางพาราพันธุ์ BPM-24/RRIM600 (ชม.)					
	5×10^6 sp/ml (low)		1×10^7 sp/ml (med)		5×10^7 sp/ml (high)	
	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600
24	0.22±0.02	0.24±0.03	0.28±0.02	0.35±0.04	0.33±0.04	0.54±0.05
48	0.26±0.03	0.67±0.05	0.46±0.04	0.93±0.06	0.57±0.02	1.23±0.06
72	0.34±0.03	1.40±0.04	0.73±0.05	2.06±0.08	1.09±0.09	2.55±0.04
96	0.44±0.03	2.71±0.04	0.86±0.03	ลามทั้งใบ	1.75±0.04	ลามทั้งใบ

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

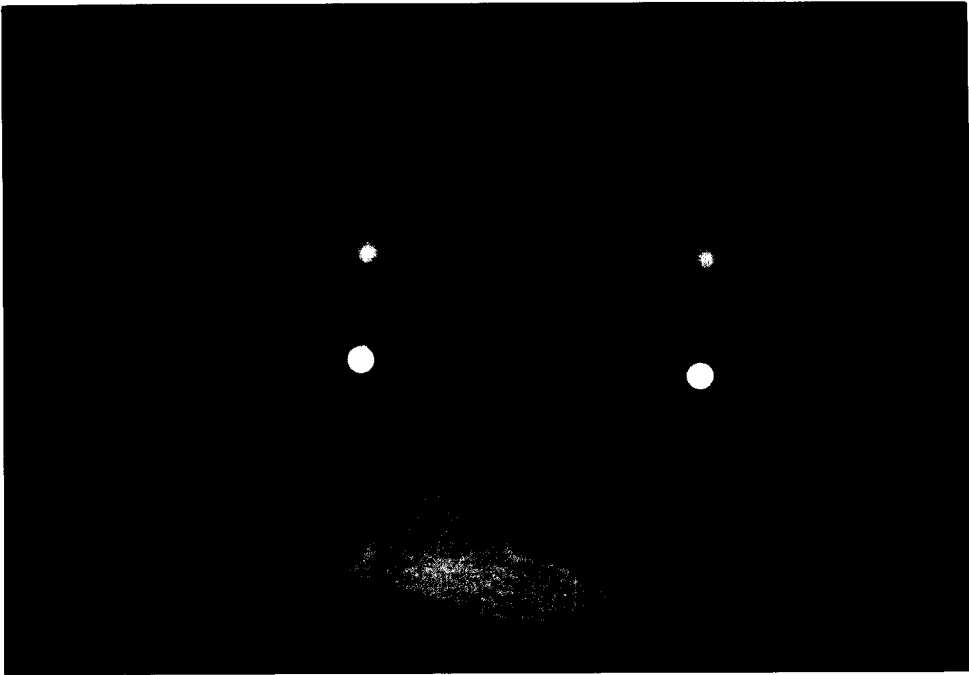


รูปที่ 15 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของนีโครซิสหลังบ่มไบบางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) ด้วยซูโอสปอร์

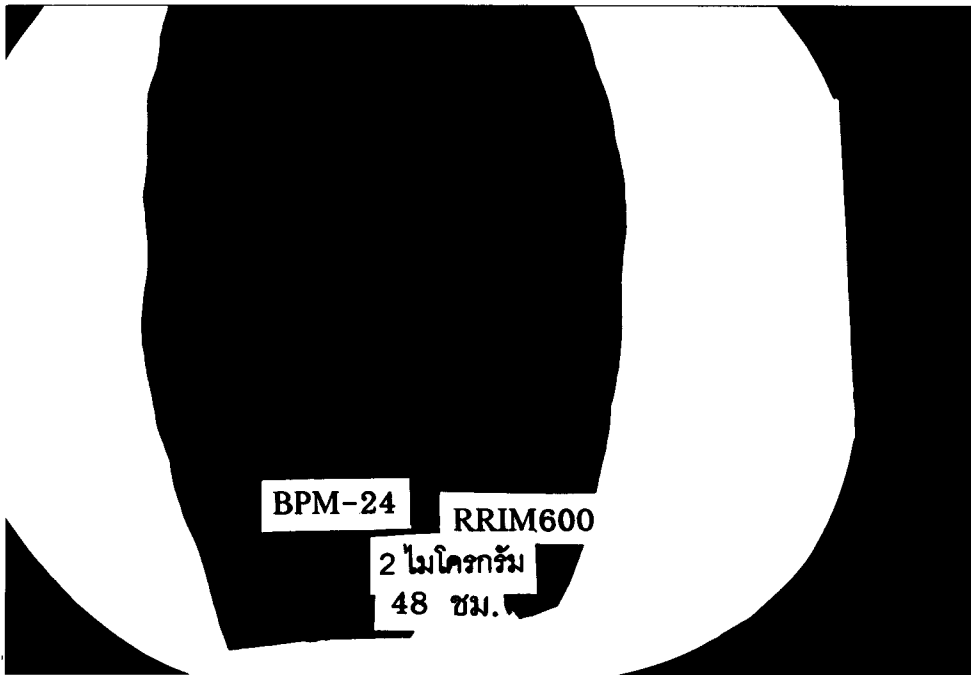
3.3.3 ผลการหาความเข้มข้นของ Tween-20 ที่เหมาะสมต่อการทำงานของอิลิซิดิน

เมื่อนำอิลิซิดินเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรใน Tween-20 ซึ่งเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05%, 0.1%, 0.2% และ 0.5% ตามลำดับ แล้วนำมาหยดทางด้านหลังของใบยางพารา จากนั้นสังเกตผลการทดลองด้วยตาเปล่า โดยการนำใบยางมาส่องดูได้แสงอุลตราไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 6-8 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 % Tween-20 มีสารเรืองแสงในหยด inoculum สังเกตเห็นได้ชัดเจน โดยปริมาณสารเรืองแสงแปรผันตามความเข้มข้นของ Tween-20 ที่ใช้ แต่ที่ความเข้มข้น 0.5% Tween-20 มีสารเรืองแสงในหยด inoculum น้อยกว่าที่ 0.2 % Tween-20 (รูปที่ 16) และเมื่อเวลาผ่านไปจนครบ 24 ชั่วโมงสังเกตเห็นการเรืองแสงลดลงอย่างชัดเจน และไม่เห็นการเรืองแสงในชุดควบคุม

ส่วนนีโครซิสที่เกิดขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของ Tween-20 ที่ใช้ (รูปที่ 17) แสดงว่า Tween-20 สามารถใช้เป็นตัวนำอิลิซิดินเข้าไปภายในเซลล์ของใบยางได้ โดยขึ้นกับปริมาณที่ใช้ แต่ถ้าใช้ปริมาณมากเกินไปจะทำให้เซลล์บริเวณนั้นตายอย่างรวดเร็ว สังเกตได้จากที่ความเข้มข้น 0.5% สารเรืองแสงที่เซลล์สร้างขึ้นน้อยกว่าที่ความเข้มข้น 0.2% แต่แผ่นนีโครซิสมีขนาดใหญ่กว่า ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ 0.2% Tween-20 ในการทดสอบใบยางเพื่อศึกษาลักษณะและขนาดของนีโครซิส, การสังเคราะห์สคอพอลิดิน, การสังเคราะห์ PR-proteins และ ปฏิกริยาการสร้างลิกนิน



รูปที่ 16 ลักษณะการเรืองแสงได้แสง UV หลังจากกระตุ้นไบยางด้วยอิทธิพลเข้มข้น 2 ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร ใน 0.05 %, 0.1 %, 0.2 % และ 0.5 % Tween-20 ตามลำดับ จากบนลงล่าง เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างไบยางพาราพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

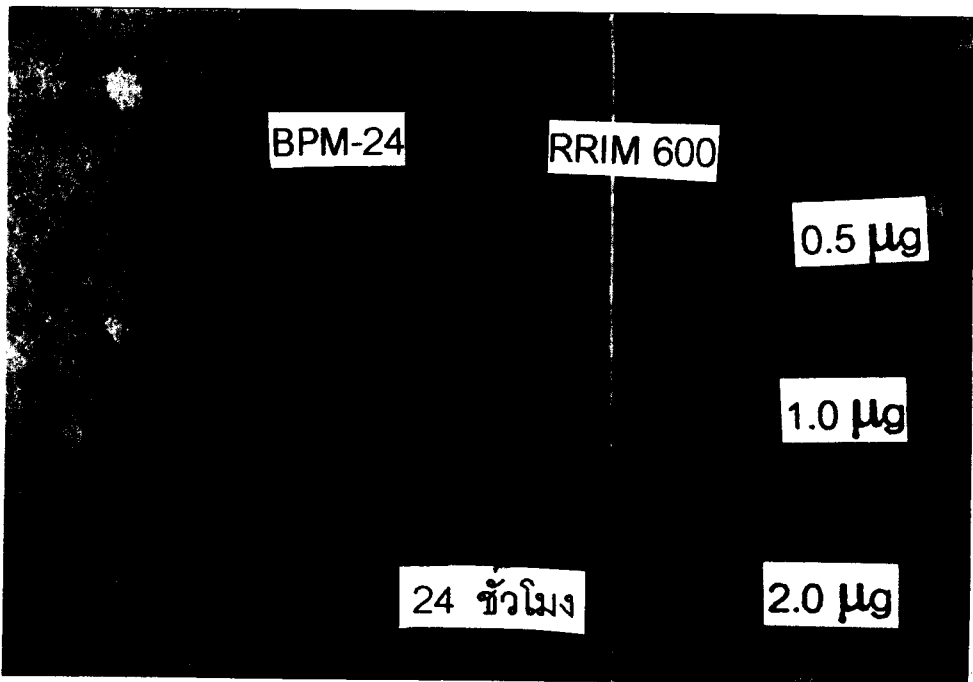


รูปที่ 17 การเกิดนิโคโรซิสหลังจากกระตุ้นไบยางด้วยอิลิซิดินเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ใน 0.05%, 0.1%, 0.2% และ 0.5% Tween-20 ตามลำดับ จากบนลงล่าง เมื่อเวลาผ่านไป จนครบ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างไบยางพาราพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) ซีกซ้ายของแต่ละไบวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม) ส่วนซีกขวาวางหยด อิลิซิดิน (ชุดทดลอง)

3.3.4 ผลการศึกษาลักษณะและขนาดของนิโคโรซิสหลังจากกระตุ้นไบบางด้วยอิลิซิดิน

นำสารละลายอิลิซิดิน (จากข้อ 3.2.4) มาเจือจางในสารละลาย 0.2 % Tween-20 ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาหยดบนไบบางพาราทั้งสองพันธุ์จากการทดลองพบว่าทั้งสามความเข้มข้นของอิลิซิดินที่นำมาใช้สามารถกระตุ้นให้ไบบางพาราทั้งสองพันธุ์เกิดแผลนิโคโรซิสได้ตั้งแต่วันที่ 24 โดยแผลนิโคโรซิสที่เกิดขึ้นบนไบบางพันธุ์ BPM-24 มีลักษณะเป็นวงกลม มีสีน้ำตาลเข้ม สังเกตเห็นได้ชัดเจนเนื่องจากมีขอบเขตของบาดแผลที่แน่นอน และขนาดของนิโคโรซิสยังแปรผันตามความเข้มข้นของอิลิซิดินที่ใช้ ส่วนไบบางพันธุ์ RRIM600 แผลนิโคโรซิสมีลักษณะเป็นจุดเล็กๆสีน้ำตาลค่อนข้างอ่อน ทำให้ยากต่อการสังเกตผล โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เนื่องจากขอบเขตของบาดแผลไม่แน่นอน ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นเช่นกัน เมื่อเวลาผ่านไปจนครบ 72 และ 96 ชั่วโมงพบว่าในแต่ละความเข้มข้นของอิลิซิดินที่ใช้ทดสอบสามารถกระตุ้นไบบางพาราทั้งสองพันธุ์ให้เกิดลักษณะและขนาดของนิโคโรซิสที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชั่วโมงที่ 24 และไม่พบนิโคโรซิสในการทดลองชุดควบคุม (ตารางที่ 6 รูปที่ 18 และ 19)

จากการทดลองเห็นว่าลักษณะและขนาดของนิโคโรซิสที่เกิดขึ้นในไบบางพาราทั้งสองพันธุ์ไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละความเข้มข้นของอิลิซิดินที่ใช้ในการทดลอง แต่ก็สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์หรือระดับความต้านทานได้ แม้จะไม่ชัดเจนเท่ากับการบ่มไบบางด้วยซูโฮสปอร์ของเชื้อราโดยตรง แต่ท็อกซินของเชื้อรานี้ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองในพืชโดยการตายของเซลล์หรือนิโคโรซิสเช่นเดียวกับ palmivorein ซึ่งเป็นอิลิซิดินที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* ที่สามารถทำให้ไบบางพาราเกิดนิโคโรซิสและเกิดอาการเหี่ยวด้วย (Chumgchow and Rattarasarn, 2000)

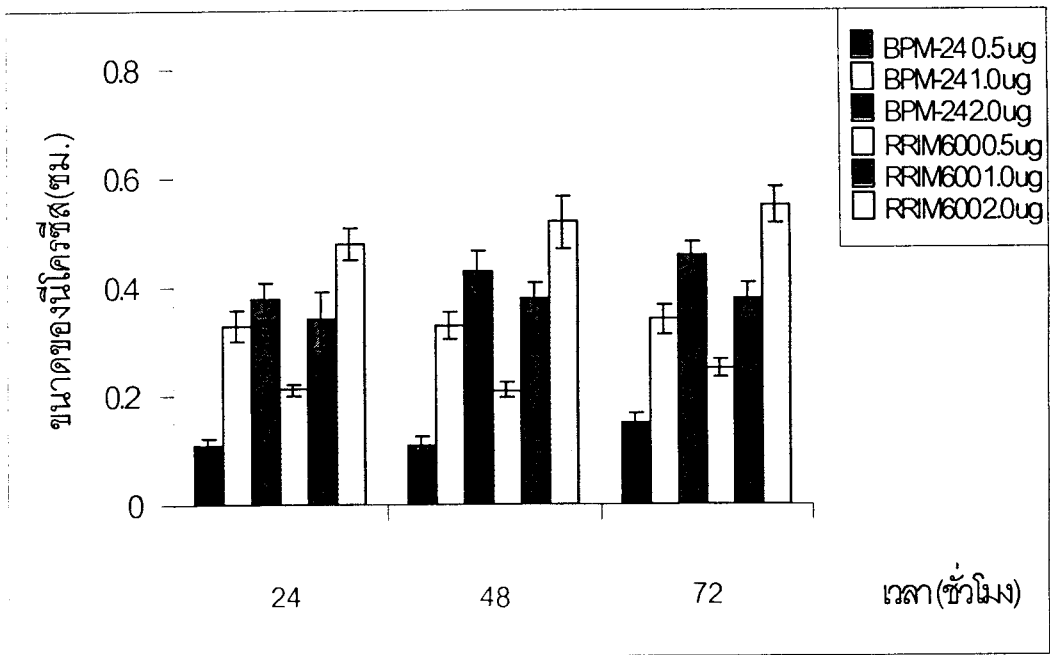


รูปที่ 18 การเกิดเนโครซิสหลังการกระตุ้นใบยางด้วยสารละลายอิลิซิดินที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างใบยางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM 600)

ตารางที่ 6 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของนีโครซิสหลังจากกระตุ้นไบบางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) ด้วยอิลิซิดิน

เวลา (ชม.)	ขนาดของนีโครซิสในไบบางพาราพันธุ์ BPM-24/RRIM600 (ชม.)					
	0.5 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		1 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		2 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600
24	0.11 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	0.33 \pm 0.03	0.34 \pm 0.05	0.38 \pm 0.03	0.48 \pm 0.03
48	0.11 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	0.33 \pm 0.02	0.38 \pm 0.03	0.43 \pm 0.04	0.52 \pm 0.05
72	0.15 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	0.34 \pm 0.03	0.38 \pm 0.03	0.46 \pm 0.02	0.55 \pm 0.03
96	0.16 \pm 0.03	0.31 \pm 0.03	0.36 \pm 0.01	0.43 \pm 0.03	0.49 \pm 0.04	0.56 \pm 0.04

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)



รูปที่ 19 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของนีโครซิสหลังกระตุ้นไบบางพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) ด้วยอิลิซิดิน

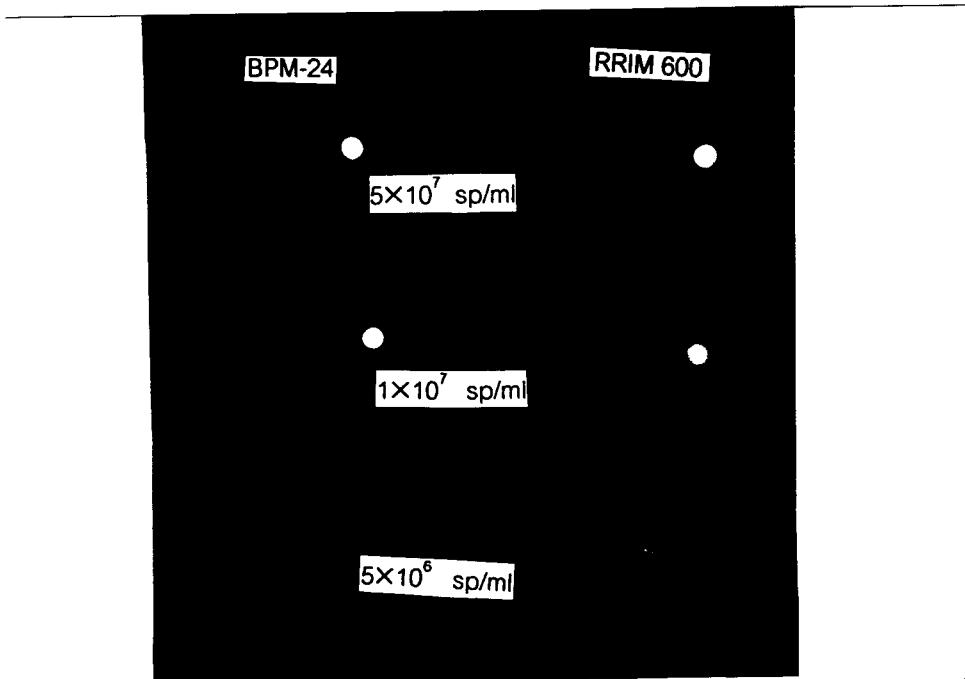
3.4 ผลการศึกษาการสังเคราะห์ไฟโตเอเล็กซินหลังจากกระตุ้นไบบางด้วยซูอิสปอร์และอิลิซิดินที่เตรียมได้จากเชื้อรา *P. botryosa*

3.4.1 ผลการบ่มเชื้อราบนไบบางด้วยซูอิสปอร์

หลังจากนำซูอิสปอร์ความเข้มข้น 5×10^6 , 1×10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับมาหยดบนไบบางพารา เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงนำไบบางมาส่องดูได้แสงอุลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตรพบว่าที่ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไบบางพาราทั้งสองพันธุ์เริ่มมีสารเรืองแสงในหยดซูอิสปอร์ โดยที่เห็นการเรืองแสงในไบบางพันธุ์ BPM-24 ได้ชัดเจนกว่าไบบางพันธุ์ RRIM600 และที่ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เริ่มมีสารเรืองแสงในหยดซูอิสปอร์เฉพาะไบบางพันธุ์ BPM-24 เท่านั้น ส่วนที่ความเข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรไม่เห็นการเรืองแสงของไบบางทั้งสองพันธุ์

เมื่อเวลาผ่านไปอีก 4 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 8) ที่ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถสังเกตเห็นการเรืองแสงในหยดซูอิสปอร์บนไบบางพาราทั้งสองพันธุ์ได้อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ จึงต้องนำสารเรืองแสงไปวัดหาปริมาณด้วยเครื่อง spectrofluorometer ส่วนที่ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไบบางพันธุ์ RRIM600 เริ่มมีสารเรืองแสงในหยดซูอิสปอร์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไบบางพันธุ์ BPM-24 แล้วพบว่า ไบบางพันธุ์ RRIM600 เรืองแสงได้น้อยกว่าไบบางพันธุ์ BPM-24 อย่างชัดเจน และที่ความเข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไบบางทั้งสองพันธุ์เริ่มมีสารเรืองแสงในหยดซูอิสปอร์แต่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ ในขณะที่การทดลองชุดควบคุมไม่มีการเรืองแสงเลย (รูปที่ 22)

4 ชั่วโมงต่อมา (ชั่วโมงที่ 12) สปอร์ทั้งสามความเข้มข้นกระตุ้นให้ไบบางสร้างสารเรืองแสงได้ใกล้เคียงกันเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า แต่จากการวัดหาปริมาณด้วยเครื่อง spectrofluorometer สามารถบอกความแตกต่างได้ เมื่อเวลาผ่านไปการเรืองแสงจะขยายวงกว้างไปเรื่อยๆ ตามบาดแผลที่ถูกلامออกไปด้วย และเนื่องจากพันธุ์ RRIM600 มีการลุกลามของเชื้อโรคเร็วกว่าพันธุ์ BPM-24 ดังนั้นที่เวลา 72 –96 ชั่วโมงของพันธุ์ RRIM600 มักมีการกระจายของสารเรืองแสงลงไปในกระดาดากรองซึ่งใช้สำหรับให้ความชื้นกับไบบางด้วย



รูปที่ 20 ลักษณะการเรืองแสงได้แสง UV เมื่อใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 กับ RRIM600 ถูกบ่มด้วยเชื้อโอสปอร์เข้มข้น 5×10^7 , 1×10^7 และ 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซีกซ้ายของแต่ละใบวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม) ส่วนซีกขวาวางหยดเชื้อโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ

3.4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไฟโตเล็กซินที่ได้จากการบ่มไบยางด้วยซูโอสปอร์

หลังจากบ่มเชื้อบนไบยาง ดูนํ้าบริเวณที่หยดเชื้อ (inoculum) แต่ละหยดกลับคืนมาเมื่อเวลาผ่านไป 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของไฟโตเล็กซิน โดยนำสารตัวอย่างที่เวลาต่างๆมากรองผ่านกระดาษกรองแล้วเจือจางด้วยนํ้ากลั่นก่อนนำไปวัดการเรืองแสง คำนวณหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิติน ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 - 0.05 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบปริมาณอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของไบยางพาราทั้งสองพันธุ์และในแต่ละความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้ ผลการวิเคราะห์พบว่าที่ความเข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ไบยางพาราทั้งสองพันธุ์ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินด้วยอัตราเร็วและปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยไบยางพันธุ์ BPM-24 ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินสูงกว่าเล็กน้อย (ตารางที่ 7 รูปที่ 21) ส่วนที่ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไบยางพันธุ์ BPM-24 ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตินด้วยอัตราเร็วและปริมาณที่สูงกว่าไบยางพันธุ์ RRIM600 ประมาณ 2 เท่า ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 48 และเป็นช่วงเวลาที่มีการสร้างสคอพอลิตินได้สูงสุด จากนั้นปริมาณการสร้างสคอพอลิตินจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 72 และ 96 ชั่วโมงแต่ไบยางพันธุ์ RRIM600 ยังคงสร้างมากขึ้นที่ 72 ชั่วโมง แล้วลดลงเล็กน้อยเมื่อครบ 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 7 รูปที่ 21) ทั้งนี้เนื่องจากสคอพอลิตินเป็นสารปฏิชีวนะที่ไบยางพันธุ์ต้านทานสร้างขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ดังนั้นเมื่อสามารถควบคุมเชื้อไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงได้แล้วปริมาณการสร้างจึงลดลง ในขณะที่ไบยางพันธุ์อ่อนแอสร้างได้ช้าและน้อยกว่าซึ่งไม่สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้ จึงยังคงมีการสร้างสคอพอลิตินต่อไปเรื่อยๆ (สามารถสังเกตผลการทดลองร่วมกับการเกิดนิโคโรซิส) และที่ความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ไบยางพาราพันธุ์ BPM-24 สามารถสร้างสคอพอลิตินในปริมาณที่มากกว่าและมีอัตราเร็วในการสร้างที่สูงกว่าไบยางพันธุ์ RRIM600 อย่างชัดเจนและเป็นช่วงเวลาที่มีการสร้างได้สูงสุด จากนั้นปริมาณการสร้างจะค่อยๆลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แต่ยังมีระดับของสคอพอลิตินที่สูงมาก ที่ความเข้มข้นสูงแม้ไบยางพาราพันธุ์ BPM-24 สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้น้อย (สังเกตผลร่วมกับการเกิดนิโคโรซิสซึ่งมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 1.75 เซนติเมตร เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นระดับกลาง และเริ่มเห็นอาการเน่าของไบยาง) (ตารางที่ 5 รูปที่ 15) ซึ่งให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อราให้มากขึ้น ปฏิกริยา incompatible สามารถเปลี่ยนเป็น compatible ได้ ในขณะที่ไบยางพันธุ์ RRIM600 สร้างสคอพอลิตินได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมงแล้วลดลงเมื่อครบ 72 และ 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 7 รูปที่ 21)

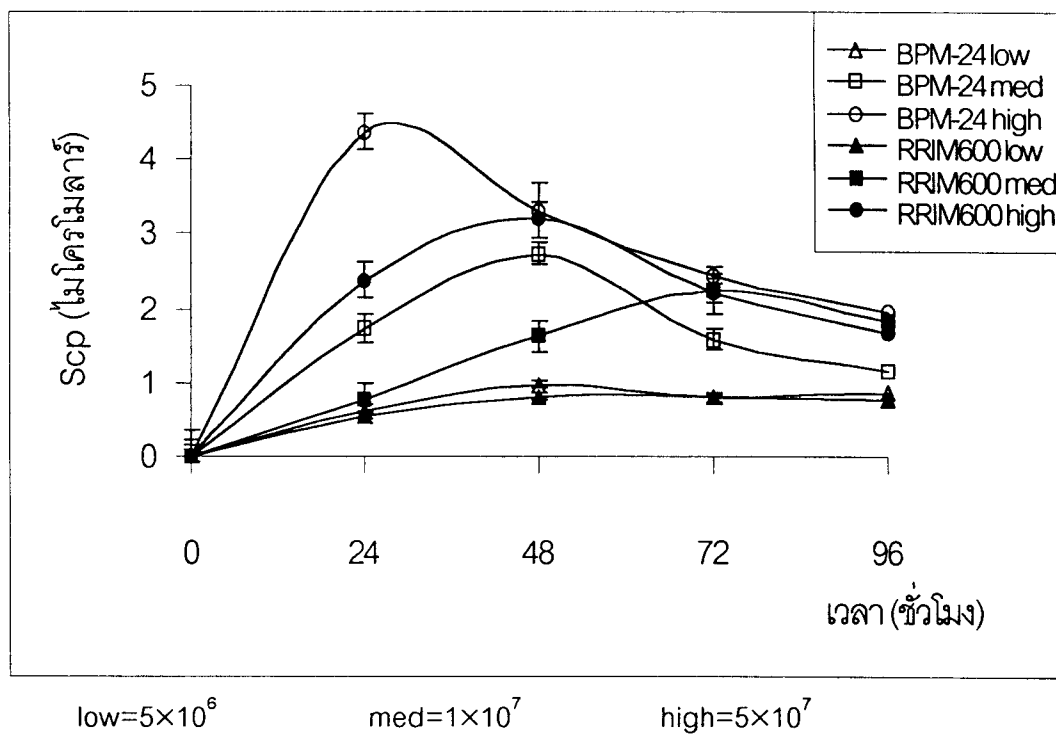
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไบบางพาราสองพันธุ์จะเห็นว่า ไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างสคอพอลิตีนในปริมาณที่มากกว่าและมีอัตราเร็วในการสร้างสูงกว่าไบบางพันธุ์ RRIM600 นอกจากนี้ปริมาณของสคอพอลิตีนที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นยังแปรผันตามความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่ใช้อีกด้วย ดังนั้นการสังเคราะห์สคอพอลิตีนหลังจากการบ่มไบบางด้วยซูโอสปอร์ที่ได้จากเชื้อราชนิดนี้สามารถบอกระดับความต้านทานโรคได้ นั่นคือ ระดับความต้านทานแปรผันตรงกับอัตราเร็วและปริมาณการสังเคราะห์สคอพอลิตีน (rapidity & intensity) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิตีนของไบบางเมื่อบ่มด้วยเชื้อรา *P. palmivora* (Churngchow and Rattarasarn, 2001)

จากการทดลองพบว่าถ้าเลือกใช้ความเข้มข้นของสปอร์ในการทดลองให้เหมาะสม ($1-5 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) การสังเคราะห์สคอพอลิตีนในไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 จะสูงกว่าพันธุ์ RRIM600 แสดงว่าพันธุ์ RRIM600 ต้านทานโรคได้น้อยกว่าพันธุ์ BPM-24 และในการทดลองชุดควบคุมไม่พบการสังเคราะห์สคอพอลิตีน

ตารางที่ 7 ผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) เมื่อถูกบ่มด้วยเชื้อสปอร์ของเชื้อรา

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24/RRIM600 (μM)					
	5×10^6 sp/ml (low)		1×10^7 sp/ml (med)		5×10^7 sp/ml (high)	
	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600
24	0.61 ± 0.06	0.53 ± 0.10	1.73 ± 0.24	0.78 ± 0.06	4.36 ± 0.37	2.38 ± 0.15
48	0.97 ± 0.10	0.81 ± 0.09	2.74 ± 0.20	1.63 ± 0.21	3.31 ± 0.24	3.20 ± 0.24
72	0.79 ± 0.05	0.79 ± 0.05	1.58 ± 0.15	2.24 ± 0.21	2.44 ± 0.37	2.20 ± 0.24
96	0.86 ± 0.09	0.77 ± 0.05	1.16 ± 0.14	1.83 ± 0.17	1.96 ± 0.11	1.68 ± 0.28

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)



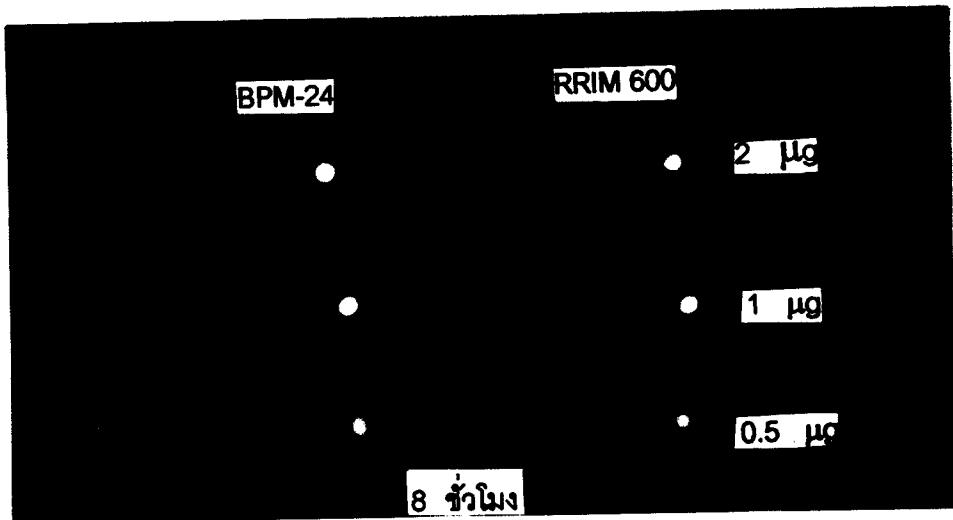
รูปที่ 21 เปรียบเทียบผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) เมื่อบ่มด้วยเชื้อสปอร์ของเชื้อราความเข้มข้นต่างๆ

3.4.3 ผลการกระตุ้นไบโอยางพาราด้วยอิลิซิดิน

หลังจากนำอิลิซิดินที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในสารละลาย 0.2 % Tween-20 มาหยดทางด้านหลังของไบโอยาง สังเกตผลการทดลองด้วยตาเปล่าโดยการนำไบโอยางมาส่องดูได้แสงอุลตราไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 6-8 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของไบโอยางทั้งสองพันธุ์มีสารเรืองแสงใน inoculum สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน โดยปริมาณของสคอพอลิตินที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของอิลิซิดินที่ใช้ แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ ต้องอาศัยการวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรเริ่มมีสารเรืองแสงใน inoculum บนไบโอยางพาราทั้งสองพันธุ์แต่มีปริมาณน้อยกว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ (รูปที่ 23) เมื่อเวลาผ่านไปจนถึงชั่วโมงที่ 16, 24 และ 32 สังเกตเห็นการเรืองแสงลดลงอย่างชัดเจน และไม่เห็นการเรืองแสงในชุดควบคุม

3.4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไฟโตอเล็กซินที่ได้จากการกระตุ้นไบโอยางด้วยอิลิซิดิน

เมื่อเวลาผ่านไป 8, 16, 24 และ 32 ชั่วโมง หลังจากกระตุ้นไบโอยางด้วยอิลิซิดิน ดูด inoculum แต่ละหยดกลับคืนมา จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสคอพอลิตินโดยนำสารตัวอย่างที่เวลาต่างๆมากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปวัดการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer คำนวณหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิตินที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 - 0.05 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบอัตราเร็วและปริมาณในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของไบโอยางพาราทั้งสองพันธุ์ในแต่ละความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้ ผลการวิเคราะห์พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ไบโอยางพาราทั้งสองพันธุ์จะมีการสังเคราะห์สคอพอลิตินออกมาในปริมาณน้อยและมีอัตราเร็วในการสร้างต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งที่ความเข้มข้น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ไบโอยางพาราทั้งสองพันธุ์ถูกกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์สคอพอลิตินตั้งแต่ 4 ชั่วโมงแรกและวัดได้สูงสุดที่ 8 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงตามลำดับเมื่อเวลาผ่านไป 16, 24, และ 32 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไบโอยางพาราทั้งสองพันธุ์ พบว่าไบโอยางพาราพันธุ์ BPM-24 ถูกกระตุ้นให้สร้างสคอพอลิตินด้วยอัตราเร็วและปริมาณที่สูงกว่าไบโอยางพันธุ์ RRIM600 ในทุกความเข้มข้นของอิลิซิดินที่ใช้ (ตารางที่ 8 รูปที่ 23) และไม่พบการสังเคราะห์สคอพอลิตินในการทดลองชุดควบคุมซึ่งใช้สารละลาย 0.2 % Tween-20

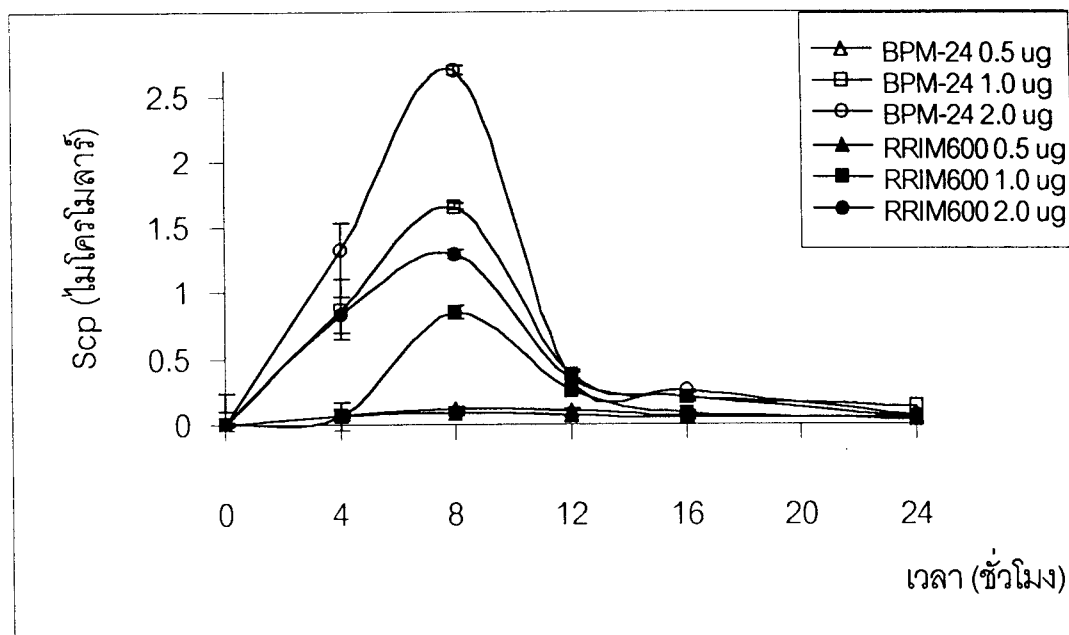


รูปที่ 22 ลักษณะการเรืองแสงได้แสง UV เมื่อใบยางพาราพันธุ์ BPM-24 และพันธุ์ RRIM600 ถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดินเข้มข้น 2, 1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง ซีกซ้ายของแต่ละใบวาง สารละลาย 0.2 % Tween-20 (ชุดควบคุม) ส่วนซีกขวาวางสารละลายอิลิซิดินความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 8 แสดงผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆ ในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิทิน

เวลา (ชม.)	ปริมาณ Scp ที่ถูกสร้างขึ้นในใบยางพาราพันธุ์ BPM-24/RRIM600 (μM)					
	0.5 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		1 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		2 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600	BPM-24	RRIM600
4	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.88 \pm 0.02	0.06 \pm 0.05	1.33 \pm 0.24	0.84 \pm 0.11
8	0.12 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	1.66 \pm 0.23	0.85 \pm 0.11	2.70 \pm 0.22	1.30 \pm 0.14
12	0.11 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.38 \pm 0.02	0.25 \pm 0.05	0.35 \pm 0.04	0.35 \pm 0.04
16	0.06 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.21 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01	0.25 \pm 0.04	0.20 \pm 0.04
24	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.14 \pm 0.05	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง \pm SD)



รูปที่ 23 เปรียบเทียบผลการสังเคราะห์ Scp ที่เวลาต่างๆ ในใบยางพาราพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิทิน

3.5 ผลการศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโคติเนส) ที่เกิดจากการกระตุ้นไบบางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. botryosa*

3.5.1 ผลการศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโคติเนส) ที่เกิดจากการกระตุ้นไบบางด้วยซูโอสปอร์

เลือกใช้ซูโอสปอร์ที่มีความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพราะเป็นความเข้มข้นที่สามารถบอกระดับความต้านทานของไบบางค่อนข้างชัดเจน (ดูผลการทดลอง 3.3.2 ร่วมกับ 3.4.2) นำซูโอสปอร์มาหยดบนไบบางและใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์ ในการทดลองชุดควบคุม เมื่อครบ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงเก็บไบบางชุดควบคุมและชุดทดลองไปสกัดโปรตีน ซึ่งสารสกัดที่ได้ต้องนำไปกำจัดน้ำตาล (internal sugar) ออกไปก่อนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าโปรตีนทั้งหมด (รวมทั้งเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโคติเนส) ตกตะกอนที่ความอิ่มตัวของเกลือ 70% จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสอง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ตามลำดับ

จากการวัดปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA พบว่าไบบางพันธุ์ BPM-24 มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อไบบางติดเชื้อราประมาณ 48 ชั่วโมงและปริมาณโปรตีนยังไม่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง ส่วนการทดลองในชุดควบคุมปริมาณโปรตีนเริ่มลดลงหลังจากทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สำหรับไบบางพันธุ์ RRIM600 พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อไบบางติดเชื้อราประมาณ 72 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนการทดลองชุดควบคุมปริมาณโปรตีนลดลงเรื่อยๆตั้งแต่เริ่มการทดลอง (ตารางที่ 9 และรูปที่ 24) จากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของโปรตีนก็ให้ผลสอดคล้องกับค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสอง (รูปที่ 25 และ 26)

จากผลการศึกษาพบว่าไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกหลังการติดเชื้อและเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 72 และ 96 ชั่วโมง ส่วนการทดลองชุดควบคุมค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 24 ชั่วโมงและเริ่มลดลงหลัง 48 ชั่วโมง สำหรับไบบางพาราพันธุ์ RRIM600 ศึกษาทำนองเดียวกันพบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นเมื่อไบบางติดเชื้อราประมาณ 48 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนการทดลองชุดควบคุมค่าความว่องไวของเอนไซม์ค่อยๆลดลงตั้งแต่เริ่มการทดลอง (ตารางที่ 10 และ รูปที่ 25) จากการทดลองจะเห็นว่าซูโอสปอร์ของเชื้อรานี้สามารถกระตุ้นให้ไบบางพาราทั้งสองพันธุ์สร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น

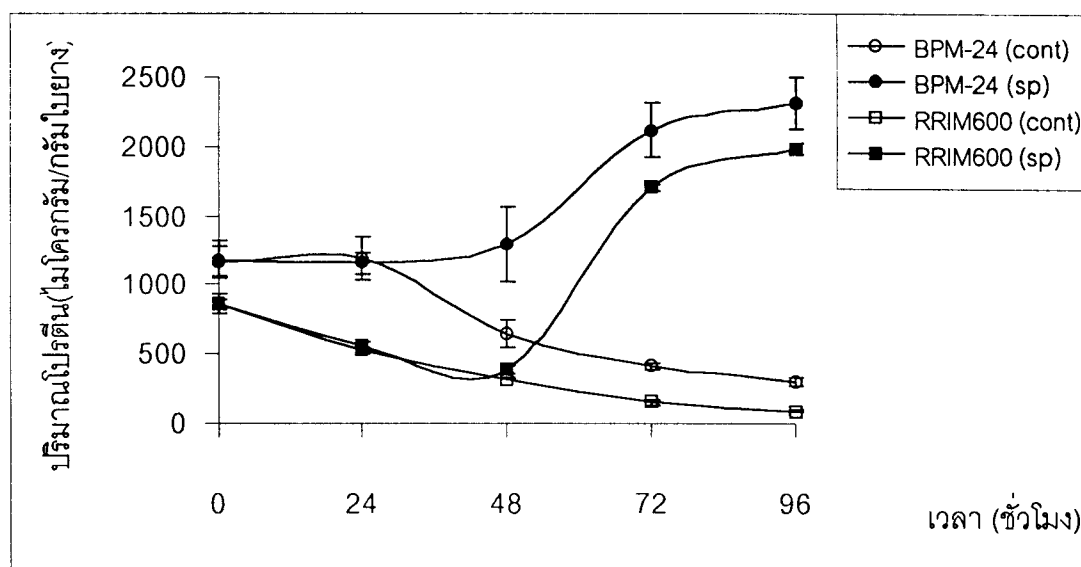
เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม โดยที่ไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 มีค่าความร่วงไวของ เอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็วที่สูงกว่าไบบางพาราพันธุ์ RRIM600 อย่างชัดเจน

สำหรับค่าความร่วงไวของเอนไซม์โคติเนส จากการศึกษพบว่าไบบางพันธุ์ BPM-24 มีค่าความร่วงไวของเอนไซม์โคติเนสเพิ่มขึ้นเมื่อไบบางติดเชื้อราประมาณ 48 ชั่วโมงและค่าความร่วงไวของเอนไซม์ยังไม่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง ส่วนการทดลองชุดควบคุมค่าความร่วงไวของเอนไซม์โคติเนสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 24 ชั่วโมงจากนั้นเริ่มลดลงหลัง 48 ชั่วโมง สำหรับไบบางพันธุ์ RRIM600 พบว่าค่าความร่วงไวของเอนไซม์โคติเนสเพิ่มขึ้นเมื่อไบบางติดเชื้อราประมาณ 72 ชั่วโมง และเริ่มลดลงที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนการทดลองชุดควบคุมค่าความร่วงไวของเอนไซม์ค่อยๆลดลงตั้งแต่เริ่มการทดลอง (ตารางที่ 11 และ รูปที่ 26) จากการทดลองจะเห็นว่าซูไฮสปอร์ของเชื้อรานี้สามารถกระตุ้นให้ไบบางพาราทั้งสองพันธุ์สร้างเอนไซม์โคติเนสเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการทดลองชุดควบคุม โดยที่ไบบางพาราพันธุ์ BPM-24 มีค่าความร่วงไวของเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็วที่สูงกว่าไบบางพันธุ์ RRIM600 อย่างชัดเจนและมีแนวโน้มที่จะลดลงช้ากว่าด้วย จาก การทดลองจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของโปรตีน (รูปที่ 24) ก็ให้ผลสอดคล้องกับค่าความร่วงไวของเอนไซม์ทั้งสอง

ตารางที่ 9 ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/กรัมใบยาง) หลังจากบ่มใบยางด้วยซุโอสปอร์ ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากใบยางพาราหลังการบ่มด้วยซุโอสปอร์ (ไมโครกรัม/กรัมใบยาง)				
ชั่วโมงที่ (inoculation time)	BPM-24 (control)	BPM-24 (spore)	RRIM600 (control)	RRIM600 (spore)
0	1170±106	1182±135	855±36	865±90
24	1191±154	1158±76	525±27	560±40
48	647±98	1292±269	320±6	385±33
72	410±21	2118±199	153±21	1708±28
96	305±27	2309±186	93±10	1983±56

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

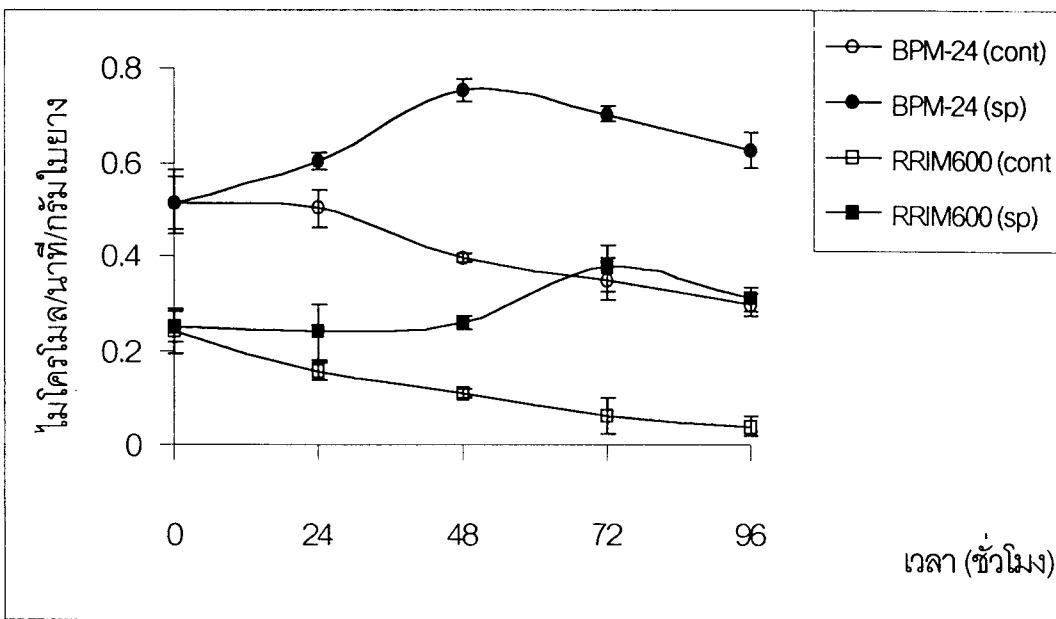


รูปที่ 24 กราฟแสดงปริมาณของโปรตีน (ไมโครกรัม/กรัมใบยาง) หลังจากบ่มใบยางด้วยซุโอสปอร์ ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมและเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM 600)

ตารางที่ 10 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (ไมโครโมล/นาทีก/กรัมไบยาง) หลังจากรบ่มไบยางด้วยซุสเปอร์ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลังการบ่มไบยางด้วยซุสเปอร์ (ไมโครโมล/นาทีก/กรัมไบยาง)				
ชั่วโมงที่ (inoculation time)	BPM-24 (control)	BPM-24 (spore)	RRIM600 (control)	RRIM600 (spore)
0	0.515±0.07	0.513±0.06	0.240±0.05	0.249±0.03
24	0.503±0.04	0.602±0.02	0.155±0.02	0.238±0.06
48	0.396±0.01	0.754±0.02	0.110±0.01	0.258±0.02
72	0.350±0.04	0.703±0.02	0.059±0.04	0.375±0.05
96	0.297±0.03	0.625±0.04	0.039±0.02	0.309±0.03

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

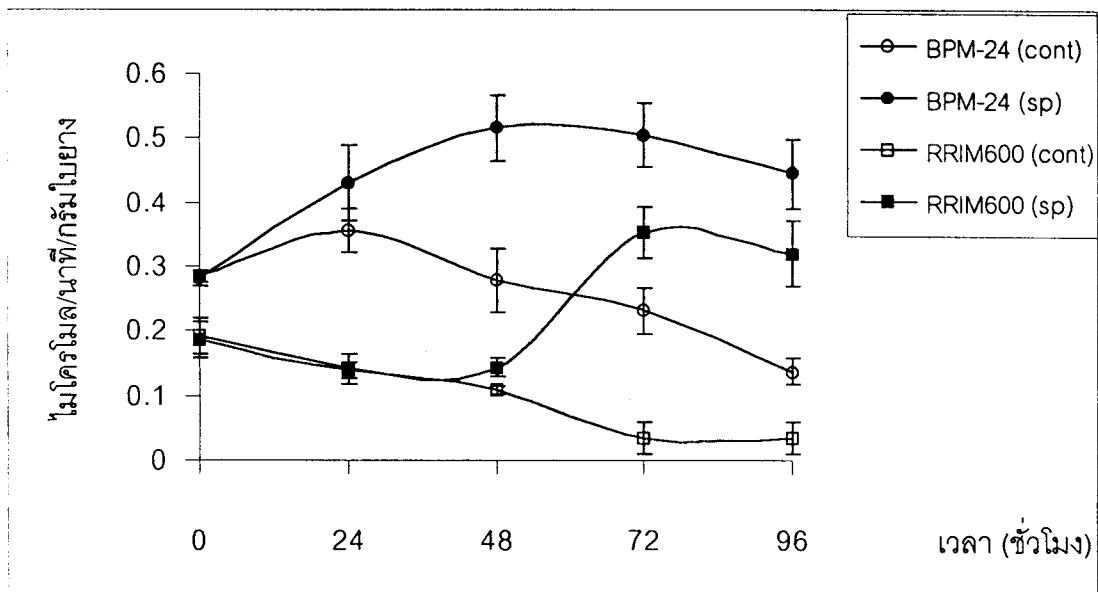


รูปที่ 25 กราฟแสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลังบ่มไบยางด้วยซุสเปอร์ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ตารางที่ 11 ค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส (ไมโครโมล/นาที/กรัมใบยาง) หลังบ่มใบยางด้วย
 ชูโอสปอร์ที่เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่าง
 พันธุ์ด้านทาน/อ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสหลังบ่มใบยางด้วยชูโอสปอร์ (ไมโครโมล/นาที/กรัมใบยาง)				
ชั่วโมงที่ (inoculation time)	BPM-24 (control)	BPM-24 (spore)	RRIM600 (control)	RRIM600 (spore)
0	0.285±0.01	0.280±0.01	0.192±0.03	0.185±0.03
24	0.356±0.03	0.430±0.06	0.141±0.02	0.139±0.01
48	0.278±0.05	0.515±0.05	0.108±0.01	0.143±0.01
72	0.231±0.04	0.504±0.05	0.034±0.02	0.353±0.04
96	0.137±0.02	0.444±0.06	0.034±0.02	0.320±0.05

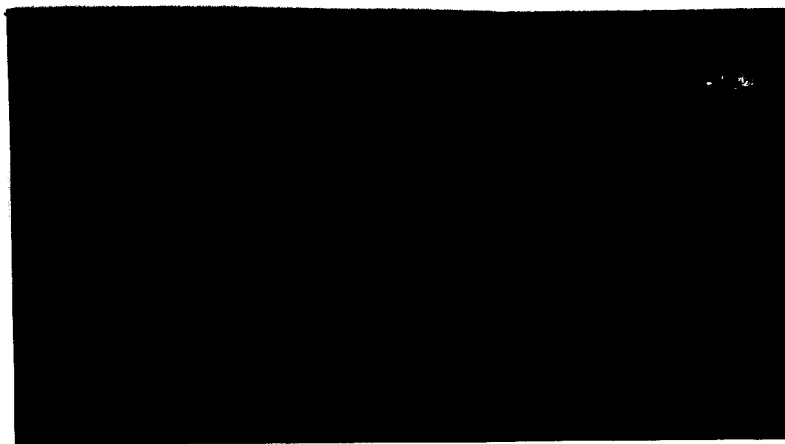
(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



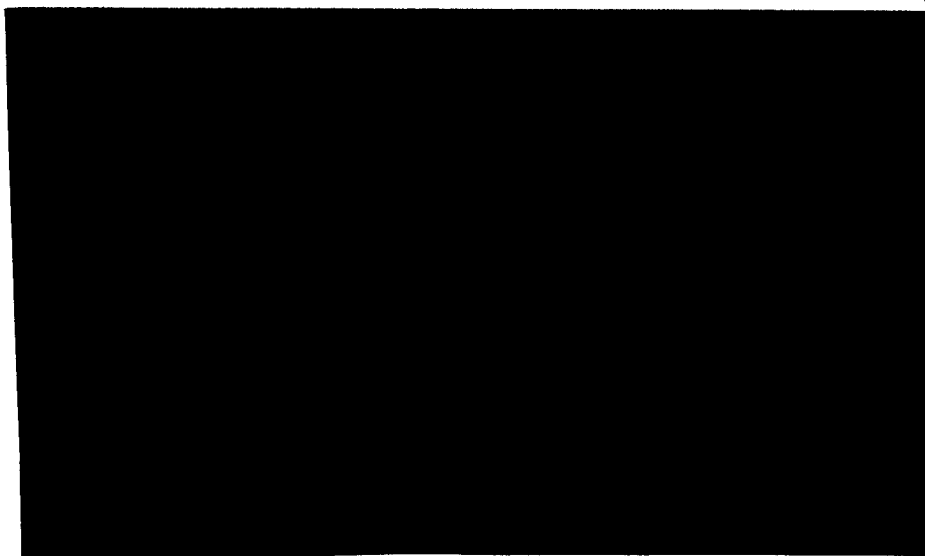
รูปที่ 26 กราฟแสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสหลังบ่มใบยางด้วยชูโอสปอร์ที่เวลาต่างๆ
 เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมและเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ด้านทานและอ่อน
 แอ (BPM-24/RRIM600)

3.5.1 ผลการตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอริซิสแบบ แปลงสภาพ (SDS-PAGE)

จากผลการศึกษาพบว่าไบบางพาราทั้งสองพันธุ์มีจำนวนไอโซไซม์ของโคติเนสแตกต่างกัน โดยเริ่มต้นไบบางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM 600) มี 2 ไอโซไซม์ (X, Y) และเฉพาะไอโซไซม์ Y เท่านั้นที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา ส่วนไบบางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) เริ่มต้นมี 3 ไอโซไซม์ (X, Y, Z) เฉพาะไอโซไซม์ Y และ Z ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา จากการทดลองซึ่งเคยเปรียบเทียบแถบโคติเนสไอโซไซม์ระหว่างพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ในเจลแผ่นเดียวกัน พบว่าแถบ Z คือแถบล่างของ doublet ตามที่ระบุไว้ในรูปที่ 27 และ 28



- รูปที่ 27 แสดงแถบโคติเนสไอโซไซม์จากไบบางพาราพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) ก่อนและหลังการ
บ่มด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา ที่เวลาต่างๆ
- ช่องที่ 1-4 : ไบบางชุดควบคุมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง
- ช่องที่ 5-8 : ไบบางหลังติดเชื้อราที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง



- รูปที่ 28 แสดงแถบโคติเนสไอโซไซม์จากใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) ก่อนและหลังการ
บ่มด้วยซูเปอร์ออกไซด์ของเชื้อรา ที่เวลาต่างๆ
- ช่องที่ 1-4 : ใบยางชุดควบคุมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง
- ช่องที่ 5-8 : ใบยางหลังติดเชื้อราที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

3.5.3 ผลการศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins ที่เกิดจากการกระตุ้นไบยางด้วยสารละลายอิลิซิดิน

เลือกใช้สารละลายอิลิซิดินที่ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพราะเป็นความเข้มข้นที่สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์มากที่สุด (ดูจากผลการทดลอง 3.3.4 ร่วมกับ 3.4.4) นำอิลิซิดินมาหยดบนไบยางและใช้สารละลาย 0.2 % Tween-20 หยดแทนสารละลายอิลิซิดินในการทดลองชุดควบคุม เมื่อครบ 8, 16, 24 และ 32 ชั่วโมง เก็บไบยางชุดควบคุมและชุดทดลองไปสกัดโปรตีน สารสกัดที่ได้ต้องนำไปกำจัดน้ำตาล (internal sugar) ออกไปก่อนโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าโปรตีนทั้งหมด (รวมทั้งเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและโคติเนส) ตกตะกอนที่ความอิ่มตัวของเกลือ 70 % จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนพบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อไบยางทั้งสองพันธุ์ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอิลิซิดินประมาณ 8 ชั่วโมงและเป็นช่วงที่มีการสร้างโปรตีนสูงสุดเช่นเดียวกัน โดยที่ไบยางพันธุ์ด้านทานจะมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็วที่สูงกว่า ส่วนการทดลองในชุดควบคุมปริมาณโปรตีนจะลดลงเรื่อยๆตั้งแต่เริ่มการทดลอง (ตารางที่ 12 รูปที่ 29)

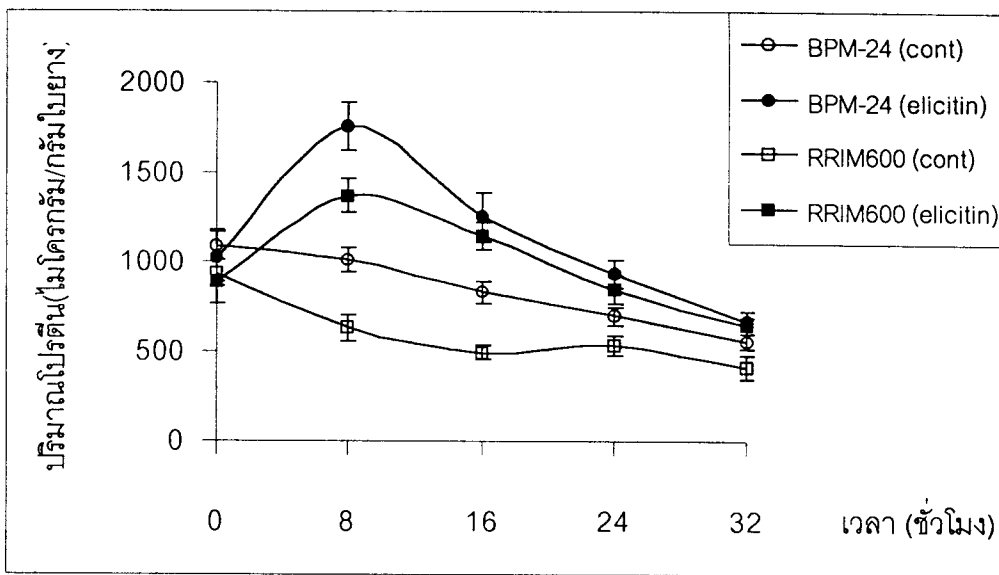
สำหรับค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสพบว่าไบยางพาราพันธุ์ด้านทาน (BPM-24) มีค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นเมื่อไบยางถูกกระตุ้นหรือชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยสารละลายอิลิซิดินประมาณ 8 ชั่วโมงและเป็นช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นสูงสุด จากนั้นจะค่อยๆลดลงเรื่อยๆ ส่วนการทดลองชุดควบคุมค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 16 ชั่วโมงหลังจากนั้นเริ่มลดลง สำหรับไบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) พบว่าค่าความว่องไวของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อไบยางถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดินประมาณ 8 ชั่วโมงและเป็นช่วงเวลาที่เพิ่มขึ้นสูงสุด จากนั้นจะค่อยๆลดลงเช่นเดียวกับพันธุ์ด้านทาน แต่ปริมาณการสังเคราะห์ในไบยางพาราพันธุ์ด้านทานจะเพิ่มขึ้นในลักษณะที่ชัดเจนกว่าไบยางพันธุ์อ่อนแอ ส่วนการทดลองชุดควบคุมค่าความว่องไวของเอนไซม์ค่อยๆลดลงตั้งแต่เริ่มการทดลองและค่อนข้างคงที่ในช่วง 8 - 32 ชั่วโมง (ตารางที่ 13 และ รูปที่ 30)

ส่วนค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส พบว่าไบยางพาราทั้งสองพันธุ์ถูกกระตุ้นหรือชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เช่นเดียวกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส นั่นคือถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 8 ชั่วโมงและเป็นช่วงเวลาที่มีการสังเคราะห์สูงสุด จากนั้นจะค่อยๆลดลงเรื่อยๆ ส่วนการทดลองชุดควบคุมค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสค่อยๆลดลงตั้งแต่เริ่มการทดลอง (ตารางที่ 14 รูปที่ 31)

ตารางที่ 12 ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/กรัมใบยาง) หลังถูกกระตุ้นด้วยอีลิซิทินที่เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ (BPM-24/RRIM 600)

ปริมาณโปรตีนที่สกัดจากใบยางพาราหลังการกระตุ้นด้วยอีลิซิทิน (ไมโครกรัม/กรัมใบยาง)				
เวลาที่ใช้ในการกระตุ้น (ชั่วโมง)	BPM-24 (control)	BPM-24 (elicitin)	RRIM600 (control)	RRIM600 (elicitin)
0	1092±82	1027±137	938±68	887±121
8	1011±70	1753±131	629±71	1372±93
16	828±56	1255±139	491±39	1144±83
24	697±47	930±78	532±53	845±77
32	555±44	662±61	410±64	642±45

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

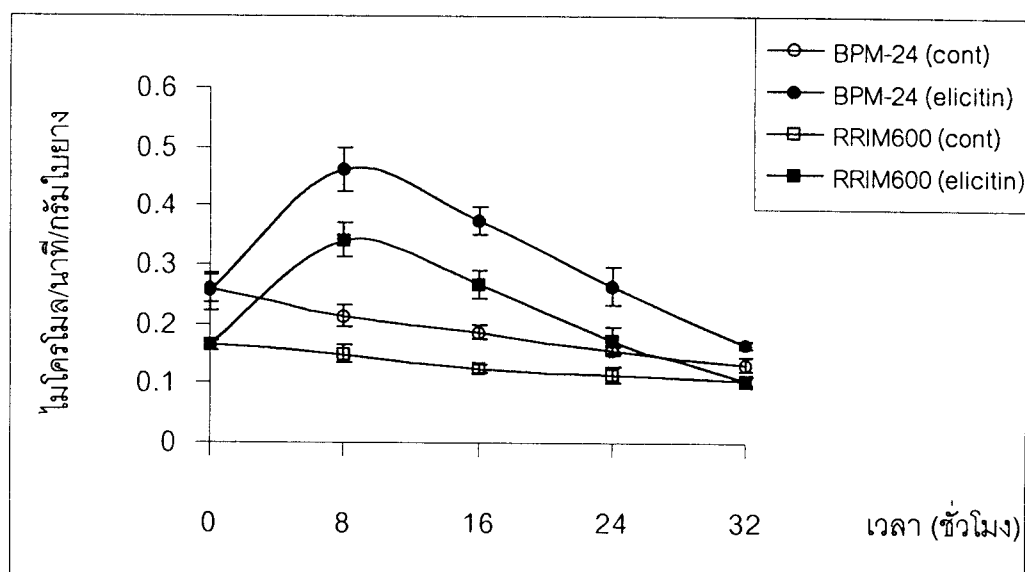


รูปที่ 29 กราฟแสดงปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/กรัมใบยาง) หลังกระตุ้นใบยางพาราด้วยอีลิซิทินที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ตารางที่ 13 ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (ไมโครโมล/นาที/กรัมใบยาง) หลังการกระตุ้นใบยางด้วยอิลิซิดินที่เวลาต่างๆเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุมและเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หลังการกระตุ้นด้วยอิลิซิดิน (ไมโครโมล/นาที/กรัมใบยาง)				
เวลาที่ใช้ในการกระตุ้น (ชั่วโมง)	BPM-24 (control)	BPM-24 (elicitin)	RRIM600 (control)	RRIM600 (elicitin)
0	0.259±0.02	0.255±0.03	0.164±0.01	0.164±0.01
8	0.213±0.02	0.462±0.04	0.149±0.02	0.342±0.03
16	0.187±0.01	0.374±0.02	0.125±0.01	0.266±0.02
24	0.156±0.01	0.264±0.03	0.114±0.01	0.173±0.02
32	0.133±0.01	0.165±0.01	0.104±0.01	0.105±0.01

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)

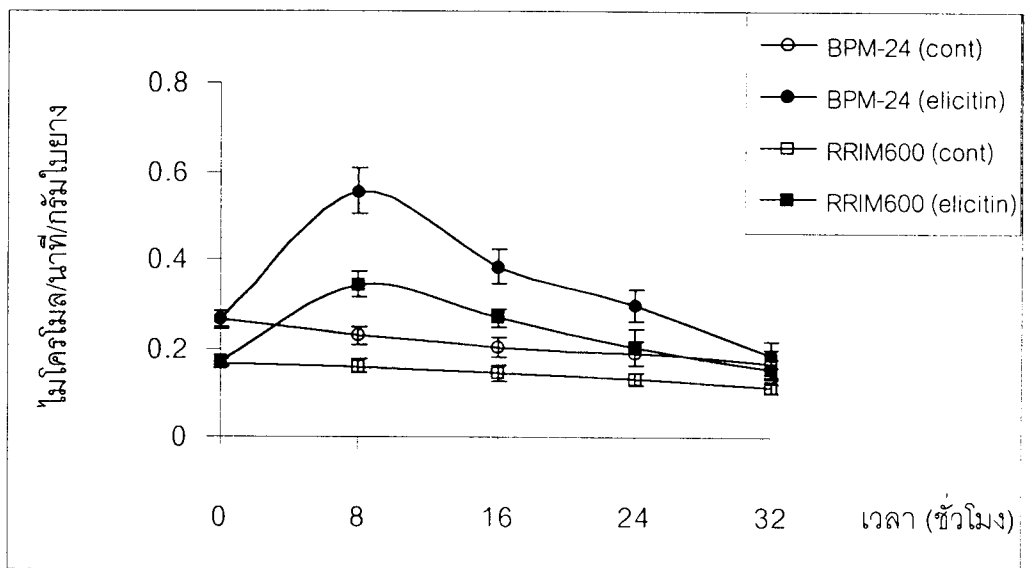


รูปที่ 30 กราฟแสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสหลังถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิดิน ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ตารางที่ 14 ค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส (ไมโครโมล/นาที/กรัมใบยาง) หลังถูกกระตุ้นด้วยอีลิซิน ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24/RRIM600)

ค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส หลังการกระตุ้นด้วยอีลิซิน (ไมโครโมล/นาที/กรัมใบยาง)				
เวลาที่ใช้ในการกระตุ้น	BPM-24 (control)	BPM-24 (elicitin)	RRIM600 (control)	RRIM600 (elicitin)
0	0.263±0.02	0.264±0.02	0.165±0.01	0.170±0.01
8	0.228±0.02	0.555±0.05	0.159±0.02	0.343±0.03
16	0.202±0.02	0.384±0.04	0.144±0.02	0.268±0.02
24	0.190±0.03	0.297±0.03	0.131±0.01	0.202±0.04
32	0.167±0.03	0.185±0.03	0.111±0.01	0.153±0.02

(ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง ± SD)



รูปที่ 31 กราฟแสดงค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสหลังถูกกระตุ้นด้วยอีลิซินที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (BPM-24 / RRIM600)

3.6 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นไบบางด้วยชูโอสปอร์และอิชิซิตินของเชื้อรา *P. botryosa*

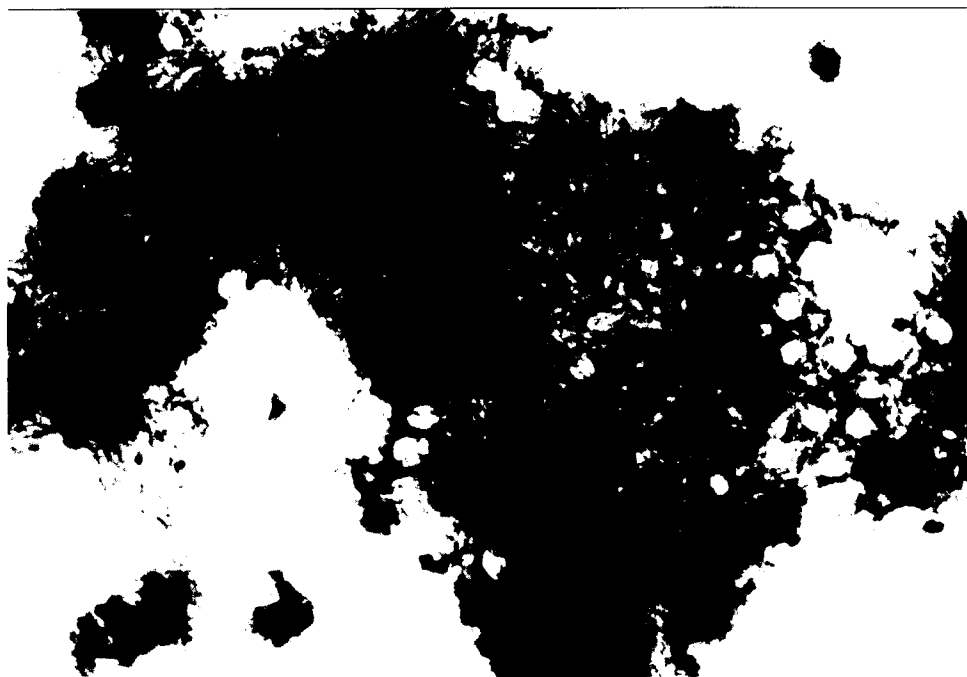
3.6.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นไบบางด้วยชูโอสปอร์

นำชูโอสปอร์ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมาหยดลงบนไบบาง เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 24 ชั่วโมงซับหยดชูโอสปอร์ออกเนื่องจากปฏิกิริยาการสร้างลิกนินจะเกิดบริเวณนี้โครซีส ดังนั้นการตรวจหาการสร้างลิกนินทำได้โดยการตัดชิ้นส่วนของไบบางบริเวณนี้โครซีสแช่ในสารละลาย 2 % Phloroglucinol เป็นเวลา 2 วัน นำชิ้นไบบางที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงซึ่งทำปฏิกิริยากับ 2 % Phloroglucinol แล้วมาวางบนแผ่นสไลด์ก่อนทำให้เป็นกรดด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น ลิกนินจะทำปฏิกิริยากับกรดเห็นเป็นสีแดงรอบๆนี้โครซีส จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ไบบางพันธุ์ BPM-24 จะเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกหลังจากการติดเชื้อ แต่สังเกตได้ไม่ชัดเจนมากนัก เมื่อเวลาผ่านไปครบ 48 ชั่วโมงจะเห็นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่ชัดเจนมากที่สุด โดยลิกนินที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเห็นสีแดงเข้มรอบๆแผ่นนี้โครซีสที่เกิดขึ้นและเมื่อเวลาผ่านไปจนครบ 72 และ 96 ชั่วโมง ปฏิกิริยาการสร้างลิกนินจะค่อยๆลดลงตามลำดับจนไม่สามารถสังเกตเห็นได้ ส่วนไบบางพาราพันธุ์ RRIM600 จะเห็นปฏิกิริยาการสร้างลิกนินไม่ชัดเจนในทุกๆช่วงเวลา และไม่พบปฏิกิริยาการสร้างลิกนินในการทดลองชุดควบคุม (รูปที่ 32 และ 33)

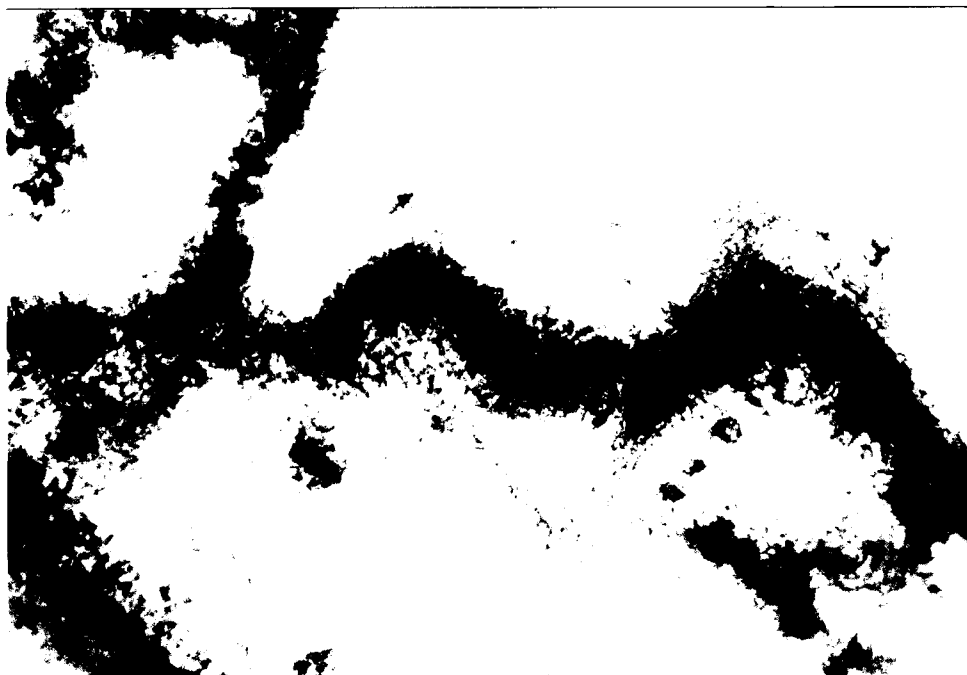
จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าไบบางพันธุ์ด้านทานจะตอบสนองต่อเชื้อราชนิดนี้โดยการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินขึ้นบริเวณผนังเซลล์ เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์และกักบริเวณเชื้อโรคไม่ให้ลุกลาม ส่วนไบบางพาราพันธุ์อ่อนแอพบปฏิกิริยาการสร้างลิกนินเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินสามารถใช้อบกระดับความต้านทานของไบบางได้

3.6.2 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นไบยางด้วยสารละลายอิลิซิดิน

ศึกษาเช่นเดียวกับซูโฮสปอร์โดยใช้สารละลายอิลิซิดินเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในสารละลาย 0.2 % Tween-20 เนื่องจากแผ่นไมโครซีสค่อนข้างชัดเจนกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ ผลการทดลองพบว่าสารละลายอิลิซิดินสามารถกระตุ้นให้ไบยางพาราพันธุ์ BPM-24 เกิดปฏิกิริยาการสร้างลิกนินได้เช่นเดียวกับการบ่มด้วยเชื้อรา แต่ปฏิกิริยาการสร้างลิกนินเห็นผลได้ไม่ชัดเจนมากนักเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการบ่มด้วยสปอร์ของเชื้อราโดยตรง เนื่องจากลิกนินที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยสารละลายอิลิซิดินเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นแล้วให้สีแดงที่ค่อนข้างอ่อน สังเกตผลได้ยาก และอาจเป็นเพราะแผ่นไมโครซีสที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิดินมีขนาดค่อนข้างเล็ก ขอบเขตไม่ชัดเจนมากนัก ปฏิกิริยาการสร้างลิกนินซึ่งจะเกิดบริเวณนี้โคโรซีลจึงตรวจพบได้เพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นไบยางด้วยอิลิซิดินก็สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ เพราะไบยางพาราพันธุ์ RRIM600 ตรวจพบปฏิกิริยาการสร้างลิกนินได้น้อยกว่าพันธุ์ BPM-24 มากและไม่พบปฏิกิริยาการสร้างลิกนินในการทดลองชุดควบคุม (รูปที่ 34 และ 35)



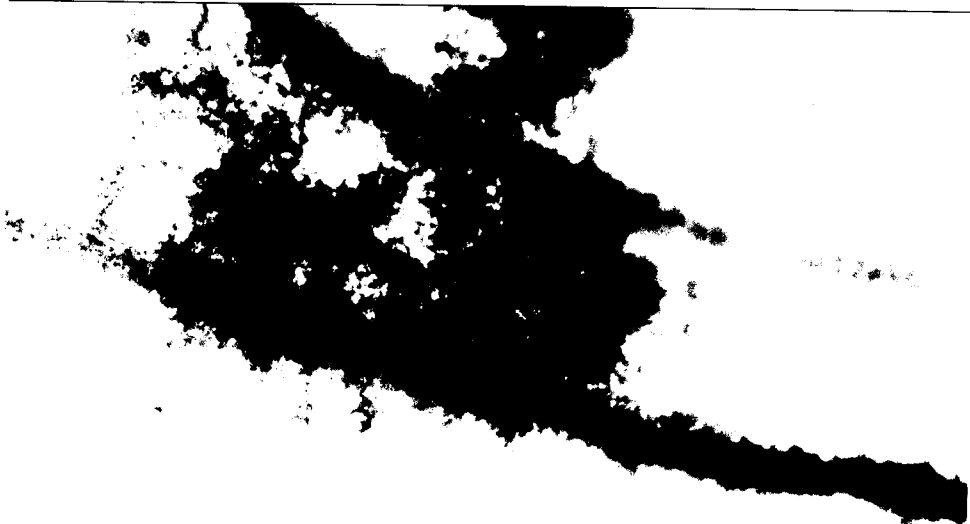
รูปที่ 32 ผลการศึกษาสร้างลิกนินที่เกิดจากการบ่มโพลียาโรพรีน BPM-24 ด้วยซูเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)



รูปที่ 33 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการสร้างลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นโพลียาโรพรีน RRIM600 ด้วยซูเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)



รูปที่ 34 ผลการศึกษาการสร้งลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นไบยางพันธุ์ BPM-24 ด้วยอิธิซิตินเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัม ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)



รูปที่ 35 ผลการศึกษาการสร้งลิกนินที่เกิดจากการกระตุ้นไบยางพันธุ์ RRIM600 ด้วยอิธิซิตินเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัม ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)