บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ผลการจัดลำดับความต้านทานต่อโรคของใบยางพารา

จากการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองในใบยางพารา 17 พันธุ์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. palmivora* ทำให้เห็นความแตกต่างของระดับความต้านทานในใบยางพาราแต่ละพันธุ์จนสามารถจัดลำดับความต้านทานต่อโรคของใบยางพาราได้ดังต่อไปนี้คือ

ในการทดลองด้วยซูโอสปอร์ทำให้เห็นความแตกต่างของสิ่งกีดขวางทางกายภาพและสิ่งกีดขวางทางเคมีของใบยางพาราแต่ละพันธุ์ การเอาชนะสิ่งกีดขวางทางกายภาพโดยการเจาะผ่านผนังเซลล์ของใบยางแต่ละพันธุ์ สังเกตได้จากลักษณะของสายรา, การเกิดสปอร์แรงเจียมและรูปแบบการสร้างสคอพอลิตินที่แตกต่างกัน โดยซูโอ-สปอร์เจาะที่ผิวใบและบริเวณด้านข้างของใบในพันธุ์ต้านทานน้อยกว่าพันธุ์ปานกลางและอ่อนแอตามลำดับ ทำให้ในพันธุ์ต้านทานและปานกลางมีอัตราการงอกของสายราน้อยกว่าในพันธุ์อ่อนแอ จนส่งผลถึงสปอร์แรงเจียมที่จะถูกสร้างขึ้นเมื่อสายรางอกได้อย่างสมบูรณ์และนำเอาสเตอรอลมาใช้ในการสร้าง สปอร์แรงเจียมได้ นั่นคือในพันธุ์อ่อนแอที่มีอัตราการงอกของสายราอย่างสมบูรณ์ก็จะมีการสร้างสปอร์แรงเจียมได้มากกว่าพันธุ์ปานกลางและต้านทาน รูปแบบของการสร้างสคอพอลิตินก็แตกต่างกันตามความสามารถในการงอกของสายราด้วย กล่าวคือพันธุ์ต้านทานจะมีพีคเดียวเพราะไม่มีการลาม, พันธุ์ปานกลางมีสองพีคแสดงถึงการลามหลังจากการถูกเจาะ จะลามมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสิ่งกีดขวางทางกายภาพของใบ และในพันธุ์อ่อนแอมีรูปแบบกราฟที่มีอัตราการสร้างสคอพอลิตินต่ำอย่างคงที่แสดงถึงเกิดการลามอย่างต่อเนื่อง ส่วนสิ่งกีดขวางทางเคมีดูได้จากการสร้างสคอพอลิติน และ ลิกนินที่แตกต่างกันในใบยางแต่ละกลุ่ม แต่จากการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยไม่นำเอาผลของการสร้างลิกนินมาจัดลำดับความต้านทานของพันธุ์ยางทั้ง 17 พันธุ์ เนื่องจากได้ทำการทดลองเพียงบางพันธุ์ แต่ก็มีแนว

โน้มว่าพันธุ์ต้านทานมีการสร้างลิกนินมากกว่าในพันธุ์ปานกลางและอ่อนแอตามลำดับ จากผลรวมของสิ่งกีดขวางทางกายภาพ และ สิ่งกีดขวางทางเคมีข้างต้น จะแสดงออกเป็นรอยไหม้ที่มีขนาดต่างๆกัน ถ้ามีรอยไหม้เป็นจุดดำที่มีขนาดเล็กและมีขอบเขตแน่นอนแสดงถึงมีความต้านทานสูง แต่ถ้ารอยไหม้แผ่กว้างออกแสดงถึงความต้านทานที่ลดต่ำลง จึงสามารถใช้รอยไหม้ในการจัดลำดับความต้านทานได้ด้วย จากผลการทดลองข้างต้นทั้งหมดสามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ยางตามลำดับความต้านทานออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มต้านทานประกอบด้วยพันธุ์ RRIC110, BPM-24 และ PB-235, กลุ่มปานกลางที่ค่อนไปทางต้านทานประกอบด้วยพันธุ์ RRIT250, RRIT251, PB260 และ PB311, กลุ่มปานกลางที่ค่อนไปทางอ่อนแอประกอบด้วยพันธุ์ BPM1, GT1, KRS25, PB255, PR255, PR302 และ PR305 และสุดท้ายในกลุ่มอ่อนแอประกอบด้วยพันธุ์ KRS156 , KRS163 และ RRIM600

จากความแตกต่างในการต้านทานต่อโรคของใบยางพาราที่จัดได้หลังจากถูกบ่มด้วยซูโอสปอร์ สามารถใช้เป็นคะแนนย่อยเพื่อใช้ในการจัดลำดับความต้านทานโดยคะแนนย่อยอีกส่วนหนึ่งจะได้มาจากการทดลองด้วยอิลิซิติน กำหนดให้คะแนนย่อยจากการทดลองด้วยซูโอสปอร์มี 4 ระดับคือ 4, 3, 2 และ 1 ตามลำดับความต้านทานจากมากไปหาน้อยซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 12

ส่วนการทดลองด้วยอิลิซิตินที่ได้จากเชื้อรา *P. palmivora* ทำให้เห็นความแตกต่างทางเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งแสดงออกในลักษณะของการสร้างสคอพอลิตินภายหลังจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิติน ดังนั้นวิธีนี้จึงมีเพียงสิ่งกีดขวางทางเคมีเท่านั้น ถึงแม้ว่าวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านแล้ววิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ของเนื้อใบยางพารา จะให้ผลการสร้างสคอพอลิตินไม่เป็นไปตามลำดับความต้านทาน แต่จากการทดลองเพิ่มเติมโดยวิธีการกรีดควบคู่ไปกับวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้าน โดยสังเกตการเรืองแสงที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่สัมผัสโดยตรงและที่เกิดกับเซลล์ข้างเคียง ทำให้สามารถอธิบายเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของเนื้อใบยางพาราได้ โดยอาศัยสมมุติฐานของ R และ S receptor ที่ว่าระดับความต้านทานแปรผันตามปริมาณของ R receptor โดยที่ R receptor มี affinity สูงกว่า S

receptor และผลการจับกับ R receptor จะส่งผลให้เกิดการตอบสนองแบบ hypersensitive ส่วนระดับความอ่อนแอแปรผันตามปริมาณของ S receptor ที่ส่งผลให้เกิดอาการของโรค โดยสัดส่วนของ R และ S receptor จะแตกต่างกันไปตามความสามารถในการต้านทานของพันธุ์ยางพาราแต่ละพันธุ์ จากการกระตุ้นด้วยอิลิซิตินแบ่งพันธุ์ยางได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มต้านทาน (BPM-24) ที่มีการสร้างสคอพอลิตินในเซลล์ข้างเคียงต่ำกว่าความสามารถทั้งหมดที่สร้างได้ เนื่องจากมี R receptor อยู่จำนวนมากภายในเซลล์บริเวณก้าน ทำให้เหลืออิลิซิตินเพียงเล็กน้อยที่จะเข้าจับกับ R receptor ของเซลล์ข้างเคียงที่อยู่ในเนื้อใบ ทำให้มีการสร้างสคอพอลิตินภายในเนื้อใบได้น้อย สองคือกลุ่มที่มีการสร้างสคอพอลิตินภายในเซลล์เนื้อใบยางพาราน้อยกว่าในพันธุ์ BPM-24 ซึ่งเป็นลักษณะของพันธุ์ต้านทานที่มีจำนวน R receptor จำนวนมากกว่าพันธุ์ BPM-24 ทำให้เหลืออิลิซิตินน้อยมาก จนส่งผลให้การสร้างสคอพอลิตินภายในเนื้อใบมีปริมาณต่ำกว่าพันธุ์ BPM-24 ประกอบด้วยพันธุ์ PB260, PR302, GT1, RRIC110, RRIT251, RRIT250 และ BPM1 สามคือกลุ่มที่มีการสร้างสคอพอลิตินภายในเซลล์เนื้อใบมากกว่าในพันธุ์ BPM-24 ซึ่งเป็นลักษณะของพันธุ์ปานกลาง ที่มีจำนวน R receptor น้อยกว่าในพันธุ์ต้านทาน ทำให้เหลืออิลิซิตินจำนวนมากในการเข้าจับกับเซลล์ข้างเคียงภายในเนื้อใบยางพารา จนส่งผลให้การสร้างสคอพอลิตินภายในเนื้อใบมีปริมาณมาก ประกอบด้วยพันธุ์ KRS25, PB255, KRS156 และ PB-235 สี่คือกลุ่มที่ไม่พบการสร้างสคอพอลิตินภายในเซลล์เนื้อใบ ซึ่งเป็นลักษณะพันธุ์อ่อนแอที่มีจำนวน R receptor น้อยกว่ากลุ่มต้านทานและกลุ่มปานกลางมาก S receptor จึงทำให้เกิดโรคและเกิด degradation ของสคอพอลิติน ที่ถูกสร้างขึ้นจากการจับกับ R receptor ทำให้ไม่พบการสร้างสคอพอลิติน ประกอบด้วยพันธุ์ PR255, PR302, PB311, KRS163 และ RRIM600

จากความแตกต่างในการต้านทานโรคที่จัดได้หลังจากถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินสามารถใช้เป็นคะแนนย่อยในการจัดลำดับความต้านทาน โดยไม่รวมผลการสร้างลิกนินเพราะได้ทำการทดลองเพียงบางพันธุ์ แม้ว่าจะพบความสามารถในการสร้างลิกนินมีแนวโน้มแปรผันตามปริมาณสคพอลิตินที่ถูกสร้างภายในเซลล์เนื้อใบ ดังนั้นจึงเป็น

ระดับคะแนนอย่างคร่าวๆที่ได้จากการสร้างสคอพอลิตินเท่านั้น เรียกว่าเป็นคะแนนอย่างคร่าวๆเพราะจากการทดลองเพิ่มเติมเพื่อสังเกตการสังเคราะห์สคอพอลิตินโดยวิธีการกรีดแล้ววางหยดอิลิซิตินกับวิธีการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้าน ได้ใช้เพียงตัวแทนพันธุ์ยางในแต่ละกลุ่มต้านทานมาศึกษาเท่านั้น ยังไม่ได้มีการศึกษาครบทุกพันธุ์จึงต้องมีการศึกษาต่อไป เพื่อทำให้การจัดระดับคะแนนมีความละเอียดและถูกต้องมากขึ้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มที่ได้จากการทดลองครั้งนี้กำหนดให้คะแนนย่อยมี 5 ระดับ ดังนี้คือ 5, 4, 3, 2 และ 1 ตามลำดับความต้านทานจากมากไปหาน้อย ในกลุ่มต้านทานสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 กลุ่มตามลำดับการสร้างสคอพอลิติน (รูปที่ 48) กลุ่มต้านทานกลุ่มแรกมีการสร้างสคอพลิตินภายในเซลล์เนื้อใบน้อยมากจึงคาดว่าน่าจะเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานมากที่สุดจึงให้คะแนนเป็น 5 ประกอบด้วยพันธุ์ BPM1, RRIT250, RRIT251 และ RRIC110 กลุ่มต้านทานกลุ่มที่สองมีการสร้างสคอพอลิตินภายในเซลล์เนื้อใบมากกว่ากลุ่มแรก จึงคาดว่าน่าจะเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานรองลงมา จึงให้คะแนนเป็น 4 ประกอบด้วยพันธุ์ GT1, PR302 และ PB260 และกลุ่มต้านทานกลุ่มสุดท้ายคือ BPM-24 ที่พบการสร้างสคอพอลิตินภายในเซลล์เนื้อใบมากที่สุดจึงให้คะแนนเป็น 3 ส่วนในกลุ่มปานกลางให้คะแนนเป็น 2 ประกอบด้วยพันธุ์ PB-235, KRS156, PB255 และ KRS25 และสุดท้ายในกลุ่มอ่อนแอให้คะแนนเป็น 1 ประกอบด้วยพันธุ์ RRIM600, KRS163, PB311, PR305 และ PR255 โดยระดับคะแนนของพันธุ์ยางทั้ง 17 พันธุ์ถูกแสดงในตารางที่ 13 และถูกรวมกับคะแนนย่อยที่ได้จากผลการทดลองด้วยซูโอสปอร์เพื่อจัดลำดับความต้านทานโรคของพันธุ์ยางทั้ง 17 พันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นว่าคะแนนของยางบางพันธุ์ที่จัดโดยอิลิซิตินไม่จำเป็นต้องอยู่ในกลุ่มเดียวกับที่จัดด้วยขนาดของรอยไหม้ที่เกิดจากการเจาะด้วยซูโอสปอร์ เพราะการจัดด้วยอิลิซิตินขึ้นกับสิ่งกีดขวางทางเคมี (การสร้างสคอพอลิติน) เพียงอย่างเดียว ในขณะที่การจัดด้วยขนาดของรอยไหม้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ขึ้นกับสิ่งกีดขวางทางกายภาพ

ตารางที่ 12 การแบ่งระดับคะแนนย่อยจากลักษณะปฏิกิริยาการตอบสนองในใบยางพาราเมื่อถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์ ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

ระดับคะแนน	ลักษณะการตอบสนองในใบยางพาราหลังจากบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์			
	รอยไหม้	สายรา	สปอร์แรงเจียม	รูปแบบการสร้างสคอพอลิติน
4	เป็นจุดสีดำเข้มมีขอบเขตชัดเจน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ 0.30 - 0.40 ซม.	น้อย	น้อย	มีพีคสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 เพียงตำแหน่งเดียว
3	เป็นจุดสีดำที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ 1.20-1.30 ซม.	น้อย	น้อย	มีพีค 2 ตำแหน่งคือที่ 8 และ 12 ชั่วโมง โดยตำแหน่งที่ 8 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่าที่ 12 ประมาณ 2 เท่า
2	เป็นจุดสีดำที่เริ่มแผ่กว้างออกแต่ยังมีขอบเขต มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ 1.40-1.60 ซม.	ปานกลาง	ปานกลาง	มีพีค 2 ตำแหน่งคือที่ 8 และ 12 ชั่วโมง โดยตำแหน่งที่ 8 ชั่วโมงมีค่าต่ำกว่าที่ 12 ประมาณ 2 เท่า
1	จุดสีน้ำตาลที่แผ่กว้างออกอย่างไม่มีขอบเขต มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรอยไหม้ 2.50-2.70 ซม.	มาก	มาก	มีการสร้างสคอพอลิตินในอัตราที่ต่ำอย่างคงที่

ตารางที่ 13 ระดับคะแนนย่อย และผลรวมของคะแนนย่อย จากการทดลองการตอบสนองในการป้องกันตัวเองที่เกิดขึ้นในใบยางพารา 17 พันธุ์เมื่อกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

พันธุ์ยางพารา	ระดับคะแนนย่อยจากการกระตุ้นด้วย		ผลรวมของคะแนนย่อยจากการกระตุ้นด้วยอิลิซิเตอร์ทั้งสองชนิด
	ซูโอสปอร์	อิลิซิติน	
RRIC110	4	5	9
RRIT250	3	5	8
RRIT251	3	5	8
BPM-24	4	3	7
BPM1	2	5	7
PB260	3	4	7
PR302	2	4	6
GT1	2	4	6
PB-235	4	2	6
PB311	3	1	4
KRS25	2	2	4
PB255	2	2	4
PR305	2	1	3
PR255	2	1	3
KRS156	1	2	3
KRS163	1	1	2
RRIM600	1	1	2

ผลรวมของคะแนนตามลำดับความต้านทานที่ถูกกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินสามารถแบ่งแยกระดับความต้านทานได้ 7 กลุ่มเรียงตามลำดับความต้านทานจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้คือ อันดับหนึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานมากที่สุดคือพันธุ์ RRIC110 ซึ่งมีทั้งสิ่งกีดขวางทางกายภาพและการตอบสนองทางเคมีที่สูง, อันดับสองคือพันธุ์ RRIT250 และ RRIT251, อันดับสามคือพันธุ์ BPM1, BPM-24 และ PB260,

อันดับสี่คือพันธุ์ PB-235, PR302 และ GT1, อันดับห้าคือพันธุ์ PB311, KRS25 และ PB255, อันดับหกคือพันธุ์ PR305, PR255 และ KRS156 สุดท้ายอันดับเจ็ดที่มีลักษณะเป็นพันธุ์อ่อนแอคือพันธุ์ KRS163 และ RRIM600 ซึ่งมีสิ่งกีดขวางทางกายภาพและการตอบสนองทางเคมีที่ต่ำมาก ดังนั้นพันธุ์ยางพาราที่มีระดับความต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* ได้สูง ประกอบด้วยพันธุ์ RRIC110, RRIT250, RRIT251, BPM-24, PB260 และ BPM1

พันธุ์ยางพาราบางพันธุ์ที่ถูกจัดลำดับความต้านทานจากการทดลองครั้งนี้ ได้ถูกจัดลำดับความต้านทานโดยสถาบันวิจัยยางมาก่อน (สถาบันวิจัยยาง, 2542) ซึ่งเมื่อนำผลการจัดลำดับความต้านทานดังกล่าวมาเปรียบเทียบกันพบว่ามีทั้งลำดับที่ตรงและแตกต่างกัน พันธุ์ที่มีความแตกต่างชัดเจนคือพันธุ์ KRS156 ซึ่งถูกจัดเป็นพันธุ์ค่อนข้างต้านทานจากสถาบันวิจัยยาง แต่ถูกจัดเป็นพันธุ์อ่อนแอจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการศึกษาที่แตกต่างกันเพราะในห้องปฏิบัติการจะคัดเลือกใบที่มีความสะอาดปราศจากโรคในการศึกษา แต่การศึกษาของสถาบันวิจัยยางเป็นลักษณะการประเมินในแบบ field test (สถาบันวิจัยยาง, 2546) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย และไม่สามารถควบคุมให้ใบอยู่ในสภาพที่สะอาดปราศจากเชื้อขณะที่ทำการศึกษาความต้านทาน เพราะใบยางพาราไม่ได้เกิดโรคจากเชื้อราในกลุ่ม *Phytophthora* เท่านั้น ยังพบเชื้อราในกลุ่มอื่นด้วย เช่น เชื้อรา *C. cassiicola* ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดก้างปลาและเชื้อรา *Oidium heveae* ที่ทำให้เกิดโรคราแป้งเป็นต้น (สถาบันวิจัยยาง, 2544) เมื่อใบยางพาราติดเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่งทำให้มีสภาพใบอ่อนแอจนทำให้เชื้อราชนิดอื่นเข้าทำลายซ้ำ นั่นคือในช่วงที่ทำการเก็บข้อมูลระดับ field test พันธุ์ KRS156 อาจไม่มีการติดเชื้ออื่นๆมาก่อน ในขณะที่ใบยางพันธุ์อื่นๆกำลังติดเชื้ออีกหลายชนิด ดังนั้นเมื่อเลือกศึกษาเฉพาะโรคใดโรคหนึ่งอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ ซึ่งต่างจากการทดลองในห้องปฏิบัติการที่คัดเลือกใบยางพาราที่สะอาด จึงเป็นผลความต้านทานที่เกิดขึ้นจริงจากการบ่มใบยางพาราจากเชื้อราที่ทำการทดลองเท่านั้น ซึ่งแตกต่างกันไปตามระดับความต้านทานของใบยางแต่ละพันธุ์

อย่างไรก็ตามการเลือกใช้ตัวกระตุ้นทั้งสองคือซูโอสปอร์และอิลิซิตินเพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองในการป้องกันโรคของยางพารา พบข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป คือการเตรียมซูโอสปอร์สามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็วแต่ต้องเตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง นอกจากนี้การทำให้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์เท่ากันทุกครั้งเป็นไปได้ยากต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทำวิจัยสูง ทำให้เกิดความแปรปรวนของข้อมูลได้ง่าย และในการเตรียมซูโอสปอร์แต่ละครั้งมีช่วงเวลาในการใช้เนื่องจากจะเกิด encyst แล้วเริ่มงอกเป็นสายราจนพันกันเป็นกลุ่ม ทำให้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์เปลี่ยนไป และใบยางที่มีอายุเหมาะสมไม่ได้อยู่ในช่วงเดียวกันทำให้ไม่สามารถทดลองพร้อมกันทุกพันธุ์ได้ ส่วนการเตรียมอิลิซิตินนั้นต้องใช้เวลาในการเตรียมเพราะในการแยกอิลิซิตินออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อมีหลายขั้นตอน แต่ข้อดีคืออิลิซิตินสามารถเตรียมเก็บไว้ได้ในปริมาณมากๆ และในการทดลองแต่ละครั้งสามารถควบคุมปริมาณอิลิซิตินให้เท่ากันได้ ดังนั้นจึงไม่จำเป็นว่าต้องทำการทดลองพร้อมกันทั้ง 17 พันธุ์ ดังนั้นอิลิซิตินจึงเป็นตัวกระตุ้นที่เหมาะสมกว่าที่จะใช้ในการจัดลำดับความต้านทานโรคในยางพารา และอาจดัดแปลงใช้กับการคัดเลือกพันธุ์ในพืชอื่นๆ ที่เป็นพืชเจ้าบ้านของเชื้อรากลุ่มนี้ด้วย