บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

ตารางที่ 2 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และ บริษัทผู้ผลิต

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.5	Merck
Acrylamide	71.1	Merck
Agar	-	วิทยาศรม
Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Merck
Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.7	Merck
Bicinchoninic acid	388.3	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	67,000	Sigma
Coomassie brilliant blue G 250	854.0	Sigma
Cupric sulfate ($CuSO_4$)	249.68	Sigma
Ethanol	46.07	Merck
Fluorescent brightener 28	960.9	Sigma
Glycerol	92.09	Carlo Erba
Glycine	75.07	Fluka Chemika
2- Mercaptoethanol	78.13	Merck
Methanol	32.04	Carlo Erba
N,N-methylene bisacrylamide	154.2	Merck
N,N,N,N-tetramethylenediamine	116.2	Sigma

(TEMED)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Phloroglucinol (1,3,5 trihydroxybenzene)	126.1	Sigma
Phosphoric acid	98.0	Baker Analyzed
Potassium sodium tartrate	282.22	Sigma
Potato Dextrose Agar	-	Difco
Potato Dextrose Broth	-	Difco
Scopoletin	192.2	Sigma
Sephadex G-50	-	Sigma
Silver stain kit	-	Biorad
Sodium acetate anhydrous	82.03	BDH
Sodium azide (NaN_3)	65.01	Merck
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	84.01	Merck
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	105.99	Merck
Sodium chloride (NaCl)	58.44	BDH
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	288.4	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40	BDH
Tricine	179.18	Fluka
Tris(hydroxymethyl) aminomethane	121.1	Merck
Triton X-100	-	Sigma
Trypan blue	960.82	Fluka
V_8	-	Campbell Soup

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง
2. กระบอกตวง ขนาด 0.01, 0.025, 0.050, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ลิตร
3. กล่องพลาสติกเก็บแผ่นเจล
4. กล้องจุลทรรศน์ Olympus CH 40 (Japan)
5. กล้องถ่ายรูป Nikon (Japan) และ Olympus SC 35 (Japan)
6. ขวด Duran ขนาด 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ลิตร
7. เข็มฉีดยา Nipro ขนาด 1.2 × 10 มิลลิเมตร
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Mettler Toledo
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง MonoBloc inside
10. คอลัมน์ PD-10
11. จานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6, 9 และ 11 เซนติเมตร
12. ช้อนตักสาร
13. ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)
14. บีกเกอร์ ขนาด 0.1, 0.25, 0.6, 1 และ 2 ลิตร
15. ปิเปตแก้วขนาด 2, 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร
16. ไมโครออโตปิเปต พร้อมทิป ขนาด 50, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
17. มีดผ่าตัดเบอร์ 23
18. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ Autoclave SS-320 Tomy (Japan)
19. หลอดไฟ Phillips daylight 40 Watts
20. Automatic fraction collector model 2110, Biorad (USA)
21. Centrifuge J2-21 operation, Beckman (USA)
22. Cover glass ความหนา 0.13-0.17 มิลลิเมตร, Shanghai China
23. Electrophoresis apparatus, ATTA Cooperation (Japan)
24. Freeze dryer และ Deep-freeze refrigerator, Sanyo (Japan)

อุปกรณ์ (ต่อ)

25. Hand tally counter, Fuji Nishi (Japan)
26. Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
27. Microscope slides ขนาด 25.4×76.2 มิลลิเมตร
28. Microtube pump MP-3 EYELA (Japan)
29. Orbital shaker incubator, Paton scientific model 013422 (South Austraria)
30. pH meter Cyberscan 1000 (Singapore)
31. Power supply model 1000/500, Biorad (USA)
32. Shimazu UV-Vis recording spectrophotometer model UV160A (Japan)
33. UV box, Viber Lourmat (France)

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมเชื้อพันธุ์ (germplasm) ของยางพารา

2.1.1 การคัดเลือกเชื้อพันธุ์ของยางพารา

คัดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นว่าให้ผลผลิตสูงจำนวน 20 พันธุ์ โดยคัดจากยางพันธุ์ชั้น 1, 2, 3 และยางพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งจัดลำดับโดยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร พันธุ์ยางชั้นต่างๆมีรายละเอียดดังนี้

พันธุ์ยางชั้น1 พันธุ์ยางในชั้นนี้ได้ผ่านการทดลอง และศึกษาลักษณะต่างๆ อย่างละเอียด

พันธุ์ยางชั้น 2 พันธุ์ยางชั้นนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาลักษณะบางประการเพิ่มเติม

พันธุ์ยางชั้น 3 พันธุ์ยางชั้นนี้ส่วนใหญ่อยู่ในระหว่างการทดลอง และต้องศึกษาลักษณะต่างๆเพิ่มเติม (สถาบันวิจัยยาง, 2542)

จากพันธุ์ยางทั้งสามชั้น และยางพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง สามารถคัดเลือกยางที่จะใช้ในการทดสอบได้ทั้งหมด 20 พันธุ์ คือ

พันธุ์ยางชั้น 1 ประกอบด้วย BPM-24, GT1, KRS156, PB255, PB260, PR255, RRIC110, RRIT251 และ RRIM600

พันธุ์ยางชั้น 2 ประกอบด้วย BPM1, PB-235 และ RRIT250

พันธุ์ยางชั้น 3 ประกอบด้วย RRIT163, RRIT209, RRIT226, PR302 และ PR305

ส่วนพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตสูงแต่ยังไม่ได้จัดลำดับเป็นยางพันธุ์ชั้น 1, 2 และ 3 ประกอบด้วย KRS25, KRS163 และ PB311

2.1.2 การติดตาเชื้อพันธุ์ยางที่คัดไว้ในข้อ 2.1.1

จากการคัดเลือกเชื้อพันธุ์ยางในข้อ 2.1.1 ผู้วิจัยไม่สามารถนำยางพันธุ์ RRIT163, RRIT209 และ RRIT226 มาทดสอบได้เพราะเป็นพันธุ์ยางลำดับใหม่ที่อยู่ระหว่างการทดสอบของสถานีทดลองยาง จึงไม่ได้รับอนุญาตให้นำยางพันธุ์ดังกล่าวมา

ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นเชื้อพันธุ์ยางที่จะใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 17 พันธุ์ โดยเชื้อพันธุ์ที่เก็บไว้ในรูปกิ่งตาที่สถานีทดลองยางยะลา ประกอบด้วยยางพันธุ์ BPM1, KRS25, KRS163, PB260, PR255, PR302 และ PR305 และบางพันธุ์เก็บรักษาไว้ที่ศูนย์วิจัยยางสงขลาได้แก่ยางพันธุ์ BPM-24, GT1, KRS156, PB-235, PB255, RRIC110, RRIM600, RRIT250 และ RRIT251 ส่วนยางพันธุ์ PB311 ได้มาจากแปลงยางนายขำ จังหวัดตรัง ซึ่งพันธุ์ยางดังกล่าวมีลักษณะพ่อแม่และผลผลิตน้ำยางเฉลี่ยกิโลกรัมต่อไร่ต่อปีดังแสดงในตารางที่ 3

ก่อนที่จะเริ่มการทดลองต้องนำกิ่งตาแต่ละพันธุ์มาติดตาใหม่กับต้นตอพันธุ์พื้นเมือง โดยแต่ละพันธุ์จะนำไปติดตาจำนวน 30 ต้น ในแต่ละครั้งของการติดตาจะใช้พันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora* น้อยและมากตามลำดับเป็นตัวเปรียบเทียบด้วย จึงได้แบ่งการติดตาออกเป็น 3 ชุดๆละ 7 พันธุ์ตามลำดับ ดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 ประกอบด้วยพันธุ์ RRIM600, BPM-24, KRS156, PB-235, PB255, PB311 และ RRIT251

ชุดที่ 2 ประกอบด้วยพันธุ์ RRIM600, BPM-24, PB260, GT1, PR255, RRIC110 และ RRIT250

ชุดที่ 3 ประกอบด้วยพันธุ์ RRIM600, BPM-24, BPM1, KRS25, KRS163, PR302 และ PR305

ในการติดตาพันธุ์ยางทั้งหมดจะดำเนินการที่แปลงยางนายขำ จังหวัดตรัง โดยต้องทำการเตรียมกิ่งตาเขียวของยางพันธุ์ต่างๆในแต่ละชุดก่อน เริ่มจากการติดต่อศูนย์วิจัยยางที่มีพันธุ์ยางที่ต้องการ ซึ่งถ้าเป็นของสถานีทดลองยางจังหวัดยะลาต้องเดินทางไปติดต่อและดูสภาพกิ่งตายางล่วงหน้าเป็นเวลา 1 สัปดาห์พร้อมกับนัดเวลาที่จะไปรับกิ่งตายาง โดยจะนัดหนึ่งวันก่อนนำกิ่งตายางไปส่งที่แปลงยางนายขำ แต่ถ้าเป็นที่ศูนย์วิจัยยางสงขลาสามารถติดต่อล่วงหน้าเพียงหนึ่งวันก่อนนำกิ่งตายางไปส่ง เพราะที่ศูนย์วิจัยยางสงขลามีกิ่งตาเพื่อจำหน่าย แต่ที่สถานีทดลองยางจังหวัดยะลา จะเก็บในรูปเชื้อพันธุ์ กิ่งตาที่ได้มาจะเป็นกิ่งตาเขียวอายุประมาณ 5-8 สัปดาห์ แต่ละกิ่ง

มีความยาว 1 ฟุต (รูปที่ 15) เฉลี่ยจะมีตาที่นำไปใช้ได้ 3-5 ตา โดยนำมาพันธุ์ละ 15-20 กิ่ง เพื่อให้มีจำนวนตาเพียงพอและเลือกใช้ได้มากขึ้น เพราะแม้ว่าจะใช้เพียง 30 ตาแต่การขนส่งอาจทำให้กิ่งตาช้ำได้ถึงแม้จะระมัดระวังก็ตาม

หลังจากนำกิ่งตายางพันธุ์ไปส่งที่แปลงยางนายขำเพื่อดำเนินการติดตา หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน แผ่นตาจะเชื่อมติดกับต้นตอ (รูปที่ 16ก) ถอนต้นตอมาปลูกลงถุงดำ ขนาด $4^{1}/_{2}$×14 นิ้ว มีรูระบายน้ำออก ดินที่ใช้บรรจุถุงจะต้องมีลักษณะค่อนข้างเหนียว มีดินบรรจุอยู่สูงไม่น้อยกว่า 10 นิ้ว (รูปที่ 16ข) เมื่อได้รับการปลูกลงถุงเรียบร้อยแล้วจึงนำมาไว้ที่บ้านพักอาจารย์เมธินี รัตรสาร ในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ซึ่งเป็นสถานที่ในการดูแลต้นยางต่อไป หลังจากนั้นอีกประมาณ 2 เดือน จึงจะได้ใบที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง ดังนั้นในแต่ละชุดการทดลองใช้เวลาประมาณ 3 เดือน จึงได้ทำการติดตายางห่างกันในแต่ละชุดประมาณ 3-4 สัปดาห์ เพื่อจะได้มีเวลาในการทดสอบและบันทึกผลการทดลอง

2.1.3 การดูแลรักษาต้นกิ่งตายาง

หลังจากย้ายต้นตอมาปลูกลงถุงดำ ต้องใส่ปุ๋ยอินทรีย์ให้กับต้นตอยางทุก 1 เดือน และรดน้ำในตอนเช้าวันเว้นวัน (ควรรดน้ำในตอนเช้าเพราะต้นยางจะไม่ชื้นจนเกินไปซึ่งจะส่งผลให้เกิดการติดเชื้อได้ง่าย) ประมาณ 2 เดือนจะได้ใบที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง หลังจากใช้ใบจากต้นยางจนหมดแล้วก็จะทำการตัดแต่งกิ่งตายางใหม่ อีกประมาณ 3-4 สัปดาห์ ตาจะเริ่มแตกใบใหม่ทำให้มีใบที่จะใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

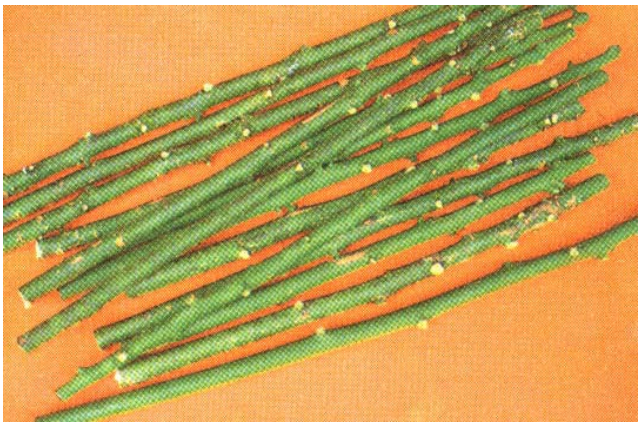
ตารางที่ 3 พ่อแม่, แหล่งกำเนิดและปริมาณน้ำยาง ของเชื้อพันธุ์ยาง 17 พันธุ์ ที่ใช้ศึกษา

เชื้อพันธุ์	พ่อแม่ (แม่ x พ่อ)	แหล่งกำเนิด	ผลผลิตเฉลี่ย กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (ml)
BPM1	AVROS163 × AVROS308	อินโดนีเซีย	307
BPM-24	GT1× AVROS1734	อินโดนีเซีย	312
GT1	พันธุ์ดั้งเดิม	อินโดนีเซีย	201
KRS25	GT1 illeg	ไทย	398
KRS156	PB5/63 × PR107	ไทย	398
KRS163	PB5/63 × RRIM501	ไทย	378
PB235	PB5/51 × PB S.78	มาเลเซีย	312
PB255	PB5/51 × PB32/36	มาเลเซีย	315
PB260	PB56 × PB24) × PB49	มาเลเซีย	312
PB311	RRIM600 × PB235	มาเลเซีย	312
PR255	Tjir1 × PR107	อินโดนีเซีย	322
PR302	-	อินโดนีเซีย	233
PR305	Tjir1 × PR78	อินโดนีเซีย	244
RRIC110	LCB1320 × RRIC7	ศรีลังกา	322
RRIM600	Tjir1 × PB86	มาเลเซีย	289
RRIT250 (KRS250)	ต้นกล้ายางในแปลงเอกชนจังหวัดสงขลา	ไทย	324
RRIT251 (KRS251)	ต้นกล้ายางในแปลงเอกชนจังหวัดสงขลา	ไทย	477

(สถาบันวิจัยยาง, 2532; สถาบันวิจัยยาง, 2540; สถาบันวิจัยยาง, 2542)

ชื่อเต็มของคำย่อที่ใช้ในการกำหนดชื่อพันธุ์ยาง

AVROS	ย่อมาจาก	Algemene Vereniging Rubberplanters Oostkust Sumatra
BPM	ย่อมาจาก	Balai Penelitian Perkebunan, Sungei Putih, Medan
GT	ย่อมาจาก	Gondang Tapen
KRS	ย่อมาจาก	Kohong Rubber Station
LCB	ย่อมาจาก	‘s Lands Caoutchouc Bedrijven
PB	ย่อมาจาก	Prang Besar
PR	ย่อมาจาก	Proefstation voor Rubber
RRIC	ย่อมาจาก	Rubber Research Institute of Ceylon
RRIM	ย่อมาจาก	Rubber Research Institute of Malaysia
RRIT	ย่อมาจาก	Rubber Research Institute of Thailand
Tjir	ย่อมาจาก	Tjirandji



รูปที่ 15 กิ่งตาเขียวที่จะนำไปติดตายางอายุประมาณ 5-8 สัปดาห์ กิ่งตาเขียว 1 กิ่ง (ความยาว 1 ฟุต) โดยเฉลี่ยจะมีตาที่นำไปใช้ได้ 3-5 ตา (ที่มา : สถาบันวิจัยยาง, 2541)

(ก) (ข)

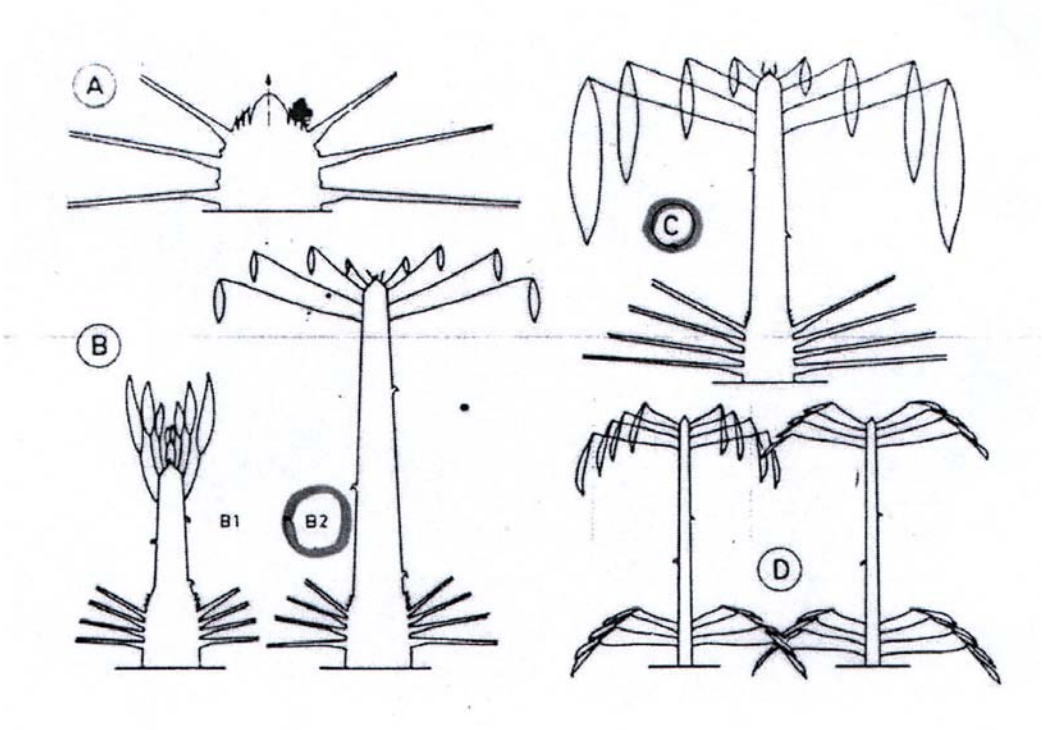
รูปที่ 16 ลักษณะของตายางเขียวกับต้นตอยางหลังจากเชื่อมติดกันประมาณ 1 เดือน จากนั้นถอนต้นตอมาปลูกลงถุงดำขนาด $4^{1}/2 \times 14$ นิ้ว มีรูระบายน้ำออก ดินที่ใช้บรรจุถุงจะต้องมีลักษณะค่อนข้างเหนียว มีดินบรรจุอยู่สูงไม่น้อยกว่า 10 นิ้ว

(ก) การเชื่อมติดของตายางเขียวกับต้นตอยาง

(ข) กิ่งตายางที่ปลูกลงถุงดำ

2.2 การเลือกใช้ใบยางในการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้พันธุ์ยางทั้งหมด 17 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ BPM1, BPM-24, GT1, KRS25, KRS156, KRS163, PB-235, PB255, PB260, PB311, PR255, PR302, PR305, RRIC110, RRIM600, RRIT250 และ RRIT251 โดยจะคัดเลือกใบยางที่มีอายุอยู่ระหว่างขั้น B_2-C stage และ C- stage (รูปที่ 17) (Breton *et al.*, 1997) โดยในการทดลองชุดเดียวกันการเลือกใช้ใบต้องมาจากต้นและกิ่งเดียวกัน, ลักษณะใบต้องไม่มีรอยกัดของแมลง, การฉีกขาดของใบหรือแม้แต่รอยไหม้ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อมาก่อน รวมทั้งใบต้องมีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ใบในชุดควบคุมและในชุดทดลองต้องมาจากก้านเดียวกันด้วย เพื่อลดการแปรปรวนของผลการทดลอง นอกจากนี้ก่อนใช้ใบยางในการทดลองทุกครั้งต้องล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และซับให้แห้งเพื่อล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับใบยาง



รูปที่ 17 แผนภาพรูปแบบอายุใบยางพาราตั้งแต่ขั้นอายุ A, B, B_1, B_2, C และ D

(ที่มา : Breton *et al.*, 1997)

2.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phyophthora palmivora* กับใบยางพันธุ์ต่าง ๆ

2.3.1 การเตรียมเชื้อรา *Phyophthora palmivora* ให้บริสุทธิ์

เชื้อรา *P. palmivora* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางสงขลา ทางศูนย์วิจัยยางสงขลาได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรค เพราะเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงในยางพารา ผู้วิจัยนำเชื้อรา *P. palmivora* ที่ได้มาทำการแยกเชื้อ (isolate) อีกครั้ง โดยการสกัดซูโอสปอร์ออกมาแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA (Potato Dextrose Agar, ดูภาคผนวก) เพื่อให้ได้ซูโอสปอร์เดี่ยวๆ (monospore) หลังจากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยวๆที่ได้ลงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จึงจะสามารถนำไปใช้งานได้ (รูปที่ 18)

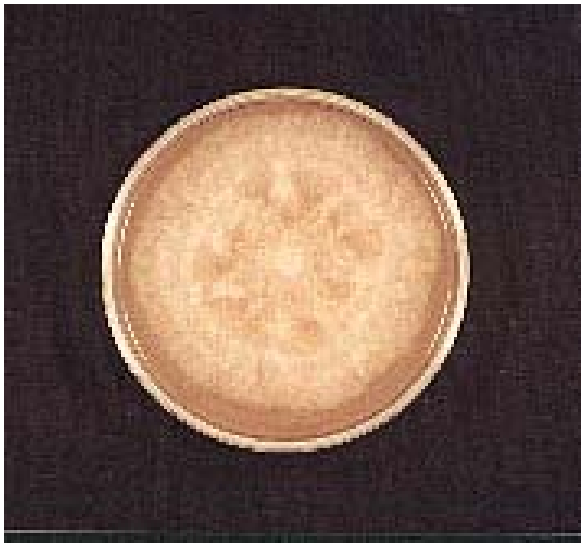
รูปที่ 18 เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ในอาหารแข็ง PDA ซึ่งเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.3.2 การเตรียมซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

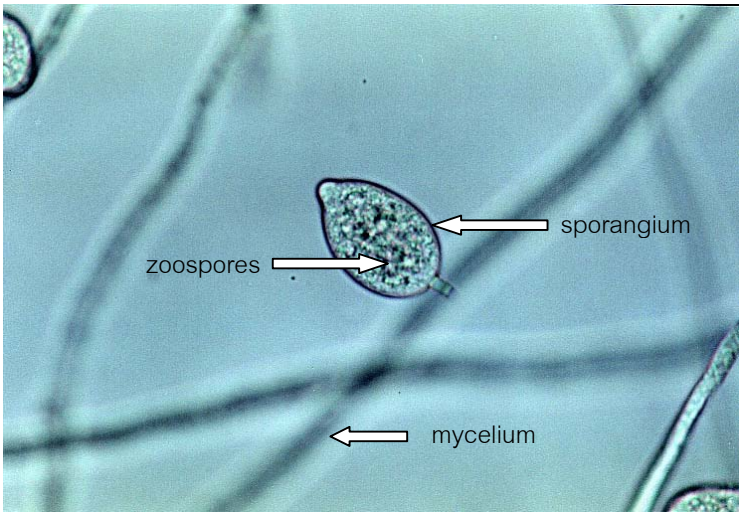
จากการเลี้ยงเชื้อราในข้อ 2.3.1 (บนอาหาร PDA) เมื่อต้องการซูโอสปอร์สามารถกระตุ้นได้โดยการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V_8 (ดูภาคผนวก) (รูปที่ 19) เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นสามารถสกัดซูโอสปอร์ได้โดยเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร บนสายราแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนำมาวางที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที สปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* จะแตกออกและปล่อยให้ซูโอสปอร์ซึ่งอยู่ข้างในหลุดออกมาได้ จากนั้นนำซูโอสปอร์ที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น $5x10^5$, $1x10^6$, $5x10^6$, $1x10^7$, $5x10^7$ และ $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวเจือจาง วิธีการหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ทำได้โดยการหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซูโอสปอร์ผสมอยู่ลงบน Petroft Hauser counting chamber และนับจำนวนซูโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 20) และคำนวณหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ซึ่งทำได้ดังนี้คือ

$$\text{ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ใน 1 มิลลิลิตร} = \frac{(\text{จำนวนซูโอสปอร์ทั้งหมดในพื้นที่}) \times 1000}{\text{ปริมาตรบน Petroft Hauser}}$$

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



รูปที่ 19 ลักษณะของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เจริญเติบโตในอาหารแข็ง V_8 ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน



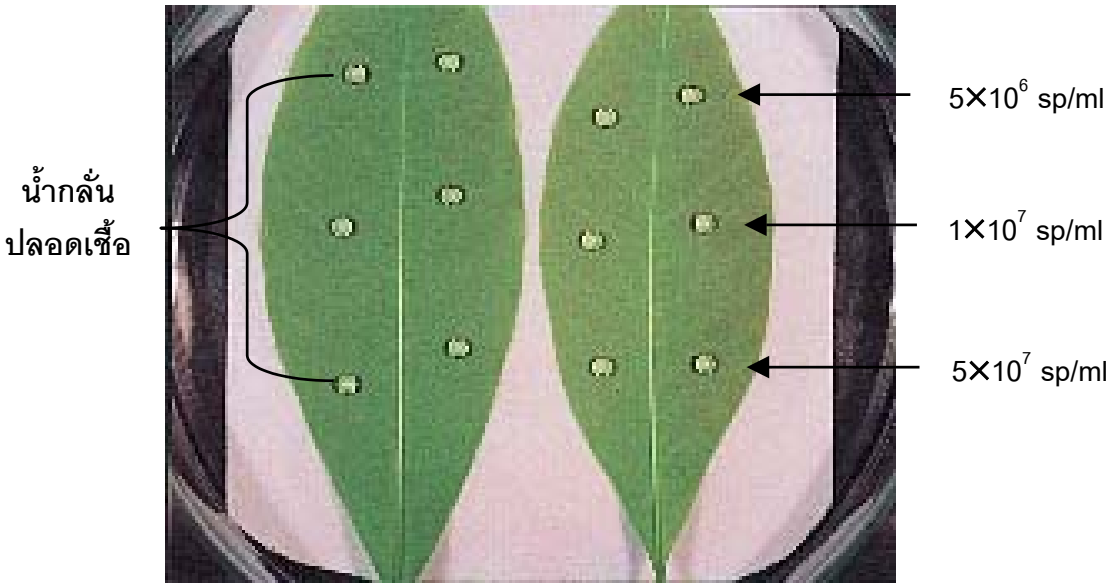
รูปที่ 20 สายรา (mycelium) และสปอร์แรงเจียม (sporangium) ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่มีซูโอสปอร์ (zoospores) อยู่ภายใน ใช้กำลังขยาย 400 เท่า

2.3.3 การศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้ (นีโครซีส) หลังจากกระตุ้นใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phyophthora palmivora*

2.3.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางพารา ตามลำดับความสามารถในการต้านทานโรค

นำซูโอสปอร์ที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ความเข้มข้น 5×10^6, 1×10^7 และ 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (จากวิธีการในข้อ 2.3.2) หยดบนหลังใบทางด้านขวาของยางพันธุ์ RRIM600 ที่จัดเป็นพันธุ์อ่อนแอ, RRIT251 ที่จัดเป็นพันธุ์ปานกลางและ BPM-24 ที่จัดเป็นพันธุ์ต้านทาน ตามการจัดลำดับความต้านทานโรคโดยสถาบันวิจัยยาง นำใบยางวางคว่ำในจานแก้วปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น หยดซูโอสปอร์ความเข้มข้นละหนึ่งหยดต่อใบต่อพันธุ์ ปริมาตรหยดละ 20 ไมโครลิตร แต่ละพันธุ์หยดเรียงตามความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนน้ำซูโอสปอร์โดยหยดทางด้านซ้ายของใบ (รูปที่ 21) วางไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่างตลอดเวลา (daylight 40 วัตต์) เมื่อเวลา

ผ่านไป 72 ชั่วโมง ซับหยดน้ำและหยดซูโอสปอร์ออก ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง และเปรียบเทียบลักษณะและขนาดของรอยไหม้บนใบยางทั้งสามพันธุ์เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกพันธุ์ยางอย่างคร่าวๆออกเป็นสามกลุ่ม (อ่อนแอ, ปานกลาง และ ต้านทาน)



รูปที่ 21 การบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆในจานแก้วปราศจากเชื้อ ด้านซ้ายของแต่ละใบวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม) ส่วนทางด้านขวาของแต่ละใบวางหยดซูโอสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ (sp/ml = ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร)

2.3.3.2 การบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ เพื่อจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์ยางออกเป็นสามกลุ่มอย่างคร่าว ๆตามระดับความต้านทาน

นำซูโอสปอร์ที่มีความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (จากผลการทดลองในข้อ 2.3.3.1 พบว่า 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม) มาหยดบนใบยาง 17 พันธุ์ที่ได้คัดเลือกไว้ในข้อ 2.2 โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.3.1 แต่ใช้เพียงความเข้มข้นเดียวคือ 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร และใช้ใบยางพันธุ์ละ 3 ใบ โดยหยดซูโอสปอร์ใบละ 3 หยดแต่ละหยดมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบลักษณะและขนาดของรอยไหม้บนใบยางแต่ละพันธุ์หลังจาก

บ่มเชื้อบนใบยางเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้แสงสว่างตลอดเวลา พร้อมกับคัดแยกพันธุ์ยางออกเป็นสามกลุ่มอย่างคร่าวๆคือกลุ่มอ่อนแอ (โดยใช้ขนาดรอยไหม้ของยางพันธุ์ RRIM600 เป็นตัวเปรียบเทียบ), กลุ่มปานกลาง (โดยใช้ขนาดรอยไหม้ของยางพันธุ์ RRIT251 เป็นตัวเปรียบเทียบ) และกลุ่มต้านทาน (โดยใช้ขนาดรอยไหม้ของยางพันธุ์ BPM-24 เป็นตัวเปรียบเทียบ) โดยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์

2.3.3.3 การบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ เพื่อจัดลำดับพันธุ์ยางในกลุ่มต้านทานอย่างละเอียด

นำซูโอสปอร์ที่มีความเข้มข้น 1×10^{8} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร มาหยดบนหลังใบยางในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน เป็นการเพิ่มความเข้มข้นของซูโอสปอร์ให้มากขึ้นเพื่อสังเกตลักษณะและระดับความต้านทานของแต่ละพันธุ์ในกลุ่มยางพันธุ์ต้านทานที่ได้จากการคัดเลือกอย่างคร่าวๆในข้อ 2.3.3.2 โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.3.1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของซูโอสปอร์เป็น 1×10^{8} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่างตลอดเวลา เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ซับหยดน้ำและหยดซูโอสปอร์ออก เปรียบเทียบลักษณะและขนาดของรอยไหม้บนใบยางแต่ละพันธุ์พร้อมกับจัดลำดับความต้านทานของพันธุ์ยางในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.3.3.4 การบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ เพื่อจัดลำดับพันธุ์ยางในกลุ่มอ่อนแออย่างละเอียด

ส่วนพันธุ์ยางในกลุ่มอ่อนแอทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.3.1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของซูโอสปอร์เป็น 5×10^{6} และ 1×10^{7} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการหยดซูโอสปอร์บนหลังใบยางในกลุ่มพันธุ์อ่อนแอที่ได้จากการจำแนกอย่างคร่าวๆในข้อ 2.3.3.2 การที่ใช้ความเข้มข้นน้อยลงกว่าเดิม (จาก 5×10^{7} เป็น 1×10^{7} และ 5×10^{6} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร) เพื่อที่จะได้เปรียบเทียบลักษณะและขนาดของรอยไหม้ในกลุ่มอ่อนแอได้อย่างละเอียดและชัดเจนมากขึ้น จนสามารถจัดลำดับความอ่อนแอต่อโรคได้ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.3.4 กระบวนการในการย้อมเซลล์ใบยางด้วยสี Trypan blue หลังจากบ่มใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

พันธุ์ยางที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยพันธุ์ RRIC110, RRIT251 และ RRIM600 ซึ่งเป็นพันธุ์ยางที่ต้านทานต่อโรคในระดับที่มาก, ปานกลาง และ น้อย ตามลำดับ (การที่ใช้พันธุ์ RRIC110 แทนพันธุ์ BPM-24 เนื่องจากในช่วงที่ทำการทดลองเกิดการขาดแคลนใบยางพันธุ์ BPM-24 ประกอบกับผลการศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้หลังจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* พบว่าพันธุ์ RRIC110 มีความต้านทานต่อโรคชัดเจนมากกว่าพันธุ์ BPM-24) นำซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^7 ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรปริมาตร 3 มิลลิลิตรมาใส่ลงในจานแก้วปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร โดยมีใบยางในแต่ละพันธุ์ถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตรจำนวน 10 ชิ้นต่อ 1 จานแก้ว วางใบในลักษณะหงายใบเพื่อให้ปากใบสัมผัสกับซูโอสปอร์โดยตรง ในชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์ เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมงนำชิ้นใบยางทั้งในชุดทดสอบและชุดควบคุมมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อหนึ่งครั้ง ซับให้แห้งและวางลงบนจานแก้วปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตรที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง (นับตั้งแต่ใบยางเริ่มสัมผัสกับซูโอสปอร์) นำชิ้นใบยางในชุดทดสอบและชุดควบคุมมาแช่ใน 0.1 % Triton X-100 เป็นเวลา 20 วินาทีเพื่อลดแรงตึงผิวของใบ หลังจากนั้นนำใบยางมาแช่ใน 0.5 % Trypan blue เพื่อย้อมเซลล์ที่ตายเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนกระทั่งสีที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่ตายหลุดออกไป เซลล์ที่ตายจะทำปฏิกิริยากับสี Trypan blue เซลล์จะติดเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเกิดการตอบสนองแบบไฮเปอร์เซนซิทีฟเซลล์จะติดสีน้ำเงินของสีย้อม Trypan blue อย่างมีขอบเขตชัดเจนแต่ถ้าเป็นการตายที่ไม่สามารถกักบริเวณของเชื้อไว้ได้เซลล์จะติดเป็นสีน้ำเงินที่กระจายแผ่กว้างอย่างไม่มีขอบเขต สังเกตการติดสีของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ยางในกลุ่มต้านทาน, ปานกลางและอ่อนแอต่อโรค ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์

2.3.5 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของสายรา และการสร้างสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ในพันธุ์ยางพาราที่มีความต้านทานแตกต่างกัน

พันธุ์ยางที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยพันธุ์ RRIC110, RRIT251 และ RRIM600 เป็นตัวแทนของพันธุ์ที่ต้านทาน ปานกลางและอ่อนแอต่อโรคตามลำดับ (โดยใช้พันธุ์ยางเช่นเดียวกับข้อ 2.3.4) ซึ่งจัดลำดับความต้านทานตามขนาดของรอยไหม้และจำนวนการถูกเจาะด้วยซูโอสปอร์ จากนั้นนำใบยางแต่ละพันธุ์มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตร จำนวนพันธุ์ละ 10 ชิ้น ใส่ลงในจานแก้วปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตรที่มีซูโอสปอร์ความเข้มข้น 5×10^{7} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยพลิกทางด้านหลังใบให้สัมผัสกับซูโอสปอร์ส่วนในชุดควบคุมพลิกทางด้านหลังใบให้สัมผัสกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนซูโอสปอร์ จากนั้นเมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมงดูดซูโอสปอร์และน้ำกลั่นปลอดเชื้อในชุดทดสอบและชุดควบคุมทิ้งไป ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไปแทนที่ เปลี่ยนน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 32 ชั่วโมง หลังจากเปลี่ยนน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุกครั้งสังเกตการเกิดขึ้นของสายราและสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* โดยการนำชิ้นใบยางอย่างน้อย 3 ชิ้นต่อพันธุ์ยางหนึ่งพันธุ์มาวางบนแผ่นสไลด์และนำไปส่องดูการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์ เปรียบเทียบความแปรปรวนของผลข้อมูลภายในพันธุ์เดียวกันและเปรียบเทียบความแตกต่างที่เกิดขึ้นระหว่างพันธุ์ยางในกลุ่มต้านทาน, ปานกลางและอ่อนแอ

2.3.6 ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์การสร้างสคอพอลิติน ในใบยางพาราจากการกระตุ้นด้วยซูโอสปอร์

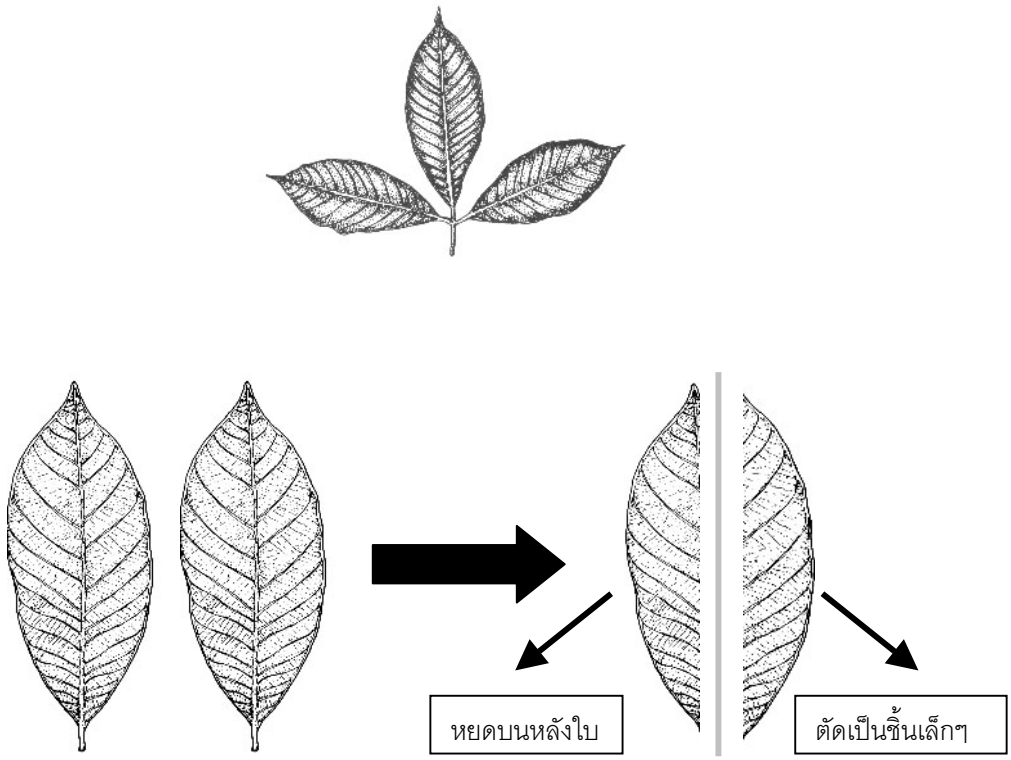
2.3.6.1 การเตรียมใบยาง

พันธุ์ยางที่ใช้ในการศึกษาคือพันธุ์ BPM-24 และ RRIM600 โดยจะใช้พันธุ์ละ 2 ใบ (อยู่ในก้านเดียวกัน) นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งและแต่ละใบนำมาแบ่งครึ่งตามแนวยาว ดังนั้นในแต่ละพันธุ์จะได้ใบยางทางด้านซีก

ซ้ายทั้งหมดสองชิ้นและใบทางด้านซีกขวาสองชิ้น หลังจากนั้นนำใบทางด้านซีกซ้ายทั้งหมดมาเป็นชุดทดลองและชุดควบคุมของวิธีการหยดบนหลังใบ ส่วนทางด้านซีกขวานำมาตัดเป็นชุดทดลองและชุดควบคุมของวิธีการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (รูปที่ 22)

2.3.6.2 การทดลองด้วยวิธีการหยดซูโอสปอร์บนหลังใบยางพารา

จากใบยางที่เตรียมได้ในข้อ 2.3.6.1 จะมีใบยางทางด้านซีกซ้ายในแต่ละพันธุ์จำนวน 2 ชิ้น ในแต่ละชิ้นจะแบ่งเป็น 2 ส่วนคือส่วนบนและส่วนล่าง โดยในส่วนล่างหยดซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรบนหลังใบยางปริมาตรหยดละ 40 ไมโครลิตร ใบละ 2 หยด ให้แต่ละหยดห่างกัน 1 ตารางนิ้ว สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์ โดยหยดทางส่วนบนของใบปริมาตรหยดละ 40 ไมโครลิตร ใบละ 2 หยดและแต่ละหยดห่างกันประมาณ 1 ตารางนิ้วเช่นเดียวกัน ในการทดลองจะนำใบยางวางในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตรที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น วางไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้แสงอยู่ตลอดเวลา เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงหลังจากบ่มเชื้อราบนใบยาง ดูดทุกหยดในชุดทดลองของแต่ละพันธุ์เก็บในหลอดทดลอง ส่วนในชุดควบคุมก็ทำเช่นเดียวกัน จากนั้นวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 40 ไมโครลิตรกลับลงไปยังบริเวณเดิม เมื่อเวลาผ่านไปอีก 4 ชั่วโมง ดูดหยดกลับคืนมาและวางน้ำกลั่นลงไปแทนที่ทำการทดลองซ้ำไปเรื่อยๆทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 36 ชั่วโมง นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิ-ตินที่ถูกสร้างขึ้นต่อไป ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์



รูปที่ 22 การเตรียมใบยางเพื่อทดสอบเปรียบเทียบระหว่างวิธีการหยดซูโอสปอร์บนหลังใบกับการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc) และแช่ในซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

2.3.6.3 การทดลองด้วยวิธีการตัดใบยางพาราเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc)

จากใบยางที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.6.1ในหนึ่งพันธุ์จะมีจำนวนใบยางทางด้านซีกขวา 2 ชิ้น นำใบยางในแต่ละชิ้นมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้น แล้วแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆกัน โดยส่วนแรกใช้เป็นชุดทดลองและส่วนหลังใช้เป็นชุดควบคุม ดังนั้นในแต่ละชุดการทดลองจะมีใบยางชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตรจำนวน 10 ชิ้น หลังจากนั้นนำส่วนแรกมาวางบนจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร โดยคว่ำทางด้านปากใบให้สัมผัสกับซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรปริมาตร 3 มิลลิลิตร ส่วนในชุดควบคุมคว่ำทางด้านปากใบให้สัมผัสกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์ เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมงดูดซูโอสปอร์และน้ำ

กลั่นปลอดเชื้อในชุดทดสอบและชุดควบคุมทิ้งไป ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตรกลับลงไปแทนที่ นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่างอย่างต่อเนื่อง เมื่อเวลาผ่านไปทุก 4 ชั่วโมง (เริ่มนับตั้งแต่ใบยางสัมผัสกับซูโอสปอร์) ดูดสารละลายเก็บในหลอดทดลองแล้วใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อกลับลงไปแทนที่ นำสารตัวอย่างที่ได้จากชั่วโมงที่ 4 ถึง 48 ไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นต่อไป โดยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์

2.3.6.4 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิติน ที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีการหยดบนหลังใบกับการตัดใบยางพาราเป็นชิ้นเล็ก ๆ

นำสารตัวอย่างที่ได้จากวิธีการหยดบนหลังใบกับการตัดเป็นชิ้นเล็กๆไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สารตัวอย่างที่ได้จากวิธีการหยดบนหลังใบนำมาเจือจางเป็น 10 เท่าโดยการใช้สารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปวัดค่าการเรืองแสง ส่วนสารตัวอย่างที่ได้จากการตัดเป็นชิ้นเล็กๆนั้น หลังจากเซนตริฟิวจ์แล้ว ดูดเฉพาะส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปวัดค่าการเรืองแสง

การวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง Spectrofluorometer ใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ, excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ, emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน (Scp) ที่เป็นไฟโตอเล็กซินที่พบในใบยางพารา (Garcia *et al*., 1995; Breton *et al*.,1997; Churngchow and Rattarasarn, 2001) คำนวณหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิตินที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.5-2.5 ไมโครโมลาร์ (ดูภาคผนวก) แล้วเปรียบเทียบความเข้มข้นสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อจัดกลุ่มพันธุ์ยางออกเป็นสามกลุ่ม (กลุ่มอ่อนแอ, กลุ่มปานกลาง และกลุ่มต้านทาน)

2.3.7 ศึกษาหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์การสร้างสคอพอลิตินด้วยวิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็ก

จากผลการทดลองในข้อ 2.3.6 ทำให้ผู้วิจัยเลือกใช้วิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตร เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิตินจากการบ่มด้วย ซูโอสปอร์ ต่อมาจึงนำมาหาค่าความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เหมาะสมโดยเลือกใช้ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 5×10^{6}, 1×10^{7}, 5×10^{7} และ 1×10^{8} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการทดลองครั้งนี้และใช้ใบยางพันธุ์ RRIC110 เป็นตัวแทนพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ RRIM600 เป็นตัวแทนพันธุ์อ่อนแอมาใช้ในการทดลอง โดยนำใบยางทั้งสองพันธุ์มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตรและทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.6.3 เก็บผลการทดลองทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 32 ชั่วโมง พร้อมกับสังเกตจำนวนการถูกเจาะ, การสร้างสายราและสปอร์แรงเจียมที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเปรียบเทียบผลการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ที่เหมาะสมในการหาค่าความเข้มข้นของสคอพอลิตินที่ถูกสร้างขึ้น เพื่อจัดลำดับความต้านทานของพันธุ์ยางต่อไป โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์

2.3.8 ศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน จากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์

จากผลการทดลองในข้อ 2.3.6 และ 2.3.7 จึงเลือกใช้วิธีการตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆขนาด1×1 เซนติเมตร และความเข้มข้นของซูโอสปอร์ 5×10^{7} ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตรมาใช้ในการทดลอง โดยการนำซูโอสปอร์ความเข้มข้นดังกล่าวปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาใส่ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร จากนั้นตัดใบยางทั้ง 17 พันธุ์ที่ได้คัดเลือกไว้ในข้อ 2.2 เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1x1 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้น โดยวางทางด้านปากใบให้สัมผัสกับซูโอสปอร์ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์ และติดตามผลการสร้างสคอพอลิติน โดยวิธีการดูดน้ำกลับคืนมา เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงหลังจากบ่มเชื้อราบนใบยาง ดูดสารตัวอย่างเก็บในหลอดทดลอง แล้วใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตรกลับลงไปแทน นำสารตัวอย่างที่ได้เก็บที่

อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ทำเช่นเดียวกันนี้ที่เวลา 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำสารตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิติน โดยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์ยาง

2.3.9 **ศึกษาการสร้างลิกนิน** (Lignification) **ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์**

นำตัวแทนใบยางในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน, ปานกลางและอ่อนแอที่ได้คัดเลือกไว้ด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตร วางคว่ำลงบนจานแก้วปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตรที่มีซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ส่วนในชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์ เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมงนำชิ้นใบยางทั้งสองชุดการทดลองมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อหนึ่งครั้ง ซับให้แห้งและวางบนกระดาษกรองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น เมื่อเวลาผ่านไปทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 36 ชั่วโมง (เริ่มจับเวลาตั้งแต่ใบยางเริ่มสัมผัสซูโอสปอร์) นำชิ้นใบในแต่ละพันธุ์ไปแช่ในสารละลายที่มี 2% Phloroglucinol ประมาณ 1-2 วัน หลังจากนั้นนำชิ้นใบยางวางบนสไลด์และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงบนใบยาง ถ้ามีการสร้างลิกนิน ลิกนินจะทำปฏิกิริยากับกรดเกิดเป็นสีแดงรอบๆรอยไหม้ โดยสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการเปรียบเทียบปริมาณลิกนินที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อจัดลำดับความต้านทานของกลุ่มยางพันธุ์ต้านทานทั้งสามพันธุ์ที่ได้คัดไว้โดยวิธีการต่างๆข้างต้น และเปรียบเทียบความแตกต่างในการเกิดลิกนินระหว่างยางพันธุ์ต้านทาน, ปานกลางและอ่อนแอด้วย ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์ยาง

2.4 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอิลิซิตินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* กับใบยางพันธุ์ต่าง ๆ

2.4.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

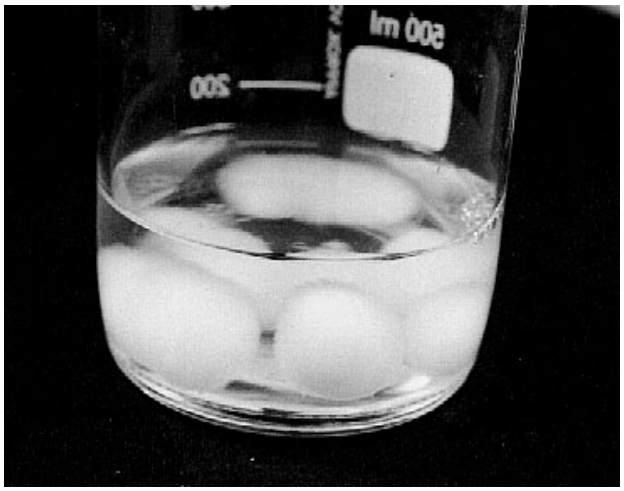
ตัดเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหาร PDA (รูปที่ 23) บริเวณที่กำลังเจริญเติบโตดี (บริเวณขอบทางด้านนอกของเชื้อราที่มีอายุ 5 วัน) ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth, ดูภาคผนวก) โดยใช้เชื้อรา 15 ชิ้นต่ออาหารเหลว 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อรา *P. palmivora* จะค่อยๆผลิตอิลิซิตินและโปรตีนต่างๆออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เตรียมอิลิซิตินให้บริสุทธิ์ต่อไป (รูปที่ 24)

2.4.2 การเตรียมอิลิซิตินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* จากข้อ 2.4.1 ปริมาตร 1 ลิตร มากรองเพื่อเอาส่วนที่เป็นสายราออกโดยการใช้ suction flask จากนั้นนำส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อรามาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ JA-21 ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำส่วนที่เป็นตะกอนละลายกลับในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีกรดไบซินโคนินิค (ดูภาคผนวก) จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้มากำจัดเอาเกลือออกด้วยคอลัมน์ PD-10 ซึ่งเป็นคอลัมน์สำเร็จรูปข้างในบรรจุ Sephadex G-25 (ปริมาตร 9 มิลลิลิตร) ทำการทดลองโดยการนำสารละลายโปรตีนดังกล่าวมาผ่านคอลัมน์ PD-10 ครั้งละ 1 มิลลิลิตร ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น และเก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (O.D. 280) รวมสารละลายหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูง และสามารถทำให้ใบยางเกิดนีโครซีสได้เข้าด้วยกัน (fraction 3 และ 4) ดังนั้นหลังจากผ่านคอลัมน์

PD-10 จำนวน 10 ครั้งๆละ 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purify) ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยกรดไบซินโคนินิค และตรวจหาความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine – SDS – PAGE) ตามวิธีการในข้อ 2.5

รูปที่ 23 ลูกศรชี้บริเวณที่ถูกตัดของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เจริญเติบโตในอาหารแข็ง PDA เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB



รูปที่ 24 เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ที่เจริญเติบโต ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

2.4.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิลิซิติน

ดัดแปลงจากวิธีของ Schagger และ Von Jagow (1987) และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

2.4.3.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล และอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ Tricine-SDS-PAGE (Tricine-sodium dodecyl sulphate polyarylamide gel)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิลิซิตินทำได้โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ในการศึกษาใช้เจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด 8×9 เซนติเมตร หนา 0.1 เซนติเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน ทำหน้าที่รวมสารตัวอย่างไม่ให้กระจาย (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง ทำหน้าที่แยกสาร (separating gel) มีความสูง 6 เซนติเมตร โดยมีส่วนประกอบของการเตรียม SDS-PAGE ซึ่งมีส่วนประกอบเจล (สำหรับสองแผ่น) แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของการเตรียม SDS-PAGE (สำหรับสองแผ่น)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (16.5%)
Acrylamide-bis-acrylamide mixture	0.40 ml	4.33 ml
3.0 M Tris-HCl, pH 8.45+0.3%SDS	1.2 ml	4.33 ml
10% Ammonium persulphate	50 μl	130 μl
TEMED	5 μl	13 μl
Deionized water	3.31 ml	4.20 ml
Total volume	5.00 ml	13.00 ml

2.4.3.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่าง (ดูภาคผนวก) และสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วย Triosephosphate isomerase 26.6 kDa, Myoglobin 16.9 kDa, α-lactalbumin 14.4 kDa และ Aprotinin 6.5 kDa) ใส่ในแต่ละช่องของเจล ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl–0.1 M Tricine–0.1%SDS, pH 8.25 เปิดกระแสไฟคงที่ 30 mA ใช้ระยะเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง สีโบรโมฟีนอลบลูจะเคลื่อนที่ไปจนเกือบถึงขอบล่างของแผ่นเจล (ห่างจากขอบล่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร) ปิดกระแสไฟ และนำเจลมาย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

2.4.3.3 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

นำเจลแช่ในสารละลายผสมระหว่าง 40% เมทานอล กับ 10% กรดอะซิติก นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลายออกซิไดเซอร์ 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน 3 ครั้งๆละ 5 นาทีพร้อมเขย่าเบาๆ จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลายซิลเวอร์นาน 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออนอีกครั้ง แล้วแช่ในสารละลายดีเวอลอปเปอร์จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% กรดอะซิติก ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออนและเก็บเจลใน 50% เมทานอล

2.4.4 ศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน จากการกระตุ้นใบยางพาราด้วยอิลิซิตินของเชื้อรา *Phytophthora palmivora*

นำใบยางที่เลือกไว้ในข้อ 2.2 มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง แล้วผ่าครึ่งใบในแนวขวาง นำส่วนปลายใบเลี้ยงไว้ในจานแก้วปลอดเชื้อที่มีน้ำกลั่นและกระดาษกรองเป็นตัวให้ความชื้นซึ่งจะใช้เป็นชุดควบคุม และส่วนที่มีก้านใบติดอยู่นำมาทดสอบกับอิลิซิตินปริมาณ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัมใบยาง โดยใช้วิธีดูดเข้าทางก้านใบ (รูปที่ 25) เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง นำใบมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1x1 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้น วางในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร โดยพลิกทางด้านปากใบให้สัมผัสกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในชุดควบคุมก็ทำเช่นเดียวกัน เมื่อเวลาผ่านไปทุก 4 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง ดูดน้ำในแต่ละการทดลอง

เก็บในหลอดแล้วใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรกลับลงไปแทนที่ เก็บสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสคอพอลิติน (ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.6.4) เพื่อจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์ยางออกเป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์อ่อนแอ, กลุ่มพันธุ์ปานกลาง และกลุ่มพันธุ์ต้านทาน และเปรียบเทียบความแตกต่างของการสร้างสคอพอลิตินเมื่อทดสอบกับปริมาณอิลิซิตินที่แตกต่างกัน ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้งต่อหนึ่งพันธุ์

รูปที่ 25 แสดงการดูดอิลิซิตินเข้าทางก้านใบของใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ

2.4.5 การสังเกตใบยางพาราหลังจากทดลองใบยางด้วยอิลิซิติน โดยวิธีดูดอิลิซิตินเข้าทางก้าน และวิธีการกรีดหลังใบ

2.4.5.1 การทดลองโดยวิธีดูดเข้าทางก้าน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4.4 แต่ใช้อิลิซิตินปริมาณ 10 ไมโครกรัมเท่านั้นในการทดลอง และเมื่อเวลาผ่านไป 4, 8 และ 12 ชั่วโมง สังเกตการเรืองแสงของสคอพอลิตินภายใต้กล่องยูวี โดยสังเกตบริเวณจุดสัมผัสโดยตรงคือบริเวณก้านใบ และบริเวณเซลล์ข้างเคียงคือเซลล์ภายในเนื้อใบยางพารา ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.4.5.2 **การทดลองโดยวิธีการกรีดบนหลังใบ**

นำใบยางพารามาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง วางใบยางในจานแก้วปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น ใช้เข็มฉีดยากรีดบริเวณหลังใบยางเบาๆความยาว 0.40 เซนติเมตรต่อหนึ่งรอยกรีด ทั้งทางด้านขวาและทางด้านซ้ายของใบยางพาราจนเห็นเป็นรอยกรีดโดยไม่ทำให้ใบยางฉีกขาด และแต่ละรอยกรีดห่างกันประมาณ 2.5 เซนติเมตร ทางด้านขวาของใบยางพาราวางอิลิซิตินปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อหนึ่งหยดบริเวณรอยกรีด ส่วนใบยางทางด้านซ้ายใช้เป็นชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนอิลิซิติน เมื่อเวลาผ่านไป 4, 8 และ 12 ชั่วโมง สังเกตการเรืองแสงของสคอพอลิตินภายใต้กล่องยูวี โดยสังเกตบริเวณจุดสัมผัสโดยตรงคือบริเวณรอยกรีด และบริเวณเซลล์ข้างเคียงคือเซลล์ภายในเนื้อใบรอบๆรอยกรีด ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.4.6 **ศึกษาการสร้างลิกนิน** (lignification) **ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยอิลิซิตินของเชื้อรา** *Phytophthora palmivora*

นำใบยางมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง แล้วผ่าครึ่งใบในแนวขวาง นำส่วนปลายใบเลี้ยงไว้ในจานแก้วปลอดเชื้อที่มีน้ำกลั่นและกระดาษกรองเป็นตัวให้ความชื้นซึ่งจะใช้เป็นชุดควบคุม และส่วนที่มีก้านใบติดอยู่นำมาทดสอบกับอิลิซิตินที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัมใบยางโดยใช้วิธีดูดเข้าทางก้านใบ หลังจากที่ใบยางดูดอิลิซิตินแล้วจึงนำมาวางบนกระดาษกรองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น เมื่อเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8,10 และ 12 ชั่วโมง (นับตั้งแต่ใบยางเริ่มมีการดูดอิลิซิติน) ตัดใบยางแต่ละพันธุ์ทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1×1 เซนติเมตร และนำชิ้นไปแช่ในสารละลายที่มี 2% Phloroglucinol ประมาณ 1-2 วัน หลังจากนั้นนำชิ้นใบยางวางบนสไลด์และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงบนใบยาง ถ้ามีการสร้างลิกนิน ลิกนินจะทำปฏิกิริยากับกรดเกิดเป็นสีแดงรอบๆรอยไหม้ โดยสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเปรียบเทียบความแตกต่างในการเกิดลิกนินระหว่างยางพันธุ์ต้านทาน, ปานกลางและอ่อนแอ