จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การคัดเลือกต้นเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ต้านทานต่อสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

เพชรรัตน์ จันทรทิณ

อัจฉริยา มณีน้อย

วีระเดช สุขเอียด

571.538
2369
พ877ก

สิงหาคม 2542

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การคัดเลือกต้นเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ต้านทานต่อสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

โดย

นางสาวเพชรรัตน์ จันทรทิณ
นางสาวอัจฉริยา มณีน้อย
ว่าที่ร้อยโท วีระเดช สุขเอียด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิงหาคม 2542

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะผู้บริหาร สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนด้านห้องปฏิบัติการตลอดจนครุภัณฑ์ในการวิจัย และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เห็นคุณค่าของการวิจัยและสนับสนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่อง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณขนิษฐา ดีประหลาด ที่ช่วยให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมี และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสถาบันทุกท่านที่คอยช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย : การคัดเลือกต้นเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ต้านทานต่อสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

ชื่อผู้วิจัย : เพชรรัตน์ จันทรทิณ อัจฉริยา มณีน้อย และ วีระเดช สุขเอียด

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ : สิงหาคม 2542

บทคัดย่อ

โรคใบจุดของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* โดยมี *Colletotrichum gloeosporioides* เป็น imperfect stage เชื้อราสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร Czapek agar (CZA) น้ำหนักแห้งของเส้นใยและปริมาณสารสกัดจากเชื้อรามีมากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Czapek dox medium เป็นเวลา 4 วัน ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อราโดยวิธีการหยดสารสกัดจากเชื้อราลงบนใบเปล้าน้อยพบว่า สารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เกิดอาการใบจุดกับเปล้าน้อยได้ จากการวิเคราะห์สารสกัดจากเชื้อราด้วยวิธี HPLC พบว่า เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสาร indoleacetic acid (IAA) และ phenylacetic acid (PAA) ได้ ซึ่งจากการนำสารมาตรฐานของสารทั้งสองชนิดนี้มาทดสอบกับใบเปล้าน้อยสามารถก่อให้เกิดอาการแผลโรคเหมือนกับแผลโรคที่เกิดจากเชื้อราเช่นเดียวกัน แสดงว่าสาร IAA และ PAA เป็นสารพิษที่เป็นตัวการสำคัญต่อการเกิดโรค ในการเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องเปล้าน้อยบนอาหารสูตรMS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.9 ยอดต่อชิ้นพืช จากการนำยอดมาคัดเลือกให้ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราโดยเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่เติมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 0, 10, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต ความสูงเฉลี่ยของยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลง เมื่อนำยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิต ย้ายเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้นสูงขึ้น โดยยอดที่ไม่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราจะมีการเจริญเติบโตน้อยลงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนยอดที่รอดชีวิตสามารถเจริญเป็นยอดปกติ

Project Title : Screening for Tissue Culture Derived Plaunoi Plant Resistable to Crude Extract Toxin from *Glomerella cingulata*

Name of the Investigators : Petcharut chuntaratin Aushariya Maneenoi and Veradej Sukaeid

Year : August 1999

Abstract

The causal organism of leafspot disease of *Croton Sublyratus* Kurz is *Glomerella cingulata* which is *Colletotrichum gloeosporioides* as imperfect stage. Optimum growth and sporulation of this fungus were found on Czapek agar. It produced maximum dry weight as well as crude extact toxin in Czapek Dox medium at 4 th days. Test toxicity of crude extract toxin by leaves assay revealed that crude extract toxin at concentration 10,000 mg/l can produce the similar symptom as product by the pathogen. The crude extract toxin was analysed by HPLC showed that *Glomerella cingulata* produced indoleacetic acid (IAA) and phenylacetic acid (PAA). Using standard of IAA and PAA for leaves assay which disease symptom were similar to cause by the fungus. The result suggested that IAA and PAA were the pathotoxin. Stem segments of *Croton sublyratus* Kurz were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium which supplement with BA at concentration 1 mg/l gave highest shoot number of 3.9 shoots. Shoots were screened for resistance to crude extract toxin by placing on the medium contained with crude extract toxin at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. The result indicated that the increasing of concentrations of the toxin would reduce percent survival of shoots, number of shoots and height of shoots. The survived shoots were selected again in high concentration of crude extact toxin. The susceptible shoots became brown and reduction in growth but the survived shoots grew the same as control .

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	6
บทที่ 3 ผลการวิจัย	14
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการวิจัย	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	45
เอกสารอ้างอิง	47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณสปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน	17
ตารางที่ 2	ปริมาณของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสารพิษที่ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อต่างกัน	19
ตารางที่ 3	ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาวของแผลโรคบนใบเปล้าน้อยที่ตอบสนองต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* (4 วัน) ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ภายหลังจากทดสอบเป็นระยะเวลา 5 วัน	19
ตารางที่ 4	ค่าเฉลี่ยขนาดของแผลโรคบนใบเปล้าน้อยที่ตอบสนองต่อสารมาตรฐาน IAA และ PAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 3 วัน	22
ตารางที่ 5	ปริมาณสาร IAA และ PAA ที่ได้จากสารสกัดของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ภายหลังการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเป็นระยะเวลาต่างๆ	27
ตารางที่ 6	การตอบสนองของเนื้อเยื่อส่วนปล้องเปล้าน้อยที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	31
ตารางที่ 7	เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ย และความสูงเฉลี่ยของยอดเปล้าน้อย ภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	35
ตารางที่ 8	จำนวนยอดและเปอร์เซ็นต์ยอดเปล้าน้อยต้านทานที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้นสูงขึ้น เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคใบจุดเปล้าน้อยที่เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* 15

ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อย 16

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบอาการของแผลโรคใบจุดเปล้าน้อยที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Glomerella cingulata* และแผลโรคที่เกิดจากสารสกัดของเชื้อรา 20

ภาพที่ 4 การตอบสนองของใบเปล้าน้อยต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับ control 21

ภาพที่ 5 การตอบสนองของใบเปล้าน้อยต่อสารมาตรฐาน indoleacetic acid (IAA) และ phenylacetic acid ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ 23

ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของสาร indoleacetic acid (IAA) ในช่วงความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร 25

ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของสาร phenylacetic acid (PAA) ในช่วงความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร 25

ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน IAA, PAA และ สารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* 26

ภาพที่ 9 ลักษณะการเจริญของยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ 29

ภาพที่ 10 การพัฒนาการของยอดเปล้าน้อยที่ได้จากการเลี้ยงส่วนปล้องในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 30

ภาพที่ 11 การเจริญของยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่ความเข้มข้น 0, 10, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 36

ภาพที่ 12 ลักษณะของยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา ภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 37

ภาพที่ 13 ลักษณะของยอดเปล้าน้อยที่ไม่ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา ภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 38

ภาพที่ 14 การเปลี่ยนยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรากับต้นตอเปล้าใหญ่ด้วยวิธีการต่อกิ่งแบบตัว " ที" 40

หน้า

แผนภาพที่ 1 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด ตาข้าง และปล้องบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 3 เดือน 32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากใบเปล้าน้อยเป็นแหล่งวัตถุดิบที่นำมาสกัดตัวยาเปลาโนทอล ใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ (Ogiso และคณะ, 1978) จึงเป็นที่ได้รับความสนใจและมีการผลิตเป็นระบบอุตสาหกรรม ซึ่งการผลิตเป็นระบบอุตสาหกรรมก่อให้เกิดผลกระทบตามมาเพราะ การปลูกพืชชนิดเดียวกันเป็นจำนวนมากจะต้องมีปัญหาเรื่องโรคและแมลงเข้าทำลาย ในประเทศไทยมีรายงานพบการระบาดของโรคใบจุดเปล้าน้อยที่เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ทำความเสียหายให้กับแหล่งที่มีการปลูกเปล้าน้อยในเขตอุทยานแห่งชาติหาดวนกร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี โดยก่อให้เกิดอาการเป็นจุดแผลกลมสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลบนเส้นใบมีสีดำ (ชลิดา และนลิน, 2540) ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการผลิตยาเปลาโนทอล เพราะการสกัดสารเปลาโนทอลนั้นสกัดจากส่วนใบของเปล้าน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราชนิดนี้ยังเป็นสาเหตุโรคพืชที่พบบนพืชอื่นอีกหลายชนิด (Uecker,1994) สำหรับพืชไม้เนื้อแข็งที่ถูกเชื้อราชนิดนี้เข้าทำลายได้แก่ แอปเปิล องุ่น camelia pears peach (Agrios, 1997) เป็นต้น

การศึกษาสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

Walker และ Templeton (1978) ได้ทำการทดสอบสารพิษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*) ในอาหารเหลวโดยตัดชิ้นส่วนของพืชอาศัย (*Aeschynomine virginica*) แช่ใน culture filtrate ของเชื้อราพบว่า เซลล์พืชถูกทำลายเกิดอาการเหี่ยว ขอบใบไหม้และตาย Wang (1986) ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของแคลลัสมะกอกต่อสารพิษของเชื้อราชนิดนี้พบว่า แคลลัสของมะกอกมีการเจริญเติบโตน้อยลงและแคลลัสมีสีน้ำตาล Suwarto และคณะ (1988) ทำการทดสอบ crude toxin ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนแคลลัสของยางและต้นมะเขือเทศ โดยดูเปอร์เซ็นต์การตายของพืชอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารพิษที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้แคลลัสของยางตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากได้รับสารพิษเป็นเวลา 30 นาทีในขณะที่ต้นอ่อนของมะเขือเทศตายภายหลังจากได้รับสารพิษความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1.11 ชั่วโมง Naik และคณะ (1989) พบว่า Richards ' medium

เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคในต้นพลู เพื่อให้สร้างสารพิษและพบว่า ความเข้มข้นของ culture filtrate และระยะเวลามีผลต่อการแสดงอาการของโรค นอกจากนี้สารพิษที่ได้ยังคงมีความเป็นพิษอยู่ภายหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว Pawirosoemardjo และ Soewarto (1990) ศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของสารพิษของเชื้อรา *C. gloeosporioides (G. cingulata)* ในยางพาราพบว่า อาการของโรคที่เกิดจากสารพิษคล้ายกับอาการของโรคที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย Naik และคณะ(1991) ทำการแยกเชื้อราชนิดนี้ในผักชี (*Coriandrum sativum*) และเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว(culture filtrate) จากนั้นทดสอบความเป็นพิษกับเมล็ดพืชได้แก่ ผักชี มะเขือเทศ พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ด Hirota และคณะ (1993) รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการแยกและสกัดสารพิษบริสุทธิ์ของเชื้อรา *G. cingulata* ที่เป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของต้นชา (tea brown blight) พบว่าเป็นสาร Phenylacetic acid และ Indoleacetic acid และทำการทดสอบสารพิษที่แยกได้โดยวิธี tea leaf puncture bioassay พบว่า สามารถทำให้เกิดอาการแผลโรคบริเวณที่หยดสารพิษลงบนใบชา

บทบาทของสารพิษที่มีต่อเซลพืช

บทบาทของสารพิษที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนั้น มีทั้งที่เป็นสารพิษที่มีความจำเป็นต่อการก่อให้เกิดอาการของโรคที่เรียกว่า primary determinant และสารพิษที่ไม่มีความจำเป็นต่อการก่อให้เกิดอาการของโรค แต่มีบทบาทส่งเสริมให้อาการของโรครุนแรงมากยิ่งขึ้นที่เรียกว่า secondary determinant (ฉรงค์ และคณะ,2538)

การศึกษาบทบาทของสารพิษที่มีต่อเซลล์พืชนั้นยังมีการศึกษาน้อย เนื่องจากสาเหตุหลายประการเช่น ไม่สามารถรู้ปริมาณของสารพิษที่มีอยู่ในต้นพืชที่เป็นโรค และปริมาณของสารพิษที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาต่อพืชนั้นจะใช้สารพิษที่สกัดได้ในความเข้มข้นที่สูงและใช้เวลาในการให้สารน้อย ในการทำการทดลองบางครั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการรบกวนทางสรีระเป็นเวลานาน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะทำให้พืชแสดงอาการของโรคมากขึ้น โดยทั่วไปสารพิษที่ต่างชนิดกันก็จะแสดงผลแตกต่างกัน ผลของสารพิษที่มีต่อพืชนั้นไม่ได้มีลักษณะจำเพาะมากนัก อาจพบลักษณะอาการที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งเกิดจากโรคอื่นหรือพืชอยู่ในสภาวะเครียด ซึ่งอาจเกิดจากฮอร์โมนหรือสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Hanchey, 1981)

งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย

การใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อขยายพันธุ์เปล้าน้อยยังมีการศึกษาน้อยมาก มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อยครั้งแรกโดย Murai และคณะ (1990) ทำการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงจากเมล็ดของเปล้าน้อยในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วจึงย้ายแคลลัสเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการเกิดยอด (regenerate) แล้วจึงนำยอดที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม IAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตรและ ไบโอไฟเบอร์ (BD_2) เพื่อชักนำให้ยอดเกิดราก จากการศึกษาของ Shibata และคณะ (1996) ทำการเพาะเลี้ยงส่วนตายอดที่ได้จากการเพาะเมล็ดเปล้าน้อยในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงส่วนตาข้างในอาหารที่เติม phenylurea 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และสามารถเพิ่มจำนวนยอดโดยเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำยอดที่ได้เลี้ยงในอาหาร MS ที่ลดความเข้มข้นของสารอาหารเหลือ 1 ใน 10 (1/10 MS) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และ vermiculite สามารถชักนำการเกิดรากได้ 60 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในประเทศไทย อพัชชา(2537) ได้ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนใบเปล้าน้อยและสามารถชักนำแคลลัส ให้เกิดยอดได้โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ GA_3 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของชลิดาและวีระเดช (2541) พบว่า สามารถชักนำส่วนปล้องเปล้าน้อยให้เกิดยอดได้ในอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคในสภาพปลอดเชื้อ (In vitro selection)

ปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้เข้ามามีบทบาทในการคัดพันธุ์ต้านทานโรคมากขึ้น เริ่มจาก Calson เป็นบุคคลแรกที่ศึกษาการคัดเลือกพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ โดยคัดเลือกเซลล์ของยาสูบที่ต้านทานต่อ methionine sulfoximine ซึ่งเป็นสารที่มีรูปแบบเดียวกับสารพิษ tabtoxin ที่สร้างโดยเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* ต้นยาสูบที่ได้จากการคัดเลือกเซลล์โดยวิธีนี้ สามารถแสดงความต้านทานเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า เมื่อนำไปปลูกในแปลง (Toyoda และ Ouchi, 1991) จากความสำเร็จนี้จึงได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกพืชต้านทานโรคในพืชชนิดอื่นมากขึ้น ซึ่งในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคโดยอาศัยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจทำได้โดยการคัดเลือกจากเซลล์หรือจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่ทนต่อความกดดันต่างๆ ที่ถูกกำหนดขึ้นในสภาพ

เพาะเลี้ยง หรือการคัดเลือกภายหลังกับต้นพืชโดยตรงจากจำนวนพืชที่ได้หลังจากการเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง (Furusava, 1988; George,1988; Sun และ Zheng,1990) ความกดดันที่สร้างขึ้นในสภาพการเพาะเลี้ยง ทำได้โดย

1. การคัดเลือกโดยใช้ host-specific toxin

host-specific toxin เป็นสารเมตะบอไลท์ ที่เชื้อสาเหตุโรคสร้างขึ้นมาและมีความจำเพาะกับพืชนั้นเช่นเดียวกับตัวเชื้อ ความต้านทานต่อสารพิษจึงเปรียบเสมือนการต้านทานต่อโรคและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับการสร้างสารพิษ ดังนั้นสารพิษจึงใช้ในการทดลองที่ต้องการผลของปฏิกริยาระหว่างพืชกับเชื้อโรค นอกจากนั้นสามารถนึ่งให้ปราศจากเชื้ออื่นๆ ได้ ซึ่งช่วยให้สามารถทำการทดลองได้ง่ายขึ้น

2. การคัดเลือกโดยใช้ non-specific toxin

non-specific toxin หมายถึงสารเมตะบอไลท์ที่เชื้อโรคสร้างขึ้น ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาการของโรค แต่ไม่ตอบสนองต่อการเข้าทำลายโดยเชื้อทั้งหมด ความต้านทานต่อ non-specific toxin อาจส่งเสริมให้เกิดความต้านทานโรคทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ

3. การคัดเลือกโดยใช้สารเคมี

สารเคมีบางชนิดอาจใช้แทนอาหารกรองที่ได้จากเชื้อ (culture filtrate) หรือสารสกัดจากเนื้อเยื่อพืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย สารเคมีที่ใช้เช่น methionine sulfoximine (MSO)

4. การคัดเลือกโดยใช้เชื้อสาเหตุโรค

เชื้อโรคหลายชนิดไม่มีการสร้างสารพิษ ดังนั้นจึงมีการใช้ส่วนของเชื้อสาเหตุเป็นตัวทดสอบ โดยเชื้อจะมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรค ทำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการคัดเลือกเซลล์พืชที่มีลักษณะต้านทานโรคออกมา

การใช้สารพิษที่เชื้อโรคสร้างขึ้นในการคัดเลือกพืชต้านทานโรคมีข้อจำกัดบางประการคือ สารพิษที่ใช้ต้องมีความสัมพันธ์ต่อการก่อให้เกิดอาการของโรค โดยแผลโรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารพิษจะต้องมีอาการคล้ายกับแผลโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา(Magaret,1986) มีพืชหลายชนิดที่ใช้เชื้อสาเหตุและสารพิษในการคัดพันธุ์ต้านทาน เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ยาสูบ เป็นต้น (Rup และ Sukanya, 1990) เชื้อที่มีการศึกษาส่วนใหญ่ ได้แก่ *Psudomonas syringae, Phoma lingam , phytopthora infestan* (สุรวิช, 2540) มีรายงานการศึกษาที่ประสบผลสำเร็จในการใช้สารพิษในการคัดเลือกพืชต้านทานโรค ได้แก่ การใช้สารพิษของเชื้อ *Phoma tracheiphila* สาเหตุโรค malsacco คัดเลือกนิวเซลลาแคลลัสของเลมอน ต้นต้านทานที่ได้เมื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติจะแสดงความต้านทานมากขึ้น (Gentile, 1992) แต่การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคอาจไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ อาจใช้ culture filtrate (CF) แทนการใช้สารพิษบริสุทธิ์ได้ (จารุวรรณ, 2539) โดยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ partially purified culture filtrate (PPCF) ของเชื้อรา *Colletotrichum Kahawae* สาเหตุโรค coffee berry disease ซึ่งเข้าทำลายผลกาแฟ ในการคัดเลือกแคลลัสของกาแฟทั้งสายพันธุ์ที่ต้านทานและไม่ต้านทานโรคพบว่าแคลลัสที่ต้านทานต่อ PPCF จะไม่เป็นสีน้ำตาล (necrosis) และมีการเจริญต่อไปได้ เมื่อนำแคลลัสที่ต้านทานมาชักนำให้เกิดยอดและนำยอดที่ได้มาคัดเลือกด้วย PPCF อีกครั้งจะทำให้ยอดมีความต้านทานสูงขึ้น และเป็นแนวทางสำหรับการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรค (Nyange และคณะ,1995)

สำหรับเปล้าน้อยยังไม่มีรายงานวิธีการควบคุมโรคนี้เนื่องจากเปล้าน้อยเป็นพืชป่า ที่ขึ้นอยู่ในสภาพที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ไม่มีการใช้สารเคมี และถ้าเมื่อใดมีการส่งเสริมให้ปลูกเปล้าน้อยเป็นพืชเศรษฐกิจ การเกิดโรคย่อมรุนแรงขึ้น การคัดเลือกพืชต้านทานสารพิษที่เชื้อสาเหตุโรคสร้างขึ้นโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่อาจจะช่วยลดความสูญเสียเนื่องจากโรคนี้ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาเทคนิคทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย เพื่อเพิ่มจำนวนยอดในสภาพปลอดเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด

2. ศึกษาความสามารถของสารพิษจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ในการก่อให้เกิดอาการใบจุดกับเปล้าน้อย

3. พัฒนาต้นเปล้าน้อยให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษจากเชื้อรา*Glomerella cingulata*

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 พืชทดลอง

ใช้ต้นเปล้าน้อยที่ปลูกไว้ในแปลงทดลองของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรม-พันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งรวบรวมต้นเปล้าน้อยที่ได้จาก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดนครพนม

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อตามอาหารสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) และ WPM (McCown และ Lloyd, 1981)

2.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่

- BAP (6-Benzylaminopurine)
- Kinetin
- NAA (α - Napthaleneacetic acid)

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อและสารลดแรงตึงผิว ได้แก่

- เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- คลอรอกซ์ (โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5.25 เปอร์เซ็นต์)
- ทวีน-80 (Tween-80)

2.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อราได้แก่ water agar (WA), potato dextrose agar (PDA), Czapek agar (CZA), Czapek Dox medium, Malt extract และ Leonian 's medium agar

2.2.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกสกัดสารพิษจากเชื้อราและวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา ได้แก่ ethylacetate, methanol, acetonitrile

2.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อย

2.3.1 การสำรวจเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างเปล้าน้อยที่เป็นโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* จากบริเวณแปลงปลูกเปล้าน้อยในเขตบ้านค่านสิงห์ขร อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพื่อนำมาใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์

2.3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรค

นำตัวอย่างใบเปล้าน้อยที่เป็นโรคใบจุดมาตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคโดยตัดเนื้อเยื่อพืชบริเวณแผลโรค (cross section) แล้วดูลักษณะของ fruiting structure , ascus และ ascospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แยกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting (Dhingro และ Sinclair, 1986) โดยการตัดชิ้นส่วนของใบบริเวณขอบแผลที่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 3 x 3 มิลลิเมตร ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้าง คลอรอกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชไปวางบนอาหาร water agar (WA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จะเห็นเส้นใยมีสีขาวเจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช ตัดส่วนปลายของเส้นใยโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) เพื่อนำไปพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch' s postulate ซึ่งเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือทางโรคพืชในการยืนยันถึงเชื้อสาเหตุโรคที่ทำให้เกิดอาการกับพืช (Agrios, 1978)

2.3.3 การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch' s postulate

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2.3.2 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 7 วัน นำเชื้อมาเตรียมสปอร์แขวนลอยให้มีความหนาแน่นของสปอร์ $1x10^{6}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงทำการปลูกเชื้อลงบนใบเปล้าน้อยด้วยวิธีฉีดพ่นสปอร์แขวนลอย จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อให้มีความชื้นสูงตลอดนาน 2-3 วัน ตรวจลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นภายหลังจากการปลูกเชื้อ เมื่อใบเปล้าน้อยแสดงอาการของโรคจึงนำมาแยกเชื้อและปลูกเชื้อใหม่อีกครั้ง (reisolation and reinoculation) ตามวิธีการข้างต้นเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2.4 การศึกษาการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

2.4.1 ศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

นำเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2.3.3 ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ปิเปตสปอร์แขวนลอยให้มีความหนาแน่นของสปอร์ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหารวุ้นเอียง 5 สูตร คือ PDA (potato dextrose agar), PCA (potato carrot agar) , CZA (Czapek agar) Malt extract และ Leonian 's medium agar ใช้เข็มห่วง (loop) ลากให้สปอร์กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน ทำการเก็บสปอร์โดยปิเปตสารละลาย tween-80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (V/V) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อรา ใช้เข็มห่วงขูดเชื้อราให้หลุดออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเขย่าอย่างแรง แล้วใช้ผ้าขาวบางกรองเส้นใยออก จะได้สารละลายแขวนลอยของสปอร์ ล้างสปอร์ที่ติดอยู่ในหลอดทดลองและบนผ้ากรองด้วยสารละลาย tween-80 จำนวน 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้ววัดปริมาตรสารละลายแขวนลอยของสปอร์ทั้งหมดที่ได้ และหาความหนาแน่นของสปอร์แขวนลอย (สปอร์/มิลลิลิตร)โดยนับด้วย haemacytometer ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ต่อ 1 สูตรอาหารทดลอง

2.4.2 ศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวให้สร้างสารพิษ และการสกัดสารพิษจากเชื้อรา *Glomerella cingulata*

เพื่อศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่เหมาะสม ในการให้ได้ปริมาณสารสกัดจากเชื้อราจำนวนมาก สำหรับนำไปใช้ในการคัดเลือกยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา โดยนำเชื้อรา *Glomerella cingulata* มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.4.1 เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้สร้างสปอร์ ถ่ายสปอร์แขวนลอยซึ่งมีความหนาแน่นของสปอร์ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Czapek-Dox medium ที่เติม yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Hirota และคณะ,1993) ปริมาตร100 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 7 และ 14 วัน เมื่อครบกำหนดแต่ละระยะ จึงนำของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรามากรองเอาเส้นใยออกโดยกรองผ่านผ้าขาวบาง 3 ชั้น และกระดาษกรอง No. 1 ของเหลวที่ได้เรียกว่า culture filtrate (CF) นำมาลดปริมาตรลงให้เหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาตรของ CF

เริ่มต้น โดยใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน(rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำ CF ที่ลดปริมาตรแล้วไปปรับค่า pH ให้ได้ 2.5 ด้วย 6N HCl สกัดด้วย ethyl acetate 4 ครั้งๆละ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายในชั้นของ ethyl acetate ไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออก ได้สารสกัดจากเชื้อราที่มีลักษณะเหนียวข้นเรียกว่า crude extract toxin ชั่งน้ำหนักสารสกัดจากเชื้อรากับปริมาณน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่กรองได้ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ

2.4.3 การทดสอบสารสกัดจากเชื้อรา*Glomerella cingulata* ต่อการเกิดโรคใบจุดเปล้าน้อย

นำใบเปล้าน้อยที่มีขนาดใบยาวประมาณ 8 เซนติเมตร มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง วางในกล่องที่ให้ความชื้น ทดสอบสารสกัดจากเชื้อราด้วยวิธี puncture bioassay (Hirota และคณะ, 1993) โดยทำแผลบนใบเปล้าน้อยด้วยเข็ม และใช้สารสกัดจากเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 4 วัน และผ่านขั้นตอนการสกัดแล้วจากข้อ 2.4.2 ในระดับความเข้มข้น 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดลงบนรอยแผลที่ทำไว้ บ่มใบพืชดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตอาการและวัดขนาดแผลโรคที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับแผลโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา

2.4.4 การทดสอบสารมาตรฐาน IAA และ PAA ต่อการเกิดโรค

จากรายงานของ Hirota และคณะ (1993) พบว่า เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสารพิษ indoleacetic acid (IAA) และ phenylacetic acid (PAA) โดยสารทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิดอาการใบจุดกับชาได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยนำสารมาตรฐาน IAA และ PAA ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หยดลงบนใบเปล้าน้อย ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4.3 ตรวจผลการตอบสนองต่อสารมาตรฐาน IAA และ PAA โดยวัดขนาดแผลโรคที่เกิดขึ้น

2.4.5 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อยโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

ทำการผันแปรความเข้มข้นของสารมาตรฐาน IAA และ PAA ที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วสร้างกราฟมาตรฐาน IAA และ PAA เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อย

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสาร IAA และ PAA ปรับปรุงจากวิธีการของ Mizukami และคณะ (1991)

คอลัมน์	: Selectosil 5 C 18 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: acetonitrile 20 เปอร์เซ็นต์
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ตรวจวิเคราะห์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	: 210 นาโนเมตร
ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์	: 5 ไมโครลิตร
ความดัน	: 130-150 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2.4.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน IAA และ PAA

เตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA และ PAA บริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 0, 10 , 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นเข้าเครื่อง HPLC ตามภาวะดังกล่าวข้างต้น สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคของสารทั้งสองชนิดจากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง คำนวณหาสมการเส้นตรง $Y = aX + b$

เมื่อ a = ความชันของเส้นตรง

b = จุดตัดแกน Y

X = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

Y = พื้นที่ใต้พีค

2.4.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา

นำสารสกัดจากเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ระยะเวลาต่างๆ และผ่านขั้นตอนการสกัดสารจากข้อ 2.4.2 ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งละลายใน acetronitrile 20 เปอร์เซ็นต์ กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสแอซีเทตที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร IAA และ PAA ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณปริมาณสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อราในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาเปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน IAA และ PAA โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

จาก $Y = aX + b$

$$X = \frac{Y - b}{a}$$

2.5 การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย

เทคนิคการพัฒนาให้พืชสร้างยอดจากเนื้อเยื่อ เป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานโรคทำโดยใช้ส่วนต่างๆ ได้แก่ ปลายยอด ตาข้าง และส่วนปล้องของพืช มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดยอด จากนั้นจึงนำยอดที่ได้มาชักนำให้ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรา (crude extract toxin)

2.5.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

ส่วนปลายยอดและตาข้าง ตัดยอดเปล้าน้อย ความยาว 12-15 เซนติเมตร นำกิ่งมาตัดใบออกล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที และสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มี tween 80 จำนวน 1-2 หยด เป็นระยะเวลา 20-30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วตัดกิ่งเป็นท่อนๆ ความยาวท่อนละ 1-1.5 เซนติเมตร มีตาติดอยู่ด้วย 1 ตา นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog ,1962) เพื่อใช้สำหรับการทดลอง

ส่วนปล้อง นำเนื้อเยื่อส่วนปล้องมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีการเช่นเดียวกับส่วนยอด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อใช้สำหรับการทดลอง

2.5.2 สูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอด

เลี้ยงส่วนปลายยอดและตาข้างของเปล้าน้อยที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.1 บนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) และ Woody Plant Medium (WPM) (McCown และ Lloyd, 1981) ที่เติม BA, kinetin, IBA หรือ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกการเกิดยอดและการเจริญเติบโต

เลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปล้องของเปล้าน้อยที่เตรียมได้จากข้อ 2.5.1 บนอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และในสภาพที่ไม่ให้แสง บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และจำนวนยอด

2.6 การชักนำให้ยอดเปล้าน้อยต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata*

2.6.1 การทดสอบผสมสารสกัดจากเชื้อราลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย

นำส่วนปล้องเปล้าน้อยซึ่งเป็นชิ้นส่วน(explant) ที่สามารถชักนำการเกิดยอดได้จำนวนมาก มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตามวิธีการข้อ 2.5.1 นำไปเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.5.2 คือ อาหารวุ้นสูตร Murashige และ Skoog (1962) (MS) ที่เติม 6-benzyladenine (BA) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 นำขวดเพาะเลี้ยงส่วนปล้องเปล้าน้อยไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในสภาพที่ไม่ให้แสงสว่างที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 เดือน เมื่อปล้องเปล้าน้อยเริ่มสร้างยอดเล็กๆ จึงนำมาย้ายลงอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ผสมอยู่ในความเข้มข้น 0 ,10, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 30 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง ความสูง และเปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต

2.6.2 การคัดเลือกยอดเปล้าน้อยต้านทานสารสกัดจากเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

นำยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตจากข้อ 2.6.1 มาทำการคัดเลือกบนอาหารสูตร MSที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ผสมอยู่ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น 2 เท่าของความเข้มข้นเดิมคือ 0, 20, 200, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ บันทึกผลโดยนับจำนวนยอดต้านทานที่รอดชีวิต จากนั้นนำยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตและต้านทานสารสกัดจากเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ไม่ใส่สารสกัดจากเชื้อราเพื่อให้ต้นเจริญเติบโตเป็นปกติและสมบูรณ์ สำหรับใช้ในการเปลี่ยนยอดกับต้นตอเปล้าใหญ่

2.6.3 การเปลี่ยนยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรากับต้นตอเปล้าใหญ่

นำยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตและต้านทานสารสกัดจากเชื้อราที่ได้จากข้อ 2.6.2 ซึ่งเป็นยอดที่สมบูรณ์ มาทำการเปลี่ยนยอดกับต้นตอเปล้าใหญ่ที่ได้จากการเพาะเมล็ด ด้วยวิธีการต่อกิ่งแบบตัว " ที " ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของชลิดา และ วีระเดช(2541) โดยใช้มีดกรีดเปลือกต้นตอตามแนวยาวประมาณ 3–5 เซนติเมตร และกรีดขวางเพื่อขึ้นรูปตัว " ที "ตัดยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราและมีขนาดความสูงประมาณ 1.5 – 3 เซนติเมตร เฉือนโคนยอดให้เป็นรูปลิ่มสอดลงในแผลที่เตรียมไว้ พันผ้าพลาสติกให้มิดรอยต่อ จากนั้นนำต้นที่เปลี่ยนยอดเรียบร้อยแล้ววางไว้ในเรือนเพาะชำที่ให้ความชื้น และได้รับแสงตามปกติ ถ้าการเสียบยอดประสบความสำเร็จจะเห็นยอดเปล้าน้อยเริ่มมีการเจริญเติบโต จากนั้นจึงทำการตัดยอดเปล้าใหญ่ทิ้งไป เมื่อต้นที่ทำการเปลี่ยนยอดเจริญสมบูรณ์ดีซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 5 สัปดาห์ ให้ตัดผ้าพลาสติกออกจากรอยแผล และดูแลบำรุงรักษาจนสามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ เพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อย

3.1.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรค

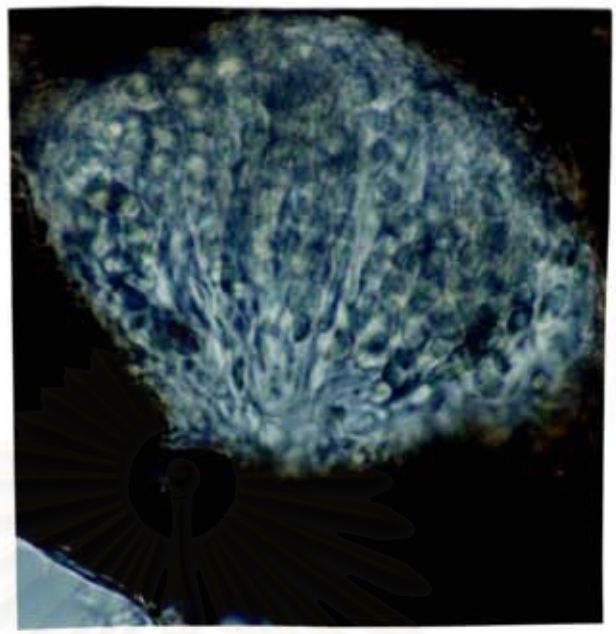
ลักษณะของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อยจากการตัด cross section เนื้อเยื่อใบบริเวณที่แสดงอาการเป็นแผลจุดกลมสีดำ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และมีวงสีเหลืองล้อมรอบ (ภาพที่ 1) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อรา *Glomerella cingulata* มี fruiting body แบบ perithecium สร้าง ascus จำนวนมาก ภายใน ascus มี 8 ascospore (ภาพที่ 2 a, b) จากการแยกเชื้อสาเหตุของโรคจากใบที่แสดงอาการเป็นแผลจุดกลมสีดำ โดยวิธี tissue transplanting method พบเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช ตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จะได้เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยฟูสีดำ เมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้นจะมีการสร้างสปอร์เป็นวงกลมหลายวงเรียงซ้อนกัน ลักษณะเป็นconcentric ring และเกิด spore mass สีส้มเล็กน้อยบนอาหาร PDA จากการตรวจดูลักษณะของ spore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ลักษณะสปอร์เป็นรูปทรงกระบอก หัวท้ายมน ขนาด 3.75-4.5 x 12.5 -15 ไมครอน ไม่มี setae (ภาพที่ 2c) เมื่อเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกเชื้อ(Hanlin,1990) พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นระยะ imperfect stage ของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

3.1.2 การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch' s postulate (Agrios, 1978)

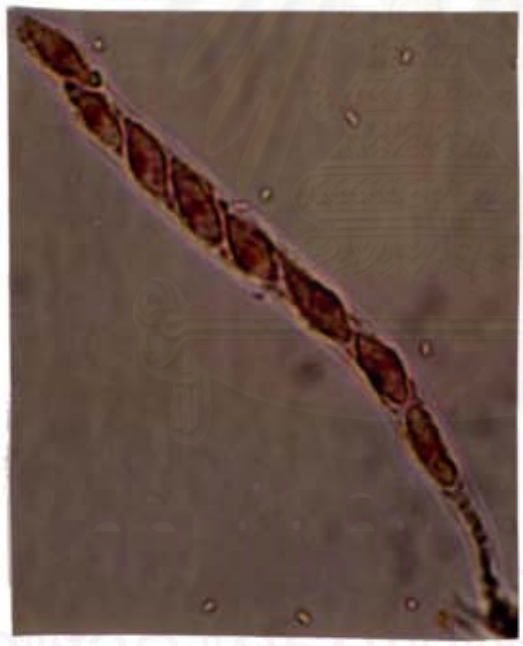
นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 3.1.1 ไปพิสูจน์โรคตามวิธี Koch's postulate โดยฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยซึ่งมีความหนาแน่นของสปอร์ 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนใบเปล้าน้อยที่ไม่เป็นโรค คลุมถุงพลาสติกเพื่อให้มีความชื้นสูงนาน 2-3 วัน พบว่า เชื้อราสามารถทำให้ใบเปล้าน้อยแสดงอาการภายหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน โดยอาการเริ่มแรกจะพบว่าเป็นจุดชุ่มน้ำแล้วต่อมาเปลี่ยนเป็นจุดสีดำเล็กๆ ทำการแยกเชื้อและปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งได้ผลการทดลองเหมือนข้างต้น จึงเป็นการยืนยันถึงเชื้อสาเหตุสามารถทำให้เกิดโรคใบจุดกับเปล้าน้อย

<u>ภาพที่ 1</u> ลักษณะอาการของโรคใบจุดเปล้าน้อยที่เกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* เป็นจุดแผลกลมสีดำ มีวงสีเหลืองล้อมรอบ

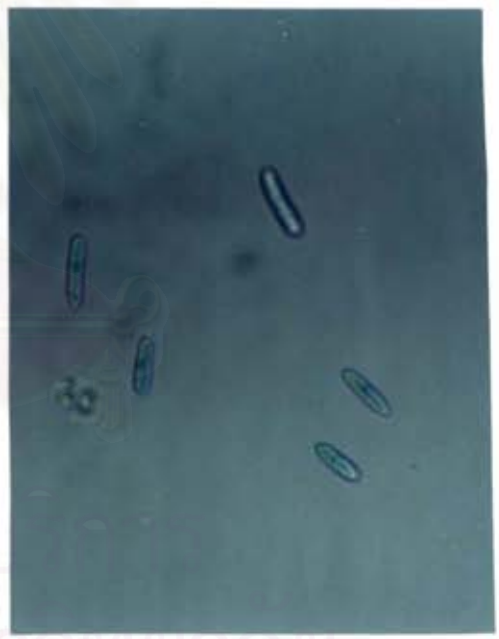
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)



(b)



(c)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ภาพที่2</u> ลักษณะของเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อย

(a) ลักษณะ fruiting body แบบ perithecium และ (b) ascus ภายในมี 8 ascospore ของเชื้อรา *Glomerella cingulata* จากการตัด cross section ใบเปล้าน้อย

(c) ลักษณะ conidia รูปทรงกระบอก หัวท้ายมนขนาด 3.75-4.5 x 12.5-15 ไมครอน ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (imperfect stage) ของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

3.2 การเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อราในสภาพที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวันพบว่า เชื้อรา สามารถสร้างสปอร์มากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Czapek Agar (CZA) รองลงมาคือสูตรอาหาร potato carrot agar (PCA) โดยมีปริมาณสปอร์เท่ากับ 2.9×10^7, 2.1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และเชื้อราสร้างสปอร์น้อยที่สุดในสูตรอาหาร Malt extract โดยมีปริมาณสปอร์เท่ากับ 3.1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงใช้สูตรอาหาร CZA ในการเลี้ยงเชื้อราให้สร้างสปอร์ และนำสปอร์มาใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสารพิษ

ตารางที่ 1 ปริมาณสปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

สูตรอาหาร	ปริมาณสปอร์ ($\times 10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
1. potato dextrose agar (PDA)	1801 bc [ง]
2. potato carrot agar (PCA)	2129 b
3. Czapex agar (CZA)	2993 a
4. malt extract	311 d
5. Leonian' s medium agar	1658 c
CV(%)	20.11

[ง] = ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังในแนวตั้งเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p = 0.01$ ตามวิธี Duncan' s new multiple range test

3.2.2 ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวให้สร้างสารพิษ และการสกัดสารพิษจากเชื้อรา *Glomerella cingulata*

ภายหลังการเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ในอาหาร Czapek Dox medium ที่เติม yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 7 วัน เพื่อให้ได้สารสกัดจากเชื้อรา พบว่า เชื้อราจะเริ่มสร้างเส้นใยเป็นเม็ดกลมเล็กๆสีขาวในอาหารเมื่อเชื้อมีอายุได้ 1 วัน เมื่อระยะเวลาของการเลี้ยงเพิ่มขึ้นเชื้อราจะเจริญเต็มอาหารที่ใช้เลี้ยง และสีของอาหารเริ่มมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีส้มเมื่อเชื้อมีอายุ 4 วัน และสีจะเข้มขึ้นเรื่อยๆจนเป็นสีน้ำตาลเมื่อใช้ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อนานขึ้น เมื่อนำของเหลวที่กรองได้จากการเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) ตามระยะเวลาที่ครบกำหนด ปริมาตร 600 มิลลิลิตร มาทำการแยกสกัดด้วย ethyl acetate สามารถแยกสารละลายออกได้เป็น 2 ชั้นคือ ชั้นของน้ำและชั้นของ ethyl acetate นำชั้นของ ethyl acetate ไประเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดจากเชื้อรา (crude extract toxin) ที่มีลักษณะข้นสีน้ำตาล พบว่า ปริมาณสารสกัดจากเชื้อราที่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดเมื่อเชื้ออายุได้ 4 วัน คือ 0.835 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำหนักแห้งของเส้นใยเท่ากับ 15.017 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวนานเกิน 4 วัน ปริมาณสารสกัดจากเชื้อราจะลดลง ซึ่งค่าดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่2) ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน จากนั้นนำสารสกัดจากเชื้อราไปทดสอบการเกิดโรคกับใบเปล้าน้อย และนำไปผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อยเพื่อคัดเลือกยอดต้านทานสารสกัดจากเชื้อรา

3.2.3 ผลการทดสอบสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ต่อการเกิดโรคใบจุดเปล้าน้อย

จากการนำสารสกัดจากเชื้อราไปทดสอบโดยหยดลงบนแผลที่ทำไว้บนใบเปล้าน้อย ใช้ความเข้มข้น 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารสกัดจากเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา เป็นเวลา 4 วัน ที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เกิดอาการแผลโรคคล้ายกับแผลโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา โดยมีขนาดของแผลโรคเท่ากับ 0.15X0.15 ตารางเซนติเมตร ส่วนความเข้มข้นอื่นรวมทั้ง control (น้ำกลั่น) ไม่ทำให้เกิดอาการใบจุดกับเปล้าน้อย (ตารางที่ 3; ภาพที่ 3 , 4)

ตารางที่ 2 ปริมาณของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสารพิษที่ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อต่างกัน

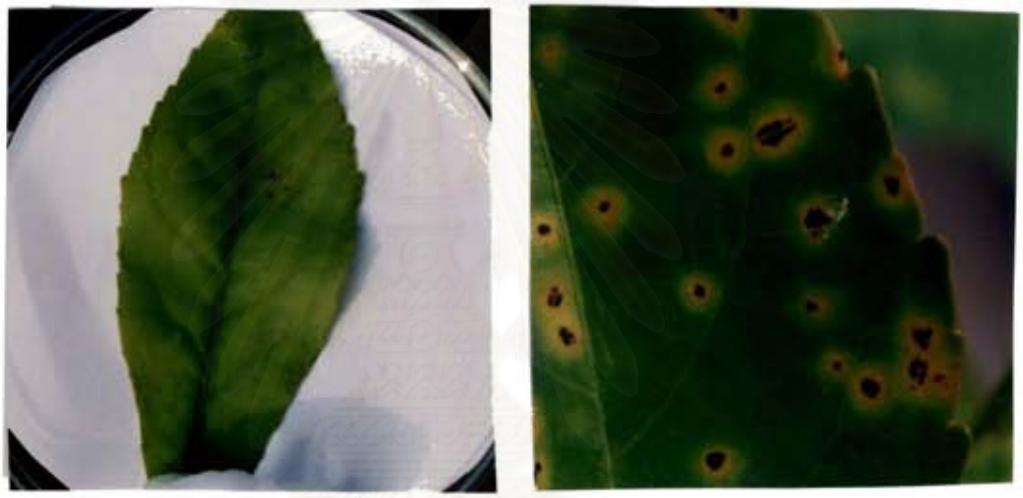
ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (วัน)	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารสกัดจากเชื้อรา (กรัมต่อลิตร)
1	0.527 f [1/]	0.175 e
2	1.611 e	0.215 e
3	6.966 d	0.435 c
4	15.017 a	0.835 a
5	14.367 b	0.755 b
7	11.230 c	0.317 d
CV(%)	0.41	6.45

[1/] = ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังในแนวตั้งเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ p = 0.01 ตามวิธี Duncan' s new multiple range test

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาวของแผลโรคบนใบเปล้าน้อยที่ตอบสนองต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* (4 วัน) ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ภายหลังจากทดสอบเป็นระยะเวลา 5 วัน

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา(มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความกว้างของแผลโรค (เซนติเมตร)	ความยาวของแผลโรค (เซนติเมตร)
0	0.00 a [1/]	0.00 a
10	0.00 a	0.00 a
100	0.00 a	0.00 a
1,000	0.00 a	0.00 a
10,000	0.15 b	0.15 b
CV(%)	81.65	81.65

[1/] = ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังในแนวตั้งเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ p = 0.01 ตามวิธี Duncan' s new multiple range test



(a) (b)

<u>ภาพที่3</u> เปรียบเทียบอาการของแผลโรคใบจุดเปล้าน้อยที่เกิดจากสารสกัดของเชื้อรา *Glomerella cingulata* (a) และแผลโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา (b)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 การตอบสนองของใบเปล้าน้อยต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ขวา) เปรียบเทียบกับ control (น้ำกลั่น) (ซ้าย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

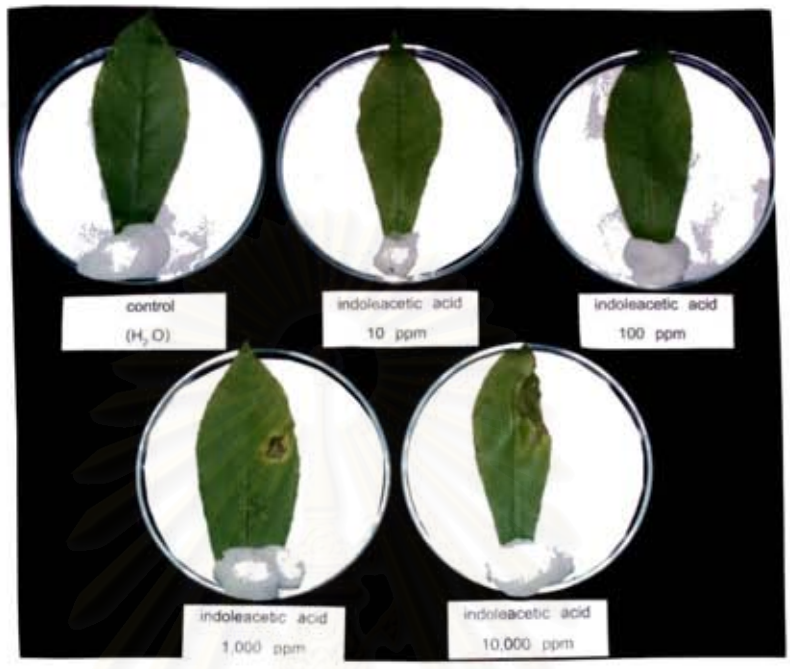
3.2.4 ผลการทดสอบสารมาตรฐาน IAA และ PAA ต่อการเกิดอาการใบจุดเปล้าน้อย

ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาวของแผลโรค ภายหลังจากหยดสารมาตรฐาน IAA และ PAA มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สาร IAA และ PAA ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดอาการใบจุดได้ โดยสาร IAA ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดความกว้างและความยาวของแผลเฉลี่ยเท่ากับ 0.525 และ 0.70 เซนติเมตร สาร IAA ที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดความกว้างและความยาวของแผลเฉลี่ยเท่ากับ 1.375 และ 2.525 เซนติเมตร สำหรับสาร PAA ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดความกว้างและความยาวของแผลเฉลี่ยเท่ากับ 0.375 และ 0.375 เซนติเมตร ส่วนสาร PAA ที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดความกว้างและความยาวของแผลเฉลี่ยเท่ากับ 1.375 และ 2.575 เซนติเมตร (ตารางที่ 4, ภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยขนาดของแผลโรคบนใบเปล้าน้อยที่ตอบสนองต่อสารมารตฐาน IAA และ PAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 3 วัน

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน(มิลลิกรัมต่อลิตร)	IAA		PAA	
	ความกว้างแผล (เซนติเมตร)	ความยาวแผล (เซนติเมตร)	ความกว้างแผล (เซนติเมตร)	ความยาวแผล (เซนติเมตร)
0	0 c[1/]	0 c	0 c	0 c
10	0 c	0 c	0 c	0 c
100	0 c	0 c	0 c	0 c
1,000	0.525 b	0.70 b	0.375 b	0.375 b
10,000	1.375 a	2.525 a	1.375 a	2.575 a
CV(%)	31.41	44.80	44.95	22.79

[1/] = ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังในแนวตั้งเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ p = 0.01 ตามวิธี Duncan' s new multiple range test



(a)

(b)

ภาพที่ 5 การตอบสนองของใบเปล้าน้อยต่อสารมาตรฐาน indoleacetic acid (IAA) ,(a) ; และ phenylacetic acid (PAA) , (b) ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ

3.2.5 ผลการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร indoleacetic acid (IAA) และ phenylacetic acid (PAA)จากสารสกัดของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ด้วยวิธี HPLC

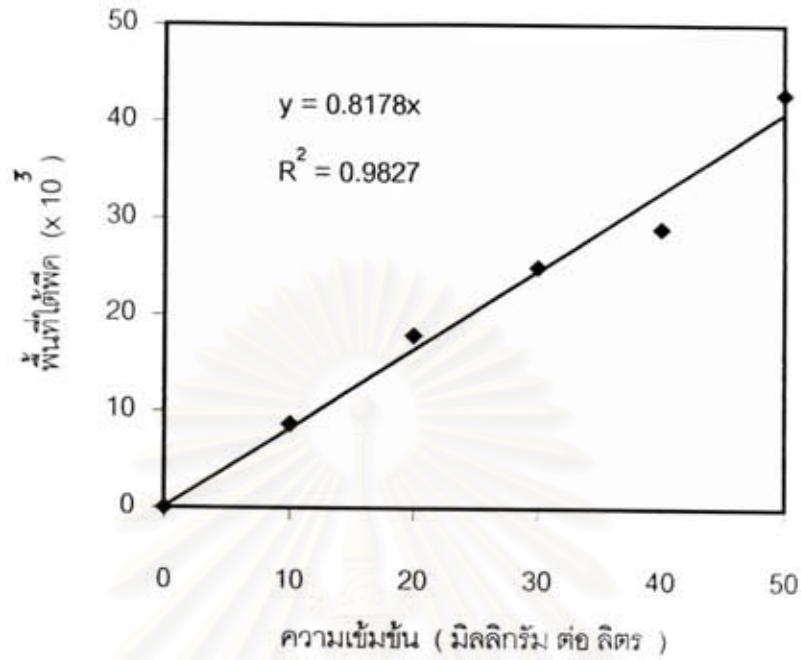
3.2.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน IAA และ PAA

จากการนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากแต่ละโครมาโทแกรมมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิด (แกน X) และพื้นที่ใต้พีค (แกน Y) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน โดยกราฟมาตรฐาน IAA จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงมีสมการเป็น $Y = 0.8178X (R^2 = 0.9827)$ และกราฟมาตรฐาน PAA จะได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงมีสมการเป็น $Y = 0.4207X (R^2 = 0.9995)$ ดังภาพที่ 6 และ 7

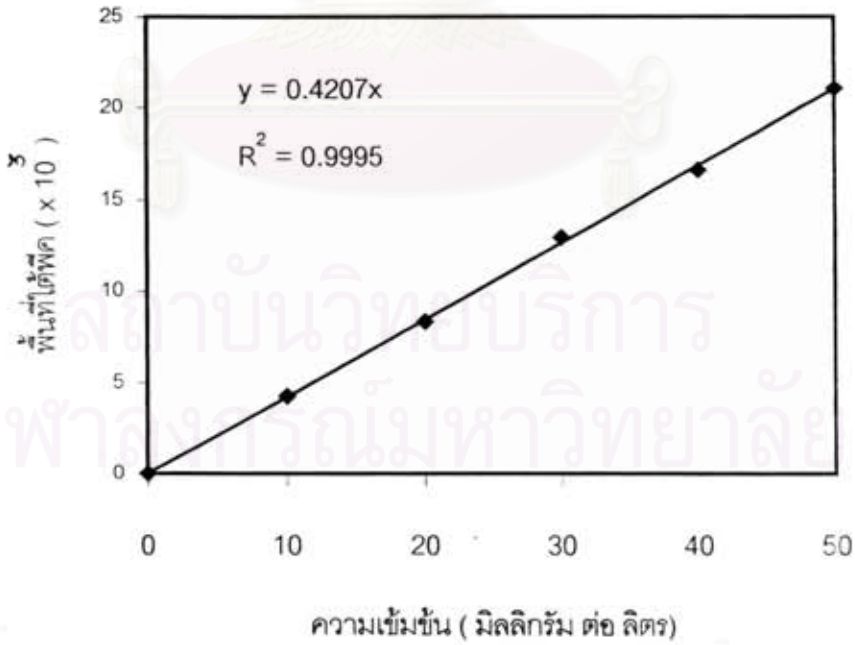
3.2.5.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา

จากการนำสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตร มาตรวจหาสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน IAA และ PAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธี HPLC ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Mizukami และคณะ (1991) พบว่า peak ของสารมาตรฐาน IAA มีค่า retention time ประมาณ 7 นาที และ peak ของสารมาตรฐาน PAA มีค่า retention time ประมาณ 5 นาที และเชื้อราสามารถสร้างสาร IAA และ PAA ได้ นอกจากนี้ยังพบสารชนิดอื่นซึ่งไม่ทราบว่าเป็นสารชนิดใด (ภาพที่ 8, ภาคผนวก)

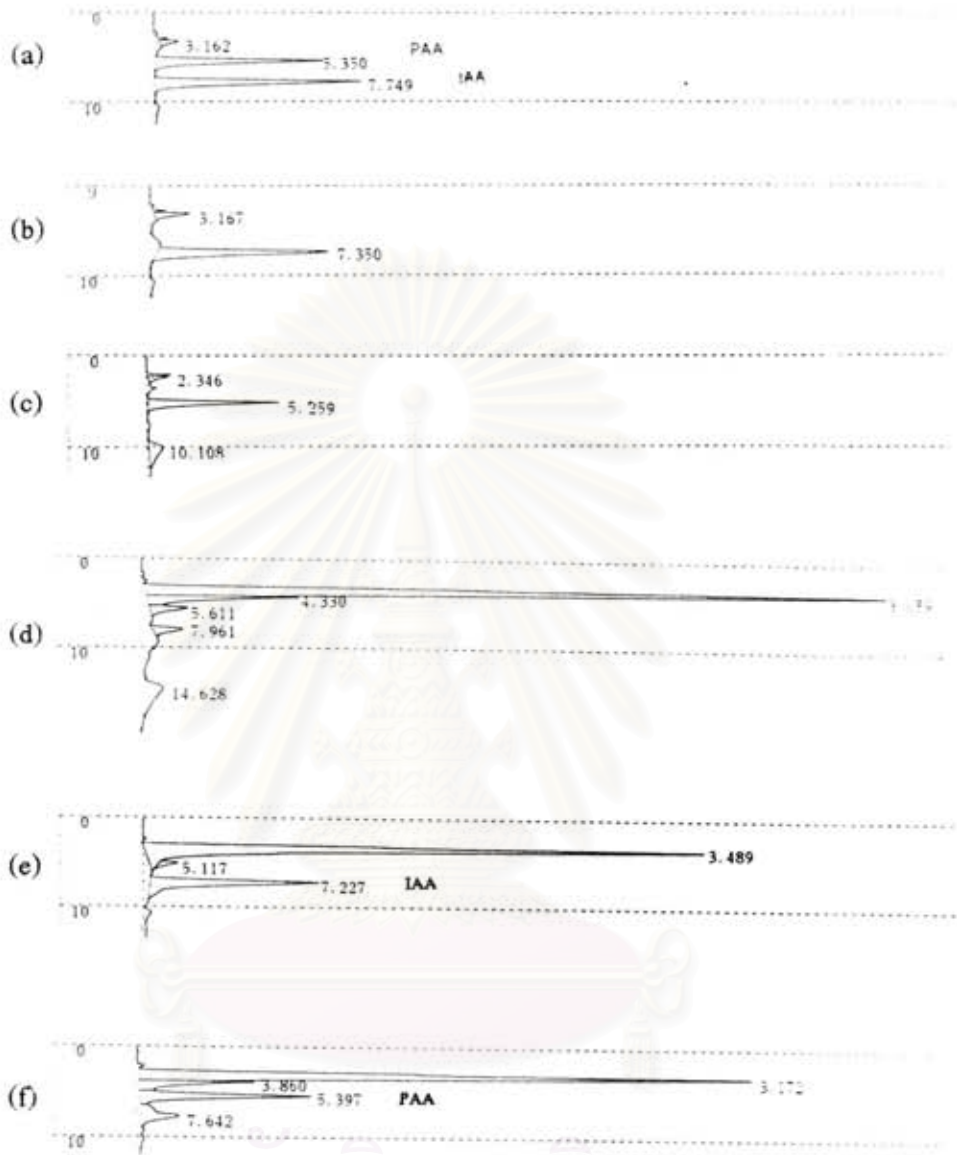
เมื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร IAA และ PAA จากสารสกัดของเชื้อราที่ได้ภายหลังการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสารพิษเป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 7 วัน พบว่าเชื้อรามีการสร้างสาร IAA และ PAA สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 4 วัน (ภาคผนวก) โดยเชื้อราเริ่มสร้างสาร IAA ประมาณวันที่ 2 และจะสร้างมากที่สุดเมื่อวันที่ 4 ซึ่งมีปริมาณสารเท่ากับ 4.22 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสาร PAA จะพบเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน มีปริมาณสารเท่ากับ 1.45 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสารพิษนานกว่า 4 วัน จะพบว่าเชื้อราอาจจะสร้างสารอื่นที่ไม่ใช่สารทั้งสองชนิดดังกล่าว (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของ indoleacetic acid (IAA) ในช่วงความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของ phenylacetic acid (PAA) ในช่วงความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน IAA , PAA และสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ภายหลังการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว 4 วัน

(a) IAA และ PAA มาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

(b) IAA มาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

(c) PAA มาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

(d) สารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

(e) สารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร+ IAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

(f) สารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร+ PAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสาร IAA และ PAA ที่ได้จากสารสกัดของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเป็นระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา (วัน)	IAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	PAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	-	-
2	1.02	-
3	1.16	-
4	4.22	1.45
5	-	-
7	-	-

- หมายถึง ไม่พบการสร้างสาร IAA และ PAA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การพัฒนาเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย

3.3.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

จากการชักนำให้เกิดยอดจากปลายยอดและตาข้างในระดับความเข้มข้นของ BA ที่ 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร MS และ WPM เป็นระยะเวลา 2 เดือน ไม่พบความแตกต่างจากการใช้อาหารแข็งสูตร MS หรือ WPM ที่ไม่ได้เติมสารเร่งการเจริญเติบโต (control) โดยให้จำนวนยอดเท่ากับ 1 ยอดต่อ 1 ตา และพบว่าสูตรอาหาร WPM จะทำให้ใบชีดมีสีขาว เมื่อเทียบกับยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS การใช้ BA ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ยอดมีสีดำ และใบร่วง (ภาพที่ 9) เมื่อใช้ฮอร์โมน kinetin , IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้นให้จำนวนยอดเท่ากับ 1 ยอดต่อ 1 ตาเช่นกัน และฮอร์โมน NAA จะมีผลทำให้เกิดแคลลัสจำนวนมาก

จากการชักนำยอดจากส่วนปล้องโดยเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS และ WPM ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่ไม่ให้แสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสพบว่า เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA พบการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดแคลลัสขึ้นปกคลุมด้านบนของชิ้นส่วนพืช ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7-10 วัน (ภาพที่ 10 a) ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ และเริ่มเกิดยอดเล็กๆสีขาวภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 เดือน เมื่อนำยอดที่ได้มาเลี้ยงในที่ให้แสงสว่างพบว่า ยอดจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียว (ภาพที่ 10 b) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 3.9 ยอดต่อชิ้นส่วนปล้อง และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 45.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตร WPM ไม่เกิดยอด (ตาราง 6)

สำหรับชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม จากการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อส่วนปล้องจะตอบสนองต่ออาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดยอดในปริมาณที่สูงกว่า (แผนภาพที่ 1)

(a)

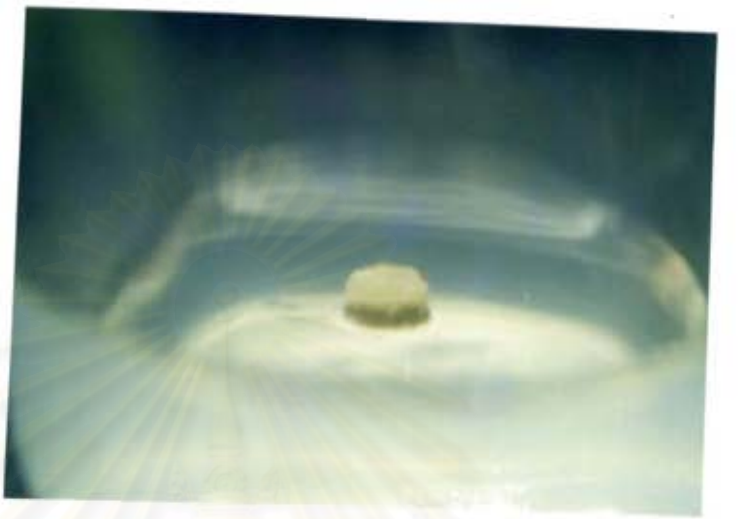
(b) (c)

ภาพที่ 9 ลักษณะการเจริญของยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

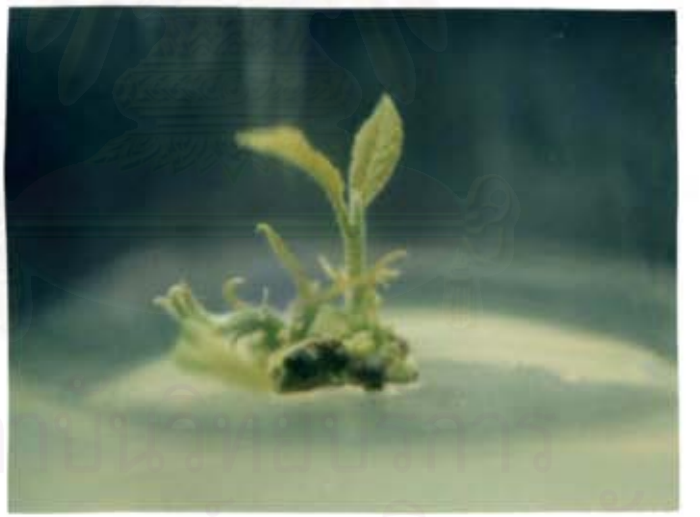
(a) ยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร WPM ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(b) ยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(c) ยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะยอดจะมีสีดำ



(a)



(b)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 10 การพัฒนาการของยอดเปล้าน้อยที่ได้จากการเลี้ยงส่วนปล้องในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

(a) เกิด callus สีขาวขึ้นปกคลุมภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

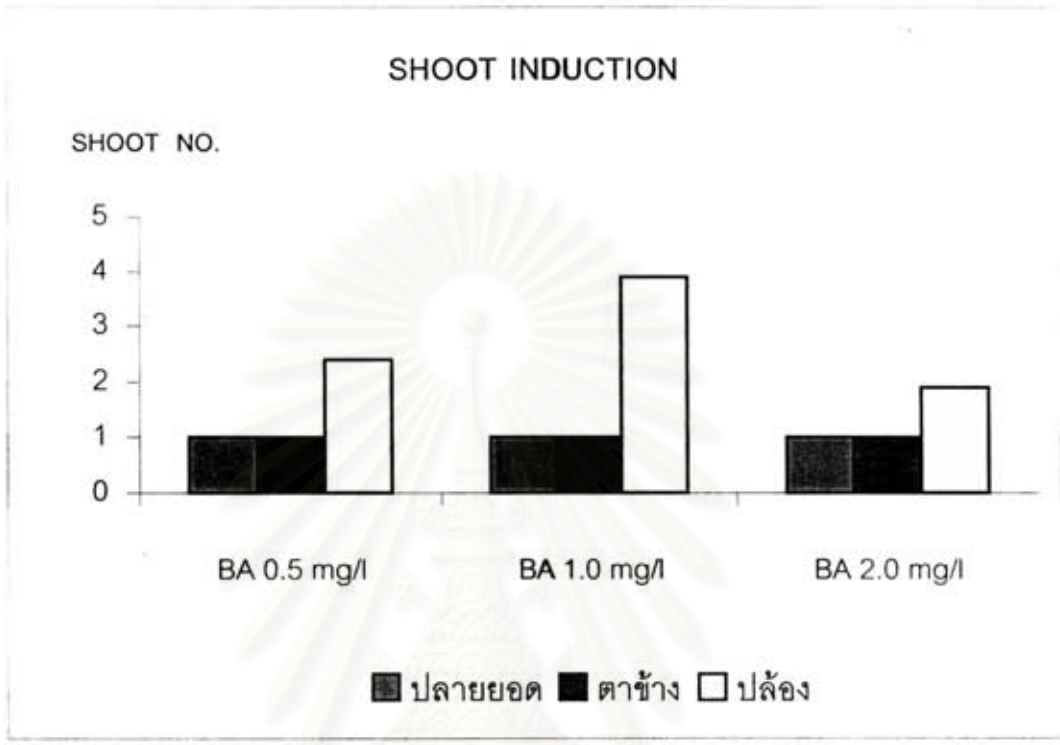
(b) ลักษณะของยอดเปล้าน้อยที่ได้ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

ตารางที่ 6 การตอบสนองของเนื้อเยื่อส่วนปล้องเปล้าน้อยที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS และ WPM ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

	อาหารสูตร MS		อาหารสูตร WPM	
ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
0	0	0	0	0
0.5	2.4	3.6	0	0
1	3.9	45.7	0	0
2	1.9	10.87	0	0

หมายเหตุ จำนวนชิ้นส่วนปล้องมากกว่า 100 ชิ้นต่อความเข้มข้นของ BA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 1 กราฟแสดงจำนวนยอดเฉลี่ยจากการชักนำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด ตาข้าง และปล้อง บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 3 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การชักนำให้เปล้าน้อยต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata*

3.4.1 การทดสอบผสมสารสกัดจากเชื้อราลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย

ภายหลังจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงส่วนปล้องเปล้าน้อยลงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 3 เดือน แล้วย้ายชิ้นส่วนปล้องที่เกิดยอดเล็กๆแล้ว ลงเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 5 ระดับ พบว่า เปอร์เซ็นต์ยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนจำนวนยอดเฉลี่ยและความสูงของยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา (control) โดยเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราเพิ่มขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต ความสูงของยอดและจำนวนยอดเฉลี่ยส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลง โดยในอาหารที่เติมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิตต่ำสุดคือ 40 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่ำสุด 0.8 ยอดต่อชิ้นส่วน สำหรับในอาหารที่เติมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมีความสูงของยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 0.19 เซนติเมตร (ตารางที่ 7 , ภาพที่ 11)

ยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราจะสามารถเจริญต่อไปได้เป็นยอดปกติและมีการแตกยอดใหม่ (ภาพที่ 12a) ส่วนยอดเปล้าน้อยที่ไม่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรา ยอดจะไม่เจริญเติบโตและมีลักษณะยอดสั้น ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราในสัปดาห์ที่ 8 หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย (ภาพที่ 12b)

3.4.2 การคัดเลือกยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราในระดับความเข้มข้นสูงขึ้น

จากการนำยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตจากสารสกัดของเชื้อราและผ่านการคัดเลือกแล้วในข้อ 3.4.1 มาเลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นที่สูงขึ้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นเดิมและคัดเลือกอีกครั้งหนึ่ง เปรียบเทียบกับยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ผสมสารสกัดจากเชื้อราพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราสูงขึ้น 2 เท่ายอดเปล้าน้อยที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วมีเปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิตลดลงจากความเข้มข้นเดิมภายหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 8) โดยยอดที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรายังสามารถเจริญต่อไปเป็นยอดที่

ปกติ ส่วนยอดที่ไม่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราโดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดจะไม่เจริญเติบโตและไม่มีการเกิดยอดใหม่ หลังจากนั้นยอดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย (ภาพที่ 13)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ย และความสูงเฉลี่ยของยอดเปล้าน้อย ภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

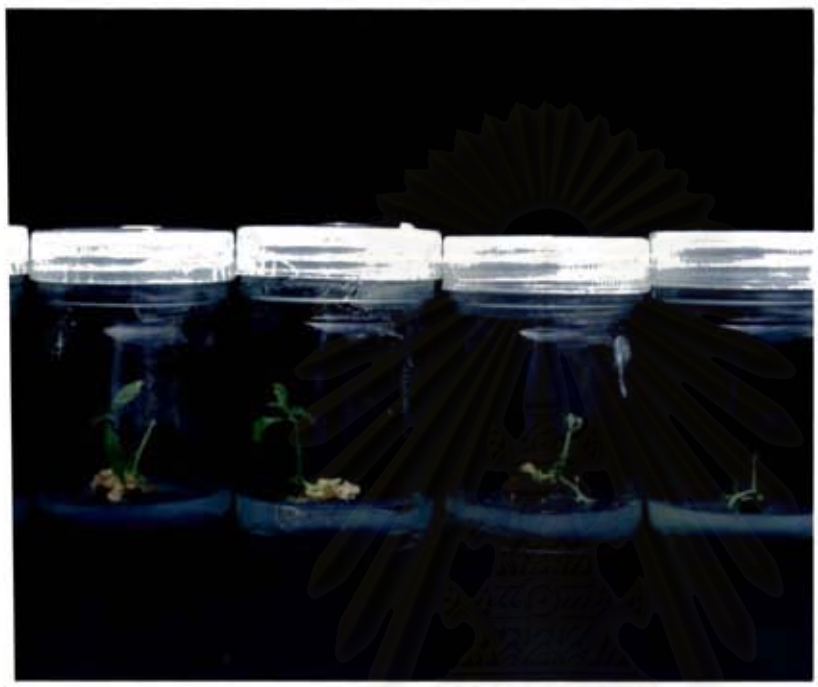
ความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต[1/]	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน	ความสูงของยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
0 (control)	73 a[2/]	1.63 a	0.48 a
10	60 ab	1.26 ab	0.31 b
100	53 ab	1.23 ab	0.34 b
500	40 b	0.80 ab	0.25 b
1,000	44 b	1.00 ab	0.19 b
CV(%)	41.24	107.46	189.29

[1/] = คิดจากจำนวนชิ้นส่วนปล้องที่เกิดยอด 60 ชิ้นต่อความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา

[2/] = ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรตามหลังในแนวตั้งเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ p = 0.05 ตามวิธี Duncan' s new multiple range test

ตารางที่ 8 จำนวนยอดและเปอร์เซ็นต์ยอดเปล้าน้อยด้านทานที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดทั้งหมดที่รอดชีวิต	ความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราสูงขึ้น 2 เท่า (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดด้านทานที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์ยอดด้านทานที่รอดชีวิต
0 (control)	48	0 (control)	48	100.00
10	38	20	33	86.84
100	37	200	20	54.05
500	24	1,000	12	50.00
1,000	30	2,000	10	40.00



ภาพที่ 11 การเจริญของยอดเปล้าน้อยที่เลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่ความเข้มข้น 0, 10, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

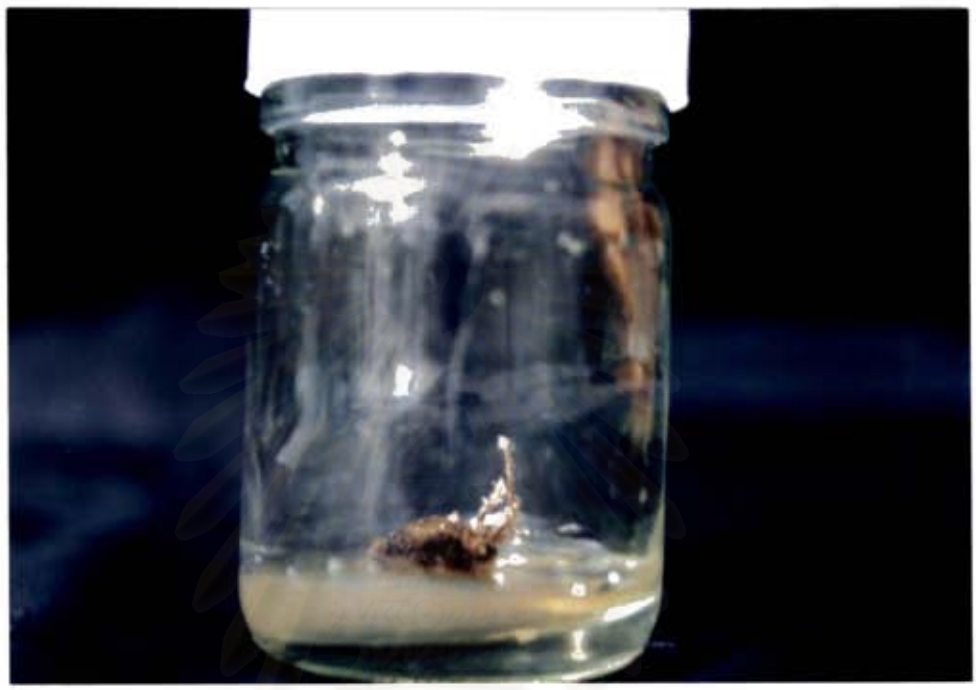
(a)

(b)

ภาพที่ 12 ลักษณะของยอดเปล้าน้อยที่ได้จากการคัดเลือกในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(a) ลักษณะของยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา

(b) ลักษณะของยอดเปล้าน้อยที่ไม่ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา



ภาพที่ 13 ลักษณะของยอดเปล้าน้อยที่ไม่ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราภายหลังจากเลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.3 การเปลี่ยนยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรากับต้นตอเปล้าใหญ่

ภายหลังจากการคัดเลือกยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจึงนำยอดเปล้าน้อยต้านทานที่รอดชีวิตมาย้ายลงเลี้ยงในอาหารชักนำยอดที่ไม่ใส่สารสกัดจากเชื้อราเพื่อเพิ่มปริมาณยอด และนำยอดบางส่วนที่เจริญเป็นปกติและสมบูรณ์มีความสูงของยอดตั้งแต่ 1.5-3 เซนติเมตร ไปเปลี่ยนยอดกับต้นตอเปล้าใหญ่ที่เพาะไว้ในเรือนเพาะชำ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการเปลี่ยนยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรากับต้นตอเปล้าใหญ่เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนต้น 20 ต้น ซึ่งยอดที่ประสบผลสำเร็จในการเปลี่ยนยอดจะมีการเชื่อมต่อระหว่างท่อนพันธุ์กับต้นตอ โดยสังเกตได้จากยอดเปล้าน้อยที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรา ลักษณะของยอดยังมีสีเขียวอยู่และมีการแตกใบใหม่ภายหลังจากที่ได้เปลี่ยนยอดแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 14)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(a)

(b)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 14 ยอดเปล้าน้อยที่ด้านทานสารสกัดจากเชื้อราและนำไปเปลี่ยนยอดกับต้นตอเปล้าใหญ่ด้วยวิธีการต่อกิ่งแบบตัว " ที"

(a) ลักษณะการต่อกิ่งท่อนพันธุ์กับต้นตอ

(b) ยอดเปล้าน้อยที่ประสบความสำเร็จในการต่อกิ่ง

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการสำรวจโรคใบจุดของเปล้าน้อย บริเวณแปลงปลูกเปล้าน้อยในเขตบ้านด่านสิงห์ขร อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบโรคใบจุดมีลักษณะอาการเป็นแผลจุดกลมสีดำ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร มีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ และเก็บตัวอย่างโรคมาตรวจหาเชื้อสาเหตุโดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณใบที่แสดงอาการใบจุด ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์และพิสูจน์โรคตามวิธี Koch's postulation ซึ่งเป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือทางโรคพืช ในการยืนยันถึงเชื้อสาเหตุโรคที่ทำให้เกิดอาการกับพืช (Agrios, 1978) จากการเปรียบเทียบเชื้อสาเหตุกับคู่มือการจำแนกเชื้อ (Hanlin, 1990) พบเชื้อราชนิดเดียวกันคือ *Glomerella cingulata* มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (imperfect stage) คือ *Colletotrichum gloeosporioides* ตรงกับรายงานของชลิดาและนลิน (2540) ซึ่งพบการระบาดของโรคใบจุดครั้งแรกในเขตอุทยานแห่งชาติหาดวนกร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี อาจกล่าวได้ว่าโรคใบจุดเป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตยาเปลาโนทอล การคัดเลือกพืชต้านทานสารพิษที่สร้างโดยเชื้อราจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่อาจจะช่วยลดความเสียหายได้

จากผลการทดลองในอดีตที่ผ่านมาพบว่าเชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสารพิษ indoleacetic (IAA) และ phenylacetic acid (PAA) มีผลทำให้เกิดอาการใบจุดของชา (Hirota และคณะ, 1993) และนอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นระยะ imperfect stage สามารถสร้างสาร IAA ทำให้เกิดโรคหอมเลื้อยได้ (สุนีย์, 2535) จึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา *G. cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อยในอาหาร Czapex agar (CZA) ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อราสามารถสร้างสปอร์มากที่สุด ที่ระยะเวลา 7 วัน เพื่อนำสปอร์ของเชื้อรามาใช้ในการเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาสารพิษต่อการเกิดโรค

จากการเลี้ยงเชื้อรา *G. cingulata* ในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสารพิษและแยกสกัดสารพิษจาก culture filtrate ได้สารสกัดจากเชื้อรา(crude extract toxin) มีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาล และนำไปทดสอบกับใบเปล้าน้อย พบว่าสารสกัดจากเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 4 วัน มีผลทำให้ใบเปล้าน้อยแสดงอาการใบจุดได้ คล้ายกับงานทดลองของ Hirota และคณะ (1993) ซึ่งทดสอบสารพิษบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Glomerella cingulata* และทำให้เกิดอาการใบจุดของชา แสดงว่าในสารสกัดจากเชื้อรา อาจมีสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นและทำให้เกิดโรคได้ แต่จากการทดลองพบว่า แผลโรคที่เกิดบนใบเปล้าน้อยมีขนาดเล็กมากแม้ว่าจะใช้สารสกัดจาก

เชื้อราความเข้มข้นสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในสารสกัดจากเชื้อรามีปริมาณของสารพิษที่มีบทบาทต่อการเกิดโรคน้อยมาก และเพื่อเป็นการยืนยันถึงเชื้อสาเหตุสามารถสร้างสารพิษ IAA และ PAA และทำให้เกิดอาการใบจุดได้ตามรายงานที่ได้มีการศึกษาไว้ จึงทดลองใช้สารมาตรฐาน IAA และ PAA ทดสอบกับใบเปล้าน้อยพบว่า มีผลทำให้เกิดอาการใบจุด คล้ายกับอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงเช่นกัน ดังนั้นจึงนำสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อยมาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อราดังกล่าวด้วยวิธี HPLC พบว่า เชื้อราสามารถสร้างสาร IAA และ PAA ซึ่งตรงกับรายงานของ Hirota และ คณะ(1993) ที่ทำการสกัดแยกสารจาก culture filtrate และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ silica gel column chromatography นอกจากนี้ยังพบสารชนิดอื่นที่เป็นสารหลักซึ่งยังไม่ทราบว่าเป็นสารชนิดใด ดังนั้นการวิเคราะห์หาชนิดของสารหลักที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อราตรงจุดนี้จำเป็นที่จะต้องพิสูจน์ให้แน่ชัดว่าเป็นสารใดและคาดว่าจะทำการวิจัยต่อไป ในการศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ในอาหารเหลวเพื่อให้สร้างสารพิษพบว่า มีน้ำหนักแห้งของเส้นใย และได้ปริมาณสารสกัดจากเชื้อราเพิ่มขึ้นในช่วง 1-4 วันแรก แต่ภายหลังจาก 4 วัน น้ำหนักแห้งของเส้นใยและปริมาณสารสกัดจากเชื้อราจะเริ่มลดลง แสดงว่าเชื้อรามีการสร้างสารพิษเกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาที่มีการเจริญและมีการสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงระยะเวลาหนึ่งปริมาณของสารสกัดจากเชื้อราที่ได้จะลดลง(พรทิพย์, 2533) จากการนำสารสกัดจากเชื้อราที่มีอายุของการเลี้ยงเชื้อต่างกันไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร IAA และ PAA ด้วยวิธี HPLC พบว่า เชื้อราจะสร้างสารทั้งสองชนิดนี้ในระยะเวลาไม่เกิน 4 วัน ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้ได้สารสกัดจากเชื้อราปริมาณมากสำหรับนำไปใช้คัดเลือกพืชต้านทาน เนื่องจากระยะเวลาดังกล่าวมีปริมาณสารสกัดจากเชื้อรา และปริมาณสารพิษ IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อราสูงกว่าระยะเวลาอื่น

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อยได้นำส่วนต่างๆของพืชได้แก่ ปลายยอด ตาข้าง และส่วนปล้อง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆกัน พบว่า ชิ้นส่วนปล้องสามารถตอบสนองต่ออาหารดังกล่าวได้สูงสุด กล่าวคือ มีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมากที่สุดในขณะที่ส่วนปลายยอดและตาข้าง จะพัฒนาเป็นยอดได้เพียง 1 ยอดเท่านั้น จากการทดลองพบว่ายอดมีการเจริญเติบโตช้ากว่ายอดที่ได้จากส่วนปล้อง นอกจากนี้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดคือสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ทั้งนี้เนื่องจากว่า BA เป็นสารกลุ่ม cytokinin มีผลต่อการแบ่งเซลล์ ในเซลล์พืชโดยจะไปมีผลชักนำให้มีการเพิ่มปริมาณยอด หรือ

adventitious shoot (Bonga และ Von Adergus, 1992) ซึ่งในพืชไม้เนื้อแข็งหลายชนิดมีการใช้ BA เพื่อกระตุ้นให้เกิดยอดจำนวนมากเป็นผลสำเร็จ (Rout and Das, 1993) มีการศึกษาในพืชไม้เนื้อแข็งเมืองหนาวโดยใช้ไซโตไคนิน 3 ชนิดคือ BA, kinetin และ isopentenyl adenine พบว่า BA มีประสิทธิภาพดีที่สุด (Goldfrab และคณะ, 1991) จากการทดลองพบว่า ส่วนปล้องจะสามารถพัฒนาเป็นยอดบนอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สูงกว่าสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ของปริมาณสารที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endogeneous substance) กับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับ (Krikorian และคณะ, 1987)

จากการทดลองใช้เมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้นต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมล็ดเปล้าน้อยมีความสมบูรณ์น้อย ทำให้การงอกของเมล็ดลดลง ซึ่งในสภาพธรรมชาติการติดดอกและเมล็ดมีจำนวนน้อยมากเช่นเดียวกัน

ในการวิจัยนี้สามารถชักนำส่วนปล้องของเปล้าน้อยให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดเพียง 3.9 ยอดต่อชิ้นส่วนปล้องเท่านั้น แต่ก็มีบางชิ้นส่วนปล้องสามารถเกิดยอดได้มากกว่า 10 ยอด และพบว่า ชิ้นส่วนปล้องที่เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงตั้งแต่เริ่มแรกของการเลี้ยงจะเกิดสาร phenolic compound ซึ่งสารนี้สามารถถูก oxidization โดยแสงทำให้ชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงมีสีดำและตาย (Bonga และ Van Adergus, 1992) ดังนั้นการเลี้ยงชิ้นส่วนปล้องควรเลี้ยงในที่มืดก่อนจนกระทั่งเกิดยอดเล็กๆ ซึ่งต้องใช้เวลานาน 2-3 เดือน จึงนำมาเลี้ยงในสภาพให้แสง การนำยอดมาเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงควรใช้ยอดที่มีความสูงเกิน 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป ทำให้ได้ยอดที่แข็งแรงสมบูรณ์มีการเจริญเติบโตและแตกใบดีกว่าการใช้ยอดที่มีความสูงน้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร หรือยอดที่มีความสูงเกิน 2 เซนติเมตร ภายหลังจากนำยอดมาเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงแล้วยอดจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียว

จากการศึกษาการคัดเลือกยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานสารสกัดจากชื้อรา โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนปล้องเปล้าน้อยที่เกิดยอดเล็กๆ แล้ว ภายหลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มาย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างกันพบว่า เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ย และความสูงของยอดส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลง เมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราที่ผสมลงในอาหารสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ปริมาณของสารพิษที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อราซึ่งจะมีมากเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น โดยปกติสาร IAA และ PAA จัดเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่ม auxin สามารถกระตุ้นการขยายตัวและการแบ่งเซลล์ ถ้ามีความเข้มข้นสูง

เกินไปอาจจะมีผลในการทำลายขบวนการเมตาบอลิซึมของพืช (Davies,1988) นอกจากนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารพิษชนิดอื่นที่มีอยู่ในสารสกัดของเชื้อราดังกล่าว เพราะจากการวิเคราะห์สารสกัดจากเชื้อราโดยวิธี HPLC พบว่ามีสารอื่นนอกเหนือจากสาร IAA และ PAA และอาจไปมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน ยอดที่รอดชีวิตจากสารสกัดของเชื้อรายังคงเป็นสีเขียวและเจริญเติบโตต่อไปได้เป็นปกติ ส่วนยอดที่ไม่รอดชีวิตจะมีลักษณะแคระแกรนไม่เจริญเติบโตและตาย เมื่อนำยอดที่รอดชีวิตที่ผ่านการคัดเลือกแล้วในขั้นต้นไปทำการคัดเลือกในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น จะพบว่ายอดเปล้าน้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง ยอดเปล้าน้อยที่ไม่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

จากการวิจัยได้นำยอดที่รอดชีวิตและต้านทานสารสกัดจากเชื้อราบางส่วนมาเลี้ยงในอาหารที่ไม่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา เพื่อให้ยอดเจริญเติบโตเป็นปกติก่อนที่จะนำไปทำการเปลี่ยนยอดกับต้นตอเปล้าใหญ่เนื่องจาก ยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตมีขนาดความสูงของยอดน้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร ซึ่งปกติถ้าจะทำการเปลี่ยนยอดกับต้นตอเปล้าใหญ่ต้องใช้ยอดที่มีความสูงตั้งแต่1.5–3 เซนติเมตร ตามวิธีการของ ชลิดา และวีระเดช (2541) จึงนำยอดเปล้าน้อยที่ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราที่รอดชีวิตมีขนาดความสูงของยอดตั้งแต่ 1.5 เซนติเมตรขึ้นไปและยอดสมบูรณ์ มาทำการเปลี่ยนยอดกับต้นตอเปล้าใหญ่พบว่ายอดเปล้าน้อยที่ประสบความสำเร็จในการเปลี่ยนยอดจะสามารถเจริญเติบโตและยอดยังคงมีสีเขียว ซึ่งจะเก็บไว้เป็นต้นพันธุ์สำหรับการศึกษาต่อไป

ในการศึกษาการคัดเลือกยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานสารสกัดจากเชื้อราโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถนำมาใช้เป็นข้อพิจารณาในการเตรียมสารสกัดจากเชื้อราเพื่อประโยชน์ในการนำสารดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการทดสอบคัดเลือกพันธุ์เปล้าน้อยต้านทานโรคใบจุดในอนาคต ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการคัดเลือกโดยใช้เชื้อสาเหตุหลายประการคือ การใช้เชื้อราสำหรับคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคต้องอาศัยสภาพแวดล้อมจากธรรมชาติ ซึ่งควบคุมการเกิดโรคได้ยาก และเกิดอาการช้ากว่าการใช้สารสกัดจากเชื้อราทดสอบ และการใช้เชื้อราในการทดสอบเป็นไปได้ว่า เมื่อทำการย้ายเชื้อหลายๆครั้ง เชื้ออาจมีการเปลี่ยนแปลงลดความรุนแรงลงได้ การใช้สารสกัดจากเชื้อราสามารถทดสอบได้ครั้งละมากๆ ประหยัดเวลา และแรงงาน นอกจากนี้สารที่ใช้ทดสอบส่วนใหญ่จะมีผลที่ระดับเซลซึ่งทำให้การคัดเลือกได้กว้างขวางขึ้น (Jones, 1990)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

1. สำรวจโรคใบจุดเปล้าน้อยที่เขตบ้านด่านสิงห์ขร อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และทำการจำแนกเชื้อ พบว่าเกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ซึ่งเป็นระยะ perfect stage (teleomorph) เมื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์และพิสูจน์โรคตามวิธีการ Koch' s postulation ได้เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นระยะ imperfect stage (anamorph)

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อราคือ Czapek agar (CZA) โดยเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน เชื้อราจะเจริญและสร้าง spore mass สีส้มบนอาหารชนิดนี้

3. เชื้อรา *Glomerella cingulata* (anamorph : *Colletotrichum gloeosporioides*) สามารถสร้างสารพิษในอาหารเหลวโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยและปริมาณสารสกัดจากเชื้อราเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหาร 4 วัน เมื่อนำสารสกัดจากเชื้อราที่ได้มาทดสอบกับใบเปล้าน้อยจะทำให้เกิดอาการใบจุดกับเปล้าน้อยได้โดยอาการของแผลโรคที่เกิดขึ้นคล้ายกับอาการแผลโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา

4. จากการวิเคราะห์สารสกัดจากเชื้อราด้วยวิธี HPLC พบว่า เชื้อราสามารถสร้างสาร indoleacetic acid (IAA) และ phenylacetic acid (PAA) โดยเชื้อราจะสร้างสาร IAA และ PAA มากที่สุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะไม่พบการสร้างสารดังกล่าวเลย และจากการนำสารมาตรฐาน IAA และ PAA ไปทดสอบกับใบเปล้าน้อยพบว่า สาร IAA และ PAA สามารถทำให้เกิดอาการใบจุดกับเปล้าน้อยคล้ายกับอาการของแผลโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา เช่นเดียวกันอาจกล่าวได้ว่าสารพิษ IAA และ PAA ที่เชื้อราสร้างขึ้น เป็นตัวการในการก่อให้เกิดอาการโรคกับใบเปล้าน้อย

5. อาหารสูตร MS ที่เติม BA (6- benzyladenine) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร pH 5.8 สามารถเพิ่มปริมาณยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.9 ยอด และชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดคือ ชิ้นส่วนปล้อง ซึ่งจะต้องเลี้ยงในสภาพที่ไม่ให้แสงก่อนเป็นระยะเวลา

ประมาณ 3-4 เดือน จึงจะเกิดยอด และพบว่าแสงมีผลต่อขนาดความสูงของยอดก่อนที่จะนำยอดที่ได้มาเลี้ยงในสภาพให้แสง ซึ่งควรให้ยอดเปล้าน้อยที่ได้มีความสูงมากกว่า 0.5 เซนติเมตร แต่ไม่ควรเกิน 2 เซนติเมตร ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะยอดที่สมบูรณ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

6. ยังไม่สามารถพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดจากปลายยอดและตาข้าง ซึ่ง 1 ตาจะให้ 1 ยอด

7. จากการคัดเลือกยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานสารสกัดจากเชื้อรา โดยผสมสารสกัดจากเชื้อราลงในอาหารที่ความเข้มข้น 0, 10, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เปอร์เซ็นต์ยอดที่รอดชีวิต จำนวนยอดและความสูงของยอดมีแนวโน้มลดลง เมื่อนำยอดที่รอดชีวิตที่ผ่านการคัดเลือกไปเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้นสูงขึ้น 2 เท่าของความเข้มข้นเดิม พบว่ายอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตจะสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นปกติและมีการแตกใบใหม่ ส่วนยอดเปล้าน้อยที่ไม่รอดชีวิตจะเปลี่ยนจากยอดสีเขียวเป็นสีน้ำตาลและตาย

8. ในการเปลี่ยนยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตจากสารสกัดจากเชื้อรากับต้นตอเปล้าใหญ่ จะใช้ยอดที่มีขนาดความสูงประมาณ 1.5-3 เซนติเมตร ไปเปลี่ยนยอดโดยการต่อกิ่งแบบตัว " ที" ถ้าการเปลี่ยนยอดประสบความสำเร็จจะพบว่า มีรอยเชื่อมต่อกันระหว่างท่อนพันธุ์กับต้นตอ ส่วนยอดที่รอดชีวิตที่ยังเล็กอยู่บางส่วนจะเลี้ยงไว้ในอาหารที่ไม่ผสมสารสกัดจากเชื้อราเพื่อให้ยอดเจริญสมบูรณ์เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับการใช้สารสกัดจากเชื้อราสาเหตุโรคในการทดสอบคัดเลือกเปล้าน้อยต้านทานสารพิษในระดับเนื้อเยื่อพืช แต่การใช้สารพิษในการทดสอบคัดเลือกพืชต้านทานโรคส่วนใหญ่จะมีผลที่ระดับเซลล์ซึ่งการคัดเลือกจะทำได้มากกว่าและเซลล์สามารถตอบสนองต่อสารพิษได้ดีกว่าในระดับเนื้อเยื่อ ดังนั้นการคัดเลือกเปล้าน้อยต้านทานโรคใบจุดในระดับเซลล์ และการชักนำเซลล์พืชให้พัฒนาไปเป็นต้นสำหรับนำมาทดสอบคัดเลือกให้ต้านทานโรคในสภาพธรรมชาติจึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษาต่อไป นอกจากนี้ในสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ยังมีสารชนิดอื่นในปริมาณสูงนอกเหนือจากสาร IAA และ PAA และคาดว่าจะนำมา purify และศึกษา structure ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ จาติเสถียร. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช . น. 60-95. ใน เอกสารเผยแพร่วิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา พ.ศ. 2539. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นลิน นิลอุบล. 2540. โรคใบจุดของพืชสมุนไพรไทย " เปล้าน้อย" . น. 413-417. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ วีระเดช สุขเอียด. 2541. การขยายพันธุ์ต้นเปล้าน้อยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนยอด. สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ฉรงค์ สิงห์บุระอุคม, ญานิสา รัตอาภา และเพชรรัตน์ จันทรทิณ. 2538. สารพิษ tenuazonic acid ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* Cav. และบทบาทในการเกิดโรคไหม้ของข้าว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่33.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว.2533. โรคพืชวิทยาขั้นสูง.โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางการเกษตร.คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น . 282 น.

สุนีย์ องอาจวาณิชย์และคณะ. 2535. ความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์สาร IAA ต่อโรคเลื้อยของหอมหัวใหญ่ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 35 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2540 . การเพาะเลี้ยงเซลล์, น. B1-B5. ใน เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเรื่อง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขั้นสูง. 2-5 กันยายน 2540. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กำแพงแสน นครปฐม.

อพัชชา วงศ์เจริญสถิตย์. 2537. การวิเคราะห์ปริมาณสารเปลาโนทอลที่ได้จากใบและเนื้อเยื่อของเปล้าน้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Agrios, G.N. 1978. Plant Pathology. Academic Press. New york. 703 p.

Agrios, G.N. 1997. Plant disease caused by fungi. p. 245-406. *In* Plant Pathology. fourth edition. Academic Press. New york.

Bonga, J.M. and P. Von Aderkas. 1992. *In Vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Boston. 238 p.

Davies, P.J. 1988. The plant hormones : Their nature, occurrence, and function. *In* Davies, P.L. (ed.), Plant hormones physiology ,Biochemistry and molecular biology, p . 1-12. Netherland : Kluwer Academic Publish.

Dhingro, O.D. and J.B. Sinclair. 1986. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 355 p.

Furusava, I. 1988. Production of disease resistant plant using somaclonal variation, pp. 5-11. *In* T.M. Chu and J.B. Peterson (eds.) Cell and Tissue Culture in Field Crop Improvement. FFTC book series No. 38.

Gentile,A. 1992 . In vitro selection of nucellar lemon callus and regeneration of plant tolerant to *Phoma tracheiphila* Toxin. Adv.Hort.Sci. 6: 151-154.

George, N.G. 1988. Application of biotechnology in plant pathology, pp 757-774. *In* Plant Pathology. Academic Press, San Diego

Goldfarb,B., Howe, G.T., Bailey,L.M., Strauss, S.H. and Zaerr, J.B. 1991. A liquid cytokinin pulse induces adventitious shoot formation from Douglas-fir cotyledons. Plant Cell Rep.10:156-160.

Hanchey, P. 1981. Ultrastructural effects, pp. 449-475. *In* R.D. Durbin (ed.). Toxin in Plant Diseases. Academic Press, New york.

Hanlin, R.T. 1990. Illustrated Genera of Ascomycetes. The American Phytopathology Society. St.Paul. Minnesota. 236 p.

Hirota, A., Horikawa, T., and Fujiwara, A. 1993. Isolation of phenylacetic acid and Indolacetic acid from a phytopathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. Biosci. Biochem. 57 (3) : 492 .

Jones, P.W. 1990. *In vitro* selection for disease resistance, pp. 113-149. *In* P.J. Dix(ed.). Plant Cell Line Selection. VCH Publishers, inc., New York.

Krikorian, A.D.,K. Kelly and D.L. Smith. 1987. Hormonees in tissue culture and micropopagation, pp. 593-163. *In* P.J. Davies(ed.). Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Magaret, E.D. 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogen. Ann. Rev. Phytopathology. 24 : 159-186.

McCown, B. and Lloyd, G. 1981. Woody plant medium(WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of wood plant species. Hort Sci. 16 : 453.

Mizukami,Y.M. , Yamamoto, Y. and Yamaki, Shohei. 1991. Analyses of indoleacetic acid and abscisic acid contents in nodules of soybean plants bearing va mycorrhizas. Soil Sci.Plant Nutr. 37(2): 291-298.

Murai,F.,Akiyama, T. and Morimoto, H.1990. Culture medium containing phytohormones for adventitious budding of Croton explant. Japanese Patent 02,107,138.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. Physiol. Plant 15 : 473.

Naik,K.S. , Hiremath, P.C. and Hegde, R.K. 1991. Toxic metabolite production by *Colletotrichum gloeosporioides* causing blight of coriander. Karnataka-Journal-of Agricultural Sciences. 4:1-2, 27-31. [CD-ROM]. CAB Abstract : UD950316

Naik,M.K. , Hiremath, P.C. and Hegde, R.K. 1989. Toxic metabolite production by *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of betelvine. Mysore-Journal-of Agricultural Sciences. 23 :1, 30-34. . [CD-ROM]. CAB Abstract : UD950316

Nyange,N.E. , Williamson, B. , McNicol, R.J. , Lyon G.D., Hackett, C.A. 1995. *In vitro* selection of *Coffea arabica* callus for resistance to partially purified phytotoxic culture filtrates from *Colletotrichum Kahawae* . Ann Appl Biol. 127:425-439.

Ogiso,A. , Kitazawa,E. , Kurabayashi,M. , Sato,A. , Takahashi,H. , Nokushii,H. ,Kuwano,H., Kobayashi,S. and Mishima, H. 1978. Isolation and structure of antipeptic ulcer diterpene from Thai medicinal plant. Chem. Pharm. Bull. 26 (10) : 3117-3123.

Pawirosoemardjo, S. and Soewarto. 1990. The use of crude toxin of *Colletotrichum gloeosporioides* for resistance screening of *Hevea rubber*. Menara Perkebunan. 58: 1, 22-25. . [CD-ROM]. CAB Abstract : UD950316

Rout, G.R. and Das, P. 1993. Micropropagation of *Madhuca longifolia* (Koenig) Mac Bride var. Latifolia Roxb. Plant Cell Rep. 12: 513-516.

Rup, L. and Sukanya, L. 1990. Cell Selection and long-term high-frequency regernaration of cereal and legumes, pp. 238-242. *In* Crop Improvement Utilizing Biotechnology. CRC Press Inc, Boca Raton.

Shibata, W. , Murai,F., Akiyama, T. , Siliphol, M. , Matsunaga, E. and Morimoto, H. 1996. Micropropagation of *Croton sublyratus* kurz. - A tropical tree of medicinal importance. Plant Cell Rep. 16 : 147-152.

Sun, Z.x. and Zheng, K.L. 1990. Somaclonal variation in rice , pp. 288-315. *In* Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol II. Springer-Verlag, Berlin.

Suwarto, Gunawan,L.W. , Tjitrosomo,S.S. and Pawirosoemardjo, S. 1988. Effect of crude toxin produced by *Colletotrichum gloeosporioides* on the cell viability of Hevia rubber and tomato plants. Bulletin-Perkaretan. 6:1,12-20. . [CD-ROM]. CAB Abstract : UD950316

Toyoda, H. and Ouchi, S. 1991. The use of somaclonal variation for the breeding of disease resistant plant. Molecular Strategies of Pathogrn and Host Plant. Springer-Verlag. p 229.

Uecker,F.A.1994. Ontogeny of the ascoma of *Glomerella cingulata*.Mycologia 68: 82-88

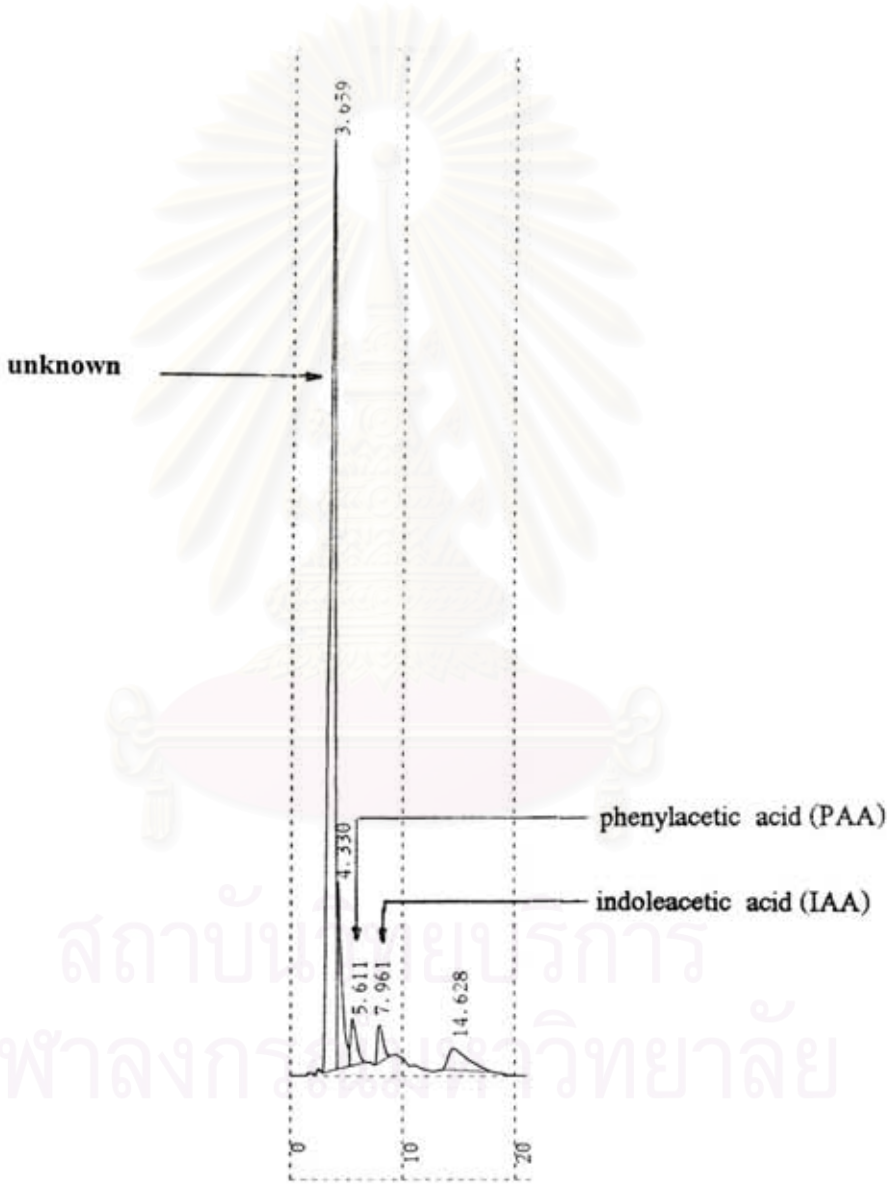
Walker,H.L. and Templeton, G.E. 1978. In Vitro production of phytotoxic metabolite by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. aeschynomene. Plant Sci. Lett. 13 : 2, 91-96.

Wang,J.W. 1986. Studies on the toxin from *Colletotrichum gloeosporioides* injuring olive protoplast. Scientia. Silvae. Sinicae 22 : 1 ,30-37. . [CD-ROM]. CAB Abstract : UD950201

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

โครมาโทแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อย



ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา