ผลของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ต่อการเจริญของเปล้าน้อย
ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นางสาวศศิ มะลิพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543
ISBN 947-03-0022-7
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20740669

EFFECT OF CRUDE EXTRACT *FROM Glomerella cingulata* ON GROWTH OF *Croton sublyratus* Kurz. IN TISSUE CULTURE

Miss Sasi Maliphan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Programme of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 947-03-0022-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ต่อการเจริญของเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
โดย	นางสาวศศิ มะลิพันธุ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ เพชรรัตน์ จันทรทิณ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์เพชรรัตน์ จันทรทิณ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....กรรมการ
(อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง)

ศศิ มะลิพันธุ์ : ผลของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ต่อการเจริญของเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (EFFECT OF CRUDE EXTRACT FROM *Glomerella cingulata* ON GROWTH OF *Croton sublyratus* Kurz. IN TISSUE CULTURE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.เพชรรัตน์ จันทรทิณ, 63 หน้า ISBN 947-03-0022-7

เชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อยสามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อราบนอาหารสูตร Czapek's Agar นำสปอร์ที่ได้มาใช้ในการเลี้ยงเพื่อผลิตสารพิษสำหรับงานวิจัยนี้ จากการเปรียบเทียบปริมาณสารพิษที่เชื้อราดังกล่าวสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด พบว่า เชื้อราที่เลี้ยงใน Czapek's Dox Medium ที่เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ yeast extract สามารถผลิตสาร Indoleacetic acid (IAA) ได้ 0.004 และ Phenylacetic acid (PAA) ได้ 1.58 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งมากกว่าอาหารชนิด Richard's Medium โดยเชื้อราสามารถผลิต IAA ได้ 0.003 และ PAA ได้ 0.046 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา จากการทดสอบความเป็นพิษของสารมาตรฐาน IAA และ PAA ต่อแคลลัสของเปล้าน้อยพบว่า ทั้งสาร IAA และ สาร PAA มีผลต่อการตายของแคลลัสเปล้าน้อย และสารทั้ง 2 ชนิด จะมีผลเสริมความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเมื่อใช้ร่วมกัน ในการทดลองชักนำให้แคลลัสและยอดเปล้าน้อยต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อ *Glomerella cingulata* โดยการนำแคลลัสและยอดที่รอดตายจากการเลี้ยงในอาหารที่เติมสารสกัดจากเชื้อรา ไปเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา พบว่าแคลลัสและยอดเปล้าน้อยมีความต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราสูงขึ้น จากความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมี IAA 6.645 และ PAA 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมี IAA 8.86 และ PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยคิดเป็น 91 และ 92 เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสและยอดเปล้าน้อยตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2543..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072392023: Major BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: *Croton sublyratus* Kurz./ *Glomerella cingulata*/ CRUDE EXTRACT

SASI MALIPHAN : EFFECT OF CRUDE EXTRACT FROM *Glomerella cingulata* ON GROWTH OF *Croton sublyratus* Kurz. IN TISSUE CULTURE.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NALINE NILUBOL, Ph. D. THESIS CO-ADVISOR : PETCHARUT CHUNTARATIN. 63 pp. ISBN 947-03-0022-7

Glomerella cingulata causing leaf spot on *Croton sublyratus* Kurz. gave maximum sporulation on day 7 when grown on Czapek's Agar.The spores were used as the source of toxin production Quantitative comparison of toxin production by *Glomerella cingulata* grown in two different media.showed that in Czapek's Dox medium containing 0.1 % yeast extract , indoleacetic acid (IAA) and phenyl acetic acid (PAA) at 0.004 and 1.58 mg/l of culture broth were produced , respectively , which were higher than those in Richard's medium in which only 0.003 and 0.046 mg/l of IAA and PAA were produced , respectively.

Toxicity test of the commercial available IAA and PAA showed positive effect on calius of *Croton sublyratus* Kurz. Both compounds had additive effects. Induction for resistance of *Croton sublyratus* Kurz. to the toxin extract from *Glomerella cingulata* was performed by challenging the callus and shoot to the increasing concentrations of the crude extract from this fungus. Callus and shoot resistant to higher concentration of the extract from 1500 ppm containing IAA at 6.645 mg/l and PAA at 75.75 mg/l to 2000 ppm containing IAA at 8.86 mg/l and PAA at 101.00 mg/l were obtained. At this concentration, about 91 % and 92 % of callus and shoot were killed, respectively.

Department.....Student's signature.....

Field of study.....Biotechnology.....Advisor's signature.....

Academic year.....2543..... Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตและวิทยาพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และ อาจารย์เพชรรัตน์ จันทรทิณ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้ขอกราบขอบพระคุณไว้เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และ รองศาสตร์จารย์ ดร. อมร เพชรสม และอาจารย์วาสนา โตเลี้ยง ที่กรุณารับเป็นกรรมการการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่มหาบัณฑิต นักวิจัย และบุคลากรทุกท่านของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เป็นทั้งที่ปรึกษาให้คำแนะนำตลอดจนอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมีและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ ทีมงานบริษัท รูเริล เทเลโฟน เซอร์วิส ทุกท่านที่ช่วยเหลือในการทำรูปเล่มของวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ที่สำคัญที่สุดคือ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นแรงสำคัญผลักดันจนมาถึงวันนี้ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฎ
สารบัญรูป.....ฎ

บทที่

1. บทนำ.....1
1.1 ธรรมชาติของต้นเปล้าน้อย.....1
1.2 การขยายพันธุ์เปล้าน้อย.....1
1.3 สรรพคุณทางยา.....2
1.4 โรคที่เกิดกับเปล้าน้อย.....3
1.5 โรคใบจุดของเปล้าน้อย.....4
1.6 การศึกษาสารพิษกับการเกิดโรค.....5
1.7 การคัดพันธุ์พืชต้านทานโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....7
1.8 มูลเหตุจูงใจ.....9
1.9 ขอบเขตงานวิจัย.....10

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....11
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....11
2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....12
2.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช.....12
2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อและสารลดแรงตึงผิว.....12
2.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา.....12
2.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกสกัดและวิเคราะห์สารสกัดจากเชื้อรา.....12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 วิธีการทดลอง.....13
2.3.1 พืชทดลอง.....13
2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....13
2.3.3 การเตรียมตัวอย่างพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ.....13
2.3.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย.....13
2.4 การเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ให้สร้างสารพิษ.....14
2.4.1 การเก็บรักษาเชื้อรา *Glomerella cingulata*.....14
2.4.2 การเตรียมอาหารวุ้นเอียง (ager slant).....14
2.4.3 การเลี้ยงเชื้อราให้สร้างสปอร์และเตรียมสปอร์แขวนลอย.....15
2.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมหัวเชื้อ.....15
2.4.5 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารพิษ.....15
2.5 การสกัดสารพิษจากเชื้อรา.....16
2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร phenylacetic acid (PAA) และ indoleacetic acid (IAA) ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....16
2.6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน.....16
2.6.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร phenylacetic acid (PAA) และ indoleacetic acid ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา.....18
2.7 ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและยอดเปล้าน้อย ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....18
2.7.1 การศึกษาสารมาตรฐาน IAA และ PAA ต่อการเจริญของแคลลัส..18
2.7.2 ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของเปล้าน้อย.....19
2.7.2.1ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของแคลลัส เปล้าน้อย.....19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.2.2 ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของยอดเปล้าน้อย.....20
2.8 คัดเลือกแคลลัสและยอดให้มีความต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น.....20

3. ผลการทดลอง.....21
3.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Glomerella cingulata*.....21
3.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ให้สร้างพิษ.....23
3.2.1 การตรวจสอบการสร้างสาร IAA และ PAA โดยเชื้อรา *Glomerella cingulata*.....23
3.2.2 เปรียบเทียบปริมาณการสร้างสาร IAA และ PAA โดยเชื้อรา *Glomerella cingulata* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium และ Richard's Medium.....25
3.3 ผลของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ต่อการเจริญของแคลลัสและยอด.....27
3.3.1 ผลการศึกษาสารมาตรฐาน IAA และ PAAที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการตายของแคลลัสเปล้าน้อย.....27
3.3.2 ผลของสารอื่นในสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* (นอกเหนือจากสาร IAA และ PAA)ที่มีต่อการตายของแคลลัส.....30
3.3.3 ผลของสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของเปล้าน้อย.....32
3.4 การคัดเลือกแคลลัสและยอดของเปล้าน้อยที่ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น.....35

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.2 ชักนำยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น.....37

4.วิจารณ์.....39

5. สรุป.....42

รายการอ้างอิง.....43

ภาคผนวก.....50

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....51

ภาคผนวก ข สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในงานวิจัย.....52

ภาคผนวก ค เกณฑ์การให้คะแนนการตายของเนื้อเยื่อ.....55

ภาคผนวก ง แสดงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Indoleacetic acid และ Phenylacetic acid..... 59

ภาคผนวก จ แสดง HPLC โครมาโตมาแกรมของสารมาตรฐาน Indoleacetic acid และ Phenylacetic acid 61

ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ.....63

6. ประวัติผู้เขียน.....64

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. ค่าเฉลี่ยระดับการตายของแคลลัสภายหลังจากการเลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารมาตรฐาน IAA และ PAA เป็นเวลา 2 เดือน.....28

2. เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสเปล้าภายหลังการเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 เดือน.....31

3. เปอร์เซ็นต์การตายของยอดเปล้าน้อยภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 เดือน.....33

4. เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสเปล้าน้อยภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นที่สูงขึ้นเป็นเวลา 2 เดือน.....36

5 เปอร์เซ็นต์การตายของยอดเปล้าน้อยภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นที่สูงขึ้นเป็นเวลา 2 เดือน.....38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1. แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงบนอาหาร Czapek agar ที่ระยะเวลาต่างๆ.....22

2. HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* 24

3. แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงในอาหาร Czapek's Dox Medium.....26

4. แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงในอาหาร Richard's Medium.....26

5. แสดงอาการฉ่ำน้ำและกลายเป็นสีน้ำตาลของแคลลัสเปล้าน้อย.....29

6. แสดงอาการหลุดร่วงของใบยอดได้รับสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 0.008 PAA 1.004 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)..... 34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ธรรมชาติของต้นเปล้าน้อย

เปล้าน้อยเป็นพืชสมุนไพรไทยที่สำคัญชนิดหนึ่ง มีชื่อทางพฤกษศาสตร์คือ *Croton sublyratus* Kurz. ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Euphobiaceae เป็นไม้ผลัดใบ ลักษณะเป็นพุ่มแตกกิ่งก้าน สูง 2-4 เมตร มีใบเดี่ยว เรียงสลับกัน ยอดมีขนอ่อนสีน้ำตาลสั้นๆ นิ่มๆ คลุมอยู่ ซึ่งแตกต่างจากเปล้าชนิดอื่นๆ ที่ไม่พบขนชนิดนี้ในยอดอ่อน ลักษณะของใบเป็นใบที่มีปลายแหลม ขอบใบหยักเล็กๆ แบบฟันเลื่อย ใบกว้าง 4-6 เซนติเมตร ยาว 15-20 เซนติเมตร ฐานใบเรียว แหลม ไม่มีขน ดอกของเปล้าน้อยจะมีสีนวลเป็นช่อที่ปลายกิ่ง โดยดอกตัวผู้จะอยู่ด้านบน ส่วนดอกตัวเมียอยู่ด้านล่าง ผลมีลักษณะค่อนข้างกลมมี 3 พู ขนาดโตเท่าเมล็ดข้าวโพด (พเยาว์, 2537)

เปล้าน้อยเป็นพืชตระกูลเปล้า ที่มีทั้งหมดทั่วโลก 750 ชนิด และมีในประเทศไทย 15 ชนิด มักพบขึ้นอยู่ในบริเวณประเทศที่ตั้งอยู่แถบชายฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่ ไทย, อินโดนีเซีย, มาเลเซีย และทางตอนใต้ของประเทศจีน ในประเทศไทยได้มีการสำรวจพบในเขตป่าเบญจพรรณ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, ปราจีนบุรี และตามแนวชายแดนประเทศไทยกับพม่า ได้แก่จังหวัดกาญจนบุรี เป็นต้น (ณรงค์, 2530)

1.2 การขยายพันธุ์เปล้าน้อย

การขยายพันธุ์เปล้าน้อยทำได้หลายวิธีคือ การเพาะเมล็ด, ตอนกิ่ง, ปักชำ เป็นต้น Matsunaga และ Domethong (1990) ได้ทำการขยายพันธุ์เปล้าน้อยโดยวิธีทาบกิ่งเพื่อเตรียมต้นพันธุ์และใช้ใบเปล้าน้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเปลาโนทอลในอุตสาหกรรม การขยายพันธุ์วิธีการดังกล่าว มีประสิทธิภาพดีในการผลิตใบที่มีคุณภาพ เนื่องจากการทาบกิ่ง จะได้กิ่งพันธุ์เปล้าน้อยพันธุ์ดีที่ต้องการขยายพันธุ์ มาทาบกับต้นตอของเปล้าใหญ่ *(Croton oblongifolius* Roxb.) ทั้งนี้เนื่องจากต้นตอเปล้าใหญ่มีการเจริญเติบโตที่ดี สามารถต้านทานต่อการเกิดโรครากเน่า ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตใบเปล้าน้อย การขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารเปลาโนทอล (พเยาว์, 2537)

เนื่องจากในปัจจุบันมีการใบเปล้าน้อยเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตยา จึงมีความจำเป็นที่ต้องเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตใบในปริมาณที่มากในระยะเวลาอันรวดเร็ว Shibata และคณะ (1996) ขยายพันธุ์เปล้าน้อยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนของใบเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเมล็ด นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้เกิดแคลลัสแล้วจึงย้ายลงเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอด (regenerate) แล้วจึงนำยอดที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม IAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไบโอไฟเบอร์ (BD_2) เพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากได้สำเร็จ อพัชชา (2537) เลี้ยงส่วนของใบเปล้าน้อยเพื่อให้เกิดแคลลัสและสามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นยอดได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ GA_3 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร Shibata และคณะ (1996) ได้ค้นพบว่าสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเปล้าน้อยคือ สูตร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมาชลิดาและวีระเดช (2541) พบว่า สามารถชักนำส่วนปล้องของเปล้าน้อยให้เกิดยอดได้ในอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3 <u>สรรพคุณทางยา</u>

เปล้าน้อยมีสรรพคุณเป็นสมุนไพรรักษาโรคได้หลายชนิดมาตั้งแต่ในอดีต (สุนทรี, 2535) ดอกสามารถใช้เป็นยาขับและฆ่าพยาธิ ผลใช้แก้โรคน้ำเหลืองเสีย เปลือกมีฤทธิ์ช่วยในการบำรุงธาตุ แก่นใช้เป็นยาขับโลหิต รากใช้ในการแก้คัน, รักษามะเร็งเพลิง, โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน, ริดสีดวงทวาร, แก้ไอเป็นโลหิต, แก้พยาธิต่างๆ ส่วนใบซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญมากใช้บำรุงธาตุ, บำรุงโลหิตประจำเดือน และแก้โรคกระเพาะ เนื่องจากใบเปล้าน้อยมีสาร Diterprene alcohol (CS-684 หรือ เปลาโนทอล) อยู่ซึ่งคุณสมบัติของตัวยาเปลาโนทอลนี้ มีฤทธิ์สมานแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อบุลำไส้ที่เสียไป ทำให้แผลหายเร็วขึ้น ทั้งยังลดปริมาณการหลั่งของกรดในกระเพาะอาหารให้น้อยลง และทำให้ระบบป้องกันการดูดซับกรดของเนื้อเยื่อบุกระเพาะซึ่งถูกทำลายด้วยสารบางชนิดกลับคืนดี ทั้งนี้ยังเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำเหมาะสำหรับผลิตเป็นตัวยารักษาโรคกระเพาะอาหารได้ดีเยี่ยม ถือว่าเป็น Broad spectrum antiseptic ulcer drug (สุนทรี, 2535)

ในปัจจุบันมีการเตรียมยาแผนปัจจุบันจากใบเปล้าน้อยโดย ดร.โอกิโซแห่งบริษัทซันเกียว ประเทศญี่ปุ่น ได้นำสมุนไพรจากร้านขายยาไทยแผนโบราณไปศึกษา พบว่าสมุนไพร “ใบเปล้าน้อย” มีผลที่น่าสนใจ จึงเข้ามาทำการสำรวจพันธุ์เปล้าน้อยในประเทศไทยพบว่า *Croton sublylatus* Kurz. ที่พบแถบจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ให้สารสำคัญในใบคือ เปลาโนทอล ซึ่งมีฤทธิ์สมานแผลในกระเพาะอาหารสูงสุด

เมื่อนำมาศึกษาถึงคุณสมบัติต่างๆ ทางเคมี เภสัชวิทยา และพิษวิทยาตลอดจนได้ผลิตเป็นยาเม็ดแผนปัจจุบัน ออกวางจำหน่ายแล้วในปัจจุบัน มีการจดทะเบียน โดยบริษัทซันเกียว ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มากกว่า 7,000 ไร่ ตั้งเป็นโรงงานสกัดสารเปลาโนทอลด้วย เมทานอลได้วันละ 9 ตัน และนำกลับไปดำเนินต่อที่ประเทศญี่ปุ่น ได้สารเปลาโนทอลซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตยารักษาแผลในกระเพาะอาหาร มีชื่อทางการค้าว่า “Kelnac” ยอมรับได้ว่าเป็นยาแผนปัจจุบันชนิดล่าสุดที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรไทย (พร้อมจิตร, 2537)

1.4 <u>โรคที่เกิดกับเปล้าน้อย</u>

Matsunaga และคณะ (1991) ได้รายงานว่า โรคสำคัญที่เกิดกับเปล้าน้อยคือ โรครากเน่าซึ่งเกิดจากสภาพแวดล้อมและการเขตกรรม และโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Amyna punctum* นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรคกับต้นเปล้าชนิดอื่นๆ เช่น *Croton capitatus, Croton monanthogynus* และ *Croton texensis* และยังพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora spp., Phyllostieta*

ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และนลิน นิลอุบล (2540) รายงานพบการระบาดของโรคใบจุดที่เกิดกับเปล้าน้อยเป็นครั้งแรกในประเทศไทยในปีพ.ศ. 2538 และ 2539 ในเขตบริเวณหาดวนกร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยพบต้นที่เกิดโรคคิดเป็นร้อยละ 76 ของต้นเปล้าน้อยทั้งหมดที่ทำการสำรวจ

นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคใบจุดกับต้นเปล้าน้อยบริเวณเขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี จากการสำรวจโรคใบจุดเปล้าน้อยทั้ง 2 แห่งข้างต้นพบว่า เชื้อสาเหตุของโรคใบจุดคือ เชื้อรา *Glomerella cingulata*

1.5 <u>โรคใบจุดของเปล้าน้อย</u>

โรคใบจุดเปล้าน้อย มีเชื้อสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* โดยลักษณะอาการเริ่มแรกของโรคใบจุด จะเกิดจุดสีเขียวชุ่มน้ำขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วบริเวณใบ ต่อมาอาการของโรคจะปรากฏเป็นแผลจุดกลมสีน้ำตาล ถึงสีดำ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร และมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ นอกจากนี้อาจพบแผลบนเส้นกลางใบมีสีดำ ภายในแผลพบฟรุตติ้งบอดี้ (friuting body) ของเชื้อเป็นจุดสีดำขนาดเล็กกระจายอยู่บริเวณแผล อาการของโรคจะมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น เมื่อระดับความชื้นในอากาศสูง (ชลิดา และนลิน, 2540)

เชื้อรา *Glomerella cingulata* เป็นระยะ telemorph stage ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งจัดอยู่ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (perfect stage) สามารถพบได้ในภูมิประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อน มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวาง เชื้อราใน species นี้มีความแตกต่างกันถึง 9 รูปแบบ ทั้งในด้านรูปร่าง การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พืชอาศัย และความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยจัดว่าเป็นเชื้อราที่มีความผันแปรค่อนข้างสูง เชื้อราจะสร้างฟรุต-ติ้งบอดี้แบบเพอริธิเซียม (perithicium) ที่มีรูปร่างคล้ายขวดรูปชมพู่ ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช มีความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100-300 นาโนเมตร ภายในเพอริธิเซียมเป็นที่กำเนิดของแอสคัส (ascus) มีลักษณะเป็นรูปไข่ (ellipsoidal) ตรงหรือโค้ง ขนาดประมาณ 55-70x10^{-14} ไมโครเมตร ภายในมี 8 แอสโคสปอร์ (ascospore) แอสโคสปอร์มีรูปร่างกลม รี ไม่มีสี (hyaline) ไม่มีผนังกั้น (non-septate) มีขนาดประมาณ 12–28 x 4–7 ไมโครเมตร (Dennis,1968)

ส่วนเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จัดเป็นเชื้อราที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (imperfect stage) จะสร้าง acervulus ประกอบด้วย stromatic cell ซึ่งแต่ละเซลล์จะมีลักษณะยาวเรียวเล็กลงที่ส่วนปลาย (sublate) หรือรูปร่างทรงกระบอก (cylindrical) อยู่ใต้ชั้น cuticle epidermis ของพืช ภายใน acervulus พบ conidiophore ที่ไม่มีสีหรือมีสีน้ำตาล มีผนังกั้นขวางแตกแขนงเฉพาะที่บริเวณฐาน conidiogenous cell จะมีลักษณะเป็นเซลล์สั้นๆ (phialidic) รูป

ร่างทรงกระบอก ความยาวคงที่ ผนังเรียบไม่มีสี ให้กำเนิด conidium จากผนังเซลล์ด้านใน (enteroblastic) conidium รูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน (cylindrical) ลักษณะตรงไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น มีขนาด 9-24x3-4.5 ไมโครเมตร สร้าง appressorium รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) ไม่แตกกิ่งก้าน สีน้ำตาล ขนาด 6-20x4-12 ไมโครเมตร (Sutton,1980)

Latham และคณะ (1983) ได้รายงานว่าเชื้อราดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรค Bitter rot ในแอปเปิ้ล นอกจากนี้ได้พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายสตรอเบอรี่ (Howard และคณะ, 1984; Freeman และคณะ, 1997) โกโก้ (Mohanan และคณะ, 1987) หญ้าสโตไล (Lenne' และคณะ, 1987) camellia (Dickens และ Cook, 1989) ส้ม (Liyanage และคณะ, 1992) พริก, ทุเรียน, เงาะ, มะม่วง, เสาวรส, พริก (Jeffiries และคณะ, 1990; Uecker, 1994) และต้นชา (Hirota และคณะ, 1993) ก่อให้เกิดโรคพืชและส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของพืชดังกล่าวเป็นอันมาก

1.6 **<u>การศึกษาสารพิษกับการเกิดโรค</u>**

มีการศึกษาพบว่า สาเหตุของการเกิดโรคใบจุดนั้น ส่วนใหญ่เกิดจากการที่เชื้อสาเหตุสร้างสารพิษเข้าไปทำลายเซลล์พืชโดยอาการจุดที่เห็นจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่เชื้อสาเหตุได้เข้าทำลายส่วนต่างๆ บริเวณดังกล่าวแล้ว (Bilgram และคณะ, 1976) ในการศึกษาถึงบทบาทของสารพิษที่มีต่อเซลล์พืชนั้นยังมีน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากไม่สามารถทราบปริมาณแน่นอนของสารพิษที่มีอยู่ในต้นพืชที่เป็นโรคได้ ปริมาณของสารพิษที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาต่อพืชนั้น จะใช้สารพิษที่สกัดได้ในความเข้มข้นสูงและใช้เวลาในการให้สารน้อย ส่งผลให้พืชแสดงอาการของโรคมากขึ้น โดยทั่วไปสารพิษต่างชนิดกันจะให้ผลแตกต่างกัน ผลของสารพิษที่มีต่อพืชนั้นไม่ได้มีลักษณะจำเพาะมากนัก อาจพบลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งเกิดจากโรคอื่นหรือ พืชอยู่ในภาวะเครียด โดยอาจเกิดจากฮอร์โมนหรือสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Hanchey,1981) Wang (1986) ทดสอบสารพิษจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*) กับแคลลัสของมะกอกพบว่ามีผลทำให้การเจริญเติบโตของแคลลัสลดลง และกลายเป็นสีน้ำตาลในที่สุด

ฮอร์โมนหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนั้นมีประโยชน์ในแง่ของการเร่งการเจริญเติบโตของพืช แต่ในขณะเดียวกันมีการศึกษาพบว่า สารออกซินที่สร้างโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas savastanoi* ทำให้เกิดอาการปุ่มปม(tumor) กับต้นยี่โถ (Wilson, 1965) เช่นเดียวกับรายงานของสุนีย์ (2535) พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella*

cingulata) ผลิตสาร indoleacetic acid ซึ่งจัดว่าเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ทำให้เกิดอาการของโรคหอมเลื้อย โดยทำให้หอมหัวใหญ่มีลักษณะใบบิดโค้งงอ หัวลีบยาว เมื่อนำมาวิเคราะห์พบสาร indoleacetic acid บริเวณเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ จึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราสาเหตุสามารถสร้างสาร indoleacetic acid และสารนี้ทำให้เกิดโรคกับหอมหัวใหญ่ Kawazu (1996) ศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สร้างสาร phenylacetic acid ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มออกซินเช่นกันเป็นสาเหตุให้เกิดโรคเหี่ยวในต้นสน (*Pinus thunbergii*)

เนื่องจากออกซินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสามารถสร้างได้ มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการขยายตัวและแบ่งเซลล์ แต่ในกรณีที่มีความเข้มข้นเกินสมดุลย์ภายในเซลล์ อาจจะเข้าไปขัดขวางหรือทำลายปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช อาจมีผลทำให้โปรตีนภายในเซลล์พืชเกิดปฏิกิริยา hydrolysis หรืออาจไปยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของโปแทสเซียม ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุให้ท่ออาหารถูกทำลาย หรือเข้าไปขัดขวางการเคลื่อนย้ายของสารประกอบฟอสเฟตที่มีพลังงานสูง เช่น ATP ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นตายได้ อาการของโรคจึงปรากฏให้เห็นในลักษณะของใบจุดและใบไหม้ (Peter, 1995)

Wightman และ Lighty (1982) ศึกษาวิเคราะห์สาร phenylacetic acid ในลำต้นของพืชชั้นสูง 6 ชนิด พบว่าสาร phenylacetic acid เป็นสารออกซินที่มีฤทธิ์อ่อนกว่าสาร indoleacetic acid แต่ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่า ในเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานพบว่า สาร phenylacetic acid ถูกสร้างขึ้นโดยอาศัย indoleacetic และ typtophan เป็นสารตั้งต้นซึ่งมีอยู่ในเซลล์พืช (Wightman และ คณะ, 1975)

Darren และคณะ (1991) นำ culture filtrate ของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ทดสอบกับพืชอาศัยพบว่าสามารถทำให้เกิดโรคได้ และมีการศึกษาพบว่าสารพิษที่เชื้อราดังกล่าวสร้างขึ้นนั้นเป็นสารประเภทเอนไซม์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีฤทธิ์เข้าไปทำปฏิกิริยากับเซลล์ของพืชอาศัย และพืชแสดงอาการของโรคให้เห็น Naik และคณะ (1991) ได้ศึกษาพบว่า culture filtrate ของเชื้อราชนิดเดียวกันนี้ สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดผักชีและมะเขือเทศได้ Hirota และคณะ (1993) ทำการแยกและสกัดสารพิษบริสุทธิ์ของเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบไหม้สีน้ำตาล (tea brown blight) ในชาญี่ปุ่น พบสาร phenylacetic acid (PAA), indoleacetic acid (IAA) และสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารประเภทใด โดยสารทั้งสองชนิดแรกนั้นเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน

1.7 **<u>การคัดพันธุ์พืชต้านทานโรคโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>**

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มขึ้นตั้งแต่ปีค.ศ. 1902 เมื่อ Harberlandt นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันได้พยายามเอาเซลล์พืชมาทดลองเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์แต่ไม่ประสบความสำเร็จ การทดลองในระยะแรกนั้นส่วนใหญ่เป็นการทำให้เนื้อเยื่อพืชมีชีวิตอยู่รอดได้ในอาหารสังเคราะห์เท่านั้น จนกระทั่ง White (1934) ค้นพบสูตรอาหารใหม่ที่ สมบรูณ์ที่สุดในขณะนั้น ทำให้สามารถเลี้ยงรากมะเขือเทศให้มีชีวิตอยู่ และมีการเจริญเติบโตต่อไปได้ จากนั้นมีนักวิทยาศาสตร์หลายคนศึกษาสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันมากมาย เช่น สูตรอาหารเลี้ยงกล้วยไม้ของ Knudson (1946) สูตรอาหารเลี้ยงแคลลัสของยาสูบของ Hildebrandt (1946) สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงพืชทั่วๆไปของ Murashige และ Skoog (1962) สูตรเลี้ยงยาสูบของ Nitsch และ Nitsch (1969) สูตร B-5 ของ Gamborg (1970) และสูตรอาหารเลี้ยงพืชตระกูลปาล์มหรือสูตร Y_3 ของ Eeuwens (1976)

การค้นพบที่ถือว่าเป็นความก้าวหน้าของงานวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการค้นพบของ Skoog และ Miller (1957) พบว่า การพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นหรือรากขึ้นอยู่กับความ สมดุลย์ของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และ ไซโตไคนิน โดยที่อัตราส่วนของออกซินต่ำกว่าไซโตไคนินเนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นยอด อัตราส่วนของออกซินเท่ากับไซโตไคนินเนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส และถ้าอัตราส่วนของออกซินสูงกว่าไซโตไคนินเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นราก หลังจากการค้นพบดังกล่าว ทำให้งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำมาใช้ในการศึกษาด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืช การขยายพันธุ์พืช และการผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค

สำหรับงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การใช้เทคนิคการเลี้ยงละอองเกสรยาสูบเพื่อหาสายพันธุ์ที่ดีมีคุณภาพดีและผลผลิตสูงได้สำเร็จ สามารถย่นระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้มาก (Patrascu และคณะ, 1981) การเลี้ยงละอองเกสรหน่อไม้ฝรั่งเพื่อสร้างพ่อ–แม่พันธุ์ที่ให้ลูกผสมเป็นตัวผู้ทั้งหมด (Tsay และคณะ, 1981) การสร้างสายพันธุ์ข้าวทนต่อโรคไหม้โดยอาศัยเทคนิคการเลี้ยงละอองเกสร ซึ่งเป็นผลสำเร็จในระยะเวลา 2 ปี ในขณะที่การปรับปรุงพันธุ์ในสภาพไร่นาใช้เวลาถึง 12 ปี (Li และคณะ, 1983) การสร้างพันธุ์ใหม่ๆ จากการผสมโซมาติกเซล (somatic hybridization) เช่น การผสมยาสูบกับแครอท และชักนำให้ลูกผสมเจริญเป็นต้นพืชได้สำเร็จ ซึ่งการ

ผสมข้ามวงศ์เช่นนี้ไม่อาจทำได้โดยการผสมเกสรตามปกติ (Kumar และคณะ, 1984) ส่วนงานวิจัยทางด้านการคัดเลือพันธุ์พืชต้านทานต่อโรคนั้น Carlson (1973) ทดลองใช้สารเคมีซึ่งคล้ายกับสารพิษที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ (wildfire disease) ในการคัดเลือกยาสูบให้ต้านทานต่อโรค ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสามารถชักนำเซลล์ที่ต้านทานให้เจริญเป็นต้นได้สำเร็จ ต่อมาจึงได้มีการศึกษาคัดเลือกพืชต้านทานโรคในพืชชนิดอื่น โดยใช้เชื้อสาเหตุโรค สารพิษที่เชื้อสาเหตุสร้างขึ้น (pathotoxin) สารเคมีและ culture filtrate เป็นตัวคัดเลือก (Sun และ Zheng, 1990) การใช้สารพิษ (toxin) ที่เชื้อสาเหตุโรคสร้างขึ้นนั้นต้องมีความสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดโรคกับพืชในธรรมชาติ (Rup และ Sukanya, 1990) โดยแผลที่เกิดจากสารพิษจะต้องมีอาการคล้ายกับแผลของโรคที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อด้วย (Magaret, 1986) สารพิษที่สร้างโดยเชื้อสาเหตุส่วนใหญ่ยังมิได้มีการจำแนกอย่างจริงจังหรือยากแก่การทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ ดังนั้นการนำ culture filtrate มาใช้เป็นตัวคัดเลือกจึงเป็นวิธีการที่ดีสำหรับการคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ต้านทานในขั้นต้น สำหรับความเป็นพิษต่อเซลล์ที่คัดเลือก อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบของอาหารที่เลี้ยงเชื้อ และสารพิษอื่นๆ ที่เชื้อสาเหตุไม่ได้สร้างโดยตรง เชื้อโรคอาจจะผลิตสารหลักที่สร้างความเป็นพิษในอาหารเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้โดยตรง จากข้อสงสัยนี้สามารถใช้สารพิษบริสุทธิ์มาทดสอบเพื่อยืนยันได้อีกครั้งหนึ่ง (Rup และ Sukanya, 1990) Batchvarova และคณะ (1992) ได้นำพันธุ์ข้าว 4 พันธุ์คือ Labelle, Leah, Lemont และ Red ซึ่งมีความต้านทานต่อเชื้อรา *Cercospora oryzae* มาทดสอบกับสาร cercosporin ที่เชื้อสาเหตุโรคสร้างขึ้น เพื่อศึกษาถึงความต้านทานต่อการเกิดอาการ chlorosis และ necrosis บนใบข้าว พบว่าพันธุ์ Red เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อสารพิษของเชื้อสูงสุดและสามารถเจริญต่อไปได้ โดยพบว่าภายในเซลล์ที่ต้านทานนั้น มีการสร้างสาร carotenoid ซึ่งมีผลในการยับยั้งสารพิษดังกล่าว

เพชรรัตน์ (2537) ได้ทำการพัฒนาเทคนิคในการคัดเลือกข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคใบไหม้โดยใช้ culture filtrate ของเชื้อราผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อและแคลลัส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ culture filtrate เพิ่มขึ้น จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าวทั้งด้านความสูงและจำนวนการเกิดยอด ตลอดจนมีขนาดของแคลลัสลดลง เมื่ออายุการเพาะเลี้ยงนานขึ้น จะมีผลทำให้มีอัตราการตายของยอดและแคลลัสของข้าวมีมากขึ้น จากนั้นนำต้นข้าวที่ต้านต่อ culture filtrate ออกปลูกในสภาพธรรมชาติ และศึกษาความแปรปรวนของลักษณะต่างๆ เทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (control) พบว่ามีลักษณะภายนอกที่กลายพันธุ์ไปจาก control เช่น ขนาดของใบใหญ่ขึ้น ความสูงเพิ่มขึ้น อายุการออกดอกสั้นลง และ

พบว่าเปอร์เซ็นต์ของต้นที่ต้านทานโรค มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ culture filtrate มากขึ้น ในขณะที่ control ไม่พบต้นต้านทานโรค

1.8 **มูลเหตุจูงใจ**

เปล้าน้อยเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทย เนื่องจากมีการใช้ใบเปล้าน้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตตัวยาเปลาโนทอล ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้รักษาโรคแผลกระเพาะอาหาร และมีรายงานพบโรคใบจุดเปล้าน้อย ซึ่งมีผลกระทบต่อปริมาณของสารเปลาโนทอลในใบ (ธนสาร, 2542) การควบคุมป้องกันโรคยังไม่เคยมีการรายงาน เนื่องจากเปล้าน้อยเป็นพืชป่า ที่ขึ้นอยู่ในสภาพที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ไม่มีการใช้สารเคมี การคัดเลือกพืชต้านทานสารพิษที่เชื้อสาเหตุโรคสร้างขึ้นโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่อาจจะช่วยลดความสูญเสียเนื่องจากโรคนี้ได้ เพชรรัตน์ (2542)พบว่าในสารพิษจากเชื้อสาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อยนี้ ประกอบไปด้วยสาร 3 ชนิด คือ Indoleacetic acid (IAA), Phenylacetic acid (PAA) และสารไม่ระบุชนิดอีก 1 ชนิด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ ต้องการทราบว่าสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา *Glomerella cingulata* ชนิดใดที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค ซึ่งอาจเกิดจากสารเพียงชนิดเดียว หรือการทำงานร่วมกันของสารมากกว่า 1 ชนิด โดยนำสารพิษดังกล่าวมาใช้สำหรับคัดเลือกแคลลัสและยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานสารพิษในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการคัดเลือกเปล้าน้อยต้านทานโรคต่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.9.ขอบเขตงานวิจัย

1.เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อยในขวดและชักนำให้เป็นยอดและแคลลัส

2.เลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ให้สร้างสารพิษ

3.สกัดสารพิษของเชื้อราจาก culture filtrate

4.ศึกษาชนิดของสารพิษจากเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของยอดและแคลลัสในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5.ชักนำให้ยอดและแคลลัสต้านทานต่อสารพิษ และคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่มีความต้านทานสารพิษ

6.ย้ายยอดและแคลลัสที่ต้านทานต่อสารพิษจากข้อ 5 ลงในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารพิษสูงขึ้น และคัดเลือกยอด และแคลลัสที่ต้านทานต่อสารพิษสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Auto steam sterilizer) รุ่น KT-30SD บริษัท ALP ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 เครื่อง HPLC รุ่น SCL-8A บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

2.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F-13E บริษัท Horita ประเทศญี่ปุ่น

2.1.4 ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave oven) รุ่น NE-7670 บริษัท Matsushita Electric Industrail ประเทศญี่ปุ่น

2.1.5 ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น 240M บริษัท Contherm Scientific ประเทศนิวเซอร์แลนด์

2.1.6 เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z230 บริษัท Hermle AG ประเทศเยอรมัน

2.1.7 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อพืช (Laminar air flow hood) รุ่น HS-124 บริษัท International Scientific Supply ประเทศไทย

2.1.8 เครื่องชั่ง (Analytical Balance) รุ่น AE240 บริษัท Metler Instrumente AG ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.1.9 เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) รุ่น RE52 บริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

2.1.10 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น UL-92AK บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

2.1.11 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Alphaphot-YS2 บริษัท NiKon ประเทศญี่ปุ่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 **<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>**

2.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

Indole-3-acetic acid (IAA) บริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

α-Napthaleneacetic acid (NAA) บริษัท Fluka Biochemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

Phenylacetic acid (PAA) บริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา

6-Benzylaminopurine acid (BA) บริษัท Fluka Biochemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อและสารลดแรงตึงผิว

คลอรอกซ์ (Clorox) กรมสรรพสามิต ประเทศไทย

เอทานอล (Ethanol) Commercial grade ประเทศไทย

ทวีน 80 (Tween-80) บริษัท Fluka Biochemika ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato dextrose agar (PDA), Czapek agar (CZA), Czapek's Dox Medium, Yeast extract และ Richard's Medium (ภาคผนวกที่ 1)

2.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกสกัด และวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา

เอทิลอะซิเตด (ethylacetate), Commercial grade บริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน

เมทานอล (Absollute Methanol) บริษัท J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) Commercial grade บริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน

กรดไฮโดรคลอริค (Hydrocholic acid) Commercial grade บริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 พืชทดลอง

เปล้าน้อย (*Croton sublyratus*) ต้นพันธุ์ IBGE 2 จากแปลงทดลองของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุ์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เตรียมอาหารสังเคราะห์แข็งสูตร Murashige และ Skoog (1962) (ภาคผนวกที่ 1ก) ในสูตรอาหารที่ชักนำให้เป็นยอด เติม 6-Benzylaminopurine acid (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และในสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส เติม α-Napthaleneacetic acid (NAA) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Morimoto และ Murai, 1989)

2.3.3 การเตรียมตัวอย่างพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ

นำยอดเปล้าน้อย ความยาว 7-10 เซนติเมตร มาตัดใบออก เอาเฉพาะส่วนปล้องล้างด้วยน้ำสะอาด แช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย คลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และ คลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ หนาประมาณ 3 มิลลิเมตร

2.3.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปล้าน้อย

นำชิ้นส่วนปล้องที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วจากข้อ 2.3.3 วางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เกิดยอดตามข้อ 2.3.2โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ เป็นเวลา16 ชั่วโมงต่อวัน และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ เพื่อใช้ในงานทดลองต่อไป

2.4 การเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ให้สร้างสารพิษ

2.4.1 การเก็บรักษาเชื้อรา *Glomerella cingulata*

ใช้เข็มเขี่ย (needle) เขี่ยลากเส้นใยของเชื้อรา *Glomerella cingulata* (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียง (agar slant) สูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวกที่ 1ข) ที่อยู่ในหลอดทดลองจุกฝ่าเกลียว บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่แล้ว นำส่วนหนึ่งเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส ส่วนหนึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2 การเตรียมอาหารวุ้นเอียง (agar slant)

หลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Czapek's Dox Medium (ภาคผนวกที่ 1ข) ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร อุดปากหลอดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลงถึง 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเอียงหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยมุมที่เท่ากัน ทั้งนี้เพื่อควบคุมผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียงให้มีพื้นที่ผิวใกล้เคียงกันมากที่สุดในแต่ละหลอด ทิ้งไว้ 1 วันเพื่อดูการปนเปื้อนก่อนนำไปปลูกเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อให้สร้างสปอร์และเตรียมสปอร์แขวนลอย

เขี่ยเส้นใยของเชื้อรา *G. cingulata* จากเชื้อที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียงสูตร Czapek's Dox Medium ที่อยู่ในหลอดทดลองจุกสำลี บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์คูลไวท์ เป็นเวลา 7 วัน (เพชรรัตน์, 2542) เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์ จากนั้นทำการล้างสปอร์ออกจากหลอด ด้วยสารละลาย tween-80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตรต่อปริมาตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อรา ใช้แท่งไม้ที่ผ่าการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกันขูดให้สปอร์หลุดออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (vertex) แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนกันหนา 4-5 ชั้น จะได้สารแขวนลอยของสปอร์ นับจำนวน สปอร์โดยใช้ Haemacytometer ภายใต้กำลังขยาย 400 เท่าของกล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาความเข้มข้นของสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปรับความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อราให้เท่ากับ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมหัวเชื้อ

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตร Czapek's Dox Medium ที่เติมสารสกัดยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Hirota และคณะ ,1993) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4.5 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารพิษ

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.4.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว Czapek's Dox Medium ที่เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ yeast extract สำหรับผลิตสารพิษ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน (เพชรรัตน์, 2542)

2.5 **<u>การสกัดสารพิษจากเชื้อรา</u>**

นำน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *G. cingulata* ในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.4.5 กรองผ่านผ้าขาวบาง 3 ชั้น และกระดาษกรองเบอร์ 1 ของเหลวที่ได้เรียกว่า culture filtrate แล้วนำมาลดปริมาตรลงให้เหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรของ culture filtrate เริ่มต้น โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 80 รอบต่อนาที นำ culture filtrate ที่ลดปริมาตรแล้วไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 2.5 ด้วย 6N HCl และนำไปสกัดด้วย ethylacetate 3 ครั้งๆ ละ 1/3 เท่าของปริมาตร culture filtrate (Zeigler และคณะ, 1980) นำสารละลายในชั้นของ ethylacetate ไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออก ได้สารสกัดจากเชื้อราที่มีลักษณะเหนียวข้นเรียกว่า crude extract toxin จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักสารสกัด

2.6 **<u>การวิเคราะห์หาปริมาณสาร phenylacetic acid (PAA) และ indoleacetic acid (IAA) ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</u>**

2.6.1 **การสร้างกราฟมาตรฐาน**

ทำการผันแปรความเข้มข้นของสารมาตรฐาน phenylacetic acid (PAA) ความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ indoleacetic acid (IAA) ความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์ให้มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐาน ดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คอลัมน์ : Selectosil 5 C_{18}
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร
ความยาว 250 มิลลิเมตร

สารละลายตัวพา : Methanol 30 เปอร์เซ็นต์ ใน acetate buffer pH 4.8

อัตราการไหลของสารละลายตัวพา: 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด : Ultraviolet ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

ปริมาตรสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ : 5 ไมโครลิตร

ความดัน : 120-170 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

สร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่ใต้พีคของสารทั้ง 2 ชนิด จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

คำนวณหาสมการเส้นตรง

$$Y = aX + b$$

เมื่อกำหนดให้

A = ความชันของเส้นตรง
B = จุดตัดแกน Y
X = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
Y = พื้นที่ใต้พีค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร phenylacetic acid และ indoleacetic acid ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา

นำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เตรียมได้ตามวิธี ข้อ 2.5 ละลายด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ Methanol กรองผ่านกระดาษกรอง cellulose acetate ที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้พีคมาเปรียบเทียบกับ สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน phenylacetic acid และ indoleacetic acid โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{จาก} \quad Y = aX + b$$

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

2.7 ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสและยอดเปล้าน้อยในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.7.1 การศึกษาสารมาตรฐาน IAA และ PAA ต่อการเจริญของแคลลัสเปล้าน้อย

เนื่องจากเพชรรัตน์และคณะ (2542) ได้รายงานว่าสารสกัดจากเชื้อราเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการของโรคใบจุด ซึ่งภายในสารสกัดจากเชื้อรานั้นมีสาร IAA และ PAA ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผสมสาร IAA และ PAA ในความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายแคลลัสลงเลี้ยงบนอาหาร จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ค)

2.7.2 ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของเปล้าน้อย

2.7.2.1 ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของแคลลัสเปล้าน้อย

นำแคลลัสเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ย้ายลงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และผสมสารสกัดจากเชื้อราที่ได้จากข้อ 2.5 ตามความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1. สารสกัดจากเชื้อรา 500 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสาร IAA 2.22 และสาร PAA 25.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. สารสกัดจากเชื้อรา 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสาร IAA 4.43 และสาร PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. สารสกัดจากเชื้อรา 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสาร IAA 6.645 และสาร PAA 5.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. สารสกัดจากเชื้อรา 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสาร IAA 8.86 และสาร PAA101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5. สารสกัดจากเชื้อรา 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสาร IAA 11.10 และสาร PAA 126.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6. สารสกัดจากเชื้อรา 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสาร IAA 13.29 และสาร PAA 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดยเปรียบเทียบกับการเจริญบนอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากเชื้อรา นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อ

2.7.2.2 ศึกษาสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของยอด

นำยอดเปล้าน้อยที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ย้ายลงบนอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผสมสารพิษจากเชื้อราที่ได้จากข้อ 2.5 ตามความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.7.2.1 โดยเปรียบเทียบกับการเจริญของยอดบนอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากเชื้อรา นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของยอด

2.8 <u>คัดเลือกแคลลัสและยอดเปล้าน้อยให้มีความต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น</u>

นำแคลลัสและยอดที่รอดชีวิตจากข้อ 2.7 มาเลี้ยงลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผสมสารสกัดจากเชื้อราที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่าจากความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราที่เนื้อเยื่อสามารถรอดชีวิตในข้อ 2.7 จากนั้นคัดเลือกแคลลัสและยอดเปล้าน้อยที่รอดชีวิตย้ายลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่เติมสารสกัดจากเชื้อราเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อเป็นการพักฟื้นและย้ายลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นเดิม (ความเข้มข้น 2 เท่าจากความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราในข้อ 2.7) อีกครั้งเพื่อทดสอบคุณสมบัติความต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราของเนื้อเยื่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

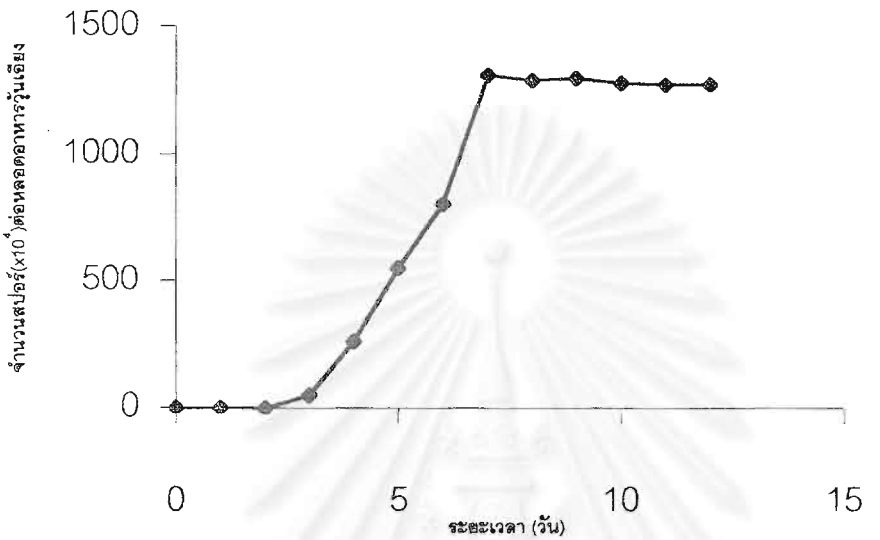
ผลการทดลอง

3.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Glomerella cingulata*

เนื่องจากในงานวิจัยครั้งนี้จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ให้สร้างสารพิษเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย ทั้งนี้ต้องให้เชื้อราดังกล่าว สร้างสปอร์มากพอที่จะนำมาใช้ในงานวิจัย รายงานของธนาสาร (2542) กล่าวว่า เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดในอาหาร Czapek's Agar (ภาคผนวก ข-3) ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* บนอาหาร Czapek's Agar ตามวิธีทดลองข้อ 2.4.2 ในอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, และ 12 วัน ตามลำดับ ทำการล้างสปอร์ และนับจำนวนสปอร์ (สปอร์ต่อหลอดอาหารวุ้นเอียง) ตามวิธีการข้อ 2.4.3 จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 1)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *G.cingulata* ที่ระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 1 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* ที่เลี้ยงบนอาหาร Czapek's Agar ที่ระยะเวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

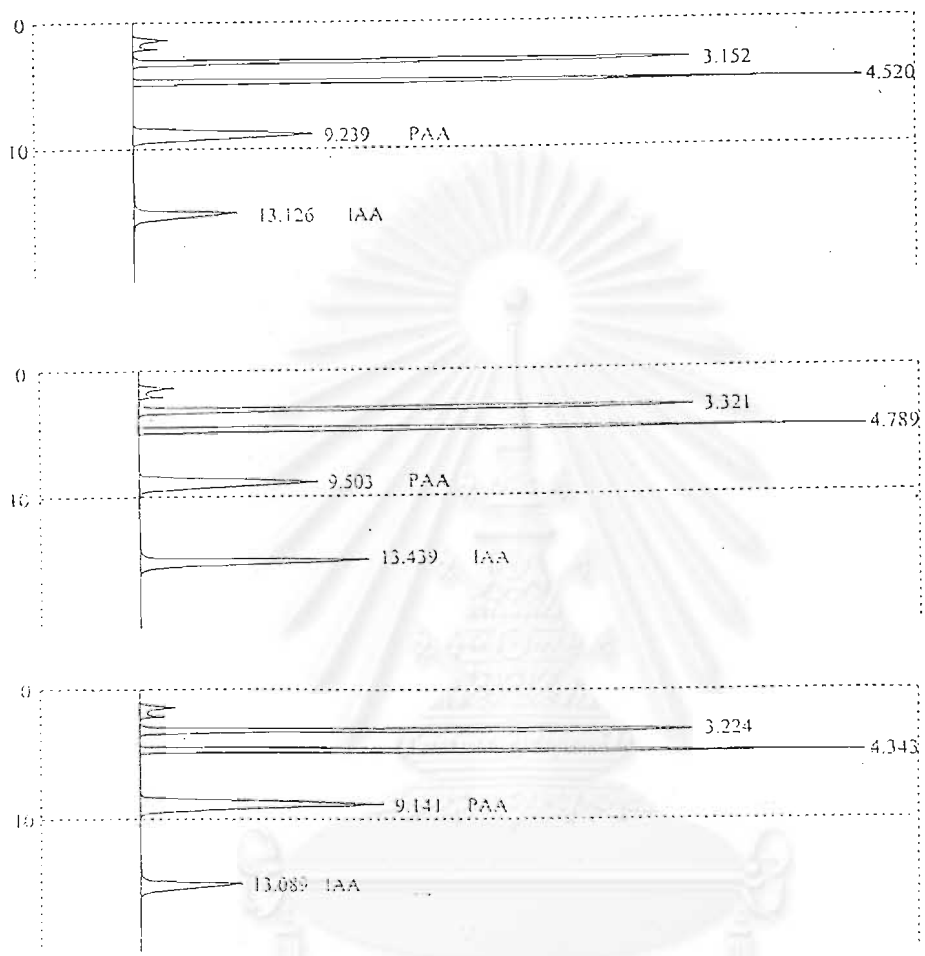
3.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ให้สร้างสารพิษ

Hirota และคณะ (1993) ได้รายงานว่า เชื้อ *Glomerella cingulata* สาเหตุของโรคใบไหม้ในชาได้สร้างสารพิษที่เป็นสาเหตุของโรคคือ สาร IAA และ PAA ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อเตรียมสารพิษ IAA และ PAA สำหรับการทดลองกับเนื้อเยื่อเปล้าน้อยต่อไป

3.2.1 การตรวจสอบการสร้างสาร IAA และ PAA โดยเชื้อรา *Glomerella cingulata*

จากการนำสารสกัดจากเชื้อราจากข้อ 2.5 ความเข้มข้น 644.52 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำเลี้ยงเชื้อรา จำนวน 5 ไมโครลิตร มาตรวจหาสาร IAA และ PAA ที่มีอยู่ในสารสกัดจากเชื้อรา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน IAA และ PAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย HPLC ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของเพชรรัตน์และคณะ (2542) พบว่า พีคของสารมาตรฐาน IAA มีค่า retention time ประมาณ 13 นาที และสารมาตรฐาน PAA มี ประมาณ 9 นาที (รูปที่ 2) และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ IAA และ PAA โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงในภาคผนวก ง ตามวิธีการทดลองข้อ 2.6 พบว่ามีสาร IAA 2.85 และสาร PAA 32.55 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata*

ก. สารสกัดจากเชื้อราเข้มข้น 644.52 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา

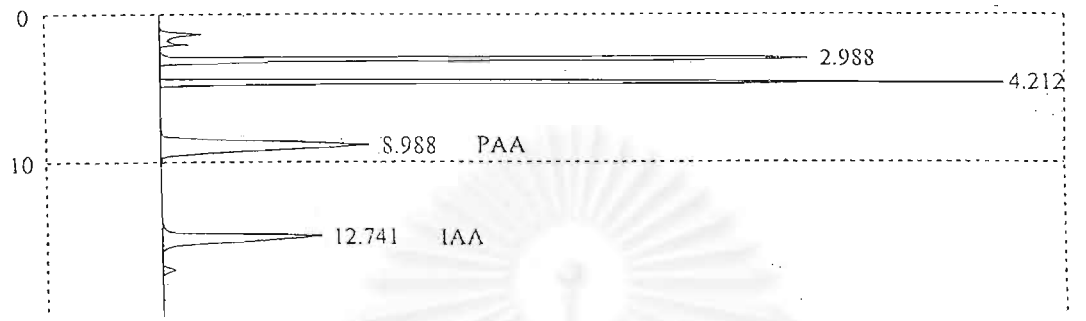
ข. สารสกัดจากเชื้อราเข้มข้น 644.52 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา ที่เติม IAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารสกัดจากเชื้อราเข้มข้น 644.52 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา ที่เติม PAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

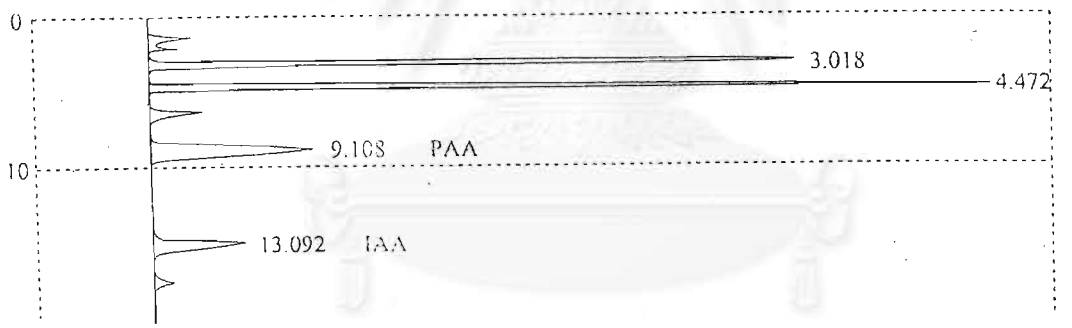
3.2.2 เปรียบเทียบปริมาณการสร้างสาร IAA และ PAA โดยเชื้อรา *Glomerella cingulata* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium และ Richard's Medium

จากการศึกษาของ Naik และคณะ (1989) พบว่า เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถผลิตสารพิษได้มากที่สุดในอาหาร Richard's Medium (ภาคผนวก ข-5) ส่วน Hirota และคณะ (1993) ได้รายงานว่าอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราชนิดดังกล่าวเพื่อสร้างสารพิษคืออาหาร Czapek's Dox Medium ที่เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ yeast extract (ภาคผนวก ข-4) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการสร้างสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata* จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น เพื่อเลือกชนิดอาหารที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ในงานทดลองนี้ ได้นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เตรียมไว้จากวิธีทดลองข้อ 2.4.3 มาถ่ายลงเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการข้อ 2.4.4 จากนั้นถ่ายหัวเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเพื่อผลิตสารพิษทั้ง 2 ชนิด ตามวิธีการทดลองข้อ 2.4.5 และนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารพิษในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลอง 2.6 ด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) พบว่าสารสกัดจากเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร Czapek's Dox Medium ที่เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ yeast extract มี IAA 0.004 และ PAA 1.58 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา ส่วนสารสกัดจากเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร Richard's Medium มี IAA 0.003 และ PAA 0.046 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา (รูปที่ 3 และ 4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงในอาหาร Czapek's Dox Medium ที่เติม Yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงในอาหาร Richard's Medium

3.3 ผลของสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ต่อการเจริญของแคลลัสและยอด

3.3.1 ผลการศึกษาสารมาตรฐาน IAA และ PAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของแคลลัสเปล้าน้อย

Hirota และคณะ (1993) รายงานว่าสาร IAA และ PAA ที่เชื้อรา *Glomerella cingulata* สร้างขึ้น เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในต้นชา ในงานทดลองนี้จึงได้ทำการทดลองหาสาเหตุการตายของแคลลัส ว่ามาจากสารใดระหว่าง สาร IAA, สาร PAA หรือเป็นการทำงานร่วมกันของสารทั้ง 2 ชนิด โดยทำการทดสอบแคลลัสด้วยสารมาตรฐาน IAA และ PAA ที่ความเข้มข้นตามข้อ 2.7.1 ทั้งนี้เพื่อหาความเข้มข้นของสารพิษที่มีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย โดยเติมสารมาตรฐาน IAA และ PAA ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแคลลัส ในข้อ 2.3.2 จากนั้นประเมินผลตามเปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อ ตามรูปในภาคผนวก ค วางแผนการทดลองแบบ CRD 25 ซ้ำ พบว่า สารมาตรฐาน IAA มีผลต่อการตายของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สารมาตรฐาน PAA มีผลต่อการตายของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสารทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์เสริมกันในการทำให้แคลลัสตายอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) โดยแคลลัสเริ่มเกิดอาการฉ่ำน้ำและตายในที่สุด (รูปที่ 5)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยระดับการตายของแคลลัส[1/]ภายหลังจากการเลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารมาตรฐาน IAA และ PAA เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้นของของสารมาตรฐาน	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน IAA (ppm)						
PAA (ppm)	0	5	10	15	20	25	ค่าเฉลี่ย
0	1.00b[2/]	1.48a	1.60ab	1.72a	1.84bc	1.84b	1.58
5	1.48a	1.60a	1.63b	1.84a	1.60c	2.20a	1.68
10	1.52a	1.60a	1.60ab	1.72a	1.84bc	1.96b	1.71
15	1.36a	1.72a	1.72a	1.72a	2.20a	2.20a	1.82
20	1.48a	1.48a	1.60b	1.72a	1.72bc	1.72b	1.62
25	1.60b	1.60a	1.60ab	1.60a	1.96ab	2.20a	1.76
ค่าเฉลี่ย	1.41	1.58	1.58	1.72	1.86	2.02	1.69
CV (%)							30.2
Lsd 0.01 IAA							**
Lsd 0.01 PAA							**
Lsd 0.01 IAAxPAA							**

[1/] จัดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส โดยแบ่งออกเป็น 4 ระดับ

1 = เนื้อเยื่อตาย 0 - 25%

2 = เนื้อเยื่อตาย 26- 50%

3 = เนื้อเยื่อตาย 51- 75%

4 = เนื้อเยื่อตาย 76-100%

[2/] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % โดยใช้วิธี DMRT

รูปที่ 5 แสดงอาการจ๋ำน้ำและกลายเป็นสีน้ำตาลของแคลลัสเปล้าน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 ผลของสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของแคลลัสเปล้าน้อย

เพื่อศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสเปล้าน้อยในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้แคลลัสเปล้าน้อยที่ได้จากการชักนำปล้องบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เป็นแคลลัส เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตรเต็มที่เติมสารสกัดเชื้อราที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (มี IAA 2.22, PAA 25.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ), 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (มี IAA 4.43, PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ), 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (มี IAA 66.45, PAA 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ), 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (มี IAA 8.86, PAA 101 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ), 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (มี IAA 11.10, PAA 126.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ) และ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (มี IAA 13.29, PAA 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ control คือ อาหารสูตรชักนำแคลลัสที่ไม่เติมสารสกัดเชื้อรา แล้วนำไปบ่มในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลโดยสังเกตอัตราการตายของเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบ CRD 30 ซ้ำ พบว่า การเพาะเลี้ยงแคลลัสในช่วง 3 สัปดาห์แรก แคลลัสก็มีลักษณะผิดปกติ คือ เกิดอาการฉ่ำน้ำ และกลายเป็นสีน้ำตาล โดยพบว่า สารสกัดจากเชื้อราที่มี IAA ตั้งแต่ 8.86 และ PAA ตั้งแต่ 101 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นไป แคลลัสตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำการเก็บผลเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า แคลลัสสามารถทนต่อสารสกัดจากเชื้อราที่มี IAA สูงสุด 66.45 และ PAA สูงสุด 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส[1/] เปล้าน้อยภายหลังการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา[2/]ในความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
MS+ NAA 2 ppm+BA 0.2 ppm (CONTROL)	0
MS+ NAA 2 ppm+BA 0.2 ppm +สารสกัดเชื้อรา 500 ppm	55
MS+ NAA 2 ppm+BA 0.2 ppm +สารสกัดเชื้อรา 1,000 ppm	78
MS+ NAA 2 ppm+BA 0.2 ppm +สารสกัดเชื้อรา 1,500 ppm	94
MS+ NAA 2 ppm+BA 0.2 ppm +สารสกัดเชื้อรา 2,000 ppm	100
MS+ NAA 2 ppm+BA 0.2 ppm +สารสกัดเชื้อรา 2,500 ppm	100
MS+ NAA 2 ppm+BA 0.2 ppm +สารสกัดเชื้อรา 3,000 ppm	100

[1/] เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส โดยแบ่งออกเป็น 4 ระดับ (ภาคผนวก ค)

1 = เนื้อเยื่อตาย 0 - 25%

2 = เนื้อเยื่อตาย 26 - 50%

3 = เนื้อเยื่อตาย 51 - 75%

4 = เนื้อเยื่อตาย 76 -100%

[2/]สารสกัดจากเชื้อรา 500 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 2.22, PAA 25.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 4.43, PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 6.65, PAA 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 8.86, PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 11.10, PAA 126.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 13.29, PAA151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.3.3 ผลของสารสกัดจากเชื้อราต่อการเจริญของยอดเปล้าน้อย

เพื่อศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยอดเปล้าน้อยในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ยอดเปล้าน้อย ที่ได้จากการชักนำปล้องเปล้าน้อยบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาล ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นย้ายลงบนอาหารสูตรเดิม ที่เติมสารสกัดเชื้อราที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 2.22, PAA 25.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ), 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 4.43, PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ), 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 66.45, PAA 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ), 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 8.86, PAA 101 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ), 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 11.10, PAA 126.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ) และ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 13.29, PAA 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ control คือ อาหารสูตรชักนำยอดที่ไม่เติมสารสกัดเชื้อรา แล้วนำไปบ่มในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลโดยสังเกตอัตราการตายของยอด วางแผนการทดลองแบบ CRD 30 ซ้ำ พบว่าสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากเชื้อราที่มี IAA เข้มข้น 8.86 และ PAA ตั้งแต่ 101 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อขึ้นไป ยอดจะเกิดอาการใบหลุดร่วงและตายในที่สุดภายใน 1 สัปดาห์แรก (รูปที่ 6) เมื่อบันทึกผลเป็นเวลา 2 เดือน พบว่ายอดเปล้าน้อยสามารถต้านทานต่อสารสกัดเชื้อราที่มี IAA เข้มข้นสูงถึง IAA สูงสุด 66.45 และ PAA สูงสุด 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

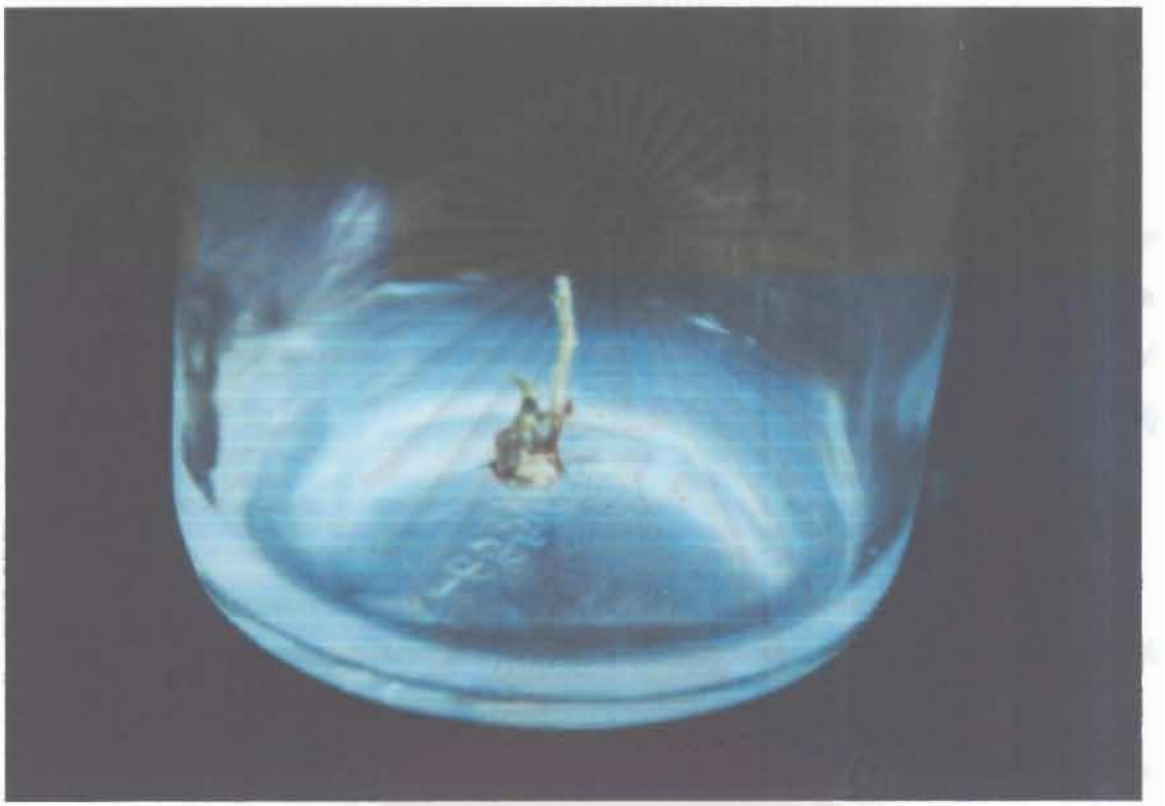
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของยอดเปล้าน้อยภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา[1/]ในความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

สูตรอาหาร	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
MS+BA 1 ppm (CONTROL)	0
MS+BA 1 ppm +สารสกัดจากเชื้อรา 500 ppm	50
MS+BA1 ppm +สารสกัดจากเชื้อรา 1,000 ppm	75
MS+BA1 ppm +สารสกัดจากเชื้อรา 1,500 ppm	88
MS+BA1 ppm +สารสกัดจากเชื้อรา 2,000 ppm	100
MS+BA1 ppm +สารสกัดจากเชื้อรา 2,500 ppm	100
MS+BA1 ppm +สารสกัดจากเชื้อรา 3,000 ppm	100

[1/]สารสกัดจากเชื้อรา 500 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 2.22, PAA 25.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 4.43, PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 6.65, PAA 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 8.86, PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 2,500 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA11.10, PAA 126.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 13.29, PAA151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเนื้อเยื่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงอาการหลุดร่วงของใบเมื่อยอดได้รับสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (มี IAA 8.86 และ PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)

3.4 การคัดเลือกแคลลัสและยอดของเปล้าน้อยที่ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น

3.4.1 ชักนำแคลลัสเปล้าน้อยให้ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น

นำแคลลัสที่รอดตายจากการทดลองข้อ 3.3.2 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS สูตรชักนำแคลลัสเพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและเป็นการพักฟื้นจากการได้รับสารสกัดจากเชื้อรา เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงอาหารสูตรเดิมที่ เติมสารสกัดเชื้อรา ความเข้มข้นสูงขึ้น จากเดิม 2 เท่า (จากการทดลองที่ 3.3.2) เพื่อชักนำให้แคลลัสให้ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นสูง ดังนี้

1. อาหารชักนำแคลลัสไม่เติมสารสกัดจากเชื้อรา (control)
2. อาหารชักนำแคลลัสที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 4.43 และ PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
3. อาหารชักนำแคลลัสที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 8.86 และ PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
4. อาหารชักนำแคลลัสที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 13.29 และ PAA 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
5. อาหารชักนำแคลลัสที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 17.69 และ PAA 202.01 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 30 ซ้ำ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า แคลลัสของเปล้าน้อยสามารถต้านทานต่อสารพิษได้สูงขึ้น คือ สามารถรอดตายในอาหารที่เติมสารสกัดจากเชื้อราที่มี IAA 8.86 และ PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายคิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสเปล้าน้อย[1/]ภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา[2/]ในความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
0	0
1,000	62
2,000	91
3,000	100
4,000	100

[1/] เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัส โดยแบ่งออกเป็น 4 ระดับ (ภาคผนวก ค)

1 = เนื้อเยื่อตาย 0 - 25%
2 = เนื้อเยื่อตาย 26 - 50%
3 = เนื้อเยื่อตาย 51 - 75%
4 = เนื้อเยื่อตาย 76 -100%

[2/]สารสกัดจากเชื้อรา1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 4.43, PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารสกัดจากเชื้อรา 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 8.86, PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารสกัดจากเชื้อรา 3,000มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 13.29, PAA 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารสกัดจากเชื้อรา 4,000มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 17.69, PAA 202.01 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 ชักนำยอดเปล้าน้อยให้ต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น

นำยอดเปล้าน้อยที่รอดตายจากการทดลองข้อ 3.3.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS สูตรชักนำยอด เพื่อเป็นการพักฟื้นจากการรับสารสกัดจากเชื้อราเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงอาหารแข็งสูตรเดิมที่เติมสารสกัดเชื้อราในความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่าจากความเข้มข้นในการทดลองข้อ 3.3.3 ดังนี้

1. อาหารชักนำยอดที่ไม่เติมสารสกัดจากเชื้อรา
2. อาหารชักนำยอดที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 4.43 และ PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
3. อาหารชักนำยอดที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 8.86 และ PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
4. อาหารชักนำยอดที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 13.29 และ PAA 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
5. อาหารชักนำยอดที่เติมสารสกัดของเชื้อราความเข้มข้น 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (IAA 17.69 และ PAA 202.01 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 30 ซ้ำ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่ายอดเปล้าน้อยสามารถต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราได้สูงขึ้น โดยสามารถต้านทานต่อสารสกัดเชื้อรา ที่มี IAA สูงถึง 8.86 และ PAA สูงถึง 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ คิดเป็น 92 เปอร์เซ็นต์การตาย (ตารางที่ 5)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตายของยอดเปล้าน้อยภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา[1/]ในความเข้มข้นที่สูงขึ้นเป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
0	0
1,000	54
2,000	92
3,000	100
4,000	100

[1/]สารสกัดจากเชื้อรา1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 4.43, PAA 50.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 8.86, PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 13.29, PAA 151.50 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ
สารสกัดจากเชื้อรา 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมี IAA 17.69, PAA 202.01 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์

เนื่องจากมีรายงานของ Naik และคณะ (1989) ว่า เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสารพิษได้ดีในอาหารสูตร Richard 's Medium ขณะที่ Hirota และคณะ (1993) ได้รายงานไว้เช่นกันว่า อาหารเหลวสูตร Czapek's Dox Medium ที่เติม yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเสร้างสารพิษของเชื้อราดังกล่าว จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าในอาหารสูตร Czapek's Dox Medium ที่เติม yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา สามารถผลิตสาร IAA และ PAA เท่ากับ 0.004. และ 1.58 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่า เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารสูตร Richard's Medium ที่สามารถผลิต IAA และ PAA ได้เพียง 0.003 และ 0.046 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา ตามลำดับ ในการทดลองต่อมาเพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเชื้อราจึงเลือกที่จะใช้อาหารสูตร Czapek's Dox Medium ที่เติม yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในการเลี้ยงเชื้อรา *Glomerella cingulata* เพื่อสร้างสารพิษ

Hirota และคณะ (1993) พบว่า เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสารพิษ IAA และ PAA มีผลทำให้เกิดอาการใบไหม้ในต้นชา และต่อมาชลิดาและนลิน (2541) ได้พบว่าเชื้อราดังกล่าวเป็นสาเหตุในการเกิดใบจุดในเปล้าน้อย และเพชรรัตน์และคณะ (2542) ได้รายงานว่าอาการของโรคใบจุดในเปล้าน้อยนั้นเกิดจากสารพิษที่เชื้อราสาเหตุผลิตขึ้น ในสารพิษนี้ตรวจพบทั้งสาร IAA และ PAA งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบโดยใช้สารมาตรฐาน IAA และ PAA กับแคลลัสของ เปล้าน้อยเพื่อหาสาเหตุของการตายของเนื้อเยื่อว่า มาจากสาร IAA หรือ PAA หรือเกิดจากการทำงานร่วมของสารทั้ง 2 ชนิด จากการทดลองพบว่าทั้ง IAA และ PAA มีผลต่อการตายของเนื้อเยื่อ นอกจากนั้นสารทั้ง 2 ชนิด ยังมีผลเสริมความเป็นพิษเมื่อใช้ร่วมกัน ดังผลการทดลองในตารางที่ 1 และ ภาคผนวก ฉ

สาร IAA และ PAA ที่พบในสารสกัดจากเชื้อราดังกล่าวนี้จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่พืชสามารถสร้างเองตามธรรมชาติ หรือเรียกอีกอย่างว่า ฮอร์โมนพืช มีคุณสมบัติในการควบคุมการขยายตัวของเซลล์ การเติบโตของใบ การติดผล การเกิดตา (พีรเดช, 2529) ในการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวนั้น จะขึ้นอยู่กับสมดุลย์ของระดับความเข้มข้นของสารภายในเซลล์พืช กล่าวคือ ออกซินเป็นฮอร์โมนพืชที่มีสามารถทำงานได้ผลมาก แม้ว่าจะมีอยู่ในระดับต่ำก็ตาม ก็สามารถส่งผลให้เกิดขบวนการเมตาโบลิซึมต่างๆ ของสารอื่นๆ ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าเป็นพันเท่าได้ กลไกการทำงานของออกซินนั้น เกิดขึ้นได้โดยเซลล์ที่ได้รับฮอร์โมนออกซินจะปลดปล่อย H^+ เข้าไปที่ผนังเซลล์ที่ปกคลุมเซลล์นั้น และ H^+ เหล่านี้จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง ก่อให้เกิดการคลายตัวของผนังเซลล์ เกิดการเพิ่มขนาดของเซลล์ การคลายตัวที่เกิดขึ้นเพราะ ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำนั้นจะมีผลไปกระตุ้นเอนไซม์ ซึ่งจะไปแยกสลายพันธะของ polysaccharides ในผนังเซลล์ที่จำกัดการขยายขนาดของเซลล์โดยไม่คำนึงถึงกลไกการคลายตัว ทำให้เซลล์เกิดการขยายตัวอย่างรวดเร็วภายใต้อิทธิพลของแรงเต่ง (Peter, 1995) จากผลการทดลองจึงเห็นได้ว่า แคลลัสและยอดเปล้าน้อยตายเนื่องจากออกซินซึ่งได้รับมาจากสารพิษที่เชื้อราผลิต มีผลทำให้เกิดความไม่สมดุลย์ภายในเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์บริเวณนั้นบางลง และตายในที่สุด ส่งผลให้เกิดอาการตายของเนื้อเยื่อ

จากการทดลองในการชักนำให้แคลลัสและยอดเปล้าน้อยให้มีความต้านทานต่อสารสกัดของเชื้อรา *Glomerella cingulata* โดยเริ่มทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่เติมสารสกัดจากเชื้อราความเข้มข้นระดับต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารพิษ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมี IAA 6.645 PAA 75.75 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าจากเดิมแคลลัสและยอดเปล้าน้อยจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายต่ำที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายคิดเป็น 94 และ 88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จึงได้นำแคลลัสและยอดที่รอดตายมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อราเป็น 2 เท่า พบว่า ทั้งแคลลัสและยอดมีความต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราสูงขึ้น คือ สามารถรอดชีวิตในอาหารที่มีสารสกัดจากเชื้อรา 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมี IAA และ PAA สูงถึง 8.86 และ 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายคิดเป็น 91 และ 92 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

กรณีที่เนื้อเยื่อสามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้บนอาหารที่มีสารพิษนั้น อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการที่เซลล์ของเนื้อเยื่อดังกล่าวสร้างกลไกบางอย่างออกมาต้านทานสารพิษ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Batchvarova (1992) ซึ่งได้ทดสอบสารพิษ cercosporin จากเชื้อรา *Cercospora orazae* พบว่าในเซลล์ที่ต้านทานต่อสารพิษนั้น มีการสร้าง caroteniod ขึ้นมาทำให้เซลล์พืชมีความต้านทานและ สามารถทำลายสารพิษได้ สำหรับกรณีของเปล้าน้อย กลไกการต้านทานสารพิษเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่ควรจะมีการศึกษาต่อไป

จากการวิจัยครั้งนี้ทำให้เกิดยอดเปล้าน้อยที่สามารถต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราสูงขึ้นเป็นจำนวน 8 ยอด จากนั้นได้นำไปทำการทดสอบความต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อรา โดยนำลงเลี้ยงในความเข้มข้นเดิม (2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมี IAA และ PAA อยู่ 8.86 และ 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตามลำดับ) ซึ่งผลปรากฏว่ายอดสามารถต้านทานต่อสารสกัดจากเชื้อราได้จริง ในการศึกษาในครั้งต่อไปจึงควรนำเอายอดดังกล่าวนี้ไปชักนำให้เป็นเป็นต้นและลงปลูกในสภาพปกติ เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เปล้าน้อยให้ต้านทานต่อสารสกัดที่เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดสร้างขึ้น ซึ่งจะได้ต้านทานต่อโรคด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสารสกัดจากเชื้อรา *Glomerella cingulata* สาเหตุโรคใบจุดเปล้าน้อยที่มีต่อการเจริญของแคลลัสและยอดเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. เชื้อรา *Glomerella cingulata* สามารถสร้างสปอร์ได้ปริมาณสูงสุด ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตร Czapex's Agar มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 1,300 x 10^4 สปอร์ต่อหลอดอาหารวุ้นเอียง

2. เชื้อรา *Glomerella cingulata* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Czapek's Dox Medium ที่เติม yeast extract 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างสารพิษได้มากกว่า เชื้อราที่เลี้ยงในอาหารสูตร Richard's Medium โดยผลิต IAA ได้ 0.004 และ PAA ได้ 1.58 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา ขณะที่ในอาหารสูตร Richard's Medium เชื้อราผลิต IAA ได้ 0.003 และ PAA ได้ 0.046 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา

3. สาร IAA และ PAA มีผลต่อการตายของแคลลัสและยอดของเปล้าน้อย เมื่อใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่ง และเมื่อใช้ร่วมกัน จะมีผลเสริมความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเมื่อใช้ร่วมกัน

4. แคลลัสและยอดเปล้าน้อยที่ผ่านการชักนำให้ต้านทานต่อสารสกัดเชื้อรา สามารถเจริญและรอดชีวิตได้ในอาหารผสมสารสกัดจากเชื้อราในความเข้มข้นที่สูงขึ้นได้ถึง 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมี IAA 8.86, PAA 101.00 มิลลิกรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชลิดา เล็กสมบรูณ์ และ นลิน นิลอุบล. 2540. โรคใบจุดของพืชสมุนไพรไทย " เปล้าน้อย". หน้า 413-417. การ ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 35. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชลิดา เล็กสมบรูณ์ และ วีระเดช สุขเอียด. 2541. การขยายพันธุ์ต้นเปล้าน้อยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนยอด. สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ณรงค์ เพ็งปรีชา. 2530. เปล้าน้อย. วนสาร 45(2). 181 หน้า

ธนาสาร ขาวสอาด. 2542. การเกิดโรคใบจุดของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) โดย *Glomerella cingulata* และผลกระทบต่อปริมาณสารเปลาโนทอลในใบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต.

พร้อมจิตร ศรลัมพ์. 2537. สมุนไพรกับระบบทางเดินอาหาร. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. 2537. สมุนไพรก้าวใหม่. สำนักพิมพ์เมดิคัลมีเดีย. กรุเทพมหานคร.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอร์โมนและสารสังเคราะห์แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: หจก. ไดนามิคการพิมพ์ 196หน้า.

เพชรรัตน์ จันทรทิณ. 2537. การพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคใบไหม้โดยใช้สารพิษร่วมกับเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

เพชรรัตน์ จันทรทิณ และคณะ. 2542. การคัดเลือกเปล้าน้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ต้านทานต่อสารพิษของเชื้อรา *Glomerella cingulata*. ทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุนทรี สิงหบุตร. 2535. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. บริษัท คุณ 39 จำกัด.

สุนีย์ องอาจวาณิชย์และคณะ. 2535. ความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์สาร IAA ต่อการเลื้อยของหอมหัวใหญ่ที่เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 35 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อพัชชา วงศ์เจริญสถิตย์. 2537. การวิเคราะห์ปริมาณสารเปลาโนทอลที่ได้จากใบและเนื้อเยื่อของเปล้าน้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Amolik, N.,J. G. Dickson and A. D. Dickson. 1959.Deterioration of barley in storage by microoganism. Phytopathology. 49: 475-461.

Batchvarova, R. B., V. S. Reddy and J. Benett. 1992. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. Phytopathology. 82: 642-646.

Bilgram, K., and Dube, H. C. 1976 A text book of modern plant pathology. New Delhi: Vikas Publishing House PVT.

Carlson, P. S. 1973. Methaionine sulfoximine-resistance mutants of tobacco. Science. 180: 1366-1368.

Darren R. Krause, Christopher J. Wood and Donald J. Maclean. 1991. Glucoamylase (exo-1, 4-∝- D-glucan glucanohydrolase, E(3.2.1.3) is the major start-degrading enzyme secreated by the phytopathogenic fungus *Collectotrichum gloeosporioides*. Journal of General Microbiology. Printed in Great Britain. 137: 2463-2468.

Dennis, Z. G. 1968. British ascomycetes. Cambridge: Cambridge University Press.

Dickens, J. S. W., and Cook, R. T. A. 1989. *Glomerella cingulata* on Camallia. Plant Path. 38: 75-85.

Eeuwens, C. J. 1979. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palm (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 36: 23-28

Freeman, S., and Katan, T. 1997 Identification of *Collectotricum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. Phytopathology. 87: 516-521.

Gamborg, O' L'. 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension. Plant Physiol. 45: 372-375.

Haberlandt, C. 1902. Culturversuche mit isolicrten. Pflanzellen Sitz-Ber. Mat-Nat Kl. Kais Akad. Wiss-wien. 111: 69-92.

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

Hildebrant, A. C., A. J. Riker and B. M. Dugger. 1946. The influence of the composition of the medium on growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue culture. Am. J. Bot. 33: 591-597.

Hirota, A., Horikawa, T., and Horikawa, T., Fujiwara, A. 1993 Isolation of phenyl acetic acid and indoleacetic acid from a phytopathologenic fungus, *Glomerella cingulata*. Biosci. Biotech. Biochem. 57(3): 492

Howard, C., and Albregts, E. E. 1984. Anthracnose of strawberry fruit caused by *Glomerella cingulata* in Florida. Plant Dis. 68(9): 824-825.

Jeffiries, P. Dodd, J. C., Jeger, M. J. and Plumbley, R. A. 1990. The biology and control of *Collectotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology. 39: 343-366.

Kawazu, K., Zhang H. and Kanzai H. 1996. Accumulation of benzoic acid in suspension culture cells of *Pinus thunbergii* Parl. In response to phenylacetic acid adminstration. Biosci. Biotect. 60(9): 1410-1412.

Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Am Orchird Soc. Bull. 15: 214-217.

Kumar, P., R. Hauptmann and J. M. Widholm. 1984. Characterization of tobacco x carrot somatic hybrids (abs.). Plant Physiol. 75: 133.

Latham, A. J., and Williams, J. C. 1983. Cultural characteristics and pathogenicity of *Glomerella cingulata* isolates from apples in Alabama. Plant dis. 67: 1065-1068.

Lenne', J. M., Vargade Avarez and J. W. Miles. 1987. Effect of anthracnose and other factors on survival of segregation *Stylosanthes guianesis* population in several pasture environment. Phytopathology. 77: 1730.

Li, M. F., P. C. Ni, Y. Q. Chen and J. H. Chen. 1983. Studies on anther culture for breeding varieties resistant to rice blast. Acta Agron. Sincia. 9: 173-179.

Liyanage, H. D., McMillan, R. T., and Kistler, H. C. 1992. Two genetically distinct population of *Collectotrichum gloeosporioides* from citrus. Phytopathology. 82: 1371-1376.

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

Matsunaga, E., Domethong, C. 1990. Studies on the cultivation of a Thai medicinal plant, Plau-Noi tree (*Croton sublyratus* Kurz.). Japan. J. Trop Agr 34(1): 48-50.

Matsunaga, E., Hirobe, Y., Siriphol M, and Pracone, U.K. 1991. Control of Root Rot and *Amyna Punctum* (Fabricius) Plaunoi (*Croton sublyratus* Kurz.). in the Plantation in Thailand Japan. J. Trop. Agr. 35(4): 273-277.

Morimoto, H., and Murai, F. 1989. The effect of gelling on plaunotol accumulation in callus cultures of *Croton sublyratus* Kurz. Plant Cell Rep. 8: 210-213.

Murashige, and Skoog, F. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco cultures.Physiol Plant 15: 473-497.

Naik, K. S Hiremath, P. C. and Hegde, R. K. 1989. Toxic metabolte production by *Collectotrichum gloeosprioides* causing anthracnose of betelvine.

Naik, K. S Hiremath, P. C. and Hegde, R. K. 1991. Toxic metabolte production by *Collectotrichum gloeosprioides* causing blight of coriander. Karnataka- Journal-of Agriculture Sciences. 4:1-2, 27-31 (CD-ROM). CAB Abstract: UD950316.

Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grain. Science. 163: 85-87.

Patrascu, M., E. Ioan and G. Deculescu. 1981. Production of isogenic lines through anther culture and their utilization in tobacco breeding. Probleme de Genetica Teoretica si Apicata. 13: 387-396.

Peter J. Davies. 1995. Plant Hormone Physiology, Biochemisty and Molecular Biology. Kuwer academic publishers. Nertherlands.

Rup, L. and Sukunya, L. 1990. Cell Selcection and long-term high-frequency regeneration of cereal and legumes. pp. 238-242. In Crop Improvement Utilizing Biotechnology. CRC Press Inc, Boca Ration.

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

Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultivated *in vitro* Sym. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.

Sun, Z. and X. Zheng, K. L 1990. Somaclonal variation in rice, pp. 288-315. In Y.p.s.Baja(ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol II. Springer-Verlag, Berlin.

Sutton, B. C. 1980. The coelomycetes fungi imperfecti with *pycnidia acervuli* and stroma. England: Commonwealth Agricluture Bureaux.

Tsay, H. S., P. C. Lai and L. J. Chen. 1981. Breeding for all male plants through tissue culture in asparagus. Proc.sym. plant breeding Taichung, Taiwan.

Vecker, F. A. 1994. Ontogeny of the ascoma of *Glomerella cingulata*. Mycoogia. 86(1): 82-88.

Wang, J. W. 1986. Studies on the toxin from *Collectotrichum gloeosporioides* injuring olive protoplast. Scientia. Silvae. Siniae 22: 1, 30-37.(CD-ROM). CAB Abstract : UD950201.

Wightman, F., Milborrow, B. V., Purse, J. G. 1975. On the auxin activity of phenylacetic acid. Ann. Bot. 39: 1143-1146.

Wightman, F. and Lighty, D. L. 1982. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. Physiol. Plant. 55: 17-24.

Willson, E. E. 1965. Plantpathologycal histogenesis in olender tumur induce by Psuedomonas savastinoi. Phytopathology. 55: 122-1249.

Zeigler, R. S., L. E. Powell and H. D. Thurston. 1980 Gibberellin A_4 production by *Sphaceloma manihoticola*, causal agent of cassava superlongation disease. Phytopathology. 70: 589-593.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)

ส่วนประกอบ		มิลลิกรัม/ลิตร
ธาตุอาหารหลัก	NH_4NO_3	1,650
(macro element)	KNO_3	1,900
	$CaCl_2.2H_2O$	440
	$MgSO_4.7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
ธาตุอาหารรอง	H_3BO_3	6.2
(micro element)	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4.H_2O$	8.6
	KI	0.83
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
	$CoCl_4.6H_2O$	0.025
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85
	Na_2EDTA	37.25
ธาตุอาหารเสริม	Glycine	2
(organic addenda)	Nicotine acid	0. 5
	Pyridoxine HCl	0.5
	Thiamine HCl	0.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราในงานวิจัย

1. Potato Carrot Agar (PCA)

ส่วนประกอบ

มันฝรั่ง	20 กรัม
แครอท	20 กรัม
ผงวุ้น	20 กรัม
น้ำ D.I	1 ลิตร

2. Potato Dextrose Agar (PDA)

ส่วนประกอบ

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเด็กโทรส	20 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
น้ำ D.I	1 ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Czapek's Agar (CZA)

ส่วนประกอบ

$NaNO_3$	3 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
KCl	0.50 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.50 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01 กรัม
น้ำตาลทราย	30 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม
น้ำ D.I	1 ลิตร

4. Czapek's Dox Medium

ส่วนประกอบ

$NaNO_3$	3 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
KCl	0.50 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.50 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01 กรัม
น้ำตาลทราย	30 กรัม
น้ำ D.I	1 ลิตร

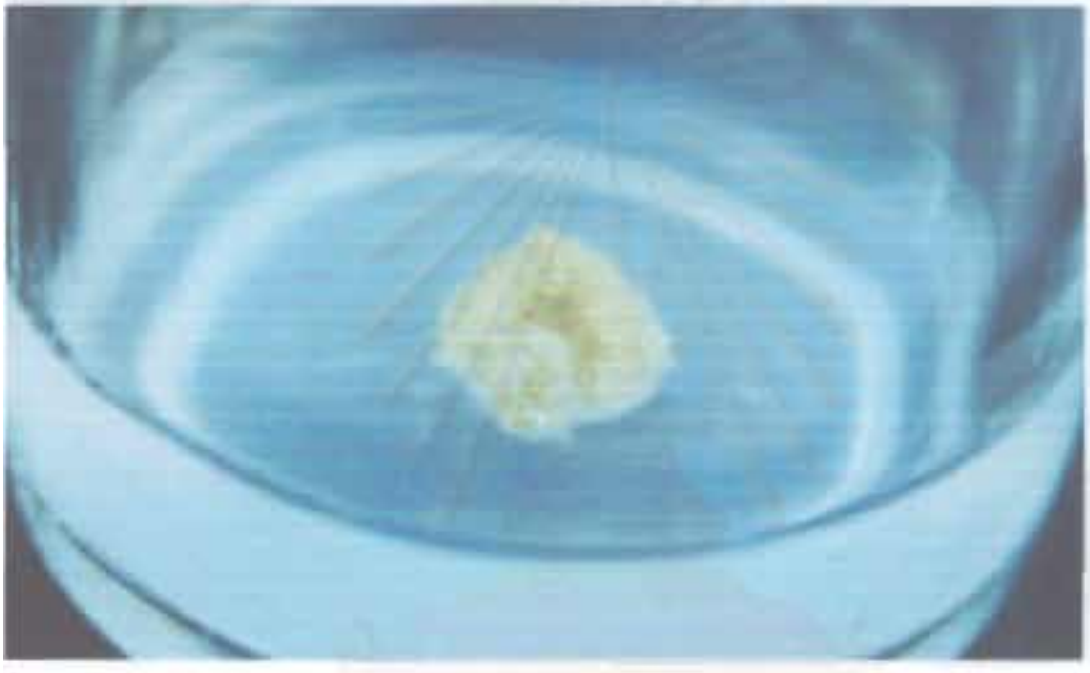
5.Richard's Medium (Armolik, 1959)

ส่วนประกอบ

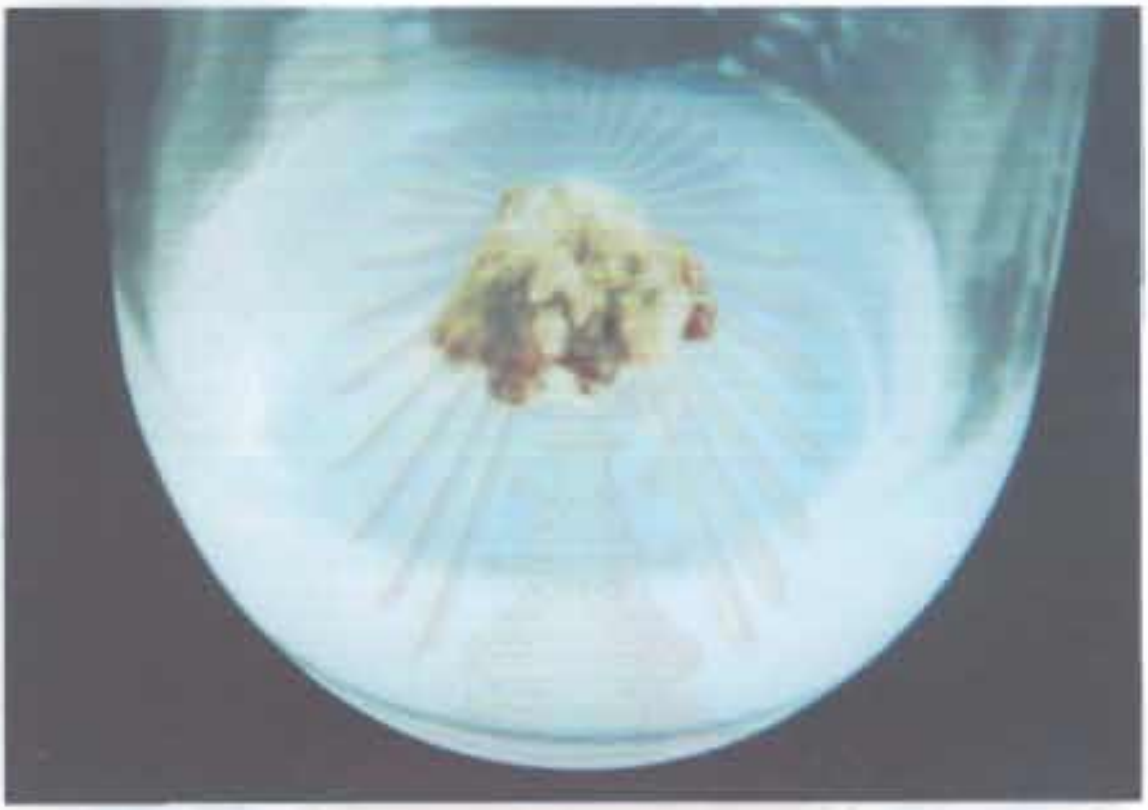
KNO_3	10 กรัม
KH_2PO_4	5 กรัม
$MgSO_4$	2.5 กรัม
$FeCl_3$	0.02 กรัม
น้ำตาลทราย	50 กรัม
น้ำ D.I	1 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

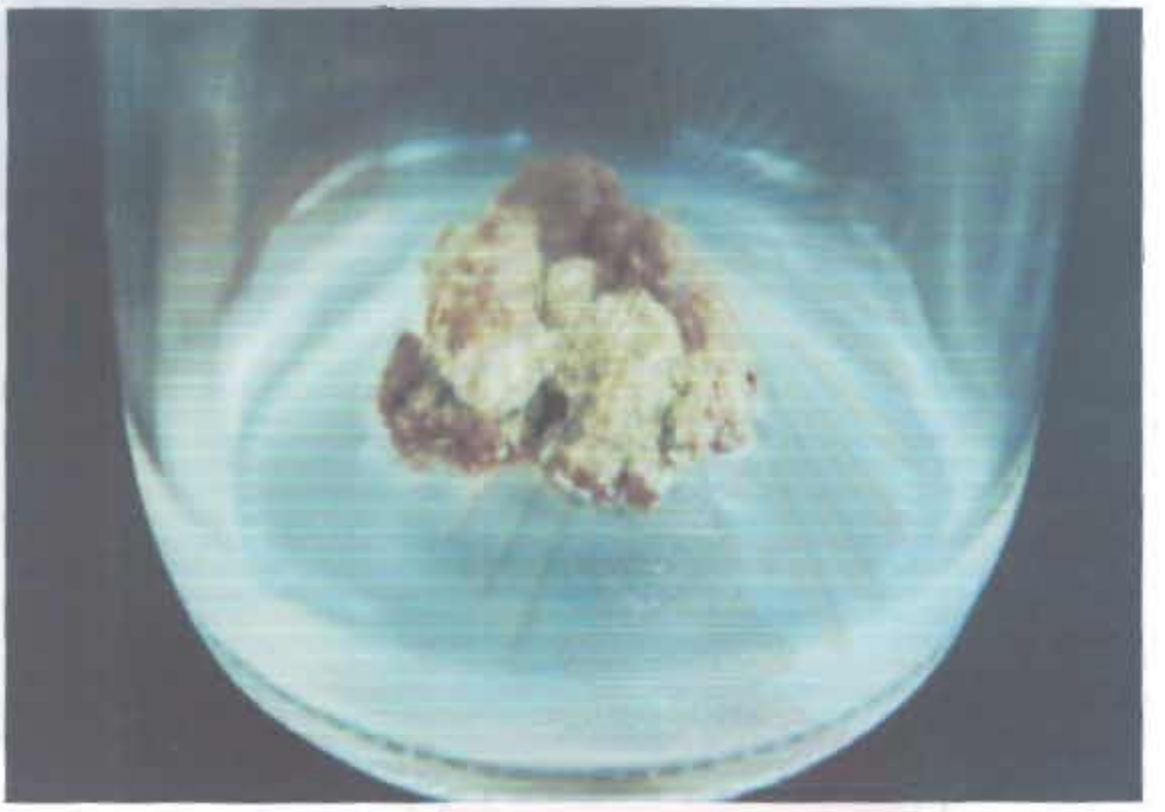
ภาคผนวก ค
เกณฑ์การให้คะแนนการตายของเนื้อเยื่อ



รูปค-1 แสดงอาการตายของแคลลัสที่ระดับ 1 คะแนน

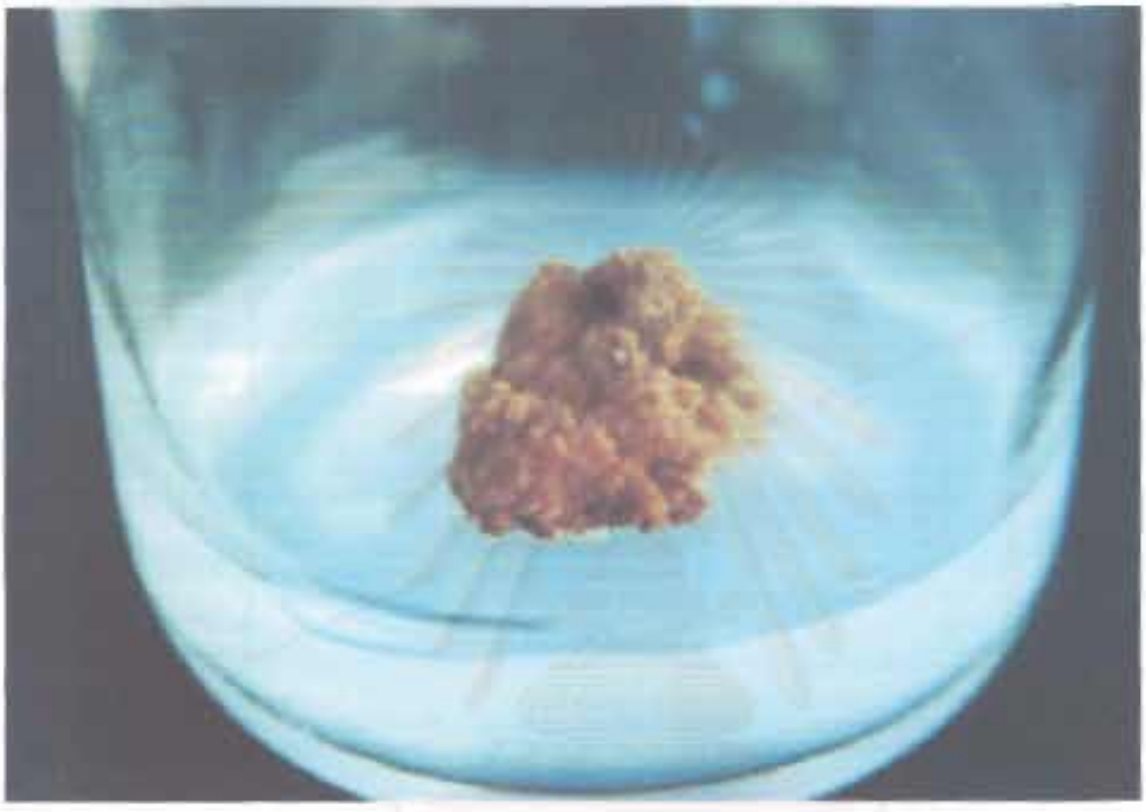


รูปค-2 แสดงอาการตายของแคลลัสที่ระดับ 2 คะแนน



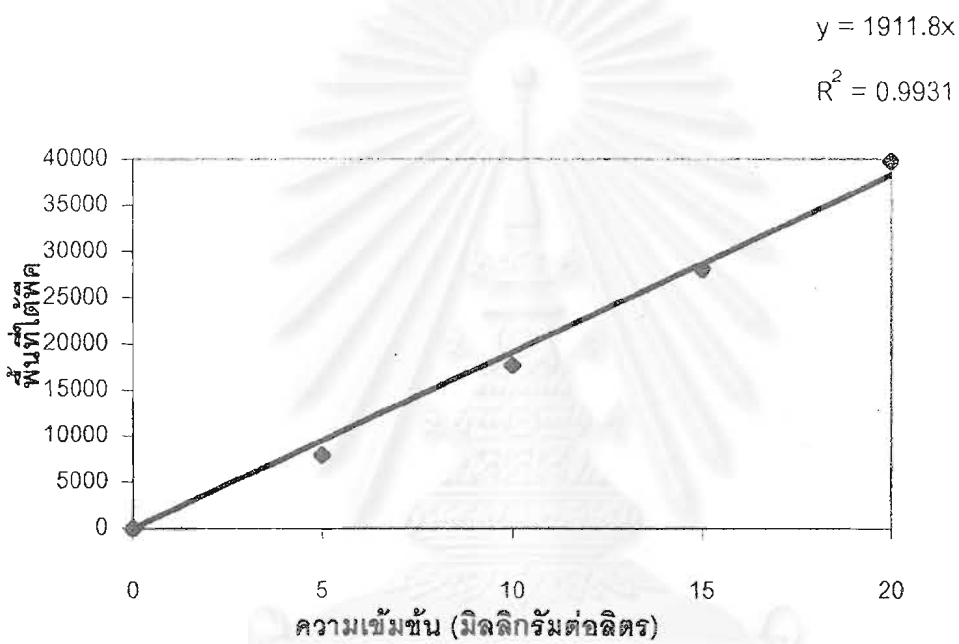
รูปค-3 แสดงอาการตายของแคลลัสที่ระดับ 3 คะแนน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



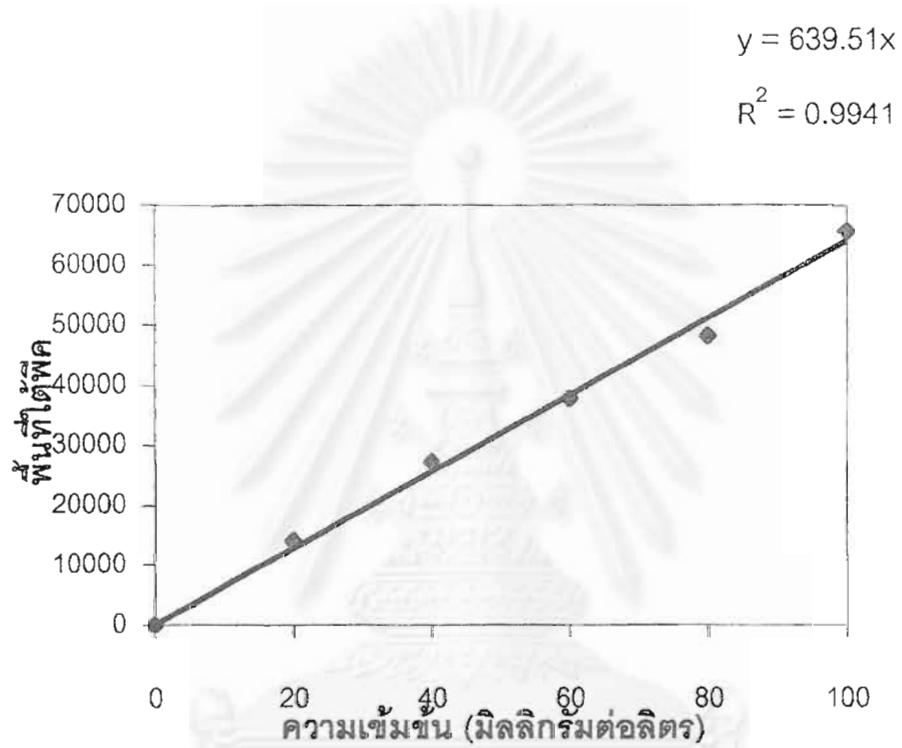
รูปค-4 แสดงอาการตายของแคลลัสที่ระดับ 4คะแนน

ภาคผนวก ง



รูปง-1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Indoleacetic acid

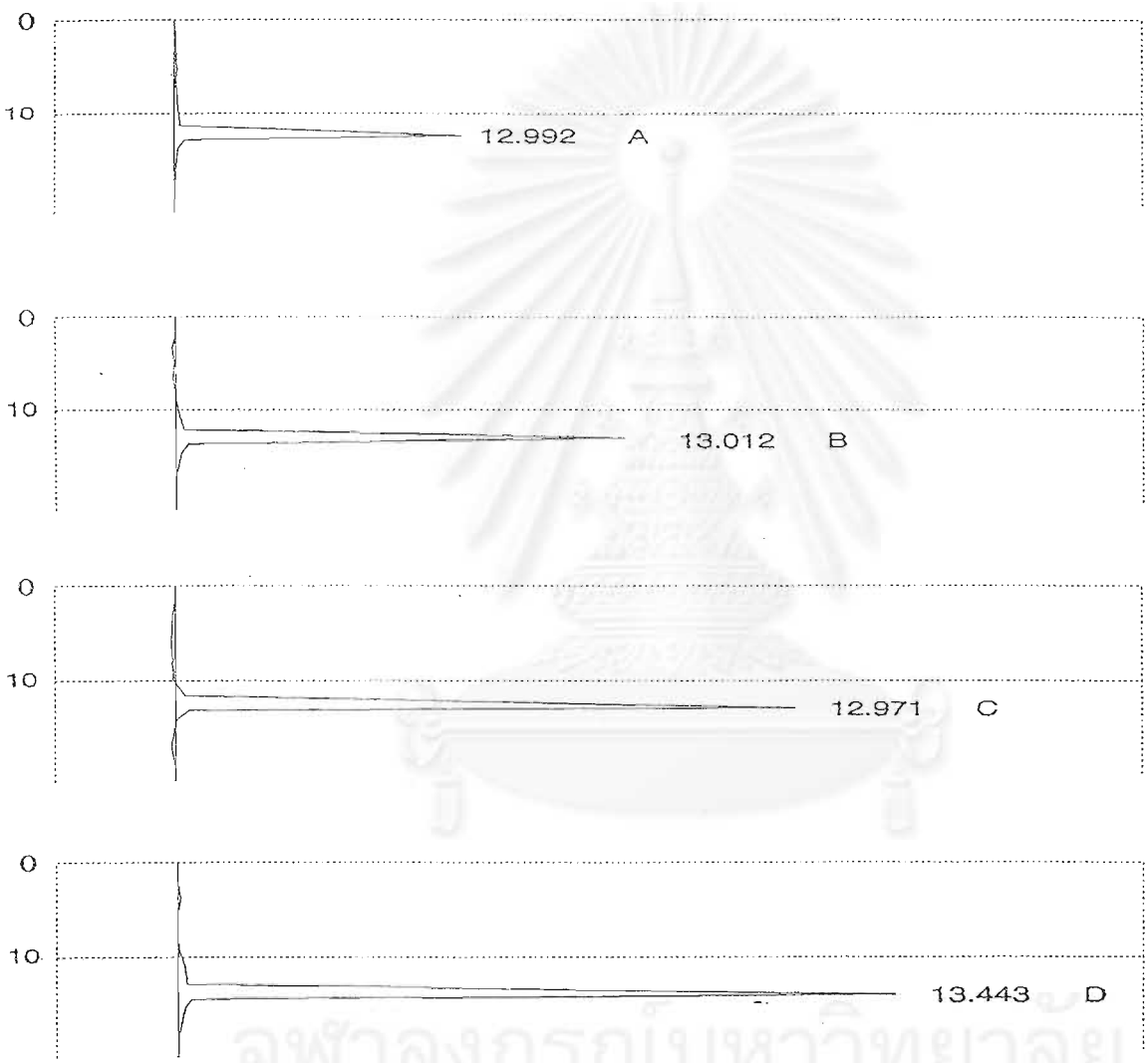
การ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

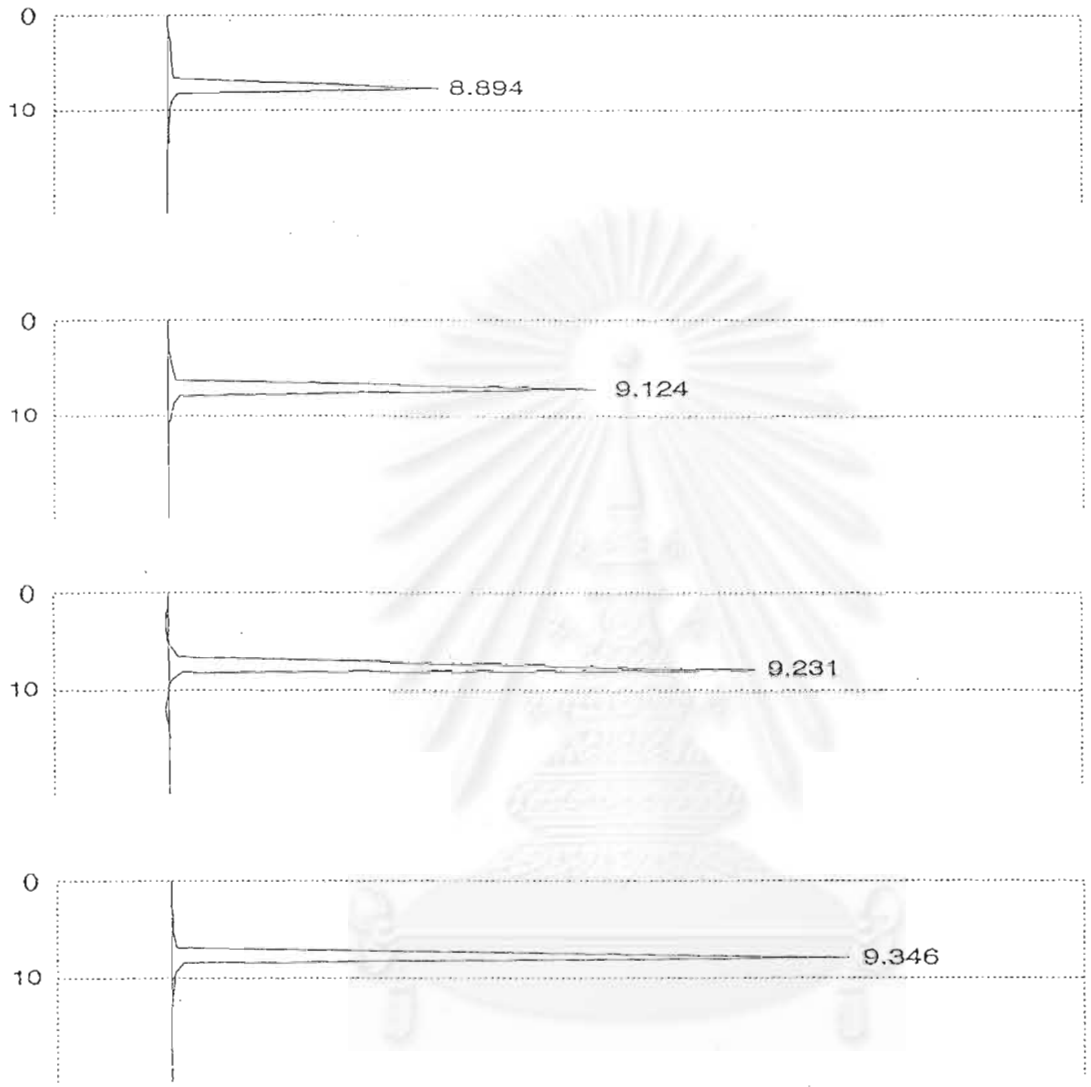
รูปง-2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Phenylacetic acid

ภาคผนวก จ



รูปจ-1 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Indoleacetic acid ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปจ-2 แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Phenylacetic acid ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ
การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตาราง ฉ-1 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของสารมาตรฐาน IAA และ PAA

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION	24	118.33	4.93	18.82**
TREATMENT	35	56.57	1.62	6.17**
IAA	5	36.46	7.29	27.83**
PAA	5	5.86	1.17	4.47**
IAAXPAA	25	14.25	0.57	2.18**
ERROR	840	220.07	0.26	
TOTAL	899	394.97		

CV= 30.2%

** = significant at 1% level

ตารางฉ-2 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของสารมาตรฐาน IAA และ PAA ในสารสกัดจากเชื้อรา 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION	24	13.86	0.58	1.20ns
TREATMENT	35	183.53	5.24	10.93**
IAA	5	134.83	26.97	56.22**
PAA	5	4.07	0.81	1.70ns
IAAXPAA	25	44.63	1.79	3.72**
ERROR	840	402.94	0.48	
TOTAL	899	600.33		

CV= 35.6%

** = significant at 1% level

ns= not significant

ประวัติผู้เขียน

นางสาวศศิ มะลิพันธุ์ เกิดวันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย