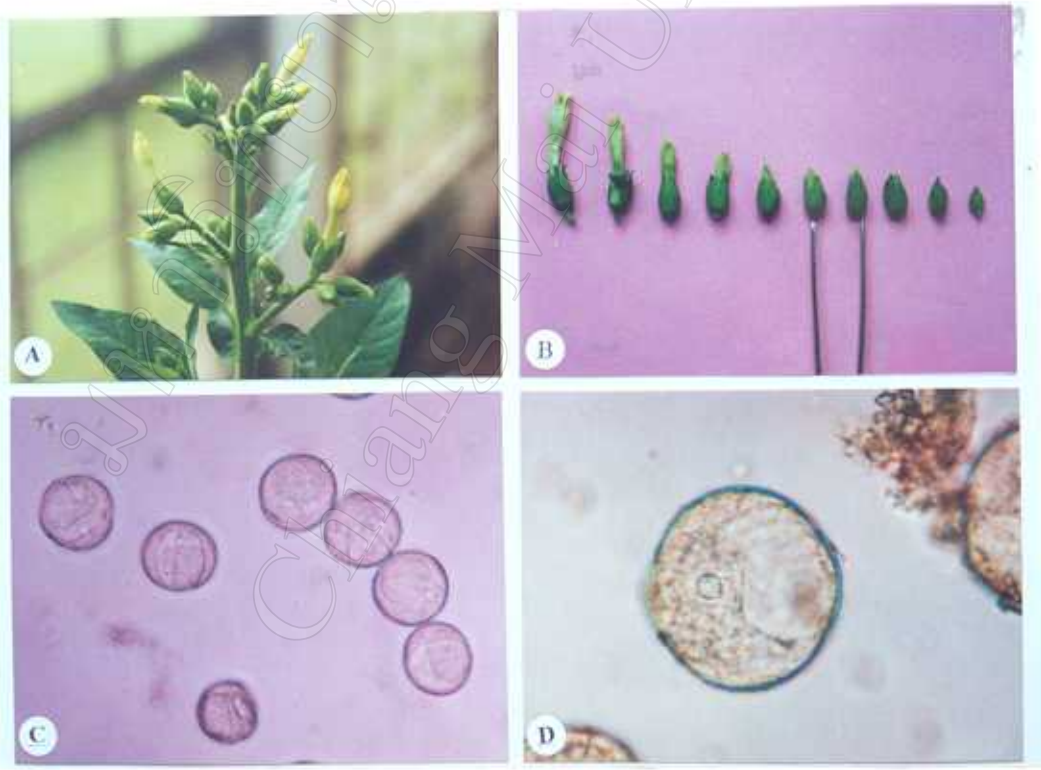
บทที่ 4

ผลการทดลอง

<u>การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc</u>

หลังจากปลูกต้นยาสูบในเรือนทดลองโดยการเพาะเมล็ดจนกระทั่งอยู่ในระยะเริ่มออกดอก (ภาพที่ 1) นำดอกที่ยังตูมและเพิ่งมองเห็นกลีบดอกอยู่เหนือกลีบเลี้ยงมาตรวจสอบระยะการพัฒนาของละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถตรวจพบระยะ uninucleate ที่มองเห็นนิวเคลียสจำนวน 1 อันก่อนที่นิวเคลียสจะมีการแบ่งในขั้นตอนอื่น ๆ ซึ่งระยะดังกล่าวเป็นระยะที่เซลล์มีความสมบูรณ์เต็มที่และละอองเรณูสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด



ภาพที่ 1 การเตรียมดอกยาสูบเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงอับเรณู

A) ช่อดอกยาสูบที่อยู่ในระยะดอกตูม (button stage)

B) ดอกยาสูบที่นำมาเพาะเลี้ยงอับเรณูขนาดที่เพิ่งมองเห็นกลีบดอกอยู่เหนือกลีบเลี้ยง

C) พัฒนาการของละอองเรณูในระยะ uninucleate (20×)

D) พัฒนาการของละอองเรณูในระยะ uninucleate (40×)

1. ผลการศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของต้นอ่อนยาสูบจากอับเรณู

ผลการทดลองเลี้ยงอับเรณูของยาสูบทั้งสองพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์ 2 สูตร คือ NN ที่เติม activated charcoal 2.0% และผสมวุ้น 0.5% กับ MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต ที่ผสมวุ้น 0.7% พบว่า อาหารทั้งสองสูตรให้ผลแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ (ตารางที่ 2) โดยในพันธุ์ TN 90 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด และเปอร์เซ็นต์การสร้างรากในอาหารสูตร NN 46 42 และ 40% ตามลำดับ ในขณะที่ในอาหารสูตร MS มีในอัตรา 6 6 และ 2% ตามลำดับ โดยแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนพันธุ์ Xanthi nc มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน การสร้างยอด และการสร้างรากในอาหารสูตร NN 30 30 และ 28% ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร MS มีในอัตรา 10 10 และ 6% ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน การสร้างยอด และการสร้างรากของอับเรณูยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc บนอาหารสังเคราะห์ 2 สูตร

อาหาร	% การเกิดต้นอ่อน		% การสร้างยอด		% การสร้างราก	
สูตร	TN 90	Xanthi nc	TN 90	Xanthi nc	TN 90	Xanthi nc
1	46.00 a	30.00 a	42.00 a	30.00 a	40.00 a	28.00 a
2	6.00 b	10.00 a	6.00 b	10.00 a	2.00 b	6.00 a
LSD 0.05	21.79	26.94	21.24	26.94	17.10	25.25
0.01	29.85	36.91	29.10	36.91	23.42	34.60

ab ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ LSD เมื่อเปรียบเทียบตัวเลขในสดมภ์เดียวกัน

หมายเหตุ : สูตร 1 : NN + activated charcoal 2.0% + Agar 0.5%

สูตร 2 : free hormone MS + Agar 0.7%

ภาพที่ 2 ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ

A) การพัฒนาเป็นต้นอ่อนบนอาหารสูตร NN + activated charcoal 2.0% + Agar 0.5%

B) การพัฒนาเป็นต้นอ่อนบนอาหารสูตร free hormone MS + Agar 0.7%

C) พัฒนาการของละอองเรณูยาสูบแบบ direct embryogenesis ที่เจริญเป็นต้นเดี่ยว ๆ บนอับเรณู 1 อัน

D) พัฒนาการของละอองเรณูแบบ direct embryogenesis ที่เจริญเป็นกลุ่มต้นอ่อนเล็ก ๆ หลายร้อยต้นบนอับเรณู 1 อัน

2. ผลการตรวจสอบระดับชุดของโครโมโซมของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

2.1 การวัดขนาดของเซลล์ปากใบ และการศึกษาลักษณะในทางเกษตรบางประการ

เมื่อนำต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้ง 2 พันธุ์ มาลอกชั้นผิวใบออกเพื่อศึกษาถึงเซลล์ปากใบโดยการวัดความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบ รวมทั้งการนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบต้นยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะ

เมล็ด (ตารางที่ 3) ผลการทดลองพบว่า ต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้งสองพันธุ์มีความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบต่ำกว่าต้นยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญ โดยในพันธุ์ TN 90 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด มีความกว้างของเซลล์ปากใบ 29.60 และ 46.85 ไมครอน ตามลำดับ ส่วนความยาวของเซลล์ปากใบมี 39.00 และ 56.35 ไมครอน ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด มีความกว้าง 25.40 และ 38.30 ไมครอน ตามลำดับ ส่วนความยาวของเซลล์ปากใบมี 29.95 และ 45.50 ไมครอน ตามลำดับ เมื่อนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ปากใบแล้วก็ให้ผลในลักษณะเดียวกันคือ มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ต่อเซลล์ปากน้อยกว่าต้นยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในพันธุ์ TN 90 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ 20.90 และ 46.60 ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด มีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ 16.60 และ 26.10 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบ และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด

แหล่งยาสูบ	ความกว้างของเซลล์ปากใบ (μ)		ความยาวของเซลล์ปากใบ (μ)		จำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ	
	TN 90	Xanthi nc	TN 90	Xanthi nc	TN 90	Xanthi nc
A	29.60 ± 0.77 b	25.40 ± 1.17 b	39.00 ± 1.00 b	29.95 ± 1.40 b	20.90 ± 1.73 b	16.60 ± 1.26 b
B	46.85 ± 1.73 a	38.30 ± 1.38 a	56.35 ± 2.97 a	45.50 ± 1.39 a	46.60 ± 0.84 a	26.10 ± 2.42 a
LSD 0.05	1.26	1.20	2.08	1.31	1.30	1.80
0.01	1.73	1.65	2.86	1.80	1.80	2.50

ab ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ LSD เมื่อเปรียบเทียบตัวเลขในสดมภ์เดียวกัน

หมายเหตุ : แหล่ง A: ต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

แหล่ง B: ต้นยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด

เมื่อย้ายต้นยาสูบทั้งสองพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูลงปลูกในกระถาง เพื่อศึกษาลักษณะบางประการในทางเกษตรได้แก่ ความยาวและความกว้างของใบ อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของใบ จำนวนวันที่ออกดอก จำนวนใบต่อต้น และความสูงของต้น (ตารางที่ 4) พบว่า ความยาวของใบ จำนวนวันที่ออกดอก จำนวนใบต่อต้น และความสูงของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเมื่อเปรียบเทียบกับยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยในพันธุ์ TN 90 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติ มีความยาวของใบ 37.30 และ 41.20 ซม. ตามลำดับ มีจำนวนวันที่ออกดอก 74.90 และ 70.70 วัน ตามลำดับ มีจำนวนใบต่อต้น 25.70 และ 25.60 ใบ ตามลำดับ และมีความสูง 120.00 และ 127.50 ซม. ตามลำดับ และในพันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติ มีความยาวของใบ 15.55 และ 16.40 ซม. ตามลำดับ มีจำนวนวันที่ออกดอก 84.00 และ 84.00 วัน ตามลำดับ มีจำนวนใบต่อต้น 30.60 และ 29.40 ใบ ตามลำดับ และมีความสูง 85.70 และ 92.00 ซม. ตามลำดับ

สำหรับความกว้างของใบยาสูบทั้งสองพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู มีต่ำกว่าใบยาสูบปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในพันธุ์ TN 90 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติ มีความกว้างของใบ 15.60 และ 19.85 ซม. ตามลำดับ ส่วน Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติ มีความกว้าง 7.45 และ 8.58 ซม. ตามลำดับ ในขณะที่อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของใบยาสูบให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในยาสูบพันธุ์ TN 90 โดยมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและต้นปกติ 2.44 และ 2.07 ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ Xanthi nc มีในอัตรา 2.11 และ 1.94 ตามลำดับ โดยให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของลักษณะสัณฐานของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู เปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้จากเมล็ด

พันธุ์	แหล่งยาสูบ	ความยาวของใบ (ซม.)	ความกว้างของใบ (ซม.)	อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง	จำนวนวันที่ออกดอก	จำนวนใบต่อต้น	ความสูง (ซม.)
TN 90	A	37.30 ± 6.80 a	15.60 ± 4.09 b	2.44 ± 0.29 a	74.90 ± 9.72 a	25.70 ± 8.53 a	120.00 ± 34.46 a
	B	41.20 ± 6.51 a	19.85 ± 3.42 a	2.07 ± 0.07 b	70.70 ± 4.64 a	25.60 ± 7.57 a	127.50 ± 39.10 a
LSD	0.05	6.26	3.54	0.20	7.20	7.60	34.63
	0.01	8.57	4.85	0.28	9.80	10.40	47.45
Xanthi nc	A	15.55 ± 1.82 a	7.45 ± 0.98 b	2.11 ± 0.29 a	84.00 ± 4.59 a	30.60 ± 2.07 a	85.70 ± 15.50 a
	B	16.40 ± 2.47 a	8.58 ± 1.33 a	1.94 ± 0.34 a	84.00 ± 4.59 a	29.40 ± 2.07 a	92.00 ± 9.78 a
LSD	0.05	2.04	1.10	0.30	4.30	2.20	12.18
	0.01	2.79	1.51	0.41	5.90	3.00	16.68

ab ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
จากการวิเคราะห์แบบ LSD เมื่อเปรียบเทียบตัวเลขในสดมภ์เดียวกัน

หมายเหตุ : แหล่ง A: ต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู
แหล่ง B: ต้นยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

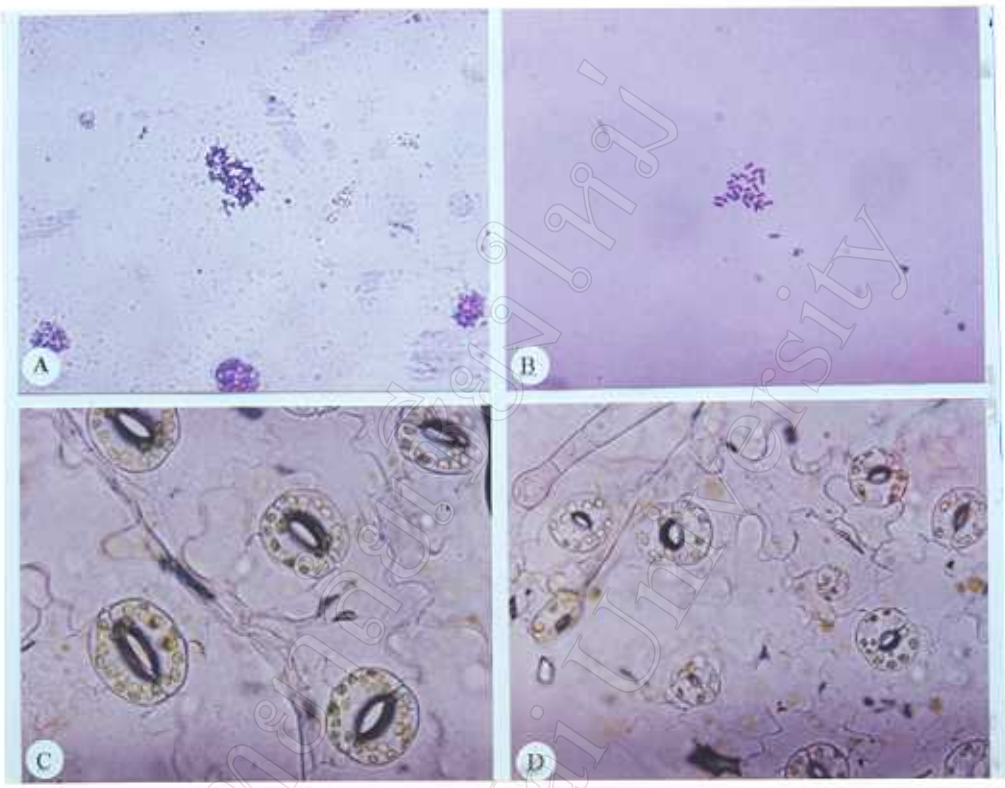
2.2 การตรวจนับโครโมโซม

หลังจากนำยาสูบทั้ง 2 พันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูและที่ได้จากเมล็ด มานับแท่งโครโมโซมของเซลล์ปลายรากเปรียบเทียบกัน ผลปรากฏว่า ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีจำนวน 24 โครโมโซม ส่วนต้นที่ได้จากเมล็ดมีจำนวน 48 โครโมโซม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc

แหล่งยาสูบ	จำนวนโครโมโซมที่นับได้	
	TN 90	Xanthi nc
ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู	24 a	24 a
ต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด	48 b	48 b

ab ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ LSD เมื่อเปรียบเทียบตัวเลขในสดมภ์เดียวกัน



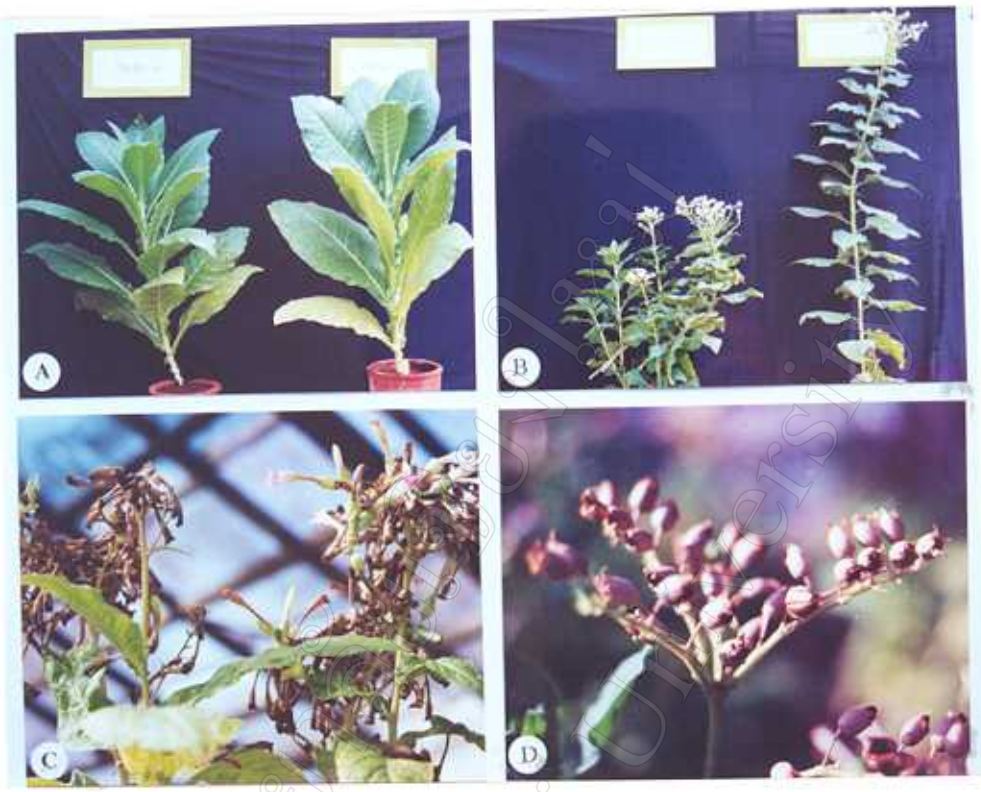
ภาพที่ 3 โครโมโซมและเซลล์ปากใบของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู เปรียบเทียบกับยาสูบปกติ

A) กลุ่มโครโมโซมของยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid)

B) กลุ่มโครโมโซมของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (haploid)

C) เซลล์ปากใบ และการเรียงตัวของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid)

D) เซลล์ปากใบ และการเรียงตัวของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (haploid)



ภาพที่ 4 ลักษณะของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเปรียบเทียบกับยาสูบปกติ

A) พันธุ์ TN 90 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู(ซ้าย) และต้นปกติที่ได้จากเมล็ด (ขวา)

B) พันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (ซ้าย) และต้นปกติที่ได้จากเมล็ด (ขวา)

C) ช่อดอกฝ่อแห้งตายหรือเป็นหมัน (sterile) ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

D) กระเปาะเมล็ดยาสูบที่สมบูรณ์หลังจากการผสมพันธุ์ในต้นยาสูบปกติที่ได้จากเมล็ด

3. ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างในยาสูบแฮพลอยด์ พันธุ์ Xanthi nc

หลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่าง พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงจนเจริญเป็นต้นอ่อนได้ทั้งหมด 26 clones (ตารางที่ 6) และคัดเลือกต้นที่มีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ได้ 16 clones หลังจากนั้นจึงนำทั้ง 16 clones มาปลูกในกระถางในสภาพโรงเรือน เพื่อทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อ TMV และสามารถคัดเลือก clone ที่มีความต้านทานต่อโรคใบด่างได้ทั้งหมด ซึ่งแสดงอาการตายของเนื้อเยื่อตรงตำแหน่งที่ได้รับเชื้อหลังจากปลูกเชื้อ TMV เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน

ตารางที่ 6 จำนวน clone ของยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ที่เป็นแฮพลอยด์

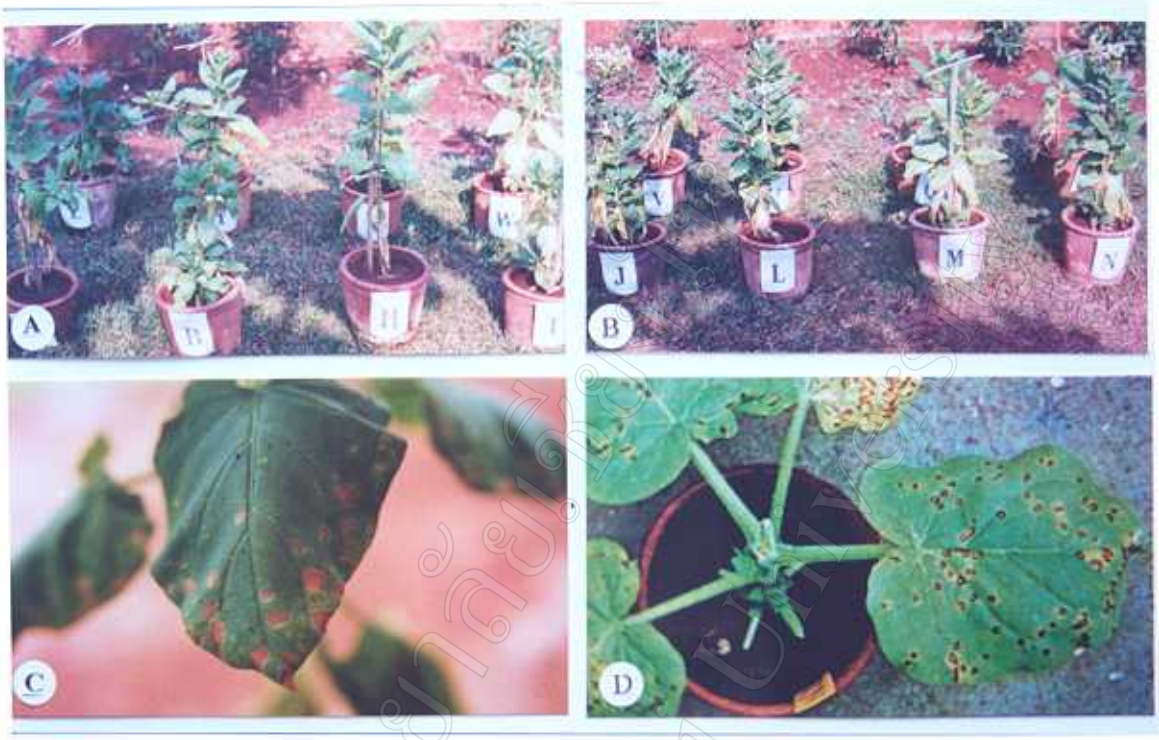
จำนวน clone ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู	ลักษณะอาการ เมื่อทดสอบโดยการปลูกเชื้อ TMV [1]
A	L
B	L
C	NG
D	NG
E	NG
F	NG
G	NG
H	L
I	L
J	L
K	NG
L	L
M	L
N	L
O	NG
P	L
Q	L
R	NG
S	NG
T	NG
U	L
V	L
W	L
X	L
Y	L
Z	L

[1] สังเกตอาการครั้งแรกหลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน และสังเกตต่อไปทุก ๆ 7 วัน จนกระทั่งต้นยาสูบอยู่ในระยะออกดอก (Flowering stage)

หมายเหตุ : L: อาการเป็นจุดแห้งตายของเนื้อเยื่อ

NG: หมายถึง ต้นยาสูบที่งอกมาแล้ว แต่มีการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ มีสีซีดและตายในที่สุด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพที่ 5 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคไวรัส TMV ในยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

A-B) ลักษณะต้นยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ที่เป็นแฮพลอยด์ ที่ต้านทานต่อ TMV

C) อาการแผลบนยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7-10 วัน

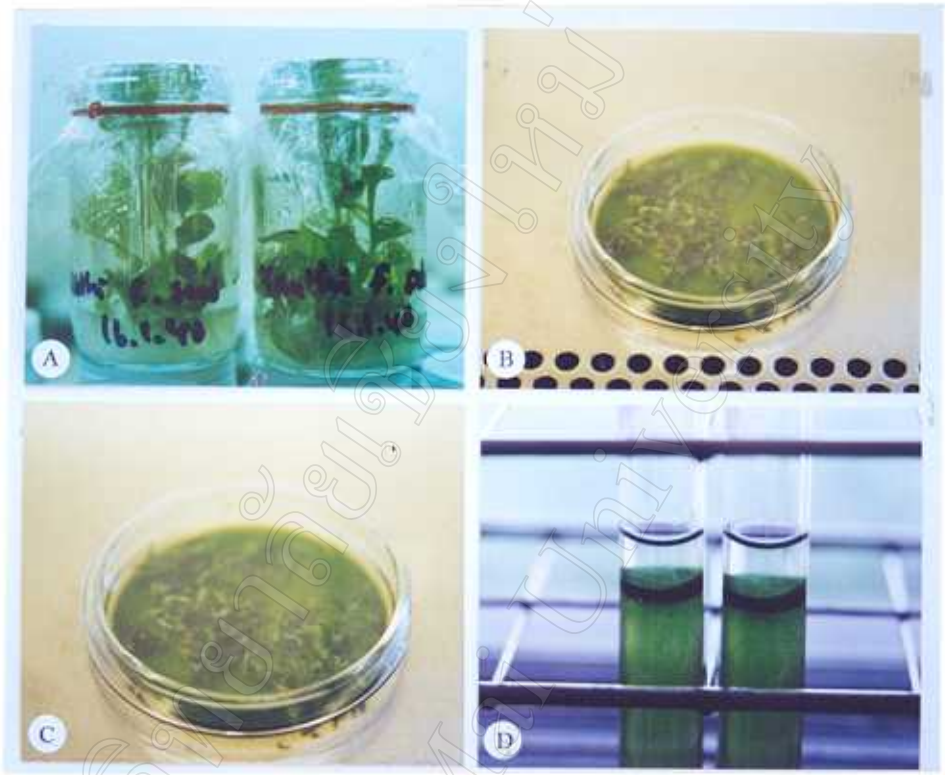
D) อาการแผลบนยาสูบ *N. glutinosa* ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc โดยการใช้กระแสไฟฟ้า

เมื่อทดลองแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบแฮพลอยด์เปรียบเทียบกับยาสูบปกติ พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบแฮพลอยด์ค่อนข้างยาก เนื่องจากใบมีลักษณะบาง ฉีกขาดง่าย เมื่อแยกโปรโตพลาสต์ออกมา ทำให้แตกง่าย เม็ดคลอโรพลาสต์เสียหาย และมีขนาดของโปรโตพลาสต์เล็ก ในขณะที่ยาสูบปกติสามารถลอกเซลล์ชั้นนอกด้านท้องใบออกได้ง่ายโดยที่ใบไม่ฉีกขาด โปรโตพลาสต์มีความสมบูรณ์สูง มีลักษณะกลม เต่ง มองเห็นเม็ดคลอโรพลาสต์ชัดเจน ดังนั้น การแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบแฮพลอยด์เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ที่สุดควรระมัดระวังทุกขั้นตอน

การเตรียมยาสูบในการแยกโปรโตพลาสต์ เริ่มจากการทดลองตัดใบคู่ที่ 2-3 มาชั่งให้ได้น้ำหนักใบสดในปริมาณ 1 กรัม เพื่อแยกหาจำนวนโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ ในพันธุ์ TN 90 มีลักษณะของใบค่อนข้างกว้างจึงชั่งได้จำนวนใบประมาณ 3-4 ใบต่อน้ำหนัก 1 กรัม ส่วนพันธุ์ Xanthi nc ใบมีขนาดเล็ก ต้องใช้ใบประมาณ 5-6 ใบให้ได้น้ำหนักสด 1 กรัม จากนั้นคัดเลือกยาสูบแฮพลอยด์ทั้งสองพันธุ์จากขวดที่เพาะเลี้ยงไว้ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อแยกหาจำนวนโปรโตพลาสต์ พบว่า ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ในพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ในความหนาแน่นประมาณ 1×10^5 และ 0.4×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งในพันธุ์ TN 90 พบว่า เป็นปริมาณที่เพียงพอในการรวมโปรโตพลาสต์ แต่ในพันธุ์ Xanthi nc ปริมาณที่ได้ค่อนข้างน้อย ดังนั้น จึงต้องตัดจำนวนใบยาสูบมาเพิ่มประมาณ 1-2 ใบเพื่อแยกให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่นเพียงพอในการรวมโปรโตพลาสต์กับพันธุ์ TN 90 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ลำดับการแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบ

A) ต้นยาสูบแฮพลอยด์ที่เลี้ยงไว้ในสภาพปลอดเชื้อพันธุ์ TN 90 (ซ้าย) และ Xanthi nc (ขวา)

B) เซลล์ที่ถูกย่อยของยาสูบพันธุ์ TN 90 หลังจากแช่ใบในส่วนประกอบของเอนไซม์ 4 ชั่วโมง

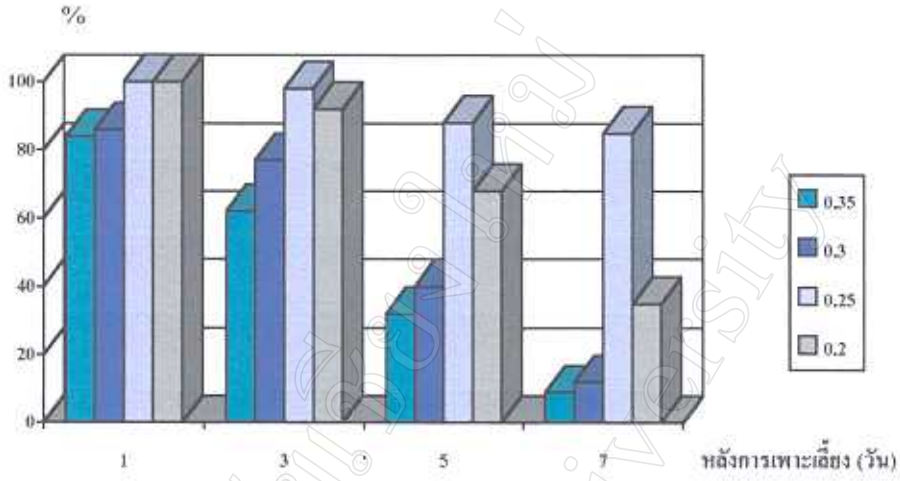
C) เซลล์ที่ถูกย่อยของยาสูบพันธุ์ Xanthi nc หลังจากแช่ใบในส่วนประกอบของเอนไซม์ 4 ชั่วโมง

D) การเตรียมโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์โดยการปั่นบนน้ำตาลซูโครส 20% พันธุ์ TN 90 (ซ้าย) และ Xanthi nc (ขวา)

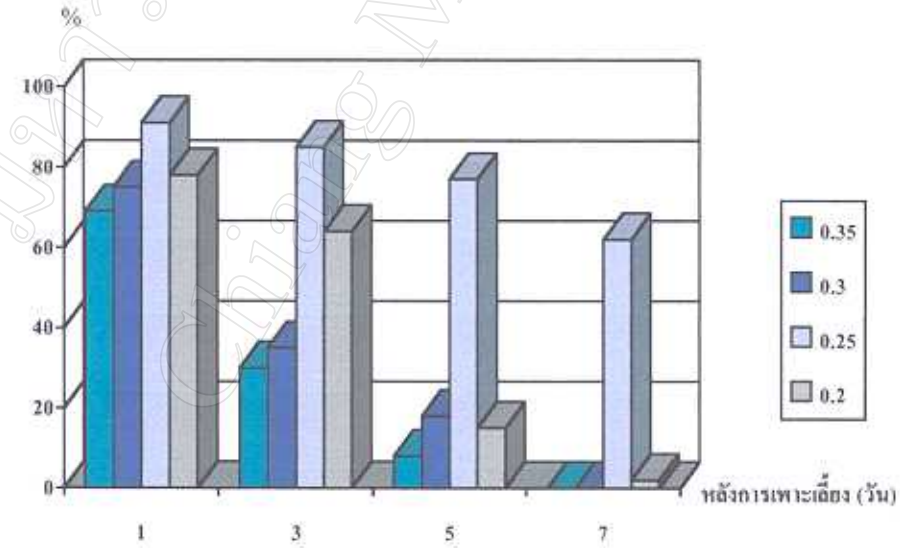
เมื่อแยกโปรโตพลาสต์ที่บริสุทธิ์ของยาสูบแฮพลอยด์ทั้งสองพันธุ์ นำมาปรับปริมาตรของโปรโตพลาสต์ให้ได้ประมาณ 1×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมล. แล้วทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่เติม NAA 2.25 มก./ล. ผสม Zeatin 0.75 มก./ล. และสารละลายแมนนิทอล 0.35 โมลาร์ เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์โดยการหยดสารละลายโปรโตพลาสต์ลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า โปรโตพลาสต์ของยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ TN 90 มีสีใส ขนาดค่อนข้างกลมโต ส่วนพันธุ์ Xanthi nc โปรโตพลาสต์มีสีเข้ม ขนาดเล็กกว่าพันธุ์ TN 90 เล็กน้อย และมีรูปร่างไม่ค่อยกลมมากนัก เมื่อตรวจดูโปรโตพลาสต์หลังการเลี้ยงในตู้เลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิและความเข้มแสงที่เหมาะสมเป็นเวลา 1 วัน โปรโตพลาสต์ของยาสูบทั้งสองพันธุ์เริ่มมีลักษณะเหี่ยวแฟบตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยง หรือลอยเดี่ยวในอาหาร เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์ไม่มีลักษณะกลมเต่งแต่อย่างใด แต่กลับมีสีซีด หรือเป็นสีน้ำตาลตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยงในปริมาณมาก ไม่พบการเจริญเติบโต และการแบ่งเซลล์ใด ๆ เกิดขึ้น เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตอีกครั้งหนึ่ง พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลง และตายหมดในที่สุดหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงว่า ความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมติกที่ใช้มีความเข้มข้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ ดังนั้น จึงได้ลดความเข้มข้นของแมนนิทอลลงเหลือ 0.30 0.25 และ 0.20 โมลาร์ พบว่า ความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ 0.25 โมลาร์ ทำให้มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์หลังจากเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหลังจากเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 1 วัน โปรโตพลาสต์มีลักษณะกลม เต่ง สังเกตเห็นลักษณะ cytoplasmic strand ได้ชัดเจน เม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียวมีจำนวนเต็มเซลล์ และบางเซลล์เริ่มมีลักษณะรี แสดงว่ามีการสร้างผนังเซลล์เพื่อเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์ และการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จะพบหลังการเพาะเลี้ยงประมาณ 5-7 วัน ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีสูงขึ้น เมื่อวางเลี้ยงต่อไปโปรโตพลาสต์จะมีการพัฒนาโดยการแบ่งเซลล์ และการสร้างหน่อเพิ่มมากขึ้น ส่วนความเข้มข้นของสารละลายแมนนิทอล 0.30 โมลาร์ มีผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอยู่ในระดับสูงเพียงช่วง 2-3 วันแรกหลังการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเวลาผ่านไปความมีชีวิตกลับลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับแมนนิทอลในความเข้มข้นต่ำ 0.20 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ไม่สามารถมีชีวิตรอดในระยะเวลาเพียงไม่ถึงสัปดาห์ (ภาพที่ 7-8)

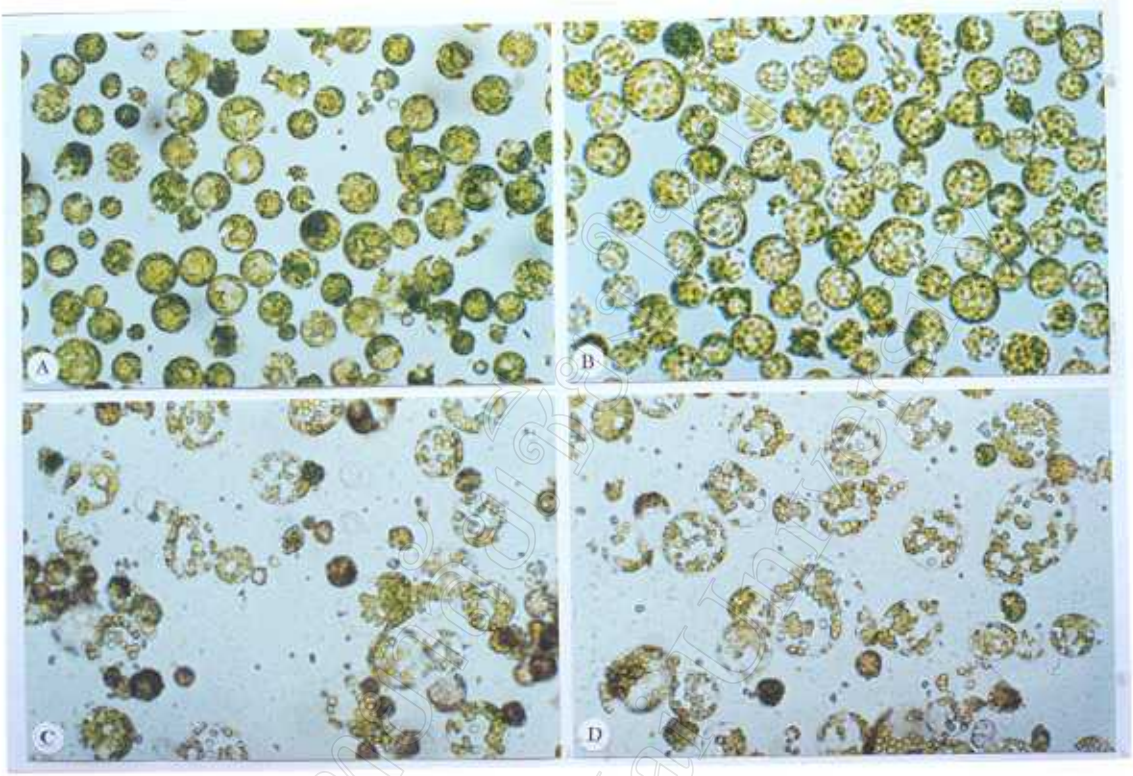
ดังนั้น ในอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยาสูบแฮพลอยด์ทั้งสองพันธุ์จึงใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมนนิทอลที่ 0.25 โมลาร์ในการทดลองอื่น ๆ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบแฮพลอยด์ พันธุ์ TN 90
ในอาหารสูตร PS ที่มีสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ (%)



ภาพที่ 8 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบแฮพลอยด์ พันธุ์ Xanthi nc
ในอาหารสูตร PS ที่มีสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ (%)



ภาพที่ 9 ลักษณะโปรโตพลาสต์ยาสูบที่แยกได้จากใบโดยใช้สารละลายเอนไซม์ Cellulase 0.5% และ Macerozyme R 10 0.3% บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

A) ในยาสูบพันธุ์ Xanthi nc โปรโตพลาสต์มีสีเข้ม และขนาดค่อนข้างเล็ก

B) ในยาสูบพันธุ์ TN 90 โปรโตพลาสต์มีสีอ่อนและขนาดใหญ่กว่าพันธุ์ Xanthi nc

C) พัฒนาการของโปรโตพลาสต์พันธุ์ Xanthi nc หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

D) พัฒนาการของโปรโตพลาสต์พันธุ์ TN 90 หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

1. ผลการคัดเลือกลูกผสม

ในการตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลูกผสมที่มีอายุ 7 วัน (ภาพที่ 9) ภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS (1981) ที่มีสารละลายแมนนิทอลเข้มข้น 0.25 โมลาร์ (ตารางที่ 7) โดยโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสทำปฏิกิริยากับ FDA แล้วเกิดการเรืองแสงสีเขียวเหลืองภายใต้คลื่นอัลตร้าไวโอเลต เมื่อวัดความมีชีวิตของลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะเรืองแสงสีเขียวเหลือง พบว่า มีเปอร์เซ็นต์สูงสุด คือ 76.09% รองลงมา ได้แก่ โปรโตพลาสต์ของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 73.08 และ 65.96% ตามลำดับ ส่วนลักษณะที่เรืองแสงสีแดง คือลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิต

ตารางที่ 7 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ

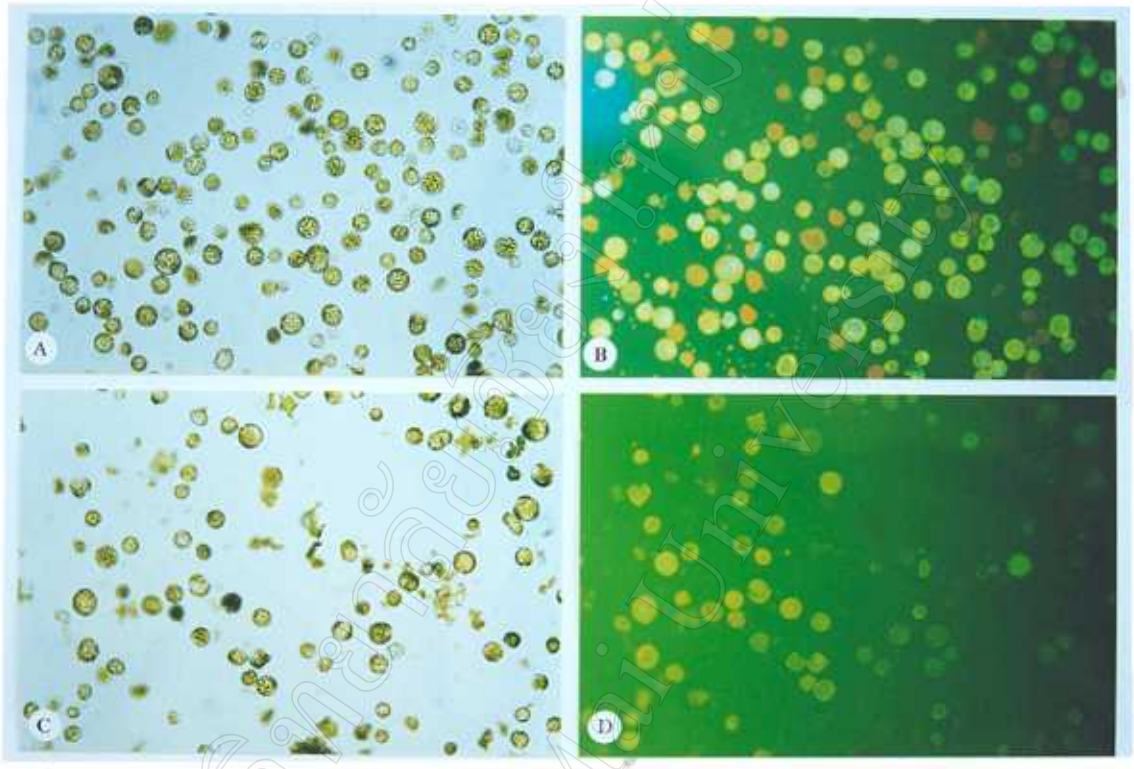
พันธุ์	จำนวนโปรโตพลาสต์เมื่อดูด้วยกล้อง Compound[1]	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสงเมื่อดูด้วยกล้อง Fluorescence[1]	% ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์[1]
TN 90	78 a	57 a	73.08 b
Xanthi nc	94 b	62 b	65.96 a
TN 90 + Xanthi nc	92 b	70 c	76.09 b
F-test	**	**	*
C.V. (%)	6.6	4.8	5.7

[1] ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

abc ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ LSD เมื่อเปรียบเทียบตัวเลขในสดมภ์เดียวกัน



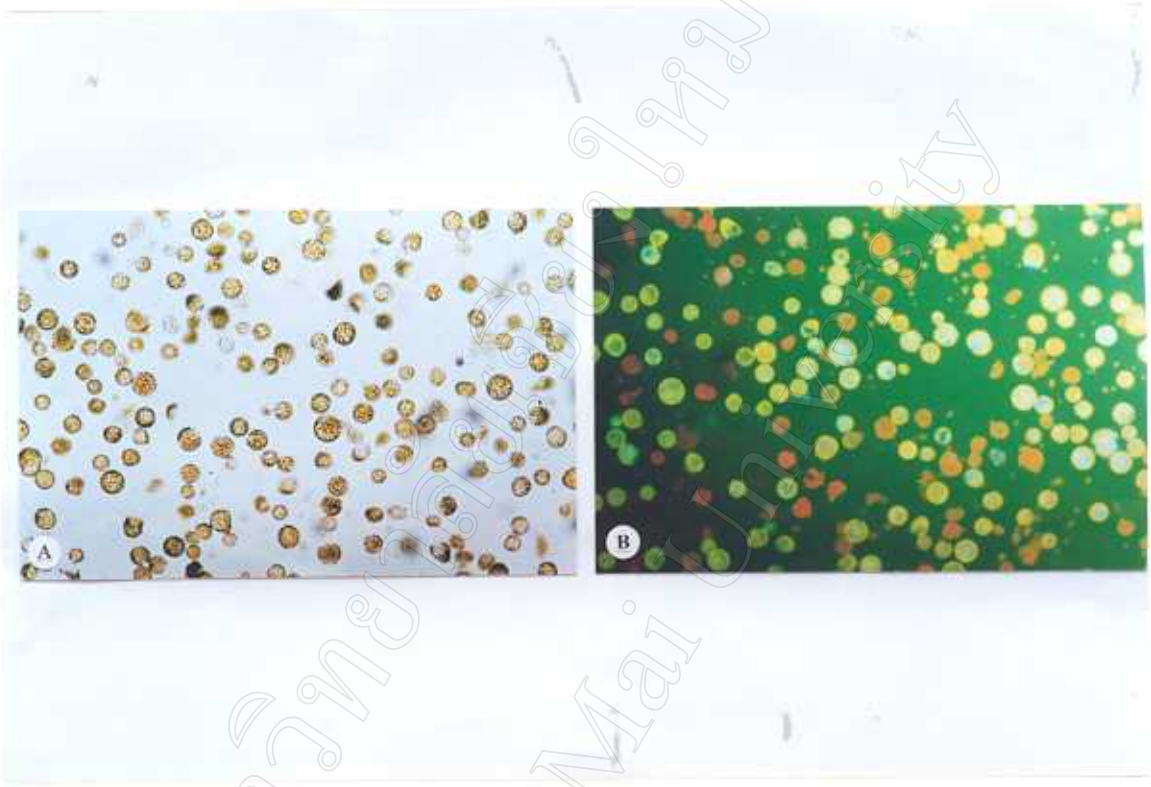
ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบแฮพลอยด์ในอาหารสูตร PS (1981)

A) จำนวนโปรโตพลาสต์ของพันธุ์ TN 90 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้แสงปกติ

B) ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตของพันธุ์ TN 90 จะเรืองแสงสีเขียวเหลืองเมื่อดูภายใต้กล้อง Fluorescence

C) จำนวนโปรโตพลาสต์ของพันธุ์ Xanthi nc เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้แสงปกติ

D) ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตของพันธุ์ Xanthi nc จะเรืองแสงสีเขียวเหลืองเมื่อดูภายใต้กล้อง Fluorescence



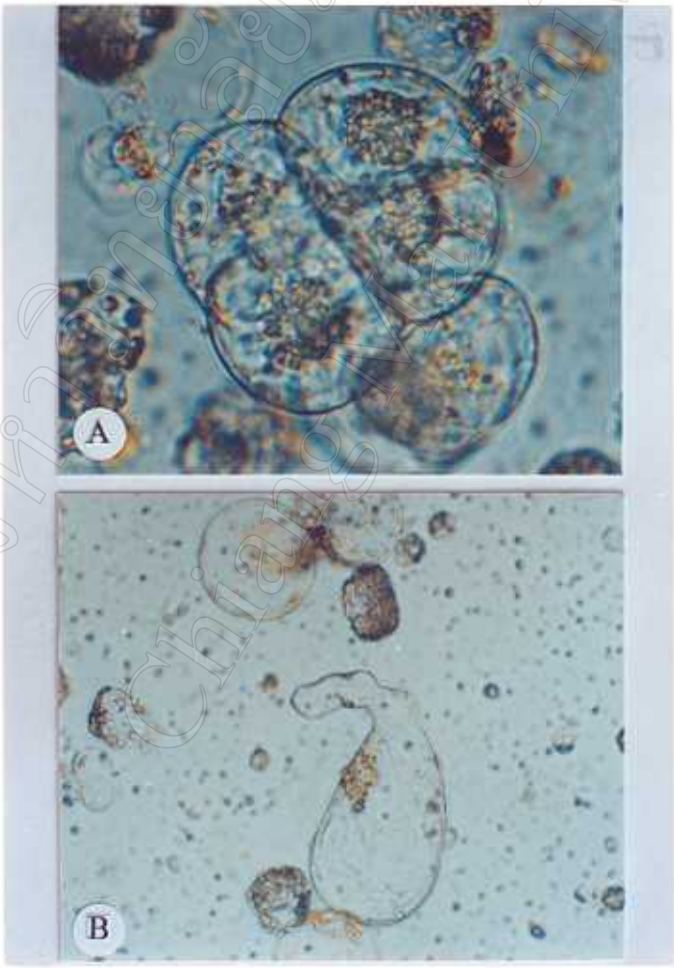
ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบลูกผสมในอาหารสูตร PS (1981)

A) จำนวนโปรโตพลาสต์เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้แสงปกติ

B) ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเขียวเหลืองเมื่อดูภายใต้กล้อง Fluorescence

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การพัฒนาของโปรโตพลาสต์เมื่ออายุเพิ่มขึ้น พบว่า โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาโดยมีการแบ่งเซลล์ในปริมาณน้อย ในขณะที่จะมีการส่งเสริมการสร้างหน่อมากกว่าในระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้น จึงเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่โดยดูดเอาอาหารเก่าออก แล้วเติมอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส เข้มข้น 3.0%, 2, 4 -D เข้มข้น 0.25 มก./ล., BAP เข้มข้น 2.0 มก./ล. และแมนนิทอล เข้มข้น 0.25 โมลาร์ลงไป แล้วตรวจสอบพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังจากที่เปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นเวลา 3 วัน พบว่า โปรโตพลาสต์มีพัฒนาการเพิ่มขึ้นใน 2 ลักษณะ คือ การแบ่งเซลล์ โดยที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจากรูปร่างกลม บริเวณตรงกลางเซลล์มีการสร้างผนังกั้นเซลล์มากั้น ส่วนพัฒนาการแบบการสร้างหน่อ คล้ายกับลักษณะแรก เซลล์มีลักษณะรี แต่ไม่มีการสร้างผนังกั้นเซลล์ (ภาพที่ 12) เมื่อวางเลี้ยงต่อไป สังเกตพบว่าโปรโตพลาสต์มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น มีแนวโน้มจะมีพัฒนาการและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้



ภาพที่ 12 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ใน 2 ลักษณะ

A) การแบ่งเซลล์

B) การสร้างหน่อ

ผลการวัดพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ (ตารางที่ 8) ยาสูบลูกผสมที่ได้จากการรวมโปร-โตพลาสต์มีจำนวนกลุ่มเซลล์ที่งอก การแบ่งเซลล์ และการสร้างหน่อ ในอัตรา 41 25.25% และ 22.50% ตามลำดับภายในระยะเวลา 20 วันหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส 3.0%, 2, 4 -D 0.25 มก./ล., BAP 2.0 มก./ล. และแมนนิทอล 0.25 โมลาร์ โดยแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติจากโปรโตพลาสต์ของยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่เป็นวิธีการเปรียบเทียบ โดยในพันธุ์ TN 90 มีจำนวนกลุ่มเซลล์ที่งอก การแบ่งเซลล์ และการสร้างหน่อพันธุ์ ในอัตรา 32 13.50% และ 5.75% ตามลำดับ ภายในเวลา 14 วัน ส่วนพันธุ์ Xanthi nc มีจำนวนกลุ่มเซลล์ที่งอก และการสร้างหน่อในอัตรา 11 และ 22.50% ตามลำดับ ภายในเวลา 30 วันโดยไม่พบการแบ่งเซลล์ใด ๆ

ตารางที่ 8 ผลของโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่าง ๆ ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ [1]

พันธุ์ยาสูบที่เป็นแหล่งโปรโตพลาสต์	พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ [2] (%)			ระยะเวลา (วัน)
	จำนวนกลุ่มเซลล์ที่งอก	การแบ่งเซลล์	การสร้างหน่อ	
TN 90	32 b	13.50 b	5.75 a	14
Xanthi nc	11 a	0.00 a	4.00 a	30
TN 90 + Xanthi nc	41 c	25.25 c	22.50 b	20
F-test	**	**	**	
C.V. (%)	19.6	16.3	26.3	

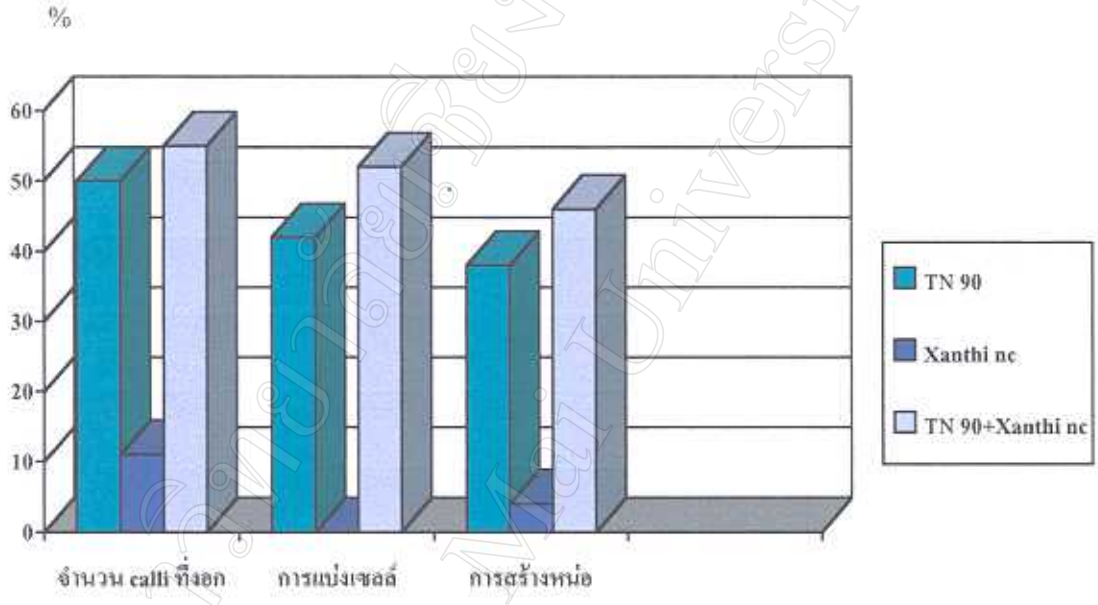
[1] ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

abc ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ LSD เมื่อเปรียบเทียบตัวเลขในสดมภ์เดียวกัน

[2] โปรโตพลาสต์ทั้งหมดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PS (1981) ที่เติม NAA 2.25 มก./ล. ผสม Zeatin 0.75 มก./ล. และแมนนิทอล 0.25 โมลาร์ ในช่วงสัปดาห์แรก จากนั้น จึงดูดเอาอาหารเก่าออก แล้วเติมอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส 3.0%, 2, 4 -D 0.25 มก./ล., BAP 2.0 มก./ล. และแมนนิทอล 0.25 โมลาร์

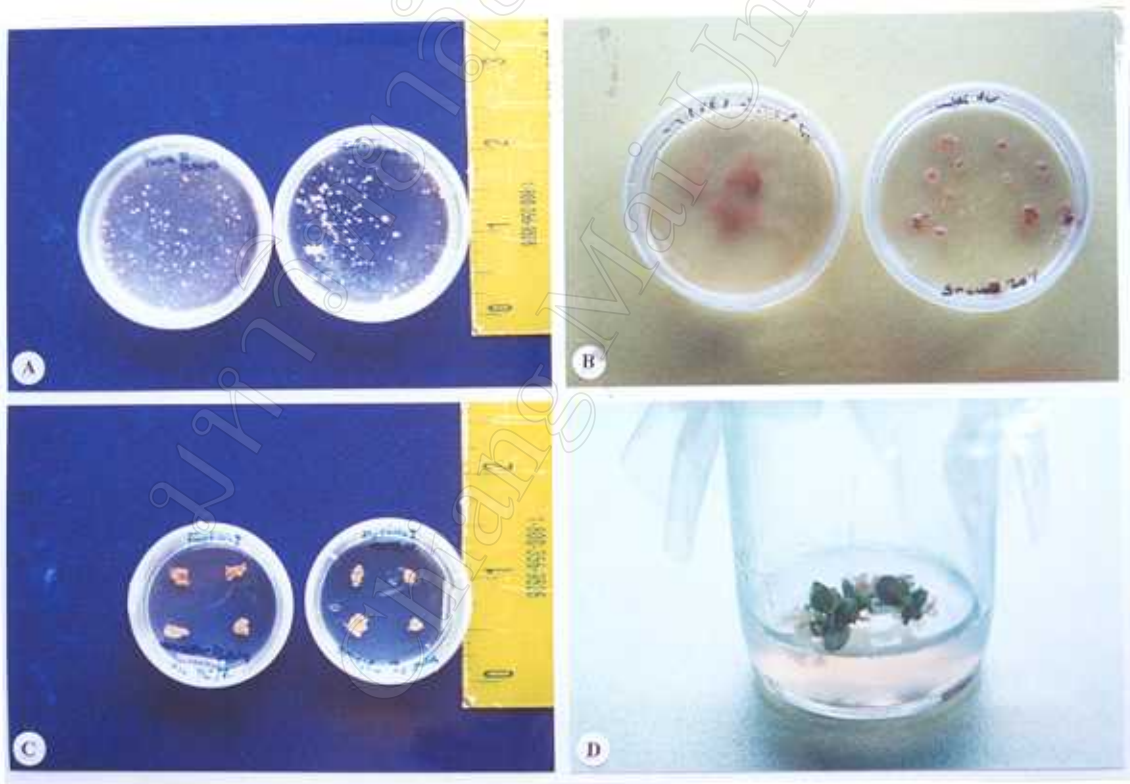
สำหรับเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของโปรโตพลาสต์เมื่อมีอายุ 30 วัน ได้แสดงไว้ในภาพที่ 13 ซึ่งในยาสูบลูกผสมมีการพัฒนาทั้ง 3 ลักษณะเป็นแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นสูงตั้งแต่โปรโตพลาสต์มีอายุได้ 10 วันหลังการเพาะเลี้ยงและมีพัฒนาการสูงสุดเมื่อมีอายุได้ประมาณ 1 เดือน ส่วนพันธุ์ TN 90 มีพัฒนาการรองลงมา ในขณะที่ Xanthi nc มีพัฒนาการในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำ



ภาพที่ 13 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ เมื่ออายุ 30 วัน (%)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ สัปดาห์ โดยการเอียงจานพลาสติกให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอน แล้วค่อย ๆ ดูดเอาอาหารเก่าออกครึ่งหนึ่ง แล้วจึงดูดเอาอาหารใหม่ในปริมาณเท่ากับที่ดูดออก เติมลงไป จากนั้นค่อย ๆ เอียงจานพลาสติกเพื่อให้อาหารเข้ากับโปรโตพลาสต์ได้ดี หลังจากเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่เรื่อย ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์โปรโตพลาสต์มีการพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ มีลักษณะสีขาวขุ่น จึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS พบว่าสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 14-15)



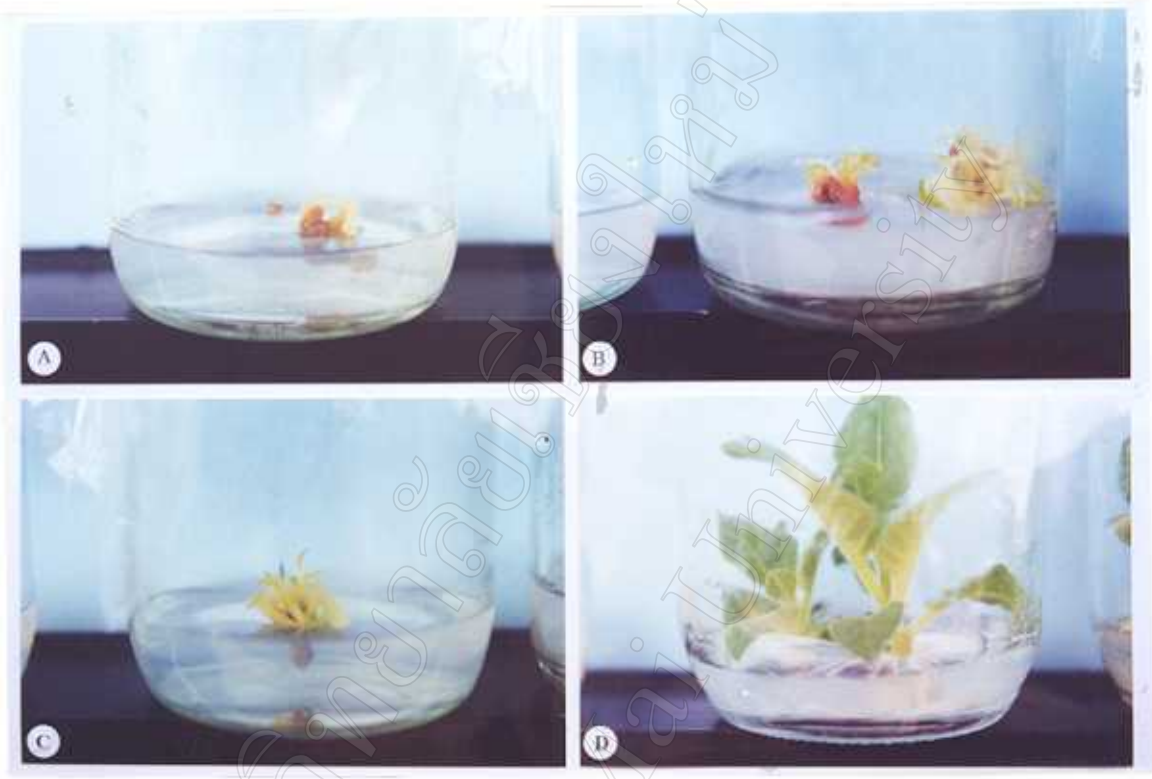
ภาพที่ 14 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์

A) ลักษณะการเกิดกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (microcalli) หลังการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

B) การเกิดเป็น microcolony (ซ้าย) และแคลลัส (ขวา)

C) แคลลัสที่ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต

D) การเจริญเป็นต้นอ่อนหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

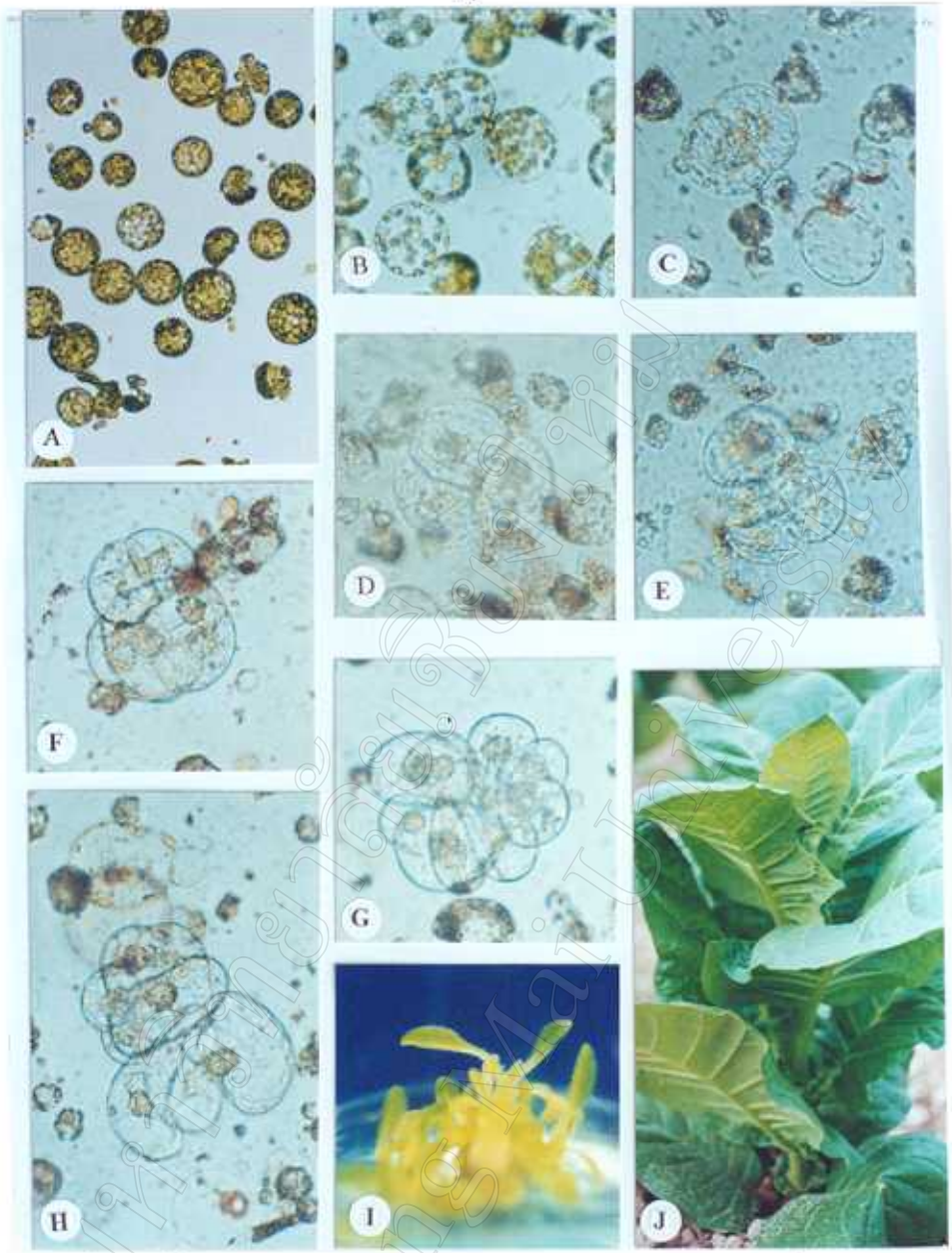


ภาพที่ 15 ระยะการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ลูกผสมหลังงอกเป็นกลุ่มแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต

A) การเกิดแคลลัส

B-C) การพัฒนาเป็นต้นอ่อน

D) การเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์หลังการเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ภายหลังการสร้างแคลลัส



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการผลิตลูกผสมยาสูบจากการรวมโปรโตพลาสต์

A) โปรโตพลาสต์หลังจากผ่านกระบวนการรวมกันด้วยกระแสไฟฟ้า

B) โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่และเริ่มแบ่งเซลล์

C-E) ช่วงแรกของการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างแคลลัสขนาดจิ๋ว

F-H) กลุ่มเซลล์ขนาดจิ๋วที่เริ่มมองเห็นได้ชัดเจน

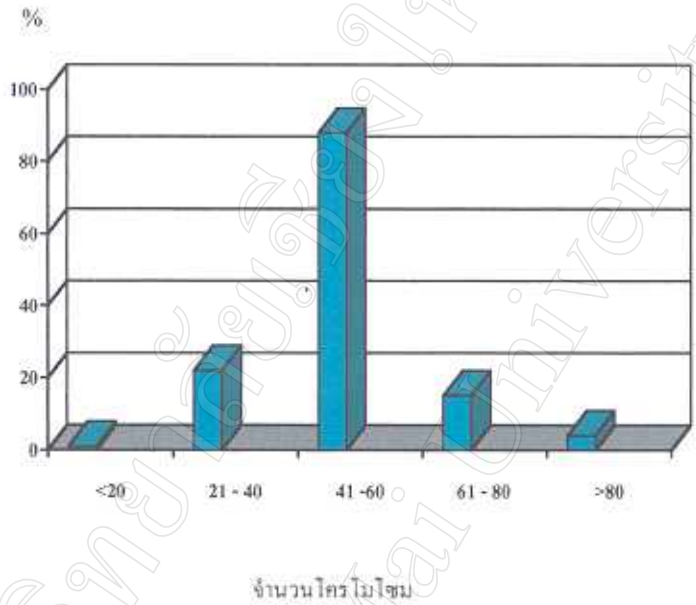
I) การพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากแคลลัส

J) ต้นยาสูบลูกผสมที่สมบูรณ์เมื่อปลูกในสภาพแปลง

2. ผลการตรวจสอบโครโมโซมของต้นยาสูบลูกผสม

ต้นยาสูบลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างยาสูบพันธุ์ TN 90 + Xanthi nc (fusant) มีจำนวนโครโมโซมผันแปรไปในช่วงตั้งแต่ 24-72 โครโมโซม แต่ส่วนใหญ่มี 48 ± 2 โครโมโซม (ภาพที่ 17) เมื่อนำต้นยาสูบลูกผสมที่ได้ทั้งหมดลงปลูกในกระถางเพื่อดูลักษณะทางสัณฐาน (ภาพที่ 18) พบลักษณะของลูกผสมแตกต่างกันไป โดยส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างของใบและลักษณะมีหูใบเหมือนกับพันธุ์ TN 90 แต่ก็พบรูปร่างของใบที่เหมือนพันธุ์ Xanthi nc ในอัตราประมาณ 12.5% อย่างไรก็ตาม ลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมีสีเขียวเข้มเหมือนพันธุ์ Xanthi nc ทุกต้น

เมื่อวัดความกว้างและความยาวของใบยาสูบลูกผสมเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เดิม พบว่าใบมีความกว้างมากกว่าพันธุ์ TN 90 ประมาณ 0.5-1.0 นิ้ว โดยลักษณะใบกว้างถ่ายทอดมาจากพันธุ์ Xanthi nc ส่วนความยาวของใบไม่มีความแตกต่างจากพันธุ์ TN 90 สำหรับลักษณะอื่น ๆ ที่ถ่ายทอดมาจากพันธุ์ Xanthi nc คือ จำนวนใบต่อต้นซึ่งจะมีจำนวนมากกว่าพันธุ์ TN 90 ประมาณ 2-3 ใบ ส่วนลักษณะอื่น ๆ ได้แก่ จำนวนวันที่ออกดอก สีและขนาดของดอก และความสูงของต้นไม่พบความแตกต่างจากพันธุ์ TN 90



ภาพที่ 17 ความผันแปรของจำนวนโครโมโซมของลูกผสมยาสูบที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาพที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานของลูกผสมยาสูบหลังย้ายปลูกในกระถาง

A) รูปร่างของใบ และลักษณะมีหูใบ เหมือนพันธุ์ TN 90

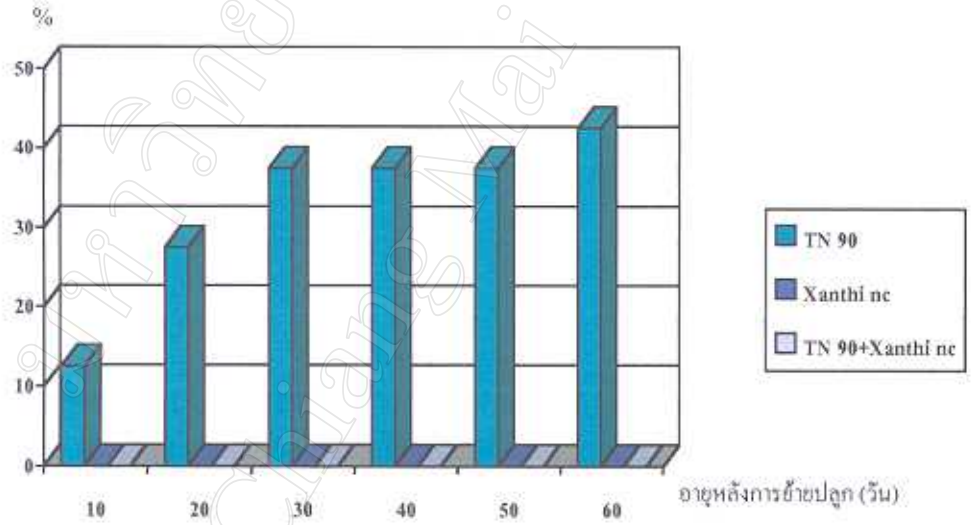
B) รูปร่างของใบที่เหมือนพันธุ์ Xanthi nc และไม่มีหูใบ

C) ลูกผสมมีสีเขียวเข้มเหมือนพันธุ์ Xanthi nc

D) ต้นที่สมบูรณ์ หลังย้ายปลูกในกระถางอายุ 20 วัน

3. ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างของลูกผสมยาสูบ ในสภาพเรือนกระจก

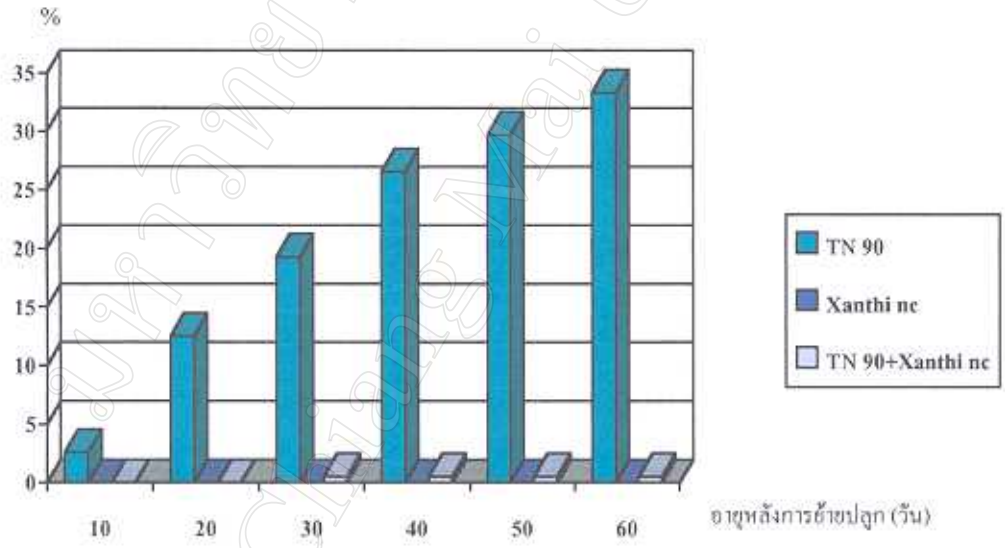
เมื่อปลูกเชื้อ TMV ด้วยวิธีกลโดยการใช้ผงคาร์โบรันดัมแก่ต้นยาสูบอายุ 15 วันหลังย้ายปลูก แล้วสำรวจหาระดับความต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างของยาสูบลูกผสม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Todd (1981) พบอาการเป็นจุดแห้งตายของเนื้อเยื่อบนใบยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ที่ปลูกเชื้อไวรัสลงไปโดยสังเกตอาการได้หลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน และไม่พบอาการใด ๆ บนต้นยาสูบลูกผสมหลังจากปลูกเชื้อ ส่วนพันธุ์ TN 90 เริ่มพบลักษณะด่างแบบ systemic ในต้นที่ปลูกเชื้อไวรัสหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน หลังจากนั้นอาการจะด่างชัดเจนขึ้น ผลการสำรวจโรคเมื่อยาสูบมีอายุ 30 และ 60 วันในพันธุ์ TN 90 มีอัตราการเกิดโรค 37.50 และ 42.50% ตามลำดับ สำหรับพันธุ์ Xanthi nc และลูกผสมยาสูบที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ไม่พบการเข้าทำลายของโรค (ภาพที่ 19)



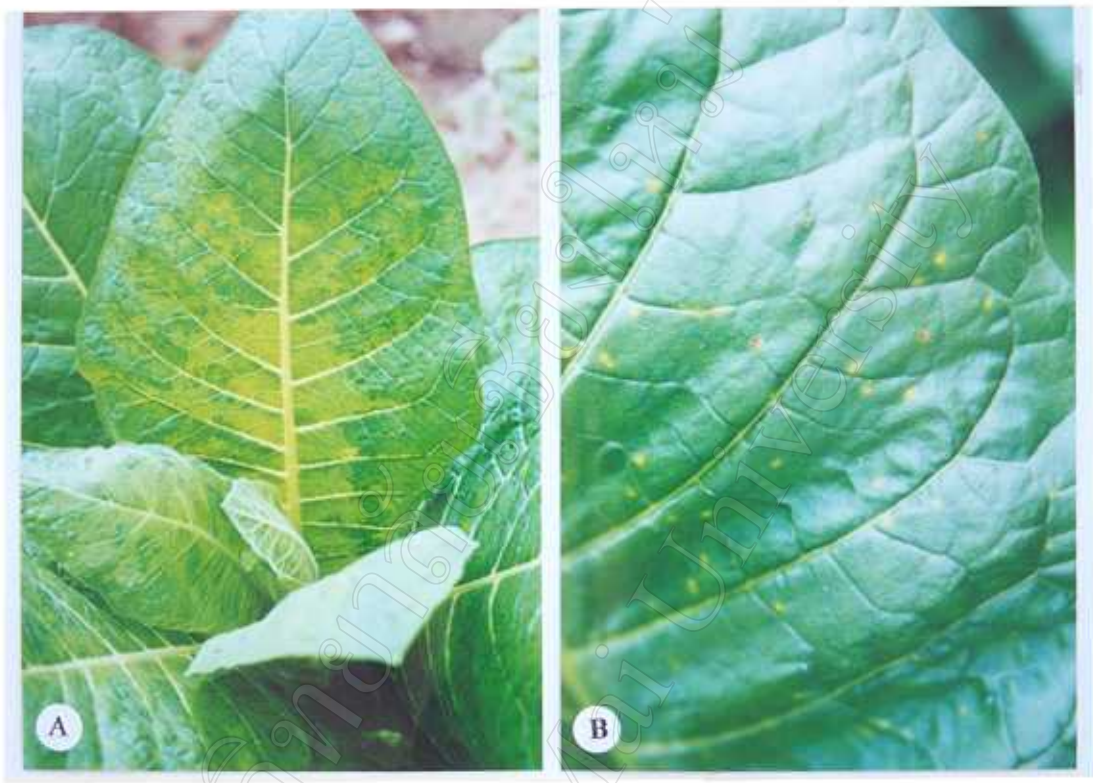
ภาพที่ 19 อัตราการเกิดโรคใบด่างในยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ หลังการปลูกเชื้อ TMV ในสภาพเรือนกระจก (%)

4. ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างของลูกผสมยาสูบในสภาพแปลง

หลังจากปลูกยาสูบในไร่ทดลองแล้วปล่อยให้เกิดโรคตามสภาพธรรมชาติ เริ่มสังเกตพบอาการของโรคใบด่างแบบ systemic ในต้นยาสูบพันธุ์ TN 90 หลังจากย้ายปลูกในไร่ได้ 20 วัน เมื่อสำรวจหาระดับความต้านทานต่อโรคไวรัสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Todd (1981) เมื่อต้นยาสูบมีอายุได้ 30 และ 60 วันหลังย้ายปลูก มีอัตราการเกิดโรคใบด่างคิดเป็น 19.27 และ 33.33% ตามลำดับ (ภาพที่ 20) ในขณะที่พันธุ์ Xanthi nc ไม่พบอาการใด ๆ ส่วนลูกผสมยาสูบที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ พบอาการเป็นจุดแห้งตายของเนื้อเยื่อคิดเป็น 0.52% (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 20 อัตราการเกิดโรคใบด่างจากเข้าทำลายของ TMV ในยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อปล่อยให้เกิดโรคตามสภาพธรรมชาติในแปลงทดลอง



ภาพที่ 21 อาการของโรคใบด่างยาสูบ

A) อาการด่างแบบ systemic ในพันธุ์ TN 90

B) จุดสีเหลืองที่เริ่มแสดงอาการเป็นจุดแห้งภายของเนื้อเยื่อในยาสูบลูกผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 22 ลักษณะทางสัณฐานของยาสูบ หลังย้ายปลูกในไร่

A) พันธุ์ TN 90 อายุ 30 วัน (ซ้าย) และ 60 วัน (ขวา) ใบมีสีเขียวอ่อน ลักษณะใบใหญ่ มีทรงพุ่มเตี้ย

B) พันธุ์ Xanthi nc อายุ 30 วัน (ซ้าย) และ 60 วัน (ขวา) ใบมีสีเขียวเข้ม ลักษณะใบเล็กแต่กว้าง มีจำนวนใบต่อต้นมาก ทรงพุ่มสูง

C) พันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ อายุ 30 วัน (ซ้าย) และ 60 วัน (ขวา) ใบมีสีเขียวเข้มเหมือนพันธุ์ Xanthi nc ลักษณะใบใหญ่และกว้าง ทรงพุ่มค่อนข้างสูง และมีจำนวนใบต่อต้นมากกว่าพันธุ์ TN 90