หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

การคัดเลือกต้นยาสูบ (N. tabacum L.) พันธุ์เวอร์จิเนีย โคเกอร์ 347 ที่ต้านทานโรคตากบ โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น จากการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของ ลำต้น ก้านใบ และใบ ของต้นกล้าอายุ 6 สัปดาห์ พบว่าส่วนต่างๆดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และเกิดต้นใหม่ได้ดี การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเพื่อให้ได้ต้นกล้านั้น สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อได้มากขณะชักนำให้เกิดแคลลัส ก่อนเพาะควรแช่เมล็ดในน้ำอุ่น อุณหภูมิ ประมาณ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะช่วยกระตุ้นให้เกิดเป็นต้นอ่อนได้เร็วขึ้นภายใน 1 สัปดาห์ และยังกำจัดเมล็ดไม่ดีออกไป โดยมีน้ำหนักเบาลอยอยู่เหนือน้ำ การใช้คลอร็อกซ์ หรือโซเดียม-ไฮโปคลอไรท์ เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที นับว่าได้ผลดีในการกำจัดเชื้อปนเปื้อน

การคัดเลือกต้นยาสูบที่ต้านทานโรคตากบ โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้เริ่มตั้งแต่

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

อาหารสูตรชักนำแคลลัสตาม Murashige and Skooge (1962) ได้ดัดแปลงโดยเติม IAA 1.9 และ Kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นับเป็นสูตรที่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบให้เกิดแคลลัสเป็นอย่างมาก พบว่าในสัปดาห์แรกชิ้นส่วนของลำต้น ก้านใบ และใบบริเวณรอยตัดเกิดปุ่มปมเซลล์มีการแบ่งตัวขยายขนาดกลายเป็นแคลลัสขนาดใหญ่ภายใน 4 สัปดาห์ โดยแคลลัสจากส่วนของลำต้นมีลักษณะ ขนาด ตลอดจนเปอร์เซ็นต์การเกิดใกล้เคียงกับส่วนของก้านใบ มีทั้งแบบเกาะกลุ่มเป็นก้อน ได้น้ำหนัก สามารถเจริญเป็นยอด และต้นใหม่ได้ดี และแบบลักษณะฟู สีขาว เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ ส่วนมากไม่ค่อยเจริญเป็นต้น แต่จะแบ่งเซลล์เพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งให้ผลตรงกับ Schenk and Hildebrant(1972); Dodd and Roberts (1982) นอกจากเกิดแคลลัสแล้วยังเกิดต้นใหม่ขึ้นด้วย โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดใกล้เคียงกันในสัปดาห์ที่ 6 แคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นมาก พร้อมๆกับการเจริญของต้นใหม่ ซึ่งเกิดขึ้นทั้งในส่วนของลำต้น ก้านใบ และใบ ปลายสัปดาห์สีของแคลลัสเริ่มซีด ใบเริ่มมีสีเหลือง ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหาร ฮอร์โมน และองค์ประกอบต่างๆในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มหมด

การเกิดเป็นต้นโดยตรงขณะชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นเนื่องจากเนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ธรรมดาเป็น meristematic cell เซลล์บางกลุ่มเกิดการรวมตัวมีการสร้างโปรตีน

และ RNA เพิ่มขึ้น มีอัตราการแบ่งเซลล์สูง เกิดเป็นจุดกำเนิดของยอด และรากโดยตรง การใช้ส่วนปลายยอด(shoot) ซึ่งมี meristematic cell อยู่ และเป็นเนื้อเยื่อที่ยังอยู่ใน juvenile stage หรือ young stage นั้น สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีได้ผลตรงตาม Gamborg and Wetter (1975); Dodds and Roberts (1982)

2. การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้น

นอกจากต้นจะเกิดขึ้นได้โดยตรงจากบริเวณเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นส่วนของตา หรือยอดแล้ว ยังเกิดผ่านการเป็นแคลลัส เพราะเนื้อเยื่อมีส่วนของแคมเบียมรวมอยู่ด้วย ซึ่งมีการแบ่งเซลล์ในอัตราสูง แคลลัสมักเกิดจากเนื้อเยื่อเหล่านี้ เมื่อได้รับสภาพที่เหมาะสม และอาหารที่มีสารกระตุ้นให้เกิดเป็นต้น หรือราก เซลล์บางส่วนจะกลายเป็น meristematic cell เกิดเป็นต้น หรือราก แต่ถ้าเนื้อเยื่อไม่มีแคมเบียม เนื้อเยื่อที่พัฒนาไปแล้ว ก็สามารถกลับกลายมาเป็นเซลล์ parenchyma ได้เมื่อสภาพที่เหมาะสมจึงเจริญกลายเป็นแคลลัสอีกที และเมื่อแคลลัสได้รับสภาพที่เหมาะสมอีกครั้งจะเจริญเป็นต้นใหม่ได้ อาหารสูตรชักนำต้นตาม Murashige and Skooge ที่เติม NAA 0.1 และ BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับชักนำให้เกิดต้น พบว่าการเลี้ยงแคลลัส อายุ 4 สัปดาห์ ในอาหารนี้ 4 สัปดาห์ จะเกิดยอดและต้นจำนวนมากยิ่งถ้าสับแคลลัสให้เป็นชิ้นเล็กๆจะดีกว่าแคลลัสที่เป็นก้อน ก่อนที่จะเกิดเป็นต้นนั้น แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณขึ้น เซลล์เกาะกลุ่มกัน ทั้งนี้เพราะเซลล์มีการสัมผัส และได้รับอาหารอย่างทั่วถึง ทำให้แคลลัสจับตัวกันเป็นก้อน เกิดเป็นจุดเขียวเพื่อเจริญเป็นยอด และต้นที่ได้ยังไม่มีรากเกิดขึ้นต้องเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำรากอีกครั้ง ซึ่งเป็นสูตรตาม Murashige and Skooge ที่เติมเฉพาะ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้นจะเกิดรากจำนวนมากภายใน 3 สัปดาห์

ขั้นตอนการเจริญของแคลลัสจนไปเป็นต้นที่สมบูรณ์นั้นเป็นแบบ organogenesis คือ แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดและต้นก่อน จากนั้นจึงเกิดรากขึ้น โดยส่วนของต้นและรากเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน ได้ผลตรงตาม Flick et al(1983); Evans et al.(1984) และได้ผลตรงกับการเจริญของแคลลัสข้าวที่เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์แบบ organogenesis เช่นกัน (Vajrabhaya and Vajrabhaya,1984) การเจริญเป็นต้นได้นั้นขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน ทั้งปัจจัยภายใน เช่น ลักษณะทางพันธุกรรม สารควบคุมการเจริญในพืช ชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อ และปัจจัยภายนอกเช่น แสง คุณภาพ ความเข้ม ตลอดจนระยะเวลาให้แสง

3. การเลี้ยงเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev.

การเลี้ยงเชื้อเพื่อทำ spore suspension นี้จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างสปอร์

เป็นจำนวนมาก ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ซึ่งตรวจสอบก่อนแล้วว่า มีการสร้างสปอร์ในอาหาร PDA ปรากฏว่าเชื้อที่เคยสร้างสปอร์กลับไม่สร้างสปอร์เลย แต่มีการเจริญของเส้นใยดี มีลักษณะฟู เปลี่ยนจากสีเทาเป็นขาว ได้ผลตรงกับ ชไมพร กิตติธรรมกูล(2531) ซึ่งรายงานว่าเชื้อราสกุลนี้จะสร้างสปอร์ได้ก็ต่อเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เฉพาะเจาะจง (specific medium) เท่านั้น การเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA ที่ผสมใบยาสูบบดละเอียดนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พบว่าเชื้อเจริญได้ดีเช่นกัน และมีการสร้างสปอร์แต่มีจำนวนน้อย อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสปอร์ดีที่สุดคือ VJA สูตรดัดแปลง โดยใช้น้ำมะเขือเทศกระป๋องแทน สปอร์มีขนาดต่างๆกันและมีจำนวนมาก จากการทดลองพบว่า เชื้ออายุ 7 วัน เหมาะสำหรับทำ spore suspension เพราะเป็นระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญดีที่สุด สร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก ส่วนการเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดสารพิษนั้น พบว่าการเลี้ยงในอาหาร MA เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ตาม Kuyama and Tamura (1957) นั้น เชื้อมีการเจริญดี แต่ไม่สร้างสปอร์เลยและจากการสกัดสารจากเส้นใยของเชื้อด้วยเอทธิลอีเทอร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ได้สารสีแดงเข้ม สารนี้ส่วนใหญ่เป็นสาร Cercosporin แต่การทดลองนี้ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ เพียงแต่นำไปทดสอบความเป็นพิษบนใบของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 60 วัน พบว่าทุกความเข้มข้นสามารถทำให้เกิดโรคได้ ในระดับ 2 และ3 เป็นจำนวนมาก แต่ระดับ 4 และ 5 เกิดน้อย อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมไม่เหมาะ สำหรับการก่อให้เกิดโรค หรืออาจเป็นเพราะสารที่ใช้มีความเข้มข้นน้อยเกินไป อาการจึงไม่แสดงออกมากนัก จะแสดงออกอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ได้ทดสอบเฉพาะกับใบ แล้วให้แสงสว่างตลอดเวลา ณ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าใบยาสูบเกิดอาการมาก และสังเกตจุดได้ชัดเจนขึ้น ลักษณะของจุดไม่แตกต่างกัน ได้ผลตรงกับ Balis and Payne (1971) ซึ่งได้แยกสารพิษ cercosporin จากใบ sugar beet แล้วนำมาทดสอบกับใบอีกครั้ง ปรากฏว่าเกิดอาการของโรคขึ้น การที่พืชเป็นโรคได้นั้นมิใช่เกิดจากตัวเชื้อเข้าทำลายพืชอาศัยอย่างเดียว แต่จะเกิดร่วมกับสารบางชนิดที่เชื้อผลิตขึ้นมาด้วย ทำให้พืชมีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้นเกิดอาการเหี่ยว การแบ่งเซลล์ และการเจริญผิดปกติ ส่วนประกอบของเซลล์บางส่วน เช่น คลอโรฟิลล์ ถูกทำลาย พืชจึงแสดงอาการใบจุด ตามที่ ไพโรจน์ จำวงพานิช (2522) และพรทิพย์ ธนูทอ และคณะ (2528) รายงาน

เมื่อมีการปลูกเชื้อบนพืช เส้นใย และสปอร์จะเจาะผ่านทางคิวติเคิล บาดแผล หรือรูเปิดตามธรรมชาติ เช่น ปากใบ เลนติเซล จากนั้นจะมีการฟักตัว และเจริญลุกลามอยู่ในเนื้อเยื่อพืช เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ ขยายปริมาณมากขึ้นโดยการเจริญออกทางปลายเส้นใย มีการแตกกิ่งก้านสาขา สร้างฮอสตอเรียมขึ้น ตรงส่วนที่แก่ของเส้นใย โดยใช้สารประกอบต่างๆ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และโคแฟกเตอร์ สำหรับการเจริญซึ่งได้จากการสลายตัวของส่วนประกอบ

ของเซลล์พืช เช่น โปรตีน เมมเบรน เซลลูโลส และแพคติน เป็นต้น

4. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการก่อให้เกิดโรค

จากการทดสอบด้วย spore suspension โดยการฉีดพ่นบนใบของต้นกล้า อายุ 60วัน ในเวลา 7 วัน อาการของโรคยังไม่แสดงออกอย่างเด่นชัด การใช้ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 10 x 2.5 x 10^5 และ 20 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร อาการของโรคส่วนใหญ่แสดงในระดับ 1 ถึง 3 คือ มีความต้านทานสูง ถึง ปานกลาง แต่ในเวลา 10 วัน อาการของโรคจะเพิ่มขึ้น และทุกความเข้มข้นของสปอร์ สามารถทำให้เกิดโรคได้ในระดับต่างๆมากขึ้น แต่ใน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร สามารถทำให้ต้นยาสูบส่วนใหญ่เกิดเป็นโรคระดับ 4 และ 5 ได้ดีที่สุด ซึ่งถือว่ามีความต้านทานโรคต่ำ จนถึงไม่มีความต้านทานโรคเลย และผลการทดสอบทางสถิติปรากฏว่าที่ปริมาณของสปอร์ 10 และ 40 x 2.5 x 10^5 การเกิดโรค (จำนวนแผล) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเป็นการเพียงพอสำหรับนำ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x2.5x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร นี้ไปใช้ทดสอบความต้านทานโรค

5. การคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension และสารพิษ

จากการเลี้ยงแคลลัสเจริญ จากส่วนของก้านใบ ในอาหาร MS สูตรชักนำแคลลัส ผสม spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ ตั้งแต่ 0 10 20 30 และ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เกิดอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายใน7วันและเมื่อนำแคลลัสที่เหลือรอด เลี้ยงในอาหารสูตรชักนำต้น เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่มีน้อยมาก และมีการเจริญเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแคลลัสมีลักษณะอ่อนนิ่ม เมื่อใส่ spore suspension ลงไป เชื้อจึงเข้าทำลายได้ง่าย แม้บางแคลลัส สีภายนอกยังคงสดใส หรือคล้ำเล็กน้อย แต่ภายในมีเชื้อเข้าทำลาย ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหาย ไม่อาจเจริญเป็นต้นใหม่ได้ และอาจเนื่องจากการกำจัดเชื้อปนเปื้อนให้หมด ต้องใช้คลอร็อกซ์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 15-30 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้แคลลัสไม่สามารถต้านทานได้ เมื่อนำไปเลี้ยงจึงไม่เจริญเป็นต้น แต่มีบางแคลลัสที่เหลือรอดและสามารถชักนำเป็นต้นได้โดยได้จากการใส่ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 10 และ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ส่วนจากการใส่ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร สามารถชักนำเป็นต้นได้ แต่เกิดการปนเปื้อนเสียก่อน ดังนั้นจึงถือได้ว่าแคลลัสที่ได้มีความต้านทานต่อ spore suspension และต่อสารคลอร็อกซ์ด้วย การเจริญเป็นต้นใหม่พบว่ามีการเจริญเปลี่ยนแปลงช้ามาก ต้นมีลักษณะหงิกงอผิดปกติต้องย้ายลงอาหาร

ใหม่หลายครั้งกว่าจะได้ต้นปกติ อายุประมาณ 12 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการใช้ spore suspension เป็นตัวคัดเลือกความต้านทาน มีผลต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของแคลลัส และต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อใหม่ด้วย และต้นที่ได้จากการเลี้ยงแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension ไม่แตกต่างจากต้นที่เกิดจากแคลลัส control

ส่วนการเลี้ยงแคลลัสที่ต้านทานสารพิษความเข้มข้นตั้งแต่ 0 0.5 1 2 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ก็เช่นเดียวกัน เกิดอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลตรงกับ Daub (1982) ซึ่งได้นำสาร cercosporin จากเชื้อรา C. beticola และ C. nicotianae Ell & Ev. ทดสอบกับแคลลัสยาสูบพันธุ์ Wisconsin 38 โดยเลี้ยงแบบ suspension culture พบว่าสามารถทำให้เซลล์ของยาสูบเกิดการตายได้ จากการทดลองนี้มีเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดน้อยและเปอร์เซ็นต์การชักนำเป็นต้นยิ่งน้อยมีเฉพาะแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถชักนำเป็นต้นใหม่ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ใช้มากเกินไปจึงทำให้สารพิษแพร่กระจายเข้าภายในเซลล์เนื้อเยื่อ จึงเกิดการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อขึ้น

6. การคัดเลือกต้นที่มีความต้านทานโรค

6.1 จากการทดสอบความต้านทานโรคกับต้นที่เกิดจากแคลลัสด้วยspore suspension เป็นเวลา 7 วัน บางต้นไม่เกิดโรค บางต้นมีความต้านทานโรคสูง บางต้นมีความต้านทานปานกลาง แต่บางต้นมีความต้านทานต่ำ จนถึงไม่มีความต้านทานเลย แต่เมื่อ 10 วัน ปรากฏว่าอาการของโรคเพิ่มขึ้นเกิดโรคระดับ 3 และ 4 คือมีความต้านทานปานกลาง และมีความต้านทานต่ำ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีต้นที่มีความต้านทานสูงมากประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าระยะเวลาของการ inoculate เชื้อนั้นสั้นเกินไป (7วัน) เชื้อยังไม่เข้าทำลายพืชทันทีอีกทั้งมีพืชบางต้นที่แข็งแรง มีความต้านทานต่อโรค อาการของโรคจึงไม่แสดงออกอย่างเด่นชัด แต่ในเวลา 10 วัน สภาพแวดล้อมตลอดจนระยะเวลาเหมาะสม อาการของโรคจึงแสดงออกมากขึ้น แต่มีต้นพืชที่มีความต้านทานโรคสูง จะแสดงอาการเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ภายหลังการทดสอบความต้านทานซ้ำกับต้นที่เกิดโรคระดับ 1 และ 2 ปรากฏว่า ต้นยาสูบแสดงอาการเป็นโรคเพิ่มขึ้นไม่มีต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมากเหลืออยู่เลย ส่วนมากมีความต้านทานโรคปานกลาง จนถึงมีความต้านทานต่ำ ได้ต้นที่มีความต้านทานสูง 2 ต้น จากจำนวนต้นที่ใช้ทดสอบ 100 ต้น จึงได้นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่อีกครั้ง โดยใช้ส่วนของลำต้นอ่อน สามารถชักนำเป็นต้นได้ แต่มีการปนเปื้อนสูงทั้งนี้เพราะพืชที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ ย่อมมีเชื้อหลายชนิดเกาะติดตามส่วนต่างๆมากกว่าต้นพืชที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ การเจริญและการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่นั้นไม่แตกต่างกับเมื่อเลี้ยงครั้งแรก ใช้เวลาประมาณ 9 สัปดาห์ จึงได้ต้นยาสูบที่สมบูรณ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพธรรมชาติ ภายหลังการทดสอบความต้านทานโรคซ้ำอีกครั้ง พบว่า

เกิดโรคระดับ 2 เป็นจำนวนมาก มีต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมาก 33.33 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีต้นเป็นโรคระดับ 5เลย ภายในเวลา 8 วัน แต่เมื่อเวลา 10 วัน จำนวนต้นเป็นโรคเพิ่มขึ้นส่วนมากอยู่ในระดับ 3 และ 4 มีต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมาก 3.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความต้านทานซ้ำ ปรากฏว่าไม่มีต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมากเหลืออยู่เลย เหลือต้นที่มีความต้านทานสูง 3.33 เปอร์เซ็นต์ ความต้านทานส่วนใหญ่อยู่ในระดับปานกลาง การเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 นี้ การเกิดโรคระดับต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นที่ต้านทานโรคกลับมีความต้านทานเพิ่มขึ้นในบางต้น แต่บางต้นก็ไม่มีความต้านทาน

6.2 ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ภายหลังการทดสอบความต้านทานซ้ำ ปรากฏว่าเกิดโรคภายในเวลา 8 วันเช่นกัน มีความต้านทานโรคสูง ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเวลา 10 วัน ปรากฏว่าต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมากมีเพียง 3.33 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนใหญ่มีต้นที่มีความต้านทานต่ำ 31.67 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ไม่มีความต้านทานเลยมีถึง 20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบความต้านทานซ้ำ ได้ต้นที่มีความต้านทานปานกลาง คือ เกิดโรคระดับ 3 ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีต้นที่มีความต้านทานสูง และสูงมากเลย

6.3 ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังทดสอบความต้านทาน เป็นเวลา 8 วัน มีต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมาก ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีต้นที่เกิดโรค ระดับ 5 เลย ทั้งนี้เพราะระยะเวลาของการ inoculate เชื้อนั้นสั้นเกินไป เชื้อจึงยังไม่เข้าทำลายพืชทันที และเมื่อทดสอบความต้านทานซ้ำ ต้นยาสูบส่วนใหญ่มีความต้านทานโรคปานกลาง ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีต้นที่มีความต้านทานโรคสูง และสูงมากเลย เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ได้ต้นที่ต้านทานโรคสูง ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่มีความต้านทานโรคปานกลาง ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องมาจากความเข้มข้นของสารพิษที่ใช้ทดสอบความต้านทานโรค ขณะที่เป็นแคลลัสนั้นไม่แตกต่างกันมากนัก

6.4 เมื่อนำต้นที่มีความต้านทานโรคสูงคือ เกิดโรคระดับ 2 จากต้นที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นที่เป็นโรคระดับ 2 ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่เป็นโรคระดับ 3 จากต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร และต้นที่เกิดจากการเพาะเมล็ดชนิดละ 1 ต้น มาศึกษาโครโมโซม พบว่าไม่สามารถศึกษาได้ เพราะเซลล์ของรากได้เปลี่ยนแปลงไปหมดแล้ว (inactive) จึงตัดส่วนโคนล่าต้นสูงจากพื้นดินประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปปักชำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในวัสดุ vermiculite รดด้วยน้ำปุ๋ยสูตร MS เป็นเวลา 3 วัน พบว่ารากมีการเจริญและแข็งแรงดี มีสีขาว จึงตัดปลายรากมาศึกษาโครโมโซมโดยวิธี Feulgen squash method และเมื่อตรวจดูลักษณะและนับจำนวนโครโมโซมของต้นที่มีความต้านทานโรค พบว่ามีลักษณะและจำนวนปกติคือ 2n = 48 (Darlington, 1955) เช่นเดียวกับต้นที่เกิดจากการเพาะเมล็ด ซึ่งได้ผลตรงตามที่ พรทิพย์ ธนุทอง และคณะ (2528) ได้ศึกษาสายพันธุ์ยาสูบต้านทานโรคใบจุดและใบไหม้ ซึ่งไม่มีความแตกต่างในระดับโครโมโซมเช่นกัน การศึกษาโดยดูลักษณะและจำนวนโครโมโซมไม่สามารถจะใช้พิสูจน์ถึงความต้านทานโรคได้ เพราะการแปรอาจไม่ได้แสดงออกในระดับโครโมโซมแต่อาจอยู่ในระดับยีนก็เป็นได้ คงต้องหาวิธีตรวจสอบที่เหมาะสม เช่น วิเคราะห์ด้วยไอโซไซม์ หรือ โดยการนำเมล็ดของต้นที่ต้านทานโรคไปปลูกและทดสอบความต้านทานซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย