หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 พืชทดลอง เมล็ดยาสูบ (N. tabacum L.) พันธุ์เวอร์จิเนีย โคเกอร์ 347 และใบยาสูบที่เป็นโรคดากบจากสถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

1.2 อาหารและสารเคมี

1.2.1 สารอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ ได้แก่ สารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (macronutrient elements) สารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (micronutrient elements) วิตามิน วุ้นอาหาร น้ำตาลทราย และสารควบคุมการเจริญตามสูตรอาหารของ Murashige and Skoog ซึ่งแบ่งเป็น

1.2.1.1 อาหารสำหรับชักนำให้เกิดแคลลัส เติม indole-3-acetic acid (IAA) ปริมาณ 1.9 มิลลิกรัม และ kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.1.2 อาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้น เติม naphthalene-acetic acid (NAA) ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม และ 6-benzyl aminopurine (BAP) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.1.3 อาหารสำหรับชักนำให้เกิดราก เติม NAA ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา

1.2.2.1 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา Cercospora nicotianae Ell & Ev. เพื่อการผลิตสารพิษใช้ Malt extract agar(MA) ตาม Kuyama and Tamura (1957)

1.2.2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา เพื่อการผลิตสปอร์ ใช้ V-8-juice agar (VJA) ดัดแปลงใช้น้ำมะเขือเทศกระป๋องแทน

1.3 สารอื่นๆ ได้แก่ คลอร็อกซ์ 10 15 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ทวีน-20 เอทธิลอีเทอร์ และแลกโตฟีนอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

2.1.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 120 และ 250 มิลลิลิตร ขวดแก้วฝาเกลียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 7 เซนติเมตร และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร

2.1.2 ชั้นสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ชั้นมืด และชั้นสว่าง ความเข้มแสง 1200 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิประมาณ 23-25 องศาเซลเซียส และหลอดไฟ grow lux

2.1.3 อุปกรณ์อื่น ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (lamina flow) หม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เตาไมโครเวฟ เครื่องเขย่าความเร็วประมาณ 125 รอบต่อนาที ปากคีบ มีดผ่าตัดเบอร์ 3 ใบมีดเบอร์ 11 อลูมินัมฟอยล์ กระบอกตวงพลาสติก ขนาด 1000 และ 3000 มิลลิลิตร

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา

2.2.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 2 เซนติเมตร ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร กระบอกแก้วตวง ขนาด 100 และ 200 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์ กระจกปิดทับสไลด์ (cover glass) สไลด์สำหรับนับสปอร์

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ตู้ถ่ายเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ เตาไฟฟ้า เครื่องชั่งธรรมดา หม้อสำหรับต้มอาหาร สำลี คอร์ก บอเรอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร กล้องจุลทรรศน์

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับการสกัดสาร ได้แก่ เครื่องปั่นน้ำผลไม้ เครื่อง Soxhlet apparatus เครื่องระเหยสาร เครื่องกรองมิลลิพอร์ พร้อมกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ผ้าขาวบาง

2.2.4 อุปกรณ์สำหรับการ inoculate เชื้อ ได้แก่ กระบอกฉีดน้ำพลาสติก ผงกากเพชร (carborandum) ถุงพลาสติก ขนาด 4 X 6 นิ้ว

2.2.5 วัสดุอุปกรณ์ในการปลูก ได้แก่ ตะแกรงพลาสติกขนาด 40X50X17 เซนติเมตร ถุงพลาสติก ขนาด 5X7 นิ้ว ดินขุยไผ่ ดินธรรมดา ทรายหยาบ ขุยมะพร้าว ปุ๋ยอินทรีย์ กทม. ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 สารละลายอาหารสูตรตาม MS

2.3 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาโครโมโซม

2.3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบคอมเพานด์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.3.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ตัวอย่าง ได้แก่ water bath vial จานแก้ว สไลด์และแผ่นแก้วปิด กรรไกร ปากคีบ เข็มเขี่ย และยาทาเล็บ

2.3.3 สารเคมี (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก.) ได้แก่ Alphabromo napthalene, Acetic acid 90 %, Normal hydrochloric acid, Schiff's reagent และ Propiono-carmine 2 %

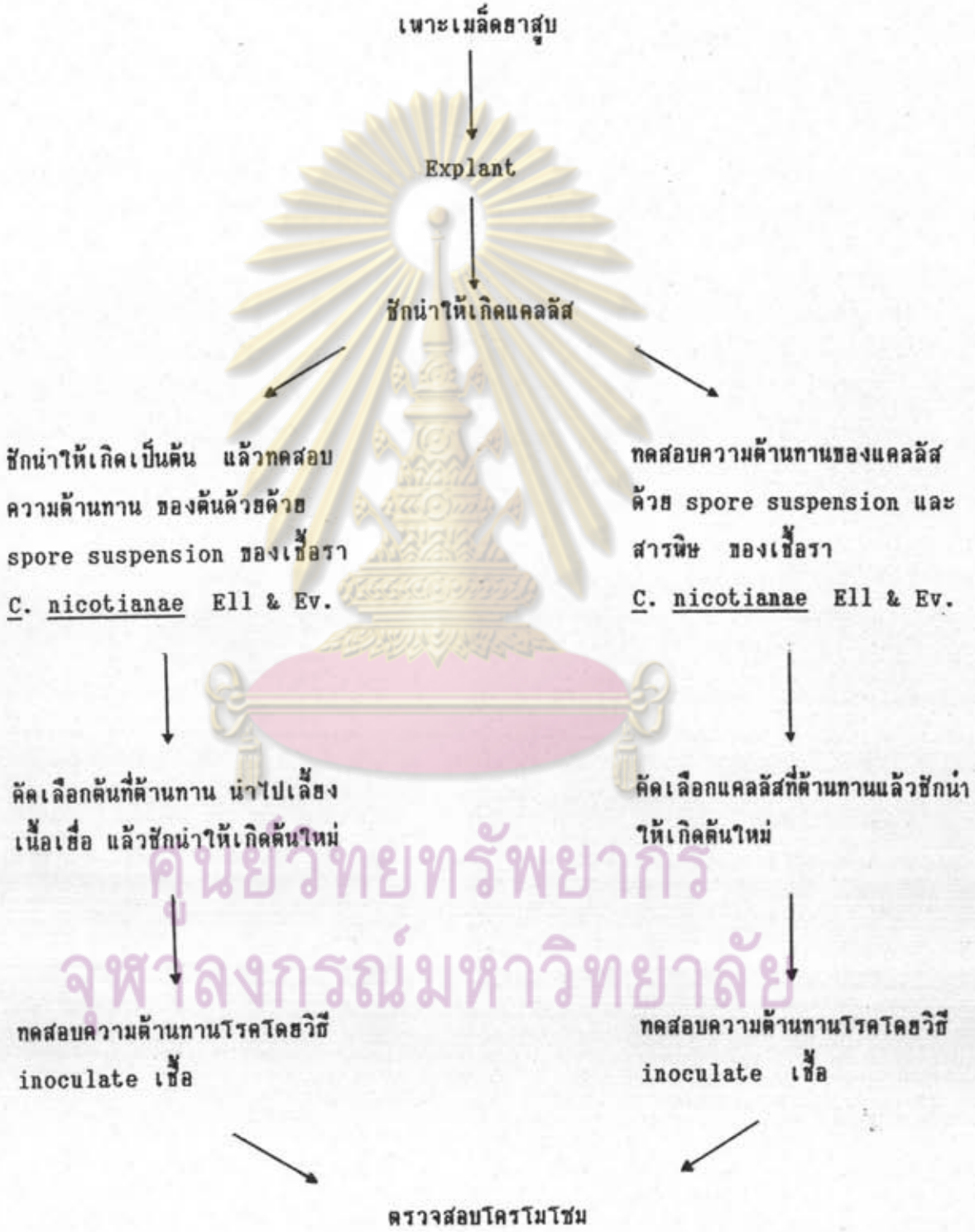
สถานที่ทำการทดลอง

ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เรือนกระจก และบริเวณด้านหลังเรือนกระจก ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีดำเนินการทดลอง

ได้ดำเนินการทดลอง ดังต่อไปนี้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

3.1.1 เพาะเมล็ดยาสูบ (N. tabacum L.) พันธุ์เวอร์จิเนีย โคเกอร์ 347 ซึ่งเป็นพันธุ์ทางการค้า เนื่องจากเมล็ดยาสูบมีขนาดเล็กมาก และมีน้ำหนักเบา ก่อนเพาะจึงต้องแช่เมล็ดในน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อทำลายระยะพักตัว (dormancy) และทำให้เปลือกเมล็ดอ่อนนุ่ม เป็นการกระตุ้นให้เกิดต้นได้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ ในขวดแก้วรูปชมพู่ บรรจุอาหารกึ่งแข็ง สูตร MS ไม่เติมฮอร์โมน ปริมาณ 75 มิลลิลิตร เพาะเมล็ดขวดละ 10 เมล็ด เลี้ยงบนชั้นสว่าง 1200 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ ประมาณ 23-25 องศาเซลเซียส จนเจริญเป็นต้นกล้า อายุ 6 สัปดาห์

3.1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส

นำต้นกล้ายาสูบที่มีขนาดลำต้นสม่ำเสมอ จากข้อ 3.1.1 ตัดส่วนลำต้นอ่อน และก้านใบ ออกเป็นท่อนๆละ ประมาณ 0.5 เซนติเมตร สำหรับใบกรีดตามแนวยาว 2 รอย เพื่อให้เกิดแผล เลี้ยงชิ้นส่วนเหล่านี้ ในขวดแก้วฝาเกลียว บรรจุอาหารกึ่งแข็ง สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ขวดละ 20 มิลลิลิตร ต่อ ลำต้น ก้านใบอย่างละ 4 ชิ้น ใบ 2 ชิ้น เลี้ยงเนื้อเยื่อบนชั้นมืด (ตู้กระจกบุด้วยกระดาษสีดำ) อุณหภูมิประมาณ 23-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนชั้นสว่าง ความเข้มแสง 1200 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิเท่าเดิม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสที่ได้ลงเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดียวกัน บันทึกผลเมื่อ 2 4 และ 6 สัปดาห์

3.1.3 การชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้น

ใช้แคลลัสยาสูบที่เกิดจากส่วนของลำต้น และก้านใบ อายุ 4 สัปดาห์ ที่มีลักษณะเกาะกลุ่มกันแน่น ตัดแบ่งเป็นก้อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 0.15 กรัม เลี้ยงในขวดแก้วฝาเกลียว บรรจุอาหารกึ่งแข็งสูตรชักนำต้น ขวดละ 30 มิลลิลิตร ต่อ แคลลัส 4 ก้อน เปรียบเทียบกับแคลลัสที่สับเป็นชิ้นเล็กๆ จากแคลลัสขนาดเดียวกัน เลี้ยงบนชั้นสว่าง อุณหภูมิและสภาพแวดล้อมเหมือนเดิมเพิ่มแสง grow lux เพื่อเร่งการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เลือกเฉพาะแคลลัสที่เกิดจุดเขียว (green spots) และเกิดยอด ลงเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดียวกัน จนเจริญเป็นต้นยาสูบอายุ ประมาณ 6 สัปดาห์ จากนั้นตัดเฉพาะส่วนของต้น เลี้ยงในขวดแก้วฝาเกลียว บรรจุอาหารกึ่งแข็งสูตรชักนำราก ขวดละ 30 มิลลิลิตร ต่อ 3 ต้น จนกระทั่งต้นยาสูบเจริญจนมีรากเกิดขึ้นนาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 สัปดาห์ จะได้ต้นยาสูบที่สมบูรณ์ซึ่งพร้อมจะนำออกปลูกภายนอกได้ อายุ 9 สัปดาห์

3.2 การเลี้ยงเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev.

3.2.1 แยกเชื้อรา

3.2.1.1 ตรวจสอบเชื้อราจากใบยาสูบที่เป็นโรคตากบตามธรรมชาติ โดยตัด section ตรงบริเวณรอยแผลที่แสดงลักษณะอาการของโรค ตรวจสอบเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตามคีย์ของ Chupp (1953)

3.2.1.2 ตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลดังกล่าวเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แช่ในคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 ครั้ง เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อโดยวิธี moist chamber จนกระทั่งเชื้อราเจริญขึ้น ประมาณ 2-3 วัน

3.2.1.3 เลี้ยงเชื้อราในอาหารกึ่งแข็ง VJA สูตรดัดแปลงเพื่อให้สร้างสปอร์

3.2.1.4 ตรวจสอบเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.2 การเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์เพื่อทำ spore suspension และสกัดสารพิษ

3.2.2.1 การทำ spore suspension ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยเส้นใยเชื้อราที่ตรวจสอบแล้วว่า มีการสร้างสปอร์ จากข้อ 3.2.1.3 เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อบรรจุอาหารกึ่งแข็ง VJA สูตรดัดแปลง ปริมาณจานละ 15 มิลลิลิตร ในที่มืด อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพิ่มปริมาณเชื้อราโดยใช้ cork boror เจาะรอบๆโคโลนีของเชื้อ เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อบรรจุอาหารกึ่งแข็งสูตรเดียวกัน ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ต่อเชื้อรา 1 แว่น อุณหภูมิและสภาพแวดล้อมเหมือนเดิม เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อรานี้ไปทำ spore suspension โดยใช้น้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อเชื้อรา 1 จานเลี้ยงเชื้อ เป็นจำนวน 10 จานเลี้ยงเชื้อ ตรวจนับจำนวนสปอร์ ต่อ 1 มิลลิลิตร ทดสอบหาปริมาณของ spore suspension ที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาณของ spore suspension เป็น 0 10 20 30 และ 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมลงในสูตรอาหาร MS 100 มิลลิลิตร

3.2.2.2 การสกัดสารพิษ ใช้ cork boror เจาะเชื้อราจากข้อ 3.2.2.1 โดยวิธีเดียวกัน เลี้ยงในขวดแก้วรูปชมพู่บรรจุอาหารกึ่งแข็ง MA ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ต่อ เชื้อรา 3 แว่น ในที่มีแสงสว่าง อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ นำเชื้อราที่ได้สกัดสารพิษ ดัดแปลงวิธีการของ Kuyama and Tamura

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(1957) แต่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเครื่องมือ Soxhlet apparatus โดยบดเส้นใยของเชื้อด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ให้ละเอียด สกัดด้วยเอทธิลอีเทอร์ ปริมาณ ครั้งละ 100 มิลลิลิตร ต่อ ปริมาณเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร 500 มิลลิลิตร อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ระเหยสารเอทธิลอีเทอร์ออกจนเหลือเฉพาะสารที่ถูกสกัด นำไปทดสอบความเป็นพิษกับต้นยาสูบปกติ และใช้เป็นสารคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานโรคต่อไป

3.2.3 การพิสูจน์โรคตากบที่เกิดจากเชื้อ C. nicotianae Ell & Ev. โดยใช้ spore suspension และสารพิษกับต้นกล้ายาสูบปกติ

3.2.3.1 ใช้ spore suspension ของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. อายุ 7 วัน ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 0 10 20 30 และ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ตามลำดับ ทดสอบกับต้นกล้ายาสูบปกติ ซึ่งเพาะจากเมล็ดอายุ 60 วัน ที่ปลูกในวัสดุที่ฆ่าเชื้อแล้ว การทดลองนี้เลือกใช้ใบยาสูบใบที่ 5 นับจากใบยอดลงมา ต้นละ 1 ใบ ใช้สำลีชุบผงถ่านกัมเพชรผสมน้ำพอเปียกชื้น ทาเบาๆให้ทั่วด้านบนของผิวหน้าใบ เพื่อทำให้เกิดรอยแผล ปริมาณใบละเท่าๆกัน ฉีดพ่นด้วย spore suspension 2 มิลลิลิตร ต่อใบ (ฉีด 2 ครั้งๆละเท่าๆกัน) คลุมใบด้วยถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำวันละ 1 ครั้ง สังเกตลักษณะอาการและบันทึกผล ทำ 5 การทดลองๆละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น

3.2.3.2 ใช้สารพิษที่สกัดได้จากเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 0.5 1 2 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทดสอบกับใบยาสูบใบที่ 5 เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 โดยวิธีแรกทดสอบกับใบบนต้นยาสูบในสภาพธรรมชาติ ด้วยการใช้สำลีชุบสารพิษ แต่ละความเข้มข้นทาให้ทั่วด้านบนของผิวใบซึ่งทำให้เกิดรอยแผลด้วยผงถ่านกัมเพชร คลุมใบด้วยถุงพลาสติก ทำ 6 การทดลองๆละ 2 ซ้ำๆละ 10 ต้น และวิธีที่สองเฉพาะใบด้วยวิธีการเช่นเดียวกันแต่ให้แสงสว่างตลอดเวลา อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะอาการและบันทึกผล ทำ 6 การทดลองๆละ 2 ซ้ำๆละ 10 ใบ

3.3 การคัดเลือกแคลลัสต้านทาน

3.3.1 คัดเลือกแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension

ใช้แคลลัสยาสูบที่เกิดจากส่วนของก้านใบ อายุ 4 สัปดาห์ ที่มีลักษณะแข็งแรงและเกาะกลุ่มกันแน่น ตัดแบ่งเป็นก้อนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขวดละ 4 ก้อน กรอง spore suspension ด้วยผ้าขาวบาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อกำจัดเส้นใยเชื้อ ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ผสมกับอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัส ขวดละ 100 มิลลิลิตร ในปริมาณต่าง ๆ กัน จากนั้นใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวที่มีแคลลัสดังกล่าว ปริมาณ 15 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 125 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง ลักษณะ สี อัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD 50) ของแคลลัส ทำ 5 การทดลองๆละ 5 ซ้ำๆละ 20 ขวด (การทดลองละ 400 แคลลัส) คัดเลือกแคลลัสที่เหลือรอด ล้างด้วยคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 15 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดเชื้อ ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง นำไปเลี้ยงในขวดแก้วฝาเกลียวที่บรรจุอาหารกึ่งแข็งสูตรชักนำต้น ขวดละ 30 มิลลิลิตร วางบนชั้นสว่าง ความเข้มแสง 1200 ลักซ์ เพิ่มแสง grow lux ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อ วัน อุณหภูมิประมาณ 23-25 องศาเซลเซียส จนแคลลัสเจริญเป็นต้นใหม่ เลี้ยงต้นที่ได้ในขวดแก้วฝาเกลียวบรรจุอาหารแข็งสูตรชักนำราก ขวดละ 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำออกปลูกเพื่อทดสอบความต้านทานโรค ซ้ำอีกครั้ง

3.3.2 <u>คัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ</u>

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 แต่ใช้สารพิษที่สกัดได้จากเชื้อรา <u>C. nicotianae</u> Ell & Ev. ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 1 2 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วยเครื่องกรอง ซึ่งใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ผสมกับอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัส ขวดละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียว ขวดละ 15 มิลลิลิตร ต่อแคลลัส 4 ก้อน วางบนเครื่องเขย่าเช่นเดียวกัน อุณหภูมิและสภาพแวดล้อมเหมือนเดิม สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะ สี อัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของแคลลัส ทำ 6 การทดลองๆละ 5 ซ้ำๆละ 10 ขวด (การทดลองละ 200 แคลลัส) คัดเลือกแคลลัสที่เหลือรอด ล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 ครั้ง ชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1

3.4 <u>การคัดเลือกต้นต้านทาน</u>

3.4.1 <u>คัดเลือกต้นที่ต้านทานจากต้นที่เจริญจากแคลลัสโดยตรง</u>

3.4.2 <u>คัดเลือกต้นที่ต้านทานจากต้นที่เจริญจากแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension</u>

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.3 <u>คัดเลือกต้นที่ต้านทานจากต้นที่เจริญจากแคลลัสที่ต้านทาน สารพิษ</u>

ปลูกต้นยาสูบที่เจริญจากแคลลัสโดยตรง ซึ่งได้จากส่วนของก้านใบ และลำต้น ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension และจากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ โดยนำต้นออกจากขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ล้างวุ้นที่ติดอยู่กับรากออกให้หมด ปลูกในตะแกรงพลาสติกที่ประกอบด้วย ดินขุยไผ่ : ดินธรรมดา : ทรายหยาบ : ปุ๋ยอินทรีย์ กทม. อัตราส่วน 2:1:1:1 ที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุเพาะปลูกโรยด้วยขุยมะพร้าวรอบๆโคนต้นให้ทั่วเพื่อรักษาความชื้น ปลูกตะแกรงละ 15 ต้น ดังนี้

ชนิด	ต้นที่เจริญจากแคลลัส	ต้นที่เจริญจากแคลลัสต้านทาน spore suspension	ต้นที่เจริญจากแคลลัสต้านทานสารพิษ	รวม
จำนวนตะแกรง	16	8	6	30
จำนวนต้น	240	120	90	450

วางไว้ในที่ร่ม บริเวณด้านหลังเรือนกระจก เพื่อให้ต้นพืชปรับตัวเข้ากับสภาพภายนอก เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปไว้ในเรือนกระจกที่มีแสงสว่าง รดด้วยสารละลายปุ๋ย MS ไม่เติมฮอร์โมนสัปดาห์ละ 1 ครั้ง พรวนดินเพื่อไม่ให้ดินแน่นเกินไปรดน้ำวันละ 1 ครั้งจนกระทั่งต้นยาสูบเจริญเติบโตดี ประมาณ 3 สัปดาห์ จึงนำออกปลูกในถ้วยพลาสติก หรือถุงพลาสติก ซึ่งเจาะรูบริเวณด้านล่าง 4 รู บรรจุวัสดุเพาะปลูกเช่นเดียวกัน รดน้ำวันละ 1 ครั้ง และรดด้วยน้ำปุ๋ยสูตร 15-15-15 2 สัปดาห์ ต่อ 1 ครั้ง จนต้นยาสูบเจริญมีขนาดความสูงวัดจากโคนต้นจนถึงปลายใบยอด ประมาณ 8-10 เซนติเมตร คัดเลือกต้นที่ต้านทานโดยใช้ปริมาณที่เหมาะสมของ spore suspension (วิธี inoculate เชื้อ)จากการทดลอง ข้อ 3.2.3.1

สำหรับการคัดเลือกต้นต้านทานจากต้นที่เจริญจากแคลลัสโดยตรง (ข้อ 3.4.1) เมื่อได้ต้นที่ต้านทานโรค นำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่อีกครั้ง แล้วจึงทดสอบความต้านทานโรคตากบซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ spore suspension ที่มีปริมาณของสปอร์มากพอที่จะทำให้เกิดโรคได้มากที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 วิธีการศึกษาโครโมโซมของยาสูบจากเซลล์ปลายรากในระยะ metaphase

3.5.1 ตัดปลายรากที่มีสีขาวใสยาวประมาณ 1 เซนติเมตรใส่ลงใน treatment solution (2.1) ทิ้งไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้การแบ่งนิวเคลียสของเซลล์หยุดอยู่ในระยะ metaphase และทำให้โครโมโซมหดตัว สะดวกต่อการศึกษารูปร่าง และจำนวนโครโมโซม

3.5.2 เท treatment ทิ้ง แล้ว fix รากด้วย fixing solution (2.2) เป็น เวลา 30 นาที ล้างด้วย เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 % เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

3.5.3 การเตรียมสไลด์โดยนำรากที่แช่ใน เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 % ล้างด้วยน้ำ 2-3 ครั้ง แล้ว hydrolyse ด้วย 1 N.HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แช่ใน schiff's reagent ประมาณ 30-60 นาที ใช้เข็มตัดปลายรากบริเวณที่ติดสีเข้มวางบนสไลด์ หยดสี propionocarmine 1 หยด ปิดทับด้วย cover glass ใช้ปลายดินสอด้านที่ปลายราบเคาะบน cover glass ที่มีกระดาษซับรองอยู่ 2-3 ชั้น เพื่อช่วยให้เซลล์และโครโมโซมกระจายออกจากกัน กดด้วยนิ้วหัวแม่มือ เพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย