บทที่ 3

ผลการทดลอง

การศึกษาเกี่ยวกับการหาพันธุ์ต้านทานโรคดากบของยาสูบ (N. tabacum L.) พันธุ์เวอร์จิเนียโคเกอร์ 347 ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ได้แบ่งการรายงานผลออกเป็นตอน ๆ ดังต่อไปนี้

ตอนที่ 1 การทดสอบความต้านทานโรคของต้นยาสูบที่เจริญจากแคลลัส

1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบโดยชักนำให้เกิดแคลลัส

1.2 การชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่

1.3 การทดสอบความต้านทานโรค โดยวิธี inoculate เชื้อ

1.4 การนำต้นที่ต้านทานโรคมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วชักนำให้เกิดต้นใหม่อีกครั้ง

1.5 การทดสอบต้นที่ต้านทานโรค โดยวิธี inoculate เชื้อซ้ำอีกครั้ง

ตอนที่ 2. การทดสอบความต้านทานโรคในระยะที่ยาสูบยังเป็นแคลลัส

2.1 การทดสอบความต้านทานของแคลลัสต่อ spore suspension และสารพิษของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev.

2.2 การคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานแล้วชักนำให้เกิดต้นใหม่

2.3 การทดสอบต้นที่ต้านทานโรค โดยวิธี inoculate เชื้อซ้ำอีกครั้ง

2.4 ตรวจสอบโครโมโซม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองตอนที่ 1 การทดสอบความต้านทานโรคของต้นยาสูบที่เจริญจากแคลลัส

1.1 การเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัส

จากการใช้ส่วนของลำต้น ก้านใบ และใบยาสูบที่มีอายุ 6 สัปดาห์ความสูงของลำต้นประมาณ 1-2 เซนติเมตร ก้านใบยาวประมาณ 1-1.7 เซนติเมตร มีใบ 6-7 ใบ (ภาพที่ 1) นำชิ้นส่วนไปเลี้ยง ในอาหารกึ่งแข็ง MS ไม่เติมฮอร์โมน โดยเลี้ยงในที่มืด 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปเลี้ยงในที่สว่างวัดผลการเจริญในสัปดาห์ที่ 2 4 และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ ได้ผลดังนี้

ปลายสัปดาห์ที่ 2 แคลลัสที่เกิดจากส่วนของลำต้น มีลักษณะฟู ใส มีสีขาวอมเหลือง และเป็นก้อน แคลลัสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร มีประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ มีบางแคลลัสเจริญเป็นต้นมีความสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร มี 20.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2) การเกิดแคลลัสมีประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์

สำหรับแคลลัสที่เกิดจากส่วนของก้านใบ พบว่ามีขนาดเล็กกว่าแคลลัสที่เกิดจากส่วนของลำต้น ขนาดใหญ่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.7 เซนติเมตร มีประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ และเกิดเป็นแคลลัสได้ประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์ และบางแคลลัสเจริญเป็นต้นได้เช่นเดียวกับแคลลัสจากส่วนของลำต้น มี 17.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2)

ส่วนแคลลัสที่เกิดจากใบ พบว่าเจริญเป็นแคลลัสได้ขนาดใกล้เคียงกับส่วนของก้านใบ แต่มีเปอร์เซ็นต์การเจริญน้อยกว่า และแคลลัสที่เกิดจากใบ อายุ 2 สัปดาห์ ยังไม่เกิดเป็นต้นเลย (ภาพที่ 3) การเกิดแคลลัสมี 73.34 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 1 แผนภูมิที่ 1 ก. และ 2 ก.

ปลายสัปดาห์ที่ 4 แคลลัสที่เกิดจากส่วนของลำต้น เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นแคลลัสขนาดใหญ่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.7 เซนติเมตร มี 7.67 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น 32.33 การเกิดแคลลัส 89.67 เปอร์เซ็นต์

แคลลัสที่เกิดจากส่วนของก้านใบ การเจริญใกล้เคียงกับแคลลัสจากส่วนลำต้น แคลลัสขนาดใหญ่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.3 เซนติเมตร และเกิดเป็นต้น 30.67 เปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัสมี 90.67 เปอร์เซ็นต์

แคลลัสที่เกิดจากใบ มีการเจริญและขนาดใกล้เคียงกับแคลลัสจากส่วนของก้านใบแต่ยังไม่เกิดต้น (ภาพที่ 3) การเกิดแคลลัสมี 82.67 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 1 แผนภูมิที่ 1 ข. และ 2 ก.

ปลายสัปดาห์ที่ 6 แคลลัสจากส่วนของลำต้น ก้านใบ และใบ มีขนาดใหญ่มากขึ้น และเจริญเป็นต้นเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 4) การเจริญเป็นแคลลัสจากส่วนของลำต้นมี 92.33 เปอร์เซ็นต์ จากส่วนของก้านใบมี 91.67 เปอร์เซ็นต์ และจากใบ 84.67 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 1 แผนภูมิที่ 1 ค. และ 2 ก.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลจากการทดลองพบว่าแคลลัสจากส่วนของลำต้นมีการเจริญดีที่สุด รองลงมาคือส่วนของก้านใบ (แผนภูมิที่ 2 ข) แคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ เป็นแคลลัสที่มีการเจริญดี มีลักษณะแข็งแรงและเกาะกลุ่มกันแน่น จึงนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ เพื่อทดสอบความต้านทานและนำแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์นี้ ไปทดสอบกับ spore suspension และสารพิษของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ต่อไป

1.2 จากการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นยาสูบใหม่ โดยนำแคลลัสที่เจริญจากส่วนของก้านใบ ตัดเป็นก้อน ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร (A) และก้อนขนาด ประมาณ 0.5 เซนติเมตร แต่สับเป็นชิ้นเล็กๆ (B) เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่าภายใน 2 สัปดาห์ แคลลัส A ขยายตัว และมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น แต่แคลลัส B เจริญได้ดีกว่ามีการเกาะกลุ่มเป็นก้อนได้ดี (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5 ก)

สัปดาห์ที่ 4 แคลลัส A แต่ละก้อนขยายขนาดใหญ่ขึ้น บางก้อนเกิดจุดเขียว บางก้อนเจริญเป็นยอด ส่วนแคลลัส B ขยายปริมาณ และมีน้ำหนักเพิ่มมากกว่า มีบางส่วนเจริญเป็นยอดจำนวนมาก (ภาพที่ 5 ข) และในปลายสัปดาห์ที่ 4 สีของแคลลัสทั้ง 2 เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นเหลืองอ่อน

สัปดาห์ที่ 6 ทั้งแคลลัส A และ B ขยายปริมาณมากขึ้น และเจริญเป็นต้นประมาณ 2-6 และ 6-12 ต้น เฉลี่ย 3.90 และ 8.75 ต้น ตามลำดับ แต่ยังไม่เกิดราก (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5 ค)

การชักนำให้เกิดราก เมื่อนำต้นยาสูบที่มีอายุประมาณ 6 สัปดาห์ เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตรชักนำราก พบว่าในสัปดาห์แรก เนื้อเยื่อตรงบริเวณรอยตัดโคนลำต้นมีการเจริญมากกว่าปกติ เกิดเป็นปุ่มปมรอบๆลำต้นเจริญขึ้น มีความสูงเฉลี่ย 1.13 เซนติเมตร มีใบ 3-5 ใบ และเริ่มมีรากเกิดขึ้น เปอร์เซ็นต์การเกิดราก 57.53 (ตารางที่ 4)

สัปดาห์ที่ 3 รากเจริญอย่างรวดเร็ว ลำต้นสูงเฉลี่ย 2.94 เซนติเมตร ใบมีขนาดใหญ่ขึ้น เป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมที่จะนำออกปลูกได้ มีอายุประมาณ 9 สัปดาห์ (ภาพที่ 6 ข)

ส่วนการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากแคลลัสเจริญจากส่วนของลำต้น ขนาดเดียวกับแคลลัสเจริญจากส่วนของก้านใบ แต่สับเป็นชิ้นเล็กๆ ได้ผลเช่นเดียวกัน ภายใน 4 สัปดาห์ เกิดจุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เขียวจำนวนมาก และเจริญเป็นยอดและต้นประมาณ 3-9 ต้น (ภาพที่ 7 ก) จำนวนต้นเพิ่มขึ้นเป็น 6-11 ต้น ภายใน 6 สัปดาห์ แต่ยังไม่เกิดรากเช่นกัน (ภาพที่ 7 ข) หลังจากย้ายมาเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรชักนำราก ประมาณ 3 สัปดาห์เกิดรากจำนวนมาก (ภาพที่ 7 ค) พบว่าลักษณะของต้นใหม่ที่ได้จากการเลี้ยงแคลลัสเจริญจากส่วนลำต้นและก้านใบไม่แตกต่างกัน

การปลูกต้นยาสูบที่ได้จากการเลี้ยงแคลลัส พบว่าภายใน 1 สัปดาห์ ต้นยาสูบสามารถตั้งตัวได้ มีลำต้นแข็งแรง ใบมีสีเขียวลักษณะแข็ง มีบางต้นไม่แข็งแรงและตายไป มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 79.17 จำนวนต้นปกติมี 67.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) มีความสูงตั้งแต่ 6 - 11.5เซนติเมตร มีใบ 6-10 ใบ ขนาดตั้งแต่ 5.0-9.0 X 7.0-12.0 เซนติเมตร (ภาพที่ 8)

1.3 การทดสอบความต้านทานโรคโดยวิธี inoculate เชื้อ

จากการตรวจสอบเชื้อโรคตากบของยาสูบที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่9) ตามคีย์ของ Chupp (1953) พบว่า ลักษณะของเชื้อราที่ศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ มี conidiophore ขนาดใหญ่ มีสีเข้ม ชูขึ้นเหนือเนื้อเยื่อเป็นกลุ่ม 2-7 อัน (ภาพที่ 10 ค) สปอร์เป็นเส้นเรียวใส มีผนังกั้น ปลายโค้งเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงใน moist chamber ประมาณ 2-3 วัน เส้นใยฟูคล้ายก้ามะหยี่ สีขาวออกเทา และเมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง VJA สูตรดัดแปลง ภายใน 7 วัน โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1.84 เซนติเมตร (ตารางที่ 6 และภาพที่ 10 ก)เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง พบว่า เส้นใยสร้าง conidiophore ขนาดใหญ่ และสร้างสปอร์จำนวนมาก ขนาดต่างๆกัน ขนาดใหญ่สุด ซึ่งตรวจพบ ประมาณ 2.5 X 250 ไมครอน (ภาพที่ 10 ข และ ง)

1.3.1 จากการทำ spore suspensionของเชื้ออายุ 7 วัน พบว่ามีจำนวนสปอร์ประมาณ 2.5 $X10^{5}$ สปอร์ ต่อ 1 มิลลิลิตร

1.3.2 ทดลองใช้ spore suspension ในปริมาณต่างๆ กัน inoculate บนใบยาสูบปกติ อายุ 60 วัน พบว่าถ้าใช้สปอร์ในปริมาณ 20 x 2.5 $x10^{5}$ - 40 x2.5 $x10^{5}$ สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ให้ผลในการทำให้เกิดโรคตากบอย่างชัดเจนภายหลังการฉีดพ่น 10 วัน (ภาพที่ 11) เกิดโรคระดับ 4 คือ มีความต้านทานโรคต่ำ ประมาณ 42 เปอร์เซ็นต์ และเกิดโรคระดับ 5 คือไม่มีความต้านทานโรคเลย ประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

โดยแบ่งการเกิดโรคเป็น 5 ระดับดังนี้

ระดับ 1 ต้นยาสูบไม่แสดงอาการเกิดโรคตากบเลย 0 จุด ถือว่ามีความต้านทานสูงมาก (very highly resistant)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ 2 ต้นยาสูบที่แสดงอาการเกิดโรคตากบ 1-5 จุด ถือว่ามีความต้านทานสูง (highly resistant)

ระดับ 3 ต้นยาสูบที่แสดงอาการเกิดโรคตากบ 6-10 จุด ถือว่ามีความต้านทานปานกลาง (moderately resistant)

ระดับ 4 ต้นยาสูบที่แสดงอาการเกิดโรคตากบ 11-20 จุด ถือว่ามีความต้านทานต่ำ (moderately susceptible)

ระดับ 5 ต้นยาสูบที่แสดงอาการเกิดโรคตากบ 21 จุดขึ้นไป ถือว่าไม่มีความต้านทาน (susceptible)

ดัดแปลงจากแบบของ Stavely และคณะ (1971)

ผลการทดสอบทางสถิติ (ตารางที่ 8, 9 และแผนภูมิที่ 3) จากการทดสอบด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 10 x 2.5 x 10^5 และ 20 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ในเวลา 7 และ10 วัน จำนวนแผลของการเกิดโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างจากการใช้ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 และ 40 x 2.5x10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการใช้ spore suspension ปริมาณ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร สามารถทำให้เกิดโรคในระดับ 4 และ 5 ได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นนี้เป็นตัวทดสอบความต้านทานโรค

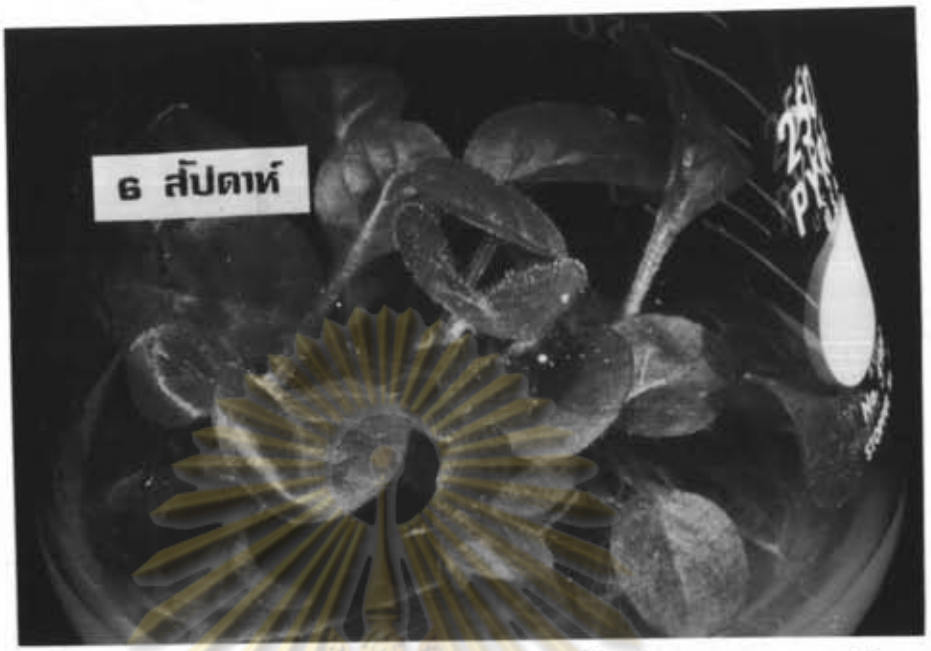
จากการทดสอบความต้านทานโรคโดยวิธี inoculate เชื้อด้วย spore suspension ที่จำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร กับต้นที่เกิดจากแคลลัสจำนวน 100 ต้น เกิดโรคระดับ 1 คือ มีความต้านทานโรคสูงมาก ประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 วัน ต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมากลดลงเหลือ ประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ เกิดโรค ระดับ 3 และ 4 คือมีความต้านทานโรคปานกลาง และต่ำ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความต้านทานซ้ำ เก็บผลภายใน 10 วัน ได้ต้นที่มีความต้านทานโรคสูงประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ และมีความต้านทานโรคปานกลาง ประมาณ 34 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10 แผนภูมิที่ 4 ก.) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 60 วัน ในเวลา 10 วัน มีความต้านทานโรคสูง และปานกลาง ประมาณ 4 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ภายหลังทดสอบความต้านทานซ้ำ พบว่ามีความต้านทานโรคต่ำ จนถึงไม่มีความต้านทานโรคเลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

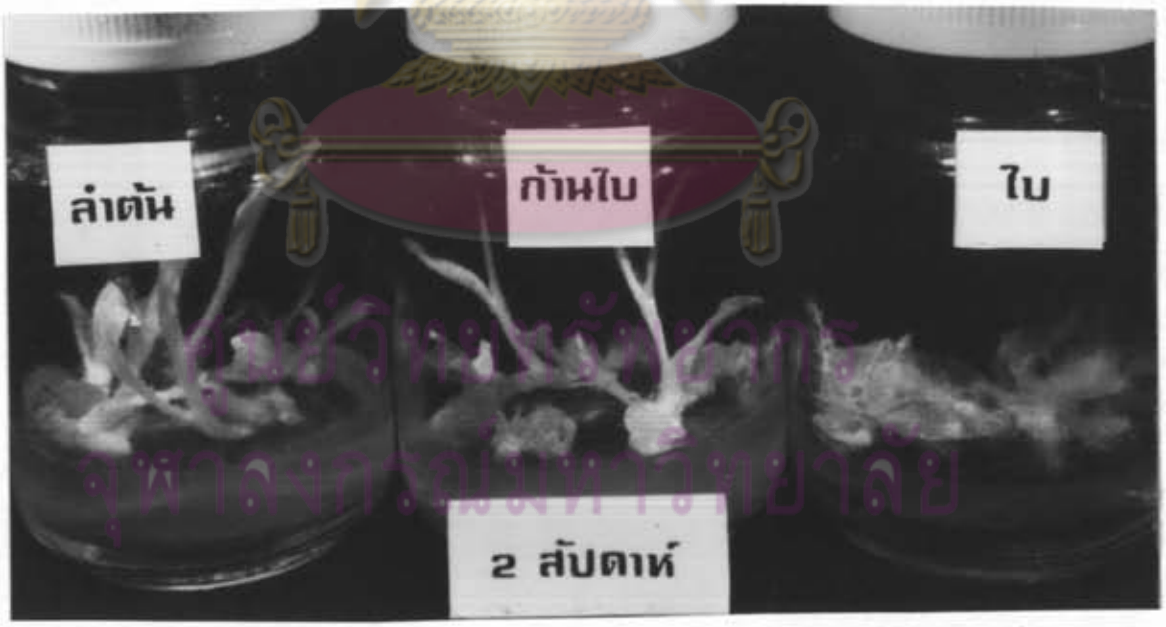
1.4 จากการนำต้นที่มีความต้านทานโรคสูง หรือ เกิดโรค ระดับ 2 จำนวน 2 ต้น (ตารางที่ 10) มาเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกครั้ง โดยใช้ส่วนของลำต้นอ่อน วัดจากปลายยอดถึงโคนลำต้น ประมาณ 3 เซนติเมตร ตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหาร MS สูตรชักนำแคลลัส พบว่าสามารถชักนำให้เป็นแคลลัส ที่มีลักษณะแข็งแรงและเจริญดี แต่มีการปนเปื้อนสูง ได้คัดเลือกเอาเฉพาะแคลลัสที่แข็งแรง มาเพาะเลี้ยงจนเกิดเป็นต้น และเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ อายุ 9 สัปดาห์ และนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูง ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง ที่ 11 และภาพที่ 13 ก.)

1.5 ผลการทดสอบความต้านทานโรคด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร จำนวน 30 ต้นในเวลา 10 วัน มีต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมาก 3.33 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่มีความต้านทานโรคปานกลาง และมีความต้านทานโรคต่ำ 33.33เปอร์เซ็นต์ หลังจากทดสอบความต้านทานซ้ำได้ต้นที่มีความต้านทานโรคสูง3.33เปอร์เซ็นต์ และมีความต้านทานโรคปานกลาง 16.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12 ภาพที่ 13 ข.และแผนภูมิที่ 4 ข.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



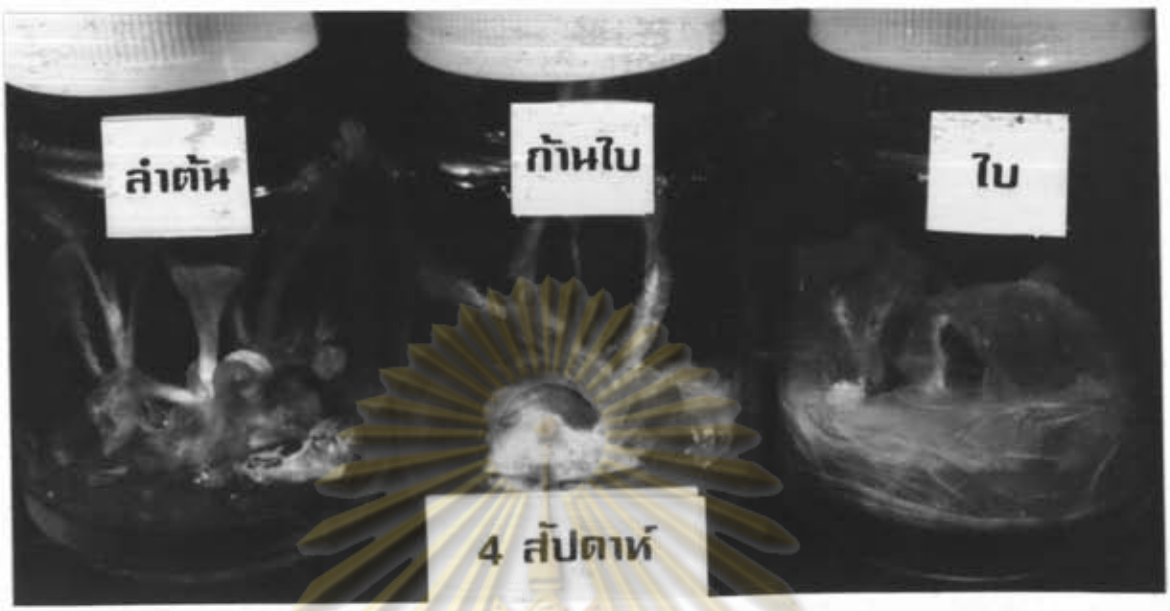
ภาพที่ 1 ต้นกล้ายาสูบที่เพาะจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 2 แคลลัสและต้นใหม่ ที่เกิดจากการเลี้ยงส่วนต่างๆของต้นกล้ายาสูบ ในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำแคลลัส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i17299955



ภาพที่ 3 แคลลัสและต้นใหม่ ที่เกิดจากการเลี้ยงส่วนต่างๆของต้นกล้ายาสูบ ในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำแคลลัส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 4 แคลลัสและต้นใหม่ที่เกิดจากการเลี้ยงส่วนต่างๆ ของต้นกล้ายาสูบ ในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำแคลลัส เป็นเวลา 6 สัปดาห์

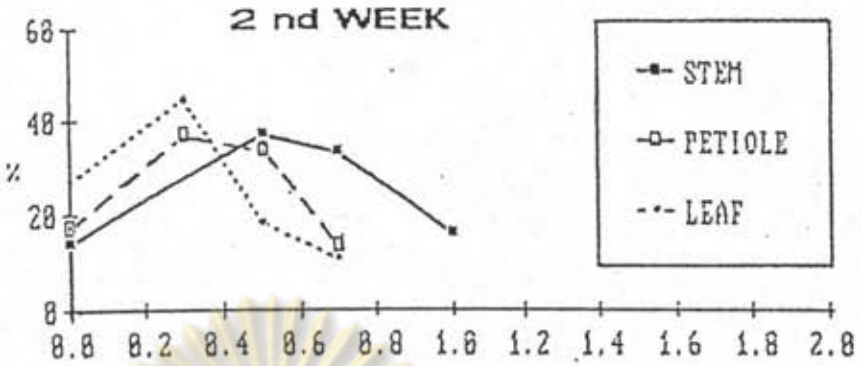
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงขนาด เปอร์เซ็นต์ ของการเกิดแคลลัสและจำนวนต้นที่เกิดขึ้นขณะชักนำให้เกิด แคลลัสจากส่วนต่างๆ ของต้นกล้าขาสูบอายุ 6 สัปดาห์ (ลำต้น, ก้านใบ = 300 ชิ้น ; ใบ = 150 ชิ้น)

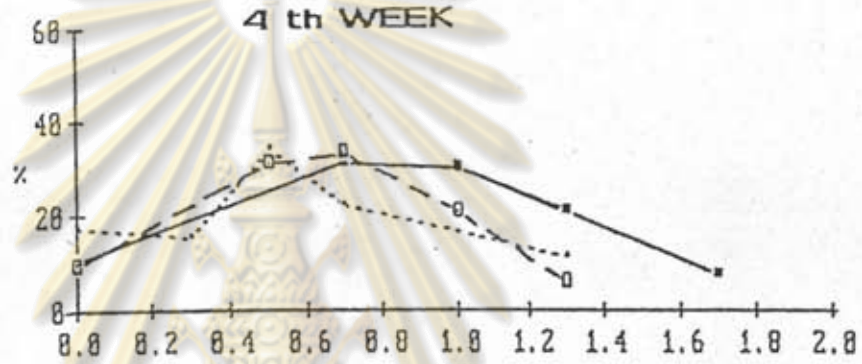
สภาพการเลี้ยงเนื้อเยื่อและระยะเวลา	ลำต้น			จำนวนต้นที่สูง 0.5 เซนติเมตร	%	ก้านใบ			จำนวนต้นที่สูง 0.5 เซนติเมตร	%	ใบ			จำนวนต้นที่สูง 0.5 เซนติเมตร	%
	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)	จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส	%			ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)	จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส	%			ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)	จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส	%		
สัปดาห์ที่ 2 (ในที่มืด 1 สัปดาห์ และที่ว่าง 1 สัปดาห์)	0	42	14.00			0	51	17.00			0	40	26.66		
	0.50	111	37.00			0.30	110	36.67			0.30	67	44.66		
	0.70	99	33.00			0.50	100	33.33			0.50	27	18.00		
	1.00	48	16.00			0.70	39	13.00			0.70	16	10.66		
การเกิดแคลลัส			88.00	61	20.33			83.00	53	17.67			73.34	0	0
สัปดาห์ที่ 4 (ในที่มืด 1 สัปดาห์ และที่ว่าง 3 สัปดาห์)	0	31	10.33			0	28	9.33			0	26	17.33		
	0.70	93	31.00			0.50	93	31.00			0.30	23	15.33		
	1.00	90	30.00			0.70	99	33.00			0.50	51	34.00		
	1.30	63	21.00			1.00	62	20.67			0.70	33	22.00		
	1.70	23	7.67			1.30	18	6.00			1.30	17	11.33		
การเกิดแคลลัส			89.67	97	32.33			90.67	92	30.67			82.67	0	0
สัปดาห์ที่ 6 (ในที่มืด 1 สัปดาห์ ในที่ว่าง 5 สัปดาห์)	0	23	7.67			0	25	8.33			0	23	15.33		
	1.00	78	26.00			0.50	46	15.33			0.30	26	17.33		
	1.30	119	39.67			0.70	98	32.67			0.50	37	24.67		
	1.70	55	18.33			1.30	114	38.00			1.30	57	38.00		
	2.00	25	8.33			1.70	17	5.67			1.70	7	4.67		
การเกิดแคลลัส			82.33	101	33.67			91.67	103	34.33			84.67	43	28.67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

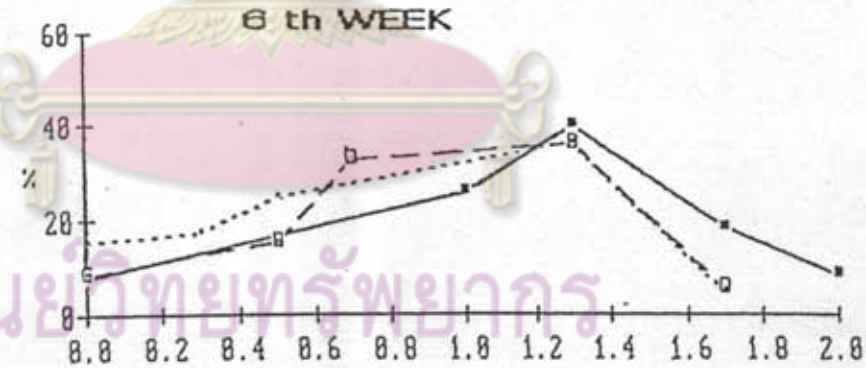
ก



ข



ค



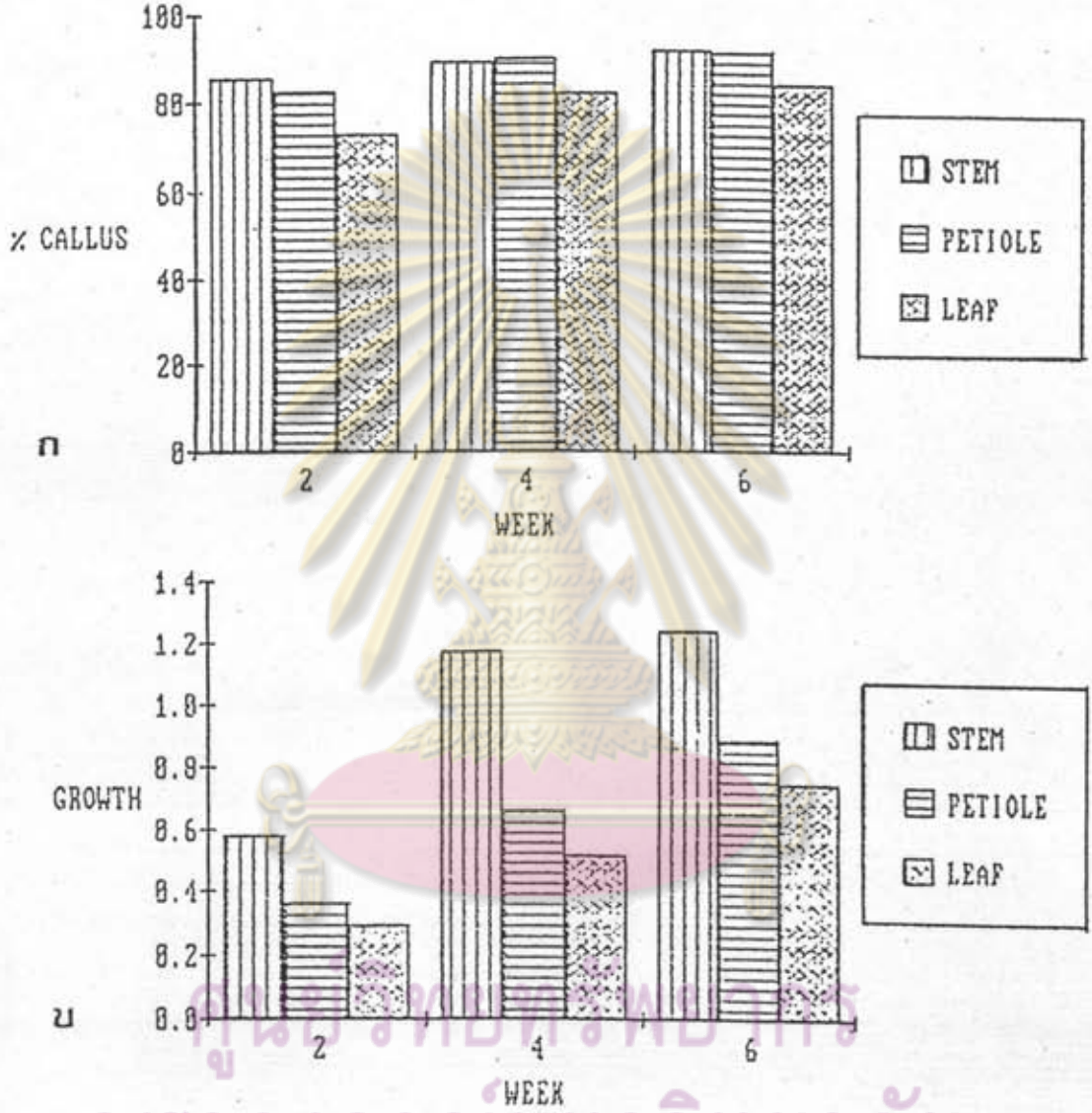
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณการเกิดแคลลัสขนาดต่างๆ จากส่วนของลำต้น ก้านใบ และใบ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS

ก. เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ข. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ค. เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิด และการเจริญของแคลลัสที่เกิดจากส่วนของลำต้น ก้านใบ และใบ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 2 4 และ 6 สัปดาห์

ก. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ข. แสดงการเจริญของแคลลัส

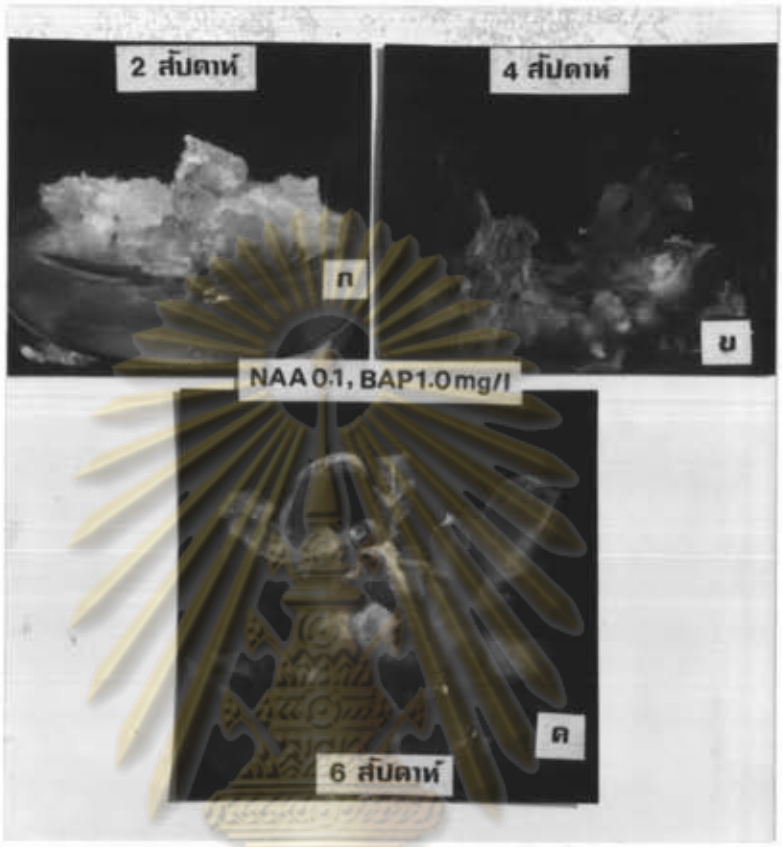
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบน้ำหนักของแคลลัสที่เจริญจากส่วนของก้านใบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำต้น

ขวดที่	0 สัปดาห์		2 สัปดาห์		4 สัปดาห์		6 สัปดาห์	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0.5293	0.5301	0.7093	0.8245	1.5289	1.7302	2.8107	3.3329
2	0.5474	0.5437	0.7549	0.8735	1.5401	1.7373	2.9017	3.4375
3	0.5483	0.5482	0.7031	0.8693	1.4267	1.7081	2.8701	3.2374
4	0.5490	0.5503	0.7199	0.8701	1.4098	1.8502	3.1606	3.4501
5	0.5597	0.5617	0.7301	0.9380	1.4623	1.7932	2.9201	3.5747
6	0.5642	0.5621	0.7305	0.8653	1.4693	1.8511	2.8784	3.4931
7	0.5645	0.5732	0.7613	0.8932	1.5308	1.8127	2.8532	3.5462
8	0.5683	0.5741	0.7300	0.8700	1.4684	1.7328	3.1617	3.4337
9	0.5798	0.5783	0.7296	0.9284	1.4552	1.7573	3.0252	3.4178
10	0.5817	0.5843	0.8154	0.9098	1.4937	1.8199	2.8901	3.3572
11	0.5883	0.5845	0.7513	1.0105	1.5176	2.0034	3.0019	3.8941
12	0.5887	0.5848	0.7217	0.9584	1.4936	1.8967	2.8709	3.6844
13	0.5894	0.5861	0.7325	1.1028	1.4550	2.0617	2.8546	4.0255
14	0.5921	0.5898	0.8026	0.9107	1.6203	1.9024	2.8345	3.8129
15	0.5963	0.5942	0.8101	0.8983	1.6313	1.7986	2.8977	3.5474
16	0.5972	0.5974	0.8074	0.9172	1.4893	1.8434	2.7773	3.5875
17	0.5974	0.5975	0.7583	1.0117	1.5067	2.0347	2.9299	4.0572
18	0.5977	0.6019	0.7527	0.8592	1.5014	1.8345	2.7993	3.6521
19	0.6010	0.6101	0.7695	0.8984	1.5280	1.9268	2.9728	3.6747
20	0.6095	0.6102	0.8184	1.0706	1.6257	2.0012	3.1007	3.9724
เฉลี่ย	0.5775	0.5781	0.7554	0.9240	1.5077	1.8548	2.9256	3.6094

A = น้ำหนักของแคลลัสที่ตัดเป็นก้อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ก้อน ต่อ 1 ขวด

B = น้ำหนักของแคลลัสที่มีขนาดและจำนวนเท่ากัน แต่สับเป็นชิ้นเล็กๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5 ต้นใหม่ที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากส่วนของก้านใบที่สับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในอาหาร MS สูตรชักนำต้น

ก. แคลลัสเจริญขยายขนาดและเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน

ข. แคลลัสเจริญเป็นยอด และต้น ภายใน 4 สัปดาห์

ค. ลักษณะของต้นใหม่ที่ยังไม่มีราก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนต้นใหม่ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญจากส่วนของก้านใบในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำต้น

ขวดที่	4 สัปดาห์		6 สัปดาห์	
	An1	Bn1	An2	Bn2
1	2	8	2	8
2	4	5	4	12
3	3	6	3	8
4	2	7	3	10
5	4	9	4	10
6	1	6	5	7
7	3	5	3	9
8	2	4	2	9
9	1	2	2	10
10	5	3	6	9
11	3	6	4	11
12	1	4	5	9
13	2	7	4	9
14	3	6	4	6
15	3	2	6	7
16	3	4	3	9
17	2	4	5	8
18	4	3	4	9
19	3	4	4	8
20	2	5	5	7
เฉลี่ย	2.65	5.05	3.90	8.75

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

An1 = จำนวนต้นใหม่ ที่มีความสูงตั้งแต่ 0.3 เซนติเมตรขึ้นไป ที่เกิดจากแคลลัสที่ตัดเป็นก้อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ก้อน ต่อ 1 ขวด

Bn1 = จำนวนต้นใหม่ ที่มีความสูงตั้งแต่ 0.3 เซนติเมตรขึ้นไป ที่เกิดจากแคลลัสขนาดเดียวกัน แต่สับเป็นชิ้นเล็กๆ

An2 = จำนวนต้นใหม่ ที่มีความสูงตั้งแต่ 0.7 เซนติเมตรขึ้นไป ที่เกิดจากแคลลัสที่ตัดเป็นก้อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 ก้อน ต่อ 1 ขวด

Bn2 = จำนวนต้นใหม่ ที่มีความสูงตั้งแต่ 0.7 เซนติเมตรขึ้นไป ที่เกิดจากแคลลัสขนาดเดียวกัน แต่สับเป็นชิ้นเล็กๆ

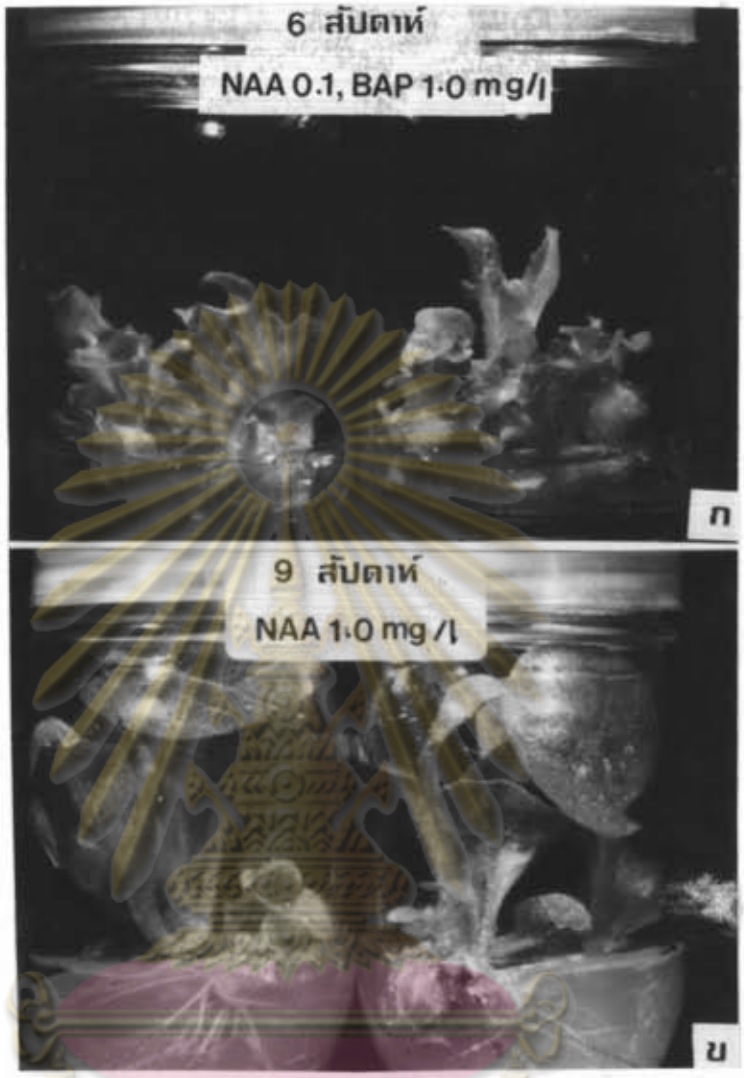
ตารางที่ 4 ลักษณะของต้นยาสูบที่เกิดจากแคลลัสในอาหาร MS สูตรชักนำราก (เฉลี่ยจาก 50 ต้น)

ลักษณะต่างๆ	0 สัปดาห์	1 สัปดาห์	3 สัปดาห์
1. ขนาดความสูงของลำต้น (เซนติเมตร)	0.97	1.13	2.94
2. จำนวนใบ	2 - 3 ใบ	3 - 5 ใบ	5 - 7 ใบ
3. ขนาดใบ (เซนติเมตร)	0.2-0.5 X 0.5-1.0	0.2-0.5 X 1.0-1.7	1.7-2.3 X 2.5-5.0
4. ความยาวของก้านใบ (เซนติเมตร)	0.3 - 0.5	0.5 - 1.3	1.0 - 2.5
5. เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	0	57.53	89.89

ตารางที่ 5 ต้นยาสูบที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อนำออกปลูกภายนอก

	ต้นที่เจริญจากแคลลัส	%
จำนวนต้นทั้งหมด	240	100.00
จำนวนต้นที่รอดตาย	190	79.17
จำนวนต้นปกติ	162	67.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 ต้นอาสุบที่เกิดจากแคลลัสที่เจริญจากส่วนของก้านใบ

ก. ลักษณะของต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำต้น

ข. ลักษณะของต้นที่สมบูรณ์ อายุประมาณ 9 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

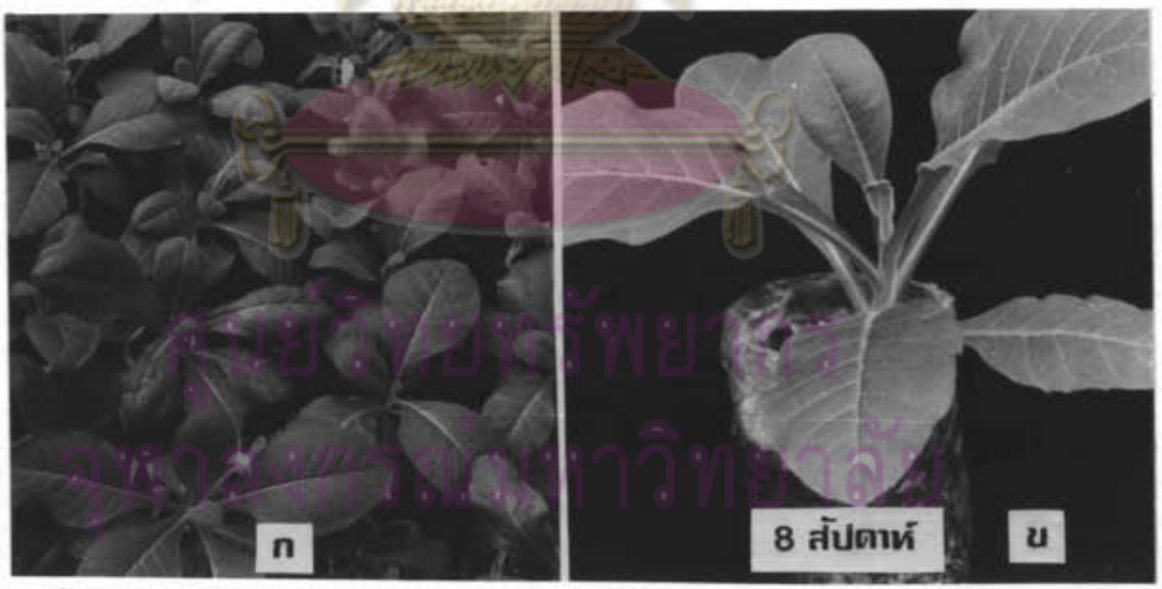
ภาพที่ 7 ต้นยาสูบที่เกิดจากแคลลัสที่เจริญจากส่วนของลำต้น

ก. ลักษณะของต้นเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำต้น

อายุ 4 สัปดาห์

ข. อายุ 6 สัปดาห์

ค. อายุ 9 สัปดาห์

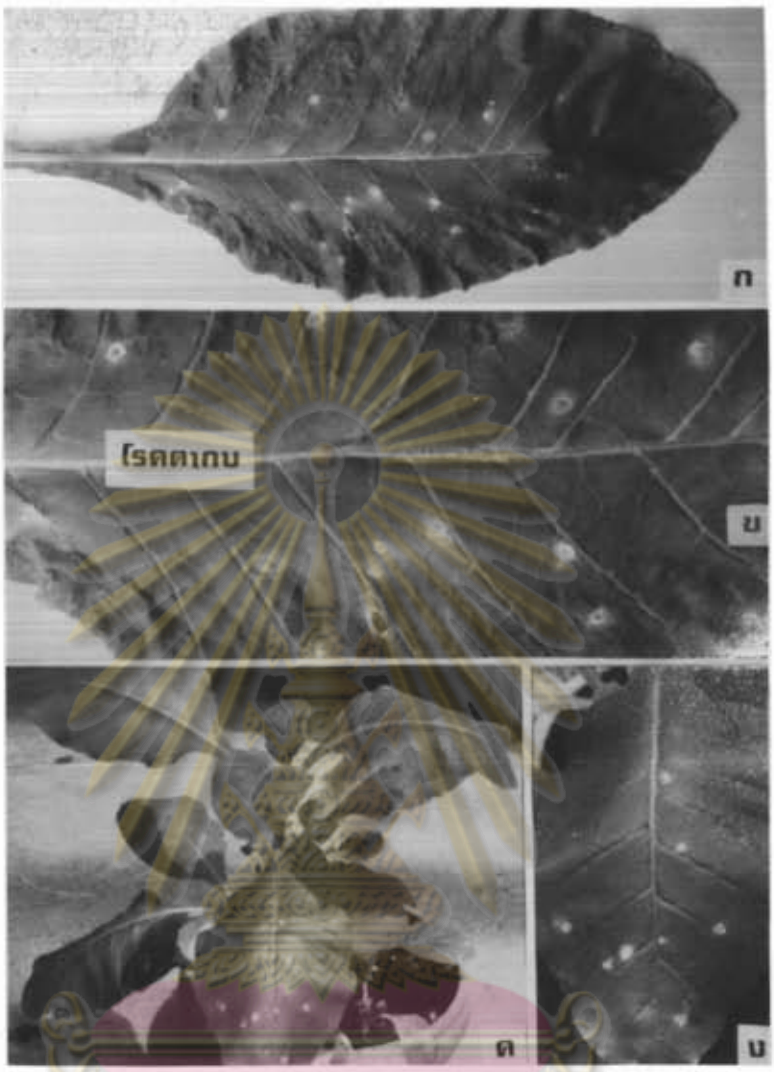


ภาพที่ 8 ต้นยาสูบที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ก. สภาพของต้นที่นำออกปลูกภายนอก

ข. ภาพขยายจากต้น ก.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



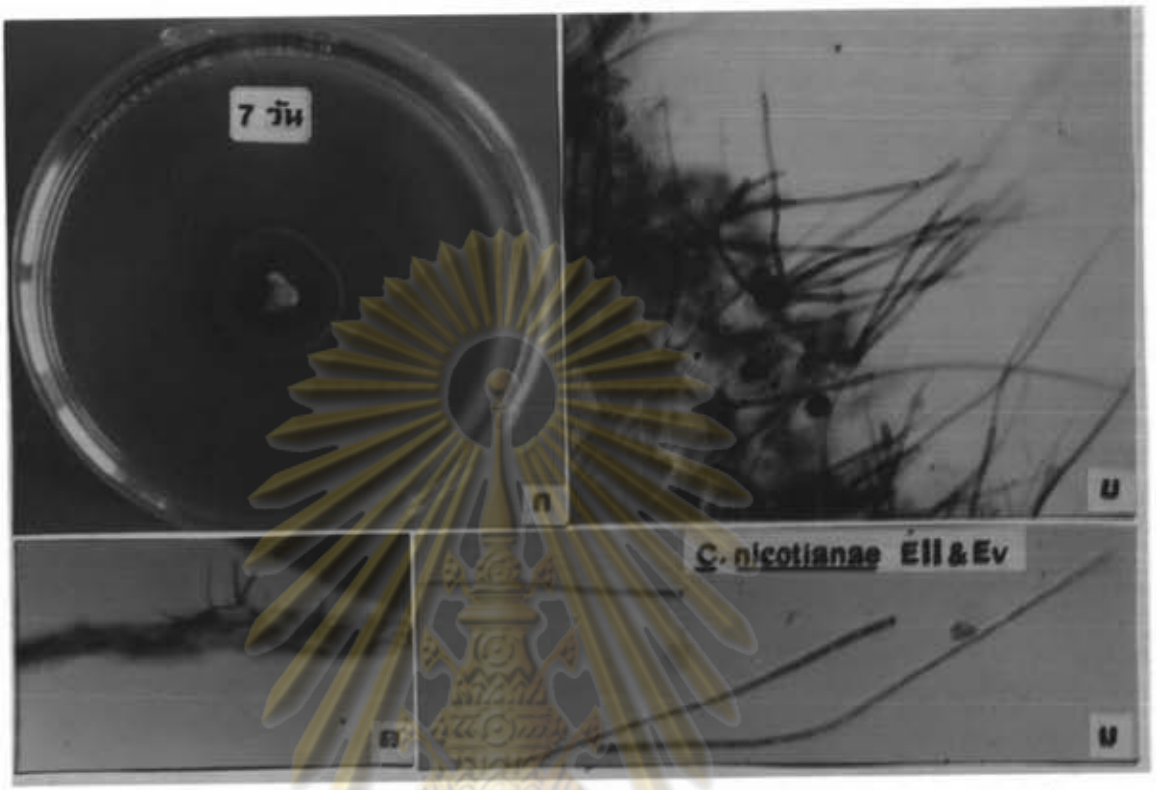
ภาพที่ 9 แสดงอาการของโรคตากบบนใบยาสูบ

ก. อาการของโรคที่พบในธรรมชาติ

ข. ภาพขยายประมาณ 40 เท่า

ค. และ ง. ต้นยาสูบที่เป็นโรคในธรรมชาติ.
อาการแสดงที่ใบล่างก่อน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 ลักษณะของเชื้อรา Cercospora nicotianae Ell & Ev. ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง VJA สูตรดัดแปลง อายุ 7 วัน

ก. ลักษณะโคโลนี

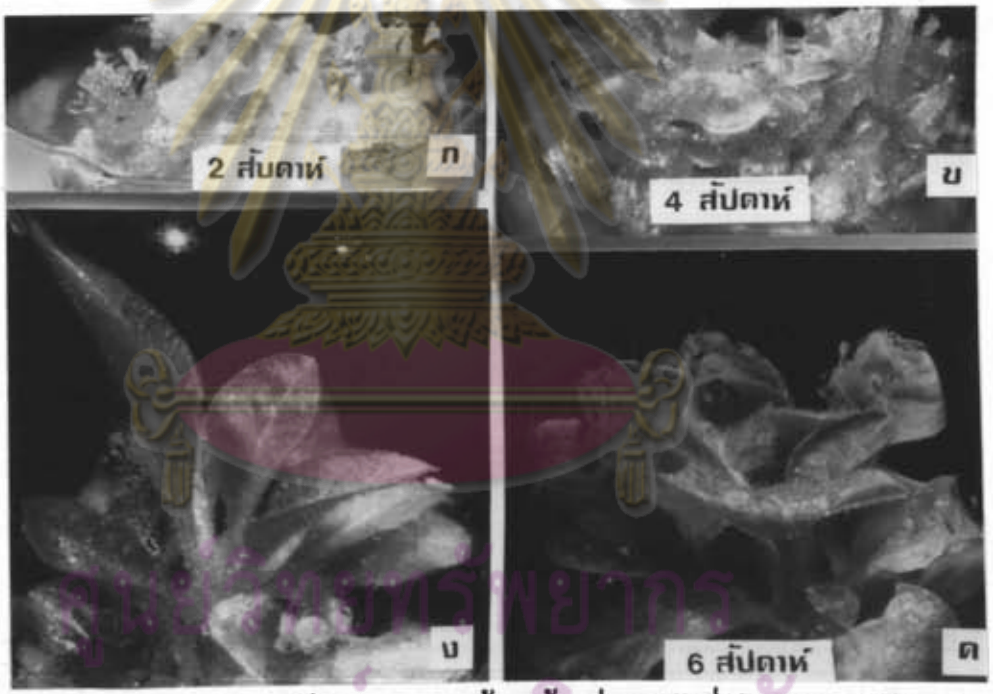
ข. ลักษณะก้านชูสปอร์ (conidiophore) กำลังขยาย 100 เท่า

ค. ลักษณะก้านชูสปอร์ จากการดัดเนื้อเยื่อใบยาสูบที่เป็นโรคตากบ

ง. ลักษณะสปอร์ (conidia) ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง VJA สูตรดัดแปลง ขนาด 2.5 X 250 ไมครอน กำลังขยาย 660 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 11 ต้นยาสูบแสดงอาการเป็นโรคตากบ ภายหลังทดสอบด้วย spore suspension ในปริมาณต่างๆ



ภาพที่ 12 ต้นใหม่ที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นที่เกิดโรค ระดับ 2

ก. แคลลัส อายุ 4 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS สูตรชักนำต้น เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ข. เจริญเป็นยอดจำนวนมาก ภายใน 4 สัปดาห์

ค. เจริญเป็นต้นเมื่อย้ายลงอาหารใหม่

ง. เลี้ยงในอาหาร MS สูตรชักนำราก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงขนาดโคโลนีของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งสังเคราะห์ VJA สูตรดัดแปลง

Plate ที่	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)	
	3 วัน	7 วัน
1	0.6	1.8
2	0.6	1.7
3	0.7	1.8
4	0.7	1.8
5	0.7	1.8
6	0.7	1.9
7	0.7	1.8
8	0.8	1.9
9	0.8	2.0
10	0.8	1.9
11	0.8	1.7
12	0.8	1.9
13	0.9	1.8
14	0.9	1.9
15	0.9	1.9
เฉลี่ย	0.76	1.84

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆบนใบยาสูบที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 60 วัน เมื่อทดสอบด้วย spore suspension ปริมาณต่าง ๆ

ระดับการเกิดโรค	ปริมาณสปอร์ใน spore suspension 100 มิลลิลิตร															
	$10 \times 2.5 \times 10^4$				$20 \times 2.5 \times 10^4$				$30 \times 2.5 \times 10^4$				$40 \times 2.5 \times 10^4$			
	7 วัน		10 วัน		7 วัน		10 วัน		7 วัน		10 วัน		7 วัน		10 วัน	
	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%
1	20	40.00	15	30.00	14	28.00	11	22.00	6	12.00	4	8.00	1	2.00	1	2.00
2	16	32.00	16	32.00	19	38.00	11	22.00	15	30.00	9	18.00	13	26.00	3	6.00
3	7	14.00	8	16.00	12	24.00	20	40.00	12	24.00	14	28.00	12	24.00	7	14.00
4	7	14.00	10	20.00	3	6.00	6	12.00	18	32.00	18	36.00	18	32.00	21	42.00
5	0	0	1	2.00	2	4.00	2	4.00	1	2.00	5	10.00	6	10.00	18	36.00
จำนวนจุดเฉลี่ยต่อ 1 ใบ	3.76		5.48		4.92		8.58		8.10		10.52		11.84		14.28	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการเกิดโรค(จำนวนแผล) บนใบยาสูบที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 60 วัน ภายหลังทดสอบด้วย spore suspension ปริมาณต่างๆ กันเป็นเวลา 7 วัน

ปริมาณสปอร์ใน 100 มิลลิลิตร	$10x2.5x10^5$	$20x2.5x10^5$	$30x2.5x10^5$	$40x2.5x10^5$
$10x2.5x10^5$	–	1.12	4.3*	8.04*
$20x2.5x10^5$	–	–	3.18*	6.92*
$30x2.5x10^5$	–	–	–	3.74*
$40x2.5x10^5$	–	–	–	–

LSD = 2.03 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

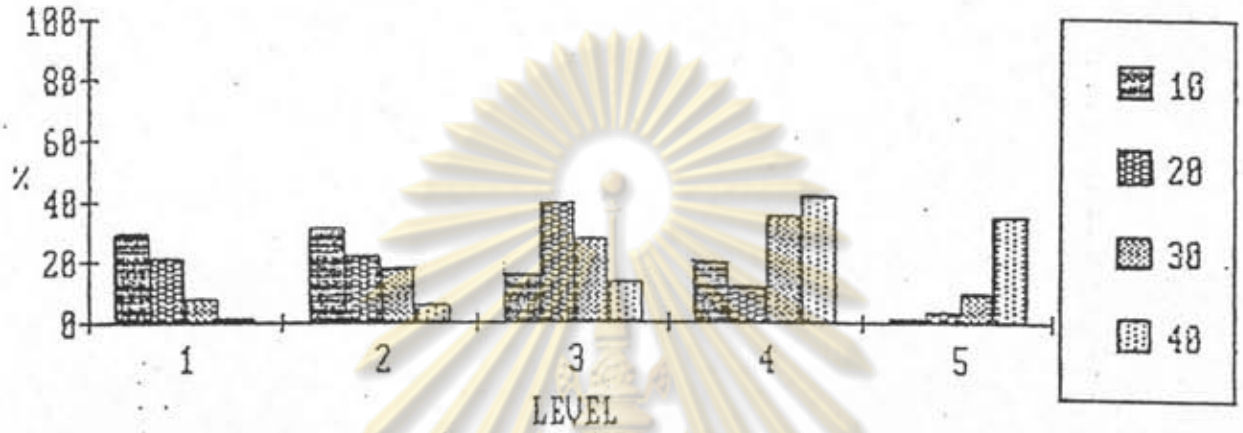
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการเกิดโรค(จำนวนแผล)บนใบยาสูบที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 60 วัน ภายหลังทดสอบด้วย spore suspension ปริมาณต่างๆ กันเป็นเวลา 10 วัน

ปริมาณสปอร์ใน 100 มิลลิลิตร	$10x2.5x10^5$	$20x2.5x10^5$	$30x2.5x10^5$	$40x2.5x10^5$
$10x2.5x10^5$	–	1.12	5.28*	9.16*
$20x2.5x10^5$	–	–	4.16*	8.04*
$30x2.5x10^5$	–	–	–	3.88*
$40x2.5x10^5$	–	–	–	–

LSD = 2.02 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆ ของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 60 วัน ภายหลังทดสอบด้วย spore suspension ปริมาณต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆ ของต้นที่เกิดจากแคลลัส จำนวน 100 ต้น ภายหลังทดสอบความต้านทานซ้ำด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ $40 \times 2.5 \times 10^5$ สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตร

ระดับการเกิดโรค	8 วัน		10 วัน		ทดสอบซ้ำ* (10 วัน)		control 10 วัน	
	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%
1	22	44.00	9	18.00	0	0	0	0
2	29	58.00	22	44.00	2	4.00	2	4.00
3	23	46.00	25	50.00	17	34.00	5	10.00
4	21	42.00	25	50.00	9	18.00	24	48.00
5	5	10.00	19	38.00	3	6.00	19	38.00

* ทดสอบซ้ำเฉพาะ 31 ต้น ที่เกิดโรค ระดับ 1 และ 2

ตารางที่ 11 ต้นชาสุบที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อนำออกปลูกภายนอก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

	ต้นที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นที่มีความต้านทานโรคสูง	
	จำนวนต้น	%
จำนวนต้นทั้งหมด	60	100
จำนวนต้นที่รอดตาย	51	85.00
จำนวนต้นปกติ	45	75.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 13 ต้นยาสูบที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นที่เกิดโรคระดับ 2 หรือมีความต้านทานโรคสูง

ก. ต้นปกติ

ข. หลังจากทดสอบความต้านทานซ้ำในเวลา 10 วัน

1. เกิดโรคระดับ 1 มีความต้านทานโรคสูงมาก
2. เกิดโรคระดับ 4 มีความต้านทานโรคต่ำ
3. เกิดโรคระดับ 3 มีความต้านทานโรคปานกลาง

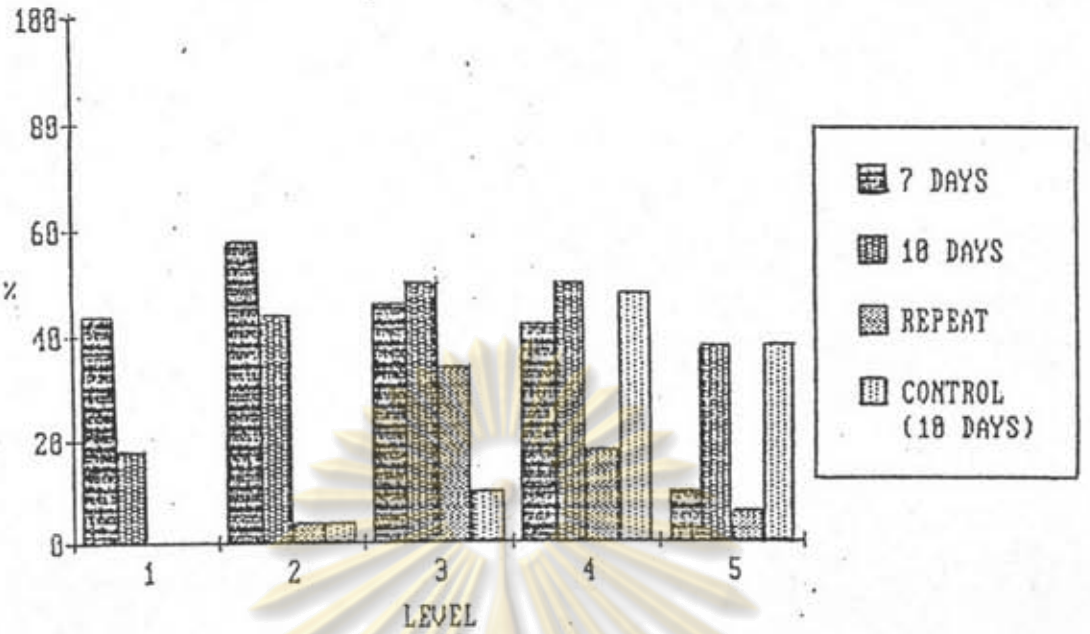
ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆของต้นที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความต้านทานโรคระดับ 2 หรือ ที่มีความต้านทานโรคสูง ภายหลังทดสอบความต้านทานซ้ำด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ $40 \times 2.5 \times 10^{5}$ สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตร

ระดับการเกิดโรค	8 วัน		10 วัน		ทดสอบซ้ำ*(10 วัน)		control 10 วัน	
	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%
1	10	33.33	1	3.33	0	0	0	0
2	11	36.67	8	26.67	1	3.33	2	4.00
3	7	23.33	10	33.33	5	16.67	5	10.00
4	2	6.67	10	33.33	3	10.00	24	48.00
5	0	0	1	3.33	0	0	19	38.00

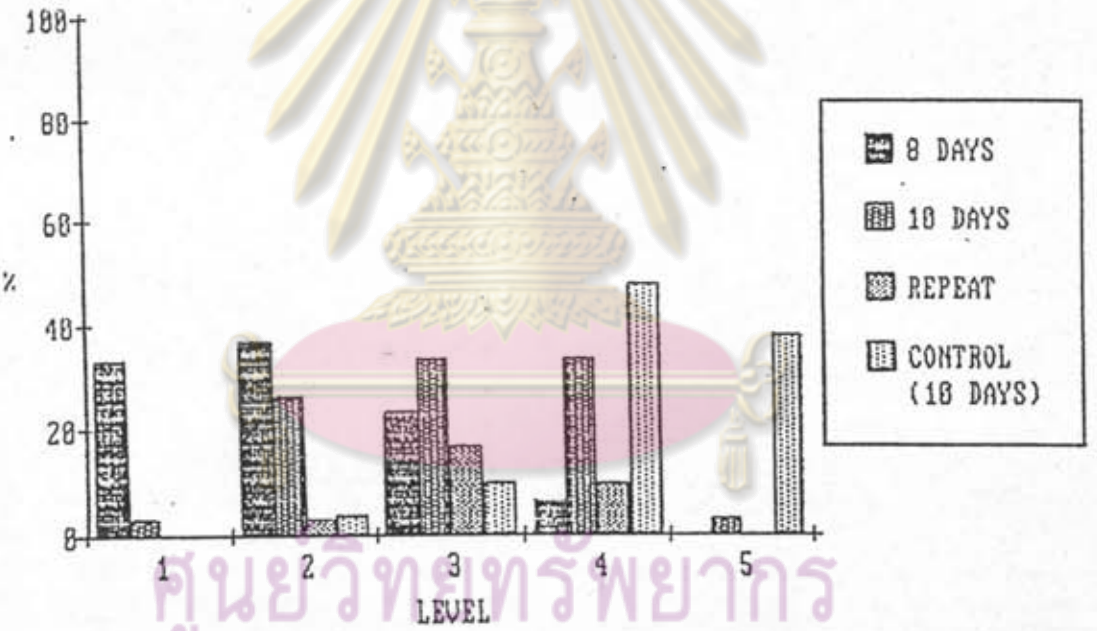
* ทดสอบซ้ำเฉพาะ 9 ต้น ที่เกิดโรคระดับ 1 และ2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก



ข



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 4 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆ ของต้นที่เกิดจากแคลลัสจำนวน 100 ต้น และ ต้นที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งที่ 2 ของต้นที่เกิดโรคระดับ 2 หรือ มีความต้านทานโรคสูง จำนวน 30 ต้น ภายหลังทดสอบด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 $x10^{6}$ สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตร เทียบกับ control ในเวลา 10 วัน

ก. ต้นที่เกิดจากแคลลัสโดยตรง

ข. ต้นที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งที่ 2

ผลการทดลองตอนที่ 2 การทดสอบความต้านทานโรคในระยะที่ยาสูบยังเป็นแคลลัส

2.1 การทดสอบความต้านทานของแคลลัสต่อ spore suspension และสารพิษ ของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev.

จากการเลี้ยงแคลลัส อายุ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 14) ที่คัดเป็นก้อนขนาดเท่าๆกัน ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ในอาหารเหลว MS สูตรชักนำแคลลัส ผสม spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 0 10 20 30 และ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่า 2-3 วันแรก แคลลัสเริ่มมีสีคล้ำ และมีเส้นใยเชื้อราเจริญบ้างเล็กน้อย บางแคลลัสยังคงมีสีสดใสเหมือนเดิม เกิดอัตราการตาย 50เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ภายใน 7 วัน และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่เหลือรอดใน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เป็นต้นใหม่ได้ 2.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร มีแคลลัสเหลือรอดประมาณ 16เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญเป็นต้นได้ 3.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

2.2 การคัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานแล้วชักนำให้เกิดต้นใหม่

2.2.1 นำแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ในปริมาณต่างๆ กันเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำต้น พบว่าแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลง และเจริญได้ช้ามาก ปลายสัปดาห์ที่ 3 แคลลัสบางก้อนมีบางส่วนเจริญเป็นจุดเขียว และขยายขนาดขึ้น เกิดเป็นยอดเล็กๆ แต่มีบางแคลลัสที่เนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 15 ข และ ง) ปลายสัปดาห์ที่ 4 ย้ายแคลลัสที่เหลือรอดลงเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดียวกัน พบว่าสามารถเจริญเป็นต้นเล็กๆจำนวนมาก แต่ที่ทดสอบด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อเจริญเป็นต้นเล็กๆได้แล้วเกิดการปนเปื้อนหมด ไม่สามารถนำไปเลี้ยงในสภาพธรรมชาติได้ ส่วนต้นที่เกิดจากแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร มีลักษณะหงิกงอผิดปกติต่างจาก control (ภาพที่ 16 และ 17) ต้องย้ายลงอาหารใหม่ ประมาณ 4 ครั้ง ได้ต้นยาสูบปกติ อายุประมาณ 12 สัปดาห์

2.2.2 การสกัดสารพิษจากเส้นใยของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MA (ภาพที่ 18) ปริมาณ 500 มิลลิลิตร นาน 3 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักสดของเส้นใยเฉลี่ยได้ 56.70 กรัม ทำให้แห้งชั่งได้เฉลี่ย 5.54 กรัม สกัดด้วยเอทธิลอีเทอร์ ได้สารสีแดง ชั่งน้ำหนักเฉลี่ยได้ 0.70 กรัม (ตารางที่ 14 ภาพที่ 19 และ 20) ทดสอบความเป็นพิษของสารความเข้มข้นตั้งแต่ 0 0.5 1 2 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ บนใบยาสูบซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดภายนอก อายุ 60 วันโดยวิธีแรก ทดสอบกับใบที่อยู่บนต้น(การทดลองละ 20 ต้น) พบว่าประมาณ 7 วัน เกิดจุดขึ้น (ภาพที่ 21) โดยแบ่งระดับการเกิดโรคจากแบบของ Stavely และคณะ (1971) เป็นเกณฑ์เช่นเดียวกัน ทุกความเข้มข้น ทำให้เกิดโรคได้ แต่ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดโรคระดับ 5 ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15 ภาพที่ 22 และแผนภูมิที่ 5 ก.) และวิธีที่สองโดยการนำใบที่ 5 นับจากยอดลงมา ทดสอบสารภายในห้องอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างตลอดเวลา พบว่าประมาณ 5 วัน ใบยาสูบแสดงอาการจุดขึ้นซึ่งไม่แตกต่างกับวิธีแรก แต่จำนวนจุดมีมากขึ้น และสังเกตได้ชัดเจน (ตารางที่ 16 และแผนภูมิที่ 5 ข.)

นำสารพิษมาทดสอบกับแคลลัส โดยเลี้ยงแคลลัส อายุ 4 สัปดาห์ ในอาหารเหลว MS สูตรชักนำแคลลัส โดยผสมสารพิษแต่ละความเข้มข้นลงไป พบว่าภายใน 5 วัน แคลลัสเริ่มมีสีคล้ำ เกิดอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 10 วัน ผลจากการทดลองพบว่าสารพิษเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์มีแคลลัสเหลือรอด 5.5 เปอร์เซ็นต์ และสารพิษเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์มีแคลลัสเหลือรอด 3.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17 และภาพที่ 15 ค) พบว่าต้นที่มีลักษณะผิดปกติต้องย้ายลงอาหารใหม่ ประมาณ 4 ครั้ง จึงได้ต้นปกติเช่นกัน (ภาพที่ 23 24 และ 25) และลักษณะของต้นไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 26)

2.3 การทดสอบต้นที่ต้านทานโรคโดยวิธี inoculate เชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

2.3.1 นำต้นยาสูบอายุ 12 สัปดาห์ ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากแคลลัสที่เหลือรอดจากการทดสอบด้วยsporesuspensionที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ปลูกในสภาพธรรมชาติ อีก 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 27 ก) แล้วนำมาทดสอบด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร จำนวน 60 ต้น เปรียบเทียบกับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 60 วัน

ผลของการทดสอบในเวลา 10 วัน เกิดโรคระดับ 2 และ 4 คือมีความต้านทานโรคสูง และมีความต้านทานโรคต่ำ 28.33 และ 31.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความต้านทานช้า ได้ต้นยาสูบที่มีความต้านทานโรคระดับ 3 คือ มีความต้านทานโรคปานกลาง ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีต้นที่ไม่ต้านทานโรคเลย (ตารางที่ 18 ภาพที่ 28 และแผนภูมิที่ 6 ก.) เมื่อเปรียบเทียบกับต้น control ภายหลังทดสอบความต้านทานช้า เกิดโรคระดับ 4 และ 5 คือ มีความต้านทาโรคต่ำ และไม่ต้านทานโรคเลย

2.3.2 นำต้นยาสูบอายุ 12 สัปดาห์ ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากแคลลัสที่เหลือรอดจากการทดสอบด้วยสารพิษเข้มข้น 2 และ 4เปอร์เซ็นต์ ปลูกในสภาพธรรมชาติอีก 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 27 ข) แล้วนำมาทดสอบด้วย spore suspensionที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 60 วัน เช่นกัน

ผลของการทดสอบพบว่าต้นที่เกิดจากแคลลัสต้านทานสารพิษ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 วัน เกิดโรคระดับ 1 มีความต้านทานโรคสูงมาก ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และ ระดับ 2 มีความต้านทานโรคสูง ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบความต้านทานช้าเกิดโรคระดับ 3 มีความต้านทานโรคปานกลาง ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 19 ภาพที่ 29 ก. และแผนภูมิที่ 6ข)

ส่วนต้นที่เกิดจากแคลลัสต้านทานสารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 วัน ได้ต้นที่มีความต้านทานโรคสูงมาก ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่มีความต้านทานโรคสูงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความต้านทานช้าเกิดโรค ระดับ 3 มีความต้านทานโรคปานกลาง ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ได้ต้นที่มีความต้านทานโรคสูง ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 20 ภาพที่ 29 ข. และแผนภูมิที่ 6 ค.) เมื่อเปรียบเทียบการเกิดโรค (จำนวนแผล) ระดับต่างของต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ก. ตาราง ฉ.) และเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ก. ตาราง ช.)

2.4 จากการศึกษาโครโมโซมของเซลล์ปลายรากในระยะ metaphase ของต้นยาสูบ (N. tabacum L.) พันธุ์เวอร์จิเนีย โคเกอร์ 347 ที่เกิดจากการเพาะเมล็ด ต้นที่มีความต้านทานโรคสูง จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นที่เกิดโรคระดับ 2 จากแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร และจากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ต้นละ 8 เซลล์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n = 48 (ภาพที่ 30)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่13 แสดงจำนวนแคลลัสที่เหลือรอด และที่สามารถเจริญเป็นต้นได้จาก LD_{50} ภายหลังจากใส่ spore suspension ของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ปริมาณต่างๆ กัน เป็นเวลา 7 วัน (การทดลองละ 400 แคลลัส)

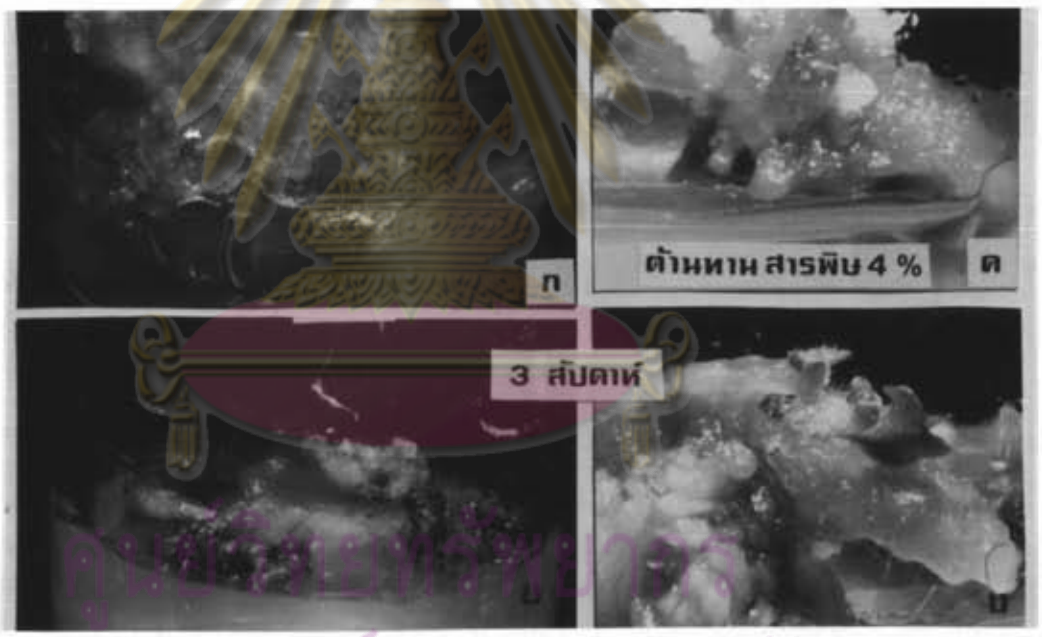
ชนิด	ปริมาณของ สปอร์ใน spore suspension				
	0	$10x2.5x10^4$	$20x2.5x10^4$	$30x2.5x10^4$	$40x2.5x10^4$
จำนวนแคลลัสที่เหลือรอด	340	123	81	64	48
เปอร์เซ็นต์	85.00	30.75	20.25	16.00	12.00
จำนวนแคลลัสที่เจริญเป็นต้น	308	17	0	13	9
เปอร์เซ็นต์	77.00	4.25	0	3.25	2.25

ตารางที่ 14 แสดงน้ำหนักของเส้นใย และสารพิษที่สกัดได้จาก เชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งปริมาณ 500 มิลลิลิตร นาน 3 สัปดาห์

ครั้งที่	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารพิษ (กรัม)
1	55.01	5.37	0.68
2	55.47	5.42	0.69
3	55.51	5.57	0,68
4	56.18	5.57	0.69
5	56.32	5.52	0.69
6	56.39	5.50	0.70
7	56.41	5.54	0.70
8	57.13	5.55	0.71
9	57.25	5.57	0.71
10	57.31	5.60	0.71
11	57.48	5.59	0.70
12	57.49	5.59	0.70
13	57.51	5.57	0.73
14	57.59	5.57	0.73
15	57.59	5.57	0.73
เฉลี่ย	56.70	5.54	0.70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 14 ลักษณะของแคลลัสที่ใช้คัดเลือกความต้านทานโรค



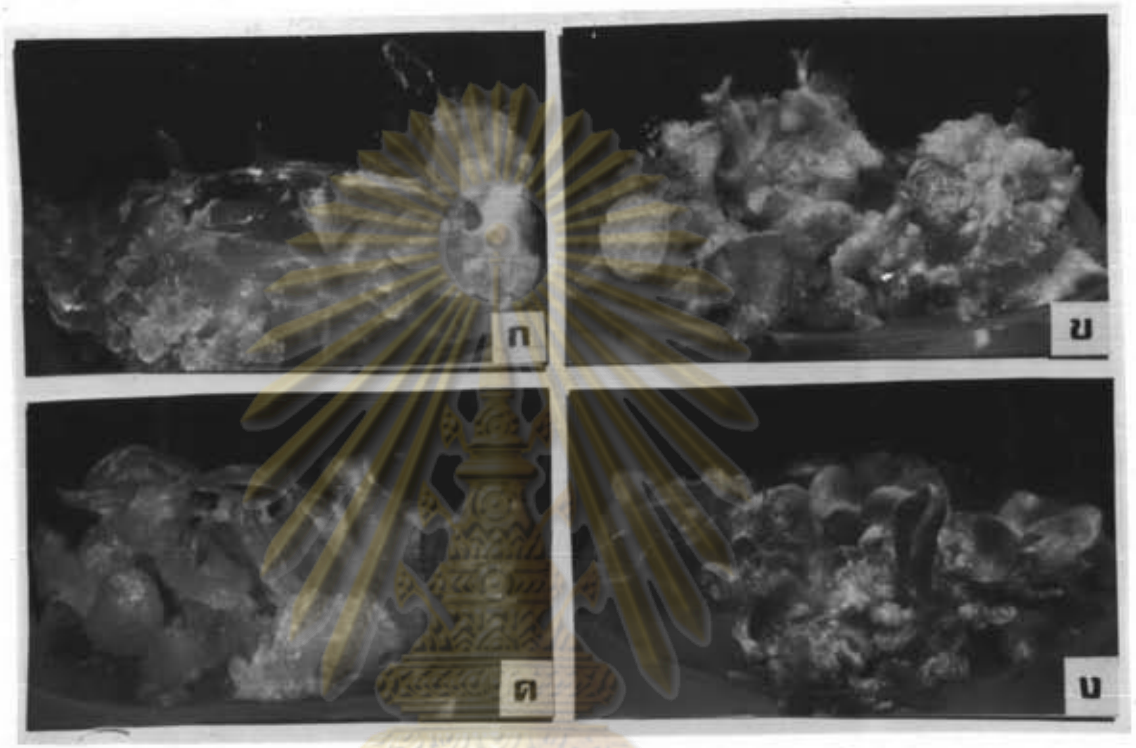
ภาพที่ 15 แคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษ และ spore suspension เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS สูตรชักนำต้น

ก. แคลลัส control

ข. แคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร

ค. และ ง. แคลลัสที่เจริญเป็นต้นได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



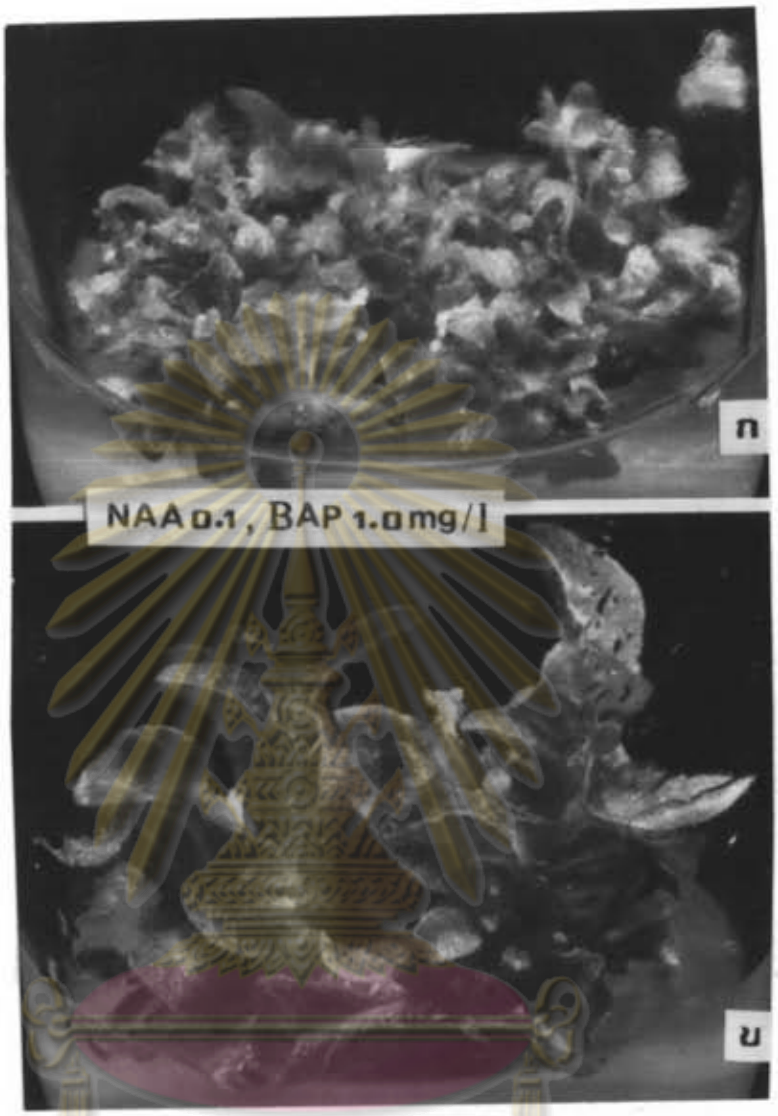
ภาพที่ 16 ต้นที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสที่เหลือรอด

ก. และ ค. เป็นแคลลัส control

ข. และ ง. จากการใส่ spore suspension

ที่มีจำนวนสปอร์ $30 \times 2.5 \times 10^{5}$ ต่อ 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

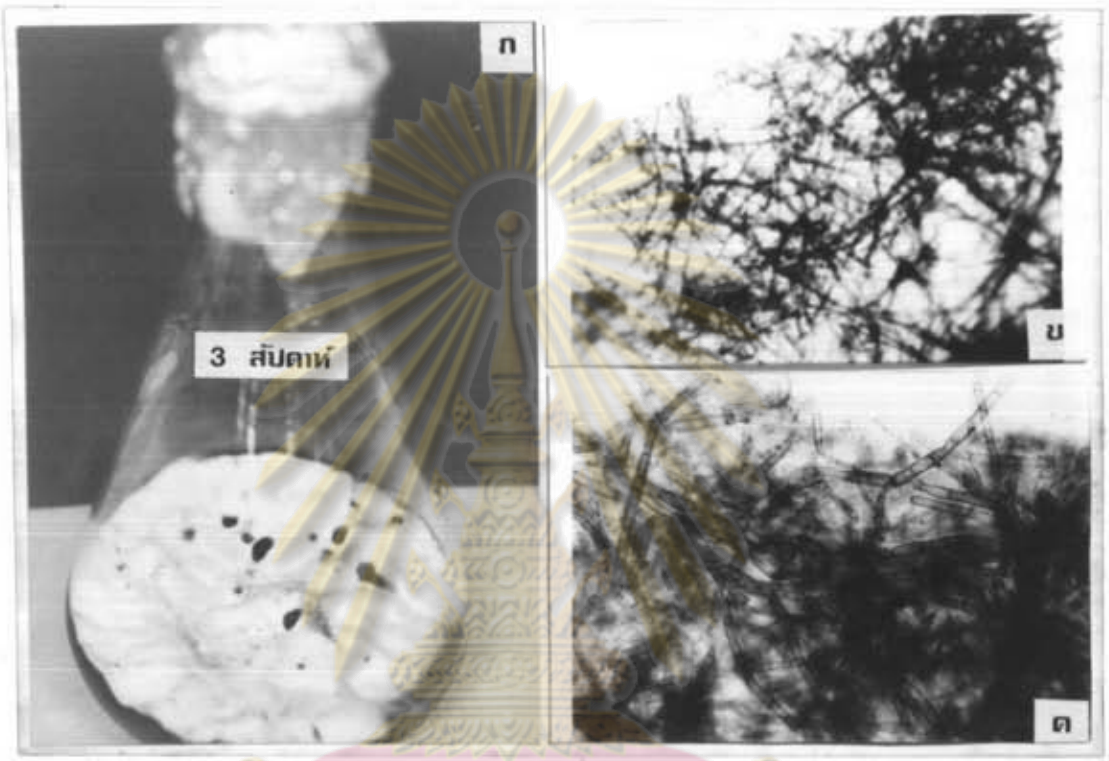


ภาพที่ 17 ลักษณะผิดปกติของต้นยาสูบที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่ spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ $30 \times 2.5 \times 10^5$ สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร

ก. ลักษณะของต้นยาสูบ ภายหลังจากย้ายลงอาหารใหม่เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. ลักษณะต้นของ ก. เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



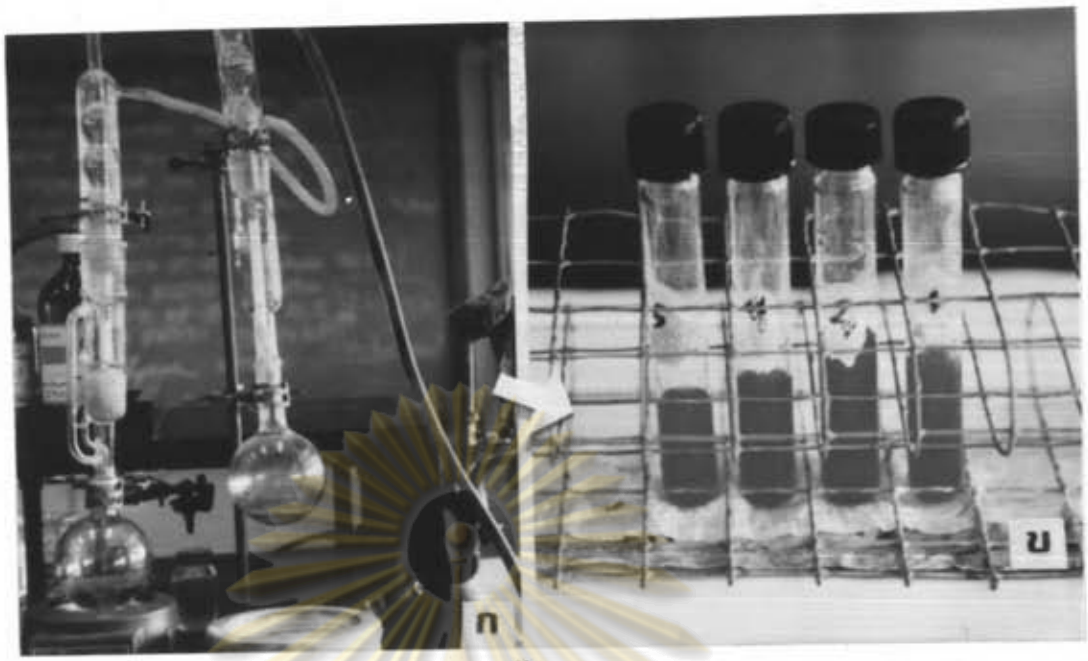
ภาพที่ 18 ลักษณะของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MA เพื่อการสกัดสารพิษ

ก. เลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ข. ลักษณะเส้นใย อายุ 2 สัปดาห์

ค. อายุ 3 สัปดาห์

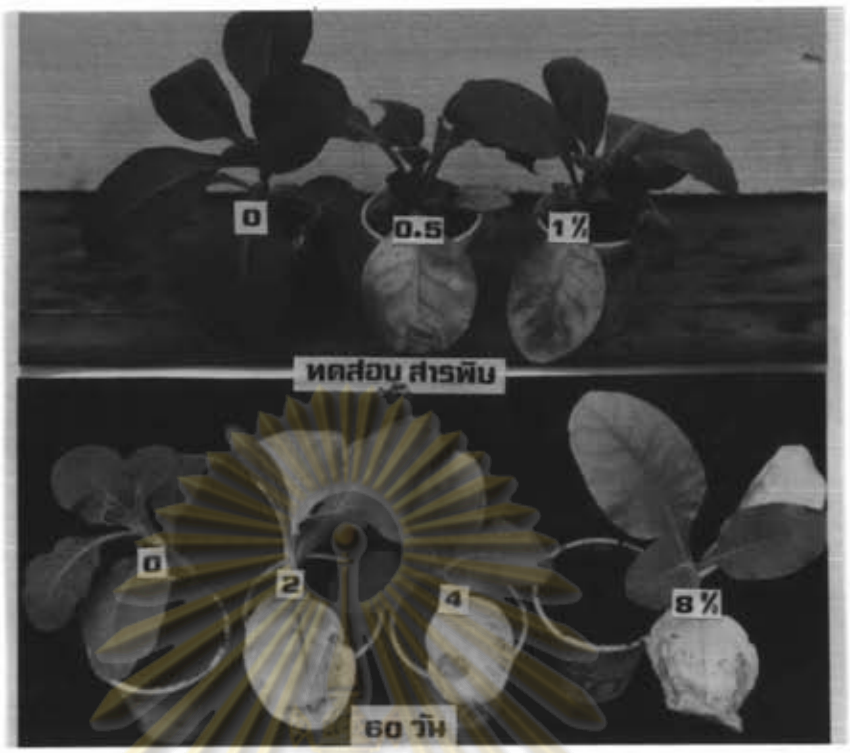
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 19 การสกัดสารพิษจากเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev.
ก. เครื่องมือ Soxhlet apparatus สำหรับสกัดสาร
ข. สารสีแดงที่สกัดได้จาก ก.

ภาพที่ 20 การระเหยสารที่สกัดได้จากเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev.
ก. เครื่องมือ Rotary vapor เพื่อระเหยสาร
ข. สารสีแดงที่ระเหยเอทธิลอีเทอร์ออกจนหมด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 21 ต้นยาสูบแสดงอาการจุดและเหี่ยว ภายหลังทดสอบด้วยสารพิษความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

ภาพที่ 22 เปรียบเทียบลักษณะอาการเป็นโรคระดับ 5 ภายหลังทดสอบด้วยสปอร์ (ก) และสารพิษ (ข) เป็นเวลา 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

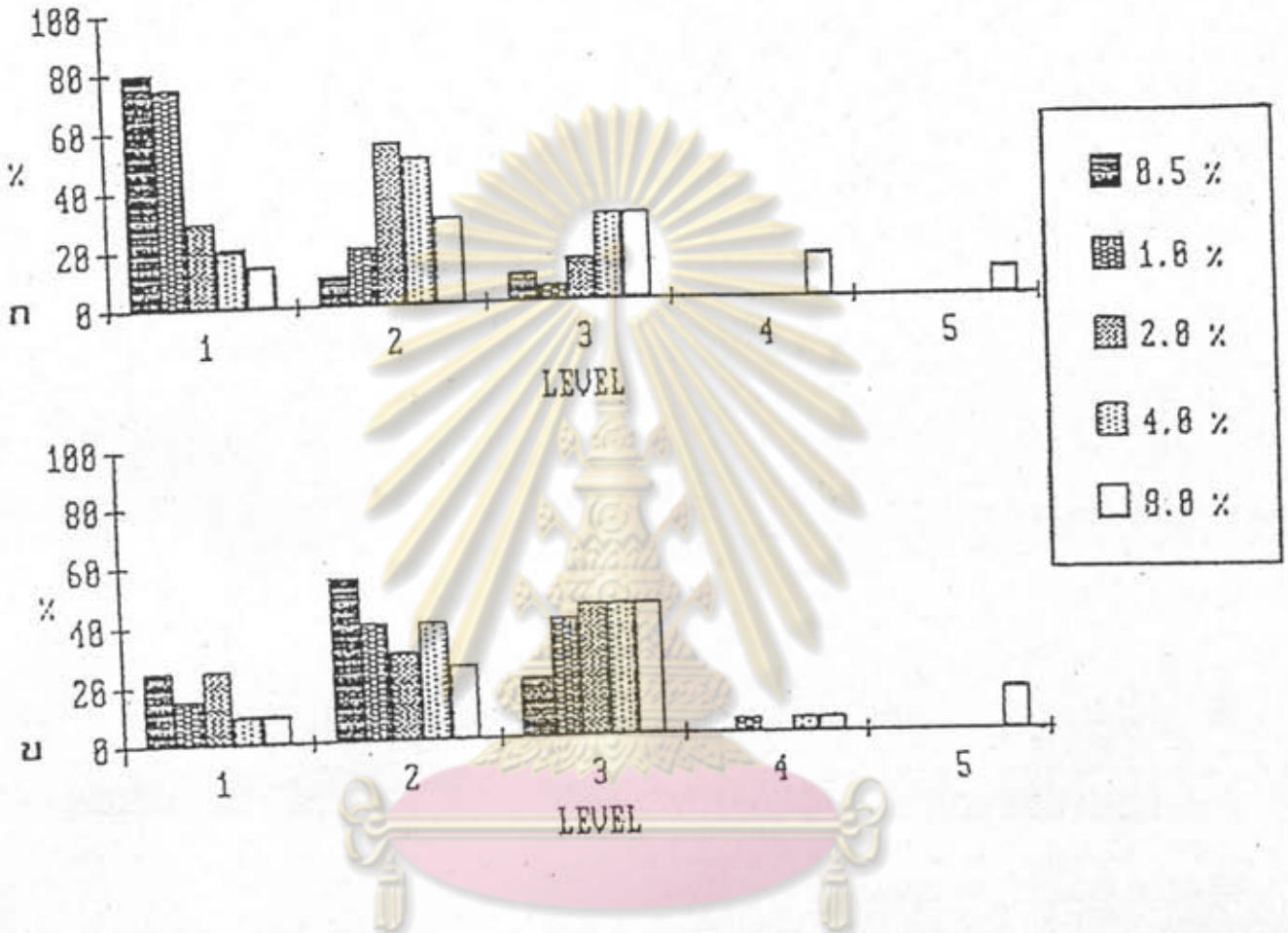
ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่าง ๆ ภายหลังทดสอบสารพิษบนใบของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 60 วัน เป็นเวลา 7 วัน

ระดับการเกิดโรค	0		0.5 %		1 %		2%		4 %		8 %	
	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%
1	20	100	18	80.00	15	75.00	6	30.00	4	20.00	3	15.00
2	0	0	2	10.00	4	20.00	11	55.00	10	50.00	8	30.00
3	0	0	2	10.00	1	5.00	3	15.00	6	30.00	6	30.00
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15.00
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10.00
จำนวนจุดเฉลี่ยต่อใบ	0		0.75		0.80		3.50		2.85		5.35	

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆ ภายหลังทดสอบสารพิษบนใบยาสูบที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ระดับการเกิดโรค	0		0.5 %		1 %		2 %		4 %		8 %	
	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%	จำนวนต้นที่เกิดโรค	%
1	20	100	5	25.00	3	15.00	5	25.00	2	10.00	2	10.00
2	0	0	11	55.00	8	40.00	6	30.00	8	40.00	5	25.00
3	0	0	4	20.00	8	40.00	9	45.00	9	45.00	9	45.00
4	0	0	0	0	1	5.00	0	0	1	5.00	1	5.00
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15.00
จำนวนจุดเฉลี่ยต่อใบ	0		2.10		3.50		3.10		5.45		6.95	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิที่ 5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆ ของต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเมล็ด อายุ 60 วัน ภายหลังจากทดสอบด้วยสารพิษ ความเข้มข้นต่างๆ

ก. ทดสอบสารพิษบนใบของต้นยาสูบ เป็นเวลา 7 วัน

ข. ทดสอบสารพิษเฉพาะใบ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงจำนวนแคลลัสที่เหลือรอด และที่สามารถเจริญเป็นต้นได้จาก LD_{50} ภายหลังจากใส่สารพิษของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน (การทดลองละ 200 แคลลัส)

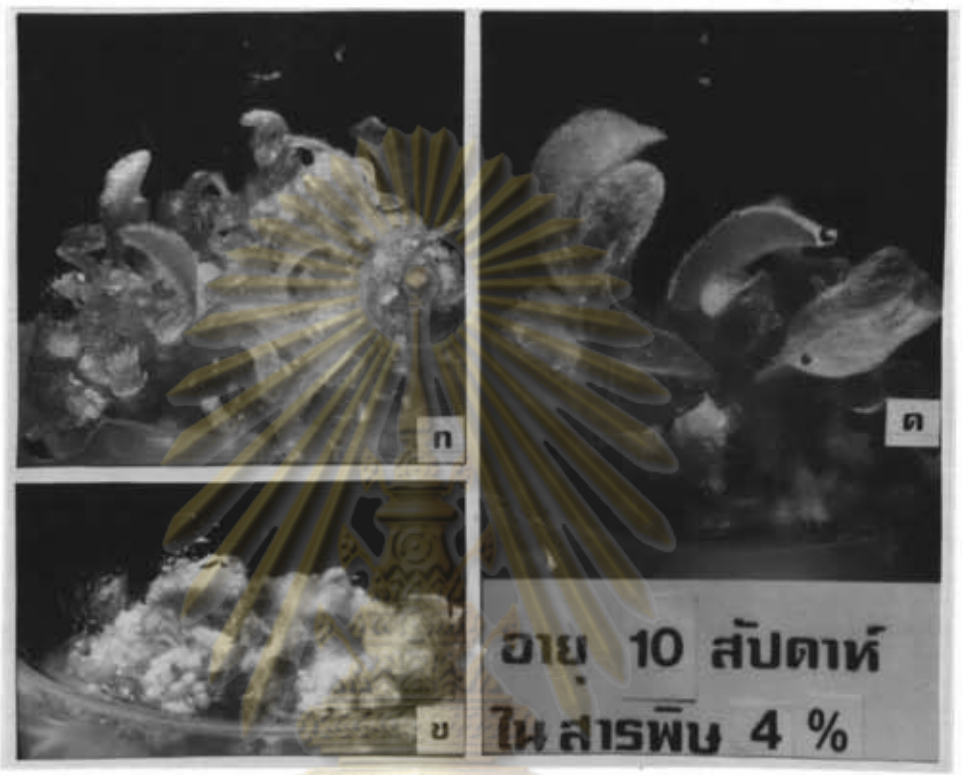
ชนิด	ความเข้มข้นของสารพิษ					
	0	0.5 %	1 %	2 %	4 %	8 %
จำนวนแคลลัสที่เหลือรอด	176	48	36	32	24	12
เปอร์เซ็นต์	88.00	24.00	18.00	16.00	12.00	6.00
จำนวนแคลลัสที่เจริญเป็นต้น	147	0	0	11	7	0
เปอร์เซ็นต์	73.50	0	0	5.50	3.50	0

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆ ของต้นที่เกิดจากแคลลัส ที่ด้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x2.5 x10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร จำนวน 60 ต้น ภายหลังทดสอบความด้านทานซ้ำด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตร

ระดับการเกิดโรค	8 วัน		10 วัน		ทดสอบซ้ำ(10 วัน)		control 10 วัน	
	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%
1	13	21.67	2	3.33	0	0	0	0
2	21	35.00	17	28.33	0	0	2	4.00
3	14	23.33	10	16.67	12	20.00	5	10.00
4	10	16.67	19	31.67	7	11.67	24	48.00
5	2	3.33	12	20.00	0	0	19	38.00

* ทดสอบซ้ำเฉพาะ 19 ต้น ที่เกิดโรค ระดับ 1 และ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

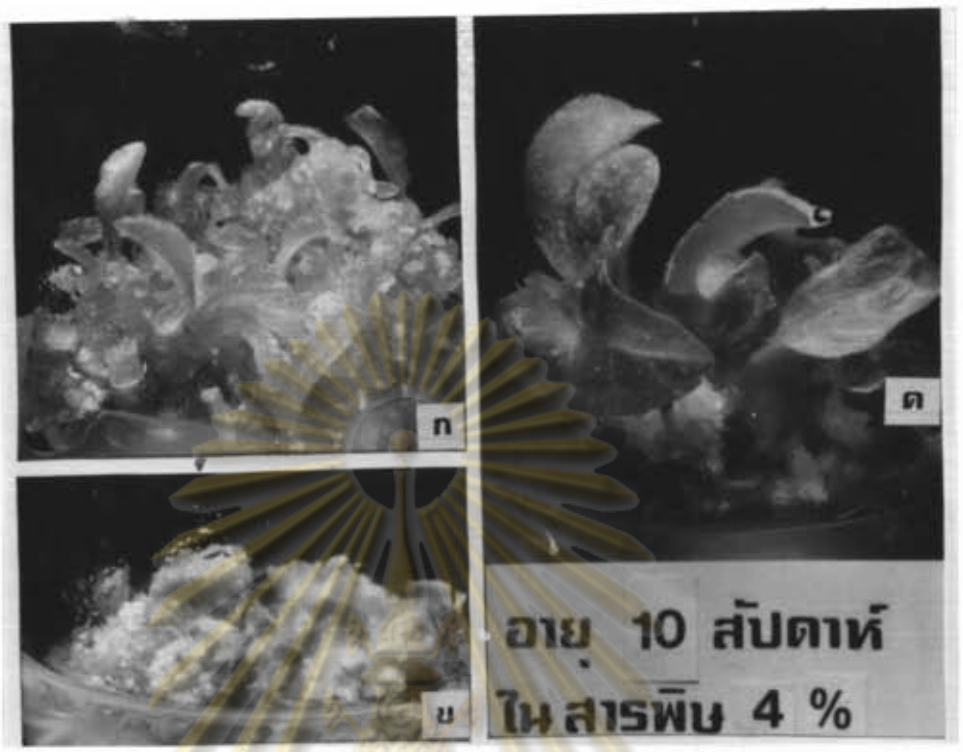


ภาพที่ 23 ลักษณะของต้นยาสูบที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับ control

ก. และ ข. เป็นต้นที่เกิดจากแคลลัส control หลังจากย้ายลงอาหารใหม่เป็นเวลา 4 และ 9 สัปดาห์ ตามลำดับ

ค. และ ง. เป็นต้นที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัส จากการใส่สารพิษเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 และ 9 สัปดาห์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 24 ลักษณะของต้นยาสูบที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัส ที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับ control

ก. แคลลัส control หลังจากย้ายลงอาหารใหม่เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. ต้นที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายลงอาหารใหม่เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ค. ลักษณะต้นจาก ข.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 25 ต้นใหม่ที่สมบูรณ์จากการเลี้ยงแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

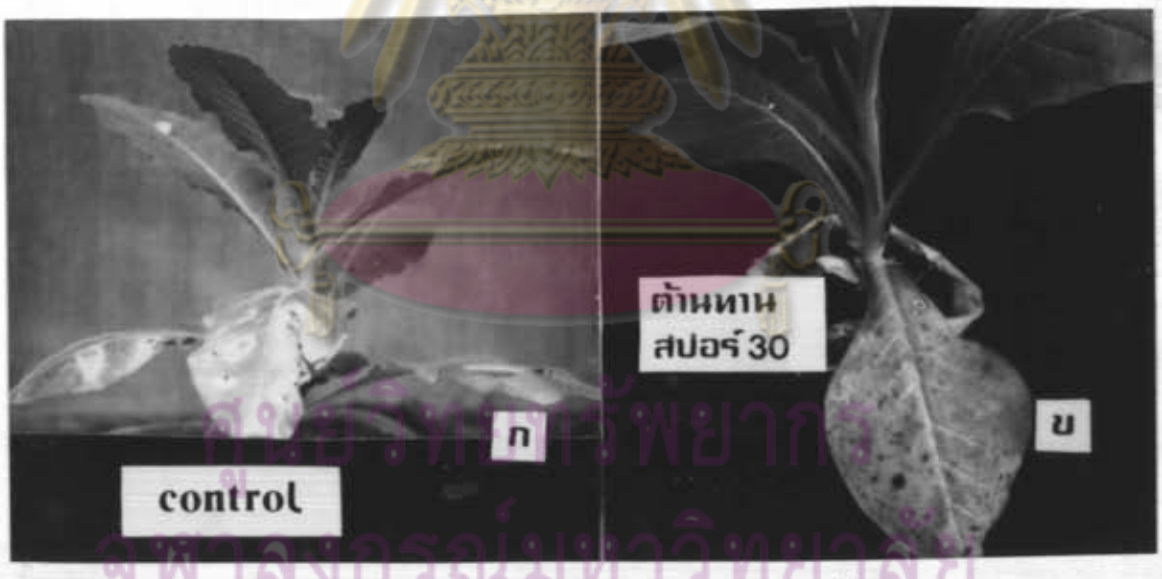
ภาพที่ 26 ลักษณะของต้นที่เกิดจากแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษ

1. เป็นต้นที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
2. เป็นต้นที่เกิดจากการเลี้ยงแคลลัสที่เหลือรอดจากการใส่สารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 27 ต้นปกติที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทาน เมื่อนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ก. ต้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร

ข. ต้านทานสารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 28 แสดงอาการของโรคเมื่อทดสอบความต้านทานซ้ำ

ก. ต้น control (จากการเพาะเมล็ด)

ข. ต้นที่เกิดจากแคลลัสต้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^5 สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร แสดงอาการเป็นโรคระดับ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆของต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ด้านทานสารพิษเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังทดสอบความด้านทานซ้ำด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตร

ระดับการเกิดโรค	8 วัน		10 วัน		ทดสอบซ้ำ * (10 วัน)	
	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%
1	6	30.00	1	5.00	0	0
2	9	45.00	7	35.00	0	0
3	3	15.00	5	25.00	6	30.00
4	2	10.00	4	20.00	1	5.00
5	0	0	2	10.00	1	5.00

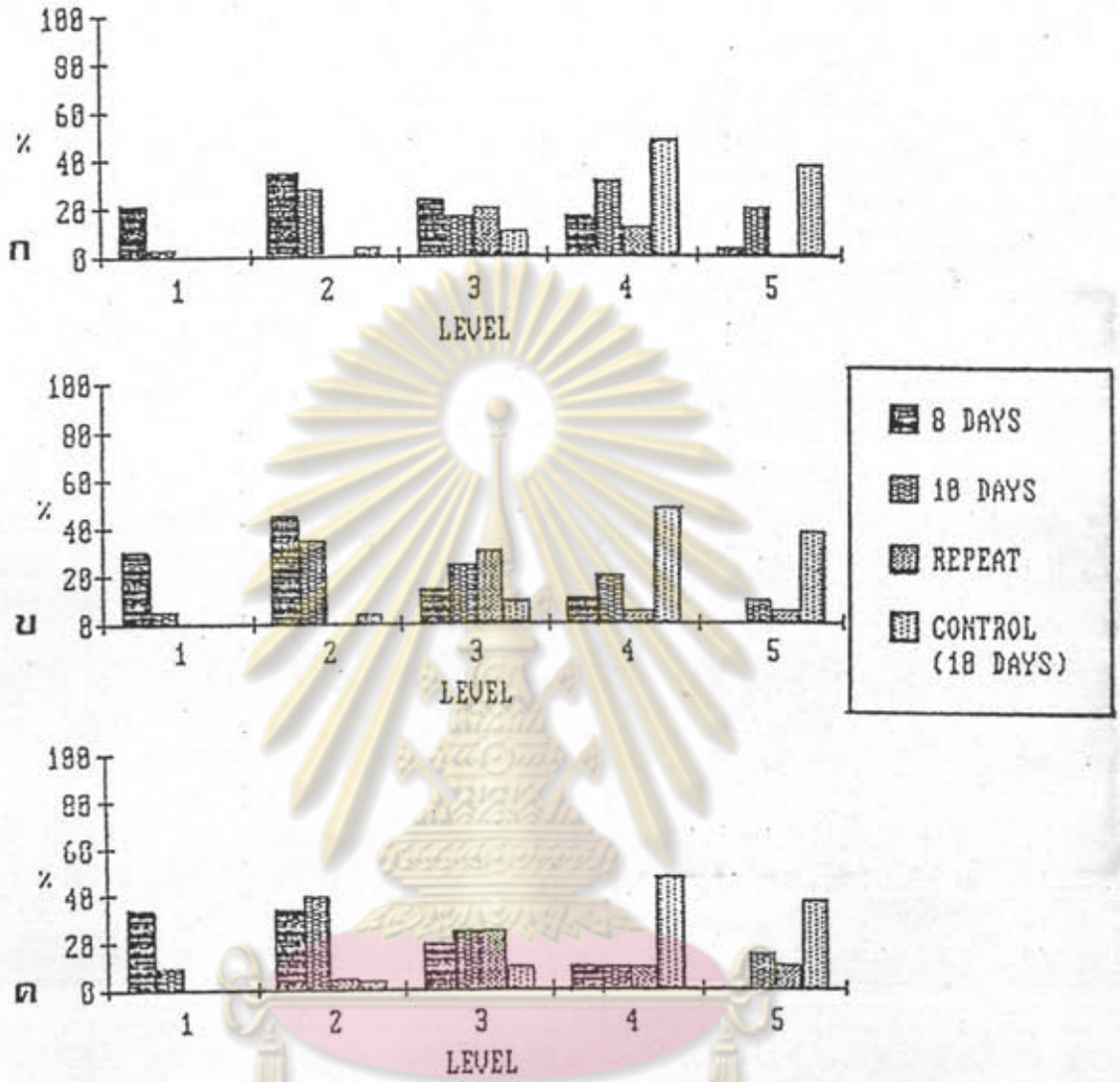
* ทดสอบซ้ำเฉพาะ 8 ต้น ที่เกิดโรคระดับ 1 และ 2

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆของต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ด้านทานสารพิษเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังทดสอบความด้านทานซ้ำด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 40 x 2.5 x 10^5 สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตร

ระดับการเกิดโรค	8 วัน		10 วัน		ทดสอบซ้ำ * (10 วัน)	
	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%	จำนวนต้น	%
1	7	35.00	2	10.00	0	0
2	7	35.00	8	40.00	1	5.00
3	4	20.00	5	25.00	5	25.00
4	2	10.00	2	10.00	2	10.00
5	0	0	3	15.00	2	10.00

* ทดสอบซ้ำเฉพาะ 10 ต้น ที่เกิดโรคระดับ 1 และ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



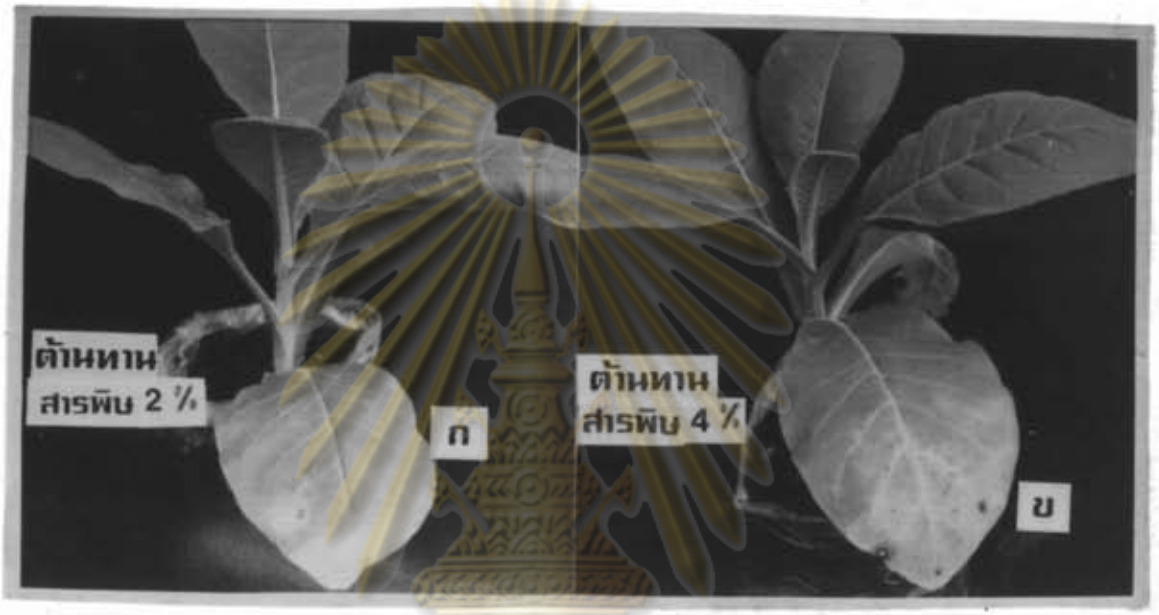
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคระดับต่างๆ ของต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ด้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ $30 \times 2.5 \times 10^5$ สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตรและต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ด้านทานสารพิษ เข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังทดสอบด้วย spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ $40 \times 2.5 \times 10^5$ สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตรเทียบกับcontrolในเวลา 10 วัน

ก. ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ด้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ $30 \times 2.5 \times 10^5$ สปอร์ต่อ 100 มิลลิลิตร

ข. ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ด้านทานสารพิษ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ค. ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ด้านทานสารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

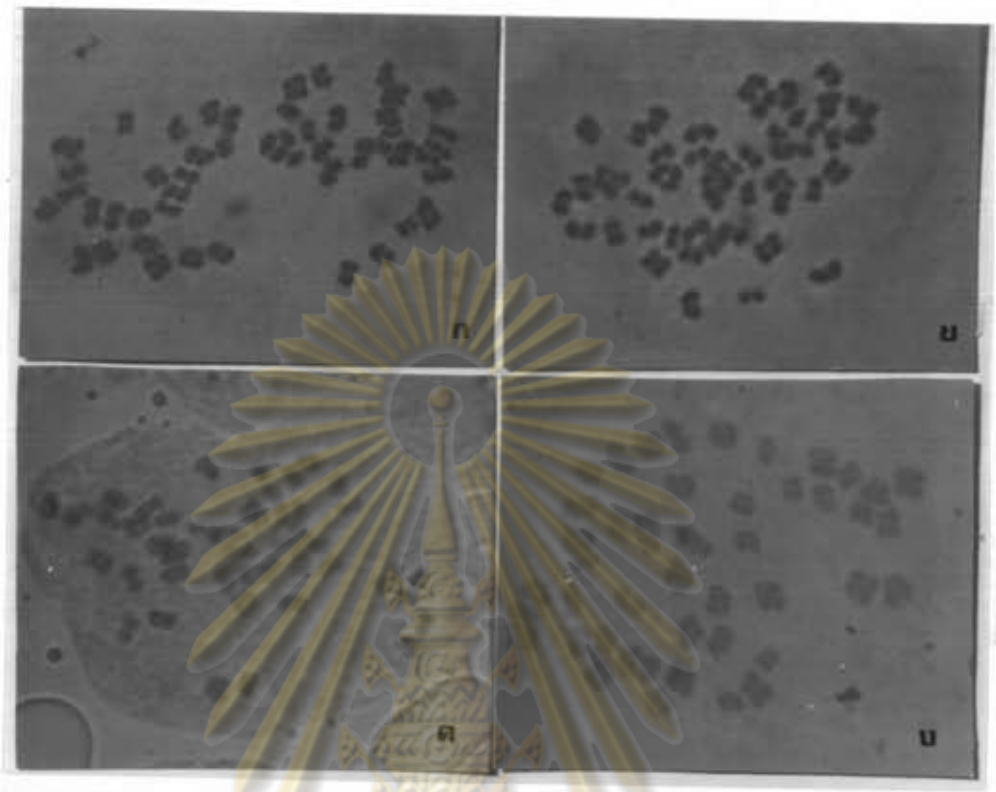


ภาพที่ 29 เปรียบเทียบอาการของโรคระดับ 2 ภายหลังทดสอบความต้านทานซ้ำ เป็นเวลา 10 วัน

ก. ต้นที่เกิดจากแคลลัสต้านทานสารพิษ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (หลังจากทดสอบความต้านทานซ้ำ เกิดโรคระดับ 3)

ข. ต้นที่เกิดจากแคลลัสต้านทานสารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (หลังจากทดสอบความต้านทานซ้ำ อาการเหมือนเดิม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 30 โครโมโซมระยะ metaphase จากเซลล์ปลายรากของยาสูบ (N. tabacum L.) พันธุ์เวอร์จิเนีย โคเกอร์ 347 (2n = 48)

ก. จากต้นที่เกิดจากการเพาะเมล็ด

ข. ต้นที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นที่มีความต้านทานโรคสูง (เกิดโรคระดับ 2)

ค. ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทาน spore suspension ที่มีจำนวนสปอร์ 30 x 2.5 x 10^{5} สปอร์ ต่อ 100 มิลลิลิตร (เกิดโรคระดับ 3)

ง. ต้นที่เกิดจากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (เกิดโรคระดับ 2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย