สารบาญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ค

บทคัดย่อภาษาไทย ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ฉ

สารบาญตาราง ญ

สารบาญภาพ ฎ

อักษรย่อ ฒ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3

บทที่ 3 วิธีการวิจัย 19

บทที่ 4 ผลการทดลอง 25

1. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc 25

1.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของต้นอ่อนยาสูบจากละอองเรณู 26

1.2 ผลการตรวจสอบระดับชุดของโครโมโซมของต้นยาสูบ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู 27

1.3 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างในยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ Xanthi nc 33

2. การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc โดยการใช้กระแสไฟฟ้า 36

2.1 ผลการคัดเลือกลูกผสม 41

2.2 ผลการตรวจสอบโครโมโซมของต้นยาสูบลูกผสม 50

2.3 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างของลูกผสมยาสูบในสภาพเรือนกระจก 53

2.4 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างของลูกผสมยาสูบในสภาพแปลง 54

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 57
เอกสารอ้างอิง 68
ภาคผนวก 74
ประวัติผู้เขียน 91

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงมูลค่าส่งออกและนำเข้าของยาสูบของไทย ระหว่างปี 2540-2542	4
2	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อน การสร้างยอด และการสร้างรากของอับเรณูยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc บนอาหารสังเคราะห์ 2 สูตร	26
3	ค่าเฉลี่ยของความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบ และจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู เปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้จากเมล็ด	28
4	ค่าเฉลี่ยของลักษณะสัณฐานของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู เปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้จากเมล็ด	30
5	ผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก ของยาสูบพันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc	31
6	จำนวน clone ของยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ที่เป็นแฮพลอยด์	34
7	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ	41
8	ผลของโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่าง ๆ ต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์	45

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สารบาญภาพ

ภาพ		หน้า
1	การเตรียมดอกยาสูบเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงอับเรณู	25
	A) ช่อดอกยาสูบที่อยู่ในระยะดอกตูม (button stage)	
	B) ดอกยาสูบที่นำมาเพาะเลี้ยงอับเรณู ขนาดที่เพิ่งมองเห็นกลีบดอกอยู่เหนือกลีบเลี้ยง	
	C) พัฒนาการของละอองเรณูในระยะ uninucleate (20×)	
	D) พัฒนาการของละอองเรณูในระยะ uninucleate (40×)	
2	ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ	27
	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	
3	โครโมโซมและเซลล์ปากใบของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเปรียบเทียบกับยาสูบปกติ	32
	A) กลุ่มโครโมโซมของยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid)	
	B) กลุ่มโครโมโซมของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (haploid)	
	C) เซลล์ปากใบ และการเรียงตัวของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของยาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid)	
	D) เซลล์ปากใบ และการเรียงตัวของเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (haploid)	
4	ลักษณะของยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูเปรียบเทียบกับยาสูบปกติ	33
	A) พันธุ์ TN 90 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (ซ้าย) และต้นปกติที่ได้จากเมล็ด (ขวา)	
	B) พันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู (ซ้าย) และต้นปกติที่ได้จากเมล็ด (ขวา)	
	C) ช่อดอกฝ่อแห้งตายหรือเป็นหมัน (sterile) ของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู	
	D) กระเปาะเมล็ดยาสูบที่สมบูรณ์หลังจากการผสมพันธุ์ ในต้นยาสูบปกติที่ได้จากเมล็ด	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

5 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคไวรัส TMV ในยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ Xanthi nc ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู 35

A-B) ลักษณะต้นยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ที่เป็นแฮพลอยด์ ที่ต้านทานต่อ TMV

C) อาการแผลบนยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7-10 วัน

D) อาการแผลบนยาสูบ *N. glutinosa* ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน

6 ลำดับการแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบ 37

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)

7 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ TN 90 ในอาหารสูตร PS ที่มีสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ (%) 39

8 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบแฮพลอยด์พันธุ์ Xanthi nc ในอาหารสูตร PS ที่มีสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ (%) 39

9 ลักษณะโปรโตพลาสต์ยาสูบที่แยกได้จากใบ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ Cellulase 0.5% และ Macerozyme R 10 0.3% บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง 40

A) ในยาสูบพันธุ์ Xanthi nc โปรโตพลาสต์มีสีเข้ม และขนาดค่อนข้างเล็ก

B) ในยาสูบพันธุ์ TN 90 โปรโตพลาสต์มีสีอ่อน และขนาดใหญ่กว่าพันธุ์ Xanthi nc

C) พัฒนาการของโปรโตพลาสต์พันธุ์ Xanthi nc หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

D) พัฒนาการของโปรโตพลาสต์พันธุ์ TN 90 หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

10 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบแฮพลอยด์ในอาหารสูตร PS (1981) 42

A) จำนวนโปรโตพลาสต์ของพันธุ์ TN 90 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้แสงปกติ

B) ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตของพันธุ์ TN 90 จะเรืองแสงสีเขียวเหลือง เมื่อดูภายใต้กล้อง Fluorescence

C) จำนวนโปรโตพลาสต์ของพันธุ์ Xanthi nc เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้แสงปกติ

D) ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตของพันธุ์ Xanthi nc จะเรืองแสงสีเขียวเหลือง

เมื่อดูภายใต้กล้อง Fluorescence

11 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ยาสูบลูกผสมในอาหารสูตร PS (1981) 43

A) จำนวนโปรโตพลาสต์เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้แสงปกติ

B) จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเขียวเหลืองเมื่อดูภายใต้กล้อง Fluorescence

12 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ใน 2 ลักษณะ 44

A) การแบ่งเซลล์

B) การสร้างหน่อ

13 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ในยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อมีอายุ 30 วัน (%) 46

14 พัฒนาการของโปรโตพลาสต์ 47

A) ลักษณะการเกิดกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (microcalli) หลังการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

B) การเกิดเป็น microcolony (ซ้าย) และแคลลัส (ขวา)

C) แคลลัสที่ย้ายมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต

D) การเจริญเป็นต้นอ่อนหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

15 ระยะการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ลูกผสมหลังงอกเป็นกลุ่มแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต 48

A) การเกิดแคลลัส

B-C) การพัฒนาเป็นต้นอ่อน

D) การเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ หลังการเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ภายหลังการสร้างแคลลัส

16 ขั้นตอนการผลิตลูกผสมยาสูบจากการรวมโปรโตพลาสต์ 49

A) โปรโตพลาสต์หลังจากผ่านขบวนการรวมกันด้วยกระแสไฟฟ้า

B) โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่และเริ่มแบ่งเซลล์

C-E) ช่วงแรกของการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างแคลลัสขนาดจิ๋ว

F-H) กลุ่มเซลล์ขนาดจิ๋วที่เริ่มมองเห็นได้ชัดเจน

I) การพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากแคลลัส

J) ต้นยาสูบลูกผสมที่สมบูรณ์เมื่อปลูกในสภาพแปลง

17 ความผันแปรของจำนวนโครโมโซมของลูกผสมยาสูบที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ 51

18	ลักษณะทางสัณฐานของลูกผสมยาสูบหลังย้ายปลูกในกระถาง	52
	A) รูปร่างของใบ และลักษณะมีหูใบ เหมือนพันธุ์ TN 90	
	B) รูปร่างของใบที่เหมือนพันธุ์ Xanthi nc และไม่มีหูใบ	
	C) ลูกผสมมีสีเขียวเข้มเหมือนพันธุ์ Xanthi nc	
	D) ต้นที่สมบูรณ์ หลังย้ายปลูกในกระถางอายุ 20 วัน	
19	อัตราการเกิดโรคใบด่างในยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ หลังจากการปลูกเชื้อ TMV ในสภาพเรือนกระจก	53
20	อัตราการเกิดโรคใบด่างจากการเข้าทำลายของ TMV ในยาสูบพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อปล่อยให้เกิดโรคตามสภาพธรรมชาติในแปลงทดลอง	54
21	อาการของโรคใบด่างยาสูบ	55
	A) อาการด่างแบบ systemic ในพันธุ์ TN 90	
	B) จุดสีเหลืองที่เริ่มแสดงอาการจุดแห้งตายของเนื้อเยื่อในยาสูบลูกผสม	
22	ลักษณะทางสัณฐานของยาสูบ หลังย้ายปลูกในไร่	56
	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 ลักษณะใบเล็ก แต่กว้าง ทรงพุ่มสูง	
	C) พันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ อายุ 30 วัน (ซ้าย) และ 60 วัน (ขวา) ใบมีสีเขียวเข้มเหมือนพันธุ์ Xanthi nc ลักษณะใบใหญ่และกว้าง ทรงพุ่มค่อนข้างสูง และมีจำนวนใบต่อต้นมากกว่าพันธุ์ TN 90	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

อักษรย่อ

µM	micromole
%	percent
°C	degree Celsius
cm	centimetre
mm	millimetre
nm	nanometre
g	gram
l	litre
mg/l	milligram per litre
ml	millilitre
ppm	part per million
M	molar
mM	millimolar
BA	6-benzylaminopurine, N^6-benzyladenine
2, 4-D	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid
GA_3	gibberellic acid
IAA	indole-3-acetic acid
IBA	indole-3-butyric acid
NAA	α-naphthaleneacetic acid
MS	Murashige and Skoog (1962) medium
NN	Nitsch and Nitsch (1969) medium
PS	Prasartporn Smitamana (1981) medium
LSD	Least significant difference

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University