

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ยาสูบเป็นพืชที่มีแหล่งปลูกกระจายอยู่ทั่วไปเกือบทุกประเทศ ตั้งแต่บริเวณเส้นรุ้งที่ 60 ° เหนือ ลงไปถึงบริเวณเส้นรุ้งที่ 45 ° ใต้ แต่บริเวณที่มีการปลูกยาสูบมากที่สุดคือ แถบบริเวณระหว่างเส้นรุ้ง ที่ 45 ° เหนือ กับ 30 ° ใต้ เมื่อแบ่งพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดของโลกจะแยกการปลูกยาสูบในทวีปต่าง ๆ ดังนี้ ทวีปเอเชีย 45% ทวีปอเมริกา 42% ทวีปยุโรปและรัสเซีย 20% ทวีปอเมริกาใต้ 6% และทวีปแอฟริกา 5% ประเทศที่มีการปลูกและผลิตยาสูบเป็นจำนวนมาก ได้แก่ จีน อินเดีย รัสเซีย ญี่ปุ่น บราซิล ตุรกี ปากีสถาน กรีซ และโรตตีเซีย

การปลูกยาสูบในประเทศไทยจะพบมากในแถบภาคเหนือและภาคอีสาน สำหรับภาคอื่น อาจจะมีการปลูกบ้างเพียงเล็กน้อยเพื่อทำยาสูบหรือยาเคี้ยว (chewing tobacco) ทั้งนี้เพราะคุณภาพของยาสูบโดยเฉพาะคุณภาพของสารนิโคติน ($C_{10}H_{14}N_2$) จะขึ้นอยู่กับสภาพของดินและสภาพภูมิอากาศ ดังนั้น จังหวัดที่มีการปลูกยาสูบเป็นจำนวนมากจึงต้องมีสภาพอากาศที่ค่อนข้างเย็นในฤดูปลูกซึ่งได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แพร่ สุโขทัย เลย สกลนคร แม่ฮ่องสอน เพชรบูรณ์ หนองคาย นครพนม ขอนแก่น และอุบลราชธานี

นอกจากยาสูบจะทำรายได้ให้แก่เกษตรกรได้มากแล้ว ยาสูบยังเป็นสินค้าออกที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศปีละนับพันล้านบาท ขณะเดียวกันประเทศไทยยังต้องสั่งซื้อยาสูบจากต่างประเทศเข้ามาปีหนึ่ง ๆ นับพันล้านบาทเช่นกัน ทำให้ดุลการค้าของประเทศไทยที่เกี่ยวกับยาสูบจึงอยู่ในสภาพที่ไม่ได้เปรียบหรือเสียเปรียบ นอกจากนี้ มูลค่าการส่งออกและการนำเข้าของยาสูบของไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี ดังนั้น ถ้าสามารถปรับปรุงพันธุ์ยาสูบให้ได้มาตรฐานเท่าเทียมกับของต่างประเทศ และสามารถผลิตได้มากพอกับความต้องการ จะทำให้เกิดการได้เปรียบดุลการค้าจากยาสูบถึงปีละนับล้านบาท (ธรรมบุญ, 2526)

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าส่งออกและนำเข้าของยาสูบของไทย ระหว่างปี 2540-2542

ปี พ.ศ.	มูลค่า (ล้านบาท)	
	ส่งออก	นำเข้า
2540	2,522.9	1,592.4
2541	2,293.0	3,022.5
2542 (ม.ค.-ก.ย.)	1,461.9	2,569.0

ที่มา: กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ (2542)

ลักษณะทางพันธุกรรมของยาสูบ

ยาสูบเป็นพืชอยู่ในสกุล *Nicotiana* ตระกูล Solanaceae หรือ Nightshade family ตัวอย่างพืชที่จัดอยู่ในตระกูลนี้ ได้แก่ มันฝรั่ง มะเขือ มะเขือเทศ พริก และพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิดซึ่งบางชนิดใช้เป็นไม้ประดับ บางชนิดใช้ทำยา และบางชนิดเป็นพิษ (ธรรมบุญ, 2526) ยาสูบสามารถจำแนกได้ทั้งหมดมากกว่า 60 ชนิด โดยแยกพื้นที่การปลูกออกเป็นบริเวณที่แตกต่างกันคือ ปลูกอยู่ในแถบอเมริกาใต้ 36 ชนิด ปลูกอยู่ในแถบอเมริกาเหนือ 9 ชนิด และปลูกอยู่ในแถบออสเตรเลียและหมู่เกาะแปซิฟิกตอนใต้ 15 ชนิด นอกจากนี้ พบว่า ยาสูบที่ปลูกตามแหล่งต่าง ๆ มี 2 ชนิดที่ใช้ปลูกเป็นพืชอุตสาหกรรมคือ *N. tabacum* และ *N. rustica* ที่ใช้ผลิตยาสูบและยาเคี้ยว ยาสูบทั้ง 2 ชนิดนี้ปลูกแพร่หลายในแถบอเมริกาใต้ อเมริกากลาง หมู่เกาะอินเดียตะวันตก บริเวณแถบตะวันตกเฉียงใต้และภาคเหนือของเม็กซิโก (Goodspeed, 1954)

Bridgen and Veilleux (1988) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของยาสูบว่า มีอยู่ในระหว่าง $n = 9$ ถึง $n = 24$ แต่ส่วนมากจะมีโครโมโซม $n = 12$ และ $n = 24$ โดยยาสูบพวก *N. tabacum* และ *N. rustica* มีจำนวนโครโมโซม $n = 24$ และจำนวนโครโมโซมในเซลล์ปกติจะมีค่า $2n = 4x = 48$ จากการศึกษาทางเซลล์วิทยา (cytology) เชื่อว่า *N. tabacum* เป็นยาสูบลูกผสม amphidiploid ระหว่าง *N. sylvestris* ($n = 12$) กับ *N. tomentosum* หรือ *N. otophora* ($n = 12$) และเชื่อว่า *N. rustica* เป็นลูกผสม amphidiploid ระหว่าง *N. paniculata* ($n = 12$) กับ *N. undulata* ($n = 12$)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยาสูบ

โดยทั่วไปยาสูบลักษณะการเจริญเติบโตแบบพืชล้มลุก (annual) แต่ในสภาพที่ภูมิอากาศเหมาะสมไม่หนาวหรือร้อนแห้งแล้งเกินไป ยาสูบจะเจริญเติบโตเป็นพุ่มใหญ่มีลักษณะเป็นพืชหลายปี (perennial) (Akehurst, 1981)

ระบบราก : ยาสูบลีมีรากต้นและมีระบบรากแบบรากฝอย หลังจากงอก 10-15 วัน รากชุดแรก (primary root) จะยาวมากและมีรากขนอ่อน (root hairs) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากคล้ายกับระบบรากฝอย (fibrous root) แต่อยู่ในระดับตื้น ขนาดของรากยาสูบขึ้นอยู่กับสภาพทางกายภาพของดิน อุณหภูมิ ความชื้น และชนิดของพันธุ์ยาสูบ

ลำต้น : ยาสูบจัดเป็นพืชพวกไม้เนื้ออ่อน (herbaceous) มีความสูงประมาณ 3-6 ฟุต ลำต้นตรงและค่อนข้างใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.5 นิ้ว ส่วนล่างหรือโคนของลำต้นค่อนข้างเป็นไม้เนื้อแข็ง (woody) ลำต้นปกคลุมด้วย glandular hairs ทำให้ลำต้นเหนียวเหนอะเมื่อจับด้วยมือ

ใบ : ยาสูบลีมีใบใหญ่ ลักษณะนี้เป็นลักษณะที่ผิดไปจากพืชสำคัญอื่น ๆ โดยทั่วไปยาสูบลีมีพื้นที่ใบประมาณ 1.0-1.5 ตารางฟุต รูปร่าง เนื้อที่ และจำนวนใบขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม แต่โดยทั่วไปจำนวนใบในพันธุ์หนึ่งจะคงที่ ใบยาสูบเป็นแบบใบเดี่ยว (simple leaf) ขอบใบเรียบ ความยาวของใบมักเป็นสองเท่าของความกว้าง ใบส่วนมากไม่มีก้านใบ (petiole) มีเพียงบางพันธุ์เท่านั้นที่มีก้านใบสั้น ตำแหน่งของใบจะเวียนสลับ (alternate) บนลำต้น โดยอาจจะเรียงตามเข็มนาฬิกาหรือทวนเข็มนาฬิกา ลักษณะการเรียงของใบ (phyllotaxy) ประมาณ 2/5, 3/8 หรือ 5/13 ใบยาสูบส่วนมากมักมีหูใบ (stipule) นอกจากบางพันธุ์ที่ไม่มีหูใบ ใบมีสีเขียวจนเขียวเข้ม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์และปริมาณธาตุอาหารที่ให้ในแต่ละแหล่งปลูก ใบเมื่อจวนแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนหรือปนเหลือง ทั้งด้านหน้าและด้านหลังของใบมี glandular hairs อยู่ทั่วไปจึงทำให้ใบยาสูบเหนียวเหนอะเช่นเดียวกับลำต้น ในระหว่างมุมใบกับลำต้นจะพบตาข้าง (axillary bud) ในระยะเติบโต ตานี้จะพักตัว (domant) แต่ถ้าเด็ดตายอด (terminal buds) ออกเมื่อโตข้างจะเจริญเติบโตเป็นกิ่งหรือแขนง (sucker) ใหม่ทันที

ช่อดอก : ยาสูบมีช่อดอกแบบ raceme เกิดที่ยอดของลำต้น (terminal raceme) ช่อหนึ่ง ๆ อาจมีดอกถึง 150 ดอก ดอกยาวประมาณ 1.5-2.5 นิ้ว โดยปกติดอกมีสีชมพูแต่อาจมีสีตั้งแต่สีขาวจนถึงสีแดงได้ ดอกมีก้านดอกสั้น มีกลีบดอก 5 กลีบ ส่วนล่างของกลีบดอกทั้ง 5 เชื่อมติดต่อกันเป็น corolla tube ที่ปลายบานออกเป็น 5 แฉก (lobe) กลีบใบ (calyx) ที่หุ้ม corolla tube อยู่ นั้น มีความยาวอาจถึงกึ่งกลางของดอกและมีลักษณะคล้ายรูประฆัง (bell-shape) ปลายแยกออกเป็น 5 แฉก มีขนอ่อน ๆ สีขาวอยู่ทั่วไป ภายในดอกประกอบด้วยเกสรตัวผู้ (stamen) 5 อัน เชื่อมติดกับ corolla tube แต่ละ stamen มีก้านชูเกสรตัวผู้ (filament) ยาว อับเรณู (anther) มีลักษณะเป็นรูปไข่ซึ่งเมื่อเวลาผสมจะแตกตามยาว เกสรตัวเมีย (pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) ที่มี 2 carpels แต่ละ carpel มีไข่ (ovule) อยู่มากมาย ก้านเกสรตัวเมีย (style) ยาวอยู่บนรังไข่ ปลายยอดเกสรตัวเมีย (stigma) แบ่งออกเป็น 2 แฉก (lobes) จะสังเกตเห็นว่า stigma และ anther เกิดอยู่ในระดับเดียวกัน จึงเป็นสาเหตุประการหนึ่งที่ทำให้ยาสูบเป็นพืชที่มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ

เมล็ด : ยาสูบเป็นพืชที่มีเมล็ดมาก ดอกหนึ่งอาจมีเมล็ดถึง 2,000-8,000 เมล็ด มีสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างคล้ายรูปไข่ มีเส้นสานกันเป็นร่างแหอยู่บนผิว ด้านหนึ่งมีเส้นผ่ากลางเห็นชัดเจน น้ำหนักเมล็ดโดยเฉลี่ยประมาณ 0.03-0.09 กรัม/1,000 เมล็ด

ประเภทของยาสูบ

ท้าว (2532) ได้จำแนกชนิดของยาสูบที่ปลูกในประเทศไทยเพื่อการผลิตจำหน่าย และส่งออกต่างประเทศเป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. ยาสูบเวอร์จิเนีย (Virginia) เป็นยาสูบประเภทบ่มไอร้อน (Flue-cured type) มีกลิ่นหอม ไม่ฉุน นิยมทำเป็นบุหรี่ยาสูบ มีปลูกกันมากในภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ และภาคอีสานที่จังหวัดนครพนม และหนองคาย มีลำต้นค่อนข้างสูงประมาณ 1-2 เมตร ใบค่อนข้างใหญ่และยาว ปลูกกันมากเป็นอันดับหนึ่ง คือประมาณ 90% ของประเทศ

2. ยาสูบเบอร์เลย์ (Burley) เป็นประเภทบ่มอากาศ (Air-cured type) มีกลิ่นหอมฉุน สีคล้ำ ใช้ปรุงแต่งบุหรี่ยาสูบ ปลูกกันมากในภาคเหนือที่จังหวัดสุโขทัย เพชรบูรณ์ ดาก มีลำต้นสูงใหญ่

ใบกว้างยาวพอ ๆ กับยาสูบเวอร์จิเนีย ชอบดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง เป็นดินที่มีน้ำท่วมถึง ปลุกกันประมาณ 5% ทั่วประเทศ

3. ยาสูบเตอร์กิช (Turkish) เป็นประเภทบ่มแดด (Sun-cured type) มีกลิ่นหอมในตัวของมันเอง จึงเรียกกันอีกชื่อหนึ่งว่า Aromatic Tobacco ใช้ปลูกที่สหรัฐอเมริกา มีปลูกกันมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดร้อยเอ็ด มหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ สกลนคร และ นครพนม ยาสูบประเภทนี้มีลำต้นเล็ก ใบเล็ก ใบส่วนใหญ่สุดโตไม่มีตำหนิถ้าปลูกในดินร่วนปนทราย ระบายน้ำได้ดี และพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้งจะได้ใบยาที่มีคุณภาพดี แต่ถ้านำไปปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงจะมีลำต้นสูงใหญ่ ใบกว้างเหมือนใบยาประเภทอื่นแต่คุณภาพอาจไม่ดีนัก พื้นที่ปลูกทั่วประเทศประมาณ 5%

4. ยาสูบพื้นเมือง (Chewing tobacco) เป็นประเภทบ่มแดดเช่นกัน ส่วนใหญ่จะมีรสจืดระคายคอ มีปลูกกันทั่วไปตามภาคต่าง ๆ ที่ดินปลูกมีความอุดมสมบูรณ์สูง และเป็นดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง เช่น ตามริมฝั่งแม่น้ำ ตามหุบเขาที่มีอากาศชุ่มชื้น หรือเป็นดินที่น้ำท่วมถึงทุกปี แต่ส่วนใหญ่พบปลูกมากทางภาคเหนือ เช่น ที่จังหวัดแพร่ อุตรดิตถ์ ทางภาคอีสานที่จังหวัด นครพนม และหนองคาย ทางภาคกลางที่จังหวัดกาญจนบุรี และทางภาคใต้ที่จังหวัด นครศรีธรรมราช เป็นต้น

โรคใบต่างของยาสูบ

โรคใบต่างของยาสูบ เป็นโรคที่แพร่ระบาดอย่างกว้างขวาง แทบกล่าวได้ว่าสามารถพบได้ทั่วโลก สามารถเข้าทำลายพืชได้ไม่ต่ำกว่า 150 สกุล ซึ่งรวมทั้งไม้เนื้ออ่อนประเภทใบเลี้ยงคู่ พืชผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ และวัชพืช พืชที่มีอาการรุนแรง คือ ยาสูบ มะเขือเทศ และมันฝรั่ง แต่จะไม่ทำให้เกิดอาการเลยกับองุ่นและแอปเปิล ทั้ง ๆ ที่มีไวรัสค่อนข้างสูง เชื้อไวรัสชนิดนี้จะเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วนไม่ว่าจะเป็นใบ ดอก หรือ ผล และอาจทำให้พืชแคระแกร็นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาสูบซึ่งเป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อนี้มากโดยจะทำให้พืชที่เป็นโรคมียุ่คุณภาพด้อยลง ตลอดจนผลผลิตลดลง ถ้ายาสูบได้รับเชื้อนี้ตั้งแต่ระยะกล้า จากการทดลองปลูกเชื้อไวรัส TMV ให้กับยาสูบที่อายุต่าง ๆ กัน คือ ตั้งแต่ย้ายปลูก, อายุ 1 เดือนหลังจากย้ายปลูก และในระยะเริ่มออกดอก ปรากฏว่า ผลผลิตลดลงถึง 33, 20 และ 5% ตามลำดับ ส่วนการป้องกันกำจัดที่ได้ผลดีที่สุด คือ การใช้พันธุ์ต้านทานโรค (ประสาทพร, 2534) โดยเชื้อสาเหตุของโรค คือ Tobacco Mosaic

Virus (TMV) ทำให้ใบยาสูบเกิดรอยต่างเป็นสีเขียวเข้มหรือสีเขียวอ่อน ๆ สลับกับสีเขียวของพื้นใบ ถ้าโรคนี้ออกกับยาสูบที่ยังเล็กอยู่ต้นจะเตี้ยแคระแกร็นและเจริญเติบโตช้ากว่าต้นปกติ ถ้าเป็นเมื่อต้นยาสูบโตแล้วใบที่แตกออกมาใหม่เท่านั้นที่จะแสดงอาการของโรคใบต่างได้ชัดเจน เชื้อไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในราก และลำต้นของยาสูบ แม้ว่าจะถอนหรือตัดต้นยาสูบทิ้งไปก็ตามเมื่อถึงฤดูเพาะปลูกยาสูบใหม่เชื้อไวรัสเหล่านี้จะเข้าทำลายแพร่ระบาดไปอีก และสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในยาสูบนานถึง 50 ปี โรคนี้อาศัยได้ง่ายด้วยการสัมผัสโดยตรงจากส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นยาสูบที่เป็นโรคกับส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นยาสูบปกติ (มานพ และอินทร์ทอง, 2525) มีรายงานโดย Akehurst (1981) ว่า ในปี 1977 ยาสูบเวอร์จิเนียที่ปลูกในมลรัฐ North Carolina ประเทศสหรัฐอเมริกา เกิดความเสียหายเนื่องจากโรคใบต่างสูงถึง 0.75% หรือคิดเป็นมูลค่าถึง 6.2 ล้านดอลลาร์

การควบคุมการระบาดของเชื้อ TMV โดยการใช้ยีนลักษณะเด่น พบในรายงานของ Wernsman (1994) ที่ใช้ยาสูบพันธุ์ป่า *Nicotiana glutinosa* ที่ให้อาการ hypersensitivity ต่อเชื้อ TMV ในลักษณะที่เป็น single dominant gene (*Nc*) มาสร้างลูกผสมที่มี *N* gene ซึ่งจะมีลักษณะของความต้านทานในรูปของการแสดงอาการเฉพาะแหล่งที่ได้รับเชื้อ แต่ในสภาพที่อุณหภูมิสูงจะแสดงอาการ systemic necrosis ได้ ส่วนในสภาพแปลงทดลองจะพบอาการดังกล่าวได้ยาก

Goodman and Novacky (1994) กล่าวถึงไวรัสสาเหตุโรคพืชที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา hypersensitivity โดยให้อาการแบบ necrotic lesions ซึ่งขึ้นกับจีโนไทป์ของพืชและมี *N* gene เป็นตัวกำหนด แต่อาจเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ แสง ปริมาณของเชื้อไวรัส และประสิทธิภาพของการปลูกเชื้อ รวมทั้งเป็น hypersensitive response (HR) ของพืช เช่นที่พบใน *N. glutinosa* เมื่อปลูกเชื้อด้วย TMV เนื่องจาก *N* gene ในยาสูบเป็นยีนลักษณะเด่นบนตำแหน่งเดียว การแสดงออกจะขึ้นกับสภาพของอุณหภูมิที่แตกต่างกันในยาสูบแต่ละชนิด โดยที่อุณหภูมิ 20-22 °C ยีนดังกล่าวจะถูกกระตุ้นให้อาการ necrosis พัฒนาได้อย่างรวดเร็วเมื่อพืชถูกเข้าทำลายโดย TMV ส่วนอุณหภูมิ 28 °C หรือสูงกว่าจะปรากฏอาการแบบ systemic พันธุ์ยาสูบที่เป็นแหล่ง *N* gene ยังได้แก่ *N. tabacum* cv. Xanthi nc ที่ให้อาการ HR ที่เฉพาะเจาะจงต่อ TMV ส่วนยาสูบ *N. sylvestris* เป็นแหล่ง *N* gene ที่ให้อาการ systemic กับ TMV ที่เป็น mild strain

Padgett and Beachy (1993) รายงานว่า ยาสูบแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อการเข้าทำลายของ TMV และไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่ม tobamovirus ได้แตกต่างกัน ส่วนในพืชอาศัยบางชนิดจะเกิดอาการ systemic เนื่องมาจากจากความรุนแรงของโรคได้มากหรือน้อย ขึ้นกับสายพันธุ์ของไวรัสและการเกิดปฏิกิริยา hypersensitive response ซึ่งเป็นการพัฒนาของอาการ necrosis ที่จำกัดขอบเขตการกระจายตัวของไวรัสที่เข้าทำลายในระยะเริ่มแรก และป้องกันไม่ให้อาการแบบ systemic เกิดขึ้นได้ N gene ที่พบในยาสูบพันธุ์ป่า *N. glutinosa* ควบคุมโดยยีน 1 ตำแหน่งที่เป็นยีนลักษณะเด่น และเป็นแหล่งของความต้านทานที่ยั่งยืนต่อไวรัสในกลุ่ม tobamovirus ส่วนยาสูบพันธุ์ Xanthi nc ที่ถูก TMV เข้าทำลายก็ตอบสนองปฏิกิริยา hypersensitive response ที่ต่อต้านไวรัสในลักษณะเดียวกัน

การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบ

การเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นงานส่วนหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นการพัฒนาเทคนิคการขยายพันธุ์พืชเพื่อการคัดพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ หรือพันธุ์เดิมที่มีคุณภาพดีและผลผลิตสูง มีปริมาณเพียงพอกับความต้องการในระยะเวลาสั้น (ลาวัลย์, 2539) ขบวนการเอ็มบริโอเจนีซิสของละอองเรณูเป็นตัวอย่างหนึ่งของการแสดงออกของลักษณะ totipotency ของพืชชั้นสูงซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์พืช แต่ในทางปฏิบัติจะประสบความสำเร็จในพืชบางชนิด (Kyo, 1996)

Bajaj (1990) รายงานการพัฒนาละอองเรณูมี 2 วิธี คือ Direct androgenesis และ Indirect androgenesis โดยในพืชสกุล *Atropa*, *Datura* และ *Nicotiana* การพัฒนาจะเป็นวิธีแรก โดยเอ็มบริโอที่อยู่ในระยะ globular stage จะพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนและงอกเกิดเป็นต้นเล็ก ๆ จากอับเรณูภายใน 4-8 สัปดาห์ พิรุฒิ (2540) ศึกษาการเพาะเลี้ยงละอองเรณูในพืชชั้นสูงว่ามีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว เพื่อผลิตพืชสายพันธุ์แท้ และเพื่อศึกษาการเจริญและการพัฒนาของละอองเรณู ส่วนความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรมของพืช สภาพแวดล้อมขณะที่ปลูกพืชและอายุของพืช ระยะการพัฒนาของละอองเรณู เทคนิคการกระตุ้นอับเรณู อาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยง ตลอดจนสภาพแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ตัวอย่างในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของ *Nicotiana rustica* จะใช้ดอกที่มีความยาว 6.5-7.5 มม. ส่วน Nitsch and Nitsch (1969) กล่าวว่าดอกที่จะนำมาเพาะเลี้ยงอับเรณูต้องอยู่ในระยะ "Stage-2" ซึ่งเป็นระยะที่เพิ่งมองเห็นกลีบดอก

อยู่เหนือกลีบเลี้ยงเพียงเล็กน้อย Sunderland and Wicks (1969) ตรวจสอบระยะของการพัฒนาของละอองเรณูของยาสูบพบว่า ช่วงที่กลีบดอกมีขนาด 8-16 มม. ที่ละอองเรณูอยู่ในระยะ uninucleate และช่วงที่กลีบดอกมีขนาด 17-20 มม. ที่ละอองเรณูเข้าสู่ระยะ first pollen grain mitosis (1stPGM) เป็นช่วงสำคัญที่สุดในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากการเลี้ยงอับเรณู ประสาทศตร์ (2536) รายงานว่า ระยะที่เหมาะสมของของอับเรณูยาสูบ คือ ละอองเรณูแบ่งตัวแบบไมโทซิสครั้งที่ 1 (1stPGM) ส่วนในธัญพืช และพืชในสกุล *Brassica* คือระยะ uninucleate

การชักนำที่ทำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของละอองเรณูยังขึ้นอยู่กับอายุของพืช และสภาพการเจริญของพืช นอกจากนี้ การ pretreatment อับเรณูก่อนที่จะเพาะเลี้ยงจะเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาของละอองเรณู โดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลาหนึ่ง (3-5 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง) สามารถช่วยเพิ่มจำนวนต้นอ่อนที่เกิดจากอับเรณู ส่วนเทคนิคการกระตุ้นอับเรณูโดยบ่มอับเรณูยาสูบในที่มืดและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมก่อนทำการเพาะเลี้ยง คือ 12 วัน ที่ 7 °C ช่วยให้การเจริญและพัฒนาของละอองเรณูดีขึ้น (ประสาทศตร์, 2536) Sunderland (1984) เก็บอับเรณูไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิอยู่ในระหว่าง 7-9 °C เป็นเวลา 14-21 วัน พบว่า ช่วยเพิ่มการเจริญของต้นอ่อนได้มากขึ้น 10-15 เท่า ส่วนที่อุณหภูมิ 14 °C เป็นเวลา 7 วัน ที่ 20 °C เป็นเวลา 4 วัน หรือที่ 25 °C เป็นเวลา 2 วัน ล้วนแต่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์

ในด้านความเข้มข้นของน้ำตาลซึ่งมีผลต่อความดันออสโมติก Gleba and Sytnik (1984) รายงานว่า ในพืชสกุล *Datura* และ *Nicotiana* spp. ต้องใช้น้ำตาลซูโครส 2.0% ผสมลงในอาหารวุ้นที่ใช้เลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดกระบวนการเอ็มบริโอจีเนซิส Nitsch and Nitsch (1969) รายงานว่า น้ำตาลซูโครส 2.0% ร่วมกับวุ้น 0.8% สามารถกระตุ้นให้ละอองเรณูสร้างเอ็มบริโอยอดได้ไม่เกินระยะ globular แต่ถ้าเติมเกลือแร่ต่าง ๆ ละอองเรณูจะสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Tomes *et al.* (1982) พบว่า น้ำตาลซูโครสที่ระดับ 8.5% ทำให้ละอองเรณูยาสูบเกิดการพัฒนาได้ดี ส่วนสารประกอบอินทรีย์ที่ต้องเติมลงในอาหาร ได้แก่ glutamine และ serine ส่วน Bhojavani and Razdan (1983) พบว่า การเจริญและพัฒนาของละอองเรณูใน *N. tabacum* และ *D. innoxia* สามารถชักนำไมโครสปอร์ให้อยู่ในระยะ globular ได้ บนอาหารวุ้นที่มีเฉพาะน้ำตาลซูโครส ส่วนการพัฒนาในขั้นต่อนต่อไป จะต้องการแร่ธาตุอาหารอื่น ๆ เพิ่มเติม

Sunderland (1984) รายงานว่า ยาสูบเป็นพืชที่สามารถเพาะเลี้ยงอับเรณูให้ประสบความสำเร็จได้สูงรองจาก *Datura innoxia* ซึ่งสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ N₆ medium ของ

Chu (1978) MS medium ของ Murashige and Skoog (1962) หรือ H medium ของ Nitsch (1972) ส่วนสถานะของอาหารที่ใช้เลี้ยง พบว่า อาหารแข็งสามารถพัฒนาให้แคลลัสได้ดีกว่าอาหารเหลว แต่แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารแข็งพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้น้อยกว่า (Dixon, 1985)

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการ นอกจากอายุของละอองเรณูแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดการเจริญและพัฒนาของละอองเรณูในช่วง 25-28 °C นับว่ามีความสำคัญต่อการผลิตพืชแฮพลอยด์โดยเกิดต้นอ่อนหลังจากการเพาะเลี้ยงละอองเรณูที่อยู่ในระยะ uninucleate ไปแล้ว 1 เดือน Kasperbauer and Collins (1974) กล่าวว่า จะเกิดต้นเล็ก ๆ เป็นจำนวนมากเมื่อเลี้ยงอับเรณูยาสูบที่อุณหภูมิ 26 °C มากกว่าที่ 21 °C โดยกระบวนการเอ็มบริโอจีเนซิสในช่วงแรกจะไม่ต้องแสง แต่ในช่วงหลังจากที่งอกแล้วแสงจะช่วยป้องกันการ etiolation ของต้นพืชได้ ส่วนการใส่ฮอร์โมนพืชลงในอาหารจะช่วยให้ช่วยในกระตุ้นให้เกิดพัฒนาการ และอาจยับยั้งพัฒนาการได้ นอกจากนี้ กรดอะมิโนบางอย่าง เช่น glutamine arginine และ asparagine สามารถส่งเสริมให้เกิดต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูสำหรับการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ในยาสูบพันธุ์ Xanthi จะไม่ต้องแสงในขณะที่ยาสูบพันธุ์อื่น ๆ มีความจำเป็นต่อการเกิดต้นอ่อนจากอับเรณู (พรทิพย์, 2528)

Kyo and Harada (1990) รายงานความเข้มข้นที่เหมาะสมของ glutamine ที่ใส่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงอับเรณูต่อพัฒนาการไปเป็นเซลล์ต้นอ่อน (embryogenic cells) นอกเหนือไปจากปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งได้แก่ ช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงในขั้นตอนต่าง ๆ ระยะการพัฒนากล่องเรณู และการยับยั้งการเกิดกระบวนการ dedifferentiation เนื่องจากสาร BA ที่ใส่ลงไปในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ Kyo and Harada (1985) ได้ใช้อาหารสูตร Murashige&Skoog ที่มี mannitol 0.4 M glutamine 3.0 mM โดยไม่ผสมฮอร์โมน มาชักนำให้ละอองเรณูของ *N. rustica* พัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ในอัตราที่สูง อย่างไรก็ตาม Kyo and Harada (1986) กลับพบว่า สาร glutamine ที่เติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงมีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอจีเนซิสของ *N. tabacum* ได้ในระยะการเจริญของละอองเรณูที่จำกัด

Reinert and Bajaj (1977) รายงานว่า การเติมผงถ่าน (activated charcoal) จะเพิ่มประสิทธิภาพของการพัฒนาของละอองเรณูในการดูดซับสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ และมีผลทำให้อัตราการรอดตายของละอองเรณูในระหว่างการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของยาสูบพันธุ์ Badischer-Burley ที่เติมผงถ่านความเข้มข้น 2% ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลทำให้

พัฒนาของละอองเรณูเพิ่มจาก 41% เป็น 91% ส่วน Ferrie *et al.* (1995) รายงานว่า การใช้ผงถ่านส่งเสริมกระบวนการเอ็มบริโอจีนิซิสในพืชอีกหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ข้าวโพด พริก โดยมีผลไปลดอันตรายจากการเป็นพิษของสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงอับเรณู

Dunwell (1979) ศึกษาถึงปริมาณของอากาศภายในภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูยาสูบที่มีผลต่อองค์ประกอบของก๊าซต่าง ๆ เช่น เอทิลีน คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบขนาดภาชนะต่าง ๆ กัน 4 ขนาด คือ 0.5 5.5 15.0 และ 25.0 มล. พบว่า ปริมาตรที่เหมาะสมต่อการเกิดต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ดี คือ 15.0 มล. ต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู 1 อัน ส่วนภาชนะขนาด 5.5 มล. เหมาะสมต่อการเจริญของต้นอ่อนหลังจากงอก ส่วนปริมาณของอากาศในภาชนะขนาดเล็ก คือ 0.5 มล. ยับยั้งการเกิดต้นอ่อน

Flick and Evans (1984) ตรวจสอบยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูว่า ได้ต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นครึ่งหนึ่งของต้นปกติ (haploid) และสามารถผลิตต้นแฮพลอยด์ได้หลายร้อยต้นจากละอองเรณูภายในอับเรณูอันเดียว Croughan (1995) กล่าวว่า ต้นแฮพลอยด์ที่ได้จะเป็นหมันและไม่สามารถสร้างเมล็ดได้ ส่วนในรายงานของ Kasperbauer and Collins (1972) ได้ตรวจสอบต้นยาสูบเล็ก ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นกลางใบของยาสูบแฮพลอยด์อายุ 3 สัปดาห์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูว่า เป็นยาสูบที่มีชุดของโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ทั้งหมด และหลังจากที่ย้ายต้นอ่อนออกไปเลี้ยงในอาหารที่กระตุ้นการสร้างราก แล้วปล่อยให้แคลลัสที่เหนือเจริญต่อไปจะสามารถงอกต้นดิพลอยด์ (diploid) และอะนิวพลอยด์ (aneuploid) ได้

การตรวจสอบความแตกต่างในระดับชุดของโครโมโซม (ploidy level) วิธีที่ดีที่สุดในพื้นที่ทั่วไปคือ การศึกษาทางพันธุกรรมของเซลล์โดยการนับแท่งโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก แต่ต้องอาศัยเวลา แรงงาน และความชำนาญสูง ในพืชอื่น ๆ เช่น แตงโม มีรายงานการตรวจสอบระดับชุดของโครโมโซมโดย Compton *et al.* (1996) ว่า สามารถตรวจสอบความแตกต่างของเตตราพลอยด์ (tetraploid) และดิพลอยด์ได้อีกหลายวิธี เช่น การนับจำนวนเมล็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ การวัดขนาดของรังไข่และกลีบดอก และการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเกสรตัวผู้ ตลอดจนการวัดอัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างของใบ Flowers *et al.* (1967) แสดงว่า ยาสูบที่เป็นแฮพลอยด์มีขนาดของเซลล์ปากใบเล็กกว่าพวกดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ Reed (1993) รายงานการใช้ขนาดของเซลล์ปากใบในการตรวจสอบระดับชุดของโครโมโซมที่แตกต่าง

กันของยาสูบพันธุ์ Ovens 52 และ Ky 15 ว่า ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเรณูที่เป็นแฮพลอยด์ และที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นกลางใบ (midvein culture) ที่เป็นดิพลอยด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ และสรุปว่าขนาดของเซลล์ปากใบจะเพิ่มขึ้นตามระดับชุดของโครโมโซม

การผลิตต้นดิพลอยด์โดยการรวมโปรโตพลาสต์

ประสาทร (2529) รายงานว่า การค้นพบวิธีการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์นับเป็นความก้าวหน้าทางวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมี และใช้ประโยชน์ในแง่การปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การนำเอาโปรโตพลาสต์จากพืช 2 พันธุ์มารวมกันให้เกิดเป็นพันธุ์ใหม่ โดยในยาสูบประสบความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์อย่างน้อย 17 ชนิด ซึ่งสภาพที่ใช้ในการแยกมีแตกต่างกันไปทั้งในระหว่างชนิดและภายในชนิดเดียวกัน ประศาสตร์ (2536) รายงานแหล่งเซลล์ที่ใช้แยกโปรโตพลาสต์ยาสูบว่ามีแตกต่างกัน 4 แหล่ง คือ เซลล์จากใบ (mesophyll) เซลล์ผิวใบ (epidermis) เซลล์แขวนลอย (cell suspension) และแคลลัสจากเซลล์ส่วนลำต้น (stem callus) เซลล์พืชทุกชนิดนอกจากนี้เยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังมีผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่งที่โครงสร้างประกอบด้วยสารพวก cellulose และ hemicellulose เซลล์แต่ละเซลล์จะเชื่อมกันด้วยชั้น middle lamella ที่ประกอบด้วยสารพวก pectin ในการย่อยเซลล์เพื่อผลิตโปรโตพลาสต์จึงต้องมีเอนไซม์ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกใช้สำหรับย่อย middle lamella ได้แก่ เอนไซม์เพคตินเอส และอีกกลุ่มที่ใช้ย่อยผนังเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส Takebe and Nagata (1984) แยกโปรโตพลาสต์จากใบยาสูบโดยใช้สารละลายเอนไซม์ 2 ชั้นตอน คือ ใช้เพคตินเอสย่อยใบที่ลอกชั้นผิวใบออกเพื่อย่อย spongy และ palisade parenchyma cells แล้วจึงใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยเซลล์ให้เป็นโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ Dixon (1985) ใช้เอนไซม์ Meicelase 15% Macerozyme R 10 0.05% และ Mannitol 13% พบว่า แยกโปรโตพลาสต์ยาสูบได้ดีโดยต้องทำการลอกเซลล์ชั้นนอกด้านท้องใบออก เอนไซม์เซลลูเลสที่มีชื่อการค้าว่า Onozuka R 10 ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ของยาสูบกันแพร่หลาย และยังใช้เอนไซม์กลุ่มนี้ร่วมกับ Macerozyme (Macerase) Carlson *et al.* (1972) ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ของ *Nicotiana glauca* และ *N. langsdorffii* โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย Cellulase 4% Macerozyme 0.4% และซูโครสเข้มข้น 0.6 M ที่ pH 5.7 พบว่า ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ได้มากกว่า 5×10^3 protoplast ต่อปริมาตร 1 มล. ส่วน Taniguchi (1997) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเพคตินเอส และเซลลูเลส

ว่า เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรกเกิดขึ้นภายใน 2-3 วันหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม Takebe and Nagata (1984) รายงานถึงเปอร์เซ็นต์ของโปรโตพลาสต์ที่รวมกลุ่มกันเป็นโคโลนี (plating efficiency) หลังจากการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารว่า ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประชากรโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ ความเข้มของแสงที่ต่ำกว่า 800 lx จะให้ plating efficiency ที่ต่ำ ในขณะที่ความเข้มของแสงที่สูงเกินไป (5,000 lx) จะไม่ส่งเสริมการสร้างโคโลนีแต่อย่างใด Bajaj (1977) กล่าวว่า ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์และความเข้มของแสงเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการเพิ่ม plating efficiency ของโปรโตพลาสต์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยในยาสูบ อาจเพิ่ม plating efficiency ขึ้นได้ถ้านำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ใน 2 วันแรกไปบ่มที่ความเข้มของแสงต่ำ (300 lux) แล้วย้ายไปไว้ที่ความเข้มแสงที่สูงขึ้น (3,000 lux)

ประกาศศร (2536) รายงานการรวมโปรโตพลาสต์ว่า เป็นการผสมพันธุ์พืชโดยอาศัย somatic cell ซึ่งอาจเป็นเซลล์ของพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน ซึ่งในการรวมโปรโตพลาสต์ในยาสูบชนิดเดียวกัน (Intraspecific hybrid) เช่น *N. tabacum* + *N. tabacum* หรือเป็นลูกผสมของการรวมโปรโตพลาสต์ในยาสูบต่างชนิดกัน (Interspecific hybrid) เช่น *N. tabacum* + *N. glutinosa* และลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์จากพืชต่างสกุลกัน (Intergeneric hybrid) เช่น *N. tabacum* + *Petunia hybrida* Kao and Michayluk (1989) รายงานขั้นตอนการรวมโปรโตพลาสต์ทั้งหมด 5 ขั้นตอน ได้แก่ การแยกเอาผนังเซลล์ออก การเหนี่ยวนำให้เมมเบรนมาสัมผัสกันและทำให้ขาดออกจากกัน การจำแนกและคัดเลือกลูกผสมที่ได้ การเพาะเลี้ยงลูกผสม และการชักนำให้เจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ปัจจุบันมีวิธีการกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์รวมกันได้ 5 วิธี ได้แก่ การใช้สาร polyethylene glycol (PEG) การใช้แคลเซียม อีออน (high Ca^{++}) การใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น การยิงด้วยอิเล็กตรอน และการใช้แสงเลเซอร์

Zimmermann (1981) รายงานถึงการรวมโปรโตพลาสต์โดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าว่า สามารถกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวในแนวเดียวกันและอยู่ชิดกันได้โดยใช้สนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ระหว่าง 1-10 KV/cm ซึ่งขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้และความสามารถในการนำไฟฟ้าของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง Bates (1989) ศึกษาว่า การใช้สนามไฟฟ้าในการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารเคมี และยับยั้งการเป็นพิษเนื่องจากการใช้สารพวก PEG ได้ Zimmermann's protocol รายงานถึงวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้า 2 ขั้นตอน คือ

หลังจากนำโปรโตพลาสต์ใส่ใน fusion chamber ที่ประกอบด้วยสายไฟจากขั้ว electrode ทั้ง 2 ขั้ว แล้วให้ไฟฟ้ากระแสสลับ (AC) ในความต่างศักย์ที่ต่ำซึ่งทำให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวกันเป็นเส้นตรงในลักษณะ pearl chain ให้แต่ละเซลล์สัมผัสกัน จากนั้นเกิดการรวมกันขึ้นได้โดยการให้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC) ในความต่างศักย์ที่สูงเป็นระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งมีผลทำให้โครงสร้างของ plasma membrane เกิดการแตกหักหรือขาดออกจากกัน เกิดการหลอมรวมกันขึ้นเป็นเซลล์เดียว รวมระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดประมาณ 5 นาทีหรืออาจน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม การเกิดโครงสร้างที่แต่ละเซลล์มาสัมผัสกันนั้นจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบต่าง ๆ เช่น ความถี่และความต่างศักย์ของไฟฟ้ากระแสสลับ ลักษณะรูปร่างหรือระยะห่างของขั้ว electrode ตลอดจนองค์ประกอบของอาหาร Bates (1989) ได้รายงานความถี่ของไฟฟ้ากระแสสลับ (AC) ที่ทำให้เกิดการเรียงตัวกันเป็นเส้นตรงของโปรโตพลาสต์ว่า โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 0.5-1.0 MHz ส่วนความต่างศักย์ที่ใช้ขึ้นอยู่กับลักษณะของ electrode ซึ่งระยะห่างของ electrode ประมาณ 0.5 มม. ใช้ความต่างศักย์ในช่วง 5-10 V แต่ถ้าระยะห่างระหว่าง electrode ทั้งสองมากขึ้น ความต่างศักย์ที่ใช้ก็จะมากขึ้นด้วย ส่วนค่าของ field strengths ที่มีผลต่อการรวมโปรโตพลาสต์โดยตรง อาจให้อยู่ระหว่าง 100-200 V/cm ในการรวมโปรโตพลาสต์ของ *N. tabacum* และ *N. plumbaginifolia* พบว่า ไม่มีการตอบสนองแต่อย่างใดในช่วงที่ให้กระแสไฟฟ้าตรง (DC) ในปริมาณ 500 V/cm แต่ถ้าเพิ่มเป็น 1,000 V/cm สามารถเกิดการรวมกันได้เป็นอย่างดี และเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ขึ้นไปจนถึง 2,000 V/cm ทำให้สมดุลการรวมกันจาก binucleate เปลี่ยนไปเป็น multinucleate cells ส่วน Taniguchi *et al.* (1994) รายงานการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างข้าวและผักกาดหอมว่า ถูกนำไปมาเรียงกันเป็นเส้นตรงเมื่อให้ค่าความถี่กระแสไฟฟ้า 1 MHz และให้ความต่างศักย์ 200 V/cm โดยใช้ระยะห่างระหว่าง electrode 2 มม. จากนั้น 30 วินาทีไปจนถึง 2 นาทีโปรโตพลาสต์จะรวมกันได้โดยให้ค่าความต่างศักย์ที่สูงถึง 1,600 V/cm เป็นเวลา 1 วินาที Phansiri *et al.* (1994) ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองและผักกาดหอมว่า ใช้ปริมาณ 4×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตร 1 มล. และให้ไฟฟ้ากระแสสลับในความถี่ 1 MHz และค่า field strength 200 V/cm เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นจึงให้ไฟฟ้ากระแสตรง 1,600 V/cm เป็นเวลา 50 μ s โดยมีระยะห่างระหว่าง electrode 0.2 ซม. Bates (1989) ยังได้แนะนำว่า กระแสไฟฟ้าสลับในปริมาณ 150 V/cm เป็นค่าที่ทำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์ได้มากที่สุด โดยความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ต้องอยู่ในช่วง $5 \times 10^5 - 10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อปริมาตร 1 มล. ส่วน Blackhall *et al.* (1994) รายงานถึงค่าของไฟฟ้ากระแสสลับ (AC field) ที่ให้อยู่ในช่วง 0.5-2.0 MHz และใช้ความต่างศักย์ 100-400 V/cm เป็นระยะเวลาสั้น เพื่อให้โปรโตพลาสต์มาเรียงตัวกันเป็นเส้นตรง จากนั้น ค่า field strength จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เป็นการชักนำให้เมมเบรนมาชิดและ

สัมผัสกันก่อนที่จะให้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) เป็นช่วงสั้น ๆ ให้เกิดการรวมกันที่สมบูรณ์ ประโยชน์ของการรวมกันโดยวิธีการใช้กระแสไฟฟ้านี้ ลดความเสียหายของโปรโตพลาสต์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้สารเคมี

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ Blackhall *et al.* (1994) รายงานว่า ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ใช้อยู่ระหว่าง $5 \times 10^2 - 1 \times 10^6$ โปรโตพลาสต์ต่ออมล. โดยนิยมเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่ใช้วุ้นหรือวุ้นอะกาโรสมากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว แต่ข้อดีของการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวคือ มีการแพร่กระจายของธาตุอาหารและของเสียต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ง่ายต่อการลดความดันออสโมติกในระหว่างการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้เจริญ และสามารถสังเคราะห์ผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ ส่วน Bhojavani and Razdan (1983) รายงานว่า สารเคมีที่ใช้รักษาแรงดันออสโมติกในสารละลายเอนไซม์ ใน washing medium และในอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตและการมีชีวิตรอดของโปรโตพลาสต์ คือ น้ำตาลอัลทอซอได้แก่ แมนนิทอล หรือซอร์บิทอล ในความเข้มข้น 450-800 mmol/l ดังในยาสูบมีรายงานการใช้น้ำตาลพวก non-metabolite เช่น D-mannitol ในความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.23 M จนถึง 0.7 M (Nagata and Takebe, 1971) แมนนิทอลในความเข้มข้น 0.4 M ไม่มีผลต่อการเจริญของโปรโตพลาสต์ยาสูบที่แยกได้จากใบ (Vasil and Vasil, 1974) แม้กระทั่งความเข้มข้นที่สูงถึง 0.7 M (Nagata and Takebe, 1971) แต่โดยทั่วไปความเข้มข้นที่ใช้ได้แก่ 0.4-0.5 M ส่วนการใช้น้ำตาลกลูโคสก็ประสบความสำเร็จในการใช้แยกโปรโตพลาสต์ยาสูบได้ในความเข้มข้นระหว่าง 0.35-0.4 M (Evans, 1979) ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ยาสูบ พบว่า มีหลายชนิดแตกต่างกันไป โดยในระยะแรกต้องเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีสภาพแรงดันออสโมติกสูง และหลังจากออกแคลลัสแล้วสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะออกซินเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต แต่โดยทั่วไปสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีทั้งออกซินและไซโตไคนิน อาหารที่ใช้เลี้ยงต้องประกอบด้วยสารพวกวิตามินต่าง ๆ น้ำตาล กรดอะมิโน หรือสารประกอบอินทรีย์ Takebe and Nagata (1984) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ยาสูบว่า ประสบความสำเร็จได้ต้องแยกปริมาณโปรโตพลาสต์ให้ได้ความหนาแน่น 1×10^7 โปรโตพลาสต์ต่อใบสด 1 กรัม หลังการเพาะเลี้ยงจะเกิดการแบ่งเซลล์ภายในเวลา 3 วัน หลังจากนั้น 3 สัปดาห์เริ่มมองเห็นกลุ่มโคโลนีด้วยตาเปล่า ซึ่งต่อมาจะเจริญเพิ่มขนาดเป็น 0.5-1.0 มม. หลังจากการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายลงอาหารวุ้นเพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากต่อไป Negrutiu (1992) รายงานว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยาสูบเป็นเวลา 7-10 วัน โปรโตพลาสต์แบ่งตัวไปได้ทั้งหมด 4-5 รอบ เมื่ออายุได้ 2-3 สัปดาห์จะมองเห็นโคโลนีได้ด้วยตาเปล่า และเกิดเป็นแคลลัสซึ่งต่อมาจะเจริญเป็นยอดเกิด

ขึ้นเป็นจำนวนมาก แต่ต้องปรับความเข้มข้นของสารบางชนิดในอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น BAP ไม่ให้มีในระดับสูงเกินไปที่จะทำให้ความถี่ในการเกิดยอดลดลง พรทิพย์ (2528) พบว่า โพรโตพลาสต์ของยาสูบจะสร้างผนังเซลล์และแบ่งตัวครั้งแรกภายใน 5-7 วันหลังการเพาะเลี้ยง และสังเกตเห็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ ด้วยตาเปล่าเกิดขึ้นภายใน 3-4 สัปดาห์ เมื่อกลุ่มเซลล์นั้นมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 0.8-1.0 มม. สามารถย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรใหม่เพื่อกระตุ้นให้สร้างแคลลัส ลำต้น และราก ตามลำดับ ส่วนอาหารที่ใช้กระตุ้นการสร้างแคลลัสจากเซลล์โคโลนีของยาสูบใช้สูตรของ Linsmaier and Skoog (1965) ที่มีส่วนประกอบของ NAA 2.0 mg/l และ BAP 0.2 mg/l ส่วนสูตรอาหารเพื่อกระตุ้นให้สร้างลำต้น ใช้ NAA 0.1 mg/l BAP 5.0 mg/l และสูตรอาหารเพื่อการสร้างรากใช้ NAA 0.1 mg/l BAP 0.05 mg/l นอกจากนี้ ต้องควบคุมอุณหภูมิประมาณ 28 °C และให้แสงสว่าง 10,000 lux วันละ 16 ชั่วโมง โดยการพัฒนาแต่ละขั้นตอนใช้เวลาประมาณ 2-4 สัปดาห์ รวมระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจนได้ต้นยาสูบที่สมบูรณ์ประมาณ 3-4 เดือน Bajaj (1977) รายงานว่า โคโลนีและแคลลัสของยาสูบที่เกิดขึ้นหลังจากการเพาะเลี้ยง โพรโตพลาสต์จะพัฒนาไปเป็นยอดภายใน 3-4 สัปดาห์ เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่มี IAA 4 mg/l และ cytokinin 2 mg/l และยังมีโอกาสที่จะสร้างรากได้ Caboche (1987) รายงานถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดยอดจากโคโลนีของยาสูบ *N. plumbaginifolia* ว่า น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ในความเข้มข้นที่สูงกว่า 20 mM มีผลไปยับยั้งโครงสร้างทางกายภาพของการเกิดยอด แต่ความเข้มข้นที่ต่ำลงมาอาจชักนำให้เกิดยอดได้บ้าง นอกจากนี้ การให้ไนโตรเจนในระดับที่สูงขึ้นมีผลชักนำให้เกิดยอดได้ โดยเฉพาะไนเตรท พบว่า ส่งเสริมการเกิดยอดได้ดีกว่า ammonium succinate หรือ glutamine ส่วนธาตุอาหารรอง พบว่า Zn จำเป็นต่อการชักนำให้เกิดยอดได้อย่างมีประสิทธิภาพในความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ระหว่าง 10-100 μ M Gleddie *et al.* (1983) ศึกษาการรวมกันของโพรโตพลาสต์ยาสูบ 2 ชนิด คือ *N. rustica* และ *N. sylvestris* ว่า เกิดการแบ่งเซลล์ครั้งแรกหลังจากการรวมกันของโพรโตพลาสต์ประมาณ 9 วันและสังเกตเห็นกลุ่มโคโลนีเกิดขึ้นภายใน 15 วัน จากนั้นย้ายลูกผสมที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้สร้างยอดที่มี BAP 1-2 mg/l และ NAA หรือ 2,4-D 0.1 mg/l ซึ่งความเข้มข้นของออกซินที่สูงไม่มีอิทธิพลต่อความถี่ในการสร้างยอดแต่อย่างใด เพียงแต่ส่งเสริมขบวนการ dedifferentiated ของแคลลัสเท่านั้น Gleba *et al.* (1985) รายงานว่า หลังจากการรวมโพรโตพลาสต์ของยาสูบ *N. plumbaginifolia* ที่เป็นแฮพลอยด์และ *N. tabacum* ที่ปลูกถ่ายโดย *Agrobacterium tumefaciens* แล้วนำไปเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์บนอาหารที่มีฮอร์โมน จะเกิดโคโลนีของกลุ่มเซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. พัฒนาขึ้นภายในเวลา 2 เดือน โดยเลี้ยงภายใต้สภาพที่มีแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้นจึงย้ายไปเจริญบนอาหารรุ่นต่อไป

หลังจากการรวมโปรโตพลาสต์ ประชากรของโปรโตพลาสต์ที่ได้จะประกอบด้วย ส่วนผสม heterogeneous ของสายพันธุ์พ่อและแม่, homokaryons, heterokaryons และสายพันธุ์ระหว่าง nuclear และ cytoplasmic อื่น โดย heterokaryons ซึ่งเป็นลูกผสมที่ต้องการมีปริมาณเพียง 0.5-10% (Bhojavani and Razdan, 1983) Blackhall *et al.* (1994) รายงานการคัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการรวมกันของโปรโตพลาสต์ 2 วิธี คือ การคัดเลือกโดยบุคคล (manual selection) และการคัดเลือกโดยใช้เครื่องมือ (Flow cytometry) สำหรับวิธีแรกทำได้โดยศึกษาการคัดเลือกลูกผสม heterokaryon ซึ่งโดยทั่วไปมีโอกาสที่มีลักษณะการแสดงความดีเด่น (heterosis) และมีการเจริญเติบโตไปจากกลุ่มเซลล์อื่นที่ได้จากสายพันธุ์พ่อแม่ หรือจาก homokaryon ด้วยกัน ตัวอย่างเช่น โคโลนีมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่า นอกจากนี้ อาจศึกษาได้โดยการใช้เทคนิคการย้อมสีชนิดต่าง ๆ Power and Chapman (1985) ศึกษาว่า ลักษณะของลูกผสม heterokaryon จะมีความคงทนในสถานะที่มีความเป็นกรดค้างสูง ส่วนพวกที่ไม่ได้เกิดการรวมกันและพวก homokaryon จะถูกทำลายและแตกเสียหายไป ประสาทพร (2529) ยังรายงานว่ กลุ่มเซลล์ที่เป็นลูกผสมมักจะมีขนาดโตกว่าเซลล์พ่อแม่อยู่บ้าง แต่ลักษณะดังกล่าว บางกรณีก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็นหลักเกณฑ์ได้จึงมีการใช้ลักษณะพิเศษทางพันธุกรรม หรือทางสรีระบางอย่างมาช่วยในการแยก เช่นในงานของ Carlson *et al.* (1972) ศึกษาลูกผสมที่ได้จากยาสูบ 2 พันธุ์ พบว่า ลูกผสมที่ได้จะไม่ต้องการออกซินในการเจริญ Evans (1989) ศึกษาโปรโตพลาสต์ของยาสูบพันธุ์ป่า *Nicotiana nesophila* และ *N. stocktonii* ที่มีความต้านทานต่อโรคหลายชนิด เมื่อนำมารวมกับโปรโตพลาสต์ของยาสูบพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า *N. tabacum* ซึ่งอ่อนแอต่อโรคและเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอยและมีลักษณะเผือกขาว (Su/Su) พบว่า สามารถจำแนกลูกผสมที่ได้จากลักษณะยอดที่มีสีเขียวอ่อน ในขณะที่ยอดยาสูบ *N. nesophila* และ *N. stocktonii* มีสีเขียวเข้ม ส่วน *N. tabacum* มียอดลักษณะเผือกขาว ตัวอย่างหนึ่งที่ประสบผลสำเร็จในการถ่ายทอดลักษณะทางเกษตรที่สำคัญโดยการรวมโปรโตพลาสต์ ได้แก่ ลักษณะที่ต้านทานต่อโรคใบด่างในยาสูบ (Tobacco mosaic virus resistance) โดยการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *N. tabacum* และ *N. nesophila* ประสาทพร (2529) ยังรายงานว่ ลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกลูกผสมสามารถยืนยันผลได้จากการนับจำนวนโครโมโซม Cambecedes (1988) รายงานว่ มีความแปรปรวนในการตรวจสอบระดับจำนวนชุดของโครโมโซมของยาสูบ *N. plumbaginifolia* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จนกระทั่งเจริญเป็นต้น โดยการวัดจากปริมาณ nuclear DNA และการนับจำนวนโครโมโซม พบว่า ปริมาณ nuclei จะปรากฏเป็นทั้งแฮพลอยด์ ดิพลอยด์ ตลอดจนอะนิวพลอยด์