หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ยาสูบเป็นพืชล้มลุกสกุล Nicotiana วงศ์ Solanaceae พืชสกุลนี้มีพันธุ์ต่างๆมากกว่า 60 พันธุ์ ยาสูบที่ปลูกทางการค้ากันอย่างกว้างขวางทั่วโลกคือ Nicotiana tabacum L. เพราะสามารถปรับตัวได้ดี และยังเป็นพืชที่จัดอยู่ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมฉบับที่ 6 ใบยาสูบแตกต่างจากพืชอื่นตรงที่มีสารแอลคาลอยด์ มีนิโคตินเป็นองค์ประกอบหลัก (เบญจา ค่าเมืองลือ และสมบูรณ์ ขยัน, 2531; วิภาวรรณ กิตติวัชระเจริญ, 2531) ประโยชน์ส่วนใหญ่จึงเน้นหนักทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะการผลิตบุหรี่ ซิการ์ ยานัตถุ์ ยาเส้น ตลอดจนใช้เป็นสารกำจัดแมลง จึงถือได้ว่ายาสูบเป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจการเกษตรและทำรายได้สุทธิให้แก่เกษตรกรไทยได้มากกว่าพืชอื่นๆในพื้นที่ปลูกเท่ากัน แม้ว่าจะไม่ใช่สิ่งบริโภคที่ให้ประโยชน์ต่อการบำรุงส่งเสริมสุขภาพของร่างกายก็ตาม Ershoff et al. (1978); Kung et al. (1980) รายงานว่ายาสูบมีสารโปรตีนชนิด F1 และ F2 ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน ชนิด ไลซีน ทรีโอนีน และวาลีน ถ้าสกัดออกมาได้จะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์มาก โปรตีนจากยาสูบสามารถใช้เป็นอาหารสำหรับเด็กทารกที่ไม่สามารถรับประทานแลคโตส หรือมีอาการแพ้นม และทางการแพทย์ยังพบว่าโปรตีนนี้มีคุณประโยชน์ต่อผู้เป็นโรคไต หัวใจ และโรคตับเรื้อรัง เนื่องจากโปรตีนจากยาสูบเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น จึงสามารถใส่ปนกับข้าว พืชผัก และเครื่องดื่มเพื่อช่วยเสริมคุณค่าได้ นอกจากนี้ยังมีความบริสุทธิ์และให้ประโยชน์สูงกว่าโปรตีนทั่วไปซึ่งสกัดจากพืชสีเขียวหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ถั่วเหลืองเป็นต้น (Tso and Kung, 1983)

ในปี พ.ศ. 2531. โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง ได้ส่งใบยาสูบแห้งออกไปขายต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น เยอรมันตะวันตก และประเทศสหรัฐอเมริกา คิดเป็นมูลค่าถึง 116,015,757.00 บาท แต่ก็ต้องสั่งซื้อใบยาสูบแห้งจากต่างประเทศปีละหลายร้อยล้านบาทเช่นกัน (สุนทรี วรผลิก และวิมลมาศ พวงมาศ, 2527 ฝ่ายใบอนุญาตและภาษี, 2533) เพื่อเป็นการแก้ปัญหาการขาดดุลย์การค้า จึงควรหาทางปรับปรุงพันธุ์ยาสูบให้ได้มาตรฐานทัดเทียมกับต่างประเทศ และสามารถผลิตได้มากพอกับความต้องการ และส่งไปขายต่างประเทศด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปลูกยาสูบของเกษตรกรไทยในปัจจุบัน มีปัญหาเกี่ยวกับโรคต่างๆทำลายต้นยาสูบ ทำให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมาก ส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไส้เดือนฝอย ตลอดจนโรคที่มีสาเหตุจากสิ่งแวดล้อมอื่นๆ รวมทั้งปัญหาเรื่องแมลงและศัตรูต่างๆ ด้วย (มานพ แก้วกำเนิด และอินทร์ทอง เมฆขยาย, 2525)

โรคตากบ (frogeye) นับว่าเป็นโรคร้ายแรงโรคหนึ่งทำให้ผลผลิตจากยาสูบลดลงเป็นอย่างมาก โรคนี้เกิดขึ้นทั่วไปและติดต่อได้ง่ายพบทุกแหล่งที่ปลูกยาสูบทั้งที่เป็นดินกล้าในแปลงเพาะและในไร่ อาการรุนแรงจะปรากฏเป็นจุดบนใบและลำต้น ถ้ารุนแรงมากอาจจะทำให้ต้นยาสูบตายได้ นอกจากนี้ยังเกิดกับใบยาที่เก็บเกี่ยวไว้ในโรงบ่มอีกด้วย เชื้อราโรคตากบสามารถอยู่ข้ามฤดูเพาะปลูกได้โดยอาศัยอยู่กับเศษต้นยาสูบที่ตกค้างอยู่ตามพื้นดิน และยังอาศัยเกาะกินพืชอื่นๆอีกหลายชนิด เช่น แตงชนิดต่างๆ มะเขือ และถั่วต่างๆ เป็นต้น (ทองพูน ศรีวรนารถ , 2502 ; อดิศักดิ์ บ้วนกียาพันธุ์, 2520) มานพ แก้วกำเนิด และอินทร์ทอง เมฆขยาย (2525) ได้รายงานเกี่ยวกับการป้องกันโรคนี้ โดยการใช้สารเคมีประเภทดูดซึม เช่น เบนเลท ห่นป้องกันกำจัดโรคได้ผลดีมากในระยะแรกๆ แต่ถ้าใช้ยานี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน 10 ปี เชื้อราโรคตากบสามารถสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นได้ โดยทั่วไปโรคนี้มักจะเกิดขึ้นที่ใบ แม้ว่าใบจะเกิดเป็นโรคหรือถูกทำลายเพียงเล็กน้อย ย่อมมีผลกระทบต่อการสังเคราะห์อาหารทำให้คุณภาพ และราคาลดต่ำลง

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคนับเป็นวิธีการสร้างความต้านทานให้แก่พืช ซึ่งต้องคำนึงถึงพันธุ์ที่ได้ใหม่ให้ผลผลิตสูง เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เพาะปลูกและสามารถต้านทานโรคด้วย การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคนิยมใช้วิธีคัดเลือก ลักษณะความต้านทานที่อาจปรากฏขึ้นในจำนวนประชากรของพืชพันธุ์นั้นๆ หรือใช้วิธีผสมระหว่างพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดีกับพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูง หรือโดยการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยรังสี หรือสารเคมี เป็นต้น วิธีการต่างๆเหล่านี้บางกรณีอาจประสพผลสำเร็จตามที่คาดหมาย แต่ต้องใช้เวลา แรงงาน และทุนทรัพย์สูง ตลอดจนข้อจำกัดทางสรีรวิทยาของพืชและอื่นๆ (ไพโรจน์ จิวงพานิช, 2522 ; พรทิพย์ ธนูทอง และคณะ, 2528)

ปัจจุบันนอกจากการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการดังกล่าวแล้ว เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ ทั้งนี้เพราะในขณะทำการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อย่อมมีโอกาสเกิดมิวเตชัน หรือเกิดการแปร (variation) ได้ตลอดเวลาเช่น

เดียวกับที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และมีโอกาสแสดงออกได้มากกว่า (Nickell and Torrey, 1969 ; Hussey, 1978 ; Hwang and Ko, 1988) นอกจากนี้การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าเป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลา ตลอดจนประหยัดพื้นที่ และยังสามารถหลีกเลี่ยงข้อจำกัดเกี่ยวกับฤดูกาลต่างๆได้ดีกว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีอื่น มีโอกาสได้พันธุ์ที่ต้องการมากและรวดเร็วยิ่งขึ้น และสามารถคัดเลือกต้นพืชที่ต้านทานโรคหรือต้านทานต่อสภาพที่กำหนดได้ เช่น ความแห้งแล้ง ความเค็มของดิน สารพิษ (toxin) ของเชื้อสาเหตุโรคพืช และความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อม โดยถือว่าพืชที่ได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ทนต่อสภาพดังกล่าว เมื่อนำมาปลูกในพื้นที่เพาะปลูกย่อมมีความทนทานต่อสิ่งต่างๆเหล่านั้นด้วย (Gengenbach et al., 1977. Ingram and Helgeson, 1980)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาและคัดเลือกแคลลัสยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนีย โคเกอร์ 347 ที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา Cercospora nicotianae Ell & Ev. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตากบ และชักนำแคลลัสดังกล่าวให้เจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์เพื่อให้ได้ต้นพืชที่ต้านทานโรค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คาดว่าจะได้ยาสูบพันธุ์ใหม่ต้านทานโรคตากบที่มีเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคได้ เป็นการลดความเสียหายของใบยาสูบเป็นจำนวนมากจากการเป็นโรคนี้ในประเทศไทย ลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค ซึ่งเชื้อโรคสร้างความต้านทานสารเคมีได้ และจะเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร ซึ่งปลูกพันธุ์ที่ปราศจากโรคนี้ อีกทั้งยังเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาความต้านทานโรคของพืชอื่นด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจเอกสาร

โรคตากบของยาสูบ

โรคตากบ (frogeye) เป็นโรคใบจุดชนิดหนึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. (Park and Fernando, 1938 ; Chupp, 1953) แต่ Sloof and Thung

(1947) รายงานว่ายังมีเชื้อรา C. raciborskii เป็นสาเหตุของโรคดากบด้วยเหมือนกันแต่พบไม่บ่อยนัก Chupp (1953) รายงานว่าทุกแหล่งที่ปลูกต้นยาสูบมักมีโรคนี้เข้าทำลายเสมอ นอกจากแหล่งที่ไม่มีหิชอาศัย ก่อนปี ค.ศ.1931โรคนี้ได้ทำความเสียหายแก่เกษตรกรที่ปลูกยาสูบบนเกาะสุมาตราแต่ไม่รุนแรงนัก แต่ในปี ค.ศ.1957 โรคนี้ได้ทำลายร้ายแรงในทวีปอาฟริกาใต้ และอีกหลายแห่งในทวีปออสเตรเลีย (Wolf, 1957)

คณิต กิตติโกวิท (2527) รายงานว่าโรคดากบพบทั่วไปในทวีปเอเชีย อาฟริกา ยุโรป ออสเตรเลีย และทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งสามารถเกิดกับต้นกล้าในแปลงเพาะและในไร่ โดยเฉพาะระหว่างฤดูฝน อากาศค่อนข้างร้อน อาการของโรคจะเริ่มแสดงหลังจากเชื้อเข้าทำลายใบยาสูบประมาณ 8-10 วัน โดยปรากฏที่ใบล่างก่อน มีลักษณะเป็นจุดขาวๆ กลมบ้างไม่กลมบ้าง รอบๆจุดมีสีน้ำตาลหรือสีเหลืองขยายออกไป ตรงกลางของบางจุดจะเห็นกลุ่มสปอร์สีเทา จุดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1-12 มิลลิเมตร แต่ส่วนมากมีขนาด 3-5 มิลลิเมตร เมื่ออาการรุนแรงใบจะเหลือง และเหี่ยวจากปลายใบจนถึงโคนใบถ้าถูกลมหรือฝนก็จะร่วงหลุดไป อาการขั้นรุนแรงที่สุดจะปรากฏจุดบนต้นยาสูบด้วยมีลักษณะเหมือนกับที่เกิดบนใบ โรคนี้ไม่ทำให้ต้นยาสูบแคระแกรน แต่ถ้าใบร่วงมากอาจทำให้ต้นตายได้ มานพ แก้วกำเนิด และอินทร์ทอง เมฆขยาย (2525) รายงานว่าถ้าต้นยาสูบเกิดเป็นโรคนี้ขณะที่มีอายุมากพอที่จะเก็บเกี่ยวได้ ใบทุกใบจะมีเชื้ออยู่ แต่ไม่แสดงอาการของโรค แต่ถ้าบ่มใบเหล่านี้ภายใต้ความชื้นสูงๆ จะปรากฏจุดสีเขียวซึ่งเมื่อถูกความร้อนจุดเหล่านี้จะกลายเป็นแผลแห้งทำให้ใบยาแห้งมีตำหนิขายได้ราคาต่ำ

Sobers (1968) ทดลองปลูกเชื้อ C. nicotianae Ell & Ev. ที่แยกได้จากใบยาสูบที่เป็นโรคดากบลงบนใบยาสูบปกติ พบว่าประมาณ 6-10 วัน จะเกิดคลอโรซิสรอยแผลขยายใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร กระจายเต็มพื้นที่ใบ นอกจากนี้ ทองหุน ศรีวรนารถ (2502)ยังพบว่าเมื่อปลูกเชื้อราชนิดนี้ลงบนใบยาสูบให้ทั่วทั้งต้น ใบล่างจะแสดงอาการของโรคก่อนใบกลางและใบยอด ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราในสกุล Cercospora ส่วนมากชอบทำลายใบแก่ก่อนเพราะมีสารอาหารที่เชื้อต้องการมากกว่าใบส่วนบนๆ

Riker and Riker (1936) ทดลองเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้แบบ dilution plates พบว่าเส้นใยขึ้นดูดีหลใช้ใน Potato dextrose agar (PDA) ระยะ 1-3 วันแรกเส้นใยจะมีสีขาว วันที่ 4 เส้นใยจะดำ เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยจะดำขึ้นอีกเล็กน้อย ตรวจสอบเชื้ออายุ 5 10 15 20 และ 30 วัน ตามลำดับด้วยกล้องจุลทรรศน์ ปรากฏว่าพบแต่ก้านชูสปอร์

(conidiophore) สีน้ำตาลมีหลายเซลล์ บริเวณโคนสีน้ำตาลเข้ม แตกแขนงออกไปบ้าง ไม่พบอยู่เป็นกลุ่มเหมือนที่เคยพบในเนื้อเยื่อพืช และทองหุน ศรีวรนารถ (2502) ยังทดลองเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ในอาหาร 6 ชนิดด้วยกัน จากการวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเมื่อเชื้ออายุ 3 7 11 และ 15 วันตามลำดับ พบว่าเชื้อราชนิดนี้เจริญได้ดีที่สุดใน PDA และจากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าเส้นใยขึ้นหนาแน่นใน PDA และ Czapeck solution agar ส่วนใน Bean agar เส้นใยขึ้นหนาแน่นพอใช้ ใน Onion agar,Corn meal agar และ Prune agar เส้นใยขึ้นบางๆ สีจางๆ ไม่ค่อยเหมือนเส้นใยใน PDA หรือ Czapeck solution agar และจากการตรวจสอบเชื้อก็พบแต่ก้านชูสปอร์สีน้ำตาลมีหลายเซลล์เช่นเดียวกัน ไม่พบสปอร์ (conidia)เลย

Nagel (1934) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อจากส่วนของเส้นใย พบว่าไม่มีสปอร์เกิดขึ้นเลย แต่ถ้าเลี้ยงจากสปอร์โดยตรงจะเกิดสปอร์ได้ Ryker (1942) พบว่าการเลี้ยงเชื้อราสกุลนี้โดยแยกเชื้อราจากพืชที่เป็นโรค หรือจากสปอร์เดี่ยวจะเกิดสปอร์ได้มากน้อยต่างกันโดยให้เหตุผลว่าการที่เชื้อสูญเสียความสามารถในการสร้างสปอร์นั้นเกิดจากมิวเตชัน Diachun and Valleau (1941) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. ให้สร้างสปอร์ได้สำเร็จโดยใช้ใบยาสูบบดแล้วนึ่งผสมกับวุ้นอาหารประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Stavely and Nimmo (1968)ได้ทดลองถ่ายสปอร์จากใบยาสูบที่เป็นโรคลงใน V-8 juice agar (VJA) ที่อุณหภูมิต่างๆกัน พบว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ขึ้นได้ภายใน 7 วัน และโคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส สปอร์มีขนาดยาวกว่าที่อุณหภูมิ 18 และ 26 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 18 และ 26 องศาเซลเซียส ลักษณะของสปอร์ไม่มีความแตกต่าง และยังได้ทดลองเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ให้สร้างสปอร์มากขึ้นใน Cercospora nicotianae meduim (CSM) พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสปอร์มากถึง 305,000 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Stavely and Nimmo (1969) ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ โดยเชื้อมีอายุระหว่าง 3-12 วัน แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และเจริญได้เล็กน้อยเท่านั้นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นอกจากเชื้อราชนิดนี้จะสร้างสปอร์ได้ใน VJA และ CSM แล้ว ยังสร้างสปอร์ใน Tabacco decoction agar อีกด้วย Dhingra and Sinclair (1985) ได้รายงานการเลี้ยงเชื้อราสกุล Cercospora หลายชนิดด้วยกัน เช่น C. brachiata

C. canescens C. capsici C. festuceae C. kikuchii C. penniseti C. pueraicola C. sesami C. sorghi C. stizolobii และ C. zebrina พบว่า เชื้อเหล่านี้สามารถสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหารวุ้นที่ผสมใบแครอท และสรุปว่าการสร้างสปอร์จำเป็นต้องใช้อาหารที่เฉพาะเจาะจง (specific medium) ซึ่งชไมพร กิตติธรรมกุล (2531) ก็รายงานผลในทำนองเดียวกัน นอกจากนี้ยังรายงานเพิ่มเติมอีกว่าในสภาพปกติเชื้อราสกุล Cercospora จะไม่สร้างสปอร์ในอาหารพื้นฐานที่ใช้เลี้ยงเชื้อราทั่วไป คือ PDA และเส้นใยมีลักษณะสีขาว หรือม่วงอ่อน และค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทาจนดำ ก้านชูสปอร์มีหลายเซลล์ ขนาดตั้งแต่ 20-150ไมครอน อยู่เป็นกลุ่มประมาณ 2-7 วัน ลักษณะเด่นของเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. คือทั้งเส้นใยและสปอร์มีสีดำ สปอร์มีลักษณะยาว เรียว โค้งงอเล็กน้อย หลายเซลล์ มีขนาดตั้งแต่ 3-4 X 35-150 ไมครอน (Alexopoulos and Mims, 1979) เชื้อราชนิดนี้เข้าทำลายต้นยาสูบได้ดีในสภาพแวดล้อมของอากาศที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง และความชื้นสูงในเวลาเย็นจนถึงกลางคืน โดยสปอร์จะงอก germ tube เข้าทางปากใบ และเจริญเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ของใบ หลังจากนั้น 8-10 วัน พืชจะแสดงอาการเป็นโรค แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำจะเกิดรอยแผลภายหลังเชื้อเข้าทำลายนานถึง 3-4 สัปดาห์

คณิต กิตติโกวิท (2527);อดิศักดิ์ บ้วนกียาพันธุ์ (2520) รายงานถึงผลการสำรวจโรคและศึกษาโรคพืชที่สำคัญในเขตลุ่มน้ำแม่กลอง พบว่าเชื้อราสกุล Cercospora ทำความเสียหายแก่เกษตรกรที่ปลูกพืชในเขตนั้น โดยเข้าทำลายพืชหลายชนิด รวมทั้งพืชเศรษฐกิจด้วย เช่น มะระ ข้าวฟ่าง ถั่วต่างๆ มะเขือเทศ และกล้วย เป็นต้น และยังพบเชื้อรา C. nicotianae Ell & Ev. เข้าทำลายต้นยาสูบในเขตนั้นด้วยเช่นกัน เชื้อราสกุลนี้สามารถแพร่ระบาดได้โดยการสร้างสปอร์บนก้านชูสปอร์ซึ่งโผล่เหนือเนื้อเยื่อพืช เมื่ออายุของเชื้อมากขึ้น สปอร์จะหลุดและไปตกยังต้นพืชอื่นๆ มี ลม น้ำ ฝน คน สัตว์ หรือแมลงเป็นพาหะ ยิ่งถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม สปอร์จะงอก germ tube เข้าทำลายพืชนั้นทันที สำหรับดินฟ้าอากาศในประเทศไทยไม่เป็นอุปสรรคต่อการเจริญของเชื้อราสกุลนี้

ชไมพร กิตติธรรมกุล (2530) รายงานถึงการควบคุมโรคซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อราสกุล Cercospora ว่าควรทำลายซากพืชที่เป็นโรค และควรดัดแปลงสภาพแวดล้อมให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการเข้าทำลายของเชื้อ เช่น การกำจัดวัชพืช ไม่ควรปลูกพืชถี่เกินไป ปลูกพืชหมุนเวียน ปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรค และการใช้สารเคมีต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กาหร่าย หลัง และคณะ (2528) ได้รายงานการป้องกันโรคดากบในไร่ว่า ในปัจจุบันการใช้ยาฆ่าเชื้อประเภทดูดซึม พ่นป้องกันและกำจัดไม่ได้ผลแล้ว เพราะเชื้อสามารถสร้างภูมิต้านทานได้ ต้องใช้ยาฆ่าเชื้อประเภทออกฤทธิ์เฉพาะที่แทน ดังที่ ค่า ผมพันธุ์ และวิลาวรรณ เลิศศรีวสุ (2529) ได้ทดลองใช้ยา 6 ชนิดด้วยกัน โดยพ่นยาหลังจากปลูกต้นยาสูบได้ 15 วัน และพ่นซ้ำทุกๆ 7 วัน ปรากฏว่ายา เอสดี-230 ดับบลิว พี อัตราร้อยละ 0.2 และยาดาโคนิล อัตราร้อยละ 0.2 ให้ผลดีที่สุดในการป้องกันกำจัดโรคดากบ

ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ยาสูบด้านทานโรคดากบนั้น Lucas (1975) ได้อ้างถึงผลงานของ Raeber และคณะว่าได้ทดสอบความต้านทานโรคของยาสูบพันธุ์ทางการค้า และพันธุ์ป่า พบว่ามีเฉพาะยาสูบพันธุ์ป่า N. repanda และ N. debneyi เท่านั้นที่มีความต้านทานสูงมาก ซึ่งมานพ แก้วกำเนิด และกาหร่าย หลัง (2515) ได้ทำการทดลองและได้ผลในทำนองเดียวกัน ต่อมาในระหว่างปี 2527-2528 กาหร่าย หลัง และคณะ สามารถถ่ายทอดความต้านทานโรคดากบจากยาสูบพันธุ์ป่าทั้ง 2 พันธุ์ดังกล่าว ไปสู่ยาสูบพันธุ์ Hicks broadleafซึ่งเป็นพันธุ์ทางการค้าประเภทบ่มด้วยไอร้อน ได้ลูกผสมที่มีความต้านทานโรคดากบในระดับมีความคงทน (ไม่เป็นโรคเลย) ได้สำเร็จ

สารพิษและการสกัด

การเกิดโรคติดเชื้อของพืชส่วนใหญ่เป็นผลเนื่องจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างสารที่เชื้อปล่อยออกมาในเนื้อเยื่อพืช หรือจากที่พืชสร้าง เช่น เอ็นไซม์ สารพิษ สารควบคุมการเจริญเติบโต โปลีแซคคาไรด์ และปฏิชีวนสาร ซึ่งสารเหล่านี้มีความสำคัญต่อความสามารถของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมากน้อยต่างกัน เช่น โรคเน่าเละ เป็นโรคที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ โรคปุ่มปม เกิดจากปฏิกิริยาของสารควบคุมการเจริญเติบโต และโรคใบแห้งของข้าวโอ๊ตสาเหตุจากเชื้อรา Helminthosporium sp. เกิดจากปฏิกิริยาของสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น เป็นต้น (Bilgrami and Dube, 1976 ไพโรจน์ จำวงพานิช, 2522) การผิดปกติที่เกิดขึ้นทางด้านสรีรวิทยา และโครงสร้างของพืชมีผลทำให้พืชตลอดจนผลผลิตทางเศรษฐกิจต่ำลง พืชอาจเป็นโรคได้ทั้งระยะกำลังเจริญเติบโตตามปกติ และในระยะพักตัว สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ความชื้น การถ่ายเทอากาศ และอุณหภูมิ มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อบนผิวพืช รวมทั้งการกระตุ้นของพืชต่อเชื้อด้วย สาเหตุที่ทำให้พืชแสดงอาการของโรคนั้น ไม่ใช่เกิดจากตัวเชื้อเข้าทำลายพืชเพียงอย่างเดียว แต่ยังเกิดร่วมกับสารบางชนิดที่

ผลิตขึ้นเองโดยตรง หรือโดยเชื้อได้รับการกระตุ้นจากปฏิกิริยาโต้ตอบของพืช ทำให้พืชที่ได้รับสารเหล่านี้มีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้น เกิดอาการเหี่ยว การแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของพืชผิดปกติ และส่วนประกอบของเซลล์บางส่วน เช่น คลอโรฟิลล์ถูกทำลาย พืชจึงแสดงอาการใบจุด นอกจากนี้ยังขึ้นกับความรุนแรงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์อีกด้วย (พิบูลย์ มงคลสุข, 2523)

พรทิพย์ ธนูทอง และคณะ (2528) รายงานว่าการที่ต้นยาสูบแสดงอาการของโรค เช่น โรคใบไหม้ (wildfire) จากเชื้อแบคทีเรีย Pseudomonas syringae pv. tabaci และโรคใบจุด (brown spot) จากเชื้อรา Alternaria alternata ซึ่งมีอาการลุกลามทั่วไป ส่วนใหญ่เป็นอาการต่อเนื่องของสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้น และเป็นพิษต่อคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกัน

สารพิษซึ่งเป็นสารที่เชื้อก่อให้เกิดโรคในพืชสร้างขึ้นนั้น ทำให้เกิดอาการของโรคที่คล้ายคลึงกับโรคที่เกิดจากการติดเชื้อในธรรมชาติ สารพิษเหล่านี้มีมวลโมเลกุลต่ำ และไม่ซับซ้อน ซึ่งตรงข้ามกับสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคในคน และเนื่องจากสารพิษเหล่านี้มีขนาดเล็กจึงสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ระดับภายในเซลของพืชได้ง่าย แต่แตกต่างจากเอ็นไซม์ตรงที่ไม่สามารถทำลายโครงสร้างของเนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลต่อขบวนการเมตาโบลิซึม และทำปฏิกิริยาโดยตรงต่อโปรโตพลาสซึมของเซลล์ด้วย (Buddenhagen and Kelman, 1964 ; Lumsden and Bateman, 1968 ; Yoder, 1980)

Kuyama and Tamura(1957)สกัดสาร cercosporin จากเชื้อรา C. kikuchii ได้สำเร็จ และอีก 2-3 ปี ต่อมาก็ได้มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะ และ Lousberg et al. (1971); Bilgrami and Dube (1976) ยังได้รายงานถึงบทบาทของ phytotoxin ที่เชื้อราสกุล Cercospora ผลิตขึ้นว่าเป็นสารพิษชนิดไม่เฉพาะเจาะจงกับพืช และอยู่ในรูปของสารเมทาโบไลต์ประเภททุติยภูมิ Balis and Payne (1971) ได้รายงานการสกัด และแยกสารชนิดนี้ได้จากเชื้อราสกุล Cercospora อีกหลายชนิด เช่น C. beticola C hayii, C. personata และ C. ricinella และยังได้สกัดสาร cercosporin จากเชื้อรา C. beticola ซึ่งเลี้ยงใน Beet leaf dextrose agar โดยสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตด หลายๆครั้ง เกิดผลึกรูปเข็มขึ้น ทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการตกผลึกซ้ำ โดยควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกิน 24 องศาเซลเซียส

Yamazaki and Ogawa (1972) ได้รายงานการสกัดสารพิษจากเชื้อรา C. kikuchii M & T. โดยเลี้ยงในอาหาร Malt agar (MA) ตามวิธีการของ Kuyama and Tamura (1957) ที่อุณหภูมิ 26.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นบดเส้นใยเชื้อราให้ละเอียด และสกัดด้วยเอทธิลอีเทอร์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จนส่วนต่างๆที่สกัดไม่มีสี ควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่สกัดเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดไอโซเมอร์ ระเหยสารที่ได้เพื่อทำให้เข้มข้น สาร cercosporin จะตกผลึกเป็นรูปปริซึม สีแดงเข้ม

นอกจากนี้ Yamazaki et al. (1975) ยังรายงานการสกัดสารพิษจากเชื้อรา C. setariae โดยเลี้ยงเชื้อใน Potato gluclose agar (PGA) ที่อุณหภูมิ 22-24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 วัน เช่นเดียวกัน จากนั้นสกัดด้วย EToAC ระเหยจนเหลือสารเข้มข้น ประมาณ 0.5 กรัม ได้สารเมทตาโบไลต์ 5 ชนิด คือ สาร 2′, 2″-diacetylcercosporin ลักษณะผงสีแดง มีจุดหลอมเหลว 80-82 องศาเซลเซียส สาร 2′- acetylcercosporin สาร 2′, 2″-dibenzoylcercosporin มีจุดหลอมเหลว 120-123 องศาเซลเซียส สาร 2′-acetyl-2″-benzoylcercosporin ลักษณะผลึกสีแดง มีจุดหลอมเหลว 153-155 องศาเซลเซียส และสาร cynodontin และเขายังได้รายงานถึงการสกัดสารพิษจากเชื้อรา C. beticola และ C. nicotianae ด้วยโดยดัดแปลงวิธีการของ Kuyama and Tamura (1957) เลี้ยงเชื้อรา C. beticola (ATCC # 2480) และ C. nicotianae (ATCC # 18366) ใน MA ภายใต้ความเข้มแสง 16 ชั่วโมง สลับมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นสกัดด้วย เอธิลอีเทอร์ โดยใช้เครื่องมือสกัดสารประเภท Soxhlet apparatus สารที่ได้ละลายด้วย $CHCl_3$ ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมด้วยแคลเซียมฟอสเฟตชนิดแห้ง และชะล้างแถบต่างๆของสารด้วย เมทธานอล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน $CHCl_3$ เติมด้วยสารเพนเทน จะได้สาร cercosporin ตกผลึกออกจากแถบสีแดง เก็บสารนี้ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาของ Assante et al. (1977) ซึ่งทดลองแยกเชื้อราสกุล Cercospora ได้ถึง 61 ชนิดด้วยกัน และในจำนวนนี้ตรวจพบว่าเป็น phytotoxin ชนิด cercosporin ถึง 24 ชนิด เป็น dothistromin อีก 8 ชนิด นอกนั้นเป็นสารเมทตาโบไลต์อื่นๆ และยังได้สกัดสารพิษจากเชื้อราบางสายพันธุ์ของ C. beticola และ C. bertoreae พบสารสีเหลืองชนิด Cercospora Beticola Toxin (CBT) และสารนี้เป็น phytotoxin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เช่นกัน พบสาร CBT นี้ในเส้นใยของ C. beticola บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากหัวบีทที่เป็นโรค ถึงแม้ว่าสารชนิดนี้ค่อนข้างจะไม่อยู่ตัวแต่ก็สามารถสกัดให้บริสุทธิ์ได้ CBT เป็นสารที่พบร่วมกับสาร cercosporin ในบางสายพันธุ์ของเชื้อ ถ้าสารทั้ง 2 ชนิดทำงานร่วมกันจะก่อให้เกิดความเป็นพิษขึ้น แต่ส่วนใหญ่ความเป็นพิษเกิดจากสาร cercosporin นอกจากนี้ยังได้รายงานถึงการสกัดสารจากเชื้อราสกุล Cercospora หลายชนิด โดยเลี้ยงเชื้อใน PGA pH ประมาณ 6.5-6.8 ที่อุณหภูมิ 22-24 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15-20 วัน จึงสกัดส่วนต่างๆ ประมาณ 2 ครั้ง ด้วยเอทธิลอะซิเตท ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่โซเดียมซัลเฟตเพื่อให้สารที่สกัดได้แห้ง แล้วระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แยกสารเมทตาโบไลต์โดยใช้โครมาโตกราฟฟี บรรจุด้วยซิลิกาเจล พบว่าเชื้อราสกุล Cercospora เกือบทุกสายพันธุ์ผลิตสารได้ดีบนอาหารที่มีวุ้นผสมอยู่ แต่สำหรับ C. ariminiensis, C. cantuariensis, C. chenopodi, C. diazu, C. malvacearum, C. medicaginis, และ C. violae นอกจากเลี้ยงบนอาหารดังกล่าวแล้ว ยังต้องเติม yeast extract ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ลงไปด้วย และ C. beticola, C. kikuchii, C. nicotianae และ C. oryzae. ต้องเติมน้ำตาลกลูโคสประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มสารเมทตาโบไลต์ แต่ตรงกันข้ามการเพิ่มสารไบโอติน ไทอามีน หรือ เบต้า-อะลานีน ไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตสารนี้ ส่วนการเติมเกลือเฟอรัส จะมีส่วนชักนำให้สร้างเม็ดสีขึ้น Daub (1986) ได้รายงานถึงการสังเคราะห์ทางชีวเคมีของสาร cercosporin ว่าเป็น phytodynamic และเป็น antibacterial ด้วย

การตรวจสอบความเป็นพิษ

สารที่สกัดจากเชื้อราสกุล Cercospora ส่วนใหญ่เป็นสาร cercosporin ซึ่งเป็น phytotoxin ชนิดไม่เฉพาะเจาะจงกับพืช Balis and Payne (1971)ได้ทดลองให้เห็นว่าสารซึ่งสกัดจากใบบีทที่เกิดโรคเป็นสารพิษ โดยใบบีทที่ไม่ทำให้เกิดรอยแผล หลังจากได้รับสารนี้ประมาณ 3-4วัน จะแสดงอาการใบจุด ส่วนใบที่มีรอยแผลจะเกิดจุดภายหลังได้รับสารนี้ไม่นานนัก และลักษณะจุดไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ความแก่อ่อนของใบไม่มีผลต่อความไวของสารนี้

Yamazaki et al. (1975) ยังรายงานถึงผลทาง photodynamic ของสารนี้ซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดงเข้ม และมีองค์ประกอบคล้ายรงควัตถุในธรรมชาติ เช่น erythroaphine fagopyrin และ elsinochromes โดยใช้หนูเป็นสัตว์ทดลองความเป็นพิษของสารนี้ และ

ฉายแสงจากหลอดเรืองแสงติดต่อกัน หนูจะตายภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เท่ากับ ปริมาณของสาร 0.3 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักของหนู 15 กรัม แต่ถ้าทดลองในที่ไม่มีแสงจะไม่พบปรากฏการณ์ดังกล่าว แม้ว่าจะเพิ่มเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เป็น 10 เท่าก็ตาม และยังทดสอบความเป็นพิษกับเชื้อแบคทีเรีย Bacillus subtilis และ Escherishea coli ด้วยวิธี plating broth dilution โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารผสมสาร cercosporin ในที่มีแสงสว่าง พบว่าจำนวนแบคทีเรียจะลดลง และผลของสารนี้ต่อแบคทีเรียแกรมบวก และลบทั้งสองไม่มีความแตกต่างกัน Daub (1982) ได้ใช้สารนี้ซึ่งสกัดได้จากเชื้อรา C. beticola และ C. nicotianae ทดสอบกับเซลล์ยาสูบ N. tabacum "Wisconsin" NT 575 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ Murashige and Skoog พบว่าสารนี้จะฆ่าเซลล์ยาสูบอย่างรวดเร็วเมื่อมีแสง ความเข้มข้นของสารนี้ประมาณ 5 ไมโครโมล จะฆ่าทุกๆเซลล์ของยาสูบภายในเวลา 4 ชั่วโมง ในที่มืดไม่พบเปอร์เซ็นต์การตายซึ่งได้ผลเหมือนควบคุม และยังพบว่าเซลล์ยาสูบเกิดการสูญเสียอิเลกโตรไลต์อย่างรวดเร็ว โปรโตพลาสต์ทั้งหมดแตก หรือมีรูปร่างผิดปกติภายหลังจากได้รับสารในที่มีแสงเป็นเวลา 45 นาที แต่ถ้านาน 12-24ชั่วโมง ใบยาสูบจะปล่อยก๊าซอีเทน และเซลล์เมมเบรนถูกทำลายด้วย

การเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

จุดประสงค์หลักที่สำคัญของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นเป็นการขยายและปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการ เนื่องจากเซลล์พืชมีลักษณะของ totipotency คือ ความสามารถที่พร้อมจะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งนอกจากขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา เคมี และกายวิภาคของเซลล์แล้ว ยังขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การเกิดเป็นยอด ราก และอื่นๆ ทุกเซลล์ของพืชมีลักษณะทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์สามารถเจริญเป็นต้นพืชใหม่ได้ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นกับปัจจัยหลายประการด้วยกัน เช่น ปัจจัยภายในทั้งชนิด องค์ประกอบ และลักษณะของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยง (Gamborg and Wetter, 1975 Sunderland and Dunwell, 1977 ; Vajrabhaya, 1977 ; Vajrabhaya, 1988) และปัจจัยภายนอก ได้แก่สภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น องค์ประกอบ และสภาพความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร อุณหภูมิ และความเข้มแสง (Linsmaier and Skoog, 1965 ; Stuart and Street, 1969 ; Schenk and Hildebrandt, 1972) การเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชใหม่นี้ อาจเกิดจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง โดยเซลล์ธรรมดาเปลี่ยนเป็น meristematic cell และเกิดเป็นจุดกำเนิดของยอดหรือรากขึ้น หรือเกิดผ่านแคลลัส โดย

เนื้อเยื่อบางส่วนโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณแคมเบียม มีการเจริญ และแบ่งเซลล์ในอัตราสูง (Digby and Skoog, 1966 ; Smith and Murashige, 1970 ; Dodd and Roberts, 1982; Maddock, 1985) เซลล์ของแคลลัสมีโอกาสเจริญเป็น growing point หรือเจริญเป็นต้นพืชใหม่ได้โดยผ่านขบวนการ organogenesis ซึ่งเป็นการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชโดยมีการเจริญทิศทางเดียว (unipolar) เช่น การเกิดส่วนยอดหรือราก ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมา เป็น meristematic cell เซลล์มีขนาดเล็ก แต่ไซโตพลาสซึมเข้มข้น และแบบ somatic embryogenesis ซึ่งเป็นการเจริญสองทิศทางโดยเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนการพัฒนาของไข่ (ovule) ภายหลังจากได้รับการผสม จนกระทั่งเป็นต้นอ่อน (embryo) ซึ่งเจริญต่อไปเป็นส่วนยอด และรากพร้อมกัน (Kohlenbach, 1977; Flick et al, 1983) การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นพืชใหม่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ และยิ่งได้จำนวนต้นพืชใหม่มากเท่าไร โอกาสการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เกิดการแปรยิ่งมีมากขึ้นเท่านั้น (Brettel and Ingram, 1979)

ยาสูบจัดเป็นพืชที่นิยมใช้เป็นตัวอย่างของการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นพืชใหม่ได้ง่ายโดยมีการพัฒนาทั้งแบบ organogenesis และ somatic embryogenesis แล้วแต่ว่าสูตรอาหารนั้นเหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการใด Murashige and Skoog (1962) ได้ศึกษาและชักนำแคลลัสจากส่วนใบ และลำต้นของยาสูบให้เกิดเป็นพืชใหม่ได้สำเร็จ และพบว่าการเติมสารไธอามีน ไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ในอาหารสังเคราะห์มีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสอย่างรวดเร็ว และได้กลายเป็นสูตรสำเร็จสูตรหนึ่ง ที่มีผู้นิยมใช้เป็นสูตรพื้นฐานกันมาก ต่อมา Linsmaier and Skoog ได้ปรับปรุงสูตรอาหารของ Murashige and Skoog สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบให้ได้ปริมาณแคลลัสอัตราสูง และสามารถชักนำเป็นต้นใหม่ได้ดี โดยการเพิ่มสารไธอามีน-ไฮโดรคลอไรด์จากปริมาณ 0.1 เป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้การเติมสารเร่งการเจริญเติบโต ชนิดออกซิน และไซโตไคนินในปริมาณที่พอเหมาะ มีผลต่อแคลลัสยาสูบ ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และพัฒนาเป็นต้นพืชใหม่ได้ ถ้าอัตราส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงจะชักนำให้เกิดต้น แต่ถ้าอัตราส่วนของทั้งสองต่ำจะชักนำให้เกิดราก การเติมสารไมโออินโอสิทอล ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ลงในอาหารปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด พืชบางชนิดรวมทั้งยาสูบด้วย ลักษณะของแคลลัสบางส่วนจะแข็งแรงได้น้ำหนัก มีการเกาะกลุ่มกันแน่น แต่บางส่วนก็ง่ายต่อการแยกออกเป็นส่วนๆ ลักษณะเป็น friable เซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ อาจมีการแบ่งเซลล์ได้เรื่อยๆ(Schenk and Hildebrandt,1972)

Torry and Reinert (1961) ; Shabde and Murashige (1977) รายงานว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ถ้ามีปริมาณออกซิน เหมาะสมจะชักนำให้เกิดแคลลัสและราก แต่ถ้ามีปริมาณไซโตไคนินเหมาะสมจะชักนำให้เกิดยอด Walkey and Woalfitt (1968) ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ N. rustica จากส่วนลำต้น เพื่อศึกษาเกี่ยวกับไวรัสโดยเลี้ยงในอาหารเหลวตามสูตรของ Linsmaier and Skoog ซึ่งเติม IAA (indoleacetic acid) ปริมาณ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคนีตินปริมาณ 2-5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ เนื้อเยื่อจะแบ่งเซลล์และเจริญเป็นแคลลัส ลักษณะเป็นกลุ่มก้อน และบางส่วนมีการพัฒนาเป็นหน่อสีเขียวมากมาย ซึ่งต่อไปจะเจริญเป็นต้นพืชใหม่ Carlson (1970); Smith and Murashige (1970) ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบโดยใช้ส่วนใบบริเวณเนื้อเยื่อพาเรนไคมา และส่วนยอดบริเวณเนื้อเยื่อเจริญชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชใหม่ได้สำเร็จในอาหารตามสูตรของ Murashige and Skoog (1962)และพบว่าเซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนกลายเป็นแคลลัสและพัฒนาเป็นยอดก่อนแต่ไม่ยืดยาวมาก จากนั้นจึงพัฒนาเป็นส่วนราก

Sekiya et al. (1977) ได้เลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IAA หรือ IBA (indolebutyric acid) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืด พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ง่าย และการเติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ปริมาณที่เหมาะสมจะชักนำให้เกิดแคลลัสมาก นอกจากนี้การเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบจากส่วนลำต้นในอาหารตามสูตร Murashige and Skoog ที่เติม IAA ปริมาณ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไคนีติน ปริมาณ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นไปตามลำดับขั้น ประมาณ 3-5 วันแรก เนื้อเยื่อจะเริ่มแบ่งเซลล์เกิดเป็นก้อนแคลลัส และอีก 2 สัปดาห์ต่อมาแคลลัสจะเจริญคลุมชิ้นส่วนของพืช หลังจากนั้นกระตุ้นการสร้างต้นและรากในอาหารใหม่ ภายในเวลา 6 สัปดาห์จะเกิดเป็นต้นเล็ก ๆ ขึ้นมากมาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พรทิพย์ ธนูทองและคณะ(2528)ทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของใบยาสูบ(N. tabacum L. cv. Samsun.) และชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารตามสูตรของ Linsmaier and Skoog ซึ่งเติม NAA (naphthalene acetic acid) ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP (benzyladenopurine)ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 800 ลักซ์ กลุ่มเซลล์จะเจริญเติบโตเป็นแคลลัสภายใน 2 สัปดาห์ และกระตุ้นให้แคลลัสเจริญเป็นต้นพืชในอาหารที่เติมฮอร์โมน NAA ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

และ BAP ปริมาณ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสจะเริ่มจัดเรียงตัวเพื่อสร้างอวัยวะ ต่างๆ โดยเจริญเป็นหน่อจำนวนมาก ภายในเวลา 3-4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายลงอาหารใหม่ตามสูตรดังกล่าว แต่เติม NAA ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นการเกิดต้นและรากให้ดีขึ้น พืชซึ่งได้จากการเลี้ยงแคลลัสเจริญจากโปรโตพลาสต์นี้ยังพบการแปรลักษณะต่างๆ ทางสรีระวิทยา และรูปร่างภายนอกรวมไปถึงส่วนสูง ขนาดรูปร่างลักษณะใบและการออกดอกด้วย แม้ว่าจะแบ่งจากแคลลัสเดียวกันเป็นส่วนๆ มาเลี้ยงต่างหากก็ตาม ในกรณีของพืชอื่นๆ เช่น พืชตระกูลกะหล่ำ มันฝรั่ง และส้ม เป็นต้น ก็พบการแปร เช่นกัน (Kao et al ,1970; Shepard et al.,1980)

วราภรณ์ อนันบุญทริก และคณะ (2527) ได้ศึกษาการเลี้ยงเรณูของยาสูบในอาหารสังเคราะห์พื้นฐาน พบว่า เรณูเจริญได้ดีในอาหารสูตร H (Harada , 1975) อัตราการงอกประมาณ 13 เปอร์เซนต์ และใน B 5 (Gamborg and Eveleigh , 1968) มีอัตราการงอกเพียง 10 เปอร์เซนต์ เท่านั้น และต้นยาสูบที่ได้จากการเลี้ยงเรณูนี้ สามารถเจริญออกดอกได้เช่นเดียวกับต้นยาสูบปกติ แต่มีลักษณะลำต้น ใบ และดอกบอบบางกว่า จึงไม่สามารถผลิตเมล็ดได้ จัดเป็นพืช haploid นอกจากนี้ยังทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อเส้นกลางใบของยาสูบในอาหารสูตรH ด้วยพบว่าถ้าไม่เติมสารเร่งหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตเนื้อเยื่อจะไม่พัฒนาเป็นอวัยวะต่างๆ และที่ความเข้มข้นของไคนีตินสูงๆ ประมาณ 1.2 มิลลิกรัม จะกระตุ้นให้เกิดหน่อมากที่สุด ถ้า NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดรากดีที่สุดแต่เมื่อเพิ่มเป็น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไม่เกิดรากและจำนวนหน่อก็ลดลงด้วย และไคนีตินความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไม่ทำให้เกิดรากเช่นเดียวกัน ในเนื้อเยื่อชิ้นเดียวกันจะไม่พบการเกิดรากและหน่อพร้อมกันเลย

<u>การคัดพันธุ์ต้านทานโรค</u>

เทคนิคการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชนี้เป็นประโยชน์ต่อการคัดพันธุ์พืชต้านทานโดยการชักนำและคัดเลือกยีนเดี่ยวที่เกิดการแปรหรือการกลายขึ้น somaclonal variation เป็นการแปรที่เกิดขึ้นในขณะทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งจะเกิดขึ้นตลอดเวลา และมีโอกาสแสดงออกได้มากกว่าที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ การแปรนี้ยังเป็นแหล่งของการคัดเลือกพืชพันธุ์ใหม่ๆ ซึ่งอาจเกิดขึ้นเอง หรือบังคับให้เกิดขึ้นได้ โดยการใช้สารเคมี รังสี หรือปัจจัยทางธรรมชาติได้ และพืชที่ได้ใหม่นี้อาจมีลักษณะดีขึ้นหรือเลวลงได้ ซึ่งนับเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วย (Heinz et al., 1977 ; Vajrabhaya, 1977; 1988 ; Brettel and Ingram, 1979; Evans et al.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1984) Secor and Shepard (1981)พบว่าพืชที่เจริญเป็นต้นซึ่งได้จากการชักนำแคลลัส และจากโปรโตพลาสต์ จะแสดงลักษณะการแปรทั้งทางสรีระวิทยา และรูปร่างลักษณะภายนอกตลอดจนแสดงถึงความต้านทานโรคด้วย ก่อนหน้านี้มีรายงานการคัดพันธุ์พืชต้านทานโดย Ingram and Robertson (1965) ได้ทดลองและศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ Solanum tuberosum พันธุ์ Majestic พบว่ามะเขือเทศพันธุ์นี้ไม่มีหรือมีความต้านทานน้อยมากต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา Phytophthora infestans ซึ่งตรงข้ามกับพันธุ์ Orion ที่มีความต้านทานสูงต่อ race 4 ของเชื้อรานี้ ซึ่ง Ingram (1967 ; 1976) ให้เหตุผลว่าการที่แคลลัสมีความต้านทานนั้นเนื่องจากการแสดงออกของยีน R_1 โดยได้ทดลองใส่สปอร์ของเชื้อราชนิดนี้เป็นเนื้อที่ครึ่งหนึ่งของก้อนแคลลัส ภายหลังจากใส่สปอร์เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีเส้นใยเชื้อราเจริญปกคลุมแคลลัสที่ไม่ต้านทานทั่วทั้งก้อนลักษณะแคลลัสอ่อนนุ่ม ชุ่มน้ำ ไม่แข็งแรง แต่แคลลัสพันธุ์ Orion ยังแข็งแรง เมื่อตัดเนื้อเยื่อภายใน พบว่าไม่มีเส้นใยเชื้อราทำลายเซลล์ให้เกิดการตายขึ้น จะพบเพียง 2-3 เซลล์เท่านั้นบริเวณผิวแคลลัส

ในปี 1969 Ingram ได้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อราพาราสิต โดยศึกษาผลที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อรา Peronospora parasitica ต่อแคลลัสของกะหล่ำปลีหัว (Brassica oleracea.) var. capitata. และระหว่างเชื้อรา P. farinosa สาเหตุของโรคราน้ำค้าง (downy mildew) ต่อแคลลัสของถั่วเหลือง (Glycine max L.) พบว่าแคลลัสของพืชทั้งสองชนิด มีความต้านทานโรคและสามารถเจริญใหม่ได้ เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารใหม่

Griffin and Coley - Smith (1968) ได้รายงานการคัดเลือกแคลลัสของ ฮอบ ซึ่งมีความต้านทานโรคราน้ำค้าง สาเหตุจากเชื้อรา Pseudoperonospora humuli พบว่าแคลลัสที่ไม่ต้านทานโรคจะมีเส้นใยเชื้อราทำลายและเจริญอยู่ภายใน (intercellular mycelium) การเจริญของเชื้อราชนิดนี้บนแคลลัสของ ฮอบ เหมือนกับการเจริญของเชื้อรา Plasmopara viticola และ Peronospora tabacina นอกจากนี้เชื้อรา P. humuli ไม่มีการสร้างหรือผลิตสปอร์ชนิด Oospore บนก้อนแคลลัสตามที่ Stow and Ihara (1962) เคยรายงานไว้เมื่อเลี้ยงและบ่มแคลลัสที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสในที่มืด แต่อาจผลิตบ้างเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงแคลลัสที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-8 วันและ Helgeson et al. (1972) รายงานถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ (N. tabacum L.) ว่ามียีนเดี่ยว ลักษณะเด่น (single dominant gene) ต้านทานต่อ race 0 ของเชื้อรา

017905

Phytophthora parasitica var nicotianae สาเหตุของโรคแข้งดำ (Black Shank Disease) การแสดงออกของยีนเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิ สารอาหาร และฮอร์โมนพืชในอาหารสังเคราะห์ ถ้าเพิ่มปริมาณของไซโตไคนิน อัตราการเจริญของแคลลัสที่ต้านทานโรคจะเพิ่มขึ้น (Helgeson et al., 1978) Carlson (1973) รายงานเพิ่มเติมถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบที่มีความต้านทานต่อสาร methionine sulfoximide ซึ่งเป็นสารพิษต่อคลอโรฟิลล์ของพืชได้ต้นพืชที่ต้านทานโรคใบไหม้ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียPseudomonas tabaci ที่ผลิตสารพิษซึ่งมีลักษณะการทำลายคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกัน ได้พืช haploid เมื่อนำพืชนี้ไปทดสอบต่อด้วยสารที่ก่อให้เกิดมิวเตชันชนิด EMS (ehtyl methane sulphonate) พบว่ามี 3 แคลลัสซึ่งเจริญเป็นพืช diploidได้และมีความต้านทานต่อ PF(P-fluorophenylalanine) และ 5 MT(DL-5-tryptophane)ด้วย โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารที่ก่อให้เกิดมิวเตชันเช่นกัน และยังพบว่าสายพันธุ์แดรอกที่คัดเลือกได้ จากจำนวน 31 ใน 32 ของเซลล์เดี่ยวเกิดยีนที่ถาวรขึ้น เช่นเดียวกับที่ Binding (1972) ได้แคลลัสที่ต้านทานต่อสาร streptomycin แต่ไม่สามารถชักนำเป็นต้นพืชได้สำเร็จ แต่ Maliga et al. (1973) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยาสูบ (N. tabacum L.) ที่เป็น diploid และไม่เป็นหมันได้สำเร็จ โดยคัดเลือกจากเนื้อเยื่อสีเขียวของแคลลัสยาสูบที่เป็นhaploidให้ต้านทานต่อความเข้มข้นของสารนี้ที่ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์การตาย 50 ความต้านทานจะคงทนอยู่ในแคลลัส และในต้นพืชที่ถูกชักนำ นอกจากนี้ยังคัดเลือกแคลลัสยาสูบให้ต้านทานต่อสาร 5 - bromodeoxyuridine ได้อีกด้วย และในปี 1976 Maliga et al. ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อและคัดเลือกสายพันธุ์ยาสูบ ให้ต้านทานต่อสาร cycloheximide มีการแสดงออกของยีนที่ต้านทานมากกว่าจากมิวเตชันในธรรมชาติ

Heinz (1973); Heinz et al. (1977) ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ล้วน จนได้พันธุ์อ่อนต้านทานโรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา Helminthosporium sacchari และการคัดเลือกแคลลัสข้าวโพดที่ทนต่อสารพิษ A 619 (CMS-T) ของเชื้อรา H. maydis ก็มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุด้วย Ishii (1978) ได้รายงานว่าข้าวสายพันธุ์ต่างๆมียีนที่ต้านทานโรคใบไหม้ (Blast)สาเหตุจากเชื้อรา Pyricularia orayzae แต่ในขณะที่เป็นแคลลัสยีนจะไม่แสดงออก

Challeff and Parsons (1978) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อและได้สายพันธุ์ยาสูบ (N. tabacum L.) 7 สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อยาฆ่าหญ้าชนิด picloram(4-amino-3, 5,6-trichloropicolinic acid) และเมื่อผสมพันธุ์ในจำนวน 4 สายพันธุ์เข้าด้วยกัน ยังพบ

ความต้านทานในรุ่นต่อไปอีก Berlyn (1980) ได้ใช้สาร isonicotinic acid hydrazide คัดเลือกสายพันธุ์ยาสูบโดยสารนี้จะลดอัตราการหายใจและเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสง ทำให้เกิดการแปรที่ถาวรขึ้น ซึ่ง Flashman et al. (1985) ยังได้คัดเลือกสายพันธุ์ยาสูบให้ต้านทานต่อ vernolate (S-propyl N, N-dipropylthiocarbamate) พบว่าเมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชใหม่ จะแสดงความต้านทานอย่างสม่ำเสมอ รูปร่างลักษณะภายนอกของพืชเป็นปกติ แต่เมื่อคัดเลือกในรุ่นต่อไป กลับไม่ต้านทาน นอกจากนี้ Durand (1987) ได้เลี้ยงเซลล์ยาสูบ (N. sylvestris) ได้พืชที่ต้านทานต่อสาร oligomycin และสาร chloramphenicol ซึ่งมีความไม่คงตัวสูงในระยะแรกของการคัดเลือก และพบว่าสายพันธุ์ที่ได้ใหม่ มีความต้านทานมากกว่าสายพันธุ์ป่า

การพัฒนาระบบการปรับปรุงพันธุ์พืช ให้ต้านทานโรคโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ได้มีการทดลองใช้สารพิษเป็นสารสำหรับคัดความต้านทาน และเพิ่มความต้านทานให้แก่พืช สำหรับแคลลัสที่ต้านทานสารพิษ เมื่อกระตุ้นให้เกิดเป็นต้นพืชใหม่ก็มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคนั้นๆ ด้วย และยังสามารถถ่ายทอดความต้านทานนี้ไปยังรุ่นต่อไปอีกด้วย (Behhke, 1980 ; Hartman et al. 1984)

พรทิพย์ ธนูทอง และคณะ (2528) ได้ผลิตพันธุ์ยาสูบที่ต้านทานโรคใบไหม้ (wildfire) และโรคใบจุด (brown spot) ได้สำเร็จ โดยการคัดเลือกแคลลัสซึ่งเจริญจากโปรโตพลาสต์ของใบยาสูบที่มีความต้านทานต่อสารพิษของเชื้อสาเหตุ พบว่าประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ ของแคลลัสต้านทานต่อสารพิษของเชื้อแบคทีเรีย Pseudomonas syringae ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ ต้านทานต่อสารพิษของเชื้อรา Alternaria alternata ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ต้นยาสูบที่ได้ยังมีลักษณะการแปรค่อนข้างสูงโดยไม่จำเป็นต้องผ่านการกระตุ้นด้วยรังสีหรือสารเคมี ลูกที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้นที่ได้จากแคลลัสต้านทานหมายเลข 348R ประมาณ 26 เปอร์เซนต์ มีความต้านทานโรคใบไหม้ได้เช่นกัน และจากแคลลัสต้านทานหมายเลข 48 R ประมาณ 9.3 เปอร์เซนต์ก็มีความต้านทานโรคใบจุดเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงลักษณะความต้านทานโรคว่าเป็นลักษณะทางพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดได้เมื่อตรวจดูลักษณะและนับจำนวนโครโมโซมของต้นต้านทานพบว่ามีลักษณะโครโมโซมและจำนวนปกติ คือ 2n=48 เช่นเดียวกับยาสูบทั่วไป นอกจากนี้การเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษชนิด T ของเชื้อรา Drechelera maydis สาเหตุโรคใบไหม้ (Southern leaf blight) เมื่อทดสอบความเป็นพิษบนใบพืชที่ทำให้เกิดแผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก็พบลักษณะอาการเช่นเดียวกับใบพืชที่เป็นโรคนี้ (Turner and Martinson, 1972) Gengenbach et al. (1977) ยังได้พันธุ์ข้าวโพดต้านทานต่อเชื้อรา H. maydis. จากแคลลัสที่ต้านทานสารพิษชนิด T. ซึ่งเชื้อราชนิดนี้ผลิตขึ้นด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย