ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสร้างพันธุ์ยาสูบลูกผสมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างโดยวิธีการทางโปรโตพลาสต์เทคโนโลยี

ชื่อผู้เขียน นายจงกิจ มาศิริ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาทพร สมิตะมาน ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. ดนัย บุณยเกียรติ กรรมการ
อาจารย์เกวลิน คุณาศักดากุล กรรมการ

บทคัดย่อ

การสร้างพันธุ์ยาสูบให้ต้านทานต่อโรคใบด่างได้พัฒนาจากการชักนำให้เกิดกระบวนการเอ็มบริโอจีนีซิสจากอับเรณูของยาสูบ 2 พันธุ์ คือ TN 90 และ Xanthi nc บนอาหารสังเคราะห์ 2 สูตร คือ NN (Nitsch and Nitsch, 1969) ที่เติม activated charcoal 2.0% และผสมวุ้น 0.5% กับ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและผสมวุ้น 0.7% พบว่าพันธุ์ TN 90 สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อน สร้างยอด และสร้างรากได้ในอาหารสูตร NN ที่ระดับ 46, 42 และ 40% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ในขณะที่พันธุ์ Xanthi nc ให้ผลการเจริญไม่แตกต่างกันบนอาหารทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำต้นที่พัฒนามาจากอับเรณูมาศึกษาความกว้างและความยาวของเซลล์ปากใบ รวมทั้งการนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ พบว่าเซลล์ปากใบมีขนาดเล็กกว่า รวมทั้งมีจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ต่ำกว่ายาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนลักษณะทางสัณฐานของยาสูบที่ได้จากการทดลองจะมีลักษณะของใบแคบกว่ายาสูบปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความยาวของใบ จำนวนวันที่ออกดอก จำนวนใบต่อต้น และความสูงของต้น ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของใบให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในพันธุ์ TN 90 เพียงพันธุ์เดียว จำนวนโครโมโซมของต้นที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูจะมีจำนวน 24 แท่ง

ในขณะที่ต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีโครโมโซม 48 แท่ง ทำให้สามารถยืนยันได้แน่นอนว่าเป็นต้นแฮพลอยด์อย่างแท้จริง

การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างยาสูบแฮพลอยด์ของทั้งสองพันธุ์ด้วยกระแสไฟฟ้าและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่เติม NAA 2.25 มก./ล. Zeatin 0.75 มก./ล. และแมนนิทอล 0.25 โมลาร์ พบว่า โปรโตพลาสต์ลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 76.09% ในขณะที่พันธุ์ TN 90 และ Xanthi nc ที่เป็นชุดเปรียบเทียบมีอัตราการมีชีวิตเป็น 73.08 และ 65.96% ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์เปลี่ยนอาหารเป็นสูตร MS (1962) ที่เพิ่มซูโครส 3.0%, 2, 4-D 0.25 มก./ล., BAP 2.0 มก./ล. และแมนนิทอล 0.25 โมลาร์ โปรโตพลาสต์ของลูกผสมมีพัฒนาการสูงสุดโดยแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการสร้างหน่อในอัตราเฉลี่ย 25.25 และ 22.50% ภายในเวลา 20 วัน ตามลำดับ แคลลัสของลูกผสมสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อนับจำนวนโครโมโซมของลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 41-60 โครโมโซม ส่วนลักษณะทางสัณฐานของลูกผสม พบว่า ส่วนมากมีรูปร่างของใบ และการมีหูใบเหมือนพันธุ์ TN 90 ในปริมาณ 77.5% แต่ก็พบรูปร่างของใบที่เหมือนกับ Xanthi nc 12.5% ลูกผสมที่ได้มีใบสีเขียวเข้มเหมือนพันธุ์ Xanthi nc ทุกต้น

การทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างในสภาพเรือนกระจกโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลสังเกตพบอาการเป็นจุดแห้งตายของเนื้อเยื่อ (local lesion) ในยาสูบลูกผสมจำนวนเพียงเล็กน้อย แต่ส่วนใหญ่ไม่พบอาการใด ๆ ในขณะที่ TN 90 พบอาการด่างแบบ systemic หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน ส่วนการทดสอบในสภาพไร่เมื่อปล่อยให้เกิดโรคตามสภาพธรรมชาติ พบอาการจุดแห้งตายของเนื้อเยื่อในยาสูบลูกผสมอัตรา 0.52% เมื่อยาสูบอายุ 60 วัน ส่วนพันธุ์ Xanthi nc ไม่พบอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ TMV แต่อย่างใด ในขณะที่พันธุ์ TN 90 มีอัตราการเกิดโรคใบด่างสูงถึง 19.27 และ 33.33% เมื่อต้นยาสูบอายุ 30 และ 60 วัน ตามลำดับ

Thesis Title Production of Tobacco Mosaic Virus Resistant Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Hybrids Using Protoplast Technology

Author Mr. Jongkit Masiri

M.S. Biotechnology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Prasartporn Smitamana	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Danai Bunyakiat	Member
Lect. Kaewalin Kunasakdakul	Member

ABSTRACT

TMV resistant tobacco cybrids was developed through the anther culture of the TN 90 and Xanthi nc cultivars using the NN medium (Nitsch and Nitsch, 1969) supplemented with 2.0% activated charcoal and 0.5% agar and the hormone-free MS (Murashige and Skoog, 1962) with 0.7% agar added. Germination, shoot formation and root formation of the TN 90 cultivar were 46, 42 and 40%, respectively when cultured in NN medium which were significant higher than using MS medium (6, 6 and 2% respectively), however, for the Xanthi nc cultivar no difference was observed. Stomatal size and number of chloroplast per guard cell were used for the identification of the ploidy level of anther-derived tobacco plants which revealed smaller guard cell and lower chloroplast number than the normal plants. Filed agronomic performance demonstrated that leaf width of the anther derived plants were significant smaller than tobacco planting from seed. Leaf length, flowering date, number of leaves per plant and plant height were not different. Leaf length by leaf width ratio was found significant different only in plants derived from TN 90 anthers. Chromosome number of anther derived plants of both cultivars was 24 comparing with 48 chromosomes in the normal tobacco which clearly demonstrated that the anther derived plants were truly haploid.

Protoplast fusion between 2 haploid lines was performed using electrofusion method. The fusants were cultured in PS (1981) medium supplemented with 2.25 mg/l NAA, 0.75 mg/l Zeatin and 0.25 M mannitol, number of viable protoplasts was significantly higher (76.09%) than the parental varieties TN 90 (73.08%) and in Xanthi nc (65.96%). After 1 week, the protoplasts were transferred to the MS (1962) medium supplemented with 3.0% sucrose, 0.25 mg/l 2, 4-D, 2.0 mg/l BAP and 0.25 M mannitol. Cell division and budding rates of the fusants were also significantly higher than the parent lines (25.25 and 22.50% in the fusants, 13.50 and 5.75% in the TN 90, 0 and 4% in the Xanthi nc). The calli derived from the fusants could regenerate when cultured on the solid hormone free MS medium. Chromosome number of the cybrids was ranged between 41 - 60 chromosomes. After transplanting, leaf shape and stipule characters of most fusants (77.5%) were similar to TN 90 cultivar while 12.5% was similar to Xanthi nc. However, all of fusants had dark green leaf color, mostly closed to Xanthi nc.

Primary testing for the TMV resistant character was performed under the greenhouse conditions, the cybrids showed some local lesions after mechanically inoculated with TMV where as the TN 90 cultivar showed the systemic symptom after 7 days of inoculation with the same inoculum. Field trials under the natural inoculation pressure, only 0.52% of the cybrids (60 days after planting) showed the local lesion symptom whereas no symptom was observed in the highly TMV resistant Xanthi nc cultivar and 19.27 and 33.33% of the systemic symptoms were observed in the TN 90 cultivars after 30 and 60 days after transplanting, respectively.