รายงานฉบับสมบูรณ์

(Final Report)

โครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง

Sub-Project 3: Research and Development of the Production of *Citrus spp.* Virus-Free Mother Plant for Growing in Highland Areas

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตพืชตระกูลส้มปลอดภัยบนพื้นที่สูง

แผนงานวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตร

โดย

ปิยะมาศ ศรีรัตน์ และคณะ

สนับสนุนทุนวิจัยโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

รายงานฉบับสมบูรณ์
(Final Report)

โครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง
Sub-Project 3: Research and Development of the Production of *Citrus spp.* Virus-Free Mother Plant for Growing in Highland Areas

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตพืชตระกูลส้มปลอดภัยบนพื้นที่สูง

แผนงานวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตร

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นางสาวปิยะมาศ ศรีรัตน์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. นางมลธิรา ศรีถาวร (ทองอนันต์)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว	มูลนิธิโครงการหลวง

ตุลาคม 2560

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อการศึกษาวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูงโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 เพื่อใช้ในการดำเนินการตลอดโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวง สถานีเกษตรหลวงปางดะ หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาตัวอย่างพืชและสนับสนุนในด้านบุคลากรเพื่อช่วยเหลือในระหว่างดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยาภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ดร.อัจฉรา ภาวศุทธิ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ให้คำแนะนำและช่วยประสานงานในระหว่างการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือและทำให้โครงการวิจัยนี้ประสบสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย
ตุลาคม 2560

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

คณะผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

1.1 ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวปิยะมาศ ศรีรัตน์
หน่วยงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ที่อยู่ 1 หมู่ 6 ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

2. ชื่อนักวิจัยโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

2.1 ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางมลธิรา ศรีถาวร (ทองอนันต์)
หน่วยงาน โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ที่อยู่ 1 หมู่ 6 ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

2.2 ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว
หน่วยงาน สถานีเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง
ที่อยู่ 192 หมู่ 10 ตำบล สะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ 50250

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

1. บทนำ

พืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) เป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทางเศรษฐกิจ ส้มถูกบริโภคทั้งในลักษณะการรับประทานเป็นผลไม้สดและในลักษณะของผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น น้ำผลไม้ ในประเทศไทยโดยมูลนิธิโครงการหลวงได้คัดเลือกชนิดและพันธุ์ส้มเพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในพื้นที่สูง โดยชนิดของส้มที่มีศักยภาพ ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท อย่างไรก็ตาม โรคของพืชตระกูลส้มเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกส้ม ซึ่งโรคเหล่านี้ส่งผลอย่างรุนแรงทำให้ผลผลิตและคุณภาพของผลไม้ลดลง

โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening disease) เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างรุนแรง มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* โรคกรีนนิ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญเสียในหลายพื้นที่ของการปลูกส้มในเอเชียและแอฟริกา ก่อนที่จะถูกระบุว่าเป็นโรคของพืชแบบเดียวกัน โรคกรีนนิ่งถูกเรียกในชื่อที่แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค เช่น ในประเทศจีน เรียกว่า yellow shoot หรือ huanglongbing; ในไต้หวัน เรียกว่า likubin; ในอินเดีย เรียกว่า dieback; ในฟิลิปปินส์ เรียกว่า leaf mottle ในแอฟริกาใต้ เรียกว่า yellow branch, blotchy-mottle หรือ greening ต่อมาเมื่อมีความชัดเจนถึงลักษณะของโรค และระบุว่าเป็นโรคเดียวกัน จึงเรียกโรคนี้ว่า “greening” (Graca, 1991) ในไต้หวันพบว่า ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์ส้มที่ปลูกในเชิงพาณิชย์ว่ามีความต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง (Su, 2008) นอกจากนี้ ยังไม่มีการนำเสนอวิธีการรักษาโรคกรีนนิ่ง แม้ว่าอาการของโรคจะมีความแตกต่างกันไป แต่มักเริ่มต้นด้วยอาการใบมีสีเหลือง มีการเสื่อมของกิ่ง ก้าน และรากก่อนวัยที่ควรจะเกิดขึ้น และสุดท้ายต้นไม้ค่อยๆ มีความแข็งแรงลดลงและต้นส้มทั้งต้นจะเหี่ยวและแห้งตาย (Su, 2008)

Citrus tristeza virus เป็นไวรัสในสกุล Closterovirus ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆที่มีผลต่อพืชตระกูลส้มอย่างมาก (Moreno et al., 2008) ในปี ค.ศ. 1920 โรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* ได้ทำลายอุตสาหกรรมส้มในอเมริกาใต้และแอฟริกา และต่อมามีการแพร่ระบาดของโรคไปทั่วโลกอย่างรวดเร็ว ไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ชื่อ CTV-D ถูกพบครั้งแรกในไต้หวันในปี ค.ศ. 1981 โดยไวรัส CTV-D ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการปลูกส้มโอในระดับอุตสาหกรรม มีการรายงานถึงโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* ว่าจะไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตส้มโอที่ปลูกภายใต้อุณหภูมิที่ร้อนในประเทศเขตร้อน อย่างไรก็ตาม มีรายงานเกี่ยวกับโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตส้มและ/หรือส้มแมนดารินในอเมริกาใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยทำให้ต้นแคระแกรนและทำให้ผลผลิตและคุณภาพของส้มลดลง อาการของโรคที่เกิดจากไวรัสมีอาการที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัส สายพันธุ์ของส้มและการร่วมกันของยอดพันธุ์ดีและต้นตอในการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเสียบยอด ในไต้หวันนิยมทำการขยายพันธุ์ส้มโดยวิธีการเสียบยอด โดยยอดส้มที่ไม่ต้านทานโรคแต่มีลักษณะที่ดีในการให้ผลผลิตจะถูกเสียบยอดบนต้นตอที่ทนต่อ *Citrus tristeza virus* ซึ่งต้นส้มจะไม่แสดงอาการแม้ว่าจะติดเชื้อไวรัส (Su and Tsai, 1991; Su, 2008)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิควิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการใช้เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชจำนวนมากที่มีคุณลักษณะตรงตามต้นแม่พันธุ์ โดยทั่วไปแล้วต้นอ่อนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนราหรือแบคทีเรียในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปรากฏลักษณะเด่นชัด ดังนั้น จึงสามารถคัดแยกเพื่อกำจัดต้นอ่อนของพืชที่มีการติดโรคจากเชื้อราหรือแบคทีเรียออกได้ตั้งแต่ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นนั้น การปรากฏลักษณะที่บ่งบอกว่ามีการปนเปื้อนของไวรัสจึงสังเกตเห็นได้ยาก ส่วนใหญ่อาการของพืชที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏภายหลังจากที่นำพืชไปปลูก นอกจากนี้ไวรัสสามารถถ่ายทอดและทำให้ติดเชื้อได้อย่างง่ายดายในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้น ในการผลิตต้นกล้าปลอดไวรัส ต้นแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องเป็นพืชที่ปลอดไวรัสอย่างแท้จริง

เนื้อเยื่อของพืชที่ปลูกในแปลงปลูกมีการปนเปื้อนสูง จึงเป็นเรื่องยากที่จะได้เนื้อเยื่อพืชที่ปลอดเชื้อสำหรับใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในหลอดทดลอง (Rugini, 1990) การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืช (Surface disinfection) เป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ในขั้นตอนนี้เน้นการขจัดสิ่งปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ออกจากพื้นผิวและภายในของเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้เกิดความเสียหายและฆ่าเนื้อเยื่อพืช (Teixeira da Silva *et al*., 2015; Lazo-Javalera *et al*., 2016) เนื่องจากสารฆ่าเชื้อ (สารฟอก) ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิวอาจเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อของพืช (George 1993) ดังนั้นในการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อจึงควรคำนึงถึงความสมดุลระหว่างอัตราการปนเปื้อนและอัตราการอยู่รอดของเนื้อเยื่อเพื่อเจริญไปเป็นต้นอ่อน โดยทั่วไปในการฆ่าเชื้อนิยมใช้สารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) (Lazo-Javalera et al., 2016) เนื่องจากสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรีย ราและ ไวรัสทุกชนิด นอกจากนี้สารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ยังมีคุณสมบัติเป็นออกซิเดชั่นที่ดีทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก เอมีนและอะไมด์ได้ดี ปฏิกิริยาโดยทั่วไประหว่างกรดอะมิโนและสารละลายคลอไรด์ไฮโปคลอไรท์ทำให้เกิด Aldehyde, NH_4Cl และ CO_2 (Yildiz, 2012) โดยสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในรูปสารละลายที่จำหน่ายในเชิงการค้า เช่น คลอรอกซ์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกยอดที่แข็งแรงและสมบูรณ์ของเลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท จากนั้นตัวอย่างของใบพืชตระกูลส้มเหล่านี้จะได้รับการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง และโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* และในการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคจะใช้เฉพาะยอดที่ปลอดโรคเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

2. วัตถุประสงค์

โครงการย่อยที่ 3 : การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง เป็นโครงการวิจัยที่มีแผนการดำเนินการ 3 ปี โดยในปีที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มที่ปลอดโรค โดยทำการรวบรวมยอดส้มที่มีความสมบูรณ์และทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง และตรวจสอบโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* เฉพาะยอดส้มที่ปลอดโรคจะถูกใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นสำหรับการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ

ทำการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวเพื่อใช้เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนยอดพืชตระกูลส้ม

3. ผลการวิจัย

ทำการรวบรวมกิ่งของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท ที่มียอดที่มีสุขภาพดีและไม่แสดงอาการของการเป็นโรค จากหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ จังหวัดเชียงใหม่ ตัวอย่างใบของพืชตระกูลส้มเหล่านี้ได้รับการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) อ้างอิงตามวิธีของ Jagoueix *et al*., 1994 และตรวจสอบโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* โดยใช้เทคนิค reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) อ้างอิงตามวิธีของ Mehta *et al*., 1997 เพื่อรวบรวมยอดส้มที่ปลอดโรคเพื่อใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นสำหรับการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลจากการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า ตัวอย่างใบของเกรพฟรุ้ท จำนวนร้อยละ 33.3 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกรีนนิ่ง โดยตัวอย่างใบเหล่านี้มีการตรวจพบชิ้นส่วน ขนาด 1107 คู่เบส ในขณะที่ตัวอย่างใบของเลมอนและคัมควัท ตรวจไม่พบชิ้นส่วน ขนาด 1107 คู่เบสดังกล่าว จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างของเลมอนและคัมควัทเป็นตัวอย่างยอดที่ปลอดโรคกรีนนิ่ง จากผลการตรวจสอบโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* พบว่า ตัวอย่างใบของคัมควัท จำนวนร้อยละ 66.7 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อ *Citrus tristeza virus* ในส่วนของเลมอนและเกรพฟรุ้ท ตรวจไม่พบชิ้นส่วน ขนาด 670 คู่เบสของ *Citrus tristeza virus* จากการศึกษานี้สามารถคัดเลือกยอดเลมอน จำนวน 17 ยอดที่ปลอดโรคกรีนนิ่งและปลอดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* โดยยอดที่ปลอดโรคเหล่านี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาอย่างระมัดระวังบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว นำชิ้นส่วนยอดพืชตระกูลส้มที่แข็งแรง มาทำการฟอกฆ่าเชื้อ 3 วิธี ได้แก่ วิธีการที่ 1 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส วิธีการที่ 2 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และวิธีการที่ 3 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าสารความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส กรณีของเลมอน พบว่า ผลการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวที่ดีที่สุดเกิดขึ้นเมื่อใช้การฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการที่ 2 โดยมีร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำและมีร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนสูง กรณีของคัมควัทและเกรพฟรุ้ท พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการที่ 3 สามารถลดค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ให้ต่ำลงร้อยละ 50 และ 33.3 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการที่ 2

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอดของเลมอนได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS หรือ อาหารพื้นฐานสูตร WPM ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อส่วนยอดของเลมอนสามารถเจริญได้บนอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานทั้ง 2 สูตร อย่างไรก็ตาม อาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานทั้ง 2 สูตรไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้เกิดรากได้

4. สรุป

ต้นแม่พันธุ์พืชปลอดโรคเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตพืชปลอดโรคโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการเก็บกิ่งของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท ที่มียอดที่มีสุขภาพดีและไม่แสดงอาการของการเป็นโรค จากหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นนำตัวอย่างใบของพืชตระกูลส้มเหล่านี้มาทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าตัวอย่างใบของเลมอนทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบไม่มีการติดเชื้อของทั้งโรคกรีนนิ่งและโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างใบของเกรพฟรุ้ท จำนวนร้อยละ 33.3 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกรีนนิ่ง และตัวอย่างใบของคัมควัทจำนวนร้อยละ 66.7 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อ *Citrus tristeza virus* จากการศึกษานี้สามารถคัดเลือกยอดเลมอนจำนวน 17 ยอดที่ไม่พบการติดเชื้อทั้งเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งและไวรัส *Citrus tristeza virus* โดยยอดปลอดโรคเหล่านี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว กรณีของเลมอน พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโดยการแช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพโดยมีร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำและมีร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนสูง กรณีของคัมควัทและเกรพฟรุ้ท แม้ว่าการฟอกฆ่าเชื้อบนเขย่าสารความถี่สูงสามารถลดค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ แต่ยังคงมีค่าการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระดับที่สูง

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เนื้อเยื่อส่วนตายอดของเลมอนสามารถเจริญได้บนอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร MS หรืออาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร WPM ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม อาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานทั้ง 2 สูตรไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้เกิดรากได้

5. ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าชิ้นส่วนตายอดของเลมอนสามารถเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้บนอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร MS หรืออาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร WPM ที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แต่ยอดที่ได้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้ยอดที่ได้ไม่มีการเกิดราก ทีมผู้วิจัยเห็นว่าการศึกษาการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์พืชตระกูลส้มที่ปราศจากโรคในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งได้แก่ การตรวจสอบผลของอาหาร

เลี้ยงเพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มจำนวนยอด และการชักนำให้ยอดเกิดรากเพื่อให้ได้ต้นกล้าที่แข็งแรงและมีสุขภาพที่ดี สถาวะที่เหมาะสมเหล่านี้จะเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตต้นกล้าพืชตระกูลส้มที่ปลอดโรค

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)
Highland Research and Development Institute (Public Organization)

Executive Summary

1. Introduction

Citrus spp. is one of the most economically important fruits corps. The fruit is consumed as fresh fruit and processed product such as fruits juice. In Thailand, the Royal Project Foundation selects the potential variety of citrus fruit including lemon, grapefruit and kumquat in order to promote these citrus for planting in highland areas. However, the disease is one of major problems in citrus cultivation, which have brought about serious yield loss and deterioration of fruit quality.

Citrus greening disease is a seriously microbial disease caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Greening disease is a major cause of crop and tree loss in many parts of Asia and Africa. Before it was identified as one disease, it had been known by various names: yellow shoot (huanglongbing) in China; likubin (decline) in Taiwan; dieback in India; leaf mottle in the Philippines; and yellow branch, blotchy-mottle, or greening in South Africa. As it became clear that all these similar diseases, the name “greening” was widely adopted (Graca, 1991). In Taiwan, commercial citrus cultivars possess resistance to greening disease has not been reported (Su, 2008). Moreover, method for curing greening disease has not been proposed. Although the disease symptoms differ to some extent among cultivars, it commonly starts with yellowing of leaf veins and adjacent tissue. Premature defoliation will follow, and dieback of twigs, decay of feeder rootlets and lateral roots are the next stages of symptom development. Finally, the tree gradually declines in vigor and the entire plant withers (Su, 2008).

Citrus tristeza virus, a member of genus *Closterovirus* is the causal agent of various diseases with dramatically effects on citrus crops (Moreno *et al.,* 2008). In 1920 *Citrus tristeza virus* devastated the citrus industry in South America and Africa and it has rapidly spread worldwide. A new strain, CTV-D, was first identified in Taiwan in 1981 which has seriously damaged pummelo industry causing tree dwarfing. The *Citrus tristeza virus* was considered not to damage the pummelo badly under warm temperature in the tropics. However, there have been some reports of virulent strains attacking sweet orange and/or mandarin in South America and South East Asia. These strains cause severe stem pitting and stunting, and resulting to

deterioration of fruit yield and quality. The virus causes a variety of disease symptoms on citrus depending upon virus strain, citrus variety and scion-rootstock combination. In Taiwan, all the citrus cultivars are propagated as graft susceptible scions onto *Citrus tristeza virus*-tolerant rootstocks. The citrus trees, in general, show no symptoms, even if they are infected by the virus (Su and Tsai, 1991; Su, 2008).

Plant tissue culture is utilized as an effective technique for producing large numbers of identical copies of a plant from its mother plant. Basically, plantlets from tissue culture are free of mold and bacteria. The infected plant tissues are clearly seen and then eliminated during the *in vitro* culture process. However, in case of virus infections, the infected tissues are difficult to visualize since viruses replicate themselves only inside the living cell of other organisms. Most of the symptoms of virus-infected plants appear after planting. In addition, viruses are easily transmitted to other tissues during the tissue culture process. Thus, in order to produce virus-free plantlets, the source plants for tissue culture must be completely free of virus.

Unfortunately, tissues of field-grown plants are highly contaminated. Consequently, it is difficult to obtain sterile explants which are suitable for *in vitro* tissue culture protocols (Rugini, 1990). Surface disinfection of plant material is essential for *in vitro* cell and tissue culture protocol. In this process, an attempt is made to eliminate microbial contaminants from the surface and interior of plant material without destroying and killing the plant tissues (Teixeira da Silva *et al.,* 2015; Lazo-Javalera *et al.,* 2016). Since disinfection agents used for surface disinfection of explants can also be toxic to plant tissues (George 1993), a balance between the level of contamination and explant survival should always be considered when disinfection agents are used. Traditionally, the disinfection method using chloride hypochlorite solutions (NaOCl), which usually represents a good option for tissue disinfection (Lazo-Javalera *et al.,* 2016). NaOCl is highly effective against all kinds of bacteria, fungi, and viruses. Moreover, NaOCl has a strong oxidizing property which makes it highly reactive with amino acids, nucleic acids, amines, and amides. The general reaction between amino acids and NaOCl produces the respective aldehyde, NH_4Cl and CO_2 (Yildiz, 2012).

In this study, the healthy shoots of lemon, grapefruit and kumquat were selected. Then the sample of these citrus leaves are tested for the citrus greening

disease and the *Citrus tristeza virus* and the only disease-free shoots are used as initiated explants for *in vitro* propagation.

2. Obiective

The sub-project 3: Research and development of the virus-free *Citrus* spp. mother plant production for growing in highland areas is a three-year long project. In the first year, the purpose was to investigate and development the method for produce the disease-free *Citrus* spp. mother plant. In this research, the healthy shoots were collected and tested for the citrus greening disease and *Citrus tristeza virus*. Only the collected disease-free shoots will be used as initiated explants for the production of disease-free *Citrus* spp. mother plant. The surface disinfection method were evaluated in order to use as suitable method for preparing *Citrus* spp. shoot.

3. Results

The healthy and not showing characteristic symptoms on young branch of *Citrus* spp. consisting of lemon, kumquat and grapefruit were collected from the Citrus Research unit Pong Noi, the Royal Agricultural Station Pang Da, Chiang Mai province. The sample of these citrus leaves are tested the citrus greening disease by using polymerase chain reaction (PCR) method according to Jagoueix *et al*.,1994. Where as *Citrus tristeza virus* is detected by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method according to Mehta, et al., 1997 in order to select the virus-free shoots as initiated explants for *in vitro* tissue culture.

The result of the citrus greening disease by using PCR method showed that 33.3% of grapefruit leaves samples had been infected by the citrus greening bacteria because these samples gave an amplification of 1107 bp fragment. While lemon and kumquat leaves samples did not show the band, so it can be concluded that lemon and kumquat samples were citrus greening disease-free shoots. From the *Citrus Tristeza Virus* testing, the result showed that 66.7% of kumquat leaves samples exhibited the 670 bp fragment of *Citrus Tristeza Virus*. It indicates that these kumquat samples have been infected by the *Citrus Tristeza Virus*. However, lemon and grapefruit leaves samples did not show the 670 bp fragment of *Citrus Tristeza Virus*.

Seventeen shoots of lemon which as *Citrus Tristeza Virus*-free and citrus greening disease-free shoots were carefully maintained on basal Murashige and Skoog medium (MS medium) containing 30 g/L sucrose.

In the study of surface disinfection, healthy shoots were sterilized by 3 treatments. In treatment 1, the dissected shoots were immersed in 5% (v/v) clorox solution (commercial chlorine which NaOCl) for 10 minutes at 25 ± 2°C. In treatment 2, the dissected shoots were immersed in 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 for 10 minutes at 25 ± 2°C. In treatment 3, the dissected shoots were immersed in 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 on a sonicator for 10 minutes at 45 ± 2°C. In case of lemon, the best results were obtained from treatment 2, which exhibited low percentage of contamination and also demonstrated the high percentage of survival. In case of kumquat and grapefruit, surface disinfection on a sonicator (treatment 3) reduced the percentage of contamination in kumquat and grapefruit at 50 and 33.3 %, respectively when comparing the treatment 2.

In vitro culture of lemon was conducted on basal MS medium or basal WPM medium containing 30 g/L sucrose for 8 weeks. Lemon shoot bud explants could be grow on both basal medium. However, both basal medium could not induce shoot multiplication and root induction.

4. Conclusions

The disease-free mother plant is a key factor in disease-free plant production using *in vitro* propagation method. The healthy young branch of *Citrus* spp. consisting of lemon, kumquat and grapefruit were collected from the Royal Agricultural Station Pang Da, Chiang Mai province. From the results of citrus greening disease and *Citrus Tristeza Virus* testing showed that both citrus greening disease and *Citrus Tristeza Virus* were not detected in all of lemon leaves samples. However, citrus greening disease were detected in 33.3% of grapefruit leaves samples and *Citrus Tristeza Virus* were detected in 66.7% of kumquat leaves samples. Seventeen shoots of lemon which as citrus greening disease-free and *Citrus Tristeza Virus*-free shoots were carefully maintained on basal MS medium containing 30 g/L sucrose. At the present,

the processes of selection and collection the disease-free citrus shoots are carried out.

For surface disinfection of lemon shoot, the surface sterilization with 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 on a sonicator for 10 minutes were the effective procedures exhibits low percentage of contamination and the highest percentage of explant forming shoots. In case of kumquat and grapefruit, surface disinfection on a sonicator can reduce the percentage of contamination although these are still high value.

In the study of *in vitro* culture, lemon shoot bud explants could be grow on basal MS medium or basal WPM medium containing 30 g/L sucrose. However, both basal medium could not induce shoot multiplication and root induction.

5. Suggestions

Although lemon shoot bud explants were able to proliferate and differentiate on basal MS medium or WPM medium containing 30 g/L sucrose, the obtained shoots were unable to multiplication. Moreover the shoot was not achieved spontaneous rooting. The research team believes that the study of the *in vitro* propagation of disease-free Citrus spp., including investigation of the effect of culture medium and plant growth regulators on the shoot induction and multiplication and root induction in order to obtain healthy plantlets. These suitable conditions will be the effective protocol for produce the disease-free plants.

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คณะผู้วิจัย	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ค
Executive Summary	ซ
สารบัญ	-1-
สารบัญตาราง	-2-
สารบัญภาพ	-3-
บทคัดย่อ	-4-
Abstract	-5-
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	15
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	24
ข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	30
ตารางสรุปเปรียบเทียบผลงานวิจัยกับแผนงานวิจัย	32

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดของส้มที่มีต่อความสามารถในการเจริญเป็นต้นอ่อน โดยทำซ้ำวิธีการละ 10 ยอด และทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง (n=20)	19
ตารางที่ 2	ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนตายอดของเลมอนบนอาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร MS และ WPM ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	22

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1	องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)	30
ตารางภาคผนวกที่ 2	องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร WPM (Lloyd & McCown woody plant basal medium) (Lloyd and McCown, 1981)	31

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1107 คู่เบส ของเชื้อก่อโรคกรีนนิ่ง ขนาด 1,107 คู่เบส ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดย L1-L3 คือ ตัวอย่างเลมอน, C1-C3 คือตัวอย่างคัมควัท และ G1-G3 คือ ตัวอย่างเกรฟฟรุ้ท ใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม และ Neg คือ Negative control PCR	16
ภาพที่ 2	ผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีนของไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดย L1-L3 คือ ตัวอย่างเลมอน, C1-C3 คือตัวอย่างคัมควัท และ G1-G3 คือ ตัวอย่างเกรฟฟรุ้ท ใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม และ Neg คือ Negative control PCR	17
ภาพที่ 3	(ก) ตัวอย่างการเจริญของชิ้นส่วนยอดของเลมอนภายหลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์; (ข) และ (ค) ตัวอย่างของยอดที่มีการเจริญที่ดี	20
ภาพที่ 4	(ก) ตัวอย่างการเจริญของชิ้นส่วนยอดของคัมควัท ภายหลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์; (ข) ตัวอย่างของยอดที่มีการเจริญที่ดี; (ค) และ (ง) ตัวอย่างของยอดที่มีการเจริญช้า	21
ภาพที่ 5	ตัวอย่างการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นกับชิ้นส่วนยอดของเกรพฟรุ้ท	21
ภาพที่ 6	ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอนภายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	23
ภาพที่ 7	ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอนภายที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	23

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการเก็บกิ่งของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท ที่มียอดที่มีสุขภาพดีและไม่แสดงอาการของการเป็นโรค จากสถานีเกษตรหลวงปางดะ จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นนำตัวอย่างใบของพืชตระกูลส้มเหล่านี้มาทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า ตัวอย่างใบของเลมอนทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบไม่มีการติดเชื้อของทั้งโรคกรีนนิ่งและโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างใบของเกรพฟรุ้ท จำนวนร้อยละ 33.3 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง และตัวอย่างใบของคัมควัท จำนวนร้อยละ 66.7 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อ *Citrus tristeza virus* โดยจากการศึกษานี้สามารถคัดเลือกยอดเลมอนจำนวน 17 ยอดที่ไม่พบการติดเชื้อทั้งเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งและไวรัส *Citrus tristeza virus* ซึ่งยอดปลอดโรคเหล่านี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ในกรณีของเลมอน พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโดยการแช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพโดยมีร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำและมีร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนสูง กรณีของคัมควัทและเกรพฟรุ้ท แม้ว่าการฟอกฆ่าเชื้อบนเขย่าสารความถี่สูงสามารถลดค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้แต่ยังคงมีค่าการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระดับที่สูง ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเนื้อเยื่อส่วนตายอดของเลมอนสามารถเจริญได้บนอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร MS หรือ อาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร WPM ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม อาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานทั้ง 2 สูตรไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้เกิดรากได้

Abstract

The purpose of this research was to investigate the production of virus-free *Citrus* spp. mother plant by using tissue culture technique. The healthy young branch of *Citrus* spp. consisting of lemon, kumquat and grapefruit were collected from the Royal Agricultural Station Pang Da, Chiang Mai province. From the results of citrus greening disease and *Citrus Tristeza Virus* testing showed that both citrus greening disease and *Citrus Tristeza Virus* were not detected in all of lemon leaves samples. However, citrus greening disease were detected in 33.3% of grapefruit leaves samples and *Citrus Tristeza Virus* were detected in 66.7% of kumquat leaves samples. Seventeen shoots of lemon which as citrus greening disease-free and *Citrus Tristeza Virus*-free shoots were carefully maintained on basal MS medium containing 30 g/L sucrose. At the present, the processes of selection and collection the disease-free citrus shoots are carried out.

For surface disinfection of lemon shoot, the surface sterilization with 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 on a sonicator for 10 minutes were the effective procedures exhibits low percentage of contamination and the highest percentage of explant forming shoots. In case of kumquat and grapefruit, surface disinfection on a sonicator can reduce the percentage of contamination although these are still high value. In the study of *in vitro* culture, lemon shoot bud explants could be grow on basal MS medium or basal WPM medium containing 30 g/L sucrose. However, both basal medium could not induce shoot multiplication and root induction.