รายงานฉบับสมบูรณ์
(Final Report)

โครงการย่อยที่ 2 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรค

Sub-Project 2 The study on the *in vitro* propagation for produce virus-free passion fruit No.2 plants

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตเสาวรสหวานปลอดโรค

แผนงานวิจัย: สนับสนุนการเสริมสร้างประสิทธิภาพการผลิตและการตลาด

โดย

ปิยะมาศ ศรีรัตน์ และคณะ

สนับสนุนทุนวิจัยโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

รายงานฉบับสมบูรณ์
(Final Report)

โครงการย่อยที่ 2 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรค

Sub-Project 2 The study on the *in vitro* propagation for produce virus-free passion fruit No.2 plants

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตเสาวรสหวานปลอดโรค

แผนงานวิจัย: สนับสนุนการเสริมสร้างประสิทธิภาพการผลิตและการตลาด

คณะผู้วิจัย		สังกัด
1. นางสาวปิยะมาศ	ศรีรัตน์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. นางสาวมาริษา	สุขปานแก้ว	มูลนิธิโครงการหลวง
3. นางสาวศิวาภรณ์	หยองเอ่น	มูลนิธิโครงการหลวง
4. นายสาโรจน์	กลางกองสรรพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พฤศจิกายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรค โดยทำการคัดเลือกและรวบรวมยอดเสาวรสหวานเบอร์ 2 จากแปลงเกษตรกรและศึกษาหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตต้นพันธุ์เสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรคไวรัส คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 เพื่อใช้ในการดำเนินการตลอดโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่ให้ความอนุเคราะห์จัดหาและประสานงานในการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างเสาวรส ขอขอบคุณสถานีเกษตรหลวงปางดะ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัยและสถานที่พักสำหรับนักวิจัยในระหว่างการทำงานวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ดร. อัจฉรา ภาวศุทธิ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ให้คำแนะนำและช่วยประสานงานในระหว่างการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือและทำให้โครงการวิจัยนี้ประสบสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย
พฤศจิกายน 2558

Highland Research and Development Institute (Public Organization)

คณะผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

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

2. ชื่อนักวิจัยโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

2.1 ชื่อ-สกุล นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว
หน่วยงาน สถานีเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง
ที่อยู่ 192 หมู่ 10 ตำบล สะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ 50250

2.2 ชื่อ-สกุล นางสาวศิวาภรณ์ หยองเอ่น
หน่วยงาน มูลนิธิโครงการหลวง
ที่อยู่ 65 หมู่ 1 ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

2.3 ชื่อ-สกุล นายสาโรจน์ กลางกองสรรพ
หน่วยงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ที่อยู่ 14/1 ต.บางปรอก อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

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

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

1. บทนำ

เสาวรส (Passion fruit) เป็นไม้ผลประเภทไม้เลื้อย จัดอยู่ในพืชตระกูล Passifloraceae โดยเสาวรสที่นิยมปลูกทางการค้า ได้แก่ เสาวรสชนิดผลสีม่วง (*Passiflora edulis*) และชนิดผลสีเหลือง (*P. flavicarpa*) ในประเทศไทยเสาวรสหวานเบอร์ 2 เป็นเสาวรสชนิดผลสีม่วงที่ได้รับการคัดเลือกและส่งเสริมจากมูลนิธิโครงการหลวงเพื่อให้เป็นเสาวรสสำหรับรับประทานสด ลักษณะเด่นของเสาวรสหวานเบอร์ 2 ได้แก่ ผลมีขนาดใหญ่และให้ผลผลิตสูง มีรสชาติหวานและมีกลิ่นหอม อย่างไรก็ตามการปลูกเสาวรสหวานเบอร์ 2 ประสบปัญหาอย่างมากเนื่องจากการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อ Passion fruit woodiness virus (PWV) ในต้นกล้าเสาวรส ซึ่งโรคนี้เกิดความเสียหายโดยตรงต่อผลของเสาวรส จึงทำให้ผลผลิตและคุณภาพของเสาวรสลดต่ำลง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิควิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการใช้เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชจำนวนมากที่มีคุณลักษณะตรงตามต้นแม่พันธุ์ โดยทั่วไปแล้วต้นอ่อนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนราหรือแบคทีเรียในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปรากฏลักษณะเด่นชัด ดังนั้นจึงสามารถคัดแยกเพื่อกำจัดต้นอ่อนของพืชที่มีการติดโรคจากเชื้อราหรือแบคทีเรียออกได้ตั้งแต่ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นนั้น การปรากฏลักษณะที่บ่งบอกว่ามีการปนเปื้อนของไวรัสจึงสังเกตเห็นได้ยาก ส่วนใหญ่อาการของพืชที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏภายหลังจากที่นำพืชไปปลูก นอกจากนี้ไวรัสสามารถถ่ายทอดและทำให้ติดเชื้อได้อย่างง่ายดายในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นในการผลิตต้นกล้าปลอดไวรัส ต้นแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องเป็นพืชที่ปลอดไวรัสอย่างแท้จริง

การคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ที่ดีเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของการผลิตต้นพันธุ์พืชปลอดไวรัส ต้นแม่พันธุ์ในฐานะที่เป็นชิ้นเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องมีสุขภาพที่ดี มีความปลอดโรคและปลอดจากการติดเชื้อไวรัสอย่างแท้จริง ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยทำการคัดเลือกและรวบรวมยอดของเสาวรสหวานเบอร์ 2 ที่แข็งแรง และเฉพาะยอดของเสาวรสที่ปลอดไวรัสจะถูกใช้เป็นชิ้นเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการผลิตต้นพันธุ์เสาวรสหวาน เบอร์ 2 ที่ปลอดโรค ในขั้นตอนต่อไป

2. วัตถุประสงค์

โครงการย่อยที่ 2: การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรค ภายใต้โครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตเสาวรสหวานปลอดโรค เป็นโครงการวิจัยที่มีแผนการดำเนินการ 2 ปี โดยในปีที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตต้นแม่พันธุ์เสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรคไวรัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3. ผลการวิจัย

ในการลงพื้นที่เพื่อเก็บข้อมูลเบื้องต้นและกำหนดพื้นที่เก็บยอดเสาวรส โดยดำเนินการในแปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกรใน 8 พื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ได้แก่ (1) สถานีเกษตรหลวงปางดะ จังหวัดเชียงใหม่, (2) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แพะ จังหวัดเชียงใหม่, (3) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งหลวง จังหวัดเชียงใหม่, (4) สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด จังหวัดเชียงใหม่, (5) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่โถ จังหวัดเชียงใหม่, (6) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหมอกจ๋าม จังหวัดเชียงใหม่, (7) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงสะโง๊ะ จังหวัดเชียงราย และ (8) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน โดยผลจากการลงพื้นที่ พบว่า เสาวรสในแปลงปลูกส่วนใหญ่ปรากฏอาการของโรคจากไวรัส คือ มีอาการใบและผลด่าง ใบหงิกงอและใบผิดรูป เมื่อวิเคราะห์จากระดับการแสดงอาการของโรคไวรัสที่พบในแปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร พบว่า มีแปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร จำนวน 4 แห่ง ใน 4 พื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ที่มีแนวโน้มจะมีโอกาสพบยอดเสาวรสปลอดไวรัส คณะผู้วิจัยจึงกำหนดพื้นที่ดังกล่าว เป็นพื้นที่เป้าหมายในการเก็บและคัดเลือกยอด ได้แก่ (1) สถานีเกษตรหลวงปางดะ, (2) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งหลวง, (3) สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด และ (4) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงสะโง๊ะ

ในการลงพื้นที่เป้าหมายเพื่อคัดเลือกและเก็บยอดเสาวรสจากแปลงปลูกของเกษตรกร สามารถเก็บยอดเสาวรสได้ 720 ยอด โดยยอดที่เก็บมีความสมบูรณ์และไม่มีการปรากฏอาการของโรคจากไวรัส จากนั้นทำการต่อยอด (grafting) โดยใช้ยอดเสาวรสที่คัดเลือกเป็นยอดพันธุ์ดีต่อยอดบนต้นตอของเสาวรสชนิดผลสีเหลือง ผลจากการต่อยอด พบว่า ต้นเสาวรสที่ได้การเสียบยอดมากกว่าร้อยละ 90 แสดงอาการของโรคไวรัส ในระยะเวลา 2 เดือนหลังจากการต่อยอด เมื่อทำการส่งตัวอย่างยอดจากต้นเสาวรสที่ผ่านการเสียบยอดและไม่แสดงอาการของโรคจากไวรัสไปทำการตรวจเชื้อไวรัสโดยเทคนิค ELISA เพื่อยืนยันผลปลอดไวรัสของยอดเสาวรส พบว่า มี 9 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจยืนยันการปลอดจากไวรัส PWV

ในการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อยอดเสาวรสที่มีความสมบูรณ์ด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 7 วิธี พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 5 % โดยปริมาตร และ สารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 % โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่า (shaker) หรือเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ โดยวิธีการดังกล่าวมีค่าร้อยละของการปนเปื้อนต่ำและมีค่าร้อยละของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่สามารถเจริญไปเป็นต้นอ่อนสูงที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

4. สรุป

ต้นแม่พันธุ์ที่ปลอดไวรัสเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ความสำเร็จในการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรคด้วยวิธีการขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ จากผลการลงพื้นที่ ในแปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร 8 แห่ง ใน 8 พื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวง พบว่า ต้นเสาวรสส่วนใหญ่มีอาการของโรคจากไวรัส คือ มีอาการใบและผลด่าง ใบหงิกงอและใบผิดรูป โดยมีแปลงปลูกเสาวรส 4 แห่ง ใน 4 พื้นที่ ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ที่มีแนวโน้มจะมีโอกาสพบยอดเสาวรสปลอดไวรัส จากการคัดเลือกและ

เก็บรวบรวมสามารถเก็บยอดเสาวรสที่มีความสมบูรณ์และไม่มีการปรากฏอาการของโรคจากไวรัสได้จำนวน 720 ยอด และเมื่อนำยอดที่ได้มาทำการปลูกเลี้ยงโดยวิธีต่อยอด พบว่า ต้นเสาวรสที่ได้การเสียบยอดมากกว่าร้อยละ 90 แสดงอาการของโรคไวรัส ภายในระยะเวลา 2 เดือน โดยผลสุดท้ายของการทดลองมีจำนวนตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง ที่ได้รับการยืนยันว่าการปลอดจากไวรัส PWV โดยการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ในการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อยอดเสาวรสด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 5 % โดยปริมาตร และ สารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 % โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าสาร (shaker) หรือเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ โดยมีค่าร้อยละของการปนเปื้อนต่ำและมีค่าร้อยละของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่สามารถเจริญไปเป็นต้นอ่อนสูงที่สุด

5. ข้อเสนอแนะ

ในช่วงที่มีปัญหาการระบาดของโรคจากไวรัส การคัดเลือกและเก็บยอดเสาวรสที่ปลอดโรคเพื่อใช้เป็นต้นแม่พันธุ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นกล้าเสาวรสปลอดโรคทำได้ยากและได้จำนวนยอดของเสาวรสน้อย คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษาหาวิธีการในการผลิตต้นพืชปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดเพื่อเพิ่มจำนวนยอดใหม่และการชักนำยอดที่ได้ให้เกิดรากเพื่อให้ได้ต้นอ่อนของพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งสภาวะที่เหมาสมดังกล่าวจะทำให้ได้กระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตต้นพืชปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Executive Summary

1. Introduction

Passion fruit is a vine species of the Passifloraceae family. The popular commercial varieties of passion fruit are the purple-skinned *Passiflora edulis* and the yellow-skinned *P. flavicarpa*. In Thailand, the passion fruit species No.2, with purple-skinned, was selected and promoted by the Royal Project Foundation. The dominant characteristics of the passion fruit No.2 are of the large size, high productivity, sweet taste and rich of aroma. However, the passion fruit No.2 cultivation has major problems according to the "passion fruit woodiness virus (PWV)" disease caused by a species of potyvirus in seeding. The disease reduces the yield and the fruit quality.

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.

The selection of good mother plants is vital for virus-free seedling production. The mother plants, as initiated explants, must be healthy and completely free of diseases. In this study, the healthy shoots of passion fruit No.2 were selected and the only virus-free passion fruit shoots were used as initiated explants for *in vitro* propagation of virus-free passion fruit No.2 plants.

2. Objectives

The sub-project 2: "The study on the *in vitro* propagation of virus-free passion fruit No.2 plants" is under the project "Research and development of production of disease-free passion fruit plants". This sub-project is a two-year long project. Hence, for the first year, the objectives was to investigate the suitable method for the *in vitro* propagation of virus-free passion fruit No.2 plants.

3. Results and discussion

According to the preliminary information gathered from a survey, 8 farm areas in Research Stations of the Royal Project Foundation (RPF) were selected for passion fruit shoots collection including: (1) The Royal Agricultural Station Pang Da, Chiang Mai province, (2) Mae Pae The Royal Project Development Center, Chiang Mai province, (3) Thung Luang Royal Project Development Center, Chiang Mai province, (4) The Royal Agricultural Station Mae Lord, Chiang Mai province, (5) Mae Tho The Royal Project Development Center, Chiang Mai province, (6) Mok Cham Royal Project Development Center, Chiang Mai province, (7) Sa-Ngo Royal Project Development Center, Chiang Rai province and (8) Mae Sariang Royal Project Development Center, Mae Hong Son province. In this study, most passion fruit trees from the farms showed various symptoms of virus infections, including leaf and fruit mosaic, leaf curl and leaf abnormal formations. However, these information exhibits that 4 farms in 4 areas of RPF have an opportunity to obtain virus-free shoots. A further survey, these farms were anticipated as target areas for selection and collection of virus-free shoots of passion fruit including (1) The Royal Agricultural Station Pang Da, (2) Thung Luang Royal Project Development Center, (3) The Royal Agricultural Station Mae Lord and (4) Sa-Ngo Royal Project Development Center.

After selection, 720 healthy shoots and no virus infected shoots of passion fruit, as observed from appearance, were collected. The collected shoots were used as the **scion** grafted onto yellow passion fruits. As a result, more than 90 percent of passion fruit trees were found to be infected by viruses within 2 months after cultivation. However, 9 shoot samples were found as virus-free plants according to the passion fruit woodiness virus (PWV) detection by ELISA technique.

Moreover, in the study of surface sterilization, healthy shoots were sterilized by 7 methods. The results showed that the surface sterilization with 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 on a shaker or a sonicator for 10 minutes were the most effective procedures. Such methods exhibited low percent of contamination and also demonstrated the highest percent of survival after 3 weeks of cultivation.

4. Conclusions

The virus-free mother plant is a key factor in disease-free plant production using *in vitro* propagation method. Form the preliminary survey about passion fruit planting in 8 farms from different planting areas in Research Stations of the Royal Project Foundation (RPF), most passion fruit trees showed various symptoms of virus infection, including leaf and fruit mosaic, leaf curl and leaf abnormal formations. However, 4 farms in different areas of RPF were expected as target areas to obtain virus-free shoots. From the selection and collection of virus-free shoots of passion fruit, 720 healthy shoots were obtained and then cultivated by grafting method. We found that more than 90 percent of passion fruit trees were infected by viruses within 2 month after cultivation. However, 9 samples were identified as the virus-free plants by ELISA technique. Furthermore, in the surface sterilization, it was found that the sterilization with 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 on a shaker or a sonicator for 10 minutes were the effective procedures showing the low percent of contamination and the highest percent of explant forming shoots.

5. Suggestions

During the outbreak of the virus diseases, the selection and collection of healthy shoots of passion fruit as a disease-free plant is difficult and, thus, a small amount of virus-free plants will be obtained. The research team believes that the studies of the *in vitro* propagation of virus-free passion fruit No.2 plants, including investigation of the several effecting on the shoot induction and multiplication and root induction of the subcultured shoots in order to obtain complete plantlets. These suitable conditions will be the effective process for produce the disease-free plants

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คณะผู้วิจัย	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ค
Executive Summary	ฉ
สารบัญ	-1-
สารบัญตาราง	-2-
สารบัญภาพ	-3-
บทคัดย่อ	-6-
Abstract	-7-
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	15
บทที่ 5 วิจารณ์ผล	33
บทที่ 6 สรุปผล	35
ข้อเสนอแนะ	36
เอกสารอ้างอิง	37
ตารางสรุปเปรียบเทียบผลงานวิจัยกับแผนงานวิจัย	39

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

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ข้อมูลทั่วไปและระดับการแสดงอาการของโรคไวรัสที่พบในเสาวรสจากแปลงปลูกขอเกษตรกร 8 แห่ง	25
ตารางที่ 2	ผลการลงพื้นที่เพื่อคัดเลือกและเก็บยอดเสาวรสหวานเบอร์ 2 จากแปลงเกษตรกร	30
ตารางที่ 3	ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อส่วนยอดของเสาวรสที่มีต่อความสามารถในการเจริญเป็นต้นอ่อน โดยทำซ้ำวิธีการละ 30 ยอด	32

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

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	เสาวรส (ก) ดอกเสาวรสเบอร์ 2 และ (ข) ผลของเสาวรสเบอร์ 2 ปลูกโดยใช้ระบบค้างแบบผืน	4
ภาพที่ 2	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร สถานีเกษตรหลวงปางดะ (ก) และ (ข) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรสค้างแบบผืนที่ระบบเถาโปร่งทำให้ไม่มีโรคและแมลงสะสม (ค) ผลของเสาวรสในแปลงปลูกซึ่งผิวของเปลือกไม่มีรอยด่างหรืออาการของโรคไวรัส (ง) ลักษณะยอดเสาวรสที่ไม่มีอาการของโรคไวรัส	16
ภาพที่ 3	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แพะ (ก) และ (ข) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรสค้างแบบผืน (ค) ยอดเสาวรสที่แตกขึ้นมาใหม่หลังการตัดแต่งกิ่ง (ง) ลักษณะยอดและใบที่มีอาการด่างและบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง	17
ภาพที่ 4	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งหลวง (ก) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรสค้างแบบผืนค่อนข้างโปร่ง อากาศถ่ายเทได้สะดวก (ข) และ (ค) ผิวของผลเสาวรสมีความเนียน และมันวาว ส่วนของดอกไม่มีการบิดเบี้ยวหรือผิดรูปร่าง (ง) ลักษณะยอดเสาวรส มีความยาวของข้อปล้องที่สม่ำเสมอ	18
ภาพที่ 5	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่หลอด (ก) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรสค้างแบบผืน หลังจากตัดแต่งประมาณ 2 เดือน พบต้นที่ไม่มีอาการของโรคไวรัส ประมาณร้อยละ 50 ของต้นเสาวรสทั้งหมด (ข) ดอกเสาวรสที่มีความปกติ สมบูรณ์ทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย (ค) ผลเสาวรส ที่มีลักษณะผิวเรียบเนียนไม่มีร่องรอยของโรค (ง) ลักษณะยอดเสาวรสค่อนข้างอวบ ใบสมบูรณ์โดยเฉพาะส่วนจากปลายยอดไปประมาณ 7 เซนติเมตร	19
ภาพที่ 6	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่โถ (ก) และ (ข) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรสแบบรั้ว (ค) ลักษณะยอดเสาวรสที่มีอาการใบด่าง (ง) ใบของเสาวรสที่แสดงอาการใบด่าง	20

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 7	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหมอกจ๋าม (ก) และ (ข) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรส ค้างแบบผืน มีผลผลิตจำนวนมาก แต่ไม่สมบูรณ์นัก (ค) และ (ง) ลักษณะยอดเสาวรสที่แสดงอาการใบด่าง และบิดเบี้ยวผิดรูป	21
ภาพที่ 8	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงสะโง๊ะ (ก) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรสค้างแบบผืน (ข) ลักษณะผลเสาวรสที่แสดงอาการของโรคไวรัส (ค) และ (ง) ยอดเสาวรสที่แตกขึ้นมาใหม่ มีความสมบูรณ์และไม่มีอาการ	22
ภาพที่ 9	แปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะเรียง (ก) และ (ข) แสดงพื้นที่และแปลงปลูกเสาวรสค้างแบบรั้ว (ค) และ (ง) แสดงเถาและใบเสาวรสที่แสดงอาการบิดเบี้ยวผิดรูป	23
ภาพที่ 10	การคัดเลือกและเก็บยอดเสาวรส (ก) สภาพพื้นที่แปลงเสาวรส (ข) ต้นและยอดของเสาวรส, (ค) การคัดเลือกยอดเสาวรส โดยพิจารณาจากลักษณะปรากฏของยอดและใบของเสาวรส (ง) การเก็บยอดที่ผ่านการคัดเลือก โดยใช้กรรไกรตัดเก็บเฉพาะยอดที่ต้องการ	27
ภาพที่ 11	การเก็บยอดเสาวรสที่ผ่านการคัดเลือก (ก) ยอดเสาวรสที่ผ่านการคัดเลือก (ข) และ (ค) ยอดเสาวรสที่เก็บได้ ทำการชุบน้ำเพื่อป้องกันการเหี่ยว (ง) เก็บยอดในถุงพลาสติกหนึ่งยอดต่อหนึ่งถุง	28
ภาพที่ 12	การต่อยอดเสาวรส (grafting) (ก) นำยอดเสาวรสที่ผ่านการตัดแต่งให้เหลือแต่ส่วนยอด บรรจุยอดในถุงซิบล็อคโดยหนึ่งยอดต่อหนึ่งถุง (ข) ทำความสะอาดยอดเสาวรสในเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (ค) ในการต่อยอด ใช้ต้นเสาวรสปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเมล็ดทำหน้าที่เป็นต้นตอ (ง) ทำการต่อยอดและในระหว่างรอจนยอดติดให้คลุมต้นเสาวรสด้วยถุงพลาสติก ใช้เวลาประมาณ 7 – 10 วัน	29

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

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 12 (ต่อ)	(จ) หลังจากแกะถุงพลาสติกออก นำถุงตาข่ายครอบที่ต้นเสาวรสเพื่อป้องกันแมลง และทำการเลี้ยงต้นเสาวรสจนเกิดใบใหม่ และ (ฉ) เมื่อต้นกล้าเสาวรสมีการเจริญมากขึ้นทำการเปลี่ยนลงในถุงดำขนาด 4x8 นิ้ว เลี้ยงต้นเสาวรสจนเกิดใบใหม่	
ภาพที่ 13	ต้นเสาวรสที่ได้จากการต่อยอดซึ่งไม่แสดงอาการของโรคจากไวรัส โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (ก) ลักษณะต้น และ (ข) ยอดเสาวรส	30
ภาพที่ 14	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ยอดจากต้นเสาวรสที่ปลอดไวรัส	30
ภาพที่ 15	ลักษณะการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่พบในชิ้นส่วนยอดของเสาวรสที่ผ่านการฟอก (ก), (ค), (จ) เป็นภาพด้านข้างของขวดเพาะเลี้ยง (ข), (ง), (ฉ) เป็นภาพด้านล่างของขวดเพาะเลี้ยง	32

Highland Research and Development Institute (Public Organization)

บทคัดย่อ

การคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ที่ดีเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของการผลิตต้นพันธุ์พืชปลอดไวรัส ต้นแม่พันธุ์ในฐานะที่เป็นชิ้นเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องมีสุขภาพที่ดี และปลอดจากการติดเชื้อไวรัสอย่างแท้จริง ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตต้นแม่พันธุ์เสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรคไวรัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากผลการลงพื้นที่เพื่อเก็บข้อมูลเบื้องต้นในแปลงปลูกเสาวรสของเกษตรกร 8 แห่ง ใน 8 พื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวง พบว่า ต้นเสาวรสส่วนใหญ่มีอาการของโรคจากไวรัส คือ มีอาการใบและผลด่าง ใบหงิกงอและใบผิดรูป โดยมีแปลงปลูกเสาวรส 4 แห่ง ใน 4 พื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวง ที่มีแนวโน้มจะมีโอกาสพบยอดเสาวรสปลอดไวรัส จากการคัดเลือกและเก็บรวบรวมสามารถเก็บยอดเสาวรสที่มีความสมบูรณ์และไม่มีการปรากฏอาการของโรคจากไวรัสได้จำนวน 720 ยอด และเมื่อนำยอดที่ได้มาทำการปลูกเลี้ยงโดยวิธีต่อยอด พบว่า ต้นเสาวรสที่ได้การเสียบยอดมากกว่าร้อยละ 90 แสดงอาการของโรคไวรัส ภายในระยะเวลา 2 เดือน อย่างไรก็ตาม มีจำนวนตัวอย่าง 9 ตัวอย่างที่ได้รับการยืนยันว่าปลอดโรคไวรัส Passion fruit woodiness virus โดยการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ในการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อยอดเสาวรสด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 5 % โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 % โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าสาร (shaker) หรือเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ โดยมีค่าร้อยละของการปนเปื้อนต่ำและมีค่าร้อยละของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่สามารถเจริญไปเป็นต้นอ่อนสูงที่สุด

Abstract

The selection of the good mother plants is an essential component of virus-free seedling production. The mother plants as initiated explants for *in vitro* propagation must be healthy and completely virus-free. The objective of this study was to investigate the suitable method for the *in vitro* propagation of virus-free passion fruit No.2 plants.

From the preliminary survey about passion fruit planting in 8 farms from different planting areas in Research Stations of the Royal Project Foundation (RPF), most passion fruit trees showed various symptoms of virus infection, including leaf and fruit mosaic, leaf curl and leaf abnormal formations. However, 4 farms in different areas of RPF were expected as target areas to obtain virus-free shoots. From the selection and collection of virus-free shoots of passion fruit, 720 healthy shoots were obtained and then cultivated by grafting method. We found that more than 90 percent of passion fruit trees were infected by viruses within 2 month after cultivation. However, 9 samples were identified as the virus-free plants by ELISA technique. Furthermore, in the surface sterilization, it was found that the sterilization with 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 on a shaker or a sonicator for 10 minutes were the effective procedures showing the low percent of contamination and the highest percent of explant forming shoots.