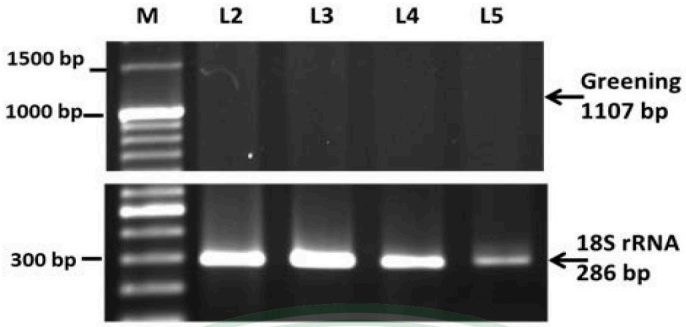
บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม

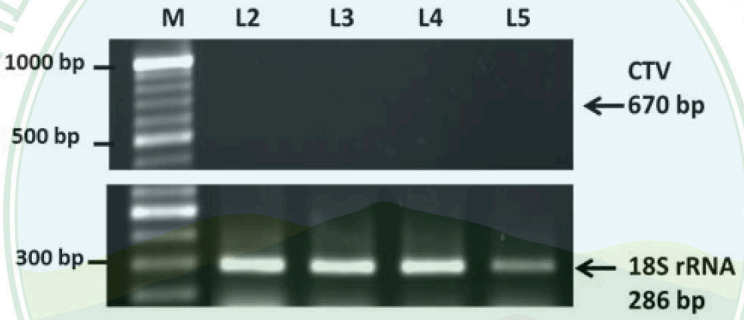
4.1.1 การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชเริ่มต้น

ในการตรวจสอบโรคในตัวอย่างพืชเริ่มต้น ได้ทำการเก็บยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทจากแปลงทดลองและโรงเรือนปลูกพืชของหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างใบมาทำการตรวจโรคกรีนนิ่ง โดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจโรคทริสเตซ่า โดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta *et al*., 1997

จากการตรวจโรคในตัวอย่างเลมอน พบว่า ตัวอย่างเลมอนที่เก็บมามีความปลอดโรค เนื่องจากไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า อธิบายผลการตรวจโรคในตัวอย่างเลมอนได้ตามภาพที่ 1 และ 2 โดยตัวอย่างเลมอนได้จากการเก็บยอดจากต้นเลมอน จำนวน 5 ต้น ให้รหัสเรียกต้นเลมอนจากหมายเลข L1 ถึง L5 โดยในระหว่างการตรวจโรค ตัวอย่างยอดเลมอนจากต้นที่ 1 เกิดความเสียหายในระหว่างการเก็บรักษา จึงทำการตรวจสอบโรคเฉพาะตัวอย่างยอดเลมอนจากต้นที่ 2 3 4 และ 5 โดยผลการตรวจโรคกรีนนิ่ง (ภาพที่ 4) พบว่า ตัวอย่างเลมอนทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่ปรากฏแถบ16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ที่มีขนาด 1,107 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างเลมอนที่ตรวจโรคทุกตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม ในส่วนของผลการตรวจโรคทริสเตซ่า ด้วยวิธี RT-PCR (ภาพที่ 5) พบว่า ตัวอย่างเลมอนทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างเลมอนเหล่านี้ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยตัวอย่างเลมอนที่มีความปลอดโรคทั้งโรคกรีนนิ่งในส้มและโรคทริสเตซ่าถูกใช้เป็นตัวอย่างเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค



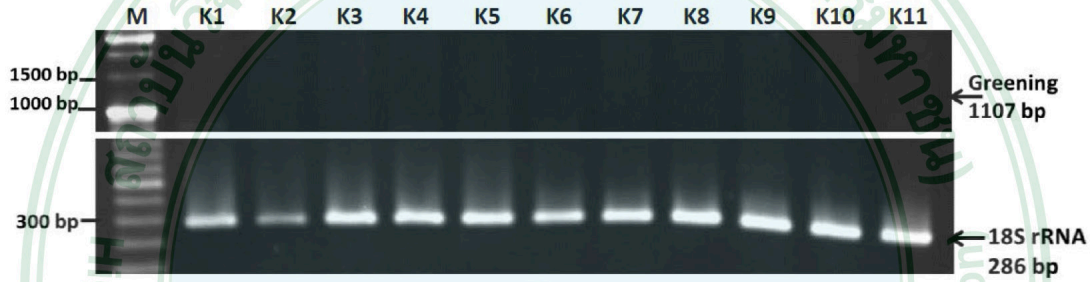
ภาพที่ 4 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในเลมอน โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



ภาพที่ 5 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในเลมอน โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

ในการตรวจสอบโรคในตัวอย่างคัมควัท พบว่า ตัวอย่างคัมควัทที่เก็บมามีทั้งตัวอย่างที่มีความปลอดโรค เนื่องจากไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า และตัวอย่างที่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มแต่พบการปนเปื้อนไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยตัวอย่างคัมควัทที่มีความปลอดโรคทั้งโรคกรีนนิ่งในส้มและโรคทริสเตซ่าถูกใช้เป็นตัวอย่างเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค ในส่วนของตัวอย่างคัมควัทที่ตรวจพบการปนเปื้อนไวรัส CTV ถูกใช้เป็นตัวอย่างเริ่มต้นในการศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิ (thermotherapy) และการบำบัดด้วยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส อธิบายผลการตรวจโรคในตัวอย่างคัมควัทได้ตามภาพที่ 6 และ 7 โดยตัวอย่างใบของคัมควัทได้จากการเก็บยอดคัมควัทจากต้น จำนวน 11 ต้น ให้รหัสเรียกต้นคัมควัทจากหมายเลข K1 ถึง K11 ผลการตรวจโรค

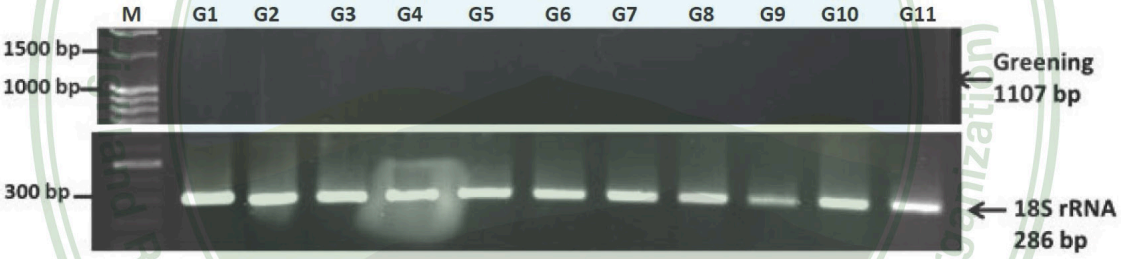
กรีนนิ่งในคัมควัท (ภาพที่ 6) พบว่า ตัวอย่างคัมควัททั้ง 11 ตัวอย่าง ไม่ปรากฏแถบ16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ที่มีขนาด 1,107 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างส้มคัมควัทที่ตรวจโรคทั้ง 11 ต้นไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม ในส่วนของผลการตรวจโรคทริสเตซ่า (ภาพที่ 7) พบว่า ตัวอย่างส้มคัมควัท K1 K2 K3 K5 และ K8 ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างส้มคัมควัทจากต้นที่ 1 ที่ 2 ที่ 3 ที่ 5 และที่ 8 ไม่พบการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ในขณะที่ตัวอย่างส้มคัมควัท K4 K6 K7 K9 K10 และ K11 ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างส้มคัมควัทจากต้นที่ 4 ที่ 6 ที่ 7 ที่ 9 ที่ 10 และที่ 11 มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า



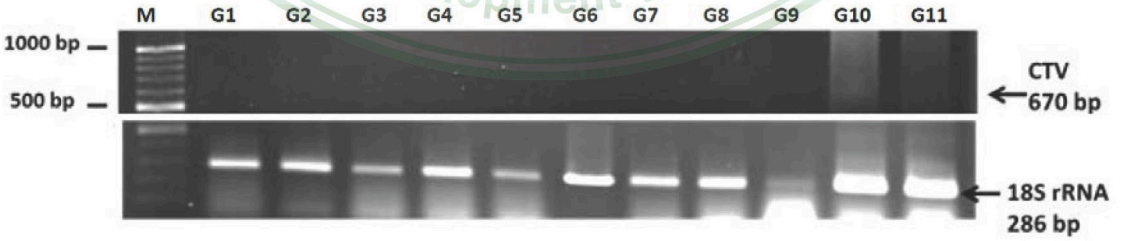
ภาพที่ 6 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในส้มคัมควัท โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

ภาพที่ 7 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้มคัมควัท โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

จากการตรวจโรคในตัวอย่างเกรพฟรุ้ท พบว่าตัวอย่างเกรพฟรุ้ทที่เก็บมามีความปลอดโรค เนื่องจากไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยอธิบายผลการตรวจโรคในตัวอย่างเกรพฟรุ้ทได้ตามภาพที่ 8 และ 9 โดยตัวอย่างเกรพฟรุ้ทได้จากการเก็บยอดจากต้นเกรพฟรุ้ทจำนวน 11 ต้น ให้รหัสเรียกต้นเกรพฟรุ้ทจากหมายเลข G1 ถึง G11 โดยในระหว่างการตรวจโรคโดยผลการตรวจโรคกรีนนิ่ง (ภาพที่ 8) พบว่า ตัวอย่างเกรพฟรุ้ททั้ง 11 ตัวอย่าง ไม่ปรากฏแถบ 16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ที่มีขนาด 1,107 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างเกรพฟรุ้ทที่ตรวจโรคทุกตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม ในส่วนของผลการตรวจโรคทริสเตซ่า ด้วยวิธี RT-PCR (ภาพที่ 9) พบว่า ตัวอย่างเกรพฟรุ้ททั้ง 11 ตัวอย่าง ไม่ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็นตัวอย่างเกรพฟรุ้ทเหล่านี้ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยตัวอย่างเกรพฟรุ้ทที่มีความปลอดโรคทั้งโรคกรีนนิ่งในส้มและโรคทริสเตซ่านี้ถูกใช้เป็นตัวอย่างเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค



ภาพที่ 8 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในส้มเกรพฟรุ้ท โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

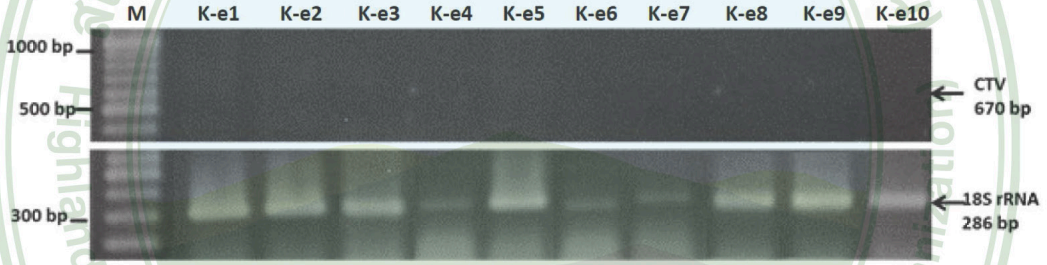


ภาพที่ 9 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้มเกรพฟรุ้ท โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีนขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

4.1.2 การตรวจสอบโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชเพาะเลี้ยงที่ผ่านการบำบัดด้วยอุณหภูมิ (thermotherapy) และการบำบัดด้วยสารเคมี (chemotherapy)

ในการศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิและการบำบัดด้วยสารเคมีต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส โดยทำการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta *et al*., 1997 ตัวอย่างคัมควัทที่ผ่านการบำบัดแล้วที่ทำการตรวจโรคได้จากการเก็บใบจากยอดของพืชที่เพาะเลี้ยง เนื่องจากยอดที่เพาะเลี้ยง มีขนาดเล็กจึงรวบรวมใบจากยอดพืชเพาะเลี้ยงทั้งหมด 2 ยอด ให้ถือเป็น 1 ตัวอย่างสำหรับทำการตรวจโรคทริสเตซ่า

ในภาพที่ 10 แสดงตัวอย่างของผลการตรวจโรคในยอดคัมควัทที่ผ่านการบำบัดแล้ว โดยทำการตรวจโรคใน 10 ตัวอย่าง (10 กรรมวิธี) ให้รหัสเรียก K-e1 ถึง K-e10 แทนตัวอย่างยอดคัมควัทที่ได้จากการบำบัดกรรมวิธีที่ 1 ถึง 10 โดยพบว่าตัวอย่างคัมควัททั้ง 10 ตัวอย่างไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส CTV แสดงว่า ตัวอย่างคัมควัททั้ง 10 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ปลอดโรคทริสเตซ่า



ภาพที่ 10 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในยอดคัมควัทที่ผ่านการบำบัด โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

4.1.3 การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชสำหรับการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค และในต้นกล้าส้มที่ผลิตได้

ในการตรวจโรคตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่ใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค ทำโดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*. (1994) และตรวจโรคทริสเตซ่า โดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta *et al*. (1997) ในตัวอย่างของต้นอ่อนเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งใช้เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และทำการตรวจโรคในตัวอย่างของต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เจริญมาจากการเพาะเมล็ด ซึ่งใช้เป็นต้นตอ (rootstock) ในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอด

โรค ผลการตรวจโรคแสดงในภาพที่ 11 - 18 โดยในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรคใช้เฉพาะยอดพันธุ์ดีและต้นตอที่ผ่านการตรวจโรคแล้วและระบุว่ามีความปลอดโรคเท่านั้น

ในการตรวจโรคต้นอ่อนเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่ใช้เป็นยอดพันธุ์ดีในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค ตัวอย่างพืชเพาะเลี้ยงที่ทำการตรวจโรคได้จากการเก็บใบจากยอดของพืชที่เพาะเลี้ยง เพื่อให้มีปริมาณตัวอย่างที่เพียงพอสำหรับทำการตรวจโรค จึงรวบรวมใบจากยอดพืชเพาะเลี้ยงทั้งหมด 2 ยอด ให้ถือเป็น 1 ตัวอย่างสำหรับทำการตรวจโรค

ผลการตรวจโรคยอดเลมอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแสดงในภาพที่ 11 และ 12 โดยทำการตรวจโรคใน 5 ตัวอย่าง ให้รหัสเรียกตัวอย่างยอดเลมอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากหมายเลข Mt-1 ถึง Mt-5 พบว่า ตัวอย่างเลมอนที่เพาะเลี้ยงมีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า

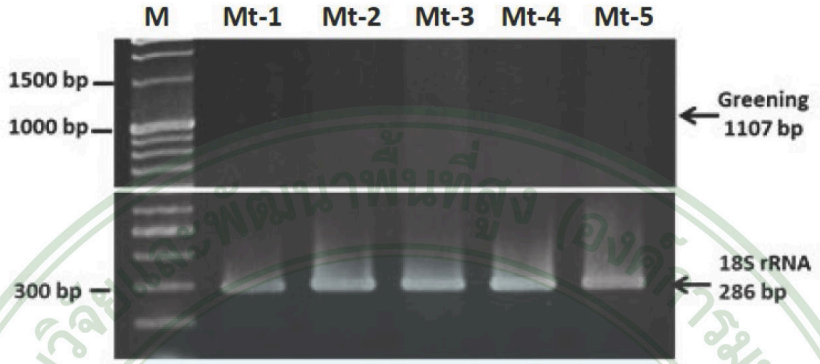
ผลการตรวจโรคยอดคัมควัทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแสดงในภาพที่ 13 และ 14 โดยทำการตรวจโรคใน 5 ตัวอย่าง ให้รหัสเรียกตัวอย่างยอดคัมควัทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากหมายเลข Kt-1 ถึง Kt-5 พบว่า ตัวอย่างคัมควัทที่เพาะเลี้ยงมีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า

ผลการตรวจโรคยอดเกรพฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแสดงในภาพที่ 15 และ 16 โดยทำการตรวจโรคใน 5 ตัวอย่าง ให้รหัสเรียกตัวอย่างเกรพฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากหมายเลข Gt-1 ถึง Gt-5 พบว่า ตัวอย่างเกรพฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงมีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีน นิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า

ผลการตรวจโรคในส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราซึ่งใช้เป็นต้นตอ (rootstock) ในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรคแสดงในภาพที่ 17 และ 18 โดยทำการตรวจโรคใน 5 ตัวอย่าง ให้รหัสเรียกตัวอย่างยอดส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เจริญมาจากการเพาะเมล็ดจากหมายเลข C1 ถึง C5 โดยพบว่า ตัวอย่างส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เจริญมาจากการเพาะเมล็ดมีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า

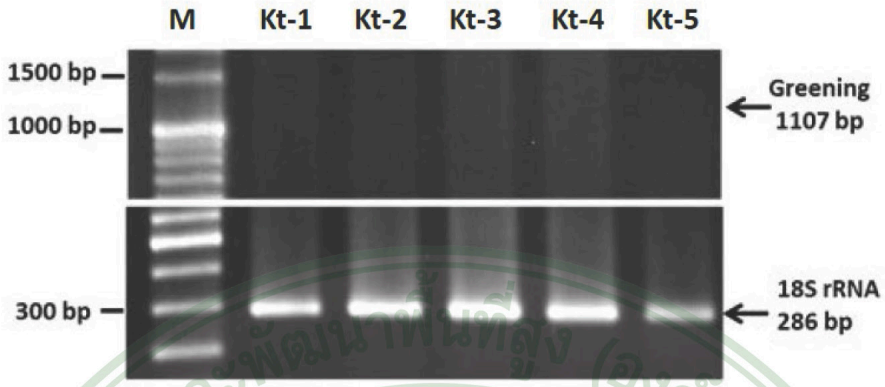
ในการตรวจโรคต้นกล้าแม่พันธุ์ของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผลิตได้นั้น ทำการสุ่มตัวอย่างจากต้นกล้าที่มีการเจริญดีและผ่านการอนุบาลในโรงเรือน โดยในแต่ละตัวอย่างสำหรับการตรวจโรคได้มาจากการเก็บตัวอย่างใบทั้งจากส่วนของยอดพันธุ์ดี (เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท) และตัวอย่างใบจากต้นตอในปริมาณเท่าๆกัน ผลการตรวจโรคต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรคที่ผลิตได้ แสดงในภาพที่ 19 และ 20 โดยให้รหัสเรียกตัวอย่างต้นแม่พันธุ์เลมอน จำนวน 4 ตัวอย่าง จากหมายเลข Lm1 ถึง Lm4 ตัวอย่างต้นแม่พันธุ์คัมควัท จำนวน 3 ตัวอย่าง จากหมายเลข Km1 ถึง Km3 และ ตัวอย่างต้นแม่พันธุ์เกรพฟรุ้ท จำนวน 3 ตัวอย่าง จากหมายเลข Gm1 ถึง Gm3 พบว่า ตัวอย่างต้นแม่พันธุ์เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผลิตได้

มีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า

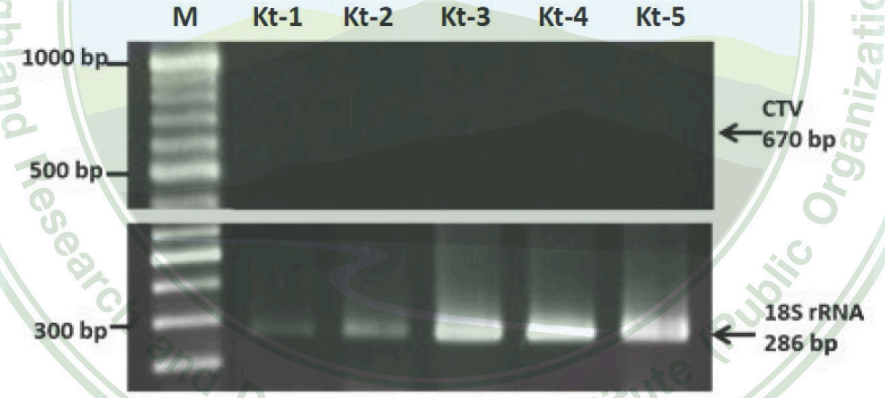


ภาพที่ 11 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในยอดเลมอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

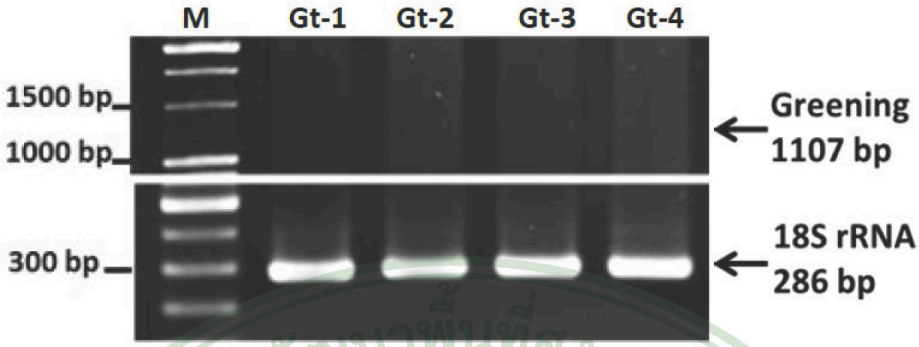
ภาพที่ 12 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในยอดเลมอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



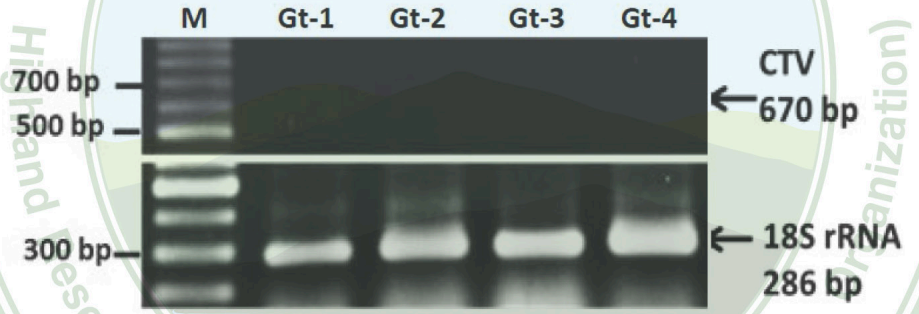
ภาพที่ 13 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในยอดคัมควัทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



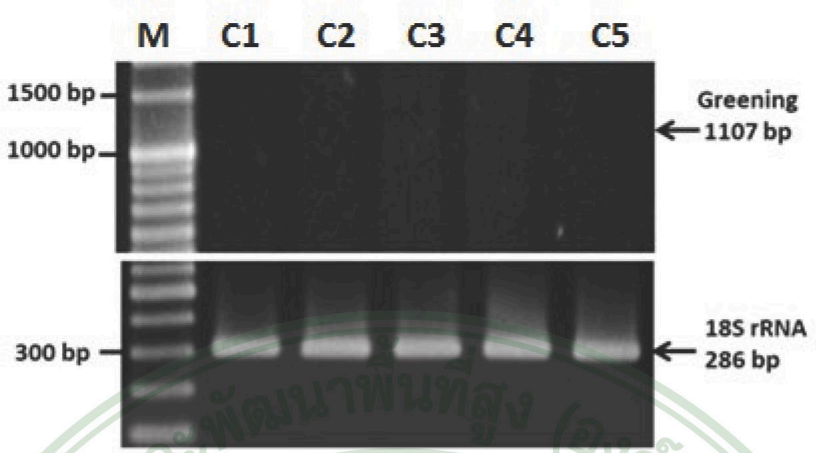
ภาพที่ 14 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในยอดคัมควัทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



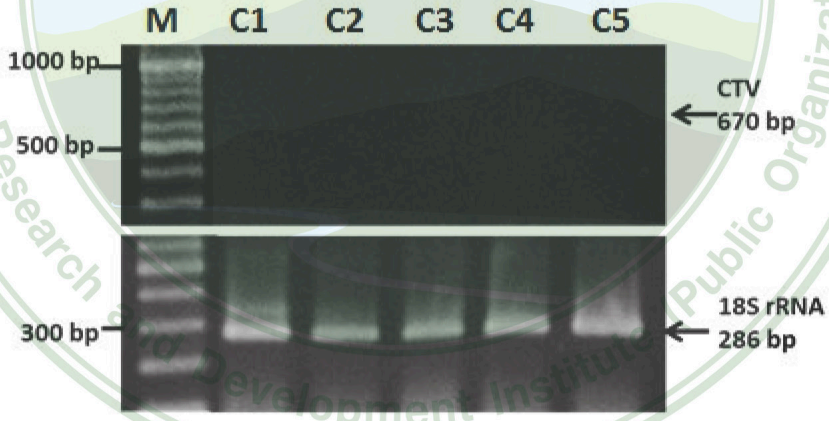
ภาพที่ 15 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในยอดเกรพฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



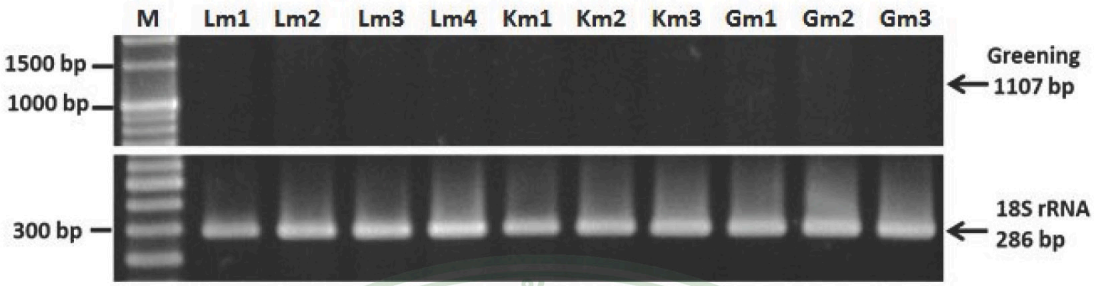
ภาพที่ 16 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในยอดเกรฟฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



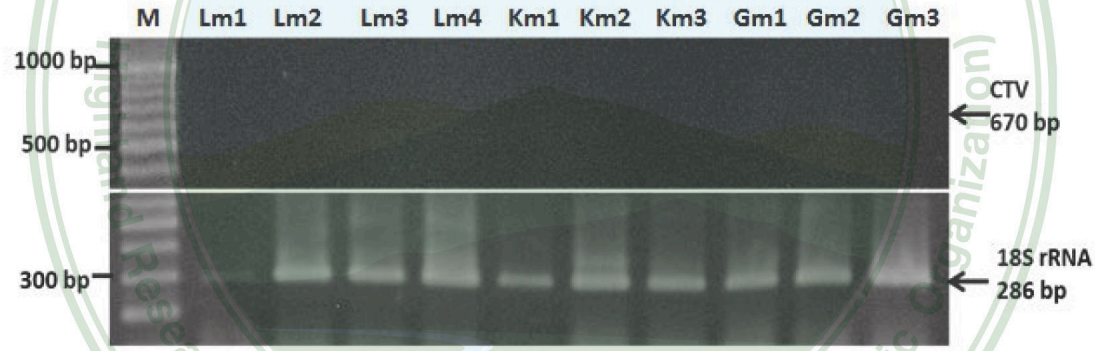
ภาพที่ 17 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในยอดส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เจริญมาจากการเพาะเมล็ด โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



ภาพที่ 18 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในยอดส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เจริญมาจากการเพาะเมล็ด โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



ภาพที่ 19 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในต้นกล้าเลมอน (Lm1 ถึง Lm4) คัมควัท (Km1 ถึง Km3) และเกรพฟรุ้ท (Gm1 ถึง Gm3) ที่ผลิตได้ โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



ภาพที่ 20 ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในต้นกล้าเลมอน (Lm1 ถึง Lm4) คัมควัท (Km1 ถึง Km3) และเกรพฟรุ้ท (Gm1 ถึง Gm3) ที่ผลิตได้ โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

4.2 การศึกษาและพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้ม

4.2.1 การชักนำให้ยอดอ่อนของพืชตระกูลส้มเกิดราก

ในการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดราก ทำการชักนำรากด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน คือ

วิธีการที่ 1 นำชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีความสูงประมาณ 2.5 - 3.0 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยอดของพืชตระกูลส้ม (อาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

วิธีการที่ 2 นำชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีความสูงประมาณ 2.5 - 3.0 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยอด ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรเดิมที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลการศึกษาพบว่า

1) ในการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการที่ 1 คือ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินและออกซิน พบว่ายอดส่วนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงมีการเกิดแคลลัส โดยในการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของเลมอน พบการเกิดแคลลัสขนาดใหญ่ และมีจำนวนยอดมากกว่าร้อยละ 40 ที่เกิดแคลลัส ซึ่งยอดที่เกิดแคลลัสจะเกิดอาการใบร่วง ยอดหัก และแห้งตายในที่สุด และยอดเลมอนเกือบทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินและออกซินไม่มีการเกิดราก (ตารางที่ 1 และภาพที่ 21)

ในกรณีการเพาะเลี้ยงยอดคัมควัท พบว่ามีการเกิดแคลลัสเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงยอดเลมอน โดยมีจำนวนยอดคัมควัทที่เกิดแคสลัสร้อยละ 50-70 ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กกว่าที่พบในเลมอน อย่างไรก็ตามยอดเกือบทั้งหมดที่เกิดแคลลัสเกิดอาการใบร่วง ยอดหัก และแห้งตายในที่สุด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 22)

ในการศึกษาการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการที่ 1 ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงในเกรพฟรุ้ท เนื่องจากผลจากการเพาะเลี้ยงเลมอนและคัมควัทไม่สามารถชักนำให้ยอดเกิดราก อีกทั้งเกิดแคลลัสและทำให้ยอดเสียหายและตาย

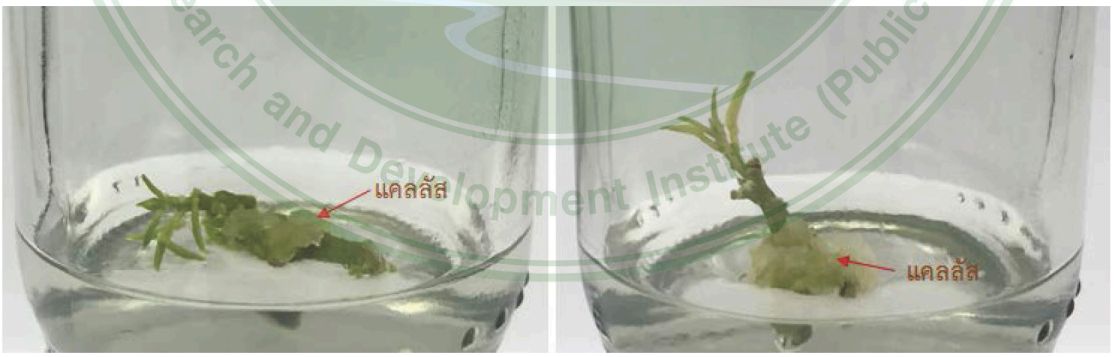
2) ในการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 พบว่า ในการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยอดของพืชตระกูลส้ม (อาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ความเข้มข้น 0.5–3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ยอดเลมอนเกิดรากได้จำนวนร้อยละ 60-80 และยอดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดไม่มีการเกิดแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าจำนวนยอดที่เกิดรากสูงที่สุด (ร้อยละ 80) แต่จากการสังเกต พบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ที่ 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีใบที่มีสีเหลือง โดยในชุดทดลองที่เติม IBA ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรมีแนวโน้ม

ของการเกิดใบเหลืองมากกว่าในชุดทดลองที่เติม IBA ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 23) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกชุดทดลองที่เติม IBA ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดของเลมอนเกิดราก

ตารางที่ 1 ผลของการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนเพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากด้วยวิธีการที่ 1 โดยการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิด BAP และกลุ่มออกซินชนิด IBA เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชื่อเรียกชุดทดลอง	ความเข้มข้นของสารควบคุม-การเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดราก *	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส*
	BAP	IBA		
Control	0	0	30	10
BAP[2]+IBA[0.5]	2	0.5	10	40
BAP[2]+IBA[1]	2	1	0	80
BAP[2]+IBA[2]	2	2	0	70
BAP[2]+IBA[3]	2	3	0	80

* ค่าร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)

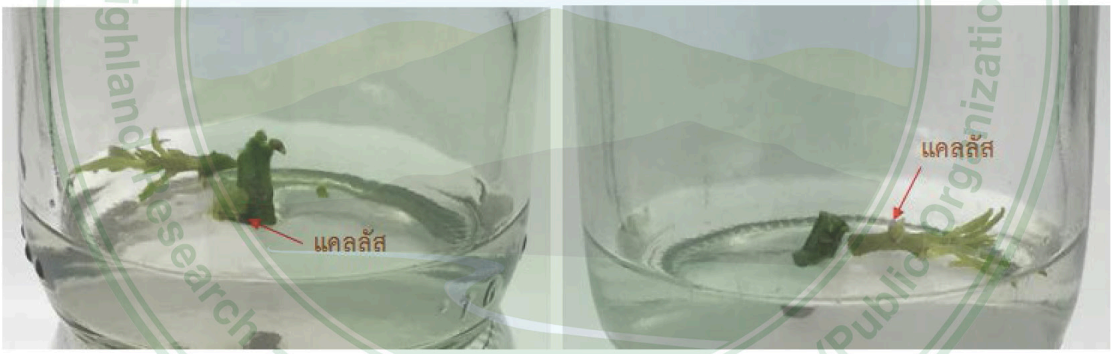


ภาพที่ 21 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิด BAP และกลุ่มออกซินชนิด IBA (วิธีการที่ 1) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 2 ผลของการเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทเพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากด้วยวิธีการที่ 1 โดยการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิด BAP และกลุ่มออกซินชนิด IBA เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชื่อเรียกชุดทดลอง	ความเข้มข้นของสารควบคุม-การเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)		ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดราก *	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส*
	BAP	IBA		
Control	0	0	20	20
BAP[2]+IBA[0.5]	2	0.5	0	50
BAP[2]+IBA[1]	2	1	0	70
BAP[2]+IBA[2]	2	2	0	60
BAP[2]+IBA[3]	2	3	0	60

* ค่าร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)



ภาพที่ 22 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิด BAP และกลุ่มออกซินชนิด IBA (วิธีการที่ 1) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ผลของการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนเพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 โดยการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชื่อเรียกชุดทดลอง	ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดราก *	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส*
Control	0	30	0
IBA[0.5]	0.5	60	0
IBA[1]	1	70	0
IBA[2]	2	70	0
IBA[3]	3	80	0

* ค่าร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)

ภาพที่ 23 ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้ยอดเลมอนเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ในกรณีของการชักนำให้ยอดคัมควัทเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ยอดคัมควัทเกิดรากได้จำนวน ร้อยละ 20-40 และยอดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดไม่มีการเกิดแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดรากสูงที่สุดที่ร้อยละ 40 (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 24)

ตารางที่ 4 ผลของการเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทเพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 โดยการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

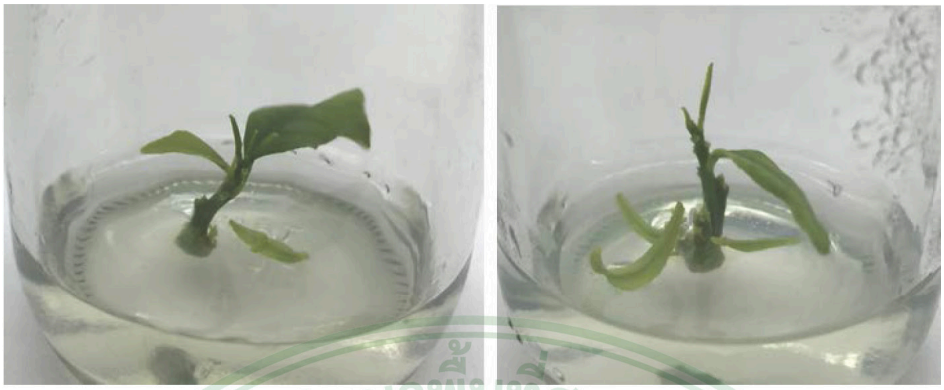
ชื่อเรียกชุดทดลอง	ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดราก *	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส*
Control	0	0	0
IBA[0.5]	0.5	0	0
IBA[1]	1	20	0
IBA[2]	2	40	0
IBA[3]	3	30	0

* ค่าร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)

ภาพที่ 24 ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้ยอดคัมควัทเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ในกรณีของเกรพฟรุ้ทเนื่องจากประสบปัญหาอัตราการเกิดยอดต่ำ โดยเนื้อเยื่อเริ่มต้นซึ่งมีขนาดเล็กมักมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส ในกรณีที่มีการเจริญของยอดจะมีการเจริญของยอดที่ช้า และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานมักพบปัญหาใบร่วง (ภาพที่ 25) โดยยอดเกรพฟรุ้ทที่เกิดอาการใบร่วงเหล่านี้ส่วนใหญ่มีการร่วงของใบทั้งหมดและยอดแห้งตายในที่สุด คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีขนาดใหญ่ (เนื้อเยื่อที่มีอายุมากขึ้น) โดยชิ้นส่วนพืชมีความยาว 3 - 5 เซนติเมตร ที่ประกอบด้วยข้อที่มีตาข้างจำนวน 2 - 4 ข้อ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มยังคงมีอัตราการปนเปื้อนสูงจุลินทรีย์สูง (ร้อยละ 70) อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนพืชที่เหลือที่ไม่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้เกือบทั้งหมด โดยยอดที่ได้มีการเจริญของยอดที่ดีและมีใบที่แข็งแรง และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเริ่มต้นขนาดเล็กที่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 12-16 สัปดาห์ ในภาพที่ 26 แสดงลักษณะของยอดเกรพฟรุ้ทที่ใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีขนาดใหญ่เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM^{TM} ที่ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ รวมเวลาเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ โดยในการศึกษาการชักนำให้ยอดอ่อนของพืชตระกูลส้มเกิดรากจะทำการตัดเนื้อเยื่อภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ โดยตัดเฉพาะส่วนยอดที่ปลอดเชื้อเพื่อใช้สำหรับเป็นยอดเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดราก

ในการชักนำให้ยอดเกรพฟรุ้ทเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไม่สามารถชักนำให้ยอดเกรพฟรุ้ทเกิดรากได้ ยอดเกรพฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญของใบ ใบมีขนาดใหญ่ แต่มีสีเขียวซีด อย่างไรก็ตามยอดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดไม่มีการเกิดแคลลัส (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 27)



ภาพที่ 25 ลักษณะการเกิดใบร่วงของยอดเกรพฟรุ้ทในระหว่างการเพาะเลี้ยง

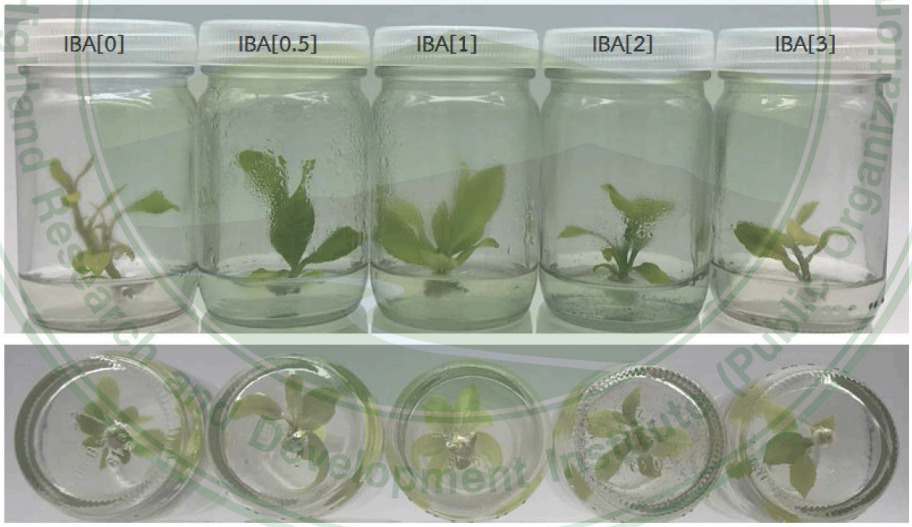
ภาพที่ 26 การเจริญของยอดเกรพฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

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

ตารางที่ 5 ผลของการเพาะเลี้ยงยอดเกรพฟรุ้ทเพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 โดยการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชื่อเรียกชุดทดลอง	ความเข้มข้นของ IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดราก *	ร้อยละของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส*
Control	0	0	0
IBA[0.5]	0.5	0	0
IBA[1]	1	0	0
IBA[2]	2	0	0
IBA[3]	3	0	0

* ค่าร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)



ภาพที่ 27 การเพาะเลี้ยงยอดเกรพฟรุ้ทเพื่อชักนำให้ยอดเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.2 การศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิ (thermotherapy) และการบำบัดด้วยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส

ในการศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิและการบำบัดด้วยสารเคมีต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส ใช้ตัวอย่างส้มคัมควัทจากต้นส้มรหัส 4 6 7 9 10 และ 11 ที่มีผลการตรวจโรคระบุว่าพบการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคทริสเตซ่าเป็นตัวอย่างเริ่มต้นในการศึกษา โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำเนื้อเยื่อคัมควัทมาทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับการบำบัดด้วยสารเคมีตามกรรมวิธีที่แตกต่างกัน ตามที่ระบุในวิธีการวิจัย เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการบำบัดแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษา (ตารางที่ 6 และภาพที่ 28) พบว่า

1) การบำบัดด้วยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับการบำบัดด้วยสารเคมี มีผลต่อจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้ภายหลังผ่านการบำบัด โดยในกรณีที่ไม่มีการบำบัด (กรรมวิธีที่ 1: T25) มีร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้มากกว่าในกรณีที่มีการบำบัด (กรรมวิธีที่ 2–10) โดยในกรณีที่ไม่มีการบำบัด มีจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโต ร้อยละ 90 ในขณะที่การบำบัดด้วยกรรมวิธีที่ 9: R25+T40 ที่ใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้น้อยที่สุด คือที่ร้อยละ 40
2) การบำบัดด้วยอุณหภูมิสูง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีที่ 3: T40) มีแนวโน้มของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าการบำบัดด้วยอุณหภูมิต่ำกว่า (กรรมวิธีที่ 1: T25 และ กรรมวิธีที่ 2: T35) โดยยอดที่ผ่านการบำบัดที่อุณหภูมิสูงมีการเจริญเติบโตช้ากว่ายอดในชุดอื่นๆ
3) การบำบัดด้วยอุณหภูมิร่วมกับการบำบัดด้วยสารเคมีโดยใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin พบว่าในกรณีการบำบัดที่ใช้อุณหภูมิเดียวกันร่วมกับการใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน เช่น การบำบัดด้วยกรรมวิธีที่ 4: R15+T25 การบำบัดด้วยการใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และการบำบัดด้วยกรรมวิธีที่ 7: R25+T25 การบำบัดที่ใช้ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เป็นต้น ในขณะที่การบำบัดด้วยสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน แต่ทำที่อุณหภูมิที่ต่างกัน พบว่า กรณีทำร่วมกับการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เช่น กรรมวิธีที่ 6: R15+T40 การบำบัดที่ใช้ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

มีจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าในกรณีที่ทำร่วมกับการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า (การบำบัดด้วยกรรมวิธีที่ 4: R15+T25 และ การบำบัดด้วยกรรมวิธีที่ 5: R15+T35) เป็นต้น โดยยอดที่ผ่านการบำบัดที่อุณหภูมิสูงมีแนวโน้มของการเจริญเติบโตช้ากว่ายอดในชุดอื่นๆ

4) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ ทำการตรวจโรคยอดที่ได้หลังผ่านการบำบัด โดยเก็บใบจากยอดของพืชที่เพาะเลี้ยง เนื่องจากยอดที่เพาะเลี้ยง มีขนาดเล็กจึงรวบรวมใบจากยอดพืชเพาะเลี้ยงทั้งหมด 2 ยอด ให้ถือเป็น 1 ตัวอย่างสำหรับทำการตรวจโรคทริสเตซ่า โดยพบว่า ตัวอย่างใบจากยอดของคัมควัทที่ผ่านการบำบัดทั้ง 10 ตัวอย่างไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส CTV แสดงว่า ตัวอย่างคัมควัททั้ง 10 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ปลอดโรคทริสเตซ่า (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 6 ผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิ (thermotherapy) และการบำบัดด้วยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส

กรรมวิธีที่	ชื่อเรียกชุดทดลอง	ร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโต *	การตรวจการปนเปื้อนของไวรัส CTV ของยอดเพาะเลี้ยง **
1	T25	90	ไม่พบการปนเปื้อน
2	T35	80	ไม่พบการปนเปื้อน
3	T40	50	ไม่พบการปนเปื้อน
4	R15+T25	80	ไม่พบการปนเปื้อน
5	R15+T35	70	ไม่พบการปนเปื้อน
6	R15+T40	50	ไม่พบการปนเปื้อน
7	R25+T25	80	ไม่พบการปนเปื้อน
8	R25+T35	70	ไม่พบการปนเปื้อน
9	R25+T40	40	ไม่พบการปนเปื้อน
10	R25*T35	50	ไม่พบการปนเปื้อน

* ร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโต โดยตรวจนับจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโต เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 สัปดาห์

** การตรวจการปนเปื้อนของไวรัส CTV ของยอดเพาะเลี้ยง โดยทำการสุ่มตัวอย่างยอดจากแต่ละกรรมวิธีเพื่อทำการตรวจสอบไวรัส CTV ด้วยวิธี RT-PCR และทำการตรวจโรคซ้ำกรรมวิธีละ 2 ครั้ง

ภาพที่ 28 การเพาะเลี้ยงยอดส้มคัมควัทที่ผ่านการบำบัดด้วยอุณหภูมิและสารเคมีด้วยกรรมวิธีต่างๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

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

4.3 การศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

ในการศึกษาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค ในส่วนของวิธีการต่อยอด จำนวน 2 วิธีการ มีรายละเอียด ดังนี้

วิธีการที่ 1 การต่อยอด (grafting) ทำโดยใช้ยอดคัมควัท เกรพฟรุ้ท และเลมอนที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราเป็นต้นตอ (rootstock)

วิธีการที่ 2 การต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ทำโดยใช้ยอดคัมควัท เกรพฟรุ้ท และเลมอนปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) โดยทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อน นำมาวางบนรอยแผลที่ตัดเตรียมไว้บนต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ที่ใช้เป็นต้นตอ (rootstock) โดยกระบวนการทั้งหมดดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.1 การเตรียมต้นตอส้มโดยการเพาะเมล็ดส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตรา

ในการเตรียมต้นตอที่ใช้สำหรับการศึกษาวิธีการที่ 1 การต่อยอด (grafting) ทำการเพาะเมล็ดส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตรา (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) ในวัสดุปลูก (ภาพที่ 29) จากการสุ่มตัวอย่างใบของส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราเพื่อตรวจโรค พบว่า ตัวอย่างส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เจริญมาจากการเพาะเมล็ดมีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า (ภาพที่ 17 และ 18)

ในการเตรียมต้นตอที่ใช้สำหรับการศึกษาวิธีการที่ 2 การต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดส้มแมนดาริน พันธุ์คลีโอพัตราในสภาพปลอดเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไซโตไคนิน ชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tallón *et al.*, 2012) และ KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงพบว่าเมล็ดส้ม 1 เมล็ดสามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้ 1-3 ยอด และร้อยละ 70 ของยอดอ่อนส้มคลีโอพัตรามีการเกิดรากได้เอง แต่รากที่ได้มักมี 1-2 ราก และมีขนาดเล็กเรียว ในภาพที่ 30 แสดงลักษณะต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ในกรณีต้องการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณยอดทำได้โดย ในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร DKW เมื่อมียอดใหม่เกิดขึ้น ให้แยกยอดที่เกิดขึ้นใหม่ออกจากยอดหลักแล้วจึงนำไปการเพาะเลี้ยงต่อ อย่างไรก็ตามยอดที่เกิดขึ้นใหม่เกือบทั้งหมดไม่มีการเกิดราก ดังนั้นจึงต้องมีการชักนำให้เกิดราก ทำโดยย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร DKW ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และออกซิน ชนิด IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 29 ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่ได้จากการเพาะเมล็ด สำหรับใช้เป็นต้นตอในการศึกษาวิธีการที่ 1 การต่อยอด (grafting)

ภาพที่ 30 ต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสำหรับใช้เป็นต้นตอในการศึกษาวิธีการที่ 2 การต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting)

4.3.2 การเตรียมยอดส้มปลอดโรค (เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท)

ในการเตรียมยอดส้มปลอดโรค โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยอดของพืชตระกูลส้ม (อาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ หลังเนื้อเยื่อส้มมีการเจริญของยอด โดยมีความยาวยอดประมาณ 1 เซนติเมตร จึงทำการย้ายยอดอ่อนที่เจริญแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงยอดของพืชตระกูลส้มที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากเนื้อเยื่อ

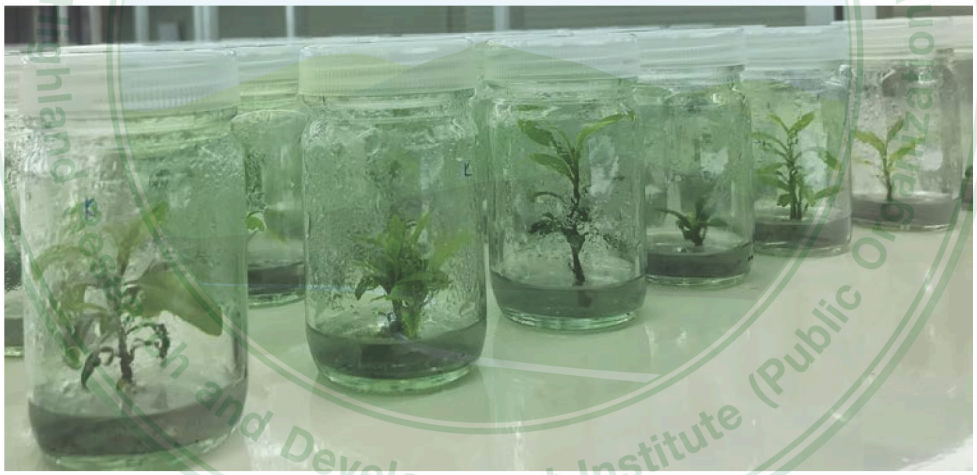
พืชตระกูลส้มที่เพาะเลี้ยง (เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท) มีการเจริญเติบโตที่ช้า จึงใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไประยะเวลาหนึ่งมักประสบปัญหาเกิดลักษณะที่ไม่พึงประสงค์อย่างหนึ่งอย่างใดหรือหลายอย่างร่วมกัน เช่น อาการใบพืชมีสีซีด ใบร่วง และอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้มีการเปลี่ยนสภาพเป็นของเหลว เป็นต้น โดยพบว่าเมื่อย้ายยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) 0.2-0.5 กรัมต่อลิตร ช่วยลดอาการใบร่วง และอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้มีการเปลี่ยนสภาพเป็นของเหลวได้

ทั้งหมดของยอดอ่อนของพืชตระกูลส้มที่ทำการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นยอดที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อตาข้างของชิ้นส่วนข้อไม่มีการเจริญของราก ซึ่งในกรณีที่ทำการเพาะเลี้ยงยอดเพื่อเป็นยอดพันธุ์ดี (scion) สำหรับการต่อยอด (grafting) และการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) การชักนำให้ยอดเกิดรากอาจไม่มีความจำเป็นมากนัก อย่างไรก็ตามจากการสังเกตพบว่า ยอดอ่อนที่มีรากจะเจริญเติบโตได้เร็วกว่า มีใบขนาดใหญ่และใบมีสีเขียวเมื่อเปรียบเทียบกับยอดอ่อนที่ไม่มีการเจริญของราก ในกรณีต้องการชักนำให้ยอดเลมอนและคัมควัทเกิดราก ทำโดยย้ายยอดที่มีความยาวยอดตั้งแต่ 3 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 - 8 สัปดาห์ เมื่อมีการเจริญของรากแล้วจึงย้ายต้นอ่อนมาเลี้ยง บนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) 0.2-0.5 กรัมต่อลิตร ในภาพที่ 31 - 33 แสดงการเพาะเลี้ยงยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคสำหรับใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

ในกรณีการเพาะเลี้ยงยอดเกรพฟรุ้ทได้ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีขนาดใหญ่ (เนื้อเยื่อที่มีอายุมากขึ้น) โดยชิ้นส่วนพืชมีความยาว 3-5 เซนติเมตร ที่ประกอบด้วยข้อที่มีตาข้างจำนวน 2-4 ข้อ โดยในภาพที่ 33 แสดงตัวอย่างของยอดเกรพฟรุ้ทที่ใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีขนาดใหญ่เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM^{TM} ที่ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM^{TM} ที่ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ รวมเวลาเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างต้นอ่อนเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาทำการตรวจโรค พบว่า ตัวอย่างเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงมีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า (ภาพที่ 11 - 16) ซึ่งต้นอ่อนเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงได้เหล่านี้ถูกใช้เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) สำหรับการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรคต่อไป

ภาพที่ 31 การเพาะเลี้ยงยอดเลมอนที่ปลอดโรคสำหรับใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค



ภาพที่ 32 การเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทที่ปลอดโรคสำหรับใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

ภาพที่ 33 การเพาะเลี้ยงยอดเกรฟฟรุ้ทที่ปลอดโรคสำหรับใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

4.3.3 การผลิตต้นแม่พันธุ์ปลอดโรคของพืชตระกูลส้มโดยการต่อยอด (grafting) และการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting)

ศึกษาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค ในส่วนของวิธีการต่อยอด จำนวน 2 วิธีการ ได้แก่

วิธีการที่ 1 การต่อยอด (grafting) ทำโดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 31 32 และ 33) เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตรา (ภาพที่ 29) เป็นต้นตอ (rootstock) รายละเอียดวิธีการแสดงในภาพที่ 1

วิธีการที่ 2 การต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ทำโดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 31 32 และ 33) เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (ภาพที่ 30) เป็นต้นตอ (rootstock) โดยทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อนนำมาวางบนรอยแผลที่ตัดเตรียมไว้บนต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตรา โดยกระบวนการทั้งหมดดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อ รายละเอียดวิธีการ แสดงในภาพที่ 2 และ 3

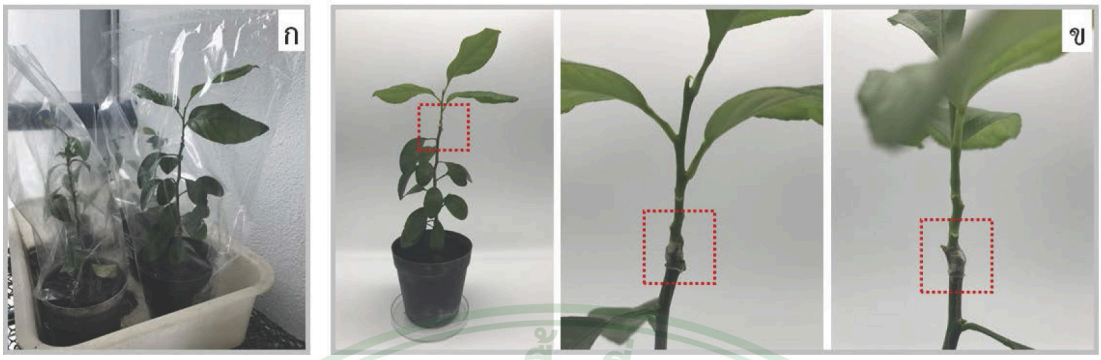
ในการต่อยอดส้มโดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดีบนต้นตอส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตรา พบว่า มีอัตราของจำนวนต้นตอที่เสียบต่อจำนวนต้นตอที่ต่อสำเร็จ หลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เท่ากับ 15 ต่อ 12 10 ต่อ 7 และ 5 ต่อ 2 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของการต่อสำเร็จ เท่ากับ ร้อยละ 80 ร้อยละ 70 และร้อยละ 40 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยลักษณะปรากฏของการต่อยอดที่ไม่สำเร็จคือ ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ใช้เป็นยอดพันธุ์ดีมีลักษณะใบเหี่ยว แห้ง และตายในที่สุด ในภาพที่ 34 แสดงตัวอย่างต้นแม่พันธุ์เลมอนปลอดโรคซึ่งได้จากการต่อยอด (grafting) โดยใช้ยอดเลมอนที่ปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และต้นส้ม

แมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราจากการเพาะเมล็ดเป็นต้นตอ (rootstock) โดยส่วนยอดเลมอนมีการเจริญที่ดีและรวดเร็ว และมีใบสีเขียว ขนาดใหญ่

ในการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) โดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท เกรพฟรุ้ท ที่ปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นต้นตอ (rootstock) พบว่ามีอัตราของจำนวนต้นตอที่เสียบต่อจำนวนต้นตอที่ต่อสำเร็จ หลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เท่ากับ 10 ต่อ 7 13 ต่อ 10 และ 7 ต่อ 3 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของการต่อสำเร็จเท่ากับ ร้อยละ 70 ร้อยละ 76.92 และร้อยละ 42.86 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยลักษณะปรากฏของการต่อยอดที่ไม่สำเร็จคือ ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ใช้เป็นยอดพันธุ์ดีมีลักษณะใบเหี่ยว และใบร่วงหลุดจากยอด โดยในส่วนของต้นตอยังคงมีชีวิตตามปกติ ในภาพที่ 35 36 และ 37 แสดงตัวอย่างต้นแม่พันธุ์ปลอดโรค ภายหลังจากการต่อยอดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) และเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ในกรณีของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท ตามลำดับ

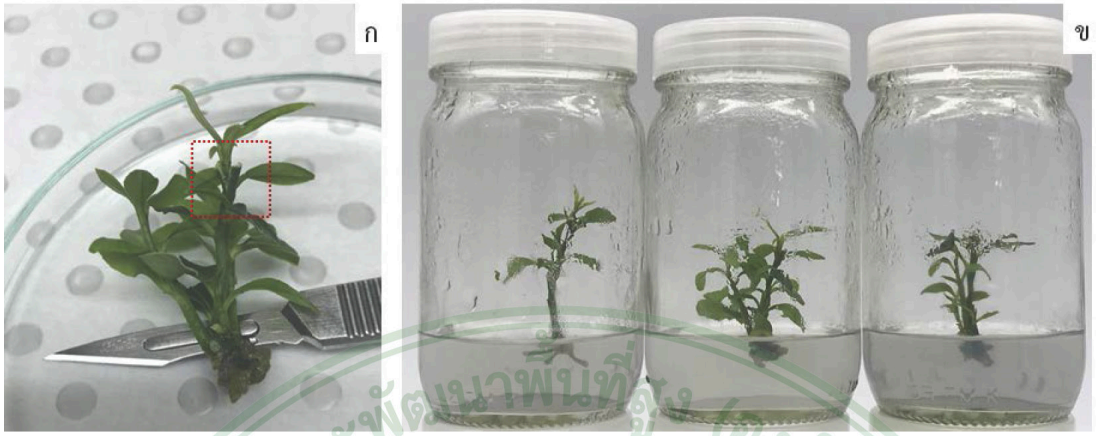
ตารางที่ 7 ผลความสำเร็จในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มโดยการต่อยอด (grafting) และการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting)

ชนิดส้ม	การต่อยอด (grafting)			การต่อยอดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting)		
	จำนวนต้นทั้งหมด	จำนวนต้นที่ต่อสำเร็จ	เปอร์เซ็นต์ต่อสำเร็จ(%)	จำนวนต้นทั้งหมด	จำนวนต้นที่ต่อสำเร็จ	เปอร์เซ็นต์ต่อสำเร็จ (%)
เลมอน	15	12	80.0	10	7	70.0
คัมควัท	10	7	70.0	13	10	76.9
เกรพฟรุ้ท	5	2	40.0	7	3	42.9

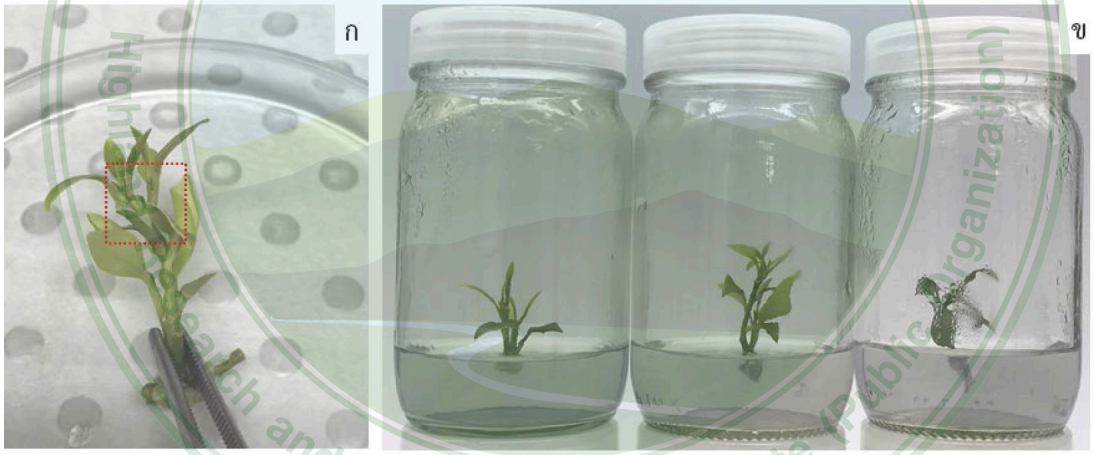


ภาพที่ 34 ตัวอย่างต้นแม่พันธุ์เลมอนปลอดโรค ที่ได้จากการต่อยอด (grafting) โดยใช้ยอดเลมอนที่ปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราจากการเพาะเมล็ดเป็นต้นตอ (rootstock)

ภาพที่ 35 ตัวอย่างต้นแม่พันธุ์เลมอนปลอดโรค ภายหลังจากการต่อยอดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) และเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) บริเวณที่ทำการต่อยอด และ (ข) ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพที่ 36 ตัวอย่างต้นแม่พันธุ์คัมควัทปลอดโรค ภายหลังจากการต่อยอดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) และเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) บริเวณที่ทำการต่อยอด และ (ข) ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพที่ 37 ตัวอย่างต้นแม่พันธุ์เกรพฟรุ้ทปลอดโรค ภายหลังจากการต่อยอดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) และเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) บริเวณที่ทำการต่อยอด และ (ข) ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

4.3.4 การผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค

ทำการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท โดยวิธีการต่อยอด (grafting) และ การต่อยอดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ตามวิธีการในภาพที่ 1-3 โดยกรณีต้นกล้าแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคที่ได้จากการต่อยอด (grafting) ทำการปลูกเลี้ยงในวัสดุปลูกและอนุบาลในโรงเรือนจนกระทั่งมีความแข็งแรงดีจากนั้นจึงนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ในกรณีต้นอ่อนที่ได้จากการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ทำการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจนกระทั่งมีการเจริญและมีความสมบูรณ์ของต้นอ่อนที่เหมาะสม โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 8-12 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้มาล้างอาหารวุ้นออก นำต้นอ่อนที่ได้ลงปลูกในวัสดุปลูกและอนุบาลในโรงเรือนจนกระทั่งมีความแข็งแรงดีจากนั้นจึงนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ในการตรวจโรคต้นกล้าเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผลิตได้ทำการสุ่มตัวอย่างจากต้นกล้าที่มีการเจริญที่ดีและทำการอนุบาลในโรงเรือน โดยในแต่ละตัวอย่างสำหรับการตรวจโรคได้มาจากการเก็บตัวอย่างใบทั้งจากส่วนของยอดพันธุ์ดี (เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท) และตัวอย่างใบจากส่วนของต้นตอในปริมาณเท่าๆกัน ผลการตรวจโรคพบว่า ตัวอย่างต้นกล้าเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผลิตได้มีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า แสดงผลการตรวจโรคในภาพที่ 19 และ 20 จึงทำการส่งมอบต้นกล้าของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคและมีการเจริญเติบโตที่ดี ให้แก่ สวพส. จำนวนชนิดละ 15 ต้น เพื่อใช้เป็นต้นแม่พันธุ์สำหรับงานส่งเสริมต่อไป

ภาพที่ 38 ตัวอย่างต้นกล้าเลมอนปลอดโรคที่มีการเจริญดีและทำการอนุบาลในโรงเรือน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม

ในการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชตระกูลส้มทำโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างใบของส้มแต่ละชนิดมาทำการตรวจโรคกรีนนิ่ง โดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*. (1994) และตรวจโรคทริสเตซ่า โดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*. (1997) โดยการตรวจสอบโรคตามวิธีดังกล่าวสามารถคัดเลือกต้นส้มที่ไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง และไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยต้นส้มเหล่านี้จะใช้เป็นแหล่งต้นพันธุ์ในการเก็บยอดเพื่อเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป อย่างไรก็ตาม มีต้นส้มคัมควัทจำนวนหนึ่งที่ตรวจพบการปนเปื้อนไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยต้นส้มคัมควัทจะถูกใช้เป็นแหล่งต้นพันธุ์ในการเก็บยอดเพื่อเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น สำหรับการศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิ (thermotherapy) และการบำบัดด้วยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส

ในการตรวจโรคยอดของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท ที่ได้การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ตัวอย่างพืชที่ทำการตรวจโรคได้จากการเก็บใบจากยอดของพืชที่เพาะเลี้ยง เนื่องจากยอดของพืชที่เพาะเลี้ยงมีขนาดเล็ก เพื่อให้มีปริมาณตัวอย่างที่เพียงพอสำหรับทำการตรวจโรค จึงรวบรวมใบจากยอดพืชเพาะเลี้ยงมากกว่า 1 ยอด โดยถือเป็น 1 ตัวอย่างสำหรับทำการตรวจโรค

5.2 การศึกษาและพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้ม

5.2.1 การชักนำให้ยอดอ่อนของพืชตระกูลส้มเกิดราก

ในการศึกษาและพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้มได้ทำการศึกษาวิธีการในการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากจำนวน 2 วิธี คือ วิธีการที่ 1 โดยนำยอดที่มีความสูงประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเพื่อการเพาะเลี้ยงยอด (อาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเดิมที่เสริมด้วยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และวิธีการที่ 2 โดยนำยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเพื่อการเพาะเลี้ยงยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (อาหารสูตร ½ LS + Su30) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลของการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการที่ 1 โดยทำการศึกษาในคัมควัทและเลมอน พบว่า ยอดเลมอนมากกว่าร้อยละ 40 และยอดคัมควัทมากกว่าร้อยละ 50

ที่เพาะเลี้ยงมีการเกิดแคลลัส โดยยอดที่เกิดแคลลัสเหล่านี้จะมีการร่วงของใบ มีการหักของยอด และสุดท้ายยอดจะแห้งมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด ในส่วนของยอดที่เหลือเกือบทั้งหมดไม่มีการเกิดราก ในขณะที่การชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 พบว่า สามารถชักนำให้ยอดของเลมอนและคัมควัทที่เพาะเลี้ยงเกิดรากได้ ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดแคลลัส โดยในการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดเกิดราก โดยมีจำนวนยอดที่เกิดรากร้อยละ 70 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้ยอดเกิดรากได้สูงสุด โดยมีจำนวนยอดที่เกิดรากร้อยละ 40 ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้ยอดเกรพฟรุ้ทเกิดราก พบว่า ในการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติม IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่สามารถชักนำให้ยอดเกรพฟรุ้ทเกิดรากได้ ยอดเกรพฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญของใบใบมีขนาดใหญ่ แต่มีสีเขียวซีด อย่างไรก็ตามยอดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดไม่มีการเกิดแคลลัส

5.2.2 การศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิ (thermotherapy) และการบำบัดด้วยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส

ในการศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิและการบำบัดด้วยสารเคมีต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส ใช้ตัวอย่างส้มคัมควัทจากต้นส้มที่มีผลการตรวจโรคระบุว่าพบการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคทริสเตซ่าเป็นตัวอย่างเริ่มต้นในการศึกษา จากผลการศึกษา พบว่าการบำบัดด้วยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับการบำบัดด้วยสารเคมีมีผลต่อจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้ภายหลังผ่านการบำบัด การบำบัดด้วยอุณหภูมิสูงเพียงอย่างเดียว (อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) และการบำบัดด้วยอุณหภูมิสูงร่วมกับการบำบัดด้วยสารเคมี มีแนวโน้มของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าการบำบัดด้วยอุณหภูมิต่ำกว่า โดยยอดที่ผ่านการบำบัดที่อุณหภูมิสูงมีการเจริญเติบโตช้ากว่ายอดในชุดอื่นๆ การบำบัดด้วยอุณหภูมิร่วมกับการบำบัดด้วยสารเคมีโดยใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ในกรณีการบำบัดที่ใช้อุณหภูมิเดียวกันร่วมกับการใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ในขณะที่การบำบัดที่ใช้อุณหภูมิสูงร่วมกับการใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้นที่เท่ากัน มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่ากรณีใช้อุณหภูมิต่ำกว่า แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงมีผลอย่างชัดเจนต่อการเจริญเติบโตของยอดเพาะเลี้ยง

ในส่วนของการตรวจโรค โดยนำใบจากยอดที่ผ่านการบำบัดทั้ง 10 กรรมวิธี และทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 7 สัปดาห์ มาทำการตรวจหาการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคทริสเตซ่า พบว่า ตัวอย่างใบจากยอดของคัมควัทที่ผ่านการบำบัดทั้ง 10 ตัวอย่าง (10 กรรมวิธี) ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส CTV อย่างไรก็ตามในกรณีนี้ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนถึงผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิและการบำบัดด้วยสารเคมี ที่มีต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส เนื่องจากยอดคัมควัทที่ได้กรรมวิธีที่ 1 คือ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีผลตรวจโรค ระบุว่าไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส CTV เช่นเดียวกับยอดที่

ผ่านการบำบัดด้วยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับการบำบัดด้วยสารเคมี (กรรมวิธีที่ 2-10) ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจาก แม้ว่ายอดคัมควัทที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาถูกระบุว่าพบการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคทริสเตซ่า แต่การปนเปื้อนของไวรัสเป็นลักษณะแฝงหรือมีความรุนแรงไม่มาก สังเกตได้จากต้นคัมควัทที่ใช้เป็นแหล่งของยอดในการศึกษา โดยต้นคัมควัทเหล่านี้ไม่มีอาการของโรคปรากฏให้เห็นอย่างเด่นชัด ต้นคัมควัทยังคงมีการเจริญเติบโต และในขั้นตอนการทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อเพื่อทำให้เนื้อเยื่อปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน่าจะมีผลต่อการลดการปนเปื้อนของไวรัส CTV ได้ เนื่องจากมีการใช้สารละลายแอลกอฮอล์ สารละลายคลอรอกซ์ และสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิด PPM™

5.2.3 การศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

ในการศึกษาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค ในส่วนของวิธีการต่อยอด ได้แก่ วิธีการที่ 1 การต่อยอด (grafting) ทำโดยใช้ยอดคัมควัท เกรพฟรุ้ท และเลมอนที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่ปลอดโรคเป็นต้นตอ (rootstock) โดยสรุปรายละเอียดวิธีการดังแสดงในภาพที่ 1 และวิธีการที่ 2 การต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ทำโดยใช้ยอดเลมอน คัมควัทและ เกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) โดยทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดอ่อน นำมาวางบนรอยแผลที่ตัดเตรียมไว้บนต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่ใช้เป็นต้นตอ (rootstock) โดยกระบวนการทั้งหมดดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อ โดยสรุปรายละเอียดวิธีการดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3

ในการต่อยอดส้ม (grafting) โดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดีบนต้นตอส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตรา มีค่าร้อยละของการต่อสำเร็จ หลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เท่ากับ ร้อยละ 80 ร้อยละ 70 และร้อยละ 40 ตามลำดับ โดยลักษณะปรากฏของการต่อยอดที่ไม่สำเร็จคือ ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ใช้เป็นยอดพันธุ์ดีมีลักษณะใบเหี่ยว แห้ง และตายในที่สุด ในส่วนของการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) โดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นต้นตอ (rootstock) มีค่าร้อยละของการต่อสำเร็จ หลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เท่ากับ ร้อยละ 70 ร้อยละ 76.92 และร้อยละ 42.86 ตามลำดับ โดยลักษณะปรากฏของการต่อยอดที่ไม่สำเร็จคือ ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ใช้เป็นยอดพันธุ์ดีมีลักษณะใบเหี่ยวและใบร่วงหลุดจากยอด โดยในส่วนของต้นตอยังคงมีชีวิตตามปกติ

5.2.4 การผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค

ในการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท โดยวิธีการต่อยอด (grafting) และ การต่อยอดในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) โดยมีวิธีการในภาพที่ 1 - 3 ในกรณีต้นกล้าแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคที่ได้จากการต่อยอด (grafting) ทำการปลูกเลี้ยงในวัสดุปลูกและอนุบาลในโรงเรือนจนกระทั่งมีความแข็งแรงดีจากนั้นจึงนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ และในกรณีต้นอ่อนที่ได้จากการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ทำการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจนกระทั่งมีการเจริญและมีความสมบูรณ์ของต้นอ่อนที่เหมาะสม โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 8 - 12 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้มาล้างอาหารวุ้นออก นำต้นอ่อนที่ได้ลงปลูกในวัสดุปลูกและอนุบาลในโรงเรือนจนกระทั่งมีความแข็งแรงดีจากนั้นจึงนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

จากการตรวจโรคต้นกล้าเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผลิตได้โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากต้นกล้าที่มีการเจริญดีและที่ทำการอนุบาลในโรงเรือนพบว่า ตัวอย่างต้นกล้าเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ผลิตได้มีความปลอดโรค โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้มและไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า แสดงผลการตรวจโรคในภาพที่ 19 และ 20 โดยต้นกล้าเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคและมีการเจริญเติบโตที่ดีส่งมอบให้แก่ สวพส. จำนวนชนิดละ 15 ต้น เพื่อใช้เป็นต้นแม่พันธุ์สำหรับงานส่งเสริมต่อไป

Highland Research and Development Institute (Public Organization)