บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เสาวรส (Passion fruit) จัดเป็นพืชในตระกูล Passifloraceae เป็นไม้ผลประเภทไม้เลื้อย ในอดีต เรียกชื่อว่า กระทกรกฝรั่ง และต่อมาเปลี่ยนเป็นเรียกว่า เสาวรส เพื่อผลประโยชน์ทางการค้าจนรู้จักอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน (ณรงค์ชัย, 2550) ในปี พ.ศ. 2539 มูลนิธิโครงการหลวงประสบความสำเร็จในการคัดเลือกเสาวรสที่มีลักษณะเหมาะสำหรับรับประทานสด คือ รสชาติค่อนข้างหวาน ผลมีขนาดใหญ่ และให้ผลผลิตสูง โดยคัดเลือกจากต้นเพาะเมล็ดที่ได้จากสายพันธุ์ของสาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) โดยงานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง ได้เริ่มนำออกส่งเสริมให้แก่เกษตรกรปลูกและใช้ชื่อเรียกว่า เสาวรสหวาน เสาวรสหวานที่มูลนิธิโครงการหลวงคัดเลือกมี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์เบอร์ 1 และเบอร์ 2 ผลมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ผิวของผลเป็นสีม่วงเมื่อผลแก่ ผลสุกมีรสหวานและกลิ่นหอมกว่าเสาวรสชนิดผลสีเหลือง แต่ปัจจุบันได้ปลูกเป็นการค้าเฉพาะพันธุ์เบอร์ 2 เท่านั้น เพราะมีลักษณะเด่นกว่า คือ ผลมีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 70-100 กรัม มีความหวาน 17-18 องศาบริกซ์ นอกจากนี้ยังเปลือกผลไม่บางเกินไป ทำให้อายุการวางจำหน่ายนานขึ้นและทนทานต่อการขนส่ง (งานพัฒนาและส่งเสริมการผลิตไม้ผลขนาดเล็ก มูลนิธิโครงการหลวง, 2555) ปัจจุบันเสาวรสหวานเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของพื้นที่สูง มีปริมาณความต้องการเป็นจำนวนมากและสูงกว่าปริมาณผลผลิตของเสาวรสหวานที่ผลิตได้ โดยราคาของผลผลิตเสาวรสหวานที่เกษตรกรได้รับมีราคาสูงมากกว่า 3-5 เท่า ของราคาเสาวรสพันธุ์ที่ปลูกเพื่อส่งโรงงานแปรรูป เสาวรสหวานจึงนับเป็นผลไม้ที่มีอนาคต

ในปี พ.ศ. 2556 ในพื้นที่ส่งเสริมของมูลนิธิโครงการหลวง มีเกษตรกรผู้ปลูกเสาวรสหวานจำนวน 356 ราย มีพื้นที่ปลูก 676.2 ไร่ และมีผลผลิตจำหน่ายผ่านตลาดมูลนิธิโครงการหลวง 301,761 ตัน มูลค่า 8.21 ล้านบาท สำหรับราคาผลผลิตเสาวรสหวานอยู่ในระดับที่ดี คือ เฉลี่ย 30-50 บาทต่อกิโลกรัม จากความต้องการเสาวรสหวานของตลาดที่มีเพิ่มมากขึ้น จึงมีการเร่งขยายพื้นที่ส่งเสริมการปลูกทั้งในพื้นที่โครงการหลวงและในพื้นที่ขยายโครงการหลวง แต่พบว่าคุณภาพผลผลิตลดลง โดยผลมีขนาดเล็ก ไม่ได้คุณภาพตามที่ตลาดต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากต้นเสาวรสหวานที่ปลูกมีโรคไวรัสซึ่งทำให้ต้นไม่สมบูรณ์ อ่อนแอ และส่งผลถึงคุณภาพผลผลิต ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาการผลิตต้นเสาวรสหวานเบอร์ 2 ปลอดโรคที่สามารถให้ผลผลิตต่อต้นสูงขึ้นและผลผลิตมีคุณภาพดีตามความต้องการของตลาด เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรบนพื้นที่สูงปลูกเพื่อสร้างรายได้ต่อไป

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเสาวรสหวาน

เสาวรส (Passion fruit) เป็นพืชพวกไม้เลื้อยเครือยาว อาจยาวถึง 15 เมตร มีอายุประมาณ 4-5 ปี ลำต้นของเสาวรสมีลักษณะแข็งแรง ลำต้นอ่อนจะมีสีเขียว ไม่มีขนข้างในกลวง เมื่อต้นแก่จะกลายเป็นสีม่วงแดงเรื่อ จะเริ่มมีมือเกาะเมื่อต้นอ่อนเติบโตได้ประมาณ 6-8 ข้อ มือเกาะมีสีเดียวกับลำต้น และก้านใบ ม้วนขดเป็นวงช่วยยึดลำต้น และเถาจากเมล็ดเมื่องอกเจริญเป็นต้นอ่อน ใบอ่อนที่แตกออกมาจะเป็นใบเรียบ ๆ ไม่มีแฉก เมื่อเจริญเติมโตใบจะกลายเป็นแฉก 3 แฉก และเมื่อเจริญเติมโตได้ระยะหนึ่งจะเริ่มแตกเป็นกิ่ง การเจริญเติบโตในช่วงนี้จะเป็นไปอย่างช้า ๆ หลักจากนั้นจะมีการเจริญเติบโตแผ่กิ่งก้านสาขาออกปกคลุมพื้นที่อย่างรวดเร็ว

ใบของต้นอ่อนเสาวรสมีลักษณะใบเป็นรูปไข่ ฐานใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบมีลักษณะหยักเล็กน้อย เมื่อต้นเจริญเติมโตมีใบประมาณ 10-12 ใบ จะเริ่มมีใบที่มีลักษณะเป็น 3 แฉกลึกขนาดประมาณ 10-15 × 12-15 เซนติเมตร ผิวด้านล่างของใบเป็นร่องก้านใบเรียงไม่มีขน ยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร ที่โคนใบต่อกับก้านใบ มีต่อกลมเล็กๆ 2 อัน

ต้นเสาวรสเมื่อมีอายุประมาณ 4-5 เดือน แต่ละเถาของเสาวรสจะเริ่มออกดอกตามตาข้างเป็นดอกเดี่ยว และจะออกในข้อที่ติดกันประมาณ 4-5 ดอก แต่ละดอกเมื่อบานเต็มที่จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-10 เซนติเมตร สีสวยสะดุดตา และมีกลิ่นหอมกลีบรองดอกมี 3 ใบ อยู่ที่ปลายของก้านดอกมีขอบคล้ายฟันเลื่อย กลีบเลี้ยงมีฐานรองดอก 5 อัน ลักษณะรูปไข่ ยาวเรียวด้านล่างสีเขียวอมเหลืองด้านบนสีขาวลักษณะนุ่มคล้ายฟ้องน้ำ กลีบดอกมี 5 กลีบแยกจากกันอยู่สลับกันกับกลีบเลี้ยงขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยงเล็กน้อย ลักษณะของกลีบดอกเป็นรูปไข่สีขาวแบนบาง และจะมีเส้นสีขาวออกมาจากฐานของกลีบดอกเรียงกันอยู่ 2 ชั้น เรียกว่า corona ซึ่งจะมีสีม่วงตรงโคน และขาวตรงปลาย มีเกสรตัวผู้ 5 อัน และอับเกสรจะอยู่ตรงปลายเกสร ตรงใจกลางดอกจะมีก้านชูรังไข่เหนือดอก ที่ยอดรังไข่จะมีก้าน 3 อัน แต่ละก้านจะมีเกสรตัวเมียที่ปลาย ซึ่งมีหน้าที่รับละอองเกสร ผลจะเจริญจากรังไข่นี้ และเมื่อโตจะมีขนาด 1.5-2 นิ้วลักษณะของเสาวรสจะเหมือนกับดอกเสาวรสป่าของไทยมาก แต่ดอกเสาวรสป่าของไทยมีขนาดเล็กกวามีเส้นผ่าศูนย์กลางเพียง 2-3 เซนติเมตรเท่านั้น

ดอกเสาวรสที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วรังไข่จะขยายตัวเจริญเติมโตอย่างรวดเร็ว และผลโตเต็มที่ภายใน 17-18 วัน ลักษณะผลมีทั้งกลม และรูปไข่ ผลอ่อนมีสีเขียว ผิวเรียบเป็นมัน มีจุดสีขาวกระจายอยู่ทั่วไป ผลที่ถูกแสงแดดตลอดเวลามีสีเขียวเข้มกว่าผลที่อยู่ใต้เงาของใบ ผลเสาวรสเป็นผลประเภทอวบน้ำ (Berry) และเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ (Climacteric fruit) ระยะเวลาตั้งแต่ติดผลจนสุกนานประมาณ 8-10 สัปดาห์เมื่อผลโตเต็มที่จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-7 เซนติเมตร ผลที่เจริญเติมโตในฤดูร้อนจะสุกเร็วกว่าในฤดูหนาวเสาวรสพันธุ์สีม่วงเมื่อสุกผลจะมีสีม่วงเข้ม ส่วนพันธุ์สีเหลืองผลมีขนาดโตกว่าพันธุ์สีม่วงเมื่อสุกผลมีสีเหลืองเข้มสดใส ผิวเรียบเป็นมันวาว พันธุ์ลูกผสมเมื่อสุกมีหลายสี ตั้งแต่ม่วงเข้ม ม่วงแดง แสด เหลืองอ่อนปนเขียว จนถึงเหลืองทองลักษณะเปลือกของกะทกรกฝรั่งนั้น เปลือกชั้นนอกจะแข็งบาง ชั้นกลางมีสีเขียวชั้นในจะมีสีขาวหนา และนุ่มมีเมล็ดจำนวนมากติดอยู่กับผนังรังไข่ เมล็ดจะถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นถุง ภายในมีน้ำผลไม้สีเหลืองเข้ม รสเปรี้ยว มีกลิ่นหอมเมล็ดมีลักษณะแข็งมากเป็นรูปใบไม้สีดำสนิท

ภาพที่ 1 เสาวรส (ก) ดอกเสาวรสหวาน พันธุ์เบอร์ 2 และ (ข) ผลของเสาวรสหวาน พันธุ์เบอร์ 2 ปลูกโดยใช้ระบบค้างแบบผืน
ที่มา: มาริษา, 2557

2.2 โรคไวรัสของเสาวรส

โรคของเสาวรสที่เกิดจากไวรัสที่สำคัญและรุนแรง คือ โรค Passion fruit woodiness virus (PWV) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus ทำให้เกิดอาการใบด่าง เส้นใบใส จุดด่างเหลือง จุดวงแหวน ใบเรียวยาว ลำต้นด่าง (Taylor and Kimble, 1964; Teakle and Wildermuth, 1967; Smith,1972) ผลมีอาการด่างเป็นแบบวงแหวน ผิวเปลือกไม่เรียบ (ณรงค์ชัย, 2550) ใบหงิกงอคล้ายหนังสัตว์ (สรัสวดี, 2532) ผลด่าง เนื้อผลไม่เรียบบิดเบี้ยว ผลขนาดเล็กกว่าปกติ เปลือกของผลจะหนา แข็งคล้ายเนื้อไม้ (woody) และทำให้ผลผลิตของเสาวรสลดลง (Taylor and Kimble, 1964) เชื้อสาเหตุของโรคนี้ถ่ายทอดโดยวิธีกล โดยการทาบกิ่งมีแมลงพาหะ ได้แก่ *Aphis fabae*, *Aphis gossypii* โดยการตัดแต่งกิ่ง และการเสียบยอด (ณรงค์ชัย, 2550) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) ในกลุ่ม Cucumovirus ทำให้เกิดโรค woodiness virus ซึ่งเชื้อไวรัสมีลักษณะอนุภาคกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร ทำให้เกิดอาการใบด่าง ใบด่างเหลือง ใบยอดบิด และหงิกงอ ผิวใบไม่เรียบ ผลบิดเบี้ยว ขนาดของผลเล็กลง เนื้อผลไม่เรียบ เชื้อ CMV นี้ถ่ายทอดโดยวิธีกล โดยการทาบกิ่ง มีแมลงพาหะ ได้แก่ *Myzuspersicae* (Smith, 1972) อาการของ woodiness virus นี้ ยังมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ PWV ร่วมกับ CMV ด้วย (Taylor and Kimble, 1964)

PWV เป็นเชื้อสาเหตุหลักที่เข้าทำลายเสาวรสจัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus มีรายงานพบครั้งแรกที่รัฐควีนแลนด์ นิวเซาท์เวลส์ และออสเตรเลียตะวันตก ประเทศออสเตรเลีย (Taylor and Kimble, 1964) ส่วนในประเทศไทย ดวงใจและคณะ (2529) ได้ศึกษาและสำรวจโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสของเสาวรสที่บริษัทสยามอุตสาหกรรม จังหวัดระยอง ในปี 2528-2529 พบลักษณะอาการใบด่างถึงร้อยละ 100 ของตัวอย่างเสาวรส และทำให้ผลผลิตลดลงกว่าร้อยละ 50 โดยพบว่าเชื้อสาเหตุของโรคคือ PWV

วิธีการป้องกันและกำจัดโรคที่ดีที่สุด คือ การคัดเลือกต้นกล้าที่สมบูรณ์ปลอดจากเชื้อหรืออาการของโรคและต้านทานโรคไวรัส ไม่ควรปลูกปะปนกับพืชตระกูลแตง เมื่อนำต้นกล้าลงปลูก

จนกระทั่งถึงเริ่มติดผล ควรพ่นยากำจัดแมลงพาหะเป็นระยะและระมัดระวังเครื่องมือที่ใช้ตัดแต่งกิ่งโดยทำความสะอาดทุกครั้งที่ตัดแต่งต้นเสร็จในแต่ละต้นด้วยแอลกอฮอล์ (ณรงค์ชัย, 2550)

2.3 การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งอาจจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซลล์ มาทำการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม และสภาพแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ และความชื้น ที่ได้รับการควบคุม ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำให้ชิ้นส่วนของพืชนั้นๆ เพิ่มปริมาณ และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ คือ มีทั้งส่วนของใบ ลำต้น และราก และสามารถนำต้นอ่อนที่สมบูรณ์ไปปลูกในสภาพธรรมชาติได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิควิธีหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางถึงประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชที่มีคุณภาพ มีคุณลักษณะตรงตามต้นแม่พันธุ์ และสามารถผลิตต้นพันธุ์พืชได้เป็นจำนวนมาก ต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อรา และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในพืช เพราะหากมีอนุภาคของเชื้อเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) โดยทั้งสปอร์ของรา และอนุภาคของแบคทีเรียสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วบนอาหาร และจะปรากฏกลุ่มของจุลินทรีย์ (colony) เหล่านั้น จึงสามารถคัดแยกพืชเหล่านั้นออกมาได้ ในกรณีของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก และสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่น ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจะไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็นเช่นในลักษณะของการปนเปื้อนจากเชื้อรา และแบคทีเรียแต่จะสังเกตเห็นได้เมื่อเกิดอาการบนต้นพืชเมื่อต้นพืชนั้นอ่อนแอ ดังนั้นในการผลิตพืชที่ปลอดโรคและปราศจากการปนเปื้อนของไวรัส จึงต้องมีการคัดแยก และตรวจสอบพืชก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อไม่ให้มีเชื้อไวรัสแอบแฝงมากับต้นพืช ชิ้นส่วนของพืชที่มีความปลอดภัยจากไวรัสมากที่สุด คือ apical meristem ซึ่งเป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และ embryo ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อของต้นอ่อนที่อยู่ภายในเมล็ด เนื่องจากอนุภาคของไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหาร (phloem) และท่อน้ำ (xylem) แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่ออาหารและท่อน้ำที่จะติดต่อกับส่วนอื่นๆของพืช (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการผลิตต้นพันธุ์เสาวรสหวานที่ปลอดโรคเป็นวิธีการผลิตวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพที่ดี โดยทำการคัดเลือกต้นแม่พันธุ์เสาวรสที่ปลอดโรคหรือทำการเพาะด้วยเมล็ด เนื่องจากไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไม่สามารถถ่ายทอดสู่ต้นอื่นโดยการเพาะปลูกด้วยเมล็ด (Koizumi, 2005) จากนั้นนำต้นแม่พันธุ์เสาวรสที่ปลอดโรคมาทำการเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและในสภาวะแวดล้อมที่ควบคุม ซึ่งจะสามารถเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ได้

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่า องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดี พืชแต่ละชนิดอาจมีความต้องการในอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรมาตรฐานได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นจำนวนมากเพื่อให้เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืชหลากหลายชนิดตามวัตถุประสงค์ของ

การทดลอง โดยอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เช่น สูตรอาหาร MS และสูตรอาหาร B5 แม้ว่าจะมีองค์ประกอบหลักของอาหารที่เหมือนกัน แต่เมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบในส่วนของธาตุอาหาร อนินทรีย์ พบว่ามีความแตกต่างกัน เมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่แตกต่างกันจึงอาจทำให้พืชเกิดการตอบสนองได้แตกต่างกัน ดังนั้น อาหารเพาะเลี้ยงจึงต้องมีความเหมาะสมและสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อพืชได้

สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) เป็นสารอินทรีย์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งบางชนิดมีคุณสมบัติเหมือนฮอร์โมนพืชที่พืชมีการสร้างขึ้นตามธรรมชาติเพื่อใช้ในการควบคุมและส่งเสริมการเจริญของพืชของพืชเอง โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและออกซิน มีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อและการเจริญของพืชและมีความสำคัญต่องานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยคุณสมบัติพื้นฐานของไซโตไคนิน คือ จะส่งเสริมให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นยอด และ คุณสมบัติพื้นฐานของออกซิน คือ จะส่งเสริมให้มีการพัฒนาของราก และหากในกรณีที่เนื้อเยื่อพืชได้รับทั้งไซโตไคนินและออกซินในระดับปริมาณหนึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส ซึ่งพืชแต่ละชนิดและเนื้อเยื่อพืชแต่ละประเภท มีความไวต่อการกระตุ้นและตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556) โดยในกรณีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ต้นอ่อนหรือต้นกล้าที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับต้นแม่พันธุ์ควรจะต้องหลีกเลี่ยงการพัฒนาของต้นอ่อนผ่านการเกิดแคลลัส เนื่องจากต้นอ่อนที่พัฒนามาจากแคลลัสมีโอกาสจะเกิดการกลาย หรือ มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้

ในงานการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถสรุปเป็นขั้นตอนดังนี้

(1) การคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยต้นพันธุ์ที่คัดเลือกมีลักษณะที่ดี เช่น เป็นต้นพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง มีลักษณะแข็งแรงและมีความปลอดโรค เป็นต้น จากนั้นเลือกส่วนของพืชที่ต้องการเพื่อนำมาเลี้ยงด้วยวิธีที่เหมาะสม โดยรักษาสภาพเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นให้อยู่ในสภาพที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

(2) การทำให้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นปราศจากเชื้อ ในขั้นตอนนี้เป็นการทำให้เนื้อเยื่อพืชสะอาดและ ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชนั้น ซึ่งนับว่าเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากในสภาพธรรมชาติส่วนต่าง ๆ ของพืชนั้นมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญอยู่ด้วย ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราหรือแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน โดยที่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำ ให้อาหารมีการเน่าเสียและส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชตายได้

(3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มต้นเพื่อให้มีการพัฒนาเกิดเป็นยอด แสดงถึงความสามารถในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้มีการพัฒนาและการเจริญของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นยอดและการที่จะเจริญไปเป็นต้นอ่อนพืชได้ ในส่วนของการเพิ่มปริมาณยอด แสดงถึงศักยภาพของกระบวนการที่สามารถทำให้ได้ยอดจำนวนมาก ซึ่งยอดเหล่านี้จะสามารถพัฒนาและเจริญไปเป็นต้นอ่อนพืชได้จำนวนมากเช่นกัน โดยทั่วไปการกระตุ้นและส่งเสริมให้เกิดการเกิดยอดและ

การเพิ่มปริมาณยอด นิยมทำโดยการปรับองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง อาทิเช่น ปริมาณน้ำตาล ปริมาณธาตุอาหารของพืช และการเติมหรือปรับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินให้เหมาะสมต่อการพัฒนาและการเจริญของยอดและการเพิ่มปริมาณยอด

(4) การชักนำให้ยอดที่ได้เกิดราก ในพืชบางชนิดเมื่อยอดที่ได้มีการพัฒนาและเจริญได้จนถึงระยะเวลาหนึ่งจะมีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นตามมาได้เอง โดยไม่ต้องกระตุ้นหรือชักนำให้เกิดราก นั่นคือสามารถใช้อาหารเพาะเลี้ยงและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเหมือนกับการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดยอดและเพื่อการเพิ่มปริมาณยอด เช่น ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อย ยอดที่ได้มากกว่าร้อยละ 90 มีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นตามมาได้เองหลังจากการเพาะเลี้ยง 4-8 สัปดาห์ โดยไม่ต้องเพิ่มขั้นตอนเพื่อชักนำให้เกิดราก (วิสสุตา และ ปิยะมาศ, 2558; ธนิดา และ ปิยะมาศ, 2558 ; Srirat *et al*., 2009, 2013) แต่สำหรับพืชบางชนิด พบว่า ยอดที่ได้ไม่มีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นตามมาได้เอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการชักนำให้เกิดราก โดยการนำยอดที่ได้เหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดรากและมีการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ สิ่งที่ควรพิจารณาเป็นพิเศษ คือ ในพืชบางชนิดมีความไวต่อการกระตุ้นและตอบสนองต่อได้รับทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและออกซิน พืชกลุ่มนี้เมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอดอาจมีการได้รับและสะสมไซโตไคนินไว้ในพืช และเมื่อต้องมาได้รับออกซินในขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก อาจทำให้เกิดสภาวะที่ส่งเสริมให้เกิดแคลลัสขึ้น ซึ่งการเกิดแคลลัสจะส่งผลกระทบต่อการพัฒนาและการเจริญของยอดและรากของพืช

(5) การย้ายต้นกล้าออกปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้จำนวนมากแล้ว สามารถนำต้นอ่อนที่ได้มาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเพื่อปรับสภาพพืช และเมื่อต้นพืชแข็งแรงสามารถย้ายต้นกล้าออกปลูกในแปลงปลูกในสภาพธรรมชาติได้

2.4 การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA

วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีการทางเซรุ่มวิทยาที่อาศัยการทำปฏิกิริยากันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี ในปี ค.ศ. 1976 Wolter และคณะเป็นกลุ่มนักวิจัยกลุ่มแรกที่นำเทคนิค ELISA มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืช จากนั้น ในปี ค.ศ. 1977 Clark and Adam ได้นำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส mycoplasma like organism (MLO) แบคทีเรีย และเชื้อรา เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก มีความรวดเร็วถูกต้องแม่นยำ และสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก นอกจากนี้ยังสามารถดัดแปลงเทคนิคได้ง่าย

หลักการของเทคนิค ELISA คือ การใช้แอนติบอดีที่ติดฉลาก (labeled) ด้วยเอนไซม์ ไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจน ให้เกิดเป็น แอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ (antigenantibody complex) จากนั้นทำการตรวจหาแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ ที่เกิดขึ้นโดยการเติมสับสเตรทของเอนไซม์ที่

ติดฉลากไว้กับแอนติบอดีลงไป ถ้ามีแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์อยู่เอนไซม์จะไปย่อย และเปลี่ยนสีสับสเตรทที่เติมลงไปให้เป็น product ที่มีสีตรวจได้ง่าย (วิชัย, 2537) ในการวิเคราะห์ผลสามารถอ่านผลได้โดยใช้เครื่องสเป็คโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งปริมาณสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจน

2.5 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสและโรค

Faria and Segura (1997) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรสพันธุ์สีเหลือง (Yellow passionfruit) โดยใช้เนื้อเยื่อส่วน axillary bud เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น ในอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด benzyladenine (BA) พบว่า เนื้อเยื่อมีการเจริญเป็นยอดอ่อน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของเสาวรสในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน พบว่า ยอดอ่อนมีการพัฒนาเนื้อเยื่อส่วนรากได้ร้อยละ 70 ของยอดอ่อนที่ทำการเพาะเลี้ยง

Trevisan and Mendes (2005) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเสาวรส ผ่านกระบวนการออร์แกโนเจเนซีส (organogenesis) โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนใบเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด thidiazuron (TDZ) และ $AgNO_3$ สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนใบเกิดการพัฒนาเป็นตา (bud) ได้ และเมื่อทำการย้าย bud มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีการเติมน้ำมะพร้าวจะช่วยส่งเสริมให้มีการพัฒนาให้มีการเจริญของยอดอ่อน และต้นอ่อนของเสาวรส

ศิรินันท์ (2551) ศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ PWV ในต้นพันธุ์เสาวรสเพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นพันธุ์ปลอดโรค โดยนำต้นเสาวรสพันธุ์สีม่วงปราศจากเชื้อ และต้นพันธุ์ที่เป็นโรคมาทำการตรวจสอบเชื้อ PWV ด้วยเทคนิคที่ใช้กันอยู่ทั่วไป 3 วิธี ได้แก่ Enzyme-link immuno-sorbent (ELISA), Tissue blot immunoassay (TBIA), และเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยทำการทดสอบกับต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด และต้นที่เป็นโรคอย่างละ 10 ต้น เทคนิค ELISA และเทคนิค TBIA เป็นการตรวจสอบโปรตีนห่อหุ้มเชื้อ PWV ด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ PWV กรณีที่ใช้เทคนิค ELISA อ่านผลการตรวจจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ติดฉลากบนแอนติบอดี และสับสเตรท ทำให้ทราบระดับปริมาณเชื้อ PWV ผลการทดลองสรุปว่าเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ PWV ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ ไวรัส ในต้นพันธุ์เสาวรสได้ร้อยละ 100 ได้แก่ เทคนิค TBIA และเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน และสามารถตรวจสอบต้นปกติแยกจากต้นที่เป็นโรคได้อย่างถูกต้อง ส่วนเทคนิค ELISA ได้ผลร้อยละ 90

สิริภัทร์ และคณะ (2551) ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการการผลิต และขยายต้นแม่พันธุ์เสาวรสที่ปลอดโรคไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดเจริญ โดยนำปลายยอดเจริญของเสาวรสพันธุ์สีม่วงที่เพาะเลี้ยงให้ปลอดโรค มาเสียบบนต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดของเสาวรสพันธุ์สีเหลืองที่ตรวจสอบแล้วว่าปลอดโรคไวรัสเป็นต้นตอ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถขยายพันธุ์ต้นปลอดโรคได้ง่ายและรวดเร็ว ยอดที่เพาะโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเสียบยอดกับพืชที่เพาะเมล็ดตามธรรมดาได้ผลดี และต้นที่ได้แข็งแรง และเจริญเติบโตได้เร็ว

มาริษา และสิริภัทร์ (2553) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของใบอ่อนเสาวรสพันธุ์สีม่วงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้มีสีเขียวอ่อน มีลักษณะที่เป็น compact callus และ friable callus เมื่อนำแคลลัสทั้ง 2 ลักษณะมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA (Benzyladenine) ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด โดยสามารถชักนำให้ compact callus เกิดยอดได้ร้อยละ 80 นำยอดที่ได้มาเพาะเลี้ยงต่อในสูตรอาหารเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อขยายยอดพันธุ์ นำยอดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด IBA (Indole-3-butyric acid) 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก ใช้เวลาประมาณ 8 สัปดาห์สามารถพัฒนาต้นพันธุ์ใหม่ จากนั้นนำต้นพันธุ์ปลูกในดินปลูกภายในโรงเรือนเพาะชำ

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