บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 วิธีการวิจัย

3.1.1 การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค ทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ดังนี้ (1) ตัวอย่างของยอดส้มที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น (2) ตัวอย่างของต้นอ่อนในระหว่างการเพาะเลี้ยง และ (3) ตัวอย่างของต้นกล้าของส้มที่ผลิตได้ โดยจะผ่านการตรวจสอบแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR เพื่อระบุถึงความปลอดโรค

1) การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง

ทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง ในตัวอย่างส้มโดยสกัดดีเอ็นเอจากใบส้มด้วยชุดสกัด GF-1-Plant DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) โดย

(1) นำตัวอย่างพืชมา 100 มิลลิกรัม มาสกัดดีเอ็นเอรวม (DNA) ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณ 16 rRNA gene ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter *asiaticus* โดยเทคนิค PCR (Jagoueix *et al*.,1994) โดยใช้

Forward primer (5'GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA 3') และ

Reverse primer (5'GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT3')

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนขนาด 1,107 คู่เบส ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.2 มิลลิโมลาร์ของแต่ละ dNTP และ primers Forward และ Reverse ที่มีความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์

(2) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

(3) ตรวจสอบผลผลิต PCR (PCR product) ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น standard marker และได้ทำ PCR ของยีนควบคุม 18S rRNA โดยใช้

primer 18S-F (5' GAACAACTGCGAAAGCATTTGC 3') และ

primer 18S-R (5' CCTGGTAAGTTTCCCCGT GTTG 3')

เพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอ

2) การตรวจสอบโรคทริสเตซ่า

ทำการตรวจสอบไวรัส Citrus Tristeza Virus (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างส้ม ด้วยวิธี RT-PCR (Mehta *et al*., 1997) โดย

(1) นำตัวอย่างพืชมา 100 มิลลิกรัม สกัดอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA) ด้วยสาร TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ Total RNA โดยการทำ gel electrophoresis และการวัดค่าการดูดกลืนแสง

(2) นำ Total RNA ของพืชตัวอย่างมา 2 ไมโครกรัม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ cDNA โดย M-MuLV Reverse Transcriptase (Vivantis, Malaysia) cDNA ที่ได้จะนำมาเป็น DNA template ในการทำ PCR ด้วย primers ที่ออกแบบจาก Coat protein (CP gene) ขนาด 670 คู่เบส ได้แก่
primer C1 (5’ GGCGGAATTCGACGACGAAACAAAGAAA 3’) และ
primer C2 (5’ GAAGATCTTCAACGTGTGTTGAATTTCC 3’)
ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน ส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 10 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 5 ยูนิต 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.2 มิลลิโมลาร์ของแต่ละ dNTP และ primer C1,C2 ที่มีความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์

(3) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที และ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

(4) ตรวจสอบผลผลิต PCR (PCR product) ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น standard marker ทั้งนี้ได้ทำ PCR ของยีนควบคุม 18S rRNA โดยใช้
primer 18S-F (5’ GAACAACTGCGAAAGCATTTGC 3’) และ
primer 18S-R (5’CCTGGTAAGTTTCCCCGTGTTG 3’)
เพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

3.1.2 การศึกษาและพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้ม

1) การชักนำให้ยอดอ่อนของพืชตระกูลส้มเกิดราก

ในการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการเปรียบเทียบวิธีการในการชักนำรากและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เหมาะสมต่อการเกิดรากของพืชตระกูลส้ม ในแต่ละวิธีการทำซ้ำ 10 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ยอดต่อ 1 ขวดทดลอง (n=10) โดยวิธีการในการชักนำรากมีรายละเอียด ดังนี้

วิธีการที่ 1 การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของพืชตระกูลส้มบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและออกซิน

(1) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½LS (Linsmaier and Skoog medium) ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

(2) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนได้ยอดส้มที่มีความสูงประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร ทำการย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรเดียวกับข้อ (1) และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(3) การตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอดที่มีการเกิดรากและการเกิดแคลลัส โดยรายงานผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ของจำนวนยอดที่เกิดราก และเปอร์เซ็นต์ของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส

วิธีการที่ 2 การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของพืชตระกูลส้มบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน

(1) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของพืชตระกูลส้ม เช่นเดียวกับวิธีการที่ 1

(2) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนได้ยอดส้มที่มีความสูงประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร ทำการย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรเดียวกับข้อ (1) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตรเดิมที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ โดยในแต่ละวิธีการทำซ้ำ 10 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ยอดต่อ 1 ขวดทดลอง (n=10)

(3) การตรวจวัดผลโดยทำการบันทึกจำนวนยอดที่มีการเกิดราก และการเกิดแคลลัส โดยรายงานผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ของจำนวนยอดที่เกิดรากและเปอร์เซ็นต์ของจำนวนยอดที่เกิดแคลลัส

2) การศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิ (thermotherapy) และการบำบัดด้วยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มคัมควัทปลอดไวรัส

ในการศึกษาผลของการบำบัดด้วยอุณหภูมิและการบำบัดด้วยสารเคมีต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มปลอดไวรัส ในการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยจะทำการศึกษาในคัมควัทเป็นพืชต้นแบบ โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาติดอยู่ของคัมควัทที่มีผลการตรวจสอบว่ามีการตรวจพบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุ

โรคทริสเตซ่า เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น ทำการเพาะเลี้ยงโดยบำบัดด้วยอุณหภูมิและสารเคมี จำนวน 10 กรรมวิธี ในแต่ละกรรมวิธีทำซ้ำ 10 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำ คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อ 1 ชิ้น ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง กรรมวิธีในการบำบัดด้วยอุณหภูมิและสารเคมี ได้แก่

กรรมวิธีที่	รายละเอียดวิธีการบำบัดด้วยอุณหภูมิและสารเคมี	รหัสเรียก
1	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	T25
2	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	T35
3	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	T40
4	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่เติมสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	R15+T25
5	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่เติมสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ - ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์	R15+T35
6	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่เติมสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ - ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์	R15+T40
7	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่เติมสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	R25+T25
8	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่เติมสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	R25+T35

กรรมวิธีที่	รายละเอียดวิธีการบำบัดด้วยอุณหภูมิและสารเคมี	รหัสเรียก
	2 สัปดาห์ - ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์	
9	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่เติมสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ - ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์	R25+T40
10	- ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ LS + Su30 ที่เติมสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	R25*T35

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาติดอยู่ของคัมควัท มีรายละเอียด ดังนี้

(1) นำเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีตาติดอยู่ของคัมควัทที่ปนเปื้อนโรคทริสเตซ่ามาทำการฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิว จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการย้ายเปลี่ยนอาหาร (subculture) ในทุกๆ 4 สัปดาห์

(2) ย้ายยอดที่เพาะเลี้ยงได้ที่มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร มาทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิและสารเคมีตามกรรมวิธีต่างๆ (กรรมวิธีที่ 1–10) จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยทำการย้ายเปลี่ยนอาหาร ในทุกๆ 4 สัปดาห์

(3) ทำการสังเกตและบันทึกการลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อคัมควัท โดยนับจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโตได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 10 สัปดาห์ เพื่อหาร้อยละของจำนวนยอดที่มีการเจริญเติบโต

(4) นำตัวอย่างของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้มาทำการตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ในตัวอย่างส้ม ด้วยวิธี RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ของการบำบัดด้วยอุณหภูมิและการบำบัดด้วยสารเคมีต่อการทำให้เนื้อเยื่อส้มปลอดไวรัส

3.1.3 การศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

ในการผลิตต้นแม่พันธุ์ปลอดโรคของพืชตระกูลส้ม ทำโดยการต่อยอด (grafting) โดยใช้ส่วนยอดของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นยอดพันธุ์ดี (scion) เสียบลงบนต้นตอส้ม (rootstocks) โดยใช้ในการศึกษาเป็นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตรา (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.)

1) การเตรียมต้นตอส้มโดยการเพาะเมล็ดส้มในสภาพปลอดเชื้อ

(1) นำเมล็ดส้มมาล้างด้วยน้ำสะอาด แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ล้างด้วยน้ำสะอาดจำนวน 3 ครั้ง นำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร สารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร

(2) นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไซโตไคนิน ชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tallón *et al.*, 2012) และ KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

(3) ย้ายยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร DKW ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ออกซิน ชนิด IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tallón *et al.*, 2012) และ KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(4) สำหรับต้นอ่อนที่ใช้เป็นต้นตอในการศึกษาการต่อยอด (grafting) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ต้นอ่อนที่เหมาะจะทำการย้ายปลูกยังวัสดุปลูกที่เหมาะสม สำหรับต้นอ่อนที่จะใช้ในการศึกษาการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) จะทำการเพาะเลี้ยงต่อโดยบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะทำการเสียบยอด

2) การเตรียมยอดส้มปลอดโรค

(1) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของพืชตระกูล ได้แก่ คัมควัท เกรพฟรุ้ท และเลมอนที่ปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส และควบคุมการให้แสงที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยมีอัตราการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์

(2) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนได้ยอดส้มที่มีความสูงประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร ทำการย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสำหรับชักนำรากที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ชนิด IBA ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์

(3) ทำการย้ายต้นอ่อนส้มมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร KELCOGEL® 3 กรัมต่อลิตร โดยทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะทำการเสียบยอด

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

ทำการศึกษาวิธีการในการต่อยอด (grafting) และการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) โดยวิธีการต่อ มีรายละเอียด ดังนี้

(1) การต่อยอด (grafting) ทำโดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราเป็นต้นตอ (rootstock) โดยต้นตอมีความสูง 10-15 เซนติเมตร ทำการติดตาโดยแบบตัวที (T. Budding) โดยจะทำซ้ำ 10 ซ้ำ (10 ต้น) ต่อส้ม 1 ชนิด

(2) การต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ทำโดยใช้ยอดคัมควัท เกรพฟรุ้ท และเลมอนปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) โดยทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนตาให้มีลักษณะเป็นชิ้นส่วนสามเหลี่ยม ขนาด 0.3-0.5 มิลลิเมตร นำมาวางบนรอยแผลที่ตัดเตรียมไว้บนต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ที่ใช้เป็นต้นตอ (rootstock) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร โดยจะทำซ้ำ 10 ซ้ำ (10 ต้น) ต่อส้ม 1 ชนิด

4) การผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค

(1) การย้ายต้นกล้าออกปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้จำนวนมากแล้ว นำต้นอ่อนที่ได้มาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเพื่อปรับสภาพพืช และเมื่อต้นพืชแข็งแรงสามารถย้ายต้นกล้าออกปลูกในแปลงปลูกในสภาพธรรมชาติ

(2) การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย CLA เชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค PCR และตรวจสอบเชื้อไวรัส CTV เชื้อสาเหตุของโรคทริสเตซ่าโดยใช้เทคนิค RT-PCR เพื่อระบุถึงความปลอดโรคของต้นกล้าส้มที่ผลิตได้

(3) ส่งมอบต้นกล้าส้มปลอดโรค จำนวน 3 ชนิด ให้สวพส. เพื่อใช้เป็นต้นแม่พันธุ์สำหรับงานส่งเสริมต่อไป

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัย

3.2.1 สถานีเกษตรหลวงปางดะ หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

3.2.2 ห้องวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

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