บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 พืชตระกูลส้ม

พืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) มีสมาชิกจำนวน 130 สกุล และ 1,500 ชนิด พบได้ในแถบหนาวและแถบกึ่งร้อนของซีกโลกเหนือและใต้ ส่วนใหญ่มีการกระจายตัวอยู่ในอัฟริกาตอนใต้และออสเตรเลีย พืชในตระกูลนี้มีทั้งที่เป็นไม้ยืนต้น ไม้ล้มลุก และไม้พุ่ม ใบมีทั้งชนิดใบเดี่ยวและใบประกอบ ซึ่งมีลักษณะแบบนิ้วมือและแบบขนนก ส่วนของใบอาจมีการลดรูปเป็นหนามด้วย ใบมีการเรียงตัวแบบตรงกันข้ามหรือสลับ ไม่มีหูใบ ต่อมน้ำมันที่ส่วนของใบนี้มีลักษณะโปร่งแสง ดอกเป็นชนิดสมบูรณ์เพศและได้สมมาตรกัน มักเกิดเป็นช่อดอก ในแต่ละดอก ส่วนของกลีบดอกและกลีบเลี้ยงแยกจากกันอย่างเด่นชัด จำนวนกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมี 3-5 กลีบ กลีบดอกมีลักษณะแยกกันบริเวณฐาน มีเกสรตัวผู้แทรกอยู่ มีจำนวนเท่ากลีบดอกหรือเป็นสองเท่าของจำนวนกลีบดอก มักเรียงตัวเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกเรียงตัวในลักษณะตรงกันข้ามกับกลีบดอก บางครั้งอาจพบเกสรตัวผู้ลดรูปซึ่งไม่สามารถทำงานได้ รังไข่ส่วนฐานของเกสรตัวเมียเป็นแบบ superior ovary คือ รังไข่จะอยู่เหนือส่วนอื่นของดอก ลักษณะของรังไข่มีสีชมพูเด่นชัด จำนวน 4-5 ช่อง แต่ละช่องมีไข่ 1-2 อัน ในการจัดจำแนกพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 ตระกูลย่อยซึ่งตระกูลย่อยที่สำคัญที่สุด ได้แก่ ตระกูลย่อยของส้ม (Orange Subfamily : Aurantioideae) ประกอบด้วยสมาชิกที่เป็นไม้ผลเศรษฐกิจมากมาย เช่น ส้มต่างๆ (Citrus *spp.*) เป็นต้น สำหรับการแบ่งกลุ่มของพืชตระกูลส้ม แบ่งได้ดังนี้ กลุ่มแรก กลุ่มของส้มเกลี้ยงและส้มตรา (Oranges group) กลุ่มที่สอง กลุ่มของส้มจีนและส้มเขียวหวาน (Mandarins group) กลุ่มที่สาม กลุ่มของส้มโอและเกรฟฟรุ๊ท (Pomelo and Grapefruits group) และสุดท้ายกลุ่มของมะนาว (Common acid members group) (เปรมปรี, 2544)

มูลนิธิโครงการหลวงได้ทำการปลูกทดสอบพันธุ์และการให้ผลผลิต โดยเน้นพันธุ์ที่แตกต่างจากพื้นราบและให้ผลผลิตได้ดีบนพื้นที่สูงซึ่งมีอากาศที่เย็น ซึ่งในปัจจุบันมูลนิธิโครงการหลวงได้คัดเลือกชนิดและพันธุ์ส้มที่มีศักยภาพ ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท อย่างไรก็ตามพืชตระกูลส้มเป็นพืชที่มีโรคและแมลงศัตรูพืชหลายชนิดเข้าทำลายในทุกระยะการเจริญเติบโต โดยเฉพาะโรคทริสเตซ่า (*Citrus tristeza* disease) และโรคกรีนนิ่ง (Greening disease)

2.2 โรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่า

โรคกรีนนิ่ง เป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดอย่างมากในประเทศแถบเอเชียและแอฟริกา มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLA) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงหรือเจริญเติบโตได้ในอาหารสังเคราะห์ได้ แบคทีเรียจะเจริญอยู่เฉพาะในเซลล์ท่ออาหาร (phloem) ของพืชอาศัย (อารมย์, 2550) แบคทีเรีย CLA เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง มีขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาได้ โดยจะมองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนเท่านั้น (กาญจนา, 2547) การเรียกชื่อโรคนั้น มีความแตกต่างในแต่ละประเทศในแถบแอฟริกาฝรั่งเศส และประเทศไทยเรียกว่า “Greening” ประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า “Leaf mottling” ประเทศอินเดีย เรียกว่า “Decline” ประเทศอินโดนีเซีย และอังกฤษ เรียกว่า “Vein phloem

degeneration” ประเทศจีน เรียกว่า “Huang long bing” หรือ HLB ไต้หวัน เรียกว่า “Likubin” และในประเทศสเปน เรียกว่า “Enverdecimiento” (Planet *et al*., 1995)

โรคกรีนนิ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญกับผลผลิตส้ม มีการสำรวจของ Reunion Island พบว่าช่วง 8 ปีที่ทำการสำรวจ ต้นส้มได้รับความเสียหายมากกว่าร้อยละ 65 ไม่สามารถให้ผลผลิตและขยายพันธุ์ต่อได้ (Aubert, 1987) อาการของต้นส้มที่ติดโรคกรีนนิ่งจะเริ่มหยุดชะงักการเจริญเติบโตและจะเริ่มให้ดอกและแตกใบใหม่นอกฤดูเป็นจำนวนมาก ดอกและใบทั้งหมดเหล่านี้จะร่วงภายหลังจากยอดเป็นสีเหลือง จากนั้นจะเกิดการตายที่ยอด รากแขนง และรากหาอาหารเน่า ความแข็งแรงลดลง และในที่สุดต้นจะตายทั้งต้น (กาญจนา, 2547) ในประเทศไทยต้นส้มมีการตายแบบช้าๆ เมื่อเริ่มให้ผลผลิตแล้ว 5-8 ปีหลังจากที่ได้รับเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง โดยโรคกรีนนิ่งสามารถเจริญอยู่ในต้นพืชเป็นเวลาอย่างน้อย 10 ปี การติดเชื้อเริ่มจากที่ใบและเชื้อจะสามารถแพร่ระบาดไปยังใบอื่นๆ (Roistacher, 1996) ลักษณะอาการของโรคกรีนนิ่งที่พบในประเทศไทยนั้น อาการที่พบบนใบจะมี 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 ใบจะแสดงอาการเหลืองโดยเส้นใบมีสีเขียวชัดเจน บนใบแก่อาจพบเส้นใบและเนื้อใบติดกันโปร่งใสกว่าปกติ (vein clearings) มักพบอาการใบเหลืองและมีแต้มสีเขียวกระจาย (Blotchy mottling) ยอดมักแห้งตายอย่างรวดเร็ว มีอาการตายจากปลายกิ่ง ลักษณะที่ 2 ใบมีขนาดเล็ก เรียวยาว และหนากว่าปกติ โดยที่เส้นกลางใบมีสีเขียวในขณะที่บริเวณใบมีสีเหลือง คล้ายการขาดธาตุสังกะสี ใบมักตั้งชี้ขึ้น (ธีระ, 2532; Schwarz, 1965) อาการที่พบบนผล คือ ผลมีขนาดเล็ก ขนาดและรูปร่างไม่สม่ำเสมอ มีรสชาติขม เนื่องจากความเข้มข้นของกรดสูงว่าน้ำตาล การเปลี่ยนสีผิวเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ โดยยังคงมีสีเขียวในด้านที่ไม่ได้รับแสง (กาญจนา, 2547)

โรคทริสเตซ่า มีสาเหตุจากไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) เป็นโรคที่สำคัญกับพืชสกุลส้มทั่วโลก โรคนี้เชื่อว่าเกิดขึ้นในแถบตะวันออกและมีการแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยเชื้อ CTV จะอาศัยอยู่ในระบบท่ออาหาร จำกัดเฉพาะในพืชที่เป็นไม้ยืนต้นในสกุลส้มและพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) Rutaceae อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่า พบเชื้อ CTV ในต้นเสาวรส (*Passiffora* ssp.) ซึ่งเป็นพืชชนิดเดียวที่ไม่ได้เป็นสมาชิกของพืชตระกูลส้มที่เป็นแหล่งอาศัยของเชื้อ CTV (กาญจนา, 2547) โดยเชื้อ CTV จัดอยู่ในกลุ่มคลอสเทอโรไวรัส (Closterovirus) มีรูปร่างเป็นแบบ flexuous threadlike particle ยาวประมาณ 2,000 นาโนเมตร กว้างประมาณ 10-12 นาโนเมตร น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 13.3x106 ดาลตัน มีสารพันธุกรรมเป็นแบบ Single-Stranded RNA (ssRNA; Lee, 2001) ถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนหลายชนิด เช่น *Toxoptera citricidu*, *Aphis spiraecola* และ *A. gossypii* ลักษณะการถ่ายทอดเป็นแบบ semi-persistent (ยุพา, 2556) นอกจากนี้ เชื้อ CTV สามารถถ่ายทอดได้โดยการติดตาหรือทาบกิ่ง แต่ไม่ถ่ายทอดผ่านเมล็ด (Yoshida, 1996) เชื้อ CTV สามารถถ่ายทอดเชื้อให้กับส้มเกือบทุกชนิด โดยพบการถ่ายทอดได้ทั่วทุกพื้นที่ปลูกทั่วโลกด้วยไวรัสที่แตกต่างสายพันธุ์ บางชนิดอาจไม่รุนแรง บางชนิดรุนแรง เช่น ไวรัสสายพันธุ์ CTV-D ที่เกิดการระบาดที่ไต้หวันในปี ค.ศ. 1981 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาอย่างรุนแรงต่ออุตสาหกรรมส้ม และในปี ค.ศ. 1988 ไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิดโรคลำต้นแตก ได้เข้าทำลายส้มนาเวลในประเทศเปรูและออสเตรเลีย เกรฟฟรุ้ทในประเทศแถบแอฟริกาใต้และออสเตรเลีย ส้มวาเลนเซียในประเทศอินโดนีเซียและจีน และส้มแมนดารินและคาลามอนดินในประเทศไทย ฟิลิปปินส์ และมาเลเซียฝั่งตะวันออก (กาญจนา, 2547) อาการโดยทั่วไปของโรคที่พบ ได้แก่ ลำต้นบุ๋ม (stem pitting) เส้นใบใส (vein clearing) ใบด่าง (leaf

mottling) ใบเป็นรูปถ้วย (leaf cupping) เส้นใบแตก (vein corking) ใบขนาดลดลง ใบเหลือง ใบร่วง ขนาดของผลลดลงและอาการต้นโทรม (decline) ทำให้ผลผลิตลดลง (ลัดดาวัลย์, 2550; ยุพา, 2556) ต้นส้มที่ได้รับเชื้อชนิดรุนแรงจะแสดงอาการแคระแกร็น กิ่งแห้งตายจากยอดลงมา ผลผลิตน้อย และผลมีขนาดเล็ก เชื้อไวรัสที่เข้าไปจะอยู่ในลักษณะแฝง อาการจะไม่ปรากฏในระยะแรก แต่เมื่อต้นส้มที่ได้รับเชื้อเหล่านั้นอ่อนแอลง จะปรากฏอาการโทรมอย่างชัดเจน เมื่อต้นส้มอายุ 4-5 ปี หลังจากที่ให้ผลผลิต และจะชัดเจนขึ้นเมื่อต้นส้มให้ผลผลิตมากเกินไป นอกจากนี้ ยังพบอาการรากเน่าแทรกซ้อน การแพร่ระบาดโดยการติดไปกับกิ่งพันธุ์หรือโดยมีเพลี้ยอ่อนส้ม (Black Cituse Aphid; Toxoptera citricidus) และเพลี้ยอ่อนอื่นๆ อีกหลายชนิดเป็นแมลงพาหนะ (ไมตรี, 2524) ในประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในพืชตระกูลส้มทุกชนิดจากทุกภูมิภาคของประเทศ (รัตนา และคณะ, 2543)

ปัจจุบันการตรวจไวรัสในส้มมี 2 เทคนิคหลัก คือ การตรวจโดยใช้เทคนิค ELISA และ RT-PCR ซึ่งเทคนิค ELISA มีสะดวกในการใช้ ราคาไม่แพง แต่มีความไวของการตรวจต่ำ หากเทียบกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล RT-PCR ซึ่งมีความไวมากกว่า แต่มีข้อจำกัด คือ มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่า อย่างไรก็ตาม หากต้องการตรวจสอบไวรัสทริสเตซ่าในต้นแม่พันธุ์หรือในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงและสามารถตรวจไวรัสในปริมาณน้อยๆ ได้

2.3 การผลิตต้นพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิควิธีหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางถึงประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชที่มีคุณภาพ มีคุณลักษณะตรงตามต้นแม่พันธุ์ และสามารถผลิตต้นพันธุ์พืชได้เป็นจำนวนมาก ต้นพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในพืช เพราะหากมีอนุภาคของเชื้อเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) โดยทั้งสปอร์ของราและอนุภาคของแบคทีเรียสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วบนอาหารและจะปรากฏกลุ่มของจุลินทรีย์ (colony) เหล่านั้น จึงสามารถคัดแยกพืชเหล่านั้นออกมาได้ ในกรณีของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กมากและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่น ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจะไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็นเช่นในลักษณะของการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย แต่จะสังเกตเห็นได้เมื่อเกิดอาการบนต้นพืชเมื่อต้นพืชนั้นอ่อนแอ

ดังนั้นในการผลิตพืชที่ปลอดโรคและปราศจากการปนเปื้อนของไวรัส จึงต้องมีการคัดแยกและตรวจสอบพืชก่อนนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อไม่ให้มีเชื้อไวรัสแอบแฝงมากับต้นพืช ชิ้นส่วนของพืชที่มีความปลอดภัยจากไวรัสมากที่สุด คือ apical meristem ซึ่งเป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และ embryo ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อของต้นอ่อนที่อยู่ภายในเมล็ด เนื่องจากอนุภาคของไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหาร (phloem) และท่อน้ำ (xylem) แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่ออาหารและท่อน้ำที่จะติดต่อกับส่วนอื่นๆของพืช (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556)

ในงานการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถสรุปเป็นขั้นตอนดังนี้

(1) การคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยต้นพันธุ์ที่คัดเลือกมีลักษณะที่ดี เช่น เป็นต้นพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง มีลักษณะแข็งแรง และมีความปลอดโรค เป็นต้น จากนั้นเลือกส่วนของพืชที่ต้องการเพื่อนำมาเลี้ยงด้วยวิธีที่เหมาะสม โดยรักษาสภาพเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นให้อยู่ในสภาพที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

(2) การทำให้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นปราศจากเชื้อ ในขั้นตอนนี้เป็นการทำให้เนื้อเยื่อพืชสะอาดและปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชนั้น ซึ่งนับว่าเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากในสภาพธรรมชาติส่วนต่าง ๆ ของพืชนั้นมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญอยู่ด้วย ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราหรือแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน โดยที่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้อาหารมีการเน่าเสีย และส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชตายได้

(3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืช โดยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มต้นเพื่อให้เกิดยอด แสดงถึงความสามารถในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดการพัฒนาและการเจริญของเนื้อเยื่อไปเป็นยอดซึ่งยอดเหล่านี้จะมีการพัฒนาและเจริญไปเป็นต้นอ่อนพืชได้ ในส่วนของการเพิ่มปริมาณยอด แสดงถึงศักยภาพของกระบวนการที่สามารถทำให้ได้ยอดจำนวนมาก ซึ่งยอดเหล่านี้จะสามารถพัฒนาและเจริญไปเป็นต้นอ่อนพืชได้จำนวนมากเช่นกัน โดยทั่วไปการกระตุ้นและการส่งเสริมให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด นิยมทำโดยการปรับองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง อาทิเช่น ปริมาณน้ำตาล ปริมาณธาตุอาหารของพืช และการเติมหรือปรับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินให้เหมาะสม โดยพืชแต่ละชนิดอาจมีความต้องการในอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน

(4) การชักนำให้ยอดที่ได้เกิดราก ในพืชบางชนิดเมื่อยอดที่ได้มีการพัฒนาและเจริญได้จนถึงระยะเวลาหนึ่งจะมีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นตามมาได้เอง โดยไม่ต้องกระตุ้นหรือชักนำให้เกิดราก นั่นคือสามารถใช้อาหารเพาะเลี้ยงและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเหมือนกับการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดยอดและเพื่อการเพิ่มปริมาณยอด เช่น ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันและขมิ้นอ้อย ยอดที่ได้มากกว่าร้อยละ 90 มีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นตามมาได้เองหลังจากการเพาะเลี้ยง 4-8 สัปดาห์ โดยไม่ต้องเพิ่มขั้นตอนเพื่อชักนำให้เกิดราก (วิสสุตา และปิยะมาศ, 2558; ธนิดา และปิยะมาศ, 2558; Srirat *et al*., 2009, 2013) แต่สำหรับพืชบางชนิด พบว่ายอดที่ได้ไม่มีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นตามมาได้เอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการชักนำให้เกิดราก โดยการนำยอดที่ได้เหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดรากและมีการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ สิ่งที่ควรพิจารณาเป็นพิเศษ คือ พืชบางชนิดมีความไวต่อการกระตุ้นและตอบสนองต่อได้รับทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและออกซิน พืชกลุ่มนี้เมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอดอาจมีการได้รับและสะสมไซโตไคนินไว้ในพืช และเมื่อต้องมาได้รับออกซินในขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก อาจทำให้เกิดสภาวะที่ส่งเสริมให้เกิดแคลลัสขึ้น ซึ่งการเกิดแคลลัสจะส่งผลกระทบต่อการพัฒนาและการเจริญของยอดและรากของพืช

(5) การย้ายต้นกล้าออกปลูกในสภาพธรรมชาติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้จำนวนมากแล้ว สามารถนำต้นอ่อนที่ได้มาล้างอาหารวุ้นออกแล้วนำออกปลูกในโรงเรือนที่มีการ

ควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเพื่อปรับสภาพพืช และเมื่อต้นพืชแข็งแรงสามารถย้ายต้นกล้าออกปลูกในแปลงปลูกในสภาพธรรมชาติได้

เนื้อเยื่อของพืชที่ปลูกในแปลงปลูกมีการปนเปื้อนสูง ดังนั้นจึงเป็นเรื่องยากที่จะได้เนื้อเยื่อพืชที่ปลอดเชื้อ สำหรับใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในหลอดทดลอง (Rugini, 1990) การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืช (Surface disinfection) เป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ในขั้นตอนนี้เน้นการขจัดสิ่งปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ออกจากพื้นผิวและภายในของเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้เกิดความเสียหายและฆ่าเนื้อเยื่อพืช (Teixeira da Silva *et al*., 2015; Lazo-Javalera *et al*., 2016) เนื่องจากสารฆ่าเชื้อ (สารฟอก) ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิวอาจเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อของพืช (George 1993) ดังนั้นในการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อจึงควรคำนึงถึงความสมดุลระหว่างอัตราการปนเปื้อนและอัตราการอยู่รอดของเนื้อเยื่อเพื่อเจริญไปเป็นต้นอ่อน โดยทั่วไปในการฆ่าเชื้อนิยมใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) (Lazo-Javalera et al., 2016) เนื่องจากโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรีย ราและ ไวรัสทุกชนิด นอกจากนี้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ยังมีคุณสมบัติเป็นออกซิเดชั่นที่ดีทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก เอมีนและอะไมด์ได้ดี ปฏิกิริยาโดยทั่วไประหว่างกรดอะมิโนและสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ทำให้เกิด Aldehyde, NH_4Cl และ CO_2 (Yildiz, 2012) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชนิยมใช้ในรูปของสารละลาย สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่จำหน่ายในเชิงการค้ามีหลายชนิด เช่น คลอรอกซ์ โดยคลอรอกซ์เป็นสารฟอกในเชิงการค้าชนิดหนึ่ง ซึ่งในคลอรอกซ์มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เป็นส่วนประกอบอยู่ร้อยละ 8.25

2.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

ศิริวรรณ (2525) ได้ทำการศึกษาวิธีการผลิตพันธุ์มะนาวให้ปราศจากโรคทริสเตซ่า โดยใช้วิธี shoot-tip grafting *in vitro* ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ต้นกล้ามะนาวที่ได้จากการเพาะเมล็ดมะนาวบนอาหารสูตร MS เป็นต้นตอที่ปราศจากโรค และใช้ shoot-tip ขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่ได้จากมะนาวพันธุ์ดี ซึ่งทำการเพาะบนอาหารสูตร MS ที่เติม N^6-Benzyladenine ความเข้มข้น 1 ppm. เป็นยอดพันธุ์ดี นำต้นที่ graft ไปเพาะบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงปลูกในดิน เมื่อทำการทดสอบต้นมะนาวที่ได้ด้วยวิธี Immune electron microscopy แบบ Derrick พบว่า ตรวจไม่พบอนุภาควัสในต้นมะนาวที่ผลิตได้

วิสุทธิ์ (2543) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิวเซลลัสและทำการขยายพันธุ์ส้มฟรีมองท์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่โตเต็มที่จากผลแก่ที่มี zygotic embryo บนอาหารสูตร Murashige and tucker (MT) (1969) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จะเริ่มมีการพัฒนาส่วนรากออกมาจากเมล็ด เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 14-20 วัน และเริ่มพัฒนาส่วนยอด เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 34-50 วัน และ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ nucellus จากเมล็ดอ่อน บนอาหารสูตร MT ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เนื้อเยื่อส่วนยอดจะเริ่มมีการพัฒนาเมื่อเพาะเลี้ยง 120-165 วัน และเริ่มพัฒนาส่วนราก เมื่อเพาะเลี้ยง 165-225 วัน ในการเพาะเลี้ยง embryoid พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MT ที่เติม BA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 13.8 ยอด

และในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นที่ได้จาก การเพาะเลี้ยง embryoid บนอาหารดัดแปลงสูตร MT ที่เติม BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 120 วัน พบว่า เนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 5.2 ยอด ส่วนเนื้อเยื่อ epicotyl ที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 3.2 ยอด และเนื้อเยื่อส่วน cotyledonary node ที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 18.8 ยอด ในการชักนำให้เกิดราก ทำโดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 60 วัน โดยมีอัตราการเกิดราก 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายปลูกในสภาพภายนอก เป็นเวลา 30 วัน พบว่า มีอัตราการเกิดรอดชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์

ศรีสุดา (2543) ได้ทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิวเซลลัสของส้มโชกุล พบว่า เนื้อเยื่อนิวเซลลัสของส้มโชกุลที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MT (1969) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด Kn ทีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็น embryo และ plantlet ตามลำดับ สูงกว่าอาหารสูตรที่เติม Kn ในการเลี้ยง nucellar embryo เพื่อชักนำให้เกิดยอด พบว่า การเลี้ยงบนอาหารสูตร MT ที่เติม Kn 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน ให้ยอดที่มีความแข็งแรง และเมื่อนำยอดที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MT ที่เติมแอมโมเนียมไนเตรทและโปแตสเซียมไนเตรท ร่วมกับ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน มีอัตราการเกิดรากสูงสุดเฉลี่ย 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงยอดส้มบนวัสดุต่างๆ ร่วมกับใช้ IBA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน พบว่า ยอดที่เลี้ยงบนรังบวบมีอัตราการเกิดรากสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายต้นส้มไปปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่า มีอัตราการเกิดรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ หลังการย้ายปลูก 50 วัน

จิระศักดิ์ (2546) ศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BAP และ IAA ในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนนิวเซลลาร์ของส้มเขียวหวานพันธุ์บางมดในสภาพปลอดเชื้อ และได้อธิบายลักษณะเด่นของต้นอ่อนนิวเซลลาร์ดังนี้ (1) รากซึ่งเป็น primary root มีทิศทางการเจริญที่ไม่แน่นอน มีการเจริญช้ากว่ารากของต้นกล้าไซโกติก (2) ใบเลี้ยง มีรูปร่างไม่แน่นอน ขนาดของใบทั้ง 2 ข้าง ไม่เท่ากัน พื้นผิวด้านหน้าใบไม่เรียบ และมีขนาดเล็กกว่าใบเลี้ยงของต้นกล้าไซโกติก และ (3) ยอดอ่อนมีการเจริญเติบโตช้ากว่ายอดของต้นกล้าไซโกติก

อุบล (2556) การศึกษาวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มซ่า โดยพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดส้มซ่าด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที และการฟอกฆ่าเชื้อปลายยอด ส้มซ่าจากสภาพแปลงด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที มีการปนเปื้อนเพียง 27.5 เปอร์เซ็นต์ และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการชักนำยอดจากส่วนต่างๆ ของต้นกล้า (ยอด ใบเลี้ยง และข้อใบเลี้ยง) และปลายยอดจากต้นในสภาพแปลงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ชักนำยอดจากจำนวนมากที่สุดจากแต่ละส่วนคือ MS+BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.70 ยอด) MS+BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.40 ยอด) MS+BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร +IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (6.40 ยอด) และ MS+BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร +IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (2.90 ยอด) ตามลำดับ และอาหารที่ให้ความยาวยอดมากที่สุดคือ MS+BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (10.36 มิลลิเมตร) MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต (2.85 มิลลิเมตร) MS+BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร +IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (9.47 มิลลิเมตร) และ MS+BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร +IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (5.56 มิลลิเมตร) ตามลำดับ การชักนำรากส้มซ่าใน 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารทุกสูตร

ให้จำนวนรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ (1.00- 1.45 ราก) โดย MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตให้เปอร์เซ็นต์การออกรากมากที่สุด (91.68 เปอร์เซ็นต์) และความยาวรากมากที่สุด (3.02 เซนติเมตร) และสูตรอาหาร MS ไม่ใส่สาร NH_4NO_3 และ KNO_3 ทำให้ออกรากเร็วที่สุด 23.33 วัน ส่วนการย้ายออกปลูกพบว่า มีวัสดุ 3 ชนิดให้การรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ คือถ่านแกลบผสมทราย (1:1) ถ่านแกลบผสมดิน (1:1) กาบมะพร้าวสับผสมถ่านแกลบและดิน (1:1:1) และต้นกล้ามีการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปปลูกในสภาพแปลง