บทคัดย่อ

ในการวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูงได้ทำการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด ประกอบด้วย เกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน โดยเก็บกิ่งอ่อนของส้มที่ปลูกเลี้ยงในพื้นที่ของหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยตัวอย่างของใบส้มถูกนำมาตรวจโรคกรีนนิ่ง (citrus greening disease) ด้วยวิธี PCR และ ตรวจโรคทริสเตซ่า (citrus tristeza disease) ด้วยวิธี RT-PCR เพื่อระบุความปลอดโรคของตัวอย่างส้ม สำหรับขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของส้มที่ปลูกในแปลงปลูก ทำโดยนำชิ้นส่วนยอดหรือชิ้นส่วนข้อของพืชตระกูลส้มแช่ในน้ำสะอาดที่ผสมน้ำยากันเชื้อราชนิดคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนยอดหรือชิ้นส่วนข้อของส้มลงในสารละลายแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM™ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที วิธีการนี้ทำให้ได้ร้อยละของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน เท่ากับ ร้อยละ 50 ร้อยละ 60 และร้อยละ 60 ตามลำดับ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรจำนวน 9 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร Murashige and Skoog medium (MS) สูตร woody plant medium (WP) และ สูตร Linsmaier and Skoog medium (LS) ที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นขององค์ประกอบของสูตรอาหาร (ครึ่งเท่าและหนึ่งเท่าของสูตรมาตรฐาน) และความเข้มข้นของซูโครส (15 และ 30 กรัมต่อลิตร) พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มทั้ง 3 ชนิด บนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (½ LS + Su30) มีแนวโน้มที่ดีในการส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อเริ่มต้นให้เกิดยอด เนื่องจากมีค่าร้อยละของการเกิดยอดสูง โดยในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน บนอาหารสูตร ½ LS + Su30 มีค่าร้อยละของการเกิดยอดเท่ากับ ร้อยละ 70 ร้อยละ 100 และร้อยละ 70 ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS อาหารสูตร WPM และอาหารสูตร LS ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มของการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตรที่มีการเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารเหล่านี้ไม่แสดงผลอย่างชัดเจนต่อการเพิ่มปริมาณยอด อย่างไรก็ตามยอดที่เจริญบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 มียอดที่สุขภาพดีและมีใบสีเขียว

ในการศึกษาผลของการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัมควัท ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีการเจริญของเนื้อเยื่อเกิดเป็นยอดได้ ร้อยละ 100 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ มีจำนวนใบต่อยอดสูงที่สุดและใบมีความแข็งแรง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอน พบว่า อาหารสูตร ½

LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสม เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ร้อยละ 90 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีการเจริญของใบที่แข็งแรงและมีจำนวนใบต่อยอดสูง เมื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญของยอดส้มในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติม BAP (ชุดควบคุม) พบว่า การเจริญของยอดส้มบนอาหารที่เติม BAP มีค่าร้อยละของการเกิดยอดสูงกว่า และมีการส่งเสริมการเจริญในส่วนความยาวของยอดและส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบที่แข็งแรงต่อยอด อย่างไรก็ตาม ในการเพาะเลี้ยงไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอดอ่อน

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

Abstract

In the research and development of disease-free *Citrus* spp. mother plant production for growing highland areas, the tissue culture process of three species of citrus including grapefruit, kumquat and lemon were investigated. The young branches of *Citrus* spp. were collected from Pongnoi Research Units, Royal Agricultural Station Pang Da, Chiang Mai province. The sample of these citrus leaves are tested the citrus greening disease by using PCR method and tristeza disease by using RT-PCR method in order to identify that the citrus plant is disease-free. For surface sterilization procedure of field-grown citrus, shoot or nodal section were sterilized by immersed in 0.5 % carbendazim solution for 20 min, dipped in 70% (v/v) alcohol for 30 sec, immersed in 10% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v) Tween-20 solution for 10 min, and then immersed in 5% (v/v) Plant Preservative Mixture (PPM™) solution for 20 min. These procedure showed the percentage of survival in grapefruit, kumquat and lemon at 50%, 60% and 60% respectively.

In the *in vitro* cultivation, the explants were cultured on nine semi-solid medium such as MS, WPM and LS medium which different strength of medium (½ and full) and concentration of sucrose (15 and 30 g/L). In the results, ½ LS media supplemented with 30 g/L of sucrose showed positive effect on shoot induction. From this medium, the shoot induction rate of grapefruit, kumquat and lemon was 70%, 100% and 70% respectively after 4 weeks of cultivation. Moreover, the cultivation on all those medium supplemented with 30 g/L of sucrose induced greater shoot induction rate than medium supplemented with 15 g/L of sucrose. For 12 weeks of cultivation, those medium did not certainly effect on shoot multiplication. However, shoots on ½ LS medium supplement with 30 g/L sucrose were produced healthy shoots and greener leaves.

The experiments were carried out to determine the effect of exogenous cytokinin on *in vitro* shoot induction and multiplication of *Citrus* spp. In the *in vitro* culture of kumquat, the suitable medium were ½ LS medium containing with 30 g/L of sucrose and supplemented with 3 mg/L of BAP. From this treatment, the shoot induction rate was 100% after 4 weeks and it was achieved the highest number of

healthy leaves after 12 weeks of cultivation. In case of lemon, the suitable medium were ½ LS medium containing with 30 g/L of sucrose and supplemented with 2 or 3 mg/L of BAP. Under these formulas, the shoot induction rate were 90% after 4 weeks and they were achieved high number of healthy greener leaves after 12 weeks of cultivation. When compared to the medium with absent of BAP (control treatment), the *in vitro* growth of citrus shoots on medium supplemented with BAP produced higher shoot induction rate, enhanced shoot elongation and healthy leaves multiplication. However all treatment could not induce shoot multiplication.

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