

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การตรวจสอบโรคสำคัญจากกิ่งพันธุ์ส้ม

4.1.1 ผลการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Greening disease) ในตัวอย่างพืช

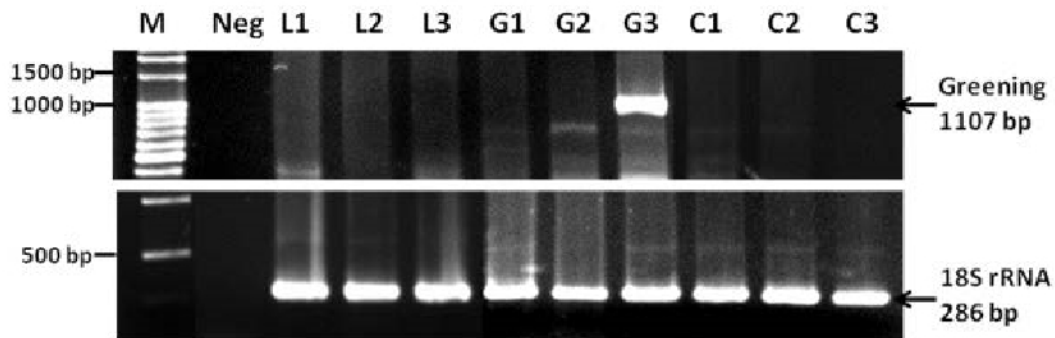
การตรวจเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Greening disease) ในตัวอย่างพืชตระกูลส้มด้วยวิธี PCR ได้นำใบสดของเลมอน คัมควัท และเกรฟฟรุ้ท อย่างละ 100 มิลลิกรัม มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัด GF-1-Plant DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) โดยในการเก็บยอดส้มในแต่ละครั้ง ทำการสุ่มยอดส้มมา 3 ตัวอย่างต่อ 1 ชนิดของส้ม ซึ่งได้ทำการเก็บยอดส้มจำนวน 3 ครั้ง (N=9) เมื่อวิเคราะห์ผลการสกัด DNA พบว่า

- 1) ได้ปริมาณ genomic DNA ระหว่าง 5-15 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างสด 100 มิลลิกรัม
- 2) ค่าความบริสุทธิ์ของ genomic DNA ที่สกัดได้ภายใต้อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสง $OD_{260/280}$ มีค่าตามมาตรฐานคือ 1.8

จากนั้นนำ genomic DNA 0.5 ไมโครกรัมมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ของเชื้อก่อโรครินนิ่งคือ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ซึ่งมีขนาด 1107 คู่เบส โดยใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนควบคุม (Internal marker) เพื่อควบคุมคุณภาพของ genomic DNA ที่สกัดได้จากพืช โดยแสดงตัวอย่างผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1107 คู่เบส ของเชื้อก่อโรครินนิ่งในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ดังภาพที่ 1

ผลการทดสอบ พบว่า

- 1) ตัวอย่างของใบเกรฟฟรุ้ท จำนวนร้อยละ 33.3 ของตัวอย่างใบที่นำมาตรวจสอบ มีการตรวจพบ แถบ 16S rRNA gene ของเชื้อก่อโรครินนิ่ง *Candidatus Liberibacter asiaticus* ขนาด 1,107 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเกรฟฟรุ้ทดังกล่าวมีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรครินนิ่ง
- 2) ตัวอย่างของใบเลมอนและคัมควัท ไม่ปรากฏแถบ 16S rRNA gene ของเชื้อก่อโรครินนิ่ง *Candidatus Liberibacter asiaticus* ขนาด 1,107 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลมอนและคัมควัทดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรครินนิ่ง



ภาพที่ 1 ผลผลิต PCR ของการตรวจยืนยัน 16S rRNA ขนาด 1107 คู่เบส ของเชื้อก่อโรครินนิ่ง ขนาด 1,107 คู่เบส ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดย L1-L3 คือ ตัวอย่างเลมอน, C1-C3 คือตัวอย่างคัมควัท และ G1-G3 คือ ตัวอย่างเกรฟฟรุ้ท ใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม และ Neg คือ Negative control PCR

4.1.2 ผลการตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ในตัวอย่างพืช

ในการตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristeza Virus* (CTV) ในตัวอย่างพืชตระกูลส้มด้วยวิธี RT-PCR ใช้ตัวอย่างส้ม 3 พันธุ์ ได้แก่ เลมอน คัมควัท และเกรฟฟรุ้ท จากหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ โดยนำใบสดของเลมอน คัมควัท และเกรฟฟรุ้ท อย่างละ 100 มิลลิกรัม นำมาสกัด Total RNA ด้วยสาร TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) โดยในการเก็บยอดส้มในแต่ละครั้ง ทำการสุ่มยอดส้มมา 3 ตัวอย่างต่อ 1 ชนิดของส้ม ซึ่งได้ทำการเก็บยอดส้ม จำนวน 3 ครั้ง (N=9) จากการวิเคราะห์ผลการสกัด RNA พบว่า

- 1) ได้ปริมาณ Total RNA ระหว่าง 15-22 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างสด 100 มิลลิกรัม
- 2) ค่าความบริสุทธิ์ของ Total RNA ที่สกัดได้ภายใต้อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสง OD₂₆₀/280 มีค่ามากกว่าค่ามาตรฐาน 1.8

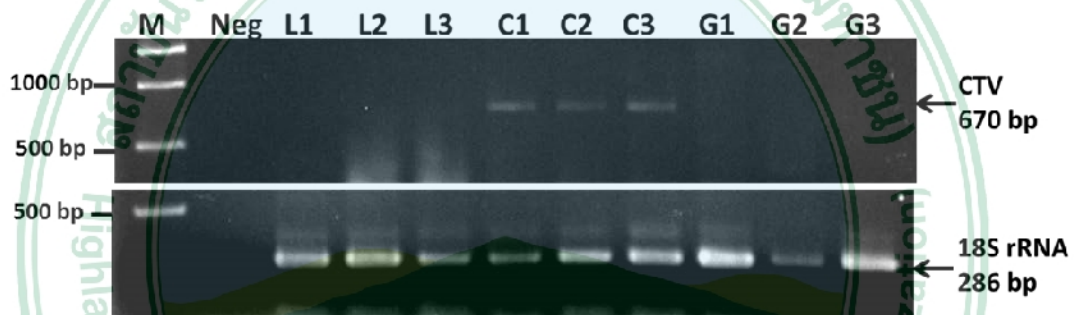
จากนั้นนำ Total RNA 2 ไมโครกรัมมาเป็นแม่แบบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ cDNA โดย M-MuLV Reverse Transcriptase (Vivantis, Malaysia) cDNA ที่ได้จะนำมาเป็น DNA template ในการทำ PCR ด้วย primers ที่ออกแบบจาก Coat protein (CP gene) ของไวรัส CTV มีขนาด 670 คู่เบส โดยใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนควบคุม (Internal marker) คุณภาพของ Total RNA ที่สกัดได้จากพืช แสดงตัวอย่างผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยืนยันของไวรัส CTV ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ดังภาพที่ 2

จากการทดลองเมื่อนำตัวอย่างมาตรวจไวรัส CTV ด้วยชุดไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนโปรตีนของไวรัส ผลการทดลองพบว่า

- 1) ตัวอย่างของใบคัมควัท จำนวนร้อยละ 66.7 ของตัวอย่างใบที่นำมาตรวจสอบ มีการตรวจพบ แถบของยีน CP ของไวรัส CTV ซึ่งขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างคัมควัทดังกล่าวมีการปนเปื้อนของไวรัส CTV

- 2) ตัวอย่างของใบเลมอนและเกรฟฟรุต ไม่ปรากฏแถบของยีน CP ของไวรัส CTV ซึ่งขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลมอนและเกรฟฟรุตดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV

จากการคัดเลือกและรวบรวมยอดส้มสามารถคัดเลือกยอดเลมอนที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรครินนิ่งและไวรัส Citrus Tristeza Virus ได้จำนวน 17 ยอด โดยทำการเพาะเลี้ยงยอดปลอดโรคเหล่านี้บนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารที่ทำให้อาหารแข็งตัว KELCOGEL® 3.0 กรัมต่อลิตร และทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ ปัจจุบันทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยยอดปลอดโรคที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเพิ่มความสูงของยอดและเพิ่มจำนวนใบ แต่ไม่มีการเพิ่มปริมาณยอด และไม่มีการพัฒนาของราก ในส่วนของคัมควัทและเกรฟฟรุตปัจจุบันยังไม่มียอดเพาะเลี้ยงที่ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรครินนิ่งและไวรัส Citrus Tristeza Virus



ภาพที่ 2 ผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีนของไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดย L1-L3 คือ ตัวอย่างเลมอน, C1-C3 คือ ตัวอย่างคัมควัท และ G1-G3 คือ ตัวอย่างเกรฟฟรุต ใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม และ Neg คือ Negative control PCR

4.2 การศึกษาวิธีการผลิตต้นส้มแม่พันธุ์ปลอดโรคของพืชตระกูลส้ม

4.2.1 ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดส้ม

ในการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเนื้อเยื่อส้มเพื่อการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ ทำการศึกษาจำนวน 3 วิธีการ ในแต่ละวิธีการทำซ้ำวิธีการละ 10 ยอด และทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง (N=20) โดย

วิธีการที่ 1 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที

วิธีการที่ 2 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที

วิธีการที่ 3 แช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าสารความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 10 นาที

ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดส้ม แสดงดังตารางที่ 1 โดย

- 1) ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดของเลมอน พบว่าวิธีการที่ 2 ใช้สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำ (ร้อยละ 15) และมีร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนสูง (ร้อยละ 85) ในขณะที่การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 3 มีร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำกว่า (ร้อยละ 5) วิธีการที่ 2 แต่มีค่าร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนต่ำกว่า (ร้อยละ 75) โดยเมื่อนำยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ายอดมีความยาวยอดเพิ่มขึ้น และมีการเจริญของใบที่ดีและแข็งแรง แต่ยังไม่มีการเกิดราก (ภาพที่ 3)
- 2) ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดของคัมควัท พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 3 โดยแช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าสารความถี่สูง (sonicator) เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำกว่าวิธีการอื่นๆ โดยลดอัตราการปนเปื้อนจุลินทรีย์ลงร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ 2 แต่เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อน พบว่าวิธีการที่ 2 มีร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนที่สูงกว่า (ร้อยละ 60) เนื่องจากชิ้นส่วนยอดที่ผ่านการฟอกด้วยวิธีการที่ 3 ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ แต่ไม่มีการเจริญหรือมีการเจริญของยอดที่ช้า (ภาพที่ 4 ก) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำยอดที่ผ่านการฟอกจากทั้ง 3 วิธีการมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามีทั้งยอดที่มีการเจริญเพิ่มความยาวยอด และมีการเจริญของใบที่ดี (ภาพที่ 4 ข) และยอดที่มีการเจริญช้า (ภาพที่ 4 ค และ ง) โดยยอดเหล่านี้มีการเกิดใบน้อยกว่า 1 คู่ และ/หรือมีความสูงของยอดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร ซึ่งจำนวนยอดเหล่านี้ไม่ถูกนำมานับรวมเป็นชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนสูง และยอดทั้งหมดยังไม่มีการเกิดราก
- 3) ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดของเกรพฟรุ๊ต พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการที่ 3 มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำกว่าวิธีการอื่นๆ และมีชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อน (ร้อยละ 15) โดยการปนเปื้อนทั้งหมดที่พบเป็นการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตาม ยอดที่ผ่านการฟอกมีการเจริญที่ช้า

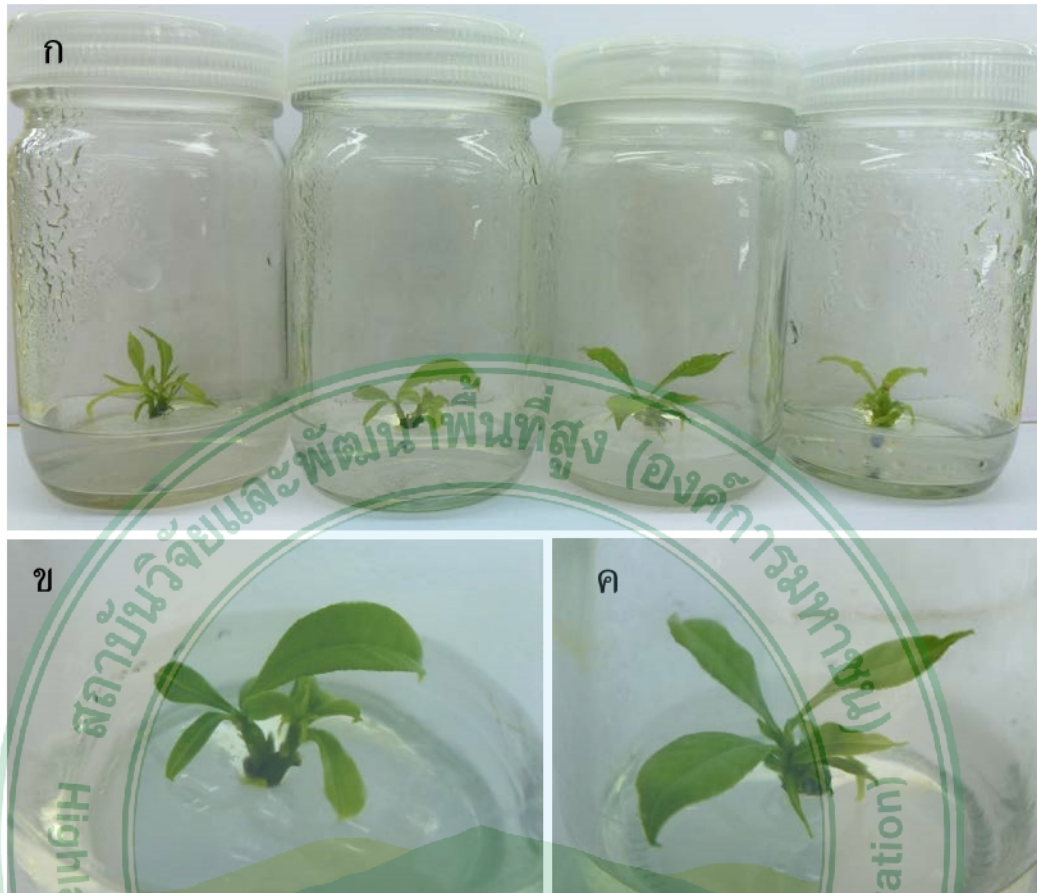
ตารางที่ 1 ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดของส้มที่มีต่อความสามารถในการเจริญเป็นต้นอ่อน โดยทำซ้ำวิธีการละ 10 ยอด และทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง (n=20)

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	ร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ *			ร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อน **		
	เลมอน	คัมควัท	เกรพฟรุ๊ต	เลมอน	คัมควัท	เกรพฟรุ๊ต
วิธีการที่ 1	20	50	95	70	45	0
วิธีการที่ 2	15	30	90	85	60	0
วิธีการที่ 3	5	15	60	75	50	15

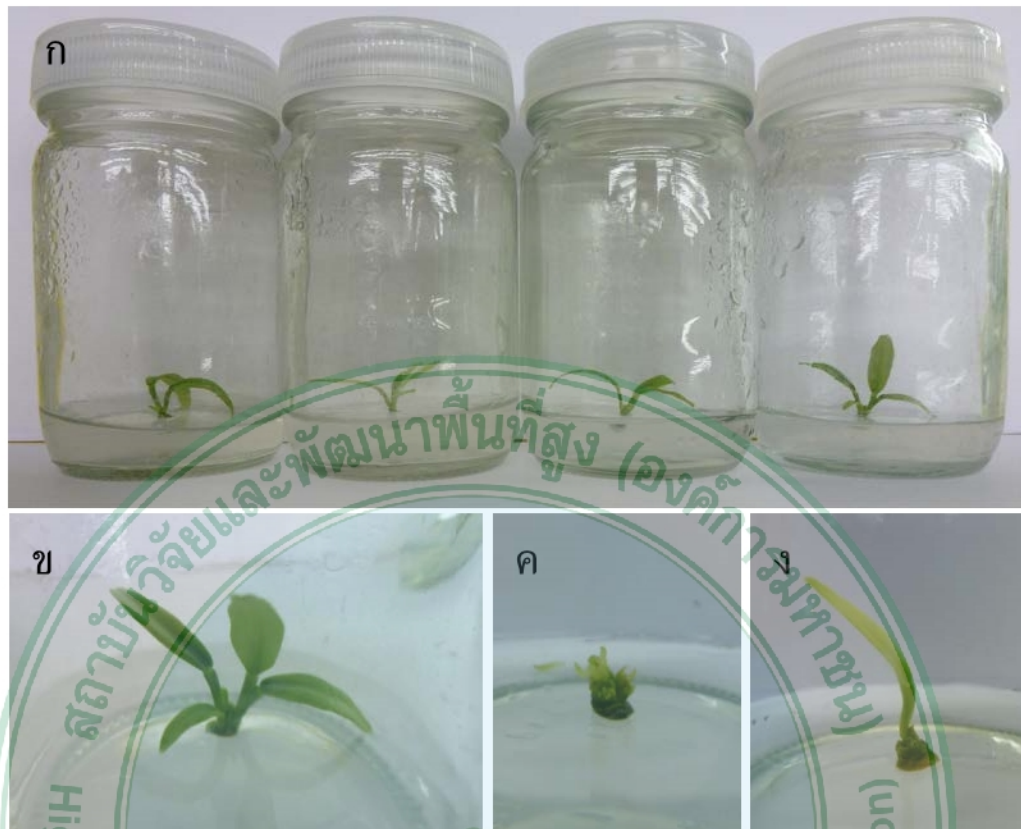
หมายเหตุ

* ผลจากการสังเกตการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย รา และยีสต์) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์

** ผลจากการสังเกตการเจริญเป็นยอดอ่อน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนนั้นจะต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ และมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร



ภาพที่ 3 (ก) ตัวอย่างการเจริญของชิ้นส่วนยอดของเลมอนหลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์; (ข) และ (ค) ตัวอย่างของยอดที่มีการเจริญที่ดี



ภาพที่ 4 (ก) ตัวอย่างการเจริญของชิ้นส่วนยอดของคัมควัท หลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์; (ข) ตัวอย่างของยอดที่มีการเจริญที่ดี; (ค) และ (ง) ตัวอย่างของยอดที่มีการเจริญช้า



ภาพที่ 5 ตัวอย่างการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นกับชิ้นส่วนยอดของเกรพฟรุ้ท

4.2.2 ผลการศึกษาและเปรียบเทียบชนิดของสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้ม

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนตายอดของส้มบนอาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร MS และ WPM ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โดยผลการศึกษาระดับเบื้องต้นที่ใช้อยอดเลมอนที่ปลอดโรคเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง พบว่า ชิ้นส่วนตายอดของเลมอนมีการเจริญได้ทั้งในการเพาะเลี้ยงที่ใช้อาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ อาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร WPM ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลของการเจริญในส่วนของจำนวนยอดและจำนวนใบต่อยอด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 6 และ 7) พบว่า ยอดเลมอนที่เพาะเลี้ยงเกือบทั้งหมดไม่มีการเพิ่มปริมาณยอดใหม่ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.1 – 1.2 ยอด มีจำนวนใบเฉลี่ย 3.1 – 3.5 ใบต่อยอด และ ยอดทั้งหมดไม่มีการเกิดราก ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนยอดจึงควรมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมการเจริญของยอดและเพิ่มปริมาณยอด และยอดเลมอนที่ได้มีการเจริญเพิ่มความยาวเข้าจึงควรมีการปรับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม หรือใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมเพื่อการส่งเสริมการเจริญของยอด และในส่วนของการเจริญของราก พบว่า ยอดทั้งหมดไม่มีการเกิดราก ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ยอดที่เจริญดีแล้วจึงควรมีการปรับสูตรอาหารโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมการเจริญของรากต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนตายอดเลมอนบนอาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร MS และ WPM ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

อาหารเพาะเลี้ยง	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนใบ (ใบ)	จำนวนยอดที่เกิดราก (เปอร์เซ็นต์)
MS	1.2 ± 0.4	3.5 ± 1.6	0
WPM	1.1 ± 0.3	3.1 ± 1.1	0
CV	0.33	0.21	-
T-test	ns	ns	-

หมายเหตุ

ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 6 ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอนภายใต้เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 7 ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอนภายใต้เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร WPM ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 การตรวจสอบโรคสำคัญจากกิ่งพันธุ์ส้ม

5.1.1 การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Greening disease) ในตัวอย่างพืช

จากการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (Greening disease) ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า ตัวอย่างใบของเลมอน และ คัมควัท ไม่พบการติดเชื้อสาเหตุของโรครินนิ่ง ในขณะที่ตัวอย่างใบของเกรพฟรุ้ท จำนวนร้อยละ 33.3 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรครินนิ่ง

5.1.2 การตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristaza Virus* (CTV) ในตัวอย่างพืช

จากการตรวจสอบไวรัส *Citrus Tristaza Virus* ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า ตัวอย่างใบของเลมอน และ เกรพฟรุ้ท ไม่พบการติดเชื้อไวรัส *Citrus Tristaza Virus* ในขณะที่ตัวอย่างใบของคัมควัท จำนวนร้อยละ 66.7 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อ *Citrus tristaza virus*

จากการศึกษานี้สามารถคัดเลือกยอดเลมอนจำนวน 17 ยอดที่ปลอดโรครินนิ่งและ ปลอดจากการติดเชื้อ *Citrus tristaza virus* ซึ่งยอดปลอดโรคเหล่านี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงและ เก็บรักษาอย่างระมัดระวัง บนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมชูโครส 30 กรัมต่อลิตร และทำการย้ายเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ ปัจจุบันทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยยอดปลอดโรคที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเพิ่มความสูงของยอดและเพิ่มจำนวนใบ แต่ไม่มีการ เพิ่มปริมาณยอด และไม่มีการพัฒนาของราก

5.2 การศึกษาวิธีการผลิตต้นส้มแม่พันธุ์ปลอดโรคของพืชตระกูลส้ม

5.2.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนยอดส้ม

ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ในกรณีของเลมอน พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว โดยการแช่ชิ้นส่วนตายอดในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และ สารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็น เวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพโดยมีร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำและ มี ร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนสูง ในกรณีของคัมควัทและเกรพฟรุ้ท แม้ว่าการ ฟอกฆ่าเชื้อบนเขย่าสารความถี่สูง สามารถลดค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ แต่ยังคงมี ค่าการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระดับที่สูง

5.2.2 การศึกษาและเปรียบเทียบชนิดของสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้ม

ในการศึกษาระดับเบื้องต้นที่ใช้ยอดเลมอนที่ปลอดโรคเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการ เพาะเลี้ยง พบว่า ชิ้นส่วนตายอดเลมอนมีการเจริญได้ทั้งในอาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม ชูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ อาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร WPM ที่เติมชูโครส 30 กรัมต่อลิตร โดย

ให้ผลของการเจริญในส่วนของจำนวนยอด และจำนวนใบต่อยอด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐานทั้ง 2 สูตร ไม่ใช่อาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์พืช เนื่องจากอาหารพื้นฐานทั้ง 2 สูตร ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเลมอนมีการเพิ่มปริมาณยอดและยอดมีการเกิดราก ดังนั้นจึงควรมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมการเจริญของยอดและเพิ่มปริมาณยอด และ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ยอดที่เจริญดีแล้วจึงควรมีการปรับสูตรอาหารโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่เหมาะสม เพื่อส่งเสริมการเจริญของรากต่อไป



ข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ แม้ว่าชิ้นส่วนตายอดของเลมอนสามารถเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS และ อาหารพื้นฐานสูตร WPM ที่มีชูโครส 30 กรัมต่อลิตร แต่ยอดที่ได้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนี้ยอดที่ได้ไม่มีการเกิดราก ทีมผู้วิจัยเห็นว่าการศึกษากการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์พืชตระกูลส้มที่ปราศจากโรคในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งได้แก่ การตรวจสอบผลของอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มจำนวนยอด และการชักนำให้ยอดเกิดรากเพื่อให้ได้ต้นกล้าที่แข็งแรงและมีสุขภาพที่ดี สถานะที่เหมาะสมเหล่านี้จะเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตต้นกล้าพืชตระกูลส้มที่ปราศจากโรค

