รายงานฉบับสมบูรณ์
(Final Report)

โครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคบนพื้นที่สูง

Sub-Project 3: Research and Development of Disease-free *Citrus* spp. Mother Plant Production on Growing Highland Areas

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตพืชตระกูลส้มปลอดภัย

แผนงานวิจัย: เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตรบนพื้นที่สูง

โดย

ปิยะมาศ ศรีรัตน์ และคณะ

สนับสนุนทุนวิจัยโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

รายงานฉบับสมบูรณ์
(Final Report)

โครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคบนพื้นที่สูง

Sub-Project 3: Research and Development of Disease-free *Citrus* spp. Mother Plant Production on Growing Highland Areas

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตพืชตระกูลส้มปลอดภัย

แผนงานวิจัย: เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตรบนพื้นที่สูง

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นางสาวปิยะมาศ ศรีรัตน์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. นางมลธิรา ศรีถาวร (ทองอนันต์)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว	มูลนิธิโครงการหลวง
4. นายวรากร รำมะวุธ	มูลนิธิโครงการหลวง

พฤศจิกายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 เพื่อใช้ในการดำเนินการตลอดโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวง สถานีเกษตรหลวงปางดะ หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาตัวอย่างพืชและให้การสนับสนุนในด้านบุคลากรเพื่อช่วยเหลือในระหว่างดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ดร.อัจฉรา ภาวศุทธิ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ให้คำแนะนำและช่วยประสานงานในระหว่างการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือและทำให้โครงการวิจัยนี้ประสบสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย
พฤศจิกายน 2562

คณะผู้วิจัย

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

1.1 ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวปิยะมาศ ศรีรัตน์

หน่วยงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ที่อยู่ 1 หมู่ 6 ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

2. ชื่อนักวิจัยโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

2.1 ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางมลธิรา ศรีถาวร (ทองอนันต์)

หน่วยงาน โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ที่อยู่ 1 หมู่ 6 ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

2.2 ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวมาริษา สุขปานแก้ว

หน่วยงาน สถานีเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง

ที่อยู่ 192 หมู่ 10 ตำบลสะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ 50250

2.3 ชื่อ-สกุล นายวรากร รำมะวุธ

หน่วยงาน หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง

ที่อยู่ 192 หมู่ 10 ตำบลสะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ 50250

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

1. บทนำ

พืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) เป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทางเศรษฐกิจ บริโภคทั้งในลักษณะรับประทานเป็นผลไม้สดและผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น น้ำผลไม้ ในประเทศไทยโดยมูลนิธิโครงการหลวงได้คัดเลือกชนิดและพันธุ์ส้มเพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในพื้นที่สูง โดยชนิดของส้มที่มีศักยภาพ ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท อย่างไรก็ตาม โรคของพืชตระกูลส้มเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกส้ม ซึ่งโรคเหล่านี้ส่งผลอย่างรุนแรงทำให้ผลผลิตและคุณภาพของผลไม้ลดลง

โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening disease) เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างรุนแรง มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* โรคกรีนนิ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญเสียในหลายพื้นที่ของการปลูกส้มในเอเชียและแอฟริกา ก่อนที่จะถูกระบุว่าเป็นโรคของพืชแบบเดียวกัน โรคกรีนนิ่งถูกเรียกในชื่อที่แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค เช่น ในประเทศจีน เรียกว่า yellow shoot หรือ huanglongbing; ในไต้หวัน เรียกว่า likubin; ในอินเดีย เรียกว่า dieback; ในฟิลิปปินส์ เรียกว่า leaf mottle ในแอฟริกาใต้ เรียกว่า yellow branch, blotchy-mottle หรือ greening ต่อมา เมื่อมีความชัดเจนถึงลักษณะของโรค และระบุว่าเป็นโรคเดียวกัน จึงเรียกโรคนี้ว่า “greening” (Graca, 1991) ในไต้หวันไม่มีการรายงานว่าสายพันธุ์ส้มที่ปลูกในเชิงพาณิชย์มีความต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง นอกจากนี้ ยังไม่มีการเสนอวิธีที่จะใช้รักษาโรคกรีนนิ่งในส้มได้ แม้ว่าอาการของโรคจะมีความแตกต่างกันไป แต่มักเริ่มต้นด้วยอาการใบมีสีเหลือง มีการเสื่อมของกิ่งก้านและรากก่อนวัยที่ควรจะเกิดขึ้น และสุดท้ายต้นไม้ค่อยๆ มีความแข็งแรงลดลงและต้นส้มทั้งต้นจะเหี่ยวและแห้งตาย (Su, 2008)

โรคพืชที่เกิดจากไวรัสจัดเป็นหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดการลดลงของปริมาณผลผลิตและการเพาะปลูกเกิดความเสียหาย โดย *Citrus tristeza virus* เป็นไวรัสในสกุล Closterovirus ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆที่มีผลต่อพืชตระกูลส้มอย่างมาก (Moreno *et al*., 2008) ในปี ค.ศ. 1920 โรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* ได้ทำลายอุตสาหกรรมส้มในอเมริกาใต้และแอฟริกา และต่อมามีการแพร่ระบาดของโรคไปทั่วโลกอย่างรวดเร็ว ไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ชื่อ CTV-D ถูกพบครั้งแรกในไต้หวันในปี ค.ศ. 1981 โดยไวรัส CTV-D ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการปลูกส้มโอในระดับอุตสาหกรรม มีการรายงานถึงโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* ว่าจะไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตส้มโอที่ปลูกภายใต้อุณหภูมิที่ร้อนในประเทศเขตร้อน อย่างไรก็ตาม มีรายงานเกี่ยวกับโรคที่เกิดจาก *Citrus tristeza virus* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตส้มแมนดารินในอเมริกาใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยทำให้ต้นแคระแกรนและทำให้ผลผลิตและคุณภาพของส้มลดลง อาการของโรคที่เกิดจากไวรัสมีอาการที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัส สายพันธุ์ของส้ม และการร่วมกันของยอดพันธุ์ดีและต้นตอในการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเสียบยอด ในไต้หวันนิยมทำการขยายพันธุ์ส้มโดยวิธีการเสียบยอด โดยยอดส้มที่ไม่ต้านทานโรค แต่มีลักษณะที่ดีในการให้ผลผลิตจะถูกเสียบยอดบนต้นตอที่ทนต่อ *Citrus tristeza virus* ซึ่งต้นส้มจะไม่แสดงอาการแม้ว่าจะติดเชื้อไวรัส (Su, 2008)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิควิธีหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการใช้เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชจำนวนมากที่มีคุณลักษณะตรงตามต้นแม่พันธุ์ โดยทั่วไปแล้วต้นอ่อนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนราหรือแบคทีเรียในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปรากฏลักษณะเด่นชัด ดังนั้น จึงสามารถคัดแยกเพื่อกำจัดต้นอ่อนของพืชที่มีการติดโรคจากเชื้อราหรือแบคทีเรียออกได้ตั้งแต่ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นนั้น การปรากฏลักษณะที่บ่งบอกว่ามีการปนเปื้อนของไวรัสจึงสังเกตเห็นได้ยาก ส่วนใหญ่อาการของพืชที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏภายหลังจากที่นำพืชไปปลูก นอกจากนี้ไวรัสสามารถถ่ายทอดและทำให้ติดเชื้อได้อย่างง่ายดายในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้น ในการผลิตต้นกล้าปลอดไวรัส ต้นแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องเป็นพืชที่ปลอดไวรัสอย่างแท้จริง

หลักการพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วยการคัดเลือกเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากต้นพืช การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อให้มีการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ถูกควบคุม และการปรับตัวของต้นพืชเพาะเลี้ยงที่ได้เมื่อย้ายมาปลูกเลี้ยงในโรงเรือน

จากการศึกษาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 และ 2561 โดยศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค ตัวอย่างส้มที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากต้นส้มเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่มีสุขภาพที่ดีที่ปลูกในพื้นที่หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ การตรวจโรคเพื่อระบุการปลอดโรคของพืชตระกูลส้ม ทำโดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบของส้มแต่ละชนิดมาทำการตรวจโรคกรีนนิ่ง โดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และในการตรวจโรคทริสเตซ่า ทำโดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997 โดยส้มปลอดโรคเหล่านี้จะถูกใช้เป็นแห่งของเนื้อเยื่อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค

ในการเตรียมตัวอย่างพืชตระกูลส้มและการทำให้ปลอดเชื้อ ทำโดยการเก็บกิ่งอ่อนส้มจากต้นส้มที่มีสุขภาพดีและไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค โดยใช้กิ่งส้มที่มีข้อ 3-5 ข้อซึ่งมีความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร นำกิ่งส้มมาริดใบออก ตัดกิ่งส้มให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นล้างทำความสะอาดอย่างระมัดระวังเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่บริเวณผิวออก ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทำโดยการตัดชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ด้วยใบมีดที่ปลอดเชื้อ นำชิ้นส่วนข้อมาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในน้ำสะอาดที่ผสมน้ำยากันเชื้อราชนิดคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างน้ำยากันเชื้อราออกโดยแช่ในน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยล้างจำนวน 3 รอบ นำชิ้นส่วนข้อของส้มมาจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างโดยแช่ในน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ย้ายชิ้นส่วนข้อมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที นำมาล้างน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง โดยแต่ละ

ครั้งแช่ในน้ำนาน 10 นาที เพื่อล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออก จากนั้นนำมาแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM™ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที โดยในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท มีค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ เท่ากับ ร้อยละ 60 ร้อยละ 60 และร้อยละ 50 ตามลำดับ

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อเริ่มต้นเกิดยอดและการเจริญเพิ่มปริมาณยอด โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างของส้มขนาดประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร บนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน จำนวน 9 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร Murashige and Skoog medium (MS) สูตร woody plant medium (WP) และ สูตร Linsmaier and Skoog medium (LS) ที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นขององค์ประกอบของสูตรอาหาร (ครึ่งเท่า และหนึ่งเท่าของสูตรมาตรฐาน) และความเข้มข้นของซูโครส (15 และ 30 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างบนอาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบของสูตรอาหารครึ่งเท่าของสูตรมาตรฐาน และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (½ LS + Su30) มีแนวโน้มที่ดีในการส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อเริ่มต้นให้เกิดยอด และยอดที่ได้มีสุขภาพที่ดีและมีใบสีเขียว นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตรมีแนวโน้มของการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตรที่เติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร ในด้านการส่งเสริมให้มีการเพิ่มปริมาณยอด พบว่าสูตรอาหารทั้ง 9 สูตรไม่แสดงผลที่ชัดเจนในด้านการเพิ่มปริมาณยอด

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างของส้ม ขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าการเติม BAP ลงในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยส่งเสริมการชักนำให้เกิดยอด โดยการเจริญของยอดส้มบนอาหารที่เติม BAP มีค่าร้อยละของการเกิดยอดและจำนวนใบสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP อย่างไรก็ตาม ในการเพาะเลี้ยงไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณยอด และยอดส้มที่ได้เกือบทั้งหมดไม่มีการพัฒนาของราก ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอน การเติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้เนื้อเยื่อเริ่มต้นมีค่าร้อยละของการเกิดยอดได้สูงที่สุด ในขณะที่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัมควัท พบว่าการเติม BAP ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการส่งเสริมการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของยอด ซึ่งยอดเลมอนและคัมควัทที่ได้มีการเจริญของใบที่ดี และมีใบสีเขียวที่แข็งแรง ในกรณีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ท พบว่าการเติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละของการเกิดยอดสูงสุดที่ร้อยละ 50 อย่างไรก็ตามยอดที่ได้มีการเจริญของยอดและใบที่ช้า

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยเพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มที่ปลอดโรค โดยในการศึกษานี้พิจารณาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดราก ในขั้นตอนการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มที่ปลอดโรคทำการประเมินผลของการบำบัดด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียวและร่วมกับการใช้เคมีบำบัดด้วย ribavirin เพื่อกำจัดไวรัส CTV ในพืชตระกูลส้ม และทำการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มที่ปลอดโรค

2. วัตถุประสงค์

โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคบนพื้นที่สูง เป็นโครงการวิจัยที่มีแผนการดำเนินการ 3 ปี โดยในปีที่ 3 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้ม โดยในการศึกษานี้พิจารณาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดราก ในขั้นตอนการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มที่ปลอดโรคทำการประเมินผลของการบำบัดด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียวและร่วมกับการใช้เคมีบำบัดด้วย ribavirin เพื่อกำจัดไวรัส CTV ในพืชตระกูลส้ม และพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มที่ปลอดโรค

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ในการวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ทำการศึกษาวิธีการเพื่อชักนำให้ยอดส้มเกิดรากจำนวน 2 วิธีการ ในการศึกษาใช้ยอดอ่อนที่ปลอดเชื้อและแข็งแรงซึ่งมีความยาวยอด 2.5-3.0 เซนติเมตรของพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด ได้แก่ เลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท เป็นยอดเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดราก การชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการที่ 1 ทำโดยย้ายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเพื่อการเพาะเลี้ยงยอด (อาหารสูตร ½LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินชนิด BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ gellan gum 3 กรัมต่อลิตร) มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเดิม (อาหารสูตรเพื่อการเพาะเลี้ยงยอด) ที่เสริมด้วยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และวิธีการที่ 2 โดยนำยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเพื่อการเพาะเลี้ยงยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง (อาหารสูตร ½LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและ gellan gum 3 กรัมต่อลิตร) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่าการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการที่ 2 เป็นวิธีการที่เหมาะสม ยอดทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดแคลลัสและต้นอ่อนที่ได้มีความแข็งแรง โดยในการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนบนอาหารสูตร ½LS + Su30 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่ดีในการชักนำให้ยอดเกิดราก โดยมีจำนวนยอดที่เกิดรากร้อยละ 70 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้ยอดเกิดรากได้ร้อยละ 40 ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้ยอดเกรพฟรุ้ทเกิดราก พบว่าการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติม IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันทั้ง 5 ระดับ (0 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่ทำให้เกิดการชักนำให้ยอดเกรพฟรุ้ทเกิดรากได้ อย่างไรก็ตามยอดที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดแคลลัส

ในการศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดโดยอุณหภูมิ (thermotherapy) เพียงอย่างเดียวและการบำบัดโดยอุณหภูมิร่วมกับการบำบัดโดยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการกำจัดไวรัส CTV ในเนื้อเยื่อส้มคัมควัท ผลการศึกษา พบว่าการบำบัดโดยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวและการบำบัดโดย

อุณหภูมิร่วมกับการบำบัดโดยสารเคมี ด้วยสาร ribavirin มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของพืชเพาะเลี้ยงหลังผ่านการบำบัด วิธีการบำบัดร่วมกันโดยการบำบัดด้วยการใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (R25+T40) มีจำนวนยอดที่มีชีวิตและมีการเจริญเติบโตได้หลังผ่านการบำบัดน้อยที่สุด คือ ที่ร้อยละ 40 ในส่วนของการบำบัดที่ใช้อุณหภูมิสูง (ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีชีวิตที่มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าการบำบัดที่ใช้อุณหภูมิต่ำกว่า (อุณหภูมิสูง 25 และ 35 องศาเซลเซียส) ในการบำบัดร่วมกันโดยการบำบัดด้วยสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิเดียวกัน พบว่า มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีชีวิตที่มีการเจริญในปริมาณใกล้เคียงกัน ในขณะที่การบำบัดด้วยสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ที่ความเข้มข้นที่เท่ากัน แต่ทำที่อุณหภูมิที่ต่างกัน พบว่าการใช้อุณหภูมิในการบำบัดที่ต่ำกว่า มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีชีวิตที่มีการเจริญสูงกว่ากรณีที่ใช้อุณหภูมิสูง ในการศึกษาครั้งนี้ยอดคัมควัทที่ได้จากทุกกรรมวิธีของการบำบัด ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ดังนั้น จึงยังไม่สามารถชี้บ่งได้อย่างชัดเจนว่าการบำบัดโดยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียว และการบำบัดโดยอุณหภูมิร่วมกับการบำบัดโดยสารเคมีด้วยสาร ribavirin มีผลต่อการกำจัดไวรัส CTV สิ่งที่น่าจะเป็นไปได้ คือ ในยอดของคัมควัทอาจมีปริมาณไวรัส CTV ปนเปื้อนอยู่น้อยมากในลักษณะไวรัสที่แฝงอยู่ในต้นพืช อีกทั้งสารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อ เช่น แอลกอฮอล์ สารละลายคลอรอกซ์ และสารยับยั้งจุลินทรีย์ ชนิด PPM™ อาจมีผลต่อไวรัส

ในการศึกษาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค โดยวิธีการที่ 1 การต่อยอด (grafting) ทำโดยการต่อยอดของยอดพันธุ์ดี (scion) ซึ่งได้แก่ ยอดเลมอน คัมควัท เกรพฟรุ้ท ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปวางบนต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่ใช้เป็นต้นตอ (rootstock) วิธีการโดยสรุปดังแสดงในภาพที่ 1 และวิธีการที่ 2 การต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ทำโดยใช้ยอดเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทที่ได้ปลอดไวรัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นยอดพันธุ์ดี (scion) และใช้ต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่ได้จากการเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจนเป็นต้นอ่อนที่มีใบและสมบูรณ์เป็นต้นตอ (rootstock) ทำการเตรียมต้นตอส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราเพื่อใช้เป็นส่วนราก โดยทำการตัดส่วนบนของต้นตอออกและทำให้เกิดแผลขนาดเล็กไว้ด้านบนบริเวณที่ตัด จากนั้นนำส่วนยอดของยอดพันธุ์ดีซึ่งถูกตัดตรงปมให้เป็นรูปตัววีวางเสียบใส่บนรอยแผลที่ตัดเตรียมไว้บนต้นตอ นำต้นอ่อนส้มที่ผ่านการเสียบยอดแล้วไปเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารบนอาหารกึ่งแข็งสูตร DKW + Su30 ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภาพที่ 2 และ 3 แสดงขั้นตอนการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ผลของการต่อยอดส้ม (grafting) หลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในกรณีของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท มีค่าร้อยละของการต่อสำเร็จ เท่ากับ ร้อยละ 80 ร้อยละ 70 และร้อยละ 40 ตามลำดับ ในส่วนของการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ในกรณีของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท มีค่าร้อยละของการต่อสำเร็จ หลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เท่ากับ ร้อยละ 70 ร้อยละ 76.92 และร้อยละ 42.86 ตามลำดับ นำต้นกล้าส้มที่ได้การต่อยอดด้วยยอดพันธุ์ดีของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทมาทำการอนุบาลต้นกล้าและย้ายไปปลูกเลี้ยงในโรงเรือน เมื่อสุ่มตัวอย่างจากต้นกล้าส้มที่มีสุขภาพดีมาทำการตรวจโรค ผลการตรวจโรคบ่งชี้ว่าตัวอย่างของต้นกล้าส้มเป็นต้นที่ปลอดโรคกรีนนิ่ง

และโรคทริสเตซ่า จากผลการศึกษานี้พบว่าการต่อยอดโดยใช้ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่สุขภาพดีเป็นต้นตอและใช้ยอดปลอดโรคของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทท่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นวิธีการที่มีประโยชน์ในการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค

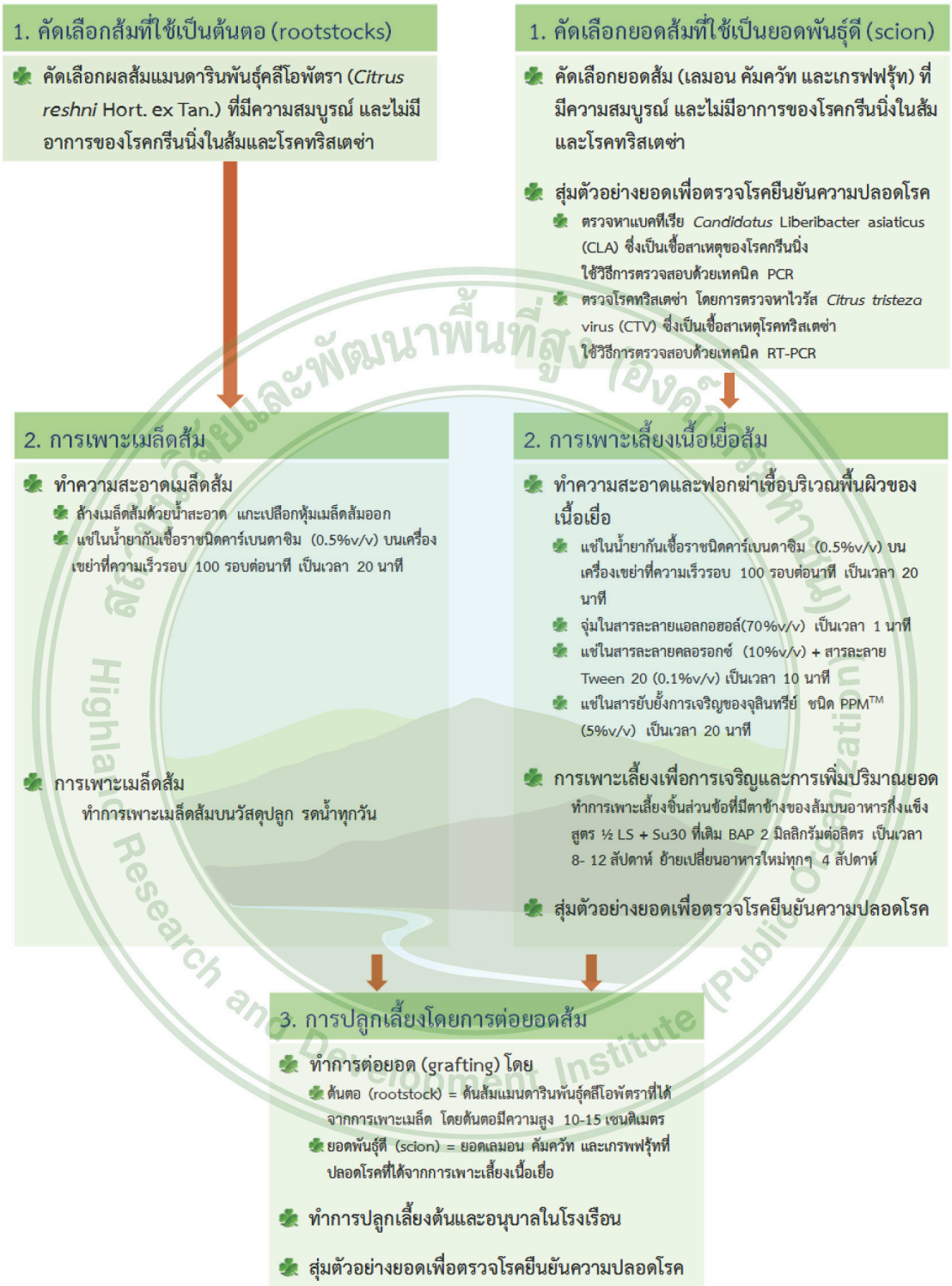
4. สรุป

ในการศึกษาและพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้มได้ทำการศึกษาวิธีการในการชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดราก จากผลการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดพืชตระกูลส้มเกิดรากคือ การนำยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเพื่อการเพาะเลี้ยงยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง (อาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและ gellan gum 3 กรัมต่อลิตร) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายยอดส้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร) การชักนำให้ยอดของพืชตระกูลส้มเกิดรากด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ ทำให้ยอดทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงได้มีการเจริญโดยไม่มีการเกิดแคลลัสและต้นอ่อนที่ได้มีความแข็งแรง ในการเพาะเลี้ยงยอดเลมอนบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่ดีในการชักนำให้ยอดเกิดราก โดยมีจำนวนยอดที่เกิดรากร้อยละ 70 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงยอดคัมควัทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้ยอดเกิดรากได้ร้อยละ 40 ในกรณีของเกรพฟรุ้ทพบว่าการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติม IBA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ไม่ทำให้เกิดการชักนำให้ยอดเกรพฟรุ้ทเกิดรากได้ อย่างไรก็ตามยอดที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดแคลลัส

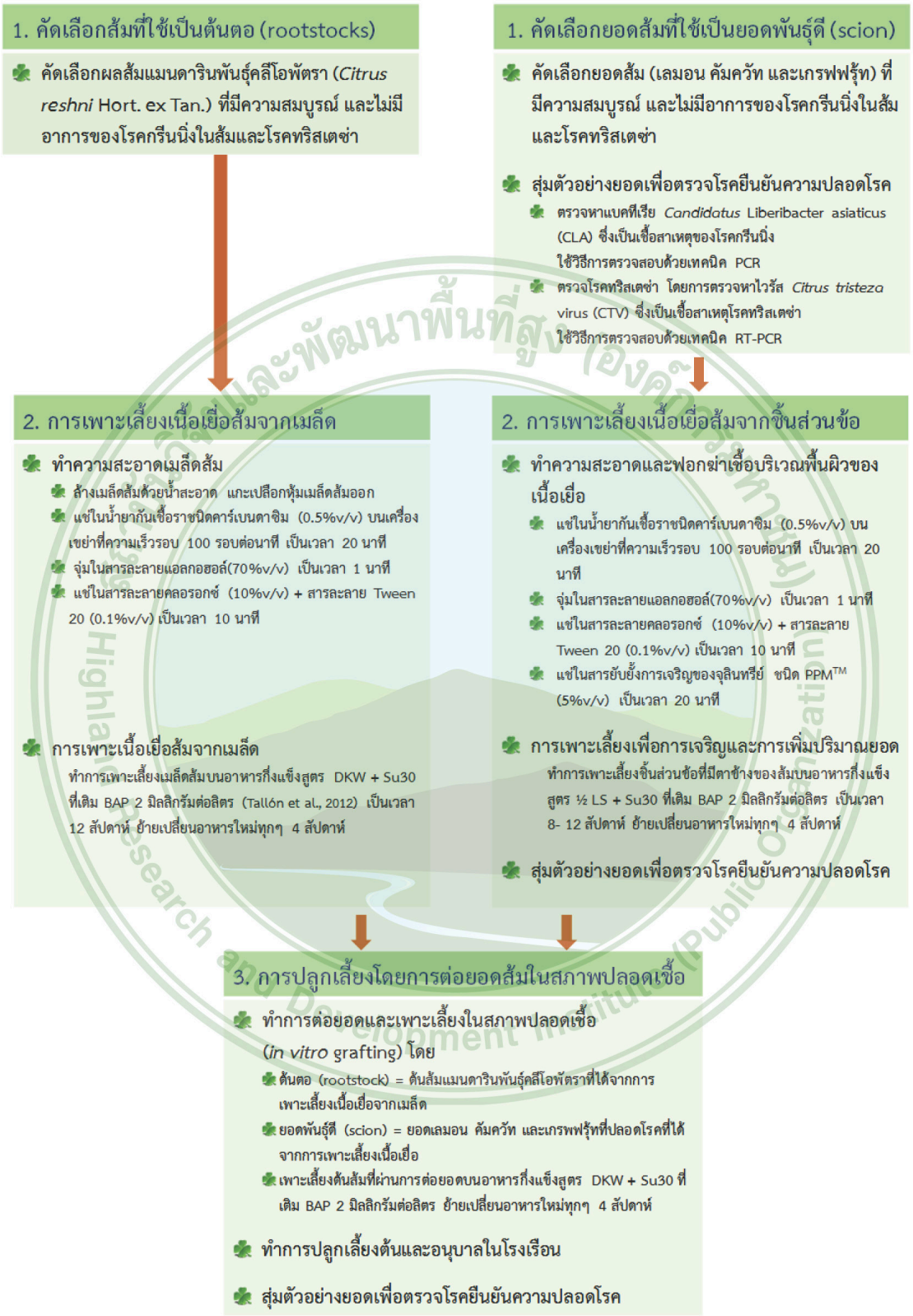
ในการศึกษาประสิทธิภาพของการบำบัดโดยอุณหภูมิ (thermotherapy) เพียงอย่างเดียวและการบำบัดโดยอุณหภูมิร่วมกับการบำบัดโดยสารเคมี (chemotherapy) ต่อการกำจัดไวรัส CTV ในเนื้อเยื่อส้มคัมควัท ผลการศึกษา พบว่า การบำบัดโดยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวและการบำบัดโดยอุณหภูมิร่วมกับการบำบัดโดยสารเคมีด้วยสาร ribavirin มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของพืชเพาะเลี้ยงหลังผ่านการบำบัด วิธีการบำบัดร่วมกันโดยการบำบัดด้วยการใช้สารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิ โดยใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (R25+T40) มีจำนวนยอดที่มีชีวิตและมีการเจริญเติบโตได้หลังผ่านการบำบัดน้อยที่สุด คือที่ร้อยละ 40 ในส่วนของการบำบัดที่ใช้อุณหภูมิสูง (ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีชีวิตที่มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าการบำบัดที่ใช้อุณหภูมิต่ำกว่า (อุณหภูมิสูง 25 และ 35 องศาเซลเซียส) ในการบำบัดร่วมกันโดยการบำบัดด้วยสารต้านไวรัส ชนิด ribavirin ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการบำบัดด้วยอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิเดียวกัน พบว่า มีค่าร้อยละของจำนวนยอดที่มีชีวิตที่มีการเจริญในปริมาณใกล้เคียงกัน ในการศึกษาครั้งนี้ยอดคัมควัทที่ได้จากทุกกรรมวิธีของการบำบัด ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ดังนั้นจึงยังไม่สามารถชี้บ่งได้อย่างชัดเจนว่าการบำบัดโดยอุณหภูมิเพียงอย่างเดียวและการบำบัดโดยอุณหภูมิร่วมกับการบำบัดโดยสารเคมี ด้วยสาร ribavirin มีผลต่อการกำจัดไวรัส CTV สิ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ ในยอดของคัมควัทอาจมีปริมาณไวรัส CTV ปนเปื้อนอยู่น้อยมากในลักษณะไวรัสที่แฝงอยู่ในต้นพืช อีกทั้งสารที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

บริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อ เช่น แอลกอฮอล์ สารละลายคลอรอกซ์ และสารยับยั้งจุลินทรีย์ ชนิด PPM™ อาจมีผลต่อไวรัส

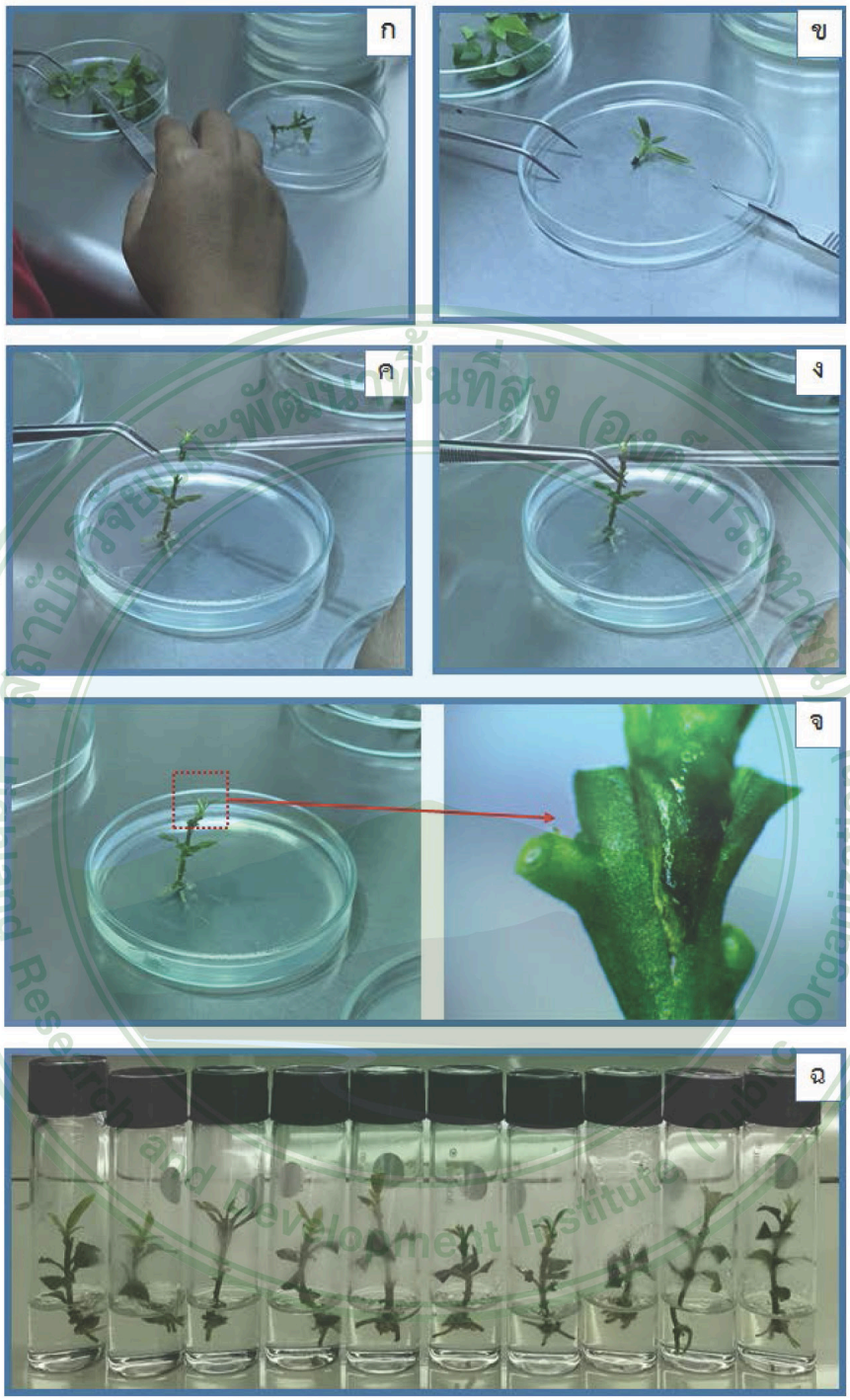
ในการศึกษาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค โดยวิธีการที่ 1 การต่อยอด (grafting) ทำโดยการต่อยอดของยอดพันธุ์ดี (scion) ซึ่งได้แก่ ยอดเลมอน คัมควัท เกรพฟรุ้ท ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปวางบนต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่ใช้เป็นต้นตอ (rootstock) วิธีการโดยสรุปดังแสดงในภาพที่ 1 ผลของการต่อยอดส้ม หลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในกรณีของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท มีค่าร้อยละของการต่อสำเร็จ เท่ากับ ร้อยละ 80 ร้อยละ 70 และร้อยละ 40 ตามลำดับ วิธีการที่ 2 ทำการศึกษาการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) วิธีการในการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ แสดงดังภาพที่ 2 และ 3 โดยในการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) ในกรณีของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท มีค่าร้อยละของการต่อสำเร็จหลังการเสียบยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เท่ากับ ร้อยละ 70 ร้อยละ 76.92 และร้อยละ 42.86 ตามลำดับ เมื่อนำต้นกล้าส้มที่ได้การต่อยอดด้วยยอดพันธุ์ดีของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ทมาทำการอนุบาลต้นกล้าและย้ายไปปลูกเลี้ยงในโรงเรือน โดยผลการตรวจโรคบ่งชี้ว่าตัวอย่างของต้นกล้าส้มเป็นต้นที่ปลอดโรคกรีนนิ่งในส้มและโรคทริสเตซ่า จากผลการศึกษานี้พบว่าการต่อยอดโดยใช้ต้นส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่สุขภาพดีเป็นต้นตอและใช้ยอดปลอดโรคของเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ททได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นวิธีการที่มีประโยชน์ในการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค



ภาพที่ 1 การผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค ด้วยวิธีการต่อยอด (grafting)



ภาพที่ 2 การผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค ด้วยวิธีการต่อยอดที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting)



ภาพที่ 3 วิธีการต่อยอดส้มที่ทำในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* grafting) โดย (ก) ต้นอ่อนส้มแมนดารินพันธุ์คลีโอพัตราที่การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่ใช้เป็นต้นตอ (rootstock) มาตัดบริเวณยอดออกและทำให้เป็นรอยแผลสำหรับการเสียบยอด, (ข) ยอดส้มที่ปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้เป็นยอดพันธุ์ดี (scion), (ค) (ง) และ (จ) นำยอดส้มพันธุ์ดี ซึ่งตัดให้ส่วนปลายล่างมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมาเสียบลงบนต้นตอ และ (ฉ) นำต้นอ่อนส้มที่ผ่านการเสียบยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร DKW ในสภาพปลอดเชื้อ

Executive Summary

1. Introduction

Citrus spp. is one of the most economically important fruits corps. The fruit is consumed as fresh fruit and processed product such as fruits juice. In Thailand, the Royal Project Foundation selects the potential variety of citrus fruit including lemon, grapefruit and kumquat in order to promote these citrus for planting in highland areas. However, the disease is one of major problems in citrus cultivation, which have brought about serious yield loss and deterioration of fruit quality.

Citrus greening disease is a seriously microbial disease caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Greening disease is a major cause of crop and tree loss in many parts of Asia and Africa. Before it was identified as one disease, it had been known by various names: yellow shoot (huanglongbing) in China; likubin (decline) in Taiwan; dieback in India; leaf mottle in the Philippines; and yellow branch, blotchy-mottle, or greening in South Africa. As it became clear that all these similar diseases, the name "greening" was widely adopted (Graca, 1991). In Taiwan, commercial citrus cultivars possess resistance to greening disease has not been reported (Su, 2008). Moreover, method for curing greening disease has not been proposed. Although the disease symptoms differ to some extent among cultivars, it commonly starts with yellowing of leaf veins and adjacent tissue. Premature defoliation will follow, and dieback of twigs, decay of feeder rootlets and lateral roots are the next stages of symptom development. Finally, the tree gradually declines in vigor and the entire plant withers (Su, 2008).

Viral disease is considered as one of the most important case of yield loss and cultivar decline. *Citrus tristeza virus*, a member of genus *Closterovirus* is the causal agent of various diseases with dramatically effects on citrus crops (Moreno *et al.,* 2008). In 1920 *Citrus tristeza virus* devastated the citrus industry in South America and Africa and it has rapidly spread worldwide. A new strain, CTV-D, was first identified in Taiwan in 1981 which has seriously damaged pummelo industry causing tree dwarfing. The *Citrus tristeza virus* was considered not to damage the pummelo badly under warm temperature in the tropics. However, there have been some

reports of virulent strains attacking sweet orange and/or mandarin in South America and South East Asia. These strains cause severe stem pitting and stunting, and resulting to deterioration of fruit yield and quality. The virus causes a variety of disease symptoms on citrus depending upon virus strain, citrus variety and scion-rootstock combination. In Taiwan, all the citrus cultivars are propagated as graft susceptible scions onto *Citrus tristeza virus*-tolerant rootstocks. The citrus trees, in general, show no symptoms, even if they are infected by the virus (Su, 2008).

Plant tissue culture is utilized as an effective technique for producing large numbers of identical copies of a plant from its mother plant. Basically, plantlets from tissue culture are free of mold and bacteria. The infected plant tissues are clearly seen and then eliminated during the *in vitro* culture process. However, in case of virus infections, the infected tissues are difficult to visualize since viruses replicate themselves only inside the living cell of other organisms. Most of the symptoms of virus-infected plants appear after planting. In addition, viruses are easily transmitted to other tissues during the tissue culture process. Thus, in order to produce virus-free plantlets, the source plants for tissue culture must be completely free of virus.

The basic principle of plant tissue culture involve the selection of the adequate explant from a plant source, the subsequent surface sterilization to eliminate microbial contaminations, cultivation in a proper culture medium to allow growth and differentiation of the tissue, incubation under controlled conditions, and finally the adaptation of in vitro regenerated plants to greenhouse conditions.

In our study from 2017 and 2018, the tissue culture process for produced disease-free Citrus spp. the mother plant was investigated. The *Citrus* spp. plant material used in this study was obtained from the healthy tree of lemon, kumquat and grapefruit growing the 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 (protocols described by Jagoueix et al., 1994) and citrus tristeza disease by using RT-PCR method (protocols described by Mehta, et al., 1997) in order to identify that the citrus plant is disease-free. Disease-free plants were used as the source of explants for in vitro culture. In the explants preparation and establishment of aseptic culture, shoots with 3-5 nodes (about 15 cm in length) of

the healthy young branch were taken. Leaves were removed and the branches were cut and then washed carefully with running tap water to remove surface dirt.

For the surface sterilization method, nodal segments with axillary buds were dissected with a sterile blade. The dissected segment were sterilized by immersed in 0.5 % carbendazim solution with shaking at 100 rpm for 20 min and rinsed by sterile distilled water three times. Dipping these segments into 70% ethanol for 1 min and rinsed by sterile distilled water. Then, transfer them to immerse in 10% Clorox solution (commercial bleach) and 0.1% Tween-20 solution with shaking at 100 rpm for 10 min and rinsed by sterile distilled water three times (each for 10 min) in order to wash out residual bleach sticking to the segments. Finally, transfer them to immerse in 5% PPM solution (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, Inc™) for 20 min. All of these steps were carried out in a laminar flow cabinet. These procedure showed the percentage of survival in lemon, kumquat and grapefruit at 60%, 60% and 50% respectively.

In the in vitro cultivation, the effect of basal medium on the shoot induction and proliferation stage were investigated. The nodal segments with axillary buds of about 2-3 mm in length were cultured on nine semi-solid medium such as Murashige and Skoog medium (MS), woody plant medium (WPM) and Linsmaier and Skoog medium (LS) which different strength of medium (½ and full) and concentration of sucrose (15 and 30 g/L) for 12 weeks. In the results, ½ strength of LS media supplemented with 30 g/L of sucrose (½ LS+Su30) showed a positive effect on shoot induction, in addition, the shoots were obtained are healthy shoots and greener leaves. 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 nine medium formulas did not certainly effect on shoot multiplication.

In the experiment of evaluation of effect of the exogenous cytokinin, 6-benzyl amino purine (BAP) on in vitro shoot induction and multiplication of *Citrus* spp., the nodal segments with axillary buds of about 5 mm in length were cultured on ½ LS supplemented with 30 g/L sucrose and individually supplemented with 0, 1, 2, 3 and 5 mg/L BAP for 12 weeks. The results show that BAP can enhance growth and

increase the shoot induction rate. The obtained shoots from the culture on the medium supplement with BAP was higher shoot induction rate and a number of leaves formation when compared with the culture without BAP treatments. However, when different concentrations of BAP were used in the culture medium, no significant differences were observed in shoot multiplication. Furthermore, all most obtained shoots do not present spontaneous rooting. The best result for lemon was obtained from the culture on the medium supplement with 2 mg/l BAP produced the highest shoot induction rate. While the culture on the medium supplement with 3 mg/l BAP is a suitable condition for kumquat cultivation. The lemon and kumquat shoots were obtained are healthy shoots and greener leaves. In case of grapefruit, the best result was obtained from the culture on the medium supplement with 2 mg/l BAP was produced 50% of shoot induction rate and obtained shoots were slowly growing.

The main purpose was to research and development of the tissue culture process for the production of disease-free *Citrus* spp. mother plant. In this study, considering the effect of plant growth regulators on the root induction method. For the produce disease-free *Citrus* spp. mother plant, the efficiency of thermotherapy alone and combined with ribavirin chemotherapy for elimination CTV virus was evaluated. Finally, a suitable process of tissue culture for the production of disease-free *Citrus* spp. mother plant was developed.

2. Objective

The sub-project 3: Research and development of the disease-free *Citrus* spp. mother plant production for growing in highland areas is a three-year-long project. In the third year, the purpose was to investigate and develop the tissue culture process, considering the effect of plant growth regulators on the root induction method. For the produce disease-free *Citrus* spp. mother plant, the efficiency of thermotherapy alone and combined with ribavirin chemotherapy for elimination CTV virus was evaluated. Finally, a suitable process of tissue culture for the production of disease-free *Citrus* spp. mother plant was developed.

3. Results and discussion

In the research and development of disease-free *Citrus* spp. mother plant production using the tissue culture process, the two methods for roots induction were investigated. 2.5-3 cm in length of healthy *in vitro* shoots of *Citrus* spp. including lemon, kumquat and grapefruit were used as explants. In the first method, transfer the shoot explants from shoot culture medium (½ LS medium containing 30 g/l sucrose, 2 mg/l BAP and 3 g/l gellan gum) to shoot culture medium supplement with five different concentrations of IBA (0, 0.5, 1, 2 and 3 mg/l). The cultivation period was 8 weeks. In the second method, transfer the shoot explants from shoot culture medium to culture medium (½ LS medium containing 30 g/l sucrose and 3 g/l gellan gum) without adding plant growth regulator for 4 weeks and then transfer the shoot to the culture medium supplement with five different concentrations of IBA (0, 0.5, 1, 2 and 3 mg/l). The cultivation period was 8 weeks. In our study, the second method was suitable in order to induction of root. From this method, all of the shoots have been grown without callus formation and the plantlets were obtained had healthy. The best result for lemon was obtained from the culture on the medium supplement with 1 mg/l IBA produced the highest root induction rate (70%). While the culture on the medium supplement with 2 mg/l IBA is a suitable condition for kumquat cultivation (40%). In the case of grapefruit, *in vitro* root were not induced under our five different concentrations of IBA adding. However, the shoots have been grown without callus formation.

For the produce disease-free *Citrus* spp. mother plant, the efficiency of thermotherapy alone and combined with chemotherapy for elimination CTV virus was evaluated. The resulted showed that the treatment by thermotherapy alone and combined with chemotherapy by ribavirin have an effect on the growth and survival of plants. The treatment by chemotherapy with ribavirin at 25 μg/l at 25 °C for 2 weeks and then thermotherapy with high temperature at 40 °C for 2 weeks had the lowest survival percentage of shoot (40%). The thermotherapy with high temperature (40 °C) has a lower survival percentage of shoot than the low temperature (25 and 35 °C). In the case of chemotherapy with ribavirin at different concentrations and combined with the same temperature of thermotherapy showed

a similar survival percentage of shoot. While the chemotherapy with ribavirin at the same concentrations and combined with the different levels of temperature showed a higher survival percentage of shoot when using lower temperatures. In our studies, shoots derived from all treatment were free of CTV virus. Thus we can not certainly indicate that thermotherapy alone and combined with chemotherapy affect these viruses eradication. The possibility is that the number of viruses that are contaminated in the plant might be very less. The disinfectant agents (such as ethanol, Clorox solution, PPM™ solution) might affect these viruses.

In this research, two grafting process for production of disease-free citrus plants were studied. In the first method, the scion (disease-free shoots of lemon, kumquat, and grapefruit from *in vitro* culture) were placed on Cleopatra mandarin rootstock. The details as shown in figure 1. The second method, *in vitro* grafting was investigated. The disease-free shoots of lemon, kumquat, and grapefruit from *in vitro* culture were used as the scion. Cleopatra mandarin rootstock plantlets obtained *in vitro* seeding are allowed to grow until several leaves and root are produced. The rootstock is established as a rooted shoot, its top portion can be cut so that there is no nodal region left and a small cleft is made in the cut end. The shoot portion of the scion base, cut in V-shape, was inserted in the cleft of the rootstock. The entire set is again cultured on DKW medium containing 30 g/l sucrose and 2 mg/l BAP. Figure 2 and 3 representation of *in vitro* grafting procedure. The result from in 4th weeks after grafting shows that the success rate of grafting on lemon, kumquat, and grapefruit was obtained by 80%, 70%, and 40% respectively. In the *in vitro* grafting, the success rate of lemon, kumquat, and grapefruit was 70%, 76.92%, and 42.8% respectively. These grafts of lemon, kumquat, and grapefruit were carefully acclimated and transfer to the greenhouse condition. These samples of healthy citrus grafts were taken for disease testing. The testing result indicate that these samples of grafts are disease-free of citrus greening and citrus tristeza disease. Therefore, the grafting which healthy seedling Cleopatra mandarin as rootstock and disease-free shoots of lemon, kumquat, and grapefruit from *in vitro* culture as the scion are benefit method for production of disease-free citrus plants.

4. Conclusions

In the research and development of disease-free *Citrus* spp. mother plant production using the tissue culture process, the method for induction of root were investigated. In our study, the suitable method were transfer the shoot explants from shoot culture medium to culture medium (½ LS medium containing 30 g/l sucrose and 3 g/l gellan gum) without adding plant growth regulator for 4 weeks and then transfer the shoot to the culture medium supplement with five different concentrations of IBA. From this method, all of the shoots have been grown without callus formation and the plantlets were obtained had healthy. The best result for lemon was obtained from the culture on the medium supplement with 1 mg/l IBA produced the highest root induction rate (70%). While the culture on the medium supplement with 2 mg/l IBA is a suitable condition for kumquat cultivation (40%). In the case of grapefruit, *in vitro* root were not induced under our five different concentrations of IBA adding. However, the shoots have been grown without callus formation.

For the produce disease-free *Citrus* spp. mother plant, the efficiency of thermotherapy alone and combined with chemotherapy for elimination CTV virus was evaluated. The resulted showed that the treatment by thermotherapy alone and combined with chemotherapy by ribavirin have an effect on the growth and survival of plants. The treatment by chemotherapy with ribavirin at 25 μg/l at 25 °C for 2 weeks and then thermotherapy with high temperature at 40 °C for 2 weeks had the lowest survival percentage of shoot (40%). The thermotherapy with high temperature (40 °C) has a lower survival percentage of shoot than the low temperature (25 and 35 °C). In the case of chemotherapy with ribavirin at different concentrations and combined with the same temperature of thermotherapy showed a similar survival percentage of shoot. In our studies, shoots derived from all treatment were free of CTV virus. Thus we can not certainly indicate that thermotherapy alone and combined with chemotherapy affect these viruses eradication. The possibility is that the number of viruses that are contaminated in the plant might be very less. The disinfectant agents (such as ethanol, Clorox solution, PPM™ solution) might affect these viruses.

In this research, two grafting process for production of disease-free citrus plants were studied. In the first method, free-virus of the scion (*in vitro* lemon, kumquat, and grapefruit shoots) were placed on Cleopatra mandarin rootstock. The details of grafting procedure as shown in figure 27. The result from in 4th weeks after grafting shows that the success rate of grafting on lemon, kumquat, and grapefruit was obtained by 80%, 70%, and 40% respectively. The second method, *in vitro* grafting was investigated. The details of procedure as shown in figure 28 and 29. In the *in vitro* grafting, the success rate of lemon, kumquat, and grapefruit was 70%, 76.92%, and 42.8% respectively. These grafts of lemon, kumquat, and grapefruit were carefully acclimated and transfer to the greenhouse condition. The testing result indicate that these samples of grafts are disease-free of citrus greening and citrus tristeza disease. Therefore, the grafting which healthy seedling Cleopatra mandarin as rootstock and disease-free shoots of lemon, kumquat, and grapefruit from *in vitro* culture as the scion are benefit method for production of disease-free citrus plants.

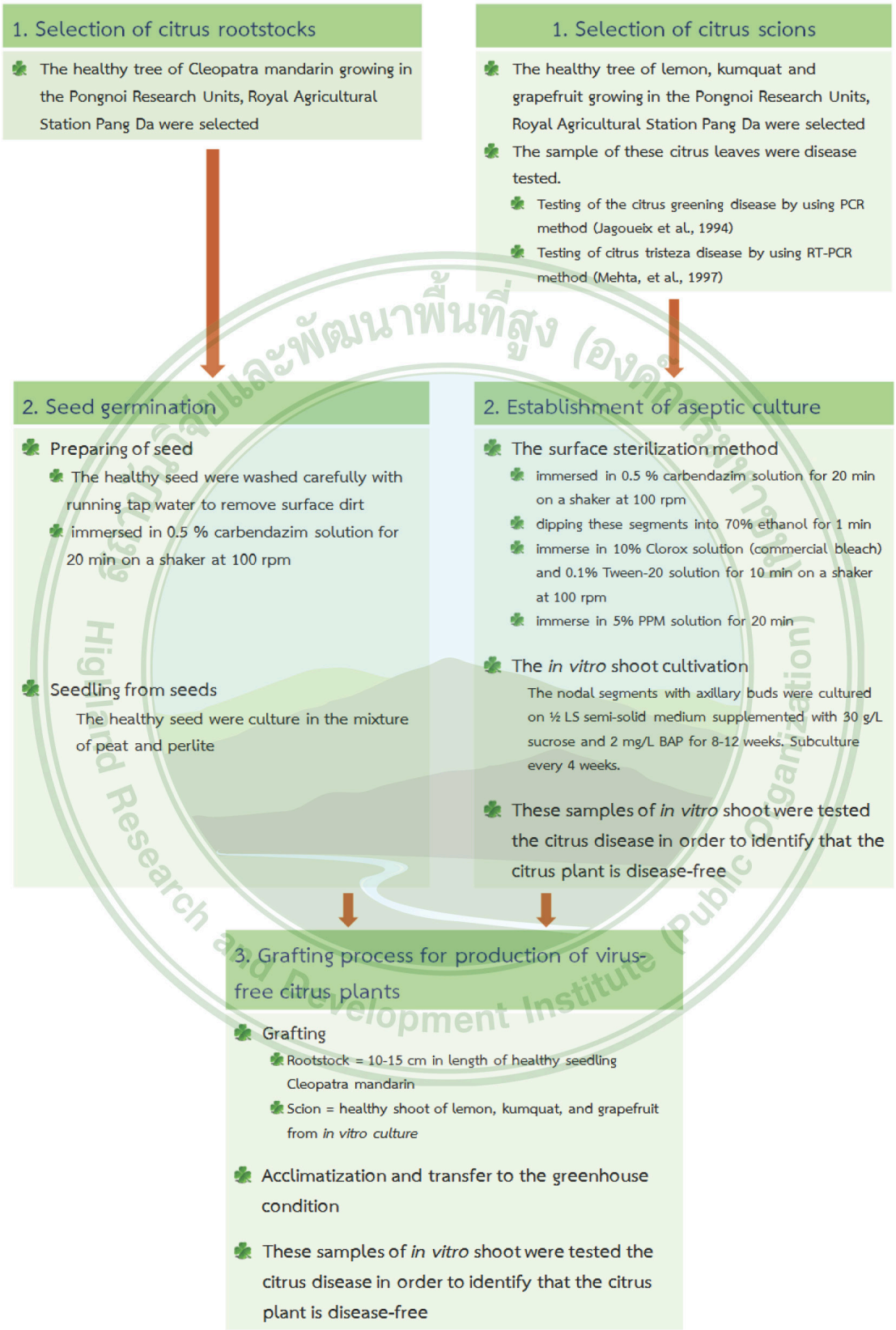


Figure 1 The production of disease-free citrus plants using grafting method.

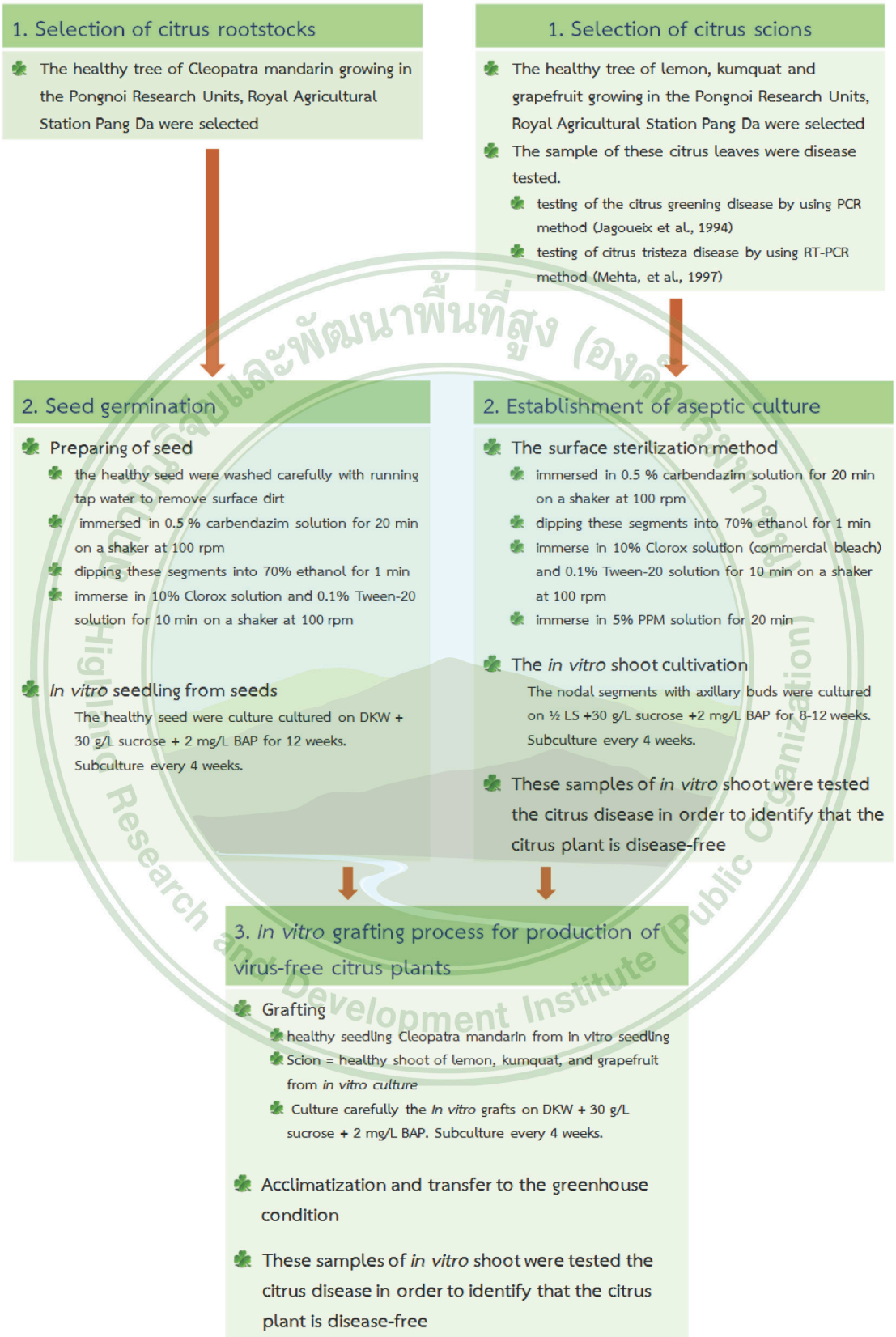


Figure 2 The production of disease-free citrus plants using *in vitro* grafting method.

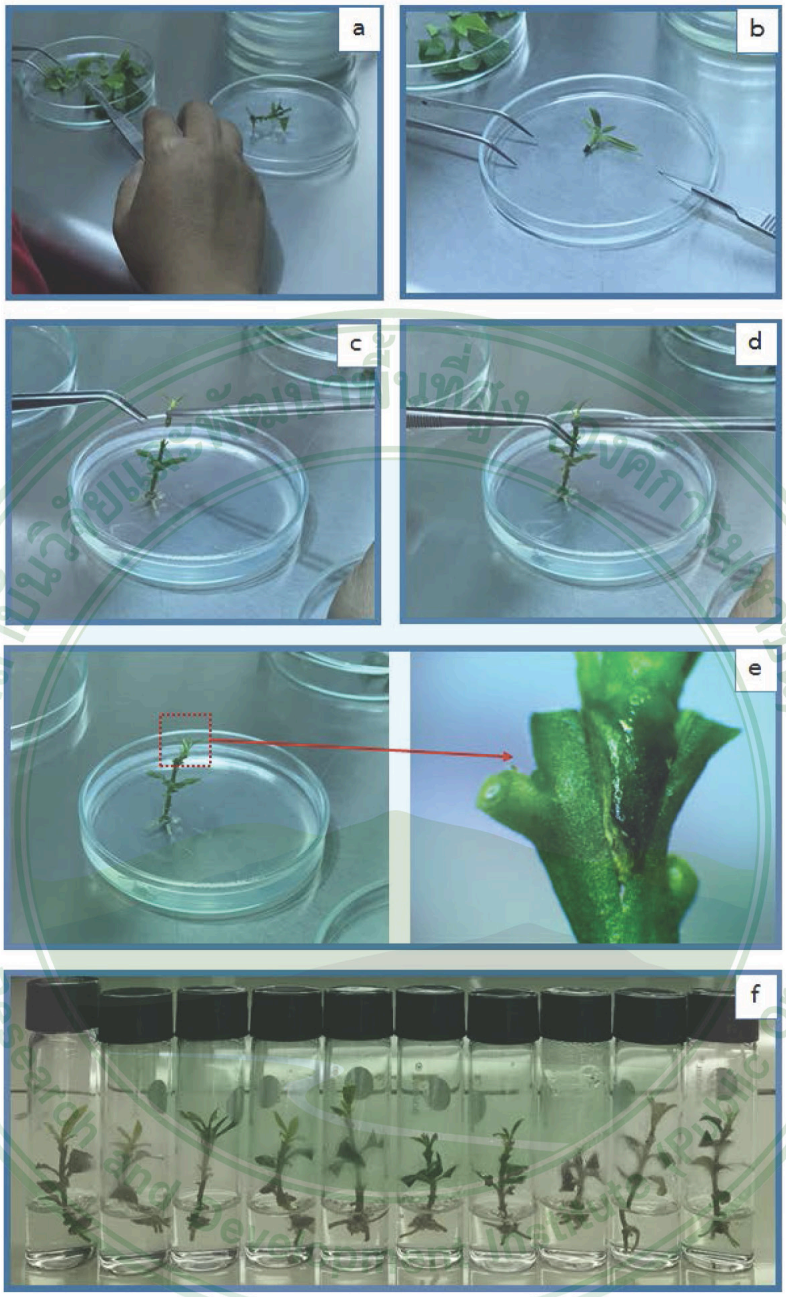


Figure 3 *In vitro* grafting of citrus plantlets (a) The healthy seedling Cleopatra mandarin from *in vitro* seedling as the rootstock, its top portion can be cut so that there is no nodal region left and a small cleft is made in the cut end, (b) the disease-free shoots of citrus from *in vitro* culture were used as the scion, (c) (d) and (e) The shoot portion of the scion base, cut in V-shape, was inserted in the cleft of the rootstock and (f) culture carefully the *in vitro* grafts on DKW semi-solid medium.

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

หน้า

สารบัญตารางภาคผนวก

หน้า

สารบัญภาพ

สารบัญภาพ (ต่อ)

สารบัญภาพ (ต่อ)

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

สารบัญภาพ (ต่อ)