บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

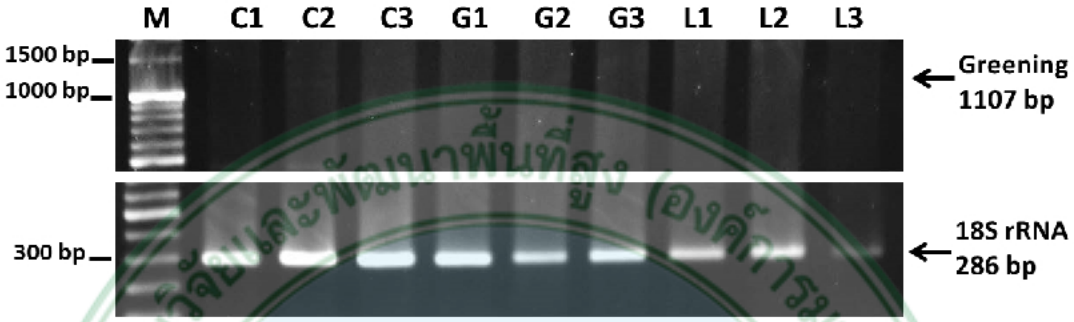
4.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง (Greening disease) และโรคทริสเตซ่า (Tristeza disease) ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม

การเก็บตัวอย่างพืชโดยเก็บยอดของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน จากต้นส้มที่ไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรคในแปลงปลูกของหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยยอดส้มที่เก็บมีความยาวยอด ไม่เกิน 15 เซนติเมตร ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบของส้มแต่ละชนิดมาทำการตรวจโรคกรีนนิ่ง โดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจโรคทริสเตซ่า โดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997 ตัวอย่างผลการตรวจโรคในส้ม แสดงในภาพที่ 1 และ 2

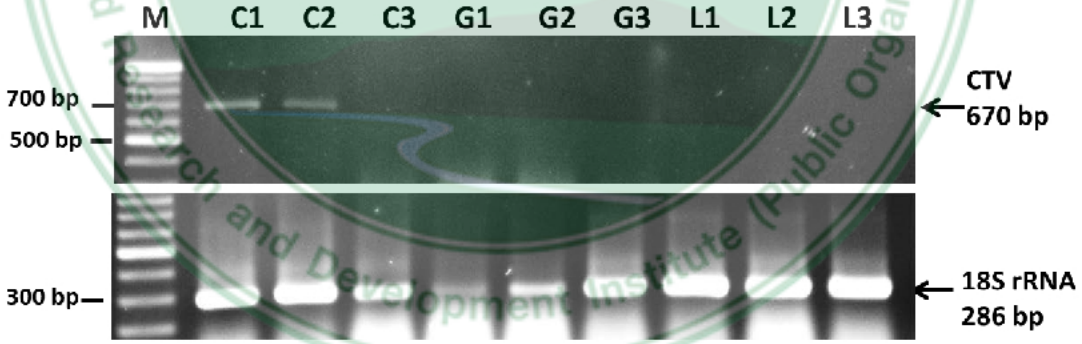
ในการตรวจโรคกรีนนิ่งในส้ม ทำโดยนำตัวอย่างใบของส้มคัมควัท (C1-C3) เกรฟฟรุ้ท (G1-G3) และ เลมอน (L1-L3) มาสกัด DNA ด้วยชุดสกัด GF-1-Plant DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) โดยได้ปริมาณ genomic DNA ระหว่าง 5-15 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างสด 100 มิลลิกรัม และค่าความบริสุทธิ์ของ genomic DNA ที่สกัดได้ภายใต้อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสง $OD_{260/280}$ ซึ่งมีค่าตามมาตรฐานคือ 1.8 จากนั้นจึงนำ genomic DNA 0.5 ไมโครกรัมมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ของเชื้อก่อโรคกรีนนิ่งคือ *Candidatus* Liberibacter *asiaticus* ซึ่งมีขนาด 1,107 คู่เบส โดยใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนควบคุม (Internal marker) เพื่อควบคุมคุณภาพของ genomic DNA ที่สกัดได้จากพืชตระกูลส้ม โดยในภาพที่ 1 พบว่า ไม่ปรากฏแถบ16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ที่มีขนาด 1,107 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างส้มที่ตรวจโรคทุกตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม

ในการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้มด้วยวิธี RT-PCR โดยนำตัวอย่างของคัมควัท (C1-C3) เกรฟฟรุ้ท (G1-G3) และ เลมอน (L1-L3) ปริมาณ 100 มิลลิกรัมของตัวอย่างสดมาสกัด Total RNA ด้วยสาร TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) ได้ปริมาณ Total RNA ระหว่าง 15-22 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างสด 100 มิลลิกรัม และมีค่าความบริสุทธิ์ของ Total RNA ที่สกัดได้ภายใต้อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสง $OD_{260/280}$ ซึ่งมีค่ามากกว่าค่ามาตรฐาน 1.8 ดังนั้นจึงนำ Total RNA ปริมาณ 2 ไมโครกรัมมาเป็นแม่แบบ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ 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 ที่สกัดได้จากพืชตระกูลส้ม โดยในภาพที่ 2 พบว่า ตัวอย่างคัมควัท C1 และ C2 ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างคัมควัท C1 และ C2 มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV

ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ในขณะที่ตัวอย่างคัมควัท (C3) เกรฟฟรุ้ท (G1-G3) และเลมอน (L1-L3) ไม่ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างส้มเหล่านี้ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า



ภาพที่ 1 ตัวอย่างผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในส้ม โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ในตัวอย่างส้มคัมควัท (C1-C3) เกรฟฟรุ้ท (G1-G3) และ เลมอน (L1-L3) โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



ภาพที่ 2 ตัวอย่างผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้ม โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างส้มคัมควัท (C1-C3) เกรฟฟรุ้ท (G1-G3) และ เลมอน (L1-L3) โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม

ในการเก็บยอดพืชตระกูลส้มในช่วงเดือนพฤษภาคม - มิถุนายน 2561 จากต้นส้มในแปลงของหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย เมื่อนำมาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว (Surface sterilization) ตามวิธีการของปิยะมาศ และคณะ 2560 โดยแช่ชิ้นส่วนยอดและข้อของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน ในน้ำสะอาดที่ผสมน้ำยากันเชื้อราชนิดคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างทำน้ำยากันเชื้อราออก จากนั้นแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที พบว่า เนื้อเยื่อส้มยังคงมีอัตราการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย และรา) ที่สูง (ภาพที่ 3) และอัตราการเจริญเป็นต้นอ่อนได้ต่ำ (ตารางที่ 1) โดยคณะผู้วิจัยคาดว่าเนื้อเยื่อเริ่มต้น (ยอดของพืชตระกูลส้ม) ที่เก็บมาจากแปลงปลูกภายใต้สภาวะแวดล้อมปกติ น่าจะมีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรก เชื้อจุลินทรีย์ หรือเชื้อก่อโรคในพืชได้มากกว่าต้นพืชที่ปลูกในโรงเรือนที่มีการควบคุม ดังนั้นในกรณีที่ใช้ตัวอย่างพืชจากต้นพืชที่ปลูกในแปลงปลูก จึงจำเป็นต้องใช้ขั้นตอนของการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ตัวอย่างเริ่มต้นที่ปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืช (Surface sterilization) เป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ในขั้นตอนนี้เน้นการขจัดสิ่งปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ออกจากพื้นผิวและภายในของเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้เกิดความเสียหายและฆ่าเนื้อเยื่อพืช (Teixeira da Silva et al., 2015; Lazo-Javalera et al., 2016) เนื่องจากสารฆ่าเชื้อ (น้ำยาฟอกขาว) ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิวอาจเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อของพืช ดังนั้นในการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อจึงควรคำนึงถึงความสมดุลระหว่างอัตราการปนเปื้อนและอัตราการอยู่รอดของเนื้อเยื่อเพื่อเจริญไปเป็นต้นอ่อน โดยทั่วไปในการฆ่าเชื้อนิยมใช้สารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) (Lazo-Javalera et al., 2016) เนื่องจากสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรีย รา และไวรัส นอกจากนี้สารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ยังมีคุณสมบัติเป็นออกซิเดชั่นที่ดีทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก เอมีนและอะไมด์ได้ดี ปฏิกิริยาโดยทั่วไประหว่างกรดอะมิโนและสารละลายคลอไรด์ไฮโปคลอไรท์ทำให้เกิด Aldehyde, NH_4Cl และ CO_2 (Yildiz, 2012) โดยสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในรูปสารละลายที่จำหน่ายในเชิงการค้า เช่น คลอรอกซ์

โดยในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูกภายใต้สภาวะแวดล้อมปกติ พบว่า เมื่อนำยอดพืชตระกูลส้มที่ขนาดความยาว ประมาณ 15 เซนติเมตร มาตัดใบออก จากนั้นล้างยอดส้มอย่างระมัดระวังภายใต้น้ำประปาที่ไหลผ่านเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ผิวนอกออก ทำการตัดชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างติดอยู่ด้วยมีดที่สะอาด นำชิ้นส่วนที่ผ่านการตัดมาแช่ในสารละลายน้ำยากันเชื้อรา ชนิดคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร วางไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำยากันเชื้อราออกโดยแช่ในน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งแช่ไว้ เป็นเวลา 10 นาที นำชิ้นส่วนพืชมาจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที ย้ายชิ้นส่วนพืชมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ (น้ำยาฟอกขาว) ความเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร และ

สารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที วางไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งแช่ไว้ เป็นเวลา 10 นาที ทำเพื่อกำจัดสารฟอกขาวที่ตกข้างอยู่ที่เนื้อเยื่อพืช จากนั้นจึงนำมาแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM™ ความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที โดยทุกขั้นตอนทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ (วิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว แสดงในภาพที่ 4) โดยในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ เท่ากับ ร้อยละ 40 ร้อยละ 30 และร้อยละ 30 และมีค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ เท่ากับ ร้อยละ 50 ร้อยละ 60 และร้อยละ 60 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความสะอาดและการสะสมของจุลินทรีย์ที่พืชเริ่มต้นก่อนการฟอกฆ่าเชื้อเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ ในกรณีที่พืชเริ่มต้นมีความสะอาดและการสะสมของจุลินทรีย์ที่พืชเริ่มต้นน้อย เช่น พืชที่ปลูกในโรงเรือนที่เหมาะสม ในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวสามารถใช้วิธีการที่มีขั้นตอนของการฟอกที่น้อยเพียง 1 ถึง 2 ขั้นตอน หรือใช้สารฟอกฆ่าเชื้อ 1 ถึง 2 ชนิด และใช้ที่ความเข้มข้นต่ำได้ แต่ในกรณีที่พืชเริ่มต้นมีการปนเปื้อนหรือมีการสะสมของจุลินทรีย์ที่พืชเริ่มต้นในปริมาณมาก เช่น พืชที่ปลูกในแปลง หรือที่ปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งมีการสัมผัสกับสภาพแวดล้อมโดยตรง ในบางฤดูหรือบางช่วงเวลาพืชจึงอาจมีความไม่สะอาดหรือมีการปนเปื้อนแมลงศัตรูพืชและมีการสะสมของจุลินทรีย์ที่พืชมากขึ้น ดังนั้นในกรณีนี้การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการที่มีขั้นตอนเพิ่มขึ้น หรือใช้สารฟอกฆ่าเชื้อเพิ่มมากขึ้น

ภาพที่ 3 ตัวอย่างการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในชิ้นส่วนของพืชตระกูลส้มที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 1 ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก โดยทำซ้ำวิธีการละ 20 ยอด

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	ร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ [3]			ร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อน [4]		
	เกรพฟรุ้ท	คัมควัท	เลมอน	เกรพฟรุ้ท	คัมควัท	เลมอน
วิธีการที่ 1[1]	80	60	70	15	20	20
วิธีการที่ 2[2]	40	30	30	50	60	60

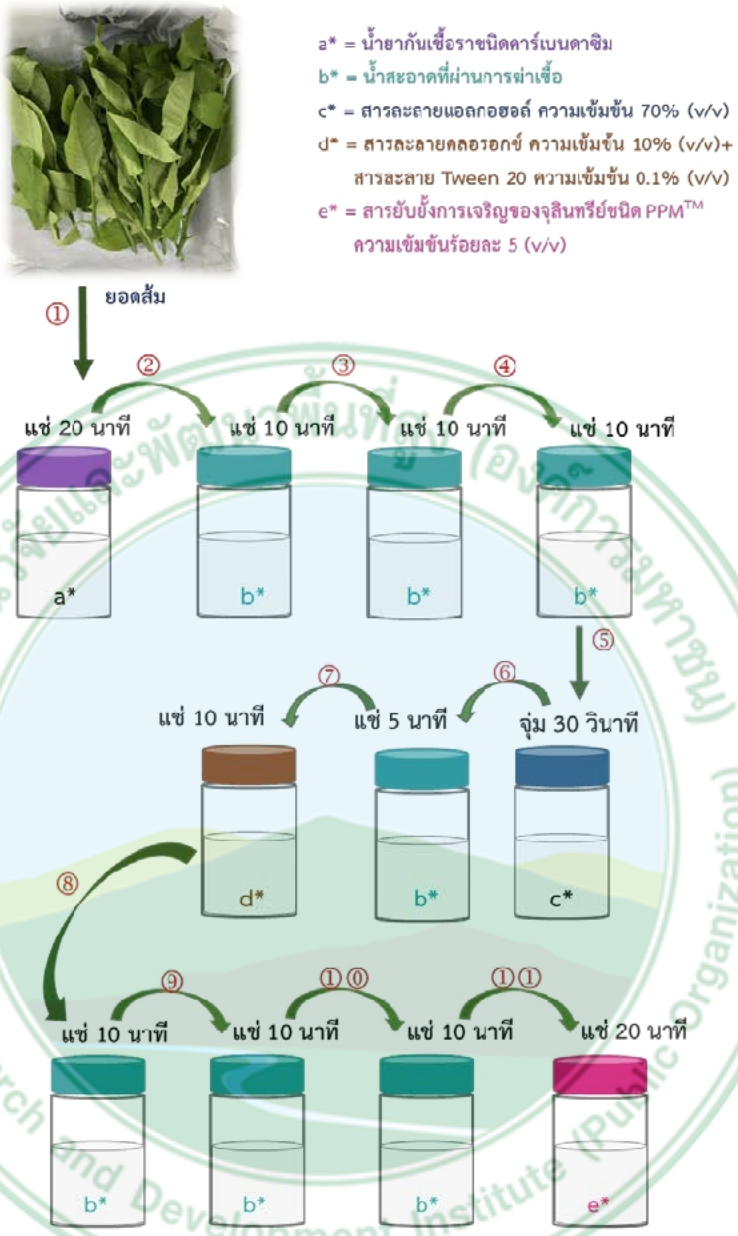
หมายเหตุ [1] วิธีการที่ 1 ทำโดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาล้างน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง

[2] วิธีการที่ 2 ทำโดยนำชิ้นส่วนพืชมาจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM™ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที

[3] ผลจากการสังเกตการปนเปื้อนจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย รา และยีสต์) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์

[4] ผลจากการสังเกตการเจริญเป็นยอดอ่อน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยชิ้นส่วนพืชที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนนั้นจะต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ และมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร

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



วิธีการ 1. ทำความสะอาดยอดส้มด้วยน้ำสะอาด ตัดชิ้นส่วนพืชโดยแยกออกจากกันตามข้อ

2. นำชิ้นส่วนพืชแช่ในน้ำยากันเชื้อรา (a*) เป็นเวลา 20 นาที
3. ย้ายชิ้นส่วนพืชแช่ในน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (b*) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เพื่อล้างน้ำยากันเชื้อราออก
4. ย้ายชิ้นส่วนพืชจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ (c*) เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นย้ายมาแช่ในน้ำสะอาด (b*) เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายชิ้นส่วนพืชแช่ในสารฟอกฆ่าเชื้อ (d*) เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นย้ายมาแช่ในน้ำสะอาด (b*) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
6. ย้ายชิ้นส่วนพืชแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM™ (e*) เป็นเวลา 20 นาที
7. ตัดแต่งชิ้นส่วนพืช จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง

ภาพที่ 4 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก

4.2 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท

4.2.1 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนพืชตระกูลส้ม

ในการศึกษาใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่ปลอดเชื้อของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยทำการตัดแต่งให้เนื้อเยื่อเริ่มต้นมีขนาดความสูงประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกันจำนวน 9 สูตร (9 ชุดทดลอง) โดยในการเพาะเลี้ยงทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้าง 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5 ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ท และขนาดของเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทบนอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน แสดงผลในตารางที่ 3 และภาพที่ 6 โดย

1) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ท เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเกิดเป็นยอดได้ร้อยละ 40.0 ถึงร้อยละ 70.0 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 (อาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน LS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) มีร้อยละของการเกิดยอดได้สูงสุด คือ ร้อยละ 70.0 และในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มของการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตรที่มีการเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2) เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทมีค่าร้อยละในการยอดต่ำ ในแต่ละชุดทดลองจึงทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งทำซ้ำ 10 ซ้ำ (N=30) เพื่อให้มีจำนวนยอดเพียงพอต่อการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของยอด

2) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 9 สูตร มีการเจริญและพัฒนาเป็นยอด

ได้ช้า โดยมีการเพิ่มจำนวนยอดได้ 1.1 – 1.3 ยอด และมีจำนวนใบ 2.2 – 3.4 ใบ ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยจำนวนยอดและจำนวนใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในส่วนของการเกิดราก พบว่า ยอดอ่อนของเกรฟฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดราก (ตารางที่ 2) ในภาพที่ 6 แสดงตัวอย่างการเจริญของยอดเกรพฟรุ้ท ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 2 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนเกรพฟรุ้ท ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

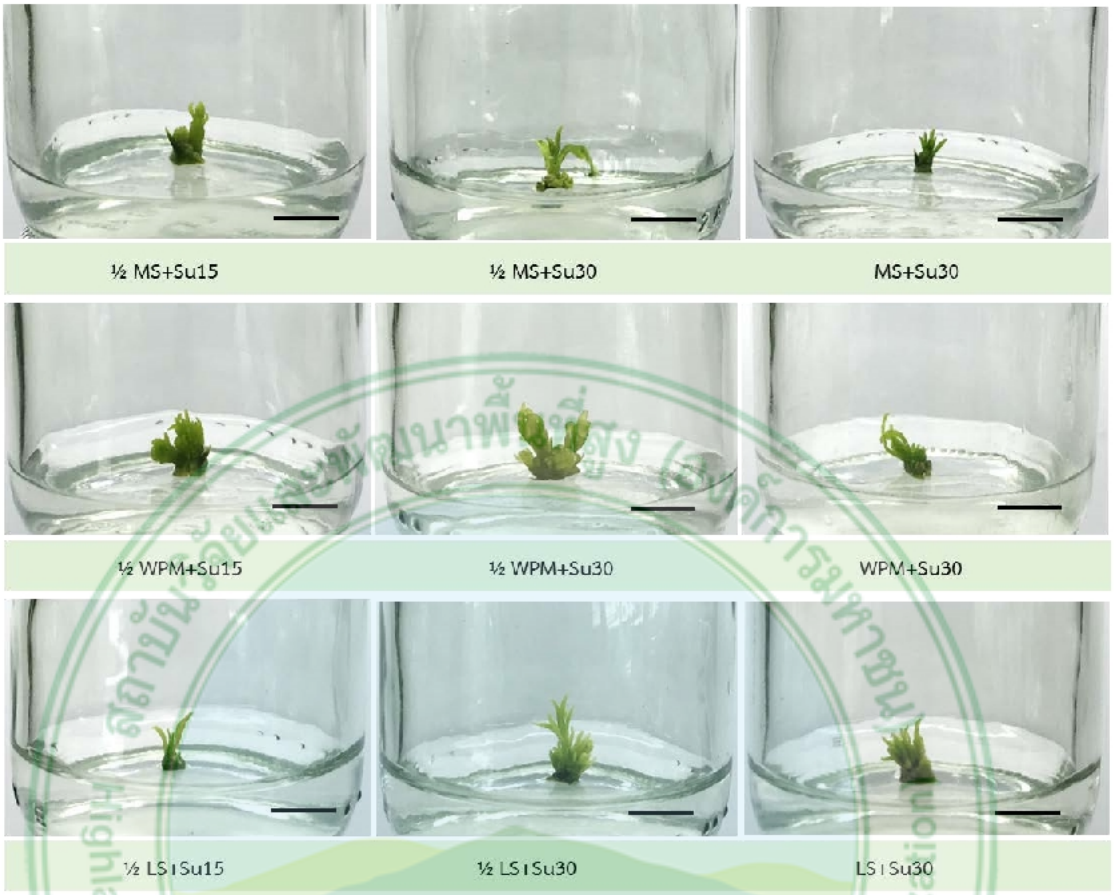
อาหารเพาะเลี้ยง	การเกิดยอด (ร้อยละ) *	จำนวนยอด (ยอด) **	จำนวนใบ (ใบ) **	จำนวนยอดที่เกิดราก (ร้อยละ) ***
½ MS + Su15	40.0	1.2 ± 0.4	3.4 ± 1.6	0
½ MS + Su30	43.3	1.3 ± 0.5	3.2 ± 1.4	0
MS + Su30	50.0	1.1 ± 0.3	3.0 ± 1.0	0
½ WPM + Su15	46.7	1.1 ± 0.3	2.7 ± 1.2	0
½ WPM + Su30	50.0	1.2 ± 0.4	2.2 ± 0.6	0
WPM + Su30	43.3	1.1 ± 0.3	2.6 ± 1.0	0
½ LS + Su15	40.0	1.3 ± 0.7	2.6 ± 1.3	0
½ LS + Su30	70.0	1.2 ± 0.4	3.2 ± 1.0	0
LS + Su30	53.3	1.2 ± 0.4	2.4 ± 1.5	0
CV	-	0.35	0.44	-
F-test		ns	ns	

หมายเหตุ

* การเกิดยอด ทำการนับเฉพาะชิ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเป็นยอดอ่อน โดยต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ หรือมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 30 ซ้ำ (N=30)

** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10) โดยค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan’s multiple range test

*** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)



ภาพที่ 6 ตัวอย่างการเจริญของยอดเกรพฟรุ้ท ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

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

ผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของคัมควัทบนอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 7 โดย

1) เมื่อทำการเพาะเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของคัมควัทที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเกิดเป็นยอดได้ร้อยละ 60 ถึงร้อยละ 100 โดยในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS + Su30 (อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน MS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) อาหารสูตร ½ LS + Su30 และ อาหารสูตร LS + Su 30 (อาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบเท่ากับสูตรพื้นฐาน LS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) มีร้อยละของการเกิดยอดได้ ร้อยละ 100 และในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มของการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตรที่มีการเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3)
2) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของคัมควัทที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง 9 สูตร มีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ โดยมีการเพิ่มจำนวนยอดได้ 1.2 – 1.6 ยอด ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีแนวโน้มของการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร WPM และ อาหารสูตร LS เล็กน้อย อย่างไรก็ตามจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ในส่วนของการเจริญของใบ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีแนวโน้มของการเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ แต่ใบที่เกิดขึ้นส่วนมากมีขนาดเล็ก (ตารางที่ 3 และภาพที่ 7) โดยเมื่อพิจารณาความสมบูรณ์และแข็งแรงของยอดและใบ พบว่ายอดส่วนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 และอาหารสูตร LS + Su 30 มีความสมบูรณ์และแข็งแรงของยอดและใบที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ (ภาพที่ 7)

ในส่วนของการเกิดราก พบว่า ยอดอ่อนของคัมควัทที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดราก

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

ตารางที่ 3 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนคัมควัท ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

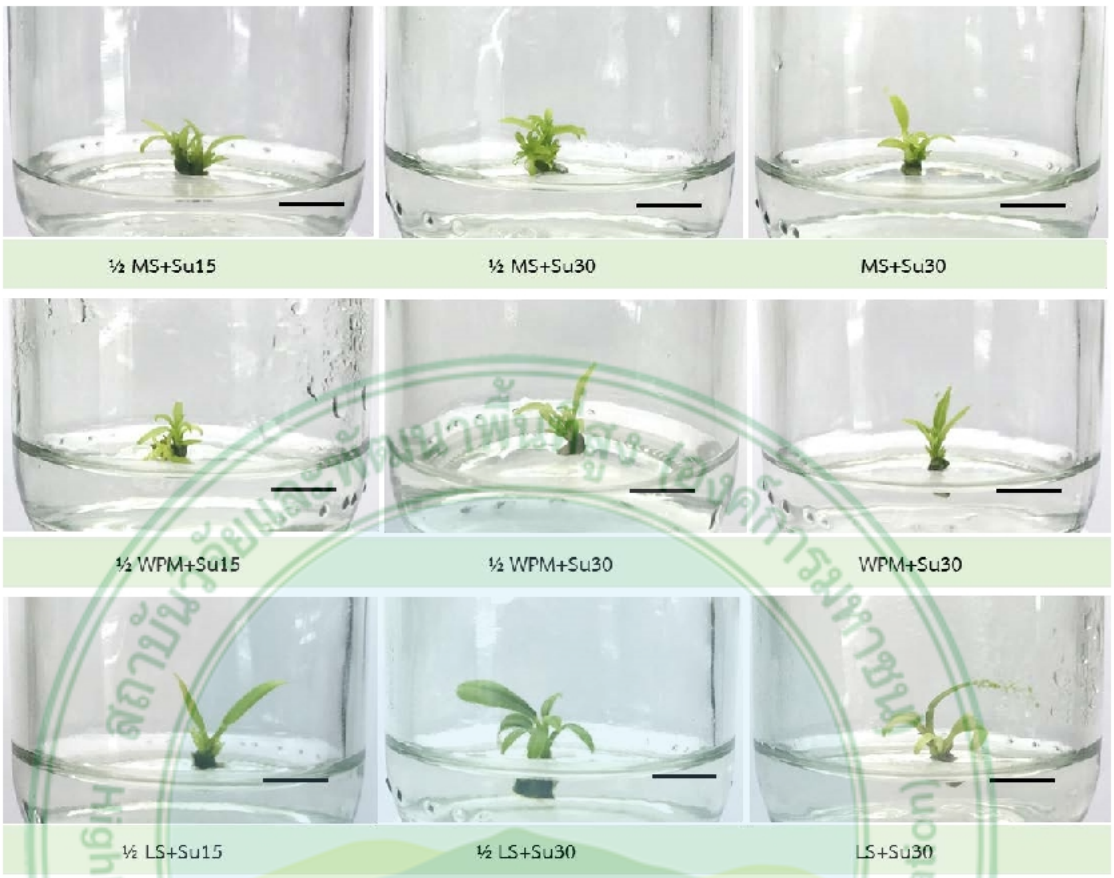
อาหารเพาะเลี้ยง	การเกิดยอด (ร้อยละ) *	จำนวนยอด (ยอด) **	จำนวนใบ (ใบ) **	จำนวนยอดที่เกิดราก (ร้อยละ) ***
½ MS + Su15	60	1.5 ± 0.5	5.7 ± 3.2 ab	0
½ MS + Su30	100	1.6 ± 0.7	6.9 ± 4.4 a	0
MS + Su30	70	1.4 ± 0.7	3.9 ± 1.9 bc	0
½ WPM + Su15	65	1.3 ± 0.5	3.9 ± 1.3 bc	0
½ WPM + Su30	70	1.2 ± 0.4	2.4 ± 0.8 c	0
WPM + Su30	70	1.2 ± 0.4	3.6 ± 1.1 bc	0
½ LS + Su15	70	1.2 ± 0.4	3.5 ± 2.0 bc	0
½ LS + Su30	100	1.3 ± 0.5	4.5 ± 1.6 bc	0
LS + Su30	100	1.3 ± 0.5	4.2 ± 1.5 c	0
CV	-	0.39	0.58	-
F-test		ns	*	

หมายเหตุ

* การเกิดยอด ทำการนับเฉพาะชิ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเป็นยอดอ่อน โดยต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ หรือมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 20 ซ้ำ (N=20)

** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10) โดยค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test

*** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)



ภาพที่ 7 ตัวอย่างการเจริญของยอดคัมควัท ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

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

ผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเลมอนบนอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 8 โดย

1). เมื่อทำการเพาะเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของเลมอนที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเกิดเป็นยอดได้ร้อยละ 60 ถึงร้อยละ 80 โดยในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ WPM + Su30 (อาหารสูตร WPM ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน WPM และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร) และ อาหารสูตร ½ LS + Su30 มีร้อยละของการเกิดยอดได้ ร้อยละ 80 และร้อยละ 70 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

2). เมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของเลมอนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง 9 สูตร มีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ โดยมีการเพิ่มจำนวนยอดได้ 1.2 – 1.4 ยอด ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละสูตรมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ในส่วนของการเจริญของใบ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS มีแนวโน้มของการเพิ่มจำนวนใบได้มากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 มีการเกิดใบสูงที่สุด 4.3 ใบ ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง (ภาพที่ 7)

ในส่วนของการเกิดราก พบว่า ยอดอ่อนของเลมอนที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดราก

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

ตารางที่ 4 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนเลมอนที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

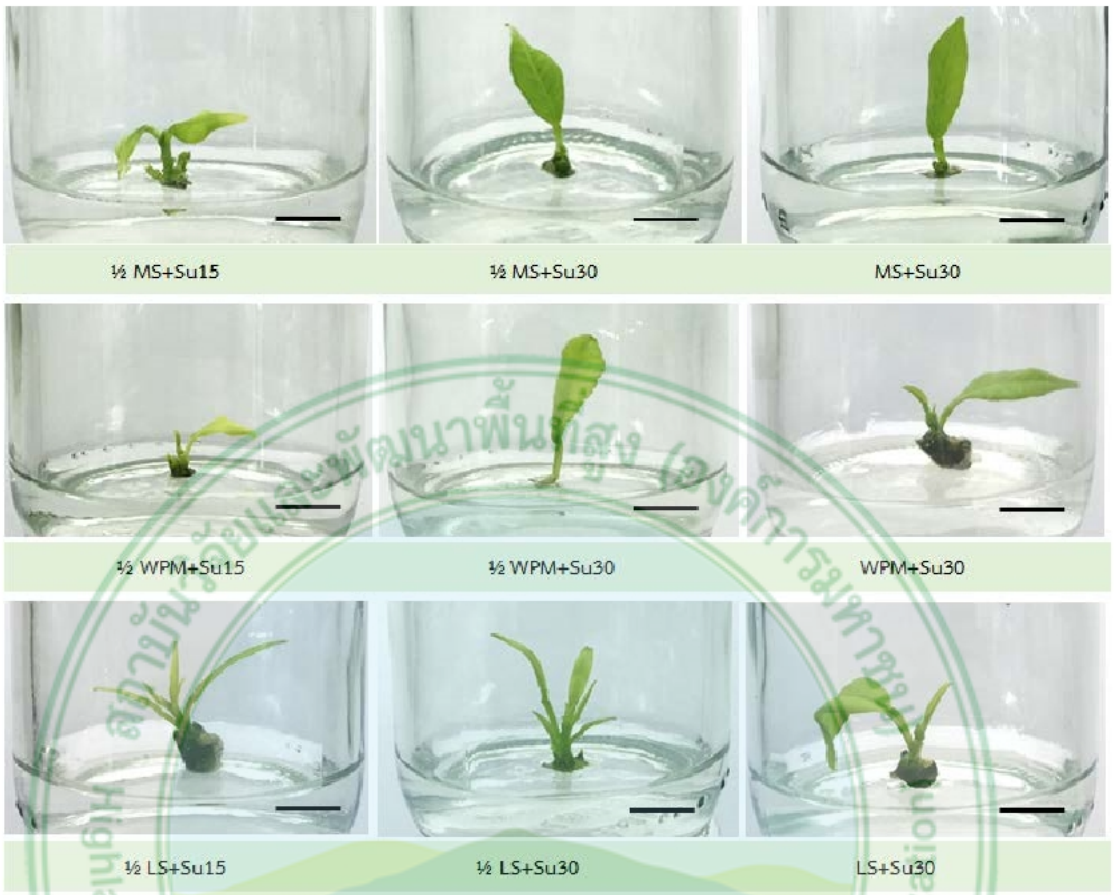
อาหารเพาะเลี้ยง	การเกิดยอด (ร้อยละ) *	จำนวนยอด (ยอด) **	จำนวนใบ (ใบ) **	จำนวนยอดที่เกิดราก (ร้อยละ) ***
½ MS + Su15	60	1.4 ± 0.5	2.7 ± 1.7 b	0
½ MS + Su30	65	1.2 ± 0.6	2.3 ± 1.6 b	0
MS + Su30	65	1.2 ± 0.4	2.0 ± 1.2 b	0
½ WPM + Su15	50	1.2 ± 0.4	1.9 ± 0.9 b	0
½ WPM + Su30	80	1.2 ± 0.4	2.6 ± 1.4 b	0
WPM + Su30	65	1.2 ± 0.7	2.4 ± 2.1 b	0
½ LS + Su15	60	1.2 ± 0.4	3.4 ± 1.1 ab	0
½ LS + Su30	70	1.3 ± 0.7	4.3 ± 1.8 a	0
LS + Su30	65	1.2 ± 0.4	3.3 ± 1.3 ab	0
CV	-	0.40	0.57	-
F-test		ns	*	

หมายเหตุ

* การเกิดยอด ทำการนับเฉพาะชิ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเป็นยอดอ่อน โดยต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ หรือมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 20 ซ้ำ (N=20)

** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10) โดยค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test

*** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)



ภาพที่ 8 ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอน ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

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

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของต้นอ่อน

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไค-นินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของต้นอ่อน ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่ปลอดเชื้อของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยทำการตัดแต่งให้เนื้อเยื่อเริ่มต้นมีขนาดความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสม (จากผลการศึกษา 4.1.1) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ BAP ที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติม BAP เป็นชุดควบคุม

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากการสังเกตการเจริญของเนื้อเยื่อเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่สามารถเจริญเป็นยอดได้ร้อยละ 40 ถึงร้อยละ 60 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ยอดเกือบทั้งหมดที่ได้ไม่มีการเจริญของใบ และไม่มีการพัฒนาของยอดไปเป็นต้นอ่อนได้ โดยคณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ทต่อไป

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัมควัทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แสดงผลในตารางที่ 5 และภาพที่ 9 โดย

1). เมื่อทำการเพาะเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของคัมควัทที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเกิดเป็นยอดได้ร้อยละ 60 ถึงร้อยละ 100 โดยในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละของการเกิดยอด ร้อยละ 100 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP มีร้อยละของการเกิดยอด ร้อยละ 60

2). เมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของคัมควัทมีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ โดยเกือบทั้งหมดไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอด มีเฉพาะการเจริญในส่วนของความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น

ในส่วนของการเจริญของใบ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญและเพิ่มจำนวนใบมากที่สุด คือ 5.0 ใบ ต่อยอด โดยใบที่เกิดขึ้นมีความสมบูรณ์และแข็งแรง

ในส่วนของการเกิดราก พบว่า ยอดอ่อนของคัมควัทที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดราก

ตารางที่ 5 ผลของการเติมไซโตไคนิน ชนิด BAP ต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญของต้นอ่อนคัมควัท

ปริมาณ BAP ที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิดยอด (ร้อยละ) *	จำนวนยอด (ยอด)**	จำนวนใบ (ใบ)**	จำนวนยอดที่เกิดราก (ร้อยละ)
0	60	1.0 ± 0.0	3.8 ± 0.6 b	0
1	80	1.0 ± 0.0	5.0 ± 0.8 a	0
2	80	1.1 ± 0.3	4.8 ± 0.9 a	0
3	100	1.1 ± 0.3	5.0 ± 0.8 a	0
5	70	1.0 ± 0.0	4.3 ± 1.1 ab	0
CV	-	0.19	0.21	-
F-test		ns	*	

หมายเหตุ

* การเกิดยอด ทำการนับเฉพาะชิ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเป็นยอดอ่อน โดยต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ หรือมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 20 ซ้ำ (N=10)

** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10) โดยค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test

*** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)

ภาพที่ 9 ตัวอย่างการเจริญของยอดคัมควัทที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอนบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แสดงผลในตารางที่ 6 และภาพที่ 10 โดย

1). เมื่อทำการเพาะเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของเลมอนที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเกิดเป็นยอดได้ร้อยละ 50 ถึงร้อยละ 90 โดยในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละของการเกิดยอด ร้อยละ 90 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP มีร้อยละของการเกิดยอด ร้อยละ 50

2). เมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของเลมอนมีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ โดยเกือบทั้งหมดไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอด มีเฉพาะการเจริญในส่วนของความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น

ในส่วนของการเจริญของใบ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญและเพิ่มจำนวนใบมากที่สุด คือ 4.1 ใบ ต่อยอด แต่ใบที่เกิดขึ้นส่วนมากมีขนาดเล็ก โดยเมื่อพิจารณาความสมบูรณ์และแข็งแรงของใบ พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์และแข็งแรงของใบที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในส่วนของการเกิดราก พบว่า ยอดอ่อนของคัมควัทที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดราก

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

ตารางที่ 6 ผลของการเติมไซโตไคนิน ชนิด BAP ต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญของต้นอ่อนเลมอน

ปริมาณ BAP ที่เติม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การเกิดยอด (ร้อยละ) *	จำนวนยอด (ยอด)**	จำนวนใบ (ใบ)**	จำนวนยอดที่เกิดราก (ร้อยละ)
0	50	1.0 ± 0.0	3.0 ± 1.1 b	0
1	80	1.0 ± 0.0	4.1 ± 0.7 a	0
2	90	1.0 ± 0.0	3.6 ± 1.3 ab	0
3	90	1.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7 ab	0
5	60	1.1 ± 0.3	3.0 ± 0.8 b	0
CV	-	0.14	0.3	-
F-test		ns	*	

หมายเหตุ

* การเกิดยอด ทำการนับเฉพาะชิ้นส่วนพืชที่มีการเจริญเป็นยอดอ่อน โดยต้องมีการเกิดใบอย่างน้อย 1 คู่ หรือมีความสูงของยอดมากกว่า 1 เซนติเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 20 ซ้ำ (N=10)

** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10) โดยค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's multiple range test

*** ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ ซึ่งได้จากการทำซ้ำชุดทดลองละ 10 ซ้ำ (N=10)

ภาพที่ 10 ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอน ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์
(สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้มในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชปลอดโรคไวรัส เมื่อพิจารณาผลการทดลองแยกตามชนิดของส้ม พบว่า

1). ในกรณีของเกรฟฟรุ้ท

(1) ขั้นตอนการคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น

ทำโดยเก็บยอดเกรฟฟรุ้ทจากต้นที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค และทำการสุ่มตัวอย่างของยอดเกรฟฟรุ้ทที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากในแต่ละต้นมาทำการตรวจสอบแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจสอบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997

(2) ขั้นตอนการทำให้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นปราศจากเชื้อ

การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ในกรณียอดที่ได้เป็นยอดจากต้นพืชที่ปลูกในแปลงปลูก ทำโดยนำชิ้นส่วนยอดและข้อของเกรฟฟรุ้ทมาจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิด PPM^{TM} ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที (รายละเอียดในแต่ละขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 4) โดยวิธีการนี้มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ร้อยละ 40 และมีค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ร้อยละ 50

(3) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของยอด

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ท พบว่า อาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน LS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (อาหารสูตร ½ LS + Su30) เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทเพื่อการพัฒนาเป็นยอด โดยมีร้อยละของการเกิดยอดได้ร้อยละ 70 อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทมีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ช้า โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ยจำนวนยอด 1.2 ยอด และมีค่าเฉลี่ยจำนวนใบ 3.4 ใบ ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยยอดอ่อนของเกรฟฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดราก

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่

ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า มีเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่สามารถเจริญเป็นยอดได้ร้อยละ 40 ถึงร้อยละ 60 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ยอดเกือบทั้งหมดที่ได้ยังไม่มีการเจริญของใบและไม่มีการพัฒนาของยอดไปเป็นต้นอ่อนได้ ในการศึกษานี้จึงยังไม่สามารถหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อการเจริญของยอดเกรพฟรุ้ทได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป และจะรายงานผลการศึกษาในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

(4) การชักนำให้ยอดที่ได้เกิดราก

การศึกษาวิธีการเพื่อการชักนำให้เกิดราก จะดำเนินการในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

2). ในกรณีของคัมควัท

(1) ขั้นตอนการคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น

ทำโดยเก็บยอดคัมควัทจากต้นที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค และทำการสุ่มตัวอย่างของยอดคัมควัทที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากในแต่ละต้นมาทำการตรวจสอบแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจสอบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997

(2) ขั้นตอนการทำให้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นปราศจากเชื้อ

การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ในกรณียอดที่ได้เป็นยอดจากต้นพืชที่ปลูกในแปลงปลูก ทำโดยนำชิ้นส่วนยอดและข้อของคัมควัทมาจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิด PPM^{TM} ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที (รายละเอียดในแต่ละขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 4) การโดยวิธีการนี้มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ร้อยละ 30 และมีค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ร้อยละ 60

(3) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของยอด

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของคัมควัท พบว่า อาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบครึ่งเท่าของสูตรพื้นฐาน MS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (อาหารสูตร ½ MS + Su30) อาหารสูตร ½ LS + Su30 และ อาหารสูตร LS ที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบเท่ากับสูตรพื้นฐาน LS และเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (อาหารสูตร LS + Su 30) มีร้อยละของการเกิดยอดได้ ร้อยละ 100 โดยในการศึกษานี้จึงเลือกอาหารสูตร ½ LS + Su30 เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสม เนื่องจากยอดและใบของคัมควัทที่ได้มีการเจริญที่ดี และมีความแข็งแรง (ตารางที่ 3 และภาพที่ 7) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของคัมควัทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการพัฒนาเป็นยอดและการเจริญของยอด ในการเพาะเลี้ยงมีร้อยละของการเกิดยอดได้ ร้อยละ 100 ซึ่งยอดที่ได้มีความสมบูรณ์และแข็งแรง และมีจำนวนใบที่มากและแข็งแรงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 9) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของคัมควัทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณยอด และยอดทั้งหมดไม่มีการเกิดราก

(4) การชักนำให้ยอดที่ได้เกิดราก

การศึกษาวิธีการเพื่อการชักนำให้เกิดราก จะดำเนินการในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

3). ในกรณีของเลมอน

(1) ขั้นตอนการคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น

ทำโดยเก็บยอดเลมอนจากต้นที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค และทำการสุ่มตัวอย่างของยอดเลมอนที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากในแต่ละต้นมาทำการตรวจสอบแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจสอบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997

(2) ขั้นตอนการทำให้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นปราศจากเชื้อ

ทำโดยการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ในกรณีที่ยอดมีความสะอาดหรือเป็นยอดที่ได้จากต้นที่ปลูกเลี้ยงในโรงเรือน สามารถทำการแช่ชิ้นส่วนยอดและข้อของเลมอนในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที โดยวิธีการนี้มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ร้อยละ 15 และมีค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ร้อยละ 85 (ผลการศึกษาในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2560)

ในกรณียอดที่ได้เป็นยอดจากต้นพืชที่ปลูกในแปลงปลูก ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรก เชื้อจุลินทรีย์ หรือเชื้อก่อโรคในพืชได้มากกว่าต้นพืชที่ปลูกในโรงเรือนที่มีการควบคุมนั้น ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวจึงมีการเพิ่มขั้นตอนมากขึ้นโดยนำชิ้นส่วนยอดและข้อของเลมอนมาจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิด PPM^{TM} ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที (รายละเอียดในแต่ละขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 4) โดยวิธีการนี้มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ร้อยละ 30 และมีค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ร้อยละ 60

(3) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของยอด

ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเลมอน พบว่า อาหารสูตร ½ LS + Su30 เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเลมอน โดยมีร้อยละของการเกิดยอดได้ร้อยละ 70 และมีจำนวนใบสูงที่สุด (ตารางที่ 4 และภาพที่ 8) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเลมอนบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่ 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการพัฒนาเป็นยอดและการเจริญของยอด ในการเพาะเลี้ยงมีร้อยละของการเกิดยอดได้ร้อยละ 90 ซึ่งยอดที่ได้มีความสมบูรณ์และแข็งแรง และมีจำนวนใบและความแข็งของใบที่ดี เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 10) ในการศึกษานี้จึงเลือกอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารที่เหมาะสมในการส่งเสริมการ

พัฒนาไปเป็นยอดและการเจริญของยอดเลมอน อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเลมอนบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณยอด และยอดทั้งหมดไม่มีการเกิดราก

(4) การชักนำให้ยอดที่ได้เกิดราก

การศึกษาวิธีการเพื่อการชักนำให้เกิดราก จะดำเนินการในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

4.2.3 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (shoot tip culture)

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด โดยใช้ยอดส้มคัมควัทที่มีผลการตรวจสอบว่า มีการตรวจพบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทริส-เตซ่า เป็นตัวอย่างในการศึกษา โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบมาทำการตรวจโรคกรีนนิ่ง โดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจโรคทริสเตซ่า โดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997

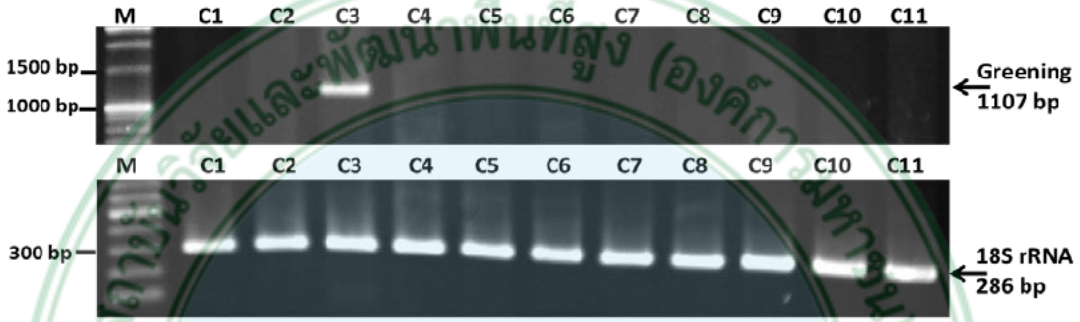
จากการเก็บยอดส้มคัมควัทจากต้นส้ม จำนวน 11 ต้น โดยให้รหัสเรียกต้นส้ม C1 ถึง C11 ผลการตรวจโรคในส้มคัมควัทที่ใช้ในการศึกษา แสดงในภาพที่ 11 และ 12 โดยผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในส้มคัมควัท (ภาพที่ 11) พบว่า ตัวอย่างคัมควัท C3 ปรากฏแถบ 16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ที่มีขนาด 1,107 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างคัมควัท C3 มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม ในขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ ไม่มีการปรากฏแถบ16S rRNA gene ของเชื้อแบคทีเรีย CLA แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างส้มคัมควัทอื่นๆไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งในส้ม

ผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้มคัมควัท ด้วยวิธี RT-PCR ในภาพที่ 12 พบว่า ตัวอย่างส้มคัมควัท C4 และ C8 ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็นตัวอย่างส้มคัมควัท C4 และ C8 มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ในขณะที่ตัวอย่างส้มคัมควัทอื่นๆ ไม่ปรากฏแถบของยีนไวรัส CTV ขนาด 670 คู่เบส แสดงให้เห็น ตัวอย่างส้มคัมควัทเหล่านี้ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า

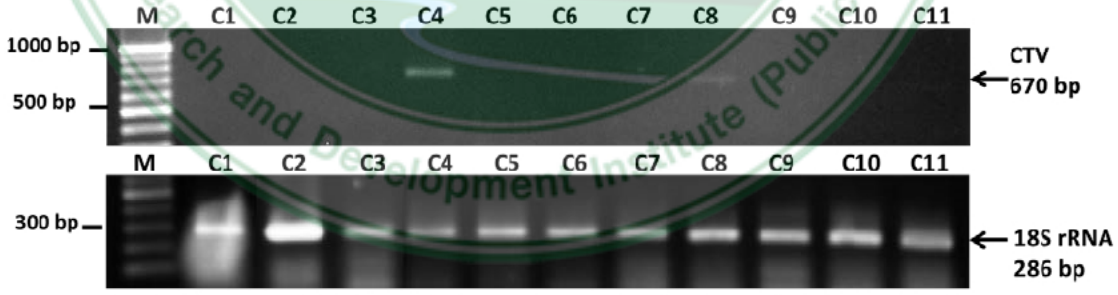
จากผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้มคัมควัท ซึ่งพบว่า ตัวอย่างส้มคัมควัท C4 และ C8 มีการปนเปื้อนของไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด จึงใช้ยอดส้มคัมควัทจากต้นส้มรหัส C4 และ C8 เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง

ในการศึกษาผลของขนาดเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของส้มคัมควัทที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยนำเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาทำการตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ ในสภาวะปลอดเชื้อ ให้เหลือเฉพาะเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่มีขนาดของปลายยอด

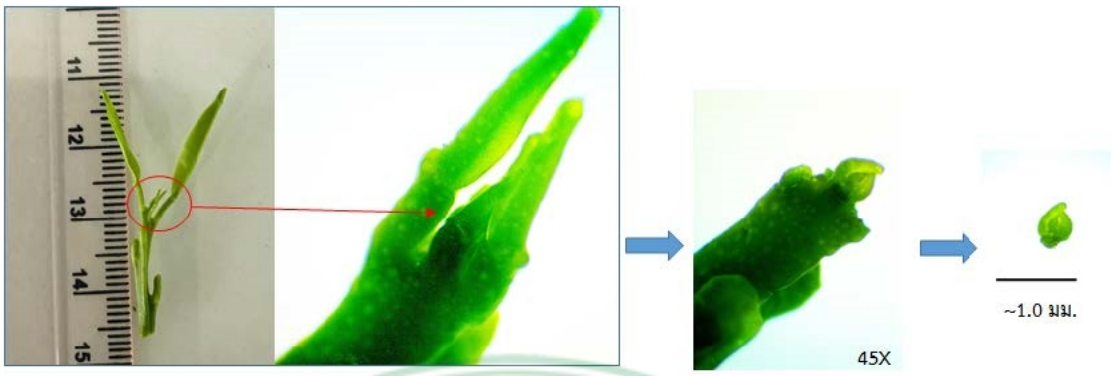
ยาว 0.3 0.5 1.0 และ 3.0 มิลลิเมตร โดยเนื้อเยื่อส่วนยอด 1 ชิ้นส่วน ทำการตัดให้เหลือเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด 1 ขนาด นำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 โดยในแต่ละชุดทดลองทำซ้ำ 5 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำ คือ การเพาะเลี้ยงใช้เนื้อเยื่อส่วนปลายยอด 1 ชิ้นส่วนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ในภาพที่ 13 แสดงตัวอย่างภาพเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของคัมควัท ที่มีขนาดของปลายยอดยาว 0.3 มิลลิเมตร โดยทำการตัดเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ



ภาพที่ 11 ตัวอย่างผลการตรวจโรคกรีนนิ่งในส้มคัมควัท โดยแสดงผลผลิต PCR ของการตรวจยีน 16S rRNA ขนาด 1,107 คู่เบส ของเชื้อแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ในตัวอย่างส้มคัมควัท (C1-C11) โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



ภาพที่ 12 ตัวอย่างผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้มคัมควัท โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างส้มคัมควัท (C1-C3) โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม



ภาพที่ 13 ตัวอย่างภาพเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของคัมควัทที่ได้จากการตัดเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดสเตอริโอ

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของคัมควัท เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่มีขนาดของปลายยอดยาว 3.0 มิลลิเมตร ที่พบการเจริญของยอด (ภาพที่ 14) โดยมีร้อยละของการเกิดยอด ร้อยละ 80 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดที่มีขนาด 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิเมตร ยังไม่พบการเจริญของยอด อย่างไรก็ตามจากการสังเกต พบว่า เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดยังคงมีสีเขียว จึงยังคงทำการเพราะเลี้ยงต่อ

ภาพที่ 14 ตัวอย่างการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของส้มคัมควัท ขนาด 3.0 มิลลิเมตรที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

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

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง (Greening disease) และโรคทริสเตซ่า (Tristeza disease) ในตัวอย่างพืชตระกูลส้ม

จากการเก็บยอดของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน จากต้นส้มที่ไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค ในแปลงปลูกของหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ โดยยอดส้มที่เก็บมีความยาวยอด ไม่เกิน 15 เซนติเมตร ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบของส้มแต่ละชนิดมาทำการตรวจโรคกรีนนิ่ง โดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจโรคทริสเตซ่า โดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997 สามารถคัดเลือกต้นส้มที่ไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง และไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยต้นส้มเหล่านี้จะใช้เป็นแหล่งต้นพันธุ์ในการเก็บยอดเพื่อเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป อย่างไรก็ตามมีต้นส้มคัมควัทจำนวนหนึ่งที่ตรวจพบการปนเปื้อนไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยต้นส้มคัมควัทจะถูกใช้เป็นแหล่งต้นพันธุ์ในการเก็บยอดเพื่อเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นสำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด

ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูกภายใต้สภาวะแวดล้อมปกติ ซึ่งน่าจะมีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรก เชื้อจุลินทรีย์ หรือเชื้อก่อโรคในพืชได้มากกว่าต้นพืชที่ปลูกในโรงเรือนที่มีการควบคุม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ขั้นตอนของการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวที่เหมาะสม ซึ่งทำได้โดยนำยอดส้มมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดที่เปิดน้ำให้ไหลผ่าน ตัดชิ้นส่วนส้มด้วยมีดที่สะอาด โดยตัดชิ้นส่วนยอด และตัดชิ้นส่วนตามข้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนส้มที่ตัดได้มาแช่ในน้ำสะอาดที่ผสมน้ำยากันเชื้อรา ชนิดคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างน้ำยากันเชื้อราออกโดยแช่ในน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นส่วนพืชมาจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ย้ายเนื้อเยื่อมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที นำมาล้างน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM^{TM} ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที

5.2 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอน คัมควัท และเกรพฟรุ้ท

5.2.1 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนพืชตระกูลส้ม

จากผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่ปลอดเชื้อของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และ เลมอน ที่มีขนาดความสูงประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกันจำนวน 9 สูตร (9 ชุดทดลอง) พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มทั้ง 3 ชนิด บนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (½ LS + Su30) มีแนวโน้มที่ดีในการส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อเริ่มต้นให้เกิดยอด เนื่องจากมีค่าร้อยละของการเกิดยอดสูง และในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรทั้ง 3 ชนิด คือ อาหารสูตร MS อาหารสูตร WPM และ อาหารสูตร LS ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มของการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตรที่มีการเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามในกรณีของเกรฟฟรุ้ท พบว่า มีแนวโน้มของการเกิดยอดที่ต่ำกว่าของคัมควัท และ เลมอน เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน

ในส่วนของการเพิ่มปริมาณยอด พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของพืชตระกูลส้มบนอาหารที่แตกต่างกันจำนวน 9 สูตร ไม่มีผลที่ชัดเจนต่อการเพิ่มปริมาณของยอดส้ม โดยยอดส้มที่ได้ของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และ เลมอน ในแต่ละชุดทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในส่วนของการเจริญของยอด พบว่า การเจริญของเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ทค่อนข้างช้ากว่าการเจริญของเนื้อเยื่อของคัมควัท และ เลมอน โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ยอดอ่อนของคัมควัท และเลมอน มีความสูงของยอดและจำนวนใบที่มากกว่ายอดอ่อนของเกรฟฟรุ้ท เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของส้มบนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่ดีต่อการส่งเสริมการเจริญของยอดอ่อน และการเพิ่มจำนวนของใบ อย่างไรก็ตามยอดอ่อนของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และ เลมอน ทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงได้ ไม่พบว่ามีการเกิดราก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

5.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของต้นอ่อน

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอด และการเจริญของต้นอ่อน ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่ปลอดเชื้อของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน ที่มีขนาดความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร ½ LS + Su30 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่ไม่เติม BAP เป็นชุดควบคุม

ในการเพาะเลี้ยงที่ใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่มีขนาดความสูงเพิ่มขึ้น (ใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นที่มีขนาดความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร) พบว่า เนื้อเยื่อมีการเจริญที่ดีกว่า และใช้เวลา

น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้ชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่มีขนาดเล็กกว่า (จากเดิมในการทดลองที่ 4.1.1 ที่ใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นที่มีขนาดความสูงประมาณ 3 มิลลิเมตร)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเป็นยอดได้ร้อยละ 40 ถึงร้อยละ 60 อย่างไรก็ตามยอดเกือบทั้งหมดไม่มีการเจริญของใบ และไม่มีการพัฒนาของยอดไปเป็นต้นอ่อน

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัมควัท พบว่า อาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ร้อยละ 100 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP มีการเกิดยอดได้ ร้อยละ 60 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีการเจริญและเพิ่มจำนวนใบมากที่สุด คือ 5.0 ใบ ต่อยอด โดยใบที่เกิดขึ้นมีความสมบูรณ์และแข็งแรง

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเลมอน พบว่า อาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ร้อยละ 90 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP มีร้อยละของการเกิดยอด ร้อยละ 50 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีการเจริญของยอดและใบมีความสมบูรณ์และแข็งแรง

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของคัมควัทและเลมอน ทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างมีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ แต่เกือบทั้งหมดไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอด มีเฉพาะการเจริญในส่วนของความยาวยอดที่เพิ่มขึ้น และยอดอ่อนของคัมควัทที่เพาะเลี้ยงไม่สามารถเกิดรากได้เอง โดยจำเป็นต้องมีการชักนำให้ยอดอ่อนเกิดราก

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้มในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชปลอดโรคไวรัส เมื่อพิจารณาผลการทดลองแยกตามชนิดของส้ม พบว่า

1). ในกรณีของเกรฟฟรุ้ท

ทำการคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยเก็บยอดเกรฟฟรุ้ทจากต้นที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค ทำการสุ่มตัวอย่างของยอดเกรฟฟรุ้ทที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นจากในแต่ละต้นมาทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจสอบโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997 จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว โดยรายละเอียดวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก แสดงในภาพที่ 4 ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ท ทำการเพาะเลี้ยงอาหารสูตร ½ LS + Su30 โดยมีร้อยละของการเกิดยอดได้ร้อยละ 70 อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทมีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดได้ช้า และยอดอ่อนของเกรฟฟรุ้ทที่เพาะเลี้ยงไม่มีการเกิดราก ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเกรพฟรุ้ทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ยอดเกือบทั้งหมดที่ได้ยังไม่มีการเจริญของใบและไม่มีการพัฒนาของยอดไปเป็นต้นอ่อนได้ ในการศึกษานี้จึงยังไม่สามารถหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อการเจริญของยอดเกรพฟรุ้ทได้ ซึ่ง

คณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป และจะรายงานผลการศึกษาในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

2). ในกรณีของคัมควัท

ทำการคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยเก็บยอดของคัมควัทจากต้นที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค ทำการสุ่มตัวอย่างของยอดในแต่ละต้นมาทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจสอบโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997 จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว โดยรายละเอียดวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก แสดงในภาพที่ 4 ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของคัมควัทบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมในการส่งเสริมการพัฒนาเป็นยอดและการเจริญของยอด เป็นเวลา 12 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ ไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณยอด และยอดทั้งหมดไม่มีการเกิดราก จึงจำเป็นต้องมีการชักนำให้ยอดที่ได้เกิดราก ซึ่งจะดำเนินการในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

3). ในกรณีของเลมอน

ทำการคัดเลือกต้นพันธุ์และชิ้นส่วนพืชที่จะใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยเก็บยอดของคัมควัทจากต้นที่มีสุขภาพดี แข็งแรง และไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค ทำการสุ่มตัวอย่างของยอดในแต่ละต้นมาทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจสอบโรคทริสเตซ่า โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997 จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว โดยรายละเอียดวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก แสดงในภาพที่ 4 ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของเลมอนบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมในการส่งเสริมการพัฒนาเป็นยอดและการเจริญของยอด เป็นเวลา 12 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ ไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณยอด และยอดทั้งหมดไม่มีการเกิดราก จึงจำเป็นต้องมีการชักนำให้ยอดที่ได้เกิดราก ซึ่งจะดำเนินการในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

5.2.3 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (shoot tip culture)

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด โดยใช้ยอดส้มคัมควัทที่มีผลการตรวจสอบว่า มีการตรวจพบไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทริส-เตซ่า เป็นตัวอย่างในการศึกษา โดยทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในสภาวะปลอดเชื้อ ให้เหลือเฉพาะเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่มีขนาดของปลายยอดยาว 0.3 0.5 1.0 และ 3.0 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร ½ LS + Su30

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของคัมควัท เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีเฉพาะการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่มีขนาดของปลายยอดยาว 3.0 มิลลิเมตร ที่มีการเจริญของยอด โดยมีการเกิดยอด ร้อยละ 80 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดที่มีขนาด 0.3 0.5 และ 1.0 มิลลิเมตร ยังไม่พบการเจริญของยอด ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นขนาดเล็ก จึงมีการเจริญและการพัฒนาที่ช้า อย่างไรก็ตามจากการสังเกต พบว่า เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดยังคงมีสีเขียว จึงยังคงทำการเพาะเลี้ยงต่อเพื่อให้เนื้อเยื่อมีการเจริญที่เหมาะสมและสามารถนำเนื้อเยื่อดังกล่าวไปตรวจโรคเพื่อหาจำนวนเนื้อเยื่อที่ปลอดไวรัสได้ต่อไป ดังนั้นจึงส่งผลให้ไม่สามารถดำเนินการเพาะเลี้ยงและตรวจสอบผลการตรวจโรคเพื่อยืนยันความปลอดไวรัสได้ตามแผนงานที่ตั้งไว้ โดยในการศึกษานี้จะดำเนินการต่อไปในการวิจัยโครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ปีงบประมาณ 2562

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