รายงานฉบับสมบูรณ์

(Final Report)

โครงการย่อยที่ 3: การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง

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

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตพืชตระกูลส้มปลอดภัย

แผนงานวิจัย: เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตร

โดย

ปิยะมาศ ศรีรัตน์ และคณะ

สนับสนุนทุนวิจัยโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

รายงานฉบับสมบูรณ์
(Final Report)

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

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ: การวิจัยและพัฒนาการผลิตพืชตระกูลส้มปลอดภัย

แผนงานวิจัย: เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตร

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

ธันวาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 สำหรับดำเนินการวิจัยตลอดโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวง สถานีเกษตรหลวงปางดะ และหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาตัวอย่างพืชและให้การสนับสนุนในด้านบุคลากรในระหว่างดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ดร. อัจฉรา ภาวศุทธิ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ที่ให้คำแนะนำและช่วยประสานงานในระหว่างการดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือและทำให้โครงการวิจัยนี้ประสบสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย
ธันวาคม 2561

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

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

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

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

1. บทนำ

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

โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening disease) เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างรุนแรง มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* โรคกรีนนิ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญเสียในหลายพื้นที่ของการปลูกส้มในเอเชียและแอฟริกาก่อนที่จะถูกระบุว่าเป็นโรคของพืชแบบเดียวกัน โรคกรีนนิ่งถูกเรียกในชื่อที่แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค เช่น ในประเทศจีน เรียกว่า yellow shoot หรือ huanglongbing; ในไต้หวัน เรียกว่า likubin; ในอินเดีย เรียกว่า dieback; ในฟิลิปปินส์เรียกว่า leaf mottle ในแอฟริกาใต้ เรียกว่า yellow branch, blotchy-mottle หรือ greening ต่อมา เมื่อมีความชัดเจนถึงลักษณะของโรคและระบุว่าเป็นโรคเดียวกัน จึงเรียกโรคนี้ว่า “greening” (Graca, 1991) ในไต้หวันไม่มีการรายงานว่าสายพันธุ์ส้มที่ปลูกในเชิงพาณิชย์มีความต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง นอกจากนี้ยังไม่มีการเสนอวิธีที่จะใช้รักษาโรคกรีนนิ่งในส้มได้ แม้ว่าอาการของโรคจะมีความแตกต่างกันไป แต่มักเริ่มต้นด้วยอาการใบมีสีเหลือง มีการเสื่อมของกิ่งก้านและรากก่อนวัยที่ควรจะเกิดขึ้นและสุดท้ายต้นไม้ค่อยๆ 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 โดยทั่วไปแล้ว ต้นอ่อนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนราหรือแบคทีเรียในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปรากฏลักษณะเด่นชัด ดังนั้น จึงสามารถคัดแยกเพื่อกำจัดต้นอ่อนของพืชที่มีการติดโรคจากเชื้อราหรือแบคทีเรียออกได้ตั้งแต่ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นนั้น การปรากฏลักษณะที่บ่งบอกว่ามีการปนเปื้อนของไวรัสจึงสังเกตเห็นได้ยาก ส่วนใหญ่อาการของพืชที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏภายหลังจากที่นำพืชไปปลูก นอกจากนี้ ไวรัสสามารถถ่ายทอดและทำให้ติดเชื้อได้อย่างง่ายดายในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้น ในการผลิตต้นกล้าปลอดไวรัส ต้นแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องเป็นพืชที่ปลอดไวรัสอย่างแท้จริง

หลักการพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย การคัดเลือกเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากต้นพืช การฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ การเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เพื่อให้มีการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ถูกควบคุม และการปรับตัวของของต้นพืชเพาะเลี้ยงที่ได้เมื่อย้ายมาปลูกเลี้ยงในโรงเรือน

จากผลการศึกษาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 โดยทำการเก็บกิ่งของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท ที่มียอดที่มีสุขภาพดีและไม่แสดงอาการของการเป็นโรคจากสถานีเกษตรหลวงปางดะ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำตัวอย่างใบของพืชตระกูลส้มเหล่านี้มาทำการตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง และโรคทริสเตซ่า พบว่า ตัวอย่างใบของเลมอนทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อของทั้งโรคกรีนนิ่งและโรคทริสเตซ่า อย่างไรก็ตามตัวอย่างใบของเกรพฟรุ้ท จำนวนร้อยละ 33.3 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งและตัวอย่างใบของคัมควัท จำนวนร้อยละ 66.7 ของจำนวนใบที่นำมาตรวจสอบ ตรวจพบการติดเชื้อ *Citrus tristeza virus* สาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยจากการศึกษานี้สามารถคัดเลือกยอดเลมอนจำนวน 17 ยอด ที่ไม่พบการติดเชื้อทั้งเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งและไวรัส *Citrus tristeza virus* ซึ่งยอดปลอดโรคเหล่านี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว ในกรณีของเลมอน พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโดยการแช่ชิ้นส่วนยอดในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพโดยมีร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ต่ำและมีร้อยละของชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนสูง กรณีของคัมควัทและเกรพฟรุ้ท แม้ว่าการฟอกฆ่าเชื้อบนเขย่าสารความถี่สูงสามารถลดค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ แต่ยังคงมีค่าการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระดับที่สูง ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเนื้อเยื่อส่วนตายอดของเลมอนสามารถเจริญได้บนอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร MS หรืออาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานสูตร WPM ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม อาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานทั้ง 2 สูตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้เกิดรากได้

ในการศึกษานี้ ได้ทำการพัฒนาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของยอดพืชตระกูลส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก และทำการศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของอาหาร ความเข้มข้นของซูโครส และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BAP ต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอดของพืชตระกูลส้มที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

2. วัตถุประสงค์

โครงการย่อยที่ 3 : การวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง เป็นโครงการวิจัยที่มีแผนการดำเนินการ 3 ปี โดยในปีที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มที่ปลอดโรค โดยทำการพัฒนาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของยอดพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เลมอน เกรพฟรุ้ท และคัมควัท ที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก และศึกษาองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของอาหาร ความเข้มข้นของซูโครส และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด BAP เพื่อใช้เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตต้นแม่พันธุ์พืชตระกูลส้มที่ปลอดโรค

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

จากการเก็บยอดของพืชตระกูลส้ม ได้แก่ เกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน จากต้นส้มที่ไม่ปรากฏอาการของการเป็นโรค ในแปลงปลูกของหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยยอดส้มที่เก็บมีความยาวยอดไม่เกิน 15 เซนติเมตร ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบของส้มแต่ละชนิดมาทำการตรวจโรคกรีนนิ่ง โดยการตรวจสอบหาแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLA) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Jagoueix *et al*.,1994 และตรวจโรคทริสเตซ่าโดยการตรวจสอบหาไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีของ Mehta, *et al*., 1997 สามารถคัดเลือกต้นส้มที่ไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย CLA ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง และไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยต้นส้มเหล่านี้จะใช้เป็นแหล่งต้นพันธุ์ในการเก็บยอดเพื่อเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป อย่างไรก็ตาม มีต้นส้มคัมควัทจำนวนหนึ่งที่ตรวจพบการปนเปื้อนไวรัส CTV ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซ่า โดยต้นส้มคัมควัทจะถูกใช้เป็นแหล่งต้นพันธุ์ในการเก็บยอดเพื่อเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นสำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด

ในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของชิ้นส่วนส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูกภายใต้สภาวะแวดล้อมปกติ ซึ่งน่าจะมีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรก เชื้อจุลินทรีย์ หรือเชื้อก่อโรคในพืชได้มากกว่าต้นพืชที่ปลูกในโรงเรือนที่มีการควบคุม ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้ขั้นตอนของการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวที่เหมาะสม ซึ่งทำได้โดยนำยอดส้มมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดที่เปิดน้ำให้ไหลผ่าน ตัดชิ้นส่วนส้มด้วยมีดที่สะอาด โดยตัดชิ้นส่วนยอดและตัดชิ้นส่วนตามข้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนส้มที่ตัดได้มาแช่ในน้ำสะอาดที่ผสมน้ำยากันเชื้อราชนิดคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดย

ปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที 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 โดยในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน มีค่าร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ เท่ากับ ร้อยละ 40 ร้อยละ 30 และร้อยละ 30 และ มีค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนได้ เท่ากับ ร้อยละ 50 ร้อยละ 60 และร้อยละ 60 ตามลำดับ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยนำชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้าง ขนาดประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร ที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรที่แตกต่างกันจำนวน 9 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร Murashige and Skoog medium (MS) สูตร woody plant medium (WP) และสูตร Linsmaier and Skoog medium (LS) ที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นขององค์ประกอบของสูตรอาหาร (ครึ่งเท่า และหนึ่งเท่าของสูตรมาตรฐาน) และความเข้มข้นของซูโครส (15 และ 30 กรัมต่อลิตร) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มทั้ง 3 ชนิด บนอาหารสูตร ½ LS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (½ LS + Su30) มีแนวโน้มที่ดีในการส่งเสริมการเจริญของเนื้อเยื่อเริ่มต้นให้เกิดยอด เนื่องจากมีค่าร้อยละของการเกิดยอดสูง โดยในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างของเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน บนอาหารสูตร ½ LS + Su30 มีค่าร้อยละของการเกิดยอด เท่ากับ ร้อยละ 70 ร้อยละ 100 และร้อยละ 70 ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS อาหารสูตร WPM และอาหารสูตร LS ที่มีการเติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มของการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตรที่มีการเติมซูโครส 15 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ท คัมควัท และเลมอน มีจำนวนยอด 1.1 - 1.3, 1.2 - 1.6 และ 1.2 - 1.4 ยอดต่อเนื้อเยื่อเริ่มต้น ตามลำดับ และมีจำนวนใบเกิดขึ้น 2.2 - 3.4, 2.4 - 6.9 และ 1.9 - 4.3ใบ ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง ตามลำดับ แม้ว่าสูตรอาหารเหล่านี้ไม่แสดงผลอย่างชัดเจนต่อการเพิ่มปริมาณยอด อย่างไรก็ตาม ยอดที่เจริญบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 มียอดที่สุขภาพดีและมีใบสีเขียว

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่ปลอดเชื้อที่มีขนาดความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร ½ LS + Su30 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัมควัทบนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรมีการเจริญของยอดที่ดีที่สุด คือ มีค่าร้อยละของการเกิดยอด เท่ากับ ร้อยละ 100 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ และมีจำนวนใบต่อยอดสูงที่สุด และใบมีความแข็งแรง เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอน พบว่า อาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นอาหารสูตรที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ร้อยละ 90 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และมีการเจริญของใบที่แข็งแรงและมีจำนวนใบต่อยอดสูง เมื่อทำการ

เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญของยอดส้มในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติม BAP (ชุดควบคุม) พบว่า การเจริญของยอดส้มบนอาหารที่เติม BAP มีค่าร้อยละของการเกิดยอดสูงกว่า และมีการส่งเสริมการเจริญในส่วนความยาวของยอดและส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบที่แข็งแรงต่อยอด อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอดอ่อน

4. สรุป

ในการวิจัยและพัฒนาการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรคสำหรับพื้นที่สูง ได้ทำการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด ประกอบด้วย เกรพฟรุ๊ท คัมควัท และเลมอน โดยเก็บกิ่งอ่อนของส้มที่ปลูกเลี้ยงในพื้นที่ของหน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย สถานีเกษตรหลวงปางดะ อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยตัวอย่างของใบส้มถูกนำมาตรวจโรคกรีนนิ่ง (citrus greening disease) ด้วยวิธี PCR และตรวจโรคทริสเตซ่า (citrus tristeza disease) ด้วยวิธี RT-PCR เพื่อระบุความปลอดโรคของตัวอย่างส้ม สำหรับขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของส้มที่ปลูกในแปลงปลูก ทำโดยนำชิ้นส่วนยอดหรือชิ้นส่วนข้อของพืชตระกูลส้มแช่ในน้ำสะอาดที่ผสมน้ำยากันเชื้อราชนิดคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนยอดหรือชิ้นส่วนข้อของส้มลงในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นเวลา 30 วินาที แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชนิด PPM^{TM} ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 20 นาที วิธีการนี้ทำให้ได้ร้อยละของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่สามารถเจริญเป็นยอดอ่อนของเกรพฟรุ๊ท คัมควัท และเลมอน เท่ากับ ร้อยละ 50 ร้อยละ 60 และ ร้อยละ 60 ตามลำดับ

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

ในการศึกษาผลของการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ชนิด BAP ต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้างที่ปลอดเชื้อที่มีขนาดความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร ½ LS + Su30 และเติม BAP ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัมควัท ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ มีการเจริญของยอดที่ดี มีค่าร้อยละของการเกิดยอด ร้อยละ 100 และ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ มีจำนวนใบต่อยอดสูงที่สุด และใบมีความแข็งแรง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเลมอน พบว่า อาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสม เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ร้อยละ 90 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีการเจริญของใบที่แข็งแรงและมีจำนวนใบต่อยอดสูง เมื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญของยอดส้มในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติม BAP (ชุดควบคุม) พบว่า การเจริญของยอดส้มบนอาหารที่เติม BAP มีค่าร้อยละของการเกิดยอดสูงกว่า และมีการส่งเสริมการเจริญในส่วนความยาวของยอด และส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบที่แข็งแรงต่อยอด อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอดอ่อน

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

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.

From recently our results in 2017, the healthy young branch of *Citrus* spp. consisting of lemon, kumquat and grapefruit were collected from the Royal Agricultural Station Pang Da, Chiang Mai province. From the results of citrus greening and tristeza disease testing showed that both disease were not detected in all of lemon leaves samples. However, citrus greening disease were detected in 33.3% of grapefruit leaves samples and *Citrus Tristeza Virus* were detected in 66.7% of kumquat leaves samples. Seventeen shoots of lemon which as citrus greening disease-free and *Citrus Tristeza Virus*-free shoots were carefully maintained on basal MS medium containing 30 g/L sucrose. At the present, the processes of selection and collection the disease-free citrus shoots are carried out. For surface sterilization of lemon shoot, the surface sterilization with 5% (v/v) clorox solution and 0.1% (v/v)

Tween-20 on a sonicator for 10 minutes were the effective procedures exhibits low percentage of contamination and the highest percentage of explant forming shoots. In case of kumquat and grapefruit, surface disinfection on a sonicator can reduce the percentage of contamination although these are still high value. In the study of *in vitro* culture, lemon shoot bud explants could be grow on basal MS medium or basal WPM medium containing 30 g/L sucrose. However, both basal medium could not induce shoot multiplication and root induction.

In this study, the surface sterilization process of field-grown *Citrus* spp. shoot were developed. Then the several effects of culture medium composition including culture medium types and strength, sucrose concentrations and BAP concentrations on *in vitro* induction and multiplication of *Citrus* spp. were evaluated.

2. Obiective

The sub-project 3: Research and development of the virus-free *Citrus* spp. mother plant production for growing in highland areas is a three-year long project. In the second year, the purpose was to investigate and development the tissue culture process for the production of disease-free *Citrus* spp. mother plant. The surface sterilization process of field-grown *Citrus* spp. shoot were developed and the culture medium composition including culture medium types and strength, sucrose concentrations and BAP concentrations were investigated in order to use as suitable method for producing virus-free *Citrus* spp. plantlets.

3. Results and discussion

In this study, the healthy young branch of *Citrus* spp. consisting of grapefruit, kumquat and lemon were collected from field growing plants of 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 source of explants for *in vitro* culture.

Shoots of about 15 cm in length of *Citrus* spp. were taken. Leaves were removed and shoots were washed carefully with running tap water to remove surface dirt. 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 (each for 10 min). Dipping these segments into 70% ethanol for 30 sec and rinsed by sterile distilled water for 5 min. 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^{TM}) for 20 min. All of these steps were carried out in a laminar flow cabinet. These procedure showed the percentage of survival in grapefruit, kumquat and lemon at 50%, 60% and 60% respectively.

Unfortunately, tissues of field-grown plants are highly contaminated. Consequently, it is difficult to obtain sterile explants which are suitable for *in vitro* tissue culture protocols (Rugini, 1990). Surface disinfection of plant material is essential for *in vitro* cell and tissue culture protocol. In this process, an attempt is made to eliminate microbial contaminants from the surface and interior of plant material without destroying and killing the plant tissues (Teixeira da Silva *et al.,* 2015; Lazo-Javalera *et al.,* 2016). Since disinfection agents used for surface disinfection of explants can also be toxic to plant tissues, a balance between the level of contamination and explant survival should always be considered when disinfection agents are used. Traditionally, the disinfection method using chloride hypochlorite solutions (NaOCl), which usually represents a good option for tissue disinfection (Lazo-Javalera *et al.,* 2016). NaOCl is highly effective against all kinds of bacteria, fungi, and viruses. Moreover, NaOCl has a strong oxidizing property which makes it highly reactive with amino acids, nucleic acids, amines, and amides. The general reaction between amino acids and NaOCl produces the respective aldehyde, NH_4Cl and CO_2 (Yildiz, 2012).

In the *in vitro* cultivation, 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). In the results, ½ LS media supplemented with 30 g/L of sucrose showed positive effect on shoot induction. From this medium, the shoot induction rate of grapefruit, kumquat and lemon was 70%, 100% and 70% respectively after 4 weeks of cultivation. Moreover, the cultivation on all MS, WPM and LS 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, the averages number of shoots and leaves produced from *in vitro* culture of grapefruit kumquat and lemon were 1.1-1.3, 1.2-1.6 and 1.2-1.4 shoot/explant and 2.2-3.4, 2.4-6.9 and 1.9-4.3 leaves/explant, respectively. Although those medium did not certainly effect on shoot multiplication, shoots on ½ LS medium supplement with 30 g/L sucrose were produced healthy shoots and greener leaves.

The experiment investigated the effect of exogenous cytokinin 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 containing with 30 g/L of sucrose and individually supplemented with 0, 1, 2, 3 and 5 mg/L of 6-benzyl amino purine (BAP) for 12 weeks. The best *in vitro* growth of kumquat was achieved when using the medium supplemented with 3 mg/L of BAP. From this treatment, the shoot induction rate was 100% after 4 weeks and it was achieved the highest number of healthy leaves after 12 weeks of cultivation. In the *in vitro* culture of lemon, the suitable medium were ½ LS medium containing with 30 g/L of sucrose and supplemented with 2 or 3 mg/L of BAP. Under these formulas, the shoot induction rate were 90% after 4 weeks and they were achieved high number of healthy greener leaves after 12 weeks of cultivation. When compared to the medium with absent of BAP (control treatment), the *in vitro* growth of citrus shoots on medium supplemented with BAP produced higher shoot induction rate, enhanced shoot elongation and healthy leaves multiplication. However all treatment could not induce shoot multiplication.

4. Conclusions

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

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

The experiments were carried out to determine the effect of exogenous cytokinin on *in vitro* shoot induction and multiplication of *Citrus* spp. In the *in vitro* culture of kumquat, the suitable medium were ½ LS medium containing with 30 g/L of sucrose and supplemented with 3 mg/L of BAP. From this treatment, the shoot induction rate was 100% after 4 weeks and it was achieved the highest number of healthy leaves after 12 weeks of cultivation. In case of lemon, the suitable medium

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

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คณะผู้วิจัย	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ค
Executive summary	ฌ
สารบัญ	-1-
สารบัญตาราง	-2-
สารบัญภาพ	-3-
บทคัดย่อ	-5-
Abstract	-7-
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	16
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	44
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	52
ตารางสรุปเปรียบเทียบผลงานวิจัยกับแผนงานวิจัย	55

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

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก โดยทำซ้ำวิธีการละ 20 ยอด	20
ตารางที่ 2	ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนเกรพฟรุ้ท ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์	23
ตารางที่ 3	ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนคัมควัท ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์	26
ตารางที่ 4	ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเจริญของต้นอ่อนเลมอนที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์	29
ตารางที่ 5	ผลของการเติมไซโตไคนิน ชนิด BAP ต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญของต้นอ่อนคัมควัท	32
ตารางที่ 6	ผลของการเติมไซโตไคนิน ชนิด BAP ต่อการชักนำให้เกิดยอด การเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญของต้นอ่อนเลมอน	35

		หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1	องค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige and Skoog basal medium (MS medium; Murashige and Skoog, 1962)	52
ตารางภาคผนวกที่ 2	องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Woody plant basal medium (WPM medium; Lloyd and McCown, 1981)	53
ตารางภาคผนวกที่ 3	องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Linsmaier and Skoog Medium (LS medium; Linsmaier and Skoog, 1965)	54

สารบัญภาพ

		หน้า
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	17
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	17
ภาพที่ 3	ตัวอย่างการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในชิ้นส่วนของพืชตระกูลส้มที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ	19
ภาพที่ 4	วิธีการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อส้มที่ได้จากต้นส้มที่ปลูกในแปลงปลูก	21
ภาพที่ 5	ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกรพฟรุ้ท และขนาดของเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง	22
ภาพที่ 6	ตัวอย่างการเจริญของยอดเกรพฟรุ้ท ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)	24
ภาพที่ 7	ตัวอย่างการเจริญของยอดคัมควัท ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)	27
ภาพที่ 8	ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอน ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)	30
ภาพที่ 9	ตัวอย่างการเจริญของยอดคัมควัทที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)	33

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 10	ตัวอย่างการเจริญของยอดเลมอน ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)	36
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	42
ภาพที่ 12	ตัวอย่างผลการตรวจโรคทริสเตซ่าในส้มคัมควัท โดยแสดงผลผลิต RT-PCR ของการตรวจยีน ขนาด 670 คู่เบส ของไวรัส CTV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทริสเตซ่าในตัวอย่างส้มคัมควัท (C1-C3) โดยใช้ 18S rRNA gene ขนาด 286 คู่เบส เป็นยีนควบคุม	42
ภาพที่ 13	ตัวอย่างภาพเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของคัมควัทที่ได้จากการตัดเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดสเตอริโอ	43
ภาพที่ 14	ตัวอย่างการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของส้มคัมควัท ขนาด 3.0 มิลลิเมตรที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ LS + Su30 ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)	43

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

บทคัดย่อ

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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