การสร้างต้นอ่อนส้มเขียวหวานและส้มโชกุนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Embryogenesis of *Citrus reticulata* (Keawan and Shokoon)

จารุวรรณ จาติเสถียร[1] กษิดิศ ดิษฐบรรจง[2]

Jaruwan Chartisathian[1] Karsedis Distabanjong[2]

หิรัญ หิรัญประดิษฐ์[3]

Hirun Hirunpradit[3]

ABSTRACT

Embryogenic callus can be induced from immature ovule of *Citrus reticulata*, Thai cultivars : Som Keawan and Som Shokoon. The higher callus induction frequency can be obtained from fruits at 0.6-0.8 cm. diameters. The larger ovule sizes showed higher frequency inducing callus than that of the smaller ones. Callus can be induced by two different kinds of media, Murashige & Tucker basal medium + 500 mg./L malt extract + 2 mg./L BA and Basal medium + 500 mg./L malt extract + 1 mg./L kinetin + 0.1 mg./L IAA. Callus can be proliferated in both liquid and solid basal media of Murashige & Tucker. Development media of Som Keawan and Som shokoon were supplemented with 5 % galactose or 5 % lactose. Somatic embryos can be regenerated with normal shoots and roots in the media containing 1.0 mg./L GA_3.

Key words : tissue culture, Keawan and Shokoon

[1] สังกัด กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ปฏิบัติงานที่สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทร. 5614484

Plant Pathology and Micrabiology Div. Working at Office of Biotechnology Research and Development. Department of Agriculture. Tel. 5614484

[2] สังกัด สถาบันวิจัยยาง ปฏิบัติงานที่ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทร. 5614484

Rubber Research Institute. Working at Office of Biotechnology Research and Development. Department of Agriculture. Tel. 5614484

[3] สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทร. 5614484

Office of Biotechnology Research and Development. Department of Agriculture. Tel. 5614484

บทคัดย่อ

การสร้างต้นอ่อนส้มโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มจากการชักนำให้เกิด embryogenic callus ในส้มเขียวหวาน และส้มโชกุนสามารถกระทำได้โดยใช้ไข่อ่อน (ovule) จากผล อ่อนส้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของผลระหว่าง 0.6-0.8 ซม. มาเลี้ยงในอาหาร Murashige & Trucker basal medium (MT) ใส่ malt extract 500 mg/L และ BA 2 mg/L (Nu2) หรืออาหาร Murashige & Trucker basal medium (MT) ใส่ malt extract 500 mg/L kinetin 1 mg/L IAA 0.1 mg./L (Nu5) เป็นเวลา 3 เดือน สามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ในอาหารทั้ง 2 ชนิด embryogenic สามารถเพิ่มปริมาณได้ในอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยไม่ใส่สารเร่งการเจริญเติบโตซึ่งประกอบด้วย Murashige & Trucker basal medium และใส่ malt extract 500 mg/L embryogenic callus เหล่านี้สามารถพัฒนา เป็น embryoid โดยย้ายใส่อาหาร MT ใส่น้ำตาลแลคโตส 50 มก./ลิตร (BMEL) embryogenic callus จะพัฒนาให้เกิดรูปร่าง กลมขนาดใหญ่ขึ้นเรียกว่า embryoid และ embryoid จะพัฒนาต่อโดยสร้างคลอโรฟิลล์ ทำให้ embryoid เกิดสีเขียวเข้ม จากนั้นย้าย dark green embryoid มาเลี้ยงในอาหาร BMEL ใส่ GA3 1 มล./ลิตร embryoid สีเขียวเข้มจะพัฒนาต่อไปเป็นรูปหัวใจและเจริญเป็นต้นอ่อน ที่มีต้นและรากที่สมบูรณ์

คำหลัก : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน

คำนำ

ในอาณาจักรพืชมีคุณสมบัติที่สำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดนวตกรรมใหม่ในมวลมนุษยชาติที่ได้ใช้ประโยชน์ในขณะนี้คือคุณสมบัติที่เรียกว่า **Totipotency** ซึ่งหมายถึงคุณสมบัติที่พืชสามารถพัฒนาตัวเองจากหนึ่งเซลล์ให้แบ่งตัวและเจริญเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ได้ จากคุณสมบัตินี้ทำให้เกิดกระบวนการสร้างคัพภะ (embryogenesis) ที่เกิดได้ในหลอดทดลองโดยพืชสามารถพัฒนาจากเซลล์เพียงหนึ่งเซลล์ให้เป็นพืชต้นใหม่ได้โดยผ่านกระบวนการสร้างคัพภะ ซึ่งกระบวนการสร้างคัพภะในหลอดทดลองนี้ได้มีรายงานในครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1958 Steward ได้เสนอรูปแบบของการพัฒนาเซลล์แครอท โดยผ่านกระบวนการสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืช (somatic embryogenesis) (Zimmerman,1993) จากนั้นความสำคัญของการสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืชได้ศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในพืชที่เป็นพืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับ (Ronchi and Giorgetti, 1995; West and Harada, 1993) ประโยชน์ของการศึกษากระบวนการสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืชนั้นมีหลายด้าน คือ การขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว พบว่าการขยายพันธุ์พืชอย่างรวดเร็วโดยผ่านกระบวนการสร้างคัพภะนั้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการขยายพันธุ์ได้ดีกว่าวิธีอื่น ๆ (Kunitake and Mu, 1995) นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุดิบในการศึกษา การเพาะเลี้ยงเซลล์ไร้ผนัง (Vardi *et al.*, 1982) การปรับปรุงพันธุ์โดยคัดเลือกจากความแปรปรวนของเซลล์ (somaclonal variation) (Gentle *et al.*,1992) การถ่ายยีน (transformation) (Niedz *et al.*, 1995) ตลอดจนการเก็บเชื้อพันธุ์ (Sakai *et al.*, 1991)

ส้มจัดเป็นไม้ผลที่สำคัญอันดับสองของโลกรองจากองุ่น ส้มปลูกกันทั่วโลกรวมทั้งสิ้นประมาณ 90 ประเทศ บริเวณที่ปลูกส้มอยู่ระหว่างเส้นศูนย์สูตรที่ 40° เหนือ และ 40° ใต้ เมื่อพิจารณาผลผลิตรวมในโลก เมื่อปี ค.ศ. 1960 ผลผลิตส้มรวมได้ 22 ล้านตัน และให้ผลผลิตมากขึ้นถึง 78 ล้านตันในปีค.ศ. 1991 (Kunitake and Mu, 1995) การศึกษาเกี่ยวกับการสร้างคัพภะในเซลล์ส้มได้มีรายงานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1672 โดย Kochba และคณะสามารถผลิต embryogenic callus จากการกระตุ้น nucleus cell ซึ่งอยู่ในไข่อ่อนของส้มพันธุ์ Shamouti sweet orange (*Citrus sinensis* Obs.) และสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ แต่เนื่องจากส้มสามารถขยายพันธุ์ได้เร็วโดยการติดตาหรือต่อกิ่ง จึงไม่นิยมใช้ embryogenic callus ในการขยายพันธุ์แต่ embryogenic callus ของส้มนิยมใช้ในงานวิจัยเชิงลึก โดยนำมาเป็นเซลล์พื้นฐานในการแยกและเลี้ยงเซลล์ไร้ผนังของส้ม mandarin และประสบความสำเร็จ (Vardi *et al.*, 1982) งานวิจัยได้พัฒนาต่อไปในเชิงประยุกต์ โดยรวมเซลล์ไร้ผนังของส้มหลายชนิดเพื่อปรับปรุงพันธุ์เช่นการรวมเซลล์ไร้ผนังของส้มพันธุ์ Flying Dragon (*Poncirus triforiata*) กับส้มพันธุ์ Hamlin (*Citrus sinensis*) เพื่อนำไปคัดเลือกต้นตอที่ดีมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ (Grosser *et al.*, 1988a) การปรับปรุงพันธุ์ส้มโดยใช้ประโยชน์จาก embryogenic callus ยังสามารถคัดพันธุ์ต้านทานโรคได้จากความแปรปรวน

ของพันธุกรรมใน embryogenic callus cells เช่นการคัดเซลล์จาก embryogenic callus และเซลล์ไร้ผนังของเลมอนพันธุ์ Femminello และส้มพันธุ์ Tarocco ให้ต้านทานโรค mal sacco ที่เกิดจากเชื้อ *Phoma tracheiphila* (Gentile *et al.*, 1992) เมื่อการ ตัดต่อสารพันธุกรรมได้ถูกคิดค้นขึ้นส้มจึงได้รับความสนใจ ในงานวิจัยทางด้านนี้ด้วยและ embryogenic callus ก็ยัง เป็นเซลล์พื้นฐานให้กับงานวิจัยในด้านนี้เช่น การตัดต่อ ยีนเรืองแสง (*gfp* gene) เข้าสู่เซลล์ไร้ผนังที่เตรียมจาก embryogenic callus ส้มพันธุ์ sweet orange (*C. sinensis*) (Niedz *et al.*, 1995) นอกจากการปรับปรุงพันธุ์ embryogenic callus ของส้มยังใช้ในการเก็บเชื้อพันธุ์ส้มต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ -196°ซ(Sakai *et al.*, 1991) ในประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นประเทศที่ปลูกส้มเป็นการค้า โดยเฉพาะส้มเขียวหวานและพันธุ์ใกล้เคียง ส้มดังกล่าวนิยมบริโภคสดใช้คั้นน้ำและเลี้ยงเด็กอ่อน ส้มส่วนใหญ่ใช้บริโภคในประเทศ และมีการส่งเป็นสินค้าออกไปขาย ยังต่างประเทศได้ถึง 574 เมตริกตัน/ปี นำเงินรายได้ เข้าประเทศได้ถึง 6,818,000 บาท/ปี (นิรนาม, 2541) แต่ปัญหาของการปลูกส้มคือ โรคและแมลง ซึ่งทำให้ผลผลิต ส้มได้ไม่ดีพอ และต้องใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดสูง ส่งผลให้เกิดพิษตกค้างในผลส้มและสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นอันตรายต่อชีวิต และสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้น การปรับปรุงส้มไทยจึงมีความจำเป็นต้องศึกษา เพื่อแก้ปัญหาให้กับเกษตรกรโดยใช้เทคโนโลยีที่ก้าวหน้าขึ้น ดังนั้นการศึกษากระบวนการสร้างคัพภะจากเซลล์ส้มจึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่ต้องศึกษา เพื่อรองรับงานประยุกต์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป การศึกษาในครั้งนี้จะศึกษาในส้มเขียวหวานและส้มโชกุน (*C.reticulat*) ซึ่งเป็นส้มที่นิยมปลูกมากในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ผลส้มโชกุนและเขียวหวาน 2 ขนาด คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 ซม. และ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. (0.6-0.8 ซม.)

2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พร้อมเครื่องแก้ว

3. กล้องผ่าตัด (stereomicroscope)

วิธีการทดลอง

1. เปรียบเทียบผลส้มที่มีอิทธิพลต่อการ ชักนำให้เกิด embryogenic callus

นำผลส้มโชกุนและส้มเขียวหวานขนาดต่าง ๆ กันมาแบ่งได้ 2 ขนาด คือ

- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 ซม.
- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. (0.6-0.8 ซม.)

นำผลส้มเหล่านั้นมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 10 % ผสม twin-20 2 หยด ใช้เวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ 10 นาที จากนั้นล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำผลส้มมาทดลองภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยใช้กล้องผ่าตัด (stereomicroscope) ผ่าและตัดเอาเฉพาะไข่อ่อน ใส่ในอาหาร 2 ชนิดคือ

1. Nu2 = MT basal medium 500 mg/l ME+ 2 mg/l BA

2. Nu5 = MT+500 mg/l ME+1 mg/l kenetin+0.1 mg./l IAA

หมายเหตุ MT = Murashige and Trucker basal medium
ME = Malt Extract

โดยใส่ไข่อ่อน 20 เม็ด/ขวด ทำ 5-20 ขวด/การทดลอง ขึ้นอยู่กับจำนวนไข่อ่อนที่พบในผลส้ม เก็บผลโดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงไปเป็น embryogenic callus

2. การเพิ่มปริมาณ embryogenic callus

นำ embryogenic callus ของส้มเขียวหวานและส้มโชกุนที่ได้จากการทดลองในอาหารเพิ่มปริมาณ embryogenic callus ซึ่งประกอบด้วย MT basal media ไม่ใส่สารเร่งการเจริญเติบโต (growth regulator) และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 3 เดือนบันทึกการเพิ่มปริมาณ embryogenic callus

3. การชักนำให้เกิด embryoid

นำ embryogenic callus มาเลี้ยงบนอาหาร 5 ชนิด โดยมีรายละเอียดดังนี้

ชนิดของอาหาร	ชนิดของน้ำตาล 5 %	น้ำมะพร้าว 15 %	Murashige&Trucker Basal medium
1. BMECS	น้ำตาลทรายขาว	ใส่น้ำมะพร้าว	MT basal medium
2. BMECSu	ซูโครส		
3.BMECG	กาแลคโตส		
4. BMECL	แลคโตส		
5. BMES	น้ำตาลทรายขาว	ไม่ใส่น้ำมะพร้าว	
6. BMESu	ซูโครส		
7. BMEG	กาแลคโตส		
8. BMEL	แลคโตส		

เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1-1.5 เดือนบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงเป็น embryoid

4. การพัฒนา embryoid ให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

4.1 ทดสอบระยะ embryoid ที่เหมาะสมในการกระตุ้นด้วย gibberellin (GA_3) โดยวางแผนการทดลองแบบ 4x4 factorial in CRD จำนวน 10 ซ้ำ โดยมี

ปัจจัยที่ 1 คือ embryoid ของส้มโชกุนในระยะต่างกัน 4 ระยะ คือ

1. ระยะ white globular
2. ระยะ light green globular
3. ระยะ dark green globular
4. ระยะ heart shape

ปัจจัยที่ 2 คือ อาหาร MT basal media ใส่น้ำตาลแลคโตส 5 % และมีปริมาณ GA_3 ความเข้มข้น ต่าง ๆ กัน 4 ชนิด คือ 0, 0.5, 1, 1.5 มก./ลิตร

นำ embryoid ระยะต่าง ๆ 4 ระยะ ดังกล่าวในปริมาณที่เท่า ๆ กันเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของ GA_3 ต่าง ๆกันคือ 0 0.5 1 1.5 มก./ลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 1.5 เดือน บันทึกผลจากการเปลี่ยนแปลง embryoid ไปเป็นต้นและราก

4.2 การทดสอบส้มเขียวหวานในระยะ embryoid ที่เหมาะสมในอาหารที่มี GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

นำ embryoid ของส้มเขียวหวานในระยะ globular เขียวเข้มเลี้ยงบนอาหาร MT basal media ใส่น้ำตาลแลคโตส 5 % มีความเข้มข้น GA_3 ต่างกัน ดังนี้ คือ 0 0.5 1 1.5 มก./ลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 1.5 เดือน บันทึกผลจากการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นและราก

ผลการทดลอง

1. เปรียบเทียบผลส้มที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิด embryogenic callus

จากการแบ่งผลส้มเขียวหวานและส้มโชกุนตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกัน พบว่า หลังจากผ่าผลส้มซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 ซม. จะมีไข่อ่อนที่พัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์แล้วเป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะไม่นำมาศึกษาในครั้งนี้ และมีไข่อ่อนขนาดเล็กอยู่เป็นส่วนน้อย เมื่อผ่าผลส้มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. พบว่ามีไข่อ่อน 2 ขนาดเช่นเดียวกันแต่เป็นไข่อ่อนที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ทั้งสิ้น โดยแบ่งเป็นไข่อ่อนขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ไข่อ่อนซึ่งมีขนาดเล็กมากต้องใช้กล้องผ่าตัดจึงสามารถนำออกมาเลี้ยงในอาหารได้โดยแยกขนาดของไข่อ่อนทั้ง 2 ออกจากกัน จากผลการทดลองโดยเลี้ยงไข่อ่อนดังกล่าวเป็นเวลา 3 เดือนในอาหาร 2 สูตรคือ Nu2 และ Nu5 สามารถเห็นความแตกต่างในการเกิด embryogenic callus ได้ดังแสดงในTable 1 พบว่าหลังจากเลี้ยงไข่อ่อนในอาหาร Nu2 และ Nu5 เป็นเวลา 3 เดือน ไข่อ่อนขนาดใหญ่ในผลส้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. ทั้งส้มเขียวหวาน

และส้มโชกุนสามารถเกิด embryogenic callus (Figure 1) และส้มโชกุนจะตอบสนองต่ออาหารทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าส้มเขียวหวาน เมื่อพิจารณาชนิดของอาหาร ในส้มชนิดเดียวกันพบว่าเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด embryogenic callus ให้ผลใกล้เคียงกันแต่เมื่อพิจารณา ปริมาณ embryogenic callus ที่เกิดในแต่ละไข่อ่อนแล้วอาหาร Nu5 จะให้ปริมาณ embryogenic callus มากกว่าทั้งใน ส้มเขียวหวานและส้มโชกุน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

2. การเพิ่มปริมาณ embryogenic callus

หลังจากนำ embryogenic callus ส้มเขียวหวานและส้มโชกุนมาเลี้ยงในอาหาร MT basal medium ไม่ใส่สารเร่งการเจริญเติบโต (BM) เป็นเวลา 3 เดือน สามารถบันทึกผลการเพิ่มปริมาณ embryogenic callus ได้โดย Figure 1 แสดงปริมาณ embryogenic callus ในขวดที่เลี้ยงด้วยอาหาร MT basal medium เป็นเวลา 3 เดือน embryogenic callus สามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้งส้มโชกุนและส้มเขียวหวาน (Figure 2)

3. การชักนำให้เกิด embryoid

หลังจากนำ embryogenic callus มาเลี้ยงบนอาหาร 5 ชนิดเป็นเวลา 3 เดือนสามารถบันทึกความแตกต่างของจำนวน embryoid ซึ่งมีลักษณะกลมเห็นได้ชัด และมีการพัฒนา chlorophyll ทำให้เกิดเป็น green globular shape ดังแสดงใน Figure 3 และแสดงผลการทดลองใน Table 2 จะเห็นว่าการใส่น้ำมะพร้าวในอาหารให้ ผลโดยรวมดีกว่าไม่ใส่น้ำมะพร้าวเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณา น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ทั้งในอาหารที่ใส่และไม่ใส่น้ำมะพร้าวพบว่า

1. อาหารที่ใส่น้ำตาลทรายและไม่ใส่น้ำมะพร้าวไม่สามารถชักนำให้เกิด embryoid ทั้งในส้มเขียวหวานและส้มโชกุน

2. อาหารที่ใส่น้ำตาลซูโครส จะให้ผลในการชักนำให้เกิด embryoid ได้ดีกว่าอาหารที่ใส่น้ำตาลทราย

3. อาหารที่ใส่น้ำตาลกาแลคโตสจะให้ผลในการชักนำให้เกิด embryoid ได้ดีกว่าอาหารที่ใส่น้ำตาลทรายและน้ำตาลซูโครส และให้ผลใกล้เคียงกันในส้มทั้งสองชนิด แต่จะให้ผลดีกว่าในอาหารที่ใส่น้ำมะพร้าว

4. อาหารที่ใส่น้ำตาลแลคโตส จะให้ผลดีที่สุดในการชักนำให้เกิด embryoid ของส้มโชกุนและให้ผลไม่แตกต่างกันในอาหารที่ใส่น้ำมะพร้าวและไม่ใส่น้ำมะพร้าว สำหรับส้มเขียวหวานผลการชักนำ embryoid ได้น้อยกว่าส้มโชกุนและจะให้ผลไม่แตกต่างกันในอาหารที่ใส่และไม่ใส่น้ำมะพร้าว

จากผลการทดลองในครั้งนี้ จึงเลือกอาหาร BMEL เป็นอาหารหลักในการทดลองต่อไป เพื่อกระตุ้นให้ embryoid พัฒนาต่อเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์

4. การพัฒนา embryoid ให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

4.1 ทดสอบระยะ embryoid ที่เหมาะสมในการกระตุ้นด้วย gibberellin (GA_3)

นำ embryoid ระยะต่าง ๆ กัน Figure 4 มาเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณ GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 เดือนสามารถแสดงผลใน Table 3, 4 จาก Table 3 พบว่า embryoid เกือบทุกระยะ เมื่อเลี้ยงบนอาหารไม่ใส่ GA_3 จะพบลักษณะผิดปกติที่เรียกว่า malform (Figure 5) ยกเว้น embryoid ระยะ globular เขียวเข้มจะไม่พบลักษณะผิดปกติดังกล่าวและไม่พบในอาหารที่มี GA_3 ทุกความเข้มข้นแสดงว่า GA_3 ช่วยลดการเกิด malform ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการ จากการทดสอบทาง สถิติพบว่าการใส่ GA_3 ให้ผลแตกต่างจากการไม่ใส่ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มก./ลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ การเกิดต้นสูงกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ (Table 3) และการเกิดราก (Table 4) สูงกว่าระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ผลการทดลอง สามารถแสดงโดย Figure 6 และเมื่อต้นเจริญ เติบโตพร้อมปลูก (Figure 7) จึงนำออกปลูกในโรงเรือน

4.2 การทดสอบส้มเขียวหวานในระยะ embryoid ที่เหมาะสมในอาหารที่มี GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ กันหลังจากเลี้ยง embryoid ของส้มเขียวหวานในระยะ globular เขียวเข้มในอาหาร MT basal media ใส่น้ำตาลแลคโตส 5% ที่มีความเข้มข้น GA_3 ต่าง ๆ ดังนี้ 0 0.5 1 1.5 มก./ลิตร เป็นเวลา 5 เดือน สามารถแสดงผลได้ใน Table 3 และ Figure 8 จากการเลี้ยง embryoid ในระยะ globular สีเขียวเข้ม ในอาหาร BMEL ที่มี GA_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า embryoid ของส้มเขียวหวานมี การตอบสนองต่ออาหารและ GA_3 ในการเกิดต้นและการเกิดรากในส้มเขียวหวาน

ระหว่างอาหารที่ไม่ใส่ GA_3 และ อาหารที่ใส่ GA_3 ความเข้มข้นต่ำ (0.5-1 มก./ลิตร) ไม่แตกต่างกันแต่จะต่างจากการเกิดต้นในอาหารที่มี GA_3 ความเข้มข้น 1.5 มก./ลิตร ซึ่งเกิดต้นถึง 106.67 % แต่ความเข้มข้นของ GA_3 สูง (1-1.5 มก./ลิตร) จะยังยั้งการเจริญของรากแต่เมื่อพิจารณาโดยรวมจาก Figure 2 พบว่า GA_3 1.0 มก./ลิตร เหมาะสมในการกระตุ้นให้ embryoid เจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืชในส้มชนิดต่าง ๆ สามารถใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืช. เช่น ไข่อ่อนอับละอองเกสร เมล็ดลีบ คัพภะ เอ็นโดสเปริม เป็นต้น มาชักนำและพัฒนาการให้เป็นต้นพืชในหลอดทดลอง โดยผ่านกระบวนการสร้างคัพภะในส้มพันธุ์แมนดาริน ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับส้มเขียวหวานและส้มโชกุน จะใช้ส่วนของไข่อ่อน คัพภะ และเมล็ดลีบ มาชักนำให้เกิด embryogenic callus (Kunitake and Mu, 1995) ซึ่งรายละเอียดของการนำไข่อ่อนอายุเท่าไรนั้นจะรายงานเป็นระยะเวลา เช่น 1 เดือนหลังจากดอกบาน เป็นต้น แต่การทดลองในครั้งนี้ไม่สะดวกในการกำหนดเวลาของดอกบาน เนื่องจากต้องไปเก็บลูกส้มจากสวนเกษตรกร จึงต้องใช้ขนาดของผลส้มเป็นมาตรฐานแทนระยะเวลาหลังดอกบาน ซึ่งผลส้มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. พร้อมที่จะนำมาผลิต embryogenic callus ผลส้มดังกล่าวเมื่อพิจารณาไข่อ่อนในผลส้มที่ผ่าออกมาพบว่ามีไข่อ่อนขนาดใหญ่และขนาดเล็ก โดยไข่อ่อนขนาดใหญ่มีจำนวนมากกว่าขนาดเล็ก ไข่อ่อนขนาดเล็กยากต่อการนำมาเลี้ยงในอาหารและจากผลการทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าไข่อ่อนขนาดใหญ่ในส้มเขียวหวานและส้มโชกุน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการนำมาเลี้ยงและชักนำให้เกิด embryogenic callus สาเหตุที่ ต้องศึกษาไข่อ่อนขนาดใหญ่และขนาดเล็ก เนื่องจากไม่ทราบว่า ไข่อ่อนขนาดใดดีที่สุดและต้องการจะปรับเทคนิคการแยก ไข่อ่อนออกมาเลี้ยงในอาหาร เนื่องจากการนำไข่อ่อนขนาดเล็ก ออกจากผลต้องใช้กล้องผ่าตัดในการแยก การศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าไข่อ่อนขนาดใหญ่ในผลอ่อนขนาดเส้นผ่าศูนย์ กลางเล็กกว่า 1 ซม. นั้นเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงและ ชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ดีกว่าไข่อ่อนขนาด เล็กในผลขนาดเดียวกัน ดังนั้นในการทำงานที่เป็นงานประจำ การชักนำไข่อ่อนส้มเขียวหวานและส้มโชกุนให้เกิด embryogenic callus จึงไม่จำเป็นต้องใช้กล้องผ่าตัดซึ่งทำให้เกิดความล่าช้าในการทำงาน การใช้เพียงแว่นขยายธรรมดา สามารถแยกไข่อ่อนขนาดใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วจากเหตุผลดังกล่าวมีประโยชน์ต่อการปรับ ใช้ในการชักนำส้มเขียวหวาน และส้มโชกุนให้เกิด embryogenic callus สมควรใช้ไข่อ่อนขนาดใหญ่ในผลส้ม ขนาดเล็กกว่า 1 ซม.

เมื่อพิจารณาผลส้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 ซม. นั้น พบว่าไข่อ่อนที่มีขนาดใหญ่จะพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์แล้วถ้านำไปเลี้ยงในอาหารเมล็ดจะงอกเป็นต้นแทนการเกิดเป็น embryogenic callus ถ้านำไข่อ่อนที่มีขนาดเล็กมาเลี้ยงสามารถเกิด embryogenic callus ได้เช่นกันแต่ช้ามากใช้เวลาถึง 6 เดือนและไม่ได้แสดงข้อมูลในครั้งนี้ หากพิจารณาเปรียบเทียบกับผลส้มขนาดเล็กแล้วจะเห็นว่าไข่อ่อนของส้มขนาดใหญ่ที่ใช้ทดลองนั้นคือ ไข่อ่อนที่พัฒนามาจากไข่อ่อนขนาดเล็กในผลอ่อนของส้มขนาดเล็กนั่นเอง ดังนั้นประสิทธิภาพหรือความล่าช้าในการเกิด embryogenic callus คล้ายคลึงกันไม่ได้แสดงข้อมูลไว้และจากผลการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าไข่อ่อนขนาดใหญ่ของส้มเขียวหวานและโชกุนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการนำมาเลี้ยง และสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus จากการศึกษาอาหาร 2 สูตร คือ Nu2 ซึ่งมีสารเร่งการเจริญชนิดเดียวคือ BA ปริมาณ 2 มก./ลิตร สำหรับ Nu5 ประกอบด้วยสารเร่งการเจริญ 2 ชนิดคือ IAA 0.1 มก. และ kinetin 1 มก./ลิตร ซึ่งจากการตรวจเอกสาร (Kunitake and Mu, 1995) ในส้มชนิดเดียวกันคือ *C. reticulata* หรือพวกแมนดาลิน ไม่ปรากฏสูตรดังกล่าวทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้สูตรอาหารใหม่ที่เหมาะสมกับการชักนำให้เกิด embryogenic callus ในส้มเขียวหวานและโชกุน จากการเปรียบเทียบส้มทั้ง 2 พบว่า Nu5 ดีกว่า Nu2 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดปริมาณ embryogenic callus มากกว่า ลักษณะของ embryogenic callus จะมีรูปทรงกลมอยู่เป็น กลุ่มอย่างหลวม ๆ เรียกว่า proembryogenic cell mass (PEM) PEM จะสามารถเพิ่มปริมาณในอาหาร MT basal medium ได้ดีเช่นเดียว

กับส้มชนิดอื่น ๆ (Kunitake and Mu, 1995) การเพิ่มปริมาณนอกจากการศึกษาในอาหารแข่แข็งแล้วยังสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วในอาหารเหลวแต่มิได้ แสดงข้อมูลในที่นี้ปริมาณ PEM หรือ embryogenic callus ในส้มเขียวหวานและส้มโชกุนสามารถชักนำให้เกิด embryoid ได้โดยใช้น้ำตาลแลคโตสและกาแลคโตสเช่นเดียวกับ *C. reticulata* อื่น ๆ (Kunitake and Mu, 1995) การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลแลคโตสเหมาะสมที่สุด แต่ในส้มเขียวหวานน้ำตาลกาแลคโตสในอาหารที่ใส่น้ำมะพร้าวสามารถให้ผลการชักนำการเกิด embryoid ได้เท่าเทียมกับอาหารที่ใส่น้ำตาลแลคโตส embryoid ของส้มเขียวหวานและส้มโชกุนที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์คือระยะ globular ที่มีสีเขียวเข้มหรือที่เรียกว่า dark green globular ความเหมาะสมในที่นี้หมายถึง ระยะที่อ่อนที่สุดสามารถนำไปกระตุ้นด้วย GA_3 1.0 มก./ลิตร แล้วให้ต้นอ่อนส้มที่มีลักษณะดีมีลำต้นยืดยาวมีใบแท้กางออกไม่มีลักษณะของ malform จากการศึกษาในเอกสาร embryoid ส้ม *C.reticulata* จะใช้ GA_3 กระตุ้นการเกิดเป็นต้นทั้งสิ้น (Kunitake and Mu, 1995) จากการศึกษาในเอกสารหลายฉบับไม่ได้บอกถึงรายละเอียดของการใช้ชนิดน้ำตาลในการชักนำให้เกิดต้นร่วมกับ GA_3 การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดลองใช้น้ำตาลทรายขาวเปรียบเทียบกับน้ำตาลแลคโตสในการกระตุ้นให้เกิดต้นในความเข้มข้นของ GA_3 ต่าง ๆ กันพบว่าการใช้ ใช้น้ำตาลทรายขาวให้ผลไม่ดีเท่าน้ำตาลแลคโตส ซึ่งการทดลองนี้ไม่ได้แสดงข้อมูลให้ทราบต้นส้มที่พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้วสามารถนำออกปลูกในโรงเรือนสรุปได้ดังนี้

- ส้มเขียวหวานและส้มโชกุนสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ในอาหาร MT basal mrdium ใส่ BA 2 มก./ลิตร และอาหารที่ใส่ IAA 0.1 มก./ลิตรและ kinetin 1 มก./ลิตร
- embryogenic callus ของส้มเขียวหวานและส้มโชกุนสามารถเพิ่มปริมาณได้โดยเลี้ยงในอาหาร MT basal medium ทั้งในอาหารแข็งและในอาหารเหลว
- การชักนำให้เกิด embryoid ในส้มเขียวหวานและในส้มโชกุนสามารถใช้น้ำตาลแลคโตส และกาแลคโตส 5 % แทนน้ำตาลทราย
- ระยะ embryoid ของส้มเขียวหวานและโชกุนที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เจริญเป็นต้นและรากคือระยะ dark green globular และอาหารที่เหมาะสมในการเกิดต้นคืออาหาร MT basal medium ที่ใส่น้ำตาลแลคโตส 5 % และใส่ GA_3 เข้มข้น 1.0 มก./ลิตร

Table 1 Percent of embryogenic callus were induced by young ovule cultured from different size of Som Keawan and Som Showkoon fruits. They were culture for 3 months on two kind of media (Nu2 and Nu5)

Varieties	**Media**	**Large size (d>1 cm)**	**Small size (d<1 cm)**	
			Small ovule	**Large ovule**
Som Keawan	Nu2	0	0	10
	Nu5	0	0	10
Som Showkoon	Nu2	0	0	33
	Nu5	0	0	40

Table 2 Level of embryoid formation on the different medium cultured for one month.

Basal media	Coconut water	C - source	Symbol	Som Keawan	Som Showkoon
MT	With	Sugar	BMECS	+	-
		Sucrose	BMECSu	++	-
		Garlactose	BMECG	+++	+++
		Lactose	BMECL	+++	++++
	Without	Sugar	BMES	-	-
		Sucrose	BMESu	+	-
		Garlactose	BMEG	++	++
		Lactose	BMEL	+++	++++

Remark :

+ = lowest quantity

++ = low quantity

+++ = high quantity

++++ = highest quantity of embryoid formation when compare with 8 different media

Table 3 Percent of shoot development from Som Showkoon embryoid were cultured on MT basal media with 5 % latoes and different concentration of GA_3, 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l. for 5 months in 25-27°C

	Stat of embryogenic callus				
GA_3 (mg/L)	White globular	Light green globular	Dark green globular	Heart shape	GA_3-mean
0	2.60[m]	1.20[m]	2.25	1.0*	1.78 b
0.5	1.00	4.20	4.40	4.00	4.80 $\bar{a}$
1.0	5.67	4.20	5.33	6.60	5.44 a
1.5	3.83	2.80	6.67	5.40	4.73 a
Embryoid-mean	4.56	3.10	4.83	4.40	

[m] = malform pattern CV (%) 68.97

Means in a column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 4 Percent of root development from Som Showkoon embryoid were cultured on MT basal media with 5 % latoes and different concentration of GA_3, 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l. for 5 months in 25-27°C

	State of embryogenic callus				
GA_3 (mg/L)	White globular	Light green globular	Dark green globular	Heart shape	GA_3-mean
0	2.40	2.20	1.25	2.5	2.11 b
0.5	1.50	3.80	4.60	2.83	3.44 ab
1.0	2.33	4.20	6.00	6.80	5.00 a
1.5	2.00	2.80	5.33	4.20	3.59 a
Embryoid-mean	2.12 b	3.25 ab	4.30 a	4.10 a	

CV (%) 68.97

Means in a column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 5 Percent of seeding development from Som Keawan embryoid were cultured on MT basal media with 5 % latoes and different concentration of GA_3, 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l. for 5 months in 25-27°C

GA_3 (mg/L)	Som Keawan	
	Shoot	Root
0	80	30
0.5	55	40
1	70	10
1.5	106.67	-

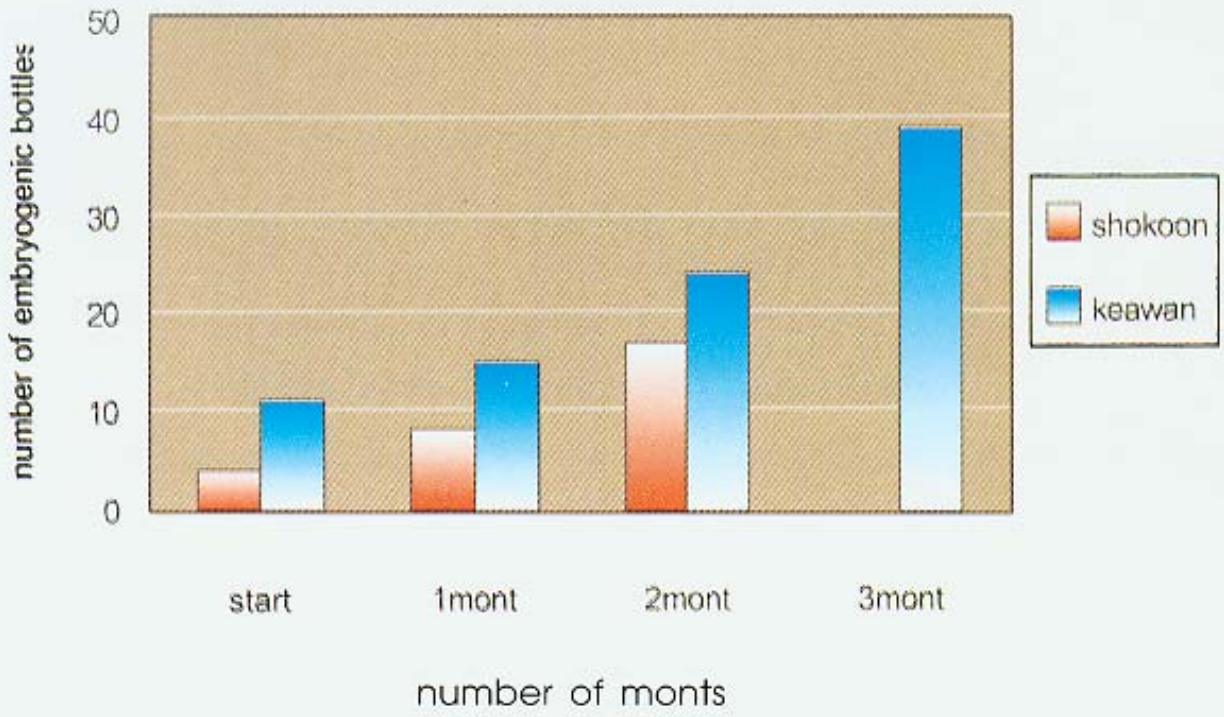


Figure 1 Growth pattern of Som Keawan and Showkoon embryogenic callus were cultured on BM media for 3 months.

Figure 1 Embryogenic callus (arrow) induced from ovule of Som Keawan variety

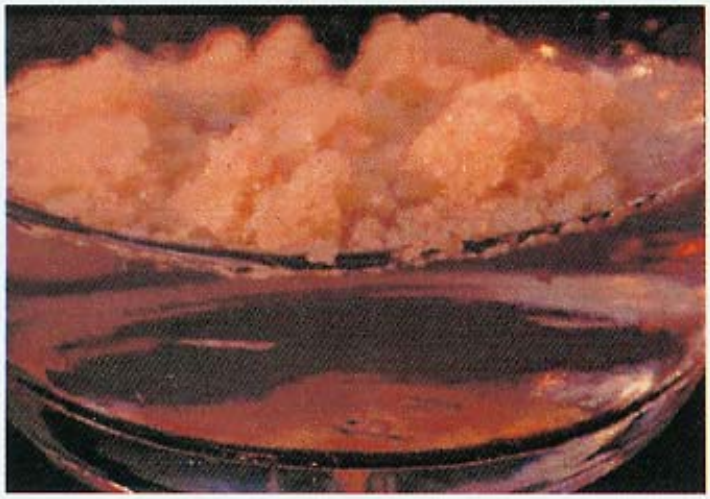
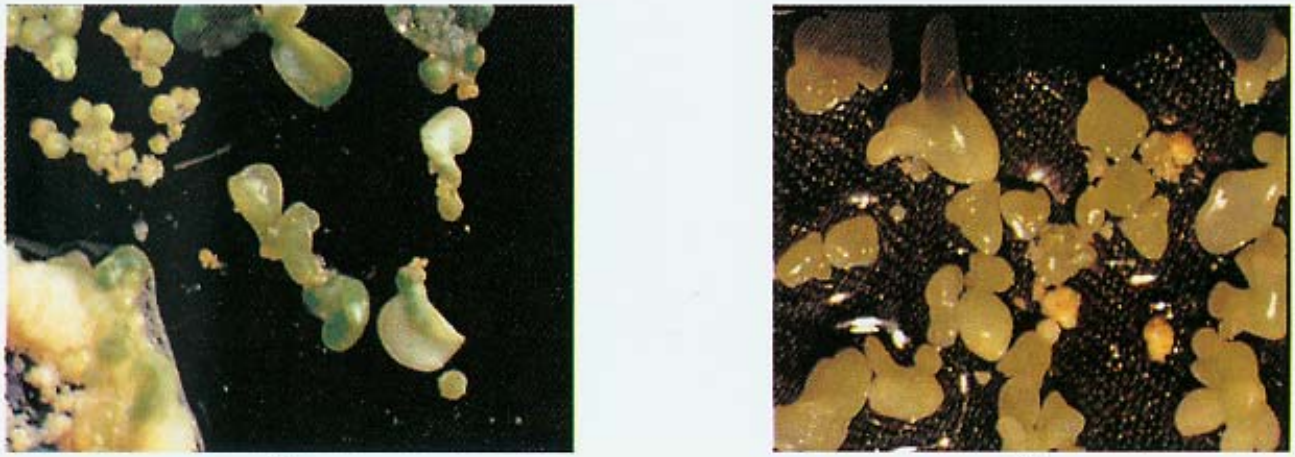


Figure 2 Proliferation of Som Keawan variety embryogenic callus on the BM Solid media

Figure 3 Development of embryoid at green globular stage from Som Keawan embryogenic callus



a b

Figure 4 Development of embryoid at various stage, light green globular dark green globular and heart shape, from Som Keawan (a) and heart shape stage from Som Keawan varieties

Figure 5 Malform embryos frequently appeared on the regeneration media without GA_3

White globula

Light green globular

Dark green globular

Heart shape

Figure 6 Development of 4 stage Som Shokoon embryoid on the BMEL basal media at varies confutation of 0 0.5 1 1.5 mg/l GA_3 during 5 month experiment

Figure 7 Som Shokoon seeding fully develop and show normal shoot and root

Figure 8 Development of drak green globular stage of Som Keawan embryoid on the BMEL media at varies confutation of 0 0.5 1 1.5 mg/l GA_3 during 5 month experiment

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2541. ปริมาณและมูลค่าสินค้าส่งออกเกษตรกรรม พ.ศ.2536-2540. หน้า 177. ใน : เอกสารเลขที่ 18/2541. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร

Gentile, A;, E.Tribulation; Z.N. Ding and A. Vardi. 1992. In vitro selection of nuclear lemon callus and regeneration of plant tolerant to *Proma tranceiphila* toxin. Adv. *Host.* Sci.6 : 51-154.

Gentle, A.; E.Tribulato; G. Continella and A.Vardi. 1992. Differential responses of citrus calli and protoplasts to culture filtrate and toxin of *Phoma tracheiphila*. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 19.

Grosser, J.W.; Jr. Gimitter and Chandler. 1988a. Intergenic somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus triforiata* cv. Flying Dagon. *Plant Cell Report* 7 : 5-8.

Kunitake, H. and M.Mu. 1995. III.4 Somatic embryogenesis in *Citrus* species. Page 280-296. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry 30 : Somatic embryogenesis and synthetic Seed I. Springier-Verlag.

Niedz, R.P; R.Sussmam and J.S.Satteree. 1995. Green fluorescent protein : an in vivo reporter of plant gene expression. *Plant cell Reports* 14 : 403-406.

Ronchi, V.N. and L.Giorgetti, 1995. I.1 The cell's commitment to somatic embryogenesis. Page 9. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry 30 : Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springier-Verlag.

Sakai, A.; S. Kobayashi and I. Oiyama, 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of Navel Orange (*Citrus sinensis* var. *Brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C *J.Plant Physiol.* 137 : 465-470.

Vardi, A; P. Spiegel-Roy and E.Galum. 1982. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts : variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor.appl.Genet.* 62 : 171-176.

West, M.A. and J.J. Harada, 1993. Embryo in higher plants : on overview. *The Plant Cells* 5 : 1361-1369.

Zimmerman, T.L. 1993. Somatic embryogenesis a model for early development in higher plants. *The Plant Cell.* 5 : 1411-1423.