

การพัฒนาสายพันธุ์ส้มไม่มีเมล็ดโดยวิธีการผสมพันธุ์

Development of Seedless Citrus Cultivars by Conventional Breeding Method.

ทวิช ตูพงษ์^{1/}

Pichit Toolapong^{1/}

Abstract: The seedless (triploid, $3x=27$) citrus cultivars can be produced through conventional breeding method by crossing tangor (Miyauchi Iyokan) and pummelo-like fruit (Hyuganatsu) as seed parents with tangelo (Minneola), hybrid mandarin (Kara), hybrid orange (Nova) as pollen parents. Triploid hybrid seedlings of 80%, 29.41%, 28.60%, 25%, 20%, and 0% of total hybrid citrus seedlings were produced from small seeds of Miyauchi Iyokan X Kara, Miyauchi Iyokan X Minneola, Hyuganatsu X Nova, Hyuganatsu X Minneola, Miyauchi Iyokan X Nova and Hyuganatsu X Kara, respectively.

บทคัดย่อ: การผลิตสายพันธุ์ส้มไม่มีเมล็ด (triploid, $3x=27$) สามารถกระทำได้โดยการผสมพันธุ์จาก ส้มลูกผสม (Tangor-Miyauchi Iyokan) และส้มที่มีผลคล้ายส้มโอ (Hyuganatsu) เป็นแม่พันธุ์และส้มลูกผสมต่างๆ (Tangelo-Minneola, hybrid mandarin-Kara, hybrid orange-Nova) เป็นพ่อพันธุ์ ปรากฏว่าคู่ผสม Miyauchi Iyokan X Kara ให้ต้นกล้าส้มลูกผสมที่เป็น triploid 80%, Miyauchi Iyokan X Minneola 29.41%, Hyuganatsu X Nova 28.60%, Hyuganatsu X Minneola 25%, Miyauchi Iyokan X Nova 20% ของจำนวน ต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดส้มขนาดเล็ก และมีคู่ผสมเดียว (Hyuganatsu X Kara) ที่ไม่สามารถผลิตต้นกล้าส้มลูกผสมที่เป็น triploid ได้

Index words: ส้ม, การผสมพันธุ์, ลูกผสม $3x$, ไม่มีเมล็ด, Citrus, Conventional breeding, Triploid hybrid, Seedless-citrus.

^{1/} สาขาไม้ผล ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ อ.สันทราย จ. เชียงใหม่ 50290

^{1/} Division of Pomology, Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo Institute of Agricultural Technology, Sansai, Chiangmai, Thailand 50290

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลให้ไม่มีเมล็ด โดยเฉพาะ ส้มเป็นที่สนใจของนักปรับปรุงพันธุ์ และเป็นความต้องการของตลาดอย่างยิ่ง ไม่ว่าจะเป็นการนำผลส้มมาบริโภคสด (พิชิต, 2537; Gmitter *et al.* 1991) ส้มบรรจุกระป๋อง (กลีบของส้มที่ไม่มีเมล็ดจะแตกยากกว่า ระหว่างกระบวนการบรรจุกระป๋อง) การผลิตน้ำส้มคั้น (จะปราศจากรสชาติที่เกิดจากการปลอมปนของเศษเมล็ดระหว่างการผลิต) และลดการดูดซึมธาตุอาหารบางชนิดจากดิน (Iwamasa, 1966) พืชตระกูลส้มที่ไม่มีเมล็ดที่จัดเป็นสายพันธุ์เศรษฐกิจที่นิยมมีอยู่หลายสายพันธุ์ ได้แก่ Washington Navel, Satsuma mandarin, Tahiti (Persian or Bearss) Lime หรือสายพันธุ์ที่มีเมล็ดน้อย เช่น ส้ม Valencia และ Shamouti, Eureka lemon, Marsh grapefruit (Esen and Soost, 1971) ด้วยความสำคัญดังกล่าวทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์ส้มไม่มีเมล็ดเกิดขึ้น

Plaut (1947) ได้ใช้วิธีเคาะยอดเกสรตัวเมียออกก่อนที่จะมีการถ่ายละอองเกสรตัวผู้ แต่ Soost (1958) และ Krezdorn and Cohen (1962) ได้ใช้จิบเบอเรลลินกับส้ม Mandarin และส้ม Clementine ตามลำดับ ต่อมาในปี ค. ศ. 1984 Hearn ได้ผลิตสายพันธุ์ส้มและ Grapefruit ที่ไม่มีเมล็ดโดยใช้รังสี X-ray นอกจากนี้ส้มที่ไม่มีเมล็ดส่วนหนึ่งจะได้มาจากต้นส้ม ที่มีโครโมโซม 3 ชุด [3x-triploid, x=9 (Frost, 1925)] และมีโอกาสเกิดได้เองโดยธรรมชาติน้อยมาก อย่างเช่น ในมะนาว Tahiti ปัจจุบันได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ส้มที่เหมาะสมนำมาผสม กันเพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 3 ชุด จากสายพันธุ์พ่อและแม่ที่มีโครโมโซม 2 ชุดเหมือนกัน (2x X

2x) หรือต่างกัน เช่น 2x X 4x หรือ 4x X 2x (Esen, 1971) เป็นต้น แต่ต้นส้มลูกผสมที่ได้รับจะมีโอกาสจะเป็น 3x ได้ก็ต่อเมื่อเกิดจากเมล็ดที่ได้รับการผสมระหว่าง สายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่แล้ว เมล็ดยังต้องมีขนาดเล็ก 1/6-1/3 (Esen and Soost, 1971) หรือ 0.4-0.3 เท่าของขนาดเมล็ดปกติ (Oiyama and Okudai, 1983) ทั้งนี้ก็สืบเนื่องมาจากการพัฒนาการและการสิ้นสุดการพัฒนาการที่เป็นไปอย่างรวดเร็วของเมล็ดที่มีโครโมโซมของศัพะ 3 ชุดต่อโครโมโซมของ แหล่งสะสมอาหาร 5 ชุด หรือ เกิดขึ้นเพราะไม่มีการแบ่งเซลล์แบบ Meiosis ระยะที่ 2 ในรังไข่หรือเกิดจากความล่าช้าในการผสมระหว่างเชื้อตัวผู้และเชื้อตัวเมีย ในรังไข่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนไข่จาก 1 เป็น 2 ฟอง (พิชิต, 2537) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Zhang, 1985) การเพาะเลี้ยงแหล่งอาหารเลี้ยงดินอ่อนของพืช (Gmitter *et al.*, 1991) และการใช้เทคนิคทาง Somatic hybridization (Protoplast fusion) (Grosser *et al.*, 1992) จะเห็นได้ว่าการพัฒนาเทคนิคการผลิตส้มไม่มีเมล็ดมาโดยตลอด จากอดีตจนถึงปัจจุบัน

แต่การศึกษาทดลองครั้งนี้เป็นความพยายามที่จะผลิตสายพันธุ์ส้มไม่มีเมล็ดโดยการผสมพันธุ์ระหว่างส้มลูกผสมและส้มที่มีผลคล้ายส้มโอเป็นต้นแม่พันธุ์กับส้มลูกผสมต่างๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

ปี ค. ศ. 1992 เดือนพฤษภาคม ได้ผสมพันธุ์ส้มสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งผ่านการคัดเลือกแล้ว ดังนี้คือ Miyauchi Iyokan (Tangor, *Citrus iyo* Hort. ex Tanaka) และ Hyuganatsu (Pummelo-like fruit)

(*C. tamurana* Hort. ex Tanaka) X *Minneola* (tangelo), *Kara* (hybrid mandarin) และ *Nova* (hybrid orange) ณ Fruit Tree Research Institute, Kumamoto Prefectural Agricultural Research Centre, Matsubase, Kumamoto, Japan โดยผสมพันธุ์หลังจากเอาเกสรตัวผู้ออกจากดอกที่จะผสม แล้วจึงคลุมด้วยกระดาษเคลือบไข ป้องกันการปลอมปนของละอองเกสรที่ไม่ต้องการนำเมล็ดจากผลแก่ที่ได้เก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน 1992 มาชั่งน้ำหนักโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือขนาดเล็กและขนาดปกติ เมล็ดขนาดเล็กจะมีน้ำหนักน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของขนาดปกติ นำเมล็ดส้มที่มีขนาดเล็กที่ได้ทั้งหมดไปเพาะในถาดแก้วทดลองบรรจุกระดาษซับชื้นหนา 2 ชั้น ในตู้มีอุณหภูมิ 25°C หลังจากเอาเปลือกทั้ง 2 ชั้นของเมล็ดออกแล้วเป็นเวลา 7 วัน จึงนำไปปลูกลงในกระถาง ดินเผาบรรจุเวอร์มิคูไลต์ในเรือนกระจก ส่วนการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของต้นกล้าส้มลูกผสมนั้นทำได้โดยการนำเอาปลายรากอ่อนของต้นกล้าส้มซึ่งยาวประมาณ 10 มม. แช่ลงในสารละลาย 0.002M 8-hydroxyquinoline 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15°C แล้วจึงนำไปแช่ในสารผสม 99% เอทานอล (ethanol) กับกรดอะซิติก (Acetic acid) ในอัตราส่วน 3:1 นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นจึงย้อมสีด้วย 1% สารละลายอะซิติก ออร์เซิน (Acetic-orcein) แล้วเติม 1N HCl 1 หยด ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 5-7 นาที แล้วจึงนำปลายรากอ่อนที่ได้ไปเตรียมสไลด์ตามวิธีการของ Love and Love (1975)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองพบว่า การติดผล จำนวนและขนาดของเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อผล น้ำหนักของเมล็ดและเปอร์เซ็นต์ของ 3x ได้แสดงใน Table 1. เปอร์เซ็นต์ 3x (Triploid) จากการตรวจสอบ โดยการส่องดูจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของต้นกล้าส้มลูกผสม (Figure 2.&3.) พบสูงสุด (80%) จากคู่ผสมระหว่าง *Miyauchi Iyokan* X *Kara* คู่ผสมระหว่าง *Miyauchi Iyokan* X *Minneola* และ *Hyuganatsu* X *Nova* ให้ 3x ประมาณ 30% (29.41 และ 28.60%) ส่วนคู่ผสมอื่นๆ ยกเว้นคู่ของ *Hyuganatsu* X *Kara* (0%-ไม่มีต้นกล้า) ได้ 3x อยู่ระหว่าง 20-25% จาก จำนวนของต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดส้มที่มีขนาดเล็ก (Figure 1.) ในขณะที่ Esen and Soost (1971) ได้รับ 24.21% 6.78% และ 0.41% จากส้มสายพันธุ์ *Sukega* (*Orangelo*) *Temple* (*Tangor*) และ *Clementine* (*Mandarin*) ตามลำดับ ส่วน Undecided seedlings เป็นต้นกล้าที่ไม่มีการเจริญเติบโต (รากและยอดอ่อนหยุดการเจริญ ซึ่งอาจจะเป็นต้นกล้าที่เจริญและพัฒนาจากเมล็ดที่มีขนาดเล็ก ที่ไม่สมบูรณ์จริงๆ อันมิได้เกิดจากการสิ้นสุดการเจริญอย่างรวดเร็วเกินไปของเมล็ดแต่เป็นเพราะความผิดปกติในอัตราส่วน 3:5 ของ Embryo : Endosperm (พิซิด, 2537) จากการทดลองในครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ส้มเมล็ดเล็กกับ 3x ไม่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ยกเว้นคู่ผสมระหว่าง *Miyauchi Iyokan* X *Nova* (Table 1.) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ ในกลุ่มของส้มที่มีผลคล้ายส้มโอและสายพันธุ์ส้มลูกผสม ความถี่ของ 3x จะใกล้เคียงกัน (25% และ 29.41% ของจำนวนต้นกล้า) เมื่อมีสายพันธุ์พ่อที่เหมือนกัน (*Minneola*) แต่จะให้ผลแตกต่างกันเมื่อใช้ *Kara*

และ Nova Toolapong (1994) และ Toolapong *et al.*, (1995a) ทดลองผสมระหว่าง Banpeiyu X Ruby Red grapefruit ได้ 3x ถึง 80.70% ของจำนวนต้นกล้า ฉะนั้นถ้าจะผลิตต้นส้มให้มีโครโมโซม 3 ชุดจำเป็นต้องศึกษาและทดสอบความเป็นไปได้เสียก่อนอย่างเช่น Toolapong *et al.*, (1995b) ได้ศึกษาพบว่าส้มลูกผสมเปิด (Open pollination) สายพันธุ์ Minneola และ Nova

สามารถให้ต้นกล้าที่เป็น 3x ได้ 6.25% และ 2.94% ตามลำดับเป็นต้น ส่วนการผสมระหว่างสายพันธุ์ Hyuganatsu กับ Kara ควรจะมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่งโดยเฉพาะสายพันธุ์ Kara การพัฒนา การของอับเกสรมักจะผิดปกติ (Nito and Iwamasa, 1985) นอกจากนี้สภาพแวดล้อมเช่น ความชื้นต่ำ แต่อุณหภูมิสูงก็จะมีผลกระทบต่อการผลิตเกสรของส้มด้วย (Nito and Iwamasa, 1986)

Table 1 Development of small seeds and 3X seedlings from crosses, using tangor and pummelos-like fruit as seed parents

Crosses		No. of		Fruit settings (%)	No. of			Small seed (%)	No. of seedlings	Av. seed wt.	
Female	Male	X Flowers	fruit settings		total seeds	seed per Fruit	small seeds			Large	Small
Miyauchi Iyokan	X Minneola	50	18	32	160	10.00	18	11.25	17		0.116
	X Kara	50	10	20	160	2.90	6	20.69	5	0.285	0.132
	X Nova	50	10	20	22	2.20	5	22.73	5		0.137
Hyuganatsu	X Minneola	50	27	54	1010	37.41	8	0.79	8		0.073
	X Kara	50	2	4	7	3.50	1	14.29	0	0.372	0.067
	X Nova	50	21	42	630	30.00	7	1.11	7		0.075

Table 1 (Continue)

Crosses		Range of small seed wt.(g.)	Seedlings			Percentage of fruits/T. seeds/seedlings produced 3X		
Female	Male		undecided	2X	3X			
Miyauchi Iyokan	X Minneola	0.037-0.195	3	9	5	1.95	3.13	29.41
	X Kara	0.034-0.136	0	1	4	4.00	13.79	80.00
	X Nova	0.094-0.168	0	4	1	1.00	4.55	20.00
Hyuganatsu	X Minneola	0.050-0.096	6	0	2	0.27	0.20	25.00
	X Kara	0.067-0.000	0	0	0	0.00	0.00	0.00
	X Nova	0.041-0.120	1	4	2	0.45	0.30	28.60

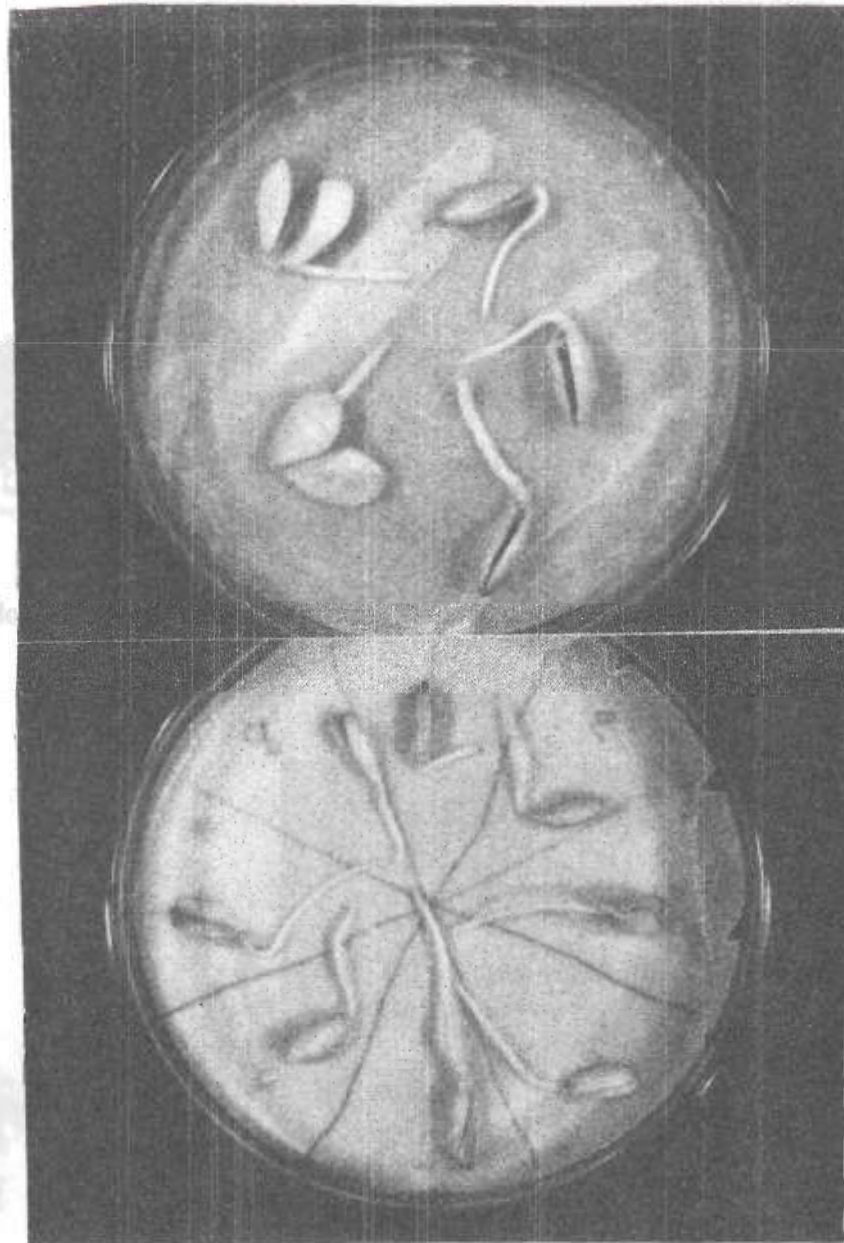


Fig. 1 Normal (top) and small (below) pregerminated seeds from mature fruits of Miyaguchi
Iyokan X Kara.



Fig. 2 Diploid (left) and 2 triploid (right) seedlings from Miyauchi Iyokan X Kara (3 months after germination).

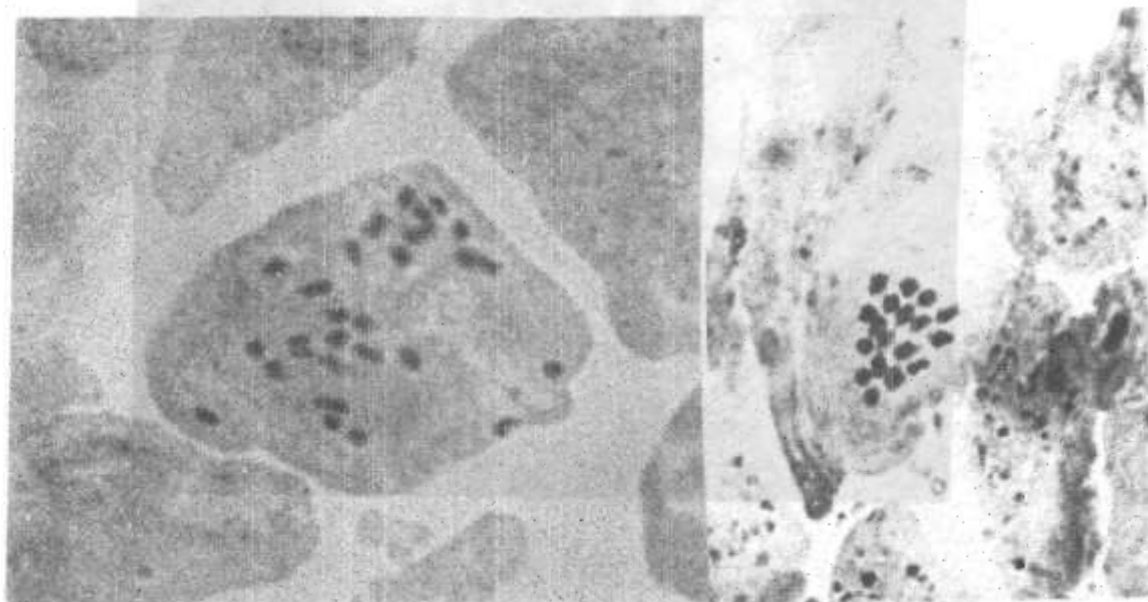


Fig. 3 Chromosomes of root-tip cells. Diploid (left) and triploid (right) of Miyauchi Iyokan X Kara (x2000).

สรุปผลการทดลอง

การผสมพันธุ์ส้มให้ได้น้ำส้มที่ไม่มีเมล็ด อยู่ในรูป 3x (Triploid=27) โดยใช้ส้มลูกผสม (Tangor-Miyauchi Iyokan) และส้มที่มีผลคล้าย ส้มโอ (Hyuganatsu) เป็นสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์ ส้มลูกผสมต่างๆ (Tangelo-Minneola, hybrid mandarin-Kara, hybrid orange-Nova) เป็นสายพันธุ์ พ่อปรากฏว่าคู่ผสม Miyauchi Iyokan X Kara ให้ต้นกล้าส้มลูกผสมที่เป็น 3x (Triploid) สูงถึง 80%, Miyauchi Iyokan X Minneola 29.41%, Hyuganatsu X Nova 28.60%, Hyuganatsu X Minneola 25%, Miyauchi Iyokan X Nova 20% ของจำนวนต้นกล้าส้มลูกผสมที่มาจากเมล็ดส้ม ที่มีขนาดเล็กและมีเพียงกลุ่มผสมเดียว (Hyuganatsu X Kara) ที่ผลิตเมล็ดส้มที่มีขนาดเล็กได้เพียง 1 เมล็ด แต่ก็ไม่สามารถที่จะเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นกล้า ส้มที่สมบูรณ์ได้

เอกสารอ้างอิง

1. พิชิต คุณพงศ์. (2737). การสร้างสายพันธุ์ส้มไม่มี เมล็ดจากเมล็ดส้มขนาดเล็กที่มีหลายลักษณะ. การสัมมนาวิชาการประจำปี 2537 สมาคมนัก เรียนไทยในประเทศญี่ปุ่นในพระบรมราชูปถัมภ์ 11 ธันวาคม 2537 ณ หอพักนักเรียนนานาชาติ กรุงโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น. หน้า 117.
2. Esen, A. (1971). Unexpected polyploids in Citrus and their origin. Ph.D. Dissertation, Uni. of California, Riverside, California.
3. Esen, A. and R. K. Soost. (1971). Unexpected triploids in Citrus: Their origin, identification, and possible use. J. Hered. 62:329-333.

4. Frost, H. B. (1925). The chromosomes of citrus. J. Wash. Acad. Sci. 15:1-3.
5. Gmitter, F. G., Jr. and X. B. Ling. (1991). Embryo- genesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:317-321.
6. Gmitter, F. G., Jr., X. B. Ling, and X. X. Deng. (1990). Induction of triploid citrus plants from endosperm calli in vitro. Theor. Appl. Genet. 80:785-790.
7. Grosser, J. W., F. G. Gmitter, Jr., F. Sesto, X. X. Deng, and J.L. Chandler. (1992). Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117:169-173.
8. Hearn, C. J. (1984). Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:270-273.
9. Iwamasa, M. (1966). Studies on the sterility in genus Citrus with special reference to the seedlessness. Bull. Hort. Res. Stn., Minist. Agri. Forest. and Fisheries. B 6:1-81.
10. Krezdorn, A. H. and M. Cohen. (1962). The influ- ence of chemical fruit-set sprays on yield and quality of citrus. Proc. Fla. State Hort. Soc. 75: 53-60.
11. Love, A. and D. Love. (1975) Plant science 1: Plant chromosomes. Strauss & Cramer, Leutershausen, Germany . 184 pp.
12. Nito, N. and M. Iwamasa. (1985). Abnormal anther development in 'Sweet Spring' and 'Kara', hybrid progenies of satsuma mandarin.

- Bull. Fac. Agri., Saga Uni. 59:11-16.
13. Nito, N. and M. Iwamasa. (1986). Development of pollen grain of Citrus at anthesis. Bull. Fac. Agri., Saga Uni. 60: 1-7.
14. Oiyama, I. and N. Okudai. (1983). Studies on the polyploidy breeding in Citrus. III. Occurrence of triploids in the progenies of diploid sweet oranges crossed with diploids. Bull. Fruit Tree Res. Stn. D 5:1-8.
15. Plaut, N. (1947). Experiments with unfruitful valencia orange trees. Palestine J. Bot. 6: 58-62.
16. Soost, R. K. (1958). Gibberellic acid on mandarin. Calif. Agri. 12:5.
17. Toolapong, P. (1994). Triploids and aneuploids in citrus fruits. D.Sc. Dissertation, Kyushu Tokai University, Kumamoto, Japan.
18. Toolapong, P., H. Komatsu and M. Iwamasa. (1995a). Triploids and haploid from small seeds of 'Banpeiyu', a pummelo cultivar, crossed with grapefruit. J. Jap. Soc. Hort. Sci. (In press).
19. Toolapong, P., H. Komatsu and M. Iwamasa. (1995b). Triploids from small seeds of polyembryonic citrus cultivars. Proc. Sch. Agri. Kyushu Tokai University. 14:1-8.
20. Zhang, W. (1985). Citrus clonal selection, progeny testing and in vitro propagation. J. Fruit Var. 39:20-30.
8. Hearn, C. J. (1984). Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:370-377.
9. Iwamasa, M. (1986). Studies on the sterility in genus Citrus with special reference to the seedlessness. Bull. Hort. Res. Stn., Minori Agri. Forest and Fisheries B 6:1-81.
10. Kozakawa, A. H. and M. Cohen. (1962). The influence of chemical fruit-set sprays on yield and quality of citrus. Proc. Fla. State Hort. Soc. 75: 23-30.
11. Lavee, A. and D. Lavee. (1972). Plant science I: Plant chromosome. Strauss & Cramer, Lautzenhausen, Germany. 184 pp.
12. Nito, N. and M. Iwamasa. (1983). Abnormal anther development in 'Sweet Spring' and 'Kara', hybrid progenies of satsuma mandarin.
1. Hsu, A. (1971). Unsexed triploids in Citrus and their origin. Ph.D. Dissertation. Univ. of California, Riverside, California.
2. Hsu, A. and R. K. Soost. (1971). Unsexed triploids in Citrus: Their origin, identification, and possible use. J. Hort. 62:129-133.