

# การสร้างต้นอ่อนลิ่มเขียวหวานและส้มโชกุนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

## Embryogenesis of *Citrus reticulata* (Keawan and Shokoon)

จารุวรรณ จาติเสถียร<sup>1</sup> กษิติศ ดิษฐบรรจง<sup>2</sup>  
Jaruwan Chartisathian<sup>1</sup> Karsedis Distabanjong<sup>2</sup>  
หิรัญ หิรัญประดิษฐ์<sup>3</sup>  
Hirun Hirunpradit<sup>3</sup>

### 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<sub>3</sub>.

**Key words :** tissue culture, Keawan and Shokoon

<sup>1</sup> สังกัด กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ปฏิบัติงานที่สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทร. 5614484

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

<sup>2</sup> สังกัด สถาบันวิจัยยาง ปฏิบัติงานที่ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทร. 5614484

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

<sup>3</sup> 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 เดือนสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้ในอาหารทั้ง 2 ชนิด embryogenic สามารถเพิ่มปริมาณได้ในอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยไม่ใส่สารเร่งการเจริญเติบโตซึ่งประกอบด้วย Murashige & Trucker basal medium และใส่ malt extract 500 mg/L embryogenic callus เหล่านี้สามารถพัฒนาเป็น embryoid โดยย้ายใส่อาหาร MT ใส่น้ำตาลแลคโตส 50 มก./ลิตร (BMEL) embryogenic callus จะพัฒนาให้เกิดรูปร่าง กลมขนาดใหญ่ขึ้นเรียกว่า embryoid และ embryoid จะพัฒนาต่อโดยสร้างคลอโรฟิลล์ทำให้ embryoid เกิดสีเขียวเข้ม จากนั้นย้าย dark green embryoid มาเลี้ยงในอาหาร BMEL ใส่ GA3 1 มล./ลิตร embryoid สีเขียวเข้มจะพัฒนาต่อไปเป็นรูปหัวใจ และเจริญเป็นต้นอ่อน ที่มีต้นและรากที่สมบูรณ์

**คำหลัก :** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน

## คำนำ

ในอาณาจักรพืชมีคุณสมบัติที่สำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดนวัตกรรมใหม่ในมวลมนุษยชาติที่ได้ใช้ประโยชน์ในขณะนี้คือคุณสมบัติที่เรียกว่า **Totipotency** ซึ่งหมายถึงคุณสมบัติที่พืชสามารถพัฒนาตัวเองจากหนึ่งเซลล์ให้แบ่งตัวและเจริญเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ได้ จากคุณสมบัตินี้ทำให้เกิดกระบวนการสร้างคัพภะ (embryogenesis) ที่เกิดได้ในหลอดทดลองโดยพืชสามารถพัฒนาจากเซลล์เพียงหนึ่งเซลล์ให้เป็นพืชต้นใหม่ได้โดยผ่านกระบวนการสร้างคัพภะ ซึ่งกระบวนการสร้างคัพภะในหลอดทดลองนี้ได้มีรายงานในครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1958 Steward ได้เสนอรูปแบบของการพัฒนาเซลล์แครอท โดยผ่านกระบวนการสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืช (somatic embryo-

genesis) (Zimmerman,1993) จากนั้นความสำคัญของการสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืชได้ศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในพืชที่เป็นพืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับ (Ronchi and Giorgetti, 1995; West and Harada, 1993) ประโยชน์ของการศึกษาระบวนการสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืชนั้นมีหลายด้าน 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. 1972 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 trifoliata*) กับส้มพันธุ์ Hamlin (*Citrus sinensis*) เพื่อนำไปคัดเลือกต้นต่อที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ (Grosser et al., 1988a) การปรับปรุงพันธุ์ส้มโดยใช้ประโยชน์จาก embryogenic callus ยังสามารถคัดพันธุ์ต้านทานโรคได้จากความแปรปรวน

ของพันธุกรรมใน embryogenic callus cells เช่นการคัดเซลล์จาก embryogenic callus และเซลล์ไร้ผนังของเลมอนพันธุ์ Femminello และส้มพันธุ์ Tarocco ให้ต้านทานโรคมal 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°C (Sakai et al., 1991) ในประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นประเทศที่ปลูกส้มเป็นการค้า โดยเฉพาะส้มเขียวหวานและพันธุ์ใกล้เคียง ส้มดังกล่าวนิยมบริโภคสดใช้คั้นน้ำและเลี้ยงเด็กอ่อน ส้มส่วนใหญ่ใช้บริโภคในประเทศ และมีการส่งเป็นสินค้าออกไปขาย ยังต่างประเทศได้ถึง 574 เมตริกตันปี นำเงินรายได้ เข้าประเทศได้ถึง 6,818,000 บาท/ปี (นิรนาม, 2541) แต่ปัญหาของการปลูกส้มคือ โรคและแมลง ซึ่งทำให้ผลผลิต ส้มได้ไม่ดีพอ และต้องใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดสูง ส่งผลให้เกิดพิษตกค้างในผลส้มและสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นอันตรายต่อชีวิต และสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้น การปรับปรุงส้มไทยจึงมีความจำเป็นต้องศึกษา เพื่อแก้ปัญหาให้กับเกษตรกรโดยใช้เทคโนโลยีที่ก้าวหน้าขึ้น ดังนั้นการศึกษาระบบการสร้างคัพภะจากเซลล์ส้มจึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่ต้องศึกษา เพื่อรองรับงานประยุกต์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป การศึกษาในครั้งนี้จะศึกษาในส้มเขียวหวานและส้มโชกุน (*C. reticulata*) ซึ่งเป็นส้มที่นิยมปลูกมากในประเทศไทย

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

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

- ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พร้อมเครื่องแก้ว
- กล้องผ่าตัด (stereomicroscope)

### วิธีการทดลอง

#### 1. เปรียบเทียบผลส้มที่มีอิทธิพลต่อการ ชักนำให้เกิด embryogenic callus

นำผลส้มโชกุนและส้มเขียวหวานขนาดต่าง ๆ กัน มาแบ่งได้ 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 ของสั้มไซกุนในระยะต่างกัน 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 ๆ กันคือ 0 0.5 1 1.5 มก./ลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 1.5 เดือน บันทึกผลจากการเปลี่ยนแปลง embryoid ไปเป็นต้นและราก

4.2 การทดสอบสั้มเขียวหวานในระยะ embryoid ที่เหมาะสมในอาหารที่มี  $GA_3$  ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

นำ embryoid ของสั้มเขียวหวานในระยะ 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. เปรียบเทียบผลสั้มที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิด embryogenic callus

จากการแบ่งผลสั้มเขียวหวานและสั้มไซกุนตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกัน พบว่า หลังจากผ่าผลสั้มซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 ซม. จะมีไซ่อ่อนที่พัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์แล้วเป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะไม่นำมาศึกษาในครั้งนี้ และมีไซ่อ่อนขนาดเล็กอยู่เป็นส่วนน้อย เมื่อผ่าผลสั้มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. พบว่ามีไซ่อ่อน 2 ขนาดเช่นเดียวกันแต่เป็นไซ่อ่อนที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ทั้งสิ้น โดยแบ่งเป็นไซ่อ่อนขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ไซ่อ่อนซึ่งมีขนาดเล็กมากต้องใช้กล้องผ่าตัดจึงสามารถนำออกมาเลี้ยงในอาหารได้โดยแยกขนาดของไซ่อ่อนทั้ง 2 ออกจากกัน จากผลการทดลองโดยเลี้ยงไซ่อ่อนดังกล่าวเป็นเวลา 3 เดือนในอาหาร 2 สูตรคือ Nu2 และ Nu5 สามารถเห็นความแตกต่างในการเกิด embryogenic callus ได้ดังแสดงใน Table 1 พบว่าหลังจากเลี้ยงไซ่อ่อนในอาหาร Nu2 และ Nu5 เป็นเวลา 3 เดือน ไซ่อ่อนขนาดใหญ่ในผลสั้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. ทั้งสั้มเขียวหวาน

และสั่มไซกอนสามารถเกิด embryogenic callus (Figure 1) และสั่มไซกอนจะตอบสนองต่ออาหารทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า สั่มเขียวหวาน เมื่อพิจารณาชนิดของอาหาร ในสั่มชนิดเดียวกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิด embryogenic callus ให้ผลใกล้เคียงกันแต่เมื่อพิจารณา ปริมาณ embryogenic callus ที่เกิดในแต่ละไข่อ่อนแล้วอาหาร Nu5 จะให้ปริมาณ embryogenic callus มากกว่าทั้งใน สั่มเขียวหวาน และสั่มไซกอน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

## 2. การเพิ่มปริมาณ embryogenic callus

หลังจากนำ embryogenic callus สั่มเขียวหวาน และสั่มไซกอนมาเลี้ยงในอาหาร MT basal medium ไม่ใส่ สารเร่งการเจริญเติบโต (BM) เป็นเวลา 3 เดือน สามารถ บำบัดเพิ่มปริมาณ embryogenic callus ได้โดย Figure 1 แสดงปริมาณ embryogenic callus ในขวด ที่เลี้ยงด้วยอาหาร MT basal medium เป็นเวลา 3 เดือน embryogenic callus สามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้ง สั่มไซกอนและสั่มเขียวหวาน (Figure 2)

## 3. การชักนำให้เกิด embryoid

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

1. อาหารที่ใส่น้ำตาลทรายและไม่ใส่น้ำมะพร้าว ไม่สามารถชักนำให้เกิด embryoid ทั้งในสั่มเขียวหวาน และสั่มไซกอน

2. อาหารที่ใส่น้ำตาลซูโครส จะให้ผลในการชักนำ ให้เกิด embryoid ได้ดีกว่าอาหารที่ใส่น้ำตาลทราย

3. อาหารที่ใส่น้ำตาลกลูโคสจะให้ผลในการ ชักนำให้เกิด embryoid ได้ดีกว่าอาหารที่ใส่น้ำตาลทรายและ น้ำตาลซูโครส และให้ผลใกล้เคียงกันในสั่มทั้งสองชนิด แต่จะ ให้ผลดีกว่าในอาหารที่ใส่น้ำมะพร้าว

4. อาหารที่ใส่น้ำตาลแลคโตส จะให้ผลดีที่สุดในการ ชักนำให้เกิด embryoid ของสั่มไซกอนและให้ผลไม่แตกต่างกัน ในอาหารที่ใส่น้ำมะพร้าวและไม่ใส่น้ำมะพร้าว สำหรับ สั่มเขียวหวานผลการชักนำ embryoid ได้น้อยกว่าสั่มไซกอน และจะให้ผลไม่แตกต่างกันในอาหารที่ใส่และไม่ใส่น้ำมะพร้าว จากผลการทดลองในครั้งนี้ จึงเลือกอาหาร BMEL เป็นอาหารหลักในการทดลองต่อไป เพื่อกระตุ้นให้ embryoid พัฒนาต่อเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์

## 4. การพัฒนา embryoid ให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

4.1 ทดสอบระยะ embryoid ที่เหมาะสมใน การกระตุ้นด้วย gibberellin ( $GA_3$ )

นำ embryoid ระยะต่าง ๆ กัน Figure 4 มาเลี้ยง ในอาหารที่มีปริมาณ  $GA_3$  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 เขียวเข้มจะไม่พบลักษณะ ผิดปกติดังกล่าวและไม่พบในอาหารที่มี  $GA_3$  ทุกความ เข้มข้นแสดงว่า  $GA_3$  ช่วยลดการเกิด malform ซึ่งเป็นลักษณะ ที่ไม่ต้องการ จากการทดสอบทาง สถิติพบว่าการใช้  $GA_3$  ให้ผลแตกต่างจากการไม่ใส่  $GA_3$  ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มก./ ลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ การเกิดต้นสูงกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ (Table 3) และการเกิดราก (Table 4) สูงกว่าระดับ ความเข้มข้นอื่น ๆ ผลการทดลอง สามารถแสดงโดย Figure 6 และเมื่อต้นเจริญ เติบโตพร้อมปลูก (Figure 7) จึงนำออกปลูกในโรงเรือน

4.2 การทดสอบสั่มเขียวหวานในระยะ embryoid ที่เหมาะสมในอาหารที่มี  $GA_3$  ความเข้มข้นต่าง ๆ กันหลังจากเลี้ยง embryoid ของสั่มเขียวหวานในระยะ globular เขียวเข้มในอาหาร MT basal media ใส่น้ำตาล แลคโตส 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 ของสั่มเขียวหวานมี การตอบสนองต่ออาหาร และ  $GA_3$  ในการเกิดต้นและการเกิดรากในสั่มเขียวหวาน

ระหว่างอาหารที่ไม่ใส่ GA<sub>3</sub> และ อาหารที่ใส่ GA<sub>3</sub> ความเข้มข้นต่ำ (0.5-1 มก./ลิตร) ไม่แตกต่างกันแต่จะต่างจากการเกิดต้นในอาหารที่มี GA<sub>3</sub> ความเข้มข้น 1.5 มก./ลิตร ซึ่งเกิดต้นถึง 106.67 % แต่ความเข้มข้นของ GA<sub>3</sub> สูง (1-1.5 มก./ลิตร) จะยังยั้งการเจริญของรากแต่เมื่อพิจารณาโดยรวมจาก Figure 2 พบว่า GA<sub>3</sub> 1.0 มก./ลิตร เหมาะสมในการกระตุ้นให้ embryoid เจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์

### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การสร้างคัพภะจากเซลล์ต้นพืชในสัณฐานิตต่าง ๆ สามารถใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ไซ่ออ่อนอับละอองเกสร เมล็ดลึบ คัพภะ เอ็นโดสเปิร์ม เป็นต้น มาชักนำและพัฒนารูปให้เป็นต้นพืชในหลอดทดลอง โดยผ่านกระบวนการสร้างคัพภะในสัณฐานิตแมเนดริน ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับสั้มเขียวหวานและสั้มโชกุน จะใช้ส่วนของไซ่ออ่อนคัพภะ และเมล็ดลึบ มาชักนำให้เกิด embryogenic callus (Kunitake and Mu, 1995) ซึ่งรายละเอียดของการนำไซ่ออ่อนอายุเท่าไรนั้นจะรายงานเป็นระยะเวลา เช่น 1 เดือนหลังจากดอกบาน เป็นต้น แต่การทดลองในครั้งนี้ไม่สะดวกในการกำหนดเวลาของดอกบาน เนื่องจากต้องไปเก็บลูกสั้มจากสวนเกษตรกร จึงต้องใช้ขนาดของผลสั้มเป็นมาตรฐานแทนระยะเวลาหลังดอกบาน ซึ่งผลสั้มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. พร้อมทั้งจะนำมาผลิต embryogenic callus ผลสั้มดังกล่าวเมื่อพิจารณาไซ่ออ่อนในผลสั้มที่ผ่าออกมาพบว่ามีไซ่ออ่อนขนาดใหญ่และขนาดเล็ก โดยไซ่ออ่อนขนาดใหญ่มีจำนวนมากว่าขนาดเล็ก ไซ่ออ่อนขนาดเล็กยากต่อการนำมาเลี้ยงในอาหารและจากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไซ่ออ่อนขนาดใหญ่ในสั้มเขียวหวานและสั้มโชกุน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการนำมาเลี้ยงและชักนำให้เกิด embryogenic callus สาเหตุที่ต้องศึกษาไซ่ออ่อนขนาดใหญ่และขนาดเล็ก เนื่องจากไม่ทราบว่ ไซ่ออ่อนขนาดใหญ่ที่ดีที่สุดและต้องการจะปรับเทคนิคการแยก ไซ่ออ่อนออกมาเลี้ยงในอาหารเนื่องจากการนำไซ่ออ่อนขนาดเล็ก ออกจากผลต้องใช้กล้องผ่าตัดในการแยก การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไซ่ออ่อนขนาดใหญ่ในผลอ่อนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. นั้นเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงและ ชักนำให้เกิด embryo-

genic callus ได้ดีกว่าไซ่ออ่อนขนาดเล็กในผลขนาดเดียวกัน ดังนั้นในการทำงานที่เป็นงานประจำ การชักนำไซ่ออ่อนสั้มเขียวหวานและสั้มโชกุนให้เกิด embryogenic callus จึงไม่จำเป็นต้องใช้กล้องผ่าตัดซึ่งทำให้เกิดความล่าช้าในการทำงาน การใช้เพียงแว่นขยายธรรมดา สามารถแยกไซ่ออ่อนขนาดใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วจากเหตุผลดังกล่าวมีประโยชน์ต่อการปรับ ใช้ในการชักนำสั้มเขียวหวาน และสั้มโชกุนให้เกิด embryogenic callus สมควรใช้ไซ่ออ่อนขนาดใหญ่ในผลสั้ม ขนาดเล็กกว่า 1 ซม.

เมื่อพิจารณาผลสั้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 ซม. นั้น พบว่าไซ่ออ่อนที่มีขนาดใหญ่จะพัฒนาเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์แล้วถ้านำไปเลี้ยงในอาหารเมล็ดจะงอกเป็นต้นแทนการเกิดเป็น embryogenic callus ถ้านำไซ่ออ่อนที่มีขนาดเล็กมาเลี้ยงสามารถเกิด embryogenic callus ได้เช่นกัน แต่ช้ามากใช้เวลาถึง 6 เดือนและไม่ได้แสดงข้อมูลในครั้งนี้ หากพิจารณาเปรียบเทียบกับผลสั้มขนาดเล็กแล้วจะเห็นว่าไซ่ออ่อนของสั้มขนาดใหญ่ที่ใช้ทดลองนั้นคือ ไซ่ออ่อนที่พัฒนามาจากไซ่ออ่อนขนาดเล็กในผลอ่อนของสั้มขนาดเล็กนั่นเอง ดังนั้นประสิทธิภาพหรือความล่าช้าในการเกิด embryogenic callus คล้ายคลึงกันไม่ได้แสดงข้อมูลไว้และจากผลการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าไซ่ออ่อนขนาดใหญ่ของสั้มเขียวหวานและสั้มโชกุนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 1 ซม. มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการนำมาเลี้ยง และสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus จากการศึกษอาหาร 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) ในสัณฐานิตเดียวกันคือ *C. reticulata* หรือพวกแมนดาลิน ไม่ปรากฏสูตรดังกล่าวทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้สูตรอาหารใหม่ที่เหมาะสมกับการชักนำให้เกิด embryogenic callus ในสั้มเขียวหวานและสั้มโชกุน จากการเปรียบเทียบสั้มทั้ง 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

กับสัณฐานอื่น ๆ (Kunitake and Mu, 1995) การเพิ่มปริมาณ นอกจากการศึกษาในอาหารแช่แข็งแล้วยังสามารถเพิ่ม ปริมาณได้อย่างรวดเร็วในอาหารเหลวแต่มีได้ แสดงข้อมูล ในที่นี้ปริมาณ PEM หรือ embryogenic callus ในสัณเขียวหวานและสัณไซกุนสามารถชักนำให้เกิด embryoid ได้โดยใช้น้ำตาลแลคโตสและกาแลคโตสเช่นเดียวกับ *C. reticulata* อื่น ๆ (Kunitake and Mu, 1995) การทดลอง ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลแลคโตสเหมาะสมที่สุด แต่ใน สัณเขียวหวานน้ำตาลกาแลคโตสในอาหารที่ใส่น้ำมะพร้าว สามารถให้ผลการชักนำการเกิด embryoid ได้เท่าเทียมกับ อาหารที่ใส่น้ำตาลแลคโตส embryoid ของสัณเขียวหวาน และสัณไซกุนที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้พัฒนาเป็นต้นที่ สมบูรณ์คือระยะ globular ที่มีสีเขียวเข้มหรือที่เรียกว่า dark green globular ความเหมาะสมในที่นี้หมายถึง ระยะที่อ่อน ที่สุดสามารถนำไปกระตุ้นด้วย GA<sub>3</sub> 1.0 มก./ลิตร แล้วให้ ต้นอ่อนสัณที่มีลักษณะดีมีลำต้นยืดยาวมีใบแทงออก ไม่มีลักษณะของ malform จากการศึกษาในเอกสาร embry- oid สัณ *C. reticulata* จะใช้ GA<sub>3</sub> กระตุ้นการเกิดเป็นต้นทั้งสิ้น (Kunitake and Mu, 1995) จากการศึกษาในเอกสาร หลายฉบับไม่ได้บอกถึงรายละเอียดของการใช้ชนิดน้ำตาล ในการชักนำให้เกิดต้นร่วมกับ GA<sub>3</sub> การศึกษาในครั้งนี้

ได้ทดลองใช้น้ำตาลทรายขาวเปรียบเทียบกับน้ำตาลแลคโตส ในการกระตุ้นให้เกิดต้นในความเข้มข้นของ GA<sub>3</sub> ต่าง ๆ กันพบว่าการใช้ใช้น้ำตาลทรายขาวให้ผลไม่ดีเท่าน้ำตาล แลคโตส ซึ่งการทดลองนี้ไม่ได้แสดงข้อมูลให้ทราบ ต้นสัณที่พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้วสามารถนำออกปลูก ในโรงเรือนสรุปได้ดังนี้

- สัณเขียวหวานและสัณไซกุนสามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ในอาหาร MT basal medium ใส่ BA 2 มก./ลิตร และอาหารที่ใส่ IAA 0.1 มก./ลิตรและ kinetin 1 มก./ลิตร

- embryogenic callus ของสัณเขียวหวานและ สัณไซกุนสามารถเพิ่มปริมาณได้โดยเลี้ยงในอาหาร MT basal medium ทั้งในอาหารแข็งและในอาหารเหลว

- การชักนำให้เกิด embryoid ในสัณเขียวหวาน และในสัณไซกุนสามารถใช้น้ำตาลแลคโตส และกาแลคโตส 5 % แทนน้ำตาลทราย

- ระยะ embryoid ของสัณเขียวหวานและไซกุน ที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เจริญเป็นต้นและรากคือระยะ dark green globular และอาหารที่เหมาะสมในการเกิดต้นคืออาหาร MT basal medium ที่ใส่น้ำตาลแลคโตส 5 % และใส่ GA<sub>3</sub> 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	++	-
		Galactose	BMECG	+++	+++
		Lactose	BMECL	+++	++++
	Without	Sugar	BMES	-	-
		Sucrose	BMESu	+	-
		Galactose	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<sub>3</sub>, 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l. for 5 months in 25-27°C

GA <sub>3</sub> (mg/L)	Stat of embryogenic callus				
	White globular	Light green globular	Dark green globular	Heart shape	GA <sub>3</sub> -mean
0	2.60 <sup>m</sup>	1.20 <sup>m</sup>	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	

<sup>m</sup> = 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<sub>3</sub>, 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l. for 5 months in 25-27°C

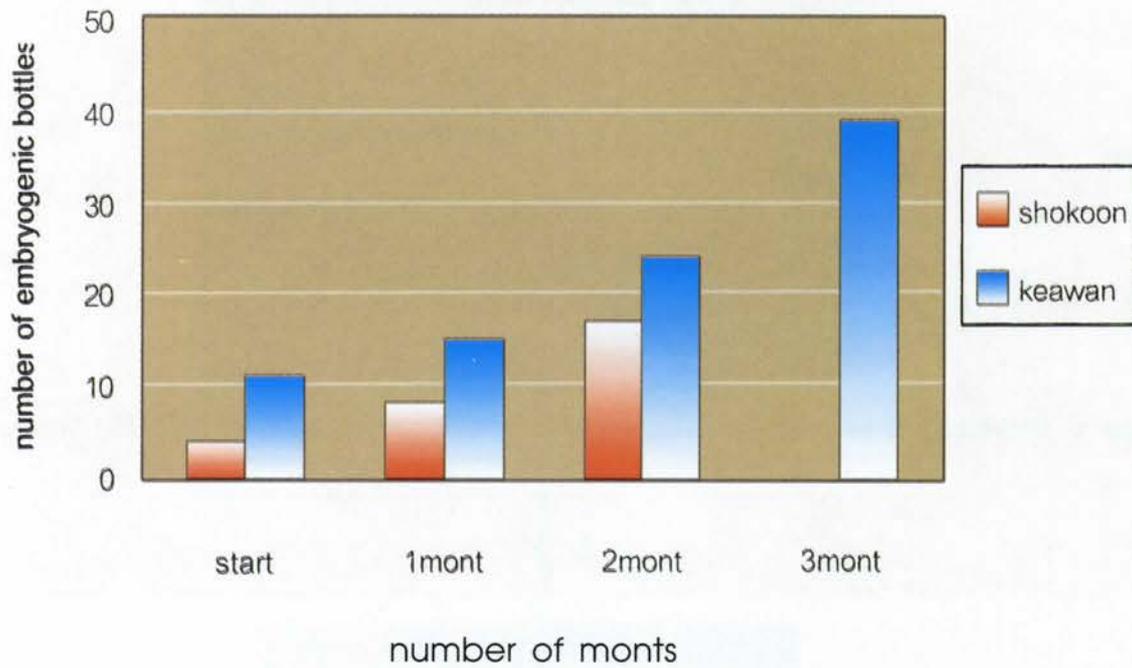
GA <sub>3</sub> (mg/L)	State of embryogenic callus				GA <sub>3</sub> -mean
	White globular	Light green globular	Dark green globular	Heart shape	
0	2.40	2.20	1.25	2.5	2.11 b
0.5	1.50	3.80	4.60	2.83	3.44 ab
1.0	2.33	4.20	6.00	6.80	5.00 a
1.5	2.00	2.80	5.33	4.20	3.59 a
Embryoid-mean	2.12 b	3.25 ab	4.30 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<sub>3</sub>, 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l. for 5 months in 25-27°C

GA <sub>3</sub> (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.



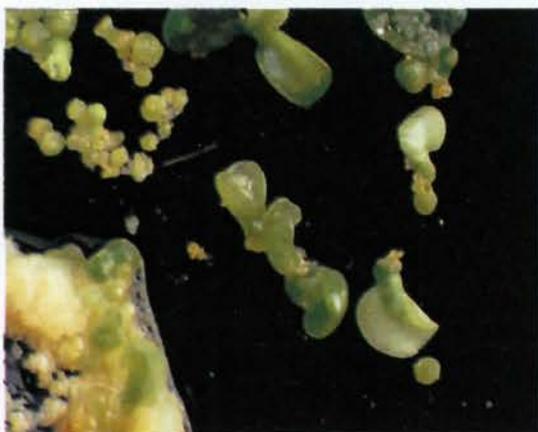
**Figure 1** Embryogenic callus (arrow) induced from ovule of Som Keawan variety



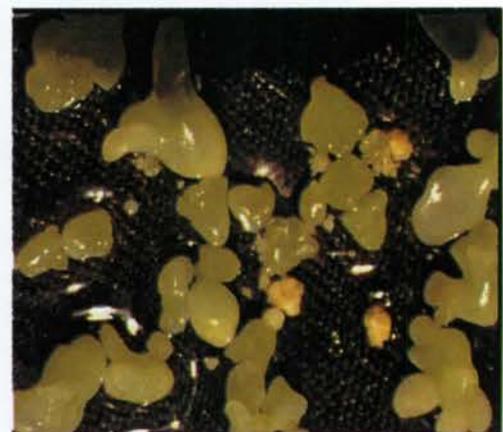
**Figure 2** Proliferation of Som Keawan variety embryogenic callus on the BM Solid media



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

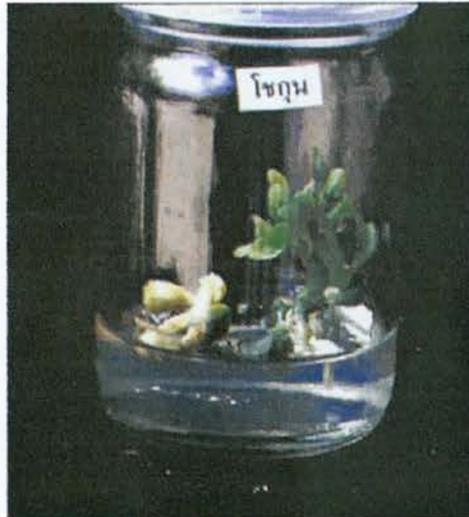


**a**



**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<sub>3</sub>



**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<sub>3</sub> during 5 month experiment



**Figure 7** Som Shokoon seedling 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 *Phoma tracheiphila* toxin. *Adv. Host. Sci.* 6 : 51-154.
- Gentile, 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. Gmitter and Chandler. 1988a. Intergenic somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *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. Springer-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. Springer-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.