บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ส้มโอ [Citrus grandis (L.) Osbeck.] เป็นไม้ผลขนาดกลาง อยู่ในตระกูล Rutaceae เป็นไม้ผลกึ่งร้อน มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย ลำต้นมักเป็นเหลี่ยมไม่ได้รูปทรงแน่นอน ทรงต้นสูงประมาณ 5-15 ม (เมตร) ทรงพุ่มโปร่ง สวยงาม กิ่งจะโน้มลง กิ่งอ่อนมีขนสั้นๆ ปกคลุม มีหนามตามข้อ ใบมีขนาดใหญ่ แผ่นใบกว้าง 2-12 ซม (เซนติเมตร) ยาว 5-20 ซม รูปร่างคล้ายรูปไข่ ฐานใบแหลม ป้านหรือกลม ปลายใบมักมีรอยเว้าเล็กน้อย ก้านใบมีปีกขนาดใหญ่ คล้ายรูปไข่หัวกลับหรือรูปหัวใจกลับ ฐานปีกแคบ ดอกขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-7 ซม เกิดบริเวณซอกใบ อาจเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ ประมาณ 2-10 ดอก/ช่อ ดอกประกอบด้วยชั้นของกลีบเลี้ยง 3-5 กลีบติดกัน ชั้นกลีบดอก 4-5 กลีบ เกสรตัวผู้ 20-25 อัน เชื่อมติดกันเป็นกลุ่ม 4-5 กลุ่ม ส่วนเกสรตัวเมียจะมีรังไข่ประมาณ 11-16 ช่อง ผลมีรูปร่างกลมแบบผลสาลี่ มีขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ เส้นผ่า ศูนย์กลางประมาณ 10-30 ซม ผิวมีสีเขียวเมื่ออ่อนและเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองหรือสีเหลืองทองเมื่อแก่ เปลือกหนา 1-2 ซม เปลือกในอ่อนนุ่มสีขาวหรือสีชมพู แต่ละกลีบจะแยกออกจากกันได้ง่าย ภายในกลีบกุ้งสีขาวหรือสีชมพู มีรสหวานหรือหวานอมเปรี้ยวจำนวนเมล็ดตั้งแต่น้อยถึงมาก มีหลายขนาดตั้งแต่เล็กสุดถึงขนาดใหญ่ สีขาวอมเหลือง ผิวเมล็ดจะมีลักษณะย่นเป็นสันและร่องลึก เป็นเมล็ดแบบมีคัพภะเดียว (เกศิณี 2528 วิจิตร 2527)

1. การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์ตามปกติสามารถทำได้จากการเพาะเมล็ด การตอน และการติดตา แต่การขยายพันธุ์ด้วยวิธีเหล่านี้ มีปัญหาเกี่ยวกับต้นที่ขยายได้ไม่ปลอดโรค ทำให้การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามามีบทบาทต่อพืชตระกูลส้ม และในกลุ่มใกล้เคียงโดยให้ผลต่างกันไป ตามชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงและอาหารที่ใช้ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1 ส่วนต่างๆ ของต้นกล้าและต้นแก่

ประสิทธิ์ และอรดี (2520) ทำการเพาะเมล็ดส้มโอพันธุ์ขาวพวงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารวุ้นสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยเติมน้ำตาลซูโครส 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำมะพร้าว 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) และสารสกัดจากมอลท์ (ME) 500 มก/ล (มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อต้นกล้ามีอายุ 10 วัน ทำการตัดแยกส่วนต่างๆ ของกล้า เช่น ตายอด ลำต้นเหนือใบเลี้ยง ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ใบ ใบเลี้ยง และราก มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เติมด้วย kinetin (6-furfuryl amino purine) 0.25 มก/ล + NAA (naphthalene acetic acid) 2.5 มก/ล + 2,4-D(2,4-dichloro phenoxy acetic acid) 0.25 มก/ล พบว่าส่วนของใบเลี้ยงจะเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด ภายในเวลา 7-10 วันเท่านั้น โดยแคลลัสจะเกิดได้ดีในส่วนของใบเลี้ยงบริเวณที่ติดกับลำต้น และการเกิดแคลลัสลดลงเมื่อส่วนที่เลี้ยงเป็นบริเวณที่ห่างออกไปจากใบเลี้ยง ต่อมาได้นำแคลลัสที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี ME 500 มก/ล + NAA และ BA (benzyl adenine) ความเข้มข้น 0.05 0.10 0.20 และ 0.40 มก/ล ปรากฏว่าแคลลัสจะถูกชักนำให้เกิดมียอด และรากได้ในอาหารที่มีส่วนผสมของ NAA และ BA ที่มีความเข้มข้น 0.10 และ 0.40 มก/ล ตามลำดับ เมื่อนำตายอดและตาข้างของต้นแก่ส้มโอพันธุ์ขาวพวงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% น้ำตาล 5% และสารสกัดจากมอลท์ (ME) 500 มก/ล ทั้งตายอดและตาข้างจะเจริญเป็นยอดได้ดีเท่าๆกัน จำนวนยอดที่ได้เท่ากับจำนวนตาที่มีอยู่ ยอดจะเจริญและปรากฏใบเล็กๆ ให้เห็นภายใน 2-3 สัปดาห์ ในเวลาต่อมา ใบคลี่และขยายออก แต่เมื่อตัดยอดเหล่านี้เลี้ยงบนอาหารที่มี IBA ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-15 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

ในส้มโอพันธุ์ขาวทองดี ประดิษฐ์และคณะ (2531) สามารถเพาะเมล็ดให้เกิดหลายยอดได้ ในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BAP (benzyl amino purine) 5 มก/ล มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดเท่ากับ 3.50 ยอด/เมล็ด แต่ลักษณะยอดจะสั้น ปริมาณการเกิดหลายยอดเท่ากับ 87.5% แต่ในอาหารสูตรเดียวกันนี้ที่มีเฉพาะ GA_3 (gibberellic acid) 10 มก/ล การเกิดหลายยอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลดลงเหลือเพียง 70% โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.62 ยอด/เมล็ด และลักษณะของยอดยืดยาว เมื่อทำการทดลองผลร่วมระหว่าง BAP และ GA_3 โดยทั้งสองมีระดับความเข้มข้น 1 5 และ 10 มก/ล พบว่าการเกิดหลายยอดเกิดขึ้นได้ในอาหารที่มี GA_3 10 มก/ล ร่วมกับ BAP 1 5 หรือ 10 มก/ล โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดเท่ากับ 4.44 5.00 และ 5.00 ยอด/เมล็ด ตามลำดับ การตัดยอดที่ได้เพื่อชักนำให้เกิดรากในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีเฉพาะออกซินหลาย ๆ ชนิดและต่างระดับความเข้มข้น พบว่าในอาหารที่เติม 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid) 0.05 มก/ล สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ 88.88% ขณะที่ 2,4-D 0.05 และ 0.10 มก/ล จะชักนำการเกิดแคลลัสแทนการเกิดราก Grinblat (1972) พบว่าบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA NAA และ ME ที่ความเข้มข้น 10 0.1 และ 500 มก/ล ตามลำดับ ทำให้แคลลัสจากลำต้นกล้าของ C.madurensis พันธุ์ Calamondin เกิดจุดกำเนิดตาเป็นปริมาณสูงสุดและจะมีปริมาณต่ำสุด เมื่อมี BA และ NAA ปริมาณ 0.1 เท่ากันและสามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อมี NAA 0.1 มก/ล + ME 500 มก/ล หรือไม่มีฮอร์โมนเลย

ในการเลี้ยงตาข้างของส้ม Shamouti บนอาหารสูตร MT (Murashige and Tuckes, 1968) ที่มีปริมาณ ABA (abscissic acid) IAA และ BA ต่างๆ กัน Altman and Goren (1971) พบว่า ABA ความเข้มข้น 5×10^{-7} โมลาร์ ไม่ก่อให้เกิดแคลลัส ขณะที่ ABA 10^{-6} และ 10^{-5} โมลาร์ช่วยเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยเกิดขึ้นที่บริเวณ abscission zone เมื่อทำการศึกษาถึงผลร่วมกับ IAA ระดับต่างๆคือ 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} โมลาร์และ BA ที่ 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} โมลาร์ แต่ละตัวจะไม่ช่วยให้เกิดแคลลัสถ้าไม่มี ABA IAA จะให้ผลเสริม (synergist) กับการเกิดแคลลัสของ ABA ขณะที่ BA จะให้ผลน้อยกว่า และต่อมายังพบว่า ABA ส่งเสริมการเกิดแคลลัสบริเวณ abscission zone ระหว่างก้านใบกับกิ่งเดิม โดยผลของ ABA ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของยอดขณะที่ตัดตาและขนาดของชิ้นส่วนที่ตัดด้วย โดยแคลลัสจะเกิดมากที่สุดกับตาจากฤดูใบไม้ร่วงและฤดูร้อน และต่ำสุดในตาที่แก่กว่าซึ่งเป็นตาที่ผลิในช่วงก่อนฤดูร้อน GA_3 มีผลต่อการเกิดแคลลัส และมีผลส่งเสริมอย่างมากเมื่อใช้ร่วมกับ ABA โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

GA_3 10^{-6} โมลาร์ + ABA 10^{-5} โมลาร์ ก่อให้เกิดแคลลัสสูงสุด เมื่อแยกแคลลัสที่เกิดขึ้นมาเลี้ยง ABA จะยับยั้งการเจริญของแคลลัส ขณะที่ IAA kinetin แต่โดยเฉพาะอย่างยิ่ง GA_3 ส่งเสริมการเพิ่มขยายของแคลลัส (Altman and Goren, 1974a) ในปีเดียวกัน Altman and Goren (1974b) ทำการศึกษาผลของฮอร์โมนต่างๆ ที่มีต่อการแตกตา และการเจริญเติบโตของตาส้ม Shamouti ซึ่งได้จากต้นปลูกตามธรรมชาติ โดยนำตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MT ที่มีฮอร์โมนชนิด ต่างๆ คือ IAA GA_3 BA และ ABA ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-6} โมลาร์ พบว่าตาที่ตัดในช่วงเดือนมิถุนายน ใช้เวลาในการแตกตาเพียง 5 วัน ในอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน แต่เมื่อเติม IAA การแตกตาจะช้าออกไปอีก 5-9 วัน และมีความยาวของยอดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วน GA_3 ทำให้การแตกตาเร็วขึ้นเล็กน้อย ขณะที่ BA และ kinetin ให้ผลเช่นเดียวกับอาหารที่ปราศจากฮอร์โมน แต่ ABA ยับยั้งการแตกตาไม่น้อยกว่า 50 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มแตกตา หากนำตาเหล่านี้ย้ายไปไว้ในอาหารที่ไม่มี ABA ตาที่เริ่มแตกจะเจริญเติบโตเป็นยอดได้ แต่ถ้าทิ้งตาเหล่านั้นไว้บนอาหารที่มี ABA ตามเดิม ตาจะยังคงอยู่ในลักษณะเดิมไม่มีการเจริญเป็นยอด แม้เวลาจะผ่านไปถึง 80 วันก็ตาม

GA_3 ทำให้ปล้องของยอดยืด ขณะที่ BA และ kinetin ชักนำให้เกิดยอดถึง 6 ยอด แทนที่จะมีเพียง 2 ยอดตามปกติ เมื่อตัดยอดเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรปกติ โดยวางบน กระดาษกรองพับ ยอดจะมีการเจริญเติบโตได้นานกว่า 55 วัน การเติม IAA หรือ BA ไม่มีผลต่อลักษณะการเจริญเติบโต แต่ถ้าเติม GA_3 จะกระตุ้นการเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัด และเมื่อนำตาที่ตัดมาในช่วงฤดูใบไม้ผลิมาศึกษาพบว่า ตาที่มีอายุต่างกันจะใช้เวลาในการแตกตาต่างกัน กล่าวคือ ตาที่มีอายุ 2-4 สัปดาห์ จะใช้เวลานานถึง 22 วัน จึงจะแตกตาเช่นเดียวกันกับตาที่ตัดในฤดูหนาวที่มีอายุ 10 เดือน แต่ตาที่มีอายุ 4 และ 12 เดือน ต้องการเวลาสำหรับการแตกตาเพียงแค่ 2-4 วัน เท่านั้น

ในปี 1974 Chaturvedi and Mitra ได้แยกเอาส่วนต่างๆ คือ ลำต้น และใบของต้นกล้าส้มโอ และ C.sinensis ในหลอดทดลอง มาทำให้เกิดแคลลัสบนสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหาร MS โดยเพิ่มเติมปริมาณ thiamine.HCL pyridoxine.HCL และ nicotinic acid เป็น 2 เท่าและเพิ่มปริมาณ kinetin NAA และ 2,4-D เป็น 0.25 2.5 และ 0.25 มก/ล ตามลำดับ เมื่อต้องการเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มากขึ้นก็นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีเฉพาะ NAA 0.5 มก/ล แล้วนำแคลลัสที่ได้แยกเลี้ยงบนอาหารที่มี NAA 0.1 มก/ล เพียงอย่างเดียว หรือ NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.15 0.25 หรือ 0.40 มก/ล หรือ NAA 0.1 มก/ล + ME 500 มก/ล ประมาณ 60 วันจะเกิดตาสีเขียวทั้งผิวบนและผิวล่าง ยกเว้นในชิ้นส่วนที่เลี้ยงบน อาหารปกติ (control) ในอาหารที่มี BA 0.25 มก/ล จะเกิดตาจำนวนสูงสุดถึง 30 ตา อาหารที่มีทั้ง NAA BA และ ME จะให้ยอดแข็งแรงแต่ไม่มีผลต่อจำนวนตา เมื่อตัดยอดที่ได้จากการชักนำ แล้วเลี้ยงบนอาหารที่มี BA + NAA ความเข้มข้น 0.25 และ 0.1 มก/ล ตามลำดับ จะเกิดตาบริเวณรอยตัด 20-30 ตา ซึ่งยอดที่แข็งแรงจะสามารถชักนำให้ออกรากได้ดีในอาหารที่มี NAA 0.5 หรือ 0.25 มก/ล ร่วมกับ IBA (indole butyric acid) 0.25 มก/ล แต่ยอดที่อ่อนแอต้องการปริมาณ NAA เพียง 0.1 มก/ล ก็สามารถออกรากได้

เมื่อเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานาน แคลลัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงมีลักษณะที่แตกต่างกัน กล่าวคือ แคลลัสชนิด A มีลักษณะแน่นเป็นปุ่มปม มีการเจริญเติบโตช้า ชนิด B มีลักษณะร่วนคล้ายฟองน้ำและมีการเจริญเติบโตเร็วบนอาหารที่มี BAP + NAA และ ME ที่ความเข้มข้น 0.25 0.1 และ 500 มก/ล ตามลำดับ แคลลัสชนิด A จะเกิดตาและเจริญเติบโตเป็นยอดจำนวนมาก ตรงกันข้ามกับชนิด B ที่ไม่เกิดอะไรเลย เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณส่วนประกอบของแคลลัสทั้งสองชนิด พบว่าแคลลัสทั้งสองชนิดมีปริมาณไนโตรเจน โปรตีน กรดอะมิโน และน้ำตาลแตกต่างกัน โดยชนิด A มีปริมาณสารประกอบต่างๆ ที่กล่าวมามากกว่าชนิด B (Chaturvedi et al 1974a) และก่อนการเปลี่ยนแปลงแคลลัสชนิด A มีปริมาณกรดอะมิโนน้อยกว่าแคลลัสชนิดเดียวกัน ที่เปลี่ยนแปลงเกิดตาและเจริญเป็นยอดแล้ว (Chaturvedi et al 1974b) ในปีต่อมา Chaturvedi and Mitra (1975) ทำการทดลองเลี้ยงแคลลัสทั้งชนิด A และชนิด B บนอาหารที่มี NAA 0.1 มก/ล และ BAP หรือ zeatin ที่ความเข้มข้น 0.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.2 0.25 และ 0.3 มก/ล ได้ผลเช่นเดียวกัน คือ เกิดจุดกำเนิดตาได้ยกเว้นแคลลัสชนิด B ส่วนการใช้ kinetin ไม่สามารถทดแทน BAP หรือ zeatin ได้

Primo-Millo (1977) นำส่วนปล้องหรือชิ้นส่วนจากแผ่นใบของต้นแก่มะนาว มาเลี้ยง พบว่า ส่วนของลำต้นเกิดแคลลัสปริมาณสูงสุด บนอาหารที่มี NAA + BA ความเข้มข้น 5 x 10^{-5} และ 10^{-6} โมลาร์ตามลำดับ หรือ 2,4-D + BA ความเข้มข้น 5 x 10^{-6} และ 10^{-6} โมลาร์ ตามลำดับ ชิ้นของแผ่นใบเกิดแคลลัสปริมาณสูงสุด เมื่ออาหารที่ใช้เลี้ยงมี 2,4-D + BA ความเข้มข้น 5 x 10^{-5} และ 5 x 10^{-7} โมลาร์ ตามลำดับ หรือ 2,4-D + BA ความเข้มข้น 5 x 10^{-6} และ 10^{-6} โมลาร์ ตามลำดับ หรือ NOA + BA ความเข้มข้น 5 x 10^{-5} และ 5 x 10^{-7} โมลาร์ ตามลำดับ หรือ NOA + BA ความเข้มข้น 5 x 10^{-5} และ 10^{-6} โมลาร์ ตามลำดับ แคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถทำให้เกิดรากได้ในอาหารที่มี NAA 5 x 10^{-5} โมลาร์

นอกจากการใช้ส่วนต่างๆของต้นกล้าแล้วเมื่อนำเฉพาะส่วนยอดของ Troyer citrange (C.sinensis พันธุ์ Washington Navel x Poncirus trifoliata) มาเลี้ยงบนอาหารที่มี IAA 1-10 มก/ล สามารถเร่งการเกิดตาภายใน 5 สัปดาห์ แต่รากเกิดได้ดีบนอาหารที่มีเฉพาะ IAA (indole acetic acid) 10 มก/ล หรือ 2,4-D หรือ NOA (naphthoxy acetic acid) ที่มีความเข้มข้นลดลงเหลือเพียง 1/10 เท่า การเพิ่ม BA zeatin หรือ kinetin ช่วยยับยั้งการเกิดรากในขณะที่การเกิดแคลลัสจะเป็นไปได้ดีในอาหารที่มี 2,4-D หรือ NOA ที่ความเข้มข้น 10 มก/ล เหมือนกัน โดยใช้ร่วมกับ BA 1 มก/ล (Primo-Millo and Harada, 1978) ในปี 1978 Altman and Goren พบว่าการเลี้ยงตาส้ม Shamouti บน อาหารกึ่งวุ้น สูตร MT ที่มี BA 10^{-5} โมลาร์ จะเกิดตาถึง 5 ตา ซึ่งตามปกติมีประมาณ 1-2 ตา ในเวลาเพียง 8 วัน ตาจะเกิดบริเวณแกนกลางของก้านใบที่หลุดออกไป ผลของ ABA ส่งเสริมการเกิดแคลลัสดังกล่าวมาแล้วในข้างต้น จะถูกยับยั้งด้วยซูโครส 5% น้ำตาลจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยอดในกรณีที่มี BA รวมอยู่ด้วย ABA จะกระตุ้นการดูดน้ำตาลและการสะสมน้ำตาลของตา ในกรณีที่มีปริมาณมากกว่า 2.5% แต่ BA จะเร่งการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูดซึมน้ำตาลที่ทุกระดับความเข้มข้น การเลี้ยงตาในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูง 5% และ 15% ตาจะมีการสะสมน้ำตาลสูง (Giladi et al, 1977) ในสภาพที่มีแสงเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์แสง น้ำตาลจะมีผลเร่งการเจริญเติบโตของตาข้าง (Navarro et al, 1975)

Bhansali and Arya (1979) สามารถชักนำการเกิดยอดและ embryoid ได้จากแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและใบของ grapefruit ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MT ซึ่งเติม NAA 0.15 มก/ล + ME และ BAP ความเข้มข้น 250-1000 มก/ล และ 0.5 มก/ล ตามลำดับและสามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารที่มี NAA 2.5 มก/ล เพียงอย่างเดียว ในปีเดียวกัน Bhansali and Arya(1978) นำส่วนลำต้นและรากยาว 1 ซม จากต้นกล้า C.aurantifolia มาเลี้ยงบนอาหารสูตร CM (Chaturvedi and Mitra, 1974) ซึ่งเติมฮอร์โมนต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่าแคลลัสเกิดได้ดี เมื่อมี NAA kinetin และ 2,4-D ในปริมาณ 0.5 0.25 และ 0.25 มก/ล ตามลำดับ โดยพบว่าในที่มืดแคลลัสของรากจะอ่อน และร่วน มีสีขาวครีม ขณะที่แคลลัสของลำต้นจะแข็ง แน่น เป็นเม็ดกลมๆ สีเหลืองซีด เมื่อนำแคลลัสของลำต้นเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP 0.5 มก/ล โดยเติม NAA 0.05-0.1 มก/ล หรือไม่ก็ตาม จะเกิดยอดมากมายเป็นจำนวนสูงสุดถึง 10-12 ยอด แต่ยอดมี ขนาดสั้น แคลลัสของรากจะเกิดยอดเป็นจำนวนน้อยเพียง 1-2 ยอด แต่ยอดมีความยาว 4-6 ซม ปริมาณแสง จากหลอดฟลูออเรสเซนซ์มากกว่า 3000 ลักซ์ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเกิดอวัยวะต่างๆ การพัฒนาของตาที่เจริญเป็นยอดนั้นจะถูกกระตุ้นได้โดยการเติม ME 500 มก/ล ในขณะที่สามารถชักนำให้แคลลัสออกรากได้ในอาหารที่มี NAA หรือ IAA 1.0 มก/ล และ kinetin 0.1 มก/ล ส่วนแคลลัสจากลำต้นกล้าของ C.sinensis พันธุ์ Mousambi และ C.aurantifolia พันธุ์ Kaghzi และพันธุ์ Nimbu สามารถพัฒนาเป็นยอดได้เมื่อมีสัดส่วน ระหว่างไซโตไคนิน และออกซินสูง ปริมาณยอดมีจำนวนสูงสุดในอาหารที่มีเฉพาะ BA และจำนวนยอดของ C.sinensis มีมากกว่า C.aurantifolia (Bhansali and Arya, 1981)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการเพิ่มปริมาณยอด จากการเลี้ยงยอดต้นกล้าจาก nucellus ของ C.aurantium Carrizo citrange และส้ม Cleopatra (C.reshni Hort. ex Tanaka) บนอาหารวุ้นสูตร MT ที่มี BA kinetin และ 2iP [6-(γ,γ-dimethylalyllamino)-purine] ระดับความเข้มข้น 0.2 1.0 ถึง 5.0 มก/ล พบว่าปริมาณ BA ที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีปริมาณยอดเพิ่มขึ้นและปริมาณยอดสูงสุด เกิดบนอาหารที่มีปริมาณวุ้น 1% + น้ำตาลซูโครส 3-4% และได้รับแสง 2.2 กิโลลักซ์ ส่วน NAA 1 มก/ล สามารถชักนำให้ออกรากได้ถึง 80% บนอาหารที่ใช้วุ้น 0.5-1.0%(Kitto and Young,1981)

Barlass and Skene (1982) สามารถชักนำการเกิดยอดใหม่ ได้จากส่วนต่างๆ ของต้นกล้า และต้นแก่ของส้มสามใบ Carrizo citrange ส้ม Cleopatra มะนาว Rangpur และส้ม Symon โดยพบว่า เมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 3 เดือน ส่วนของยอด โดยเฉพาะพันธุ์ Carrizo ซึ่งเลี้ยงบนอาหารกึ่งวุ้นสูตร MS ที่เติม BA เกิดยอดใหม่จำนวนมาก โดยยอดต้นอ่อนและต้นแก่ตอบสนองต่ออาหารที่ใช้เลี้ยงต่างกัน ต้นแก่ต้องการธาตุอาหารหลักจากสูตร MS เพียงครึ่งส่วน + BA 2.5 ไมโครโมลาร์ ขณะที่ยอดต้นอ่อนตอบสนองได้ดีกับธาตุอาหารหลักสูตร MS เต็มส่วน + BA 10 ไมโครโมลาร์ ส้ม Symon ให้ยอดใหม่เพียง 2-3 ยอด จากการเลี้ยงยอดของต้นกล้า แต่ตาข้างสามารถให้ยอดจำนวนมาก ส่วนปล้องมะนาว และส้มพันธุ์ Cleopatra เกิดยอดจำนวนน้อยและช้า ในขณะที่พบว่าส้มสามใบ มีลักษณะของการข่มยอด (shoot dominance) สูง การใช้ส่วนของปล้อง พบว่ายอดส่วนมากเกิดจากการพัฒนาของแคลลัส แต่ปล้องจากกล้า citrange เกิดยอดจำนวนมากบริเวณรอยตัดทั้งสองข้าง เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่มี BA 2.5 ไมโครโมลาร์ ตรงกันข้ามกับปล้องของต้นแก่ทุกพันธุ์ที่ทดลองซึ่งเกิดยอดเพียงเล็กน้อยหรือไม่เกิดเลย ส่วนข้อของส้มทุกพันธุ์ที่กล่าวมา ไม่ว่าจะมาจากต้นอ่อนหรือต้นแก่ นับว่าเป็นส่วนที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดยอด ยอด citrange ที่เกิดจากการเลี้ยงปล้องบนอาหารสูตร White (1943) ที่เติม IBA 5 ไมโครโมลาร์และ NAA 0.5 ไมโครโมลาร์ เกิดราก 10 และ 25% (1 ราก: 1 ยอด) ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้ NAA 5 ไมโครโมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อย่างเดียวจะให้เปอร์เซนต์การออกรากสูงถึง 80% (5-9 ราก : 1 ยอด) แต่ยอด citrange จากต้นแก่ต้องการ NAA ในปริมาณสูงถึง 10 ไมโครโมลาร์ จึงจะออกรากได้และ NAA 5 ไมโครโมลาร์สามารถชักนำให้ออกรากเพียง 25% แต่ NAA ที่ความเข้มข้นนี้ ไม่ทำให้เปอร์เซนต์การออกรากของยอดจากต้นอ่อนเพิ่มขึ้นอีกเลย ยอดจากต้นกล้าส้มสามใบ ออกราก 60 และ 90% บนอาหารที่มี NAA 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าต้องการเวลาสำหรับการออกรากมากกว่า 3 เดือน ถ้ามีปริมาณ NAA 10 ไมโครโมลาร์ แต่เวลาการออกรากลดลงเมื่อมีปริมาณ NAA ลดลง ยอดของส้ม Symon และมะนาว ต้องการ NAA ในปริมาณสูงถึง 10 - 25 ไมโครโมลาร์ สำหรับการออกราก

Sauton et al (1982) ได้นำส่วนปลายรากจากต้นกล้าส้ม พันธุ์ Trovita มะนาว พันธุ์ Eureka ส้มสามใบ และ Troyer citrange เลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS MT Navarro et al (1975) Favre (1977,คัดจาก Sauton et al,1982) และ MS ที่เติม BAP 1 มก/ล + 2,4-D 0.1 มก/ล ในอาหารสูตร Favre ส่วนที่ตัดหนาขึ้นโดยไม่เกิดแคลลัส และมีการเปลี่ยนแปลงเป็นตาและพัฒนาเป็นยอดได้ แต่ในอาหาร MS ที่มี BAP และ 2,4-D จะเกิดเป็นแคลลัสและยอดได้ในเวลาต่อมา

Edriss and Burger (1984) ทำการขยายพันธุ์ Troyer citrange ด้วยการตัดลำต้นเหนือใบเลี้ยง ปลายราก และราก แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี NAA และ BAP ระดับความเข้มข้น 0.1-10 มก/ล พบว่าส่วนของรากเกิดเป็นยอดได้โดยตรงไม่ผ่านการเป็นแคลลัสในอาหารที่มี BAP 10 มก/ล + NAA 1 มก/ล แต่ลำต้นเหนือใบเลี้ยง ให้ยอดผ่านแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP 0.25 มก/ล + NAA 0.1 มก/ล และให้ยอดโดยตรงเมื่อเพิ่ม BAP 0.5 มก/ล + NAA 0.1-1.0 มก/ล ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง และสามารถชักนำให้ออกรากได้ด้วยการเติม NAA 2.0 มก/ล เพียงอย่างเดียว ต่อมา Pontikis and Sapoutzaki (1985) ขยายพันธุ์ส้ม Troyer citrange ด้วยการเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA + IBA + GA_3 ความเข้มข้น 0.5 0.1 และ 0.1 มก/ล ตามลำดับ พบว่า phloroglucinol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

89 มก/ล ทำให้การเพิ่มยอดเป็นทวีคูณ และสามารถชักนำยอดให้ออกรากได้โดยย้ายยอดเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจาก BA และเพิ่มปริมาณ IBA และ phloroglucinol เป็น 1 มก/ล และ 178 มก/ล ตามลำดับ

Liu (1986) ได้นำส่วนต่างๆ ของต้นกล้า C.sinensis ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่าอาหารที่เติม BA 1 มก/ล + IAA 0.2 มก/ล และมีปริมาณวิตามินเป็นสองเท่าของสูตร MS จะทำให้ส่วนของใบเลี้ยงบริเวณผิวนอกเกิดเป็นตาจำนวนมาก อวัยวะเกิดได้เร็วที่สุดนับจาก ใบเลี้ยง รากและลำต้น และเกิดได้เร็วกว่าจากใบ หรือลำต้นเหนือใบเลี้ยง แต่การเกิดอวัยวะนั้นขึ้นกับอายุของต้นกล้าด้วย Burger and Hackett (1986) พบว่าลำต้นเหนือใบเลี้ยง และรากของ C.sinensis พันธุ์ Valencia จะถูกกระตุ้นให้เกิดตาเมื่อเติม BA และ NAA ความ เข้มข้น 2 และ 0.2 มก/ล ตามลำดับ ขณะที่ NAA 2 มก/ล จะยับยั้งการเกิดตาจากส่วนยอดและปลายราก แต่ถ้ามีส่วนใบเลี้ยงติดอยู่จะเพิ่มการเกิดตาในส่วนเหนือจากข้อใบเลี้ยง แต่ไม่มีผลกับส่วนราก Grosser and Chandler (1986) นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดลูกผสม Swingle citrumelo [C.paradisi Macf. x Poncirus trifoliata (L.) Raf.] ในเพอร์ไลท์ที่อิ่มตัวด้วยสารละลาย สูตร Hoagland ที่มีความเข้มข้น 1.5 เท่า ตัดเฉพาะส่วนเหนือใบเลี้ยงของต้นกล้าที่มีอายุ 4-8 สัปดาห์ ยาว 0.5 - 1.0 ซม นำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น สูตร MT ที่เติมด้วย coumarin 0 30 60 หรือ 90 ไมโครโมลาร์ ในกรณีที่เมล็ดงอกช้ามากกว่า 2 เดือน ปริมาณ coumarin ที่ใช้เพิ่มเป็น 120 และ 150 ไมโครโมลาร์ พบว่าผลของ coumarin ขึ้นอยู่อย่างมากต่อขนาดความยาวของชิ้นส่วนที่เลี้ยงโดยชิ้นที่ยาวกว่าจะมีค่าของความสัมพันธ์สูงกว่า จำนวน 50% ของชิ้นส่วนขนาด 0.5 ซม ที่เลี้ยง บนอาหารที่มี coumarin 90-150 ไมโครโมลาร์ มีการพัฒนาของยอดและรากอย่างสมบูรณ์จากส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยงโดยตรง โดยมียอดเกิดจากบริเวณรอยตัดด้านบนของชิ้นส่วนที่เลี้ยงและยอดเกิดขึ้นและมีการพัฒนาก่อนการเกิดราก ปริมาณการเกิดยอดเพิ่มเป็น 5 เท่าต่อชิ้นส่วนที่เลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในส่วนของปล้องจากต้นกล้าส้มเปรี้ยว ลูกผสม citrange พันธุ์ Carrizo และส้มเขียวหวานพันธุ์ Cleopatra เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมของ NAA และ BA ทั้งสามพันธุ์สามารถเกิดยอดได้ในอาหารที่มี BA 22 ไมโครโมลาร์ โดยจะมี NAA 5.4 ไมโครโมลาร์หรือไม่ก็ตาม จำนวนยอดขึ้นอยู่กับพันธุ์ กล่าวคือ ในส้มเปรี้ยว แคลลัสเกิดจากการเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารที่มี NAA 5.4 ไมโครโมลาร์ + BA 1.1 ไมโครโมลาร์ จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.0 และ 2.3 เมื่อมี BA 22 ไมโครโมลาร์และไม่มี NAA หรือมี NAA 5.4 ไมโครโมลาร์ ในกรณีของส้ม Cleopatra ยอดจะเกิดผ่านแคลลัส ถ้ามี NAA ร่วมกับ BA 22 ไมโครโมลาร์ ส่วนแคลลัสลูกผสม Carrizo เกิดจากการเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารที่มีอัตราส่วนของออกซินสูงกว่าไซโตไคนิน ตาและยอดที่เกิดจากแคลลัสเหล่านี้เมื่อถูกนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีปริมาณ BA อย่างน้อย 22 ไมโครโมลาร์ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.6 ยอด เมื่อมี BA 44 ไมโครโมลาร์ + NAA 5.4 ไมโครโมลาร์ ลักษณะของยอดจะสั้นน้อยกว่า 2 ซม และยอดจะยืดยาวเมื่อมี BA ลดลง แต่ปริมาณ NAA ไม่มีผลต่อจำนวนยอด (Moore, 1986)

Shengeliya and Butenko (1988) พบว่า การพัฒนาตาข้างของมะนาว พันธุ์ Meyer และ พันธุ์ Gruzinski ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติมไซโตไคนินนั้น ขึ้นอยู่กับอายุพืช แหล่งที่มา และชนิดของพืชเป็นอย่างมาก ในปีเดียวกัน Nel (1988b) เลี้ยงหน่วยเติบโตของยอดจากต้นส้มที่ปลูกในเรือนกระจกบนอาหารสูตร MT ที่เติม BA และ NAA สามารถพัฒนาเป็นยอด และชักนำให้ออกรากในอาหารสูตร MT เพียงครึ่งส่วน + NAA และรากมีความยาวเพิ่มขึ้นได้ในอาหารที่ปราศจากฮอร์โมน

การใช้ส่วนของลำต้นกล้า ส้มเกลี้ยงพันธุ์ Pineapple มะนาวพันธุ์ Mexican และ Citron พันธุ์ Arizona Etrog ผ่า และวางทาบตามยาว บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีฮอร์โมนต่างๆ อาทิ NAA BA 2iP และ น้ำส้มคั้น พบว่า ในอาหารที่มี NAA 10 มก/ล + BA 0.25 มก/ล ชิ้นส่วนที่เลี้ยงเกิดแคลลัสซึ่งสามารถเจริญต่อได้เมื่อมีการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมที่เพิ่มเติมด้วยน้ำส้มคั้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) และเก็บในที่มืด ยอดที่ได้จากการเลี้ยงซ้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และปล้องบนอาหารที่มี NAA 3 มก/ล สามารถออกรากได้เมื่อย้ายไปไว้บนอาหารที่ปราศจาก NAA เพื่อให้มีการพัฒนาของราก การชักนำให้ส่วนรากมีการพัฒนาเป็นต้นทำได้โดยการเลี้ยงปล้องของ ส้มและมะนาว บนอาหารที่มี NAA 10 มก/ล และเลี้ยงปล้อง citron บนอาหารที่มี NAA 3 มก/ล จนได้รากยาวอย่างน้อย 3 ซม ตัดแยกรากเป็นส่วนของรากและปลายราก แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า การงอกของรากจะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณ BA ในอาหารมากกว่า 0.1 มก/ล ความยาวของราก และการเกิดรากฝอยขึ้นกับพันธุ์ BA 3 มก/ล จะทำให้ส้มและ citron มีการพัฒนาของตาเป็นยอดจำนวนมาก ขณะที่มะนาวต้องการ BA เพียง 1 มก/ล เมื่อมีตา 1-2 ตา ตาส้มสามารถพัฒนาเป็นยอดที่ตัดแยกชักนำให้ออกรากได้ แต่ถ้ามีจำนวนตามาก ตาจะมีขนาดเล็กและไม่สามารถงอกรากได้ ข้อที่มีตาข้างเพียงตาเดียว สามารถเพิ่มจำนวนตามากขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA เพิ่มขึ้นถึง 1 มก/ล ปริมาณ BA ที่มากขึ้นจะยับยั้งการเจริญของยอด พบว่าการเจริญของยอดขึ้นอยู่กับชนิด ความเข้มข้นของ BA และจำนวนของยอด โดยทั่วไป ถ้าเกิดหลายยอดจากตาเดียว จะมีเพียงยอดเดียวที่มีการเจริญยืดยาวขนาด 1-2 ซม ในเวลา 2 สัปดาห์ ขณะที่ยอดอื่นยังคงเท่าเดิมหรือมีการเจริญเพียงเล็กน้อยและยอดที่มีขนาดสั้นเหล่านี้จะเจริญได้ก็ต่อเมื่อมีการตัดแยกเอายอดที่เจริญกว่านั้นออกไป ส้มและมะนาวให้จำนวนยอดสูงสุดเมื่ออาหารที่ใช้เลี้ยงมี BA 1 มก/ล ขณะที่ citron ต้องการ BA เพียง 0.1 มก/ล โดยจะได้ยอดที่มีขนาดสูง 1-1.5 ซม (Duran - Vila et al, 1989)

Sim et al (1989) พบว่า เมื่อนำปลายยอดและข้อจากต้นแก่ของ C.mitis มาเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP หรือไม่ก็ตามสามารถเกิดยอดได้ 66-100% แต่ส่วนต่างๆ ของต้นกล้าอาทิ ส่วนเหนือใบเลี้ยง ใบ ปลายยอดและข้อ สามารถเกิดยอดได้ทั้งสิ้น ในการชักนำให้เกิดตาจากการเลี้ยงราก 3 รูปแบบ คือ รากที่ติดอยู่กับต้นกล้าทั้งต้น รากที่ติดกับต้นกล้าที่ตัดปลาย และรากอย่างเดียว พบว่าจำนวนตาที่เกิดสูงสุดได้จากการเลี้ยงรากที่ติดกับต้นกล้าทั้งต้น ในอาหารที่มี BA 0.5 มก/ล ให้จำนวนยอดถึง 275 ยอด จากชิ้นส่วนพืชเพียง 13 ชิ้น ในเวลา 9 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 ส่วนต่างๆ ของดอก

Hidaka (1985a) ได้พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส มีผลอย่างมากต่อการเกิด embryoid จากอับเกสรของส้ม นอกจากนี้ยังขึ้นกับชนิดของส้มด้วย กล่าวคือ ส้มสามใบต้องการน้ำตาล 30 ก/ล ขณะที่ C. sinensis พันธุ์ Trovita และ C. aurantium ต้องการ 10 และ 70 ก/ล ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้นทำให้การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น

ในปีเดียวกัน (Hidaka, 1985b) ทำการเลี้ยงเกสรตัวผู้ของส้มพันธุ์ Trovita บนอาหารสูตร MS ที่มีปริมาณkinetin และ IAA ต่ำ เป็นเวลามากกว่า 10 สัปดาห์ ก่อให้เกิด embryoid ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 18 ได้โดยตรง ขณะที่แคลลัสจะเกิดขึ้นได้ถ้ามี kinetin หรือ IAA 2 มก/ล Chaturvedi and Sharma, (1985) ได้นำละอองเกสรตัวผู้ของ C. aurantifolia ซึ่งอยู่ในระยะ uninucleate tetra stage เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงเพิ่มเติม BA + IAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มก/ล ตามลำดับ เป็นเวลา 20-30 วัน แล้วย้ายลงบนอาหารกึ่งวุ้น สูตร SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) ที่มีปริมาณสารเร่งการเจริญเติบโตเท่าเดิมเป็นเวลาอีก 30 วัน จะเกิด embryoid ภายในช่องเกสร (anther lobe) ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นได้เมื่อย้าย embryoid เหล่านั้นลงบนอาหารที่ไม่มีออกซินและสามารถชักนำยอดใหม่ให้เกิดรากได้ด้วย ต้นใหม่ที่ได้จะมีโครโมโซม 2n = 18

1.3 ส่วนต่างๆ ของผล

Rangan et al (1968) เลี้ยง nucellus จากผลอ่อนของ C. grandis พันธุ์ Pong Yau ซึ่งมีอายุ 100-120 วัน C. limon พันธุ์ Ponderosa และ C. reticulata x C. sinensis พันธุ์ Temple ซึ่งเป็นชนิดคัพภะเดียว บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมด้วย casein hydrolysate 500 มก/ล หรือ ME 500 มก/ล หรือ ส่วนผสมของน้ำส้มคั้น 5% + ADS (adenine sulphate) 25 มก/ล + NAA 0.5 มก/ล nucellus จะเกิดเป็น embryoid และเจริญเป็นต้นกล้าในเวลา 6-7 สัปดาห์ ปริมาณการเกิดเป็น embryoid ขึ้นอยู่กับชนิดและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนประกอบของอาหาร อาหารที่มี casein hydrolysate หรือไม่ก็ตามจะไม่ก่อให้เกิด embryoid และในอาหารที่มี ME จะได้ปริมาณการเกิด embryoid สูงสุดคือ 20 12 และ 10% ในส้มพันธุ์ Temple มะนาวพันธุ์ Ponderosa และส้มโอพันธุ์ Pong Yua ตามลำดับ

ในส้มพันธุ์ Washington Navel Button and Bornman (1971) สามารถชักนำส่วน nucellus ให้เกิด pseudobulbil และเปลี่ยนแปลงเป็น embryoid ได้ในอาหารที่เติม adenine 40 มก/ล + ME 400 มก/ล และเจริญเป็นต้นได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มี GA .1 มก/ล

Kochba et al (1973) ได้นำส่วนไข่อ่อนและ nucellus ของส้มพันธุ์ Shamouti, Valencia และ grapefruit พันธุ์ Marsh ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MT ที่เติม ME 500 มก/ล สามารถเกิดเป็นต้นเมื่อเติม kinetin + IAA และน้ำมะพร้าว หรือ GA_3 หรือเมื่อมีอัตราส่วนระหว่าง kinetin ต่อ IAA สูง และการเติมน้ำมะพร้าว ช่วยทำให้ลำต้นมีความยาวเพิ่มมากกว่าการเกิดราก ในขณะที่อัตราส่วนระหว่าง kinetin ต่อ IAA ต่ำ เหมาะต่อการเกิดรากและยับยั้งการยืดของลำต้น ส่วนการเติม GA_3 ในอาหารจะเร่งการออกรากและเพิ่มการยืดยาวของลำต้น

Kochba et al (1974) ทำการเลี้ยง embryoid ที่ได้จากการเลี้ยงแคลลัสจากไข่อ่อนของส้ม Shamouti ที่มีการพัฒนาระยะต่างๆ คือ

1. เมื่อ pseudobulbils มีขนาด 1 มม
2. เมื่อ pseudobulbils มีขนาด 2-3 มม
3. เมื่ออยู่ในระยะ heart-shaped ยาว 3-5 มม
4. เมื่อ embryoid มีใบเลี้ยงแล้ว

เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MT เพื่อชักนำการออกราก พบว่า embryoid ในระยะที่ 3 จะถูกกระตุ้นด้วย ADS 27 มก/ล แต่ NAA 1 มก/ล ทำให้การงอกรากลดลงและ IBA 1 มก/ล ยับยั้งการงอกราก การเติม GA_3 1 มก/ล ลงไปในอาหารช่วยการงอกรากของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

embryoid และมีผลลบล้างการยับยั้งเนื่องจาก IBA ในอาหารที่มี GA_3 + ADS การงอกรากของ embryoid จะดีกว่าในอาหารที่มีเฉพาะ GA_3 หรือ ADS เพียงอย่างเดียว เมื่อเลี้ยง embryoid บนอาหารที่มีเฉพาะ GA_3 เป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้วย้ายส่วนที่ยังไม่เกิดรากลงบนอาหารที่มี GA_3+ ADS จะงอกราก 72% ภายใน 1 สัปดาห์และถึง 94% เมื่อเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ GA_3 ไม่สามารถชักนำการงอกรากของ embryoid ในระยะแรกได้ แต่ทั้ง GA_3 และ ADS สามารถ ทำให้ embryoid ในระยะที่ 2 และ 3 ออกรากได้ขณะที่ผลร่วมของ GA_3 + ADS ไม่มีผลต่อการงอกรากของ embryoid ทั้ง 3 ระยะเลย embryoid ในระยะที่ 4 สามารถงอกรากได้ บนอาหารที่ปราศจาก GA_3 และ ADS GA_3 และ ADS แต่ละตัวไม่มีผลต่อการงอกรากของ embryoid ในระยะนี้ แต่ผลร่วมของ GA_3 + ADS ให้ผลส่งเสริมอย่างยิ่ง อนึ่งการชักนำให้เกิดรากด้วย GA_3 และ ADS นั้น ไม่ก่อให้เกิดแนวราก (root zone) ใน embryoid ระยะ 1 และ 2 แต่จะเกิดเพียงบางส่วนในระยะที่ 3 และเกิดแนวรากเต็มส่วนในระยะที่ 4 ที่ไม่มีการเติมสารใดๆ ในอาหาร

Kamisoyama et al (1982) พบว่า ส่วนกุ้ง (juice vesicle) จากผลอ่อนของ C.hassaku ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมด้วย IAA และ kinetin เพียงสัปดาห์เดียวเกิดเป็นแคลลัสสีเขียว ซึ่งต่อมามีการพัฒนาเป็น pseudobulbils ที่มีใบเลี้ยง 2 ใบ

การเลี้ยงแคลลัสจาก nucellus ของส้ม C. sinensis 8 พันธุ์ C. deliciosa, C.junos และส้มพันธุ์ Nova บนอาหารสูตร MT ที่เติม BA 10 มก/ล พบว่าแคลลัสเกิดการ พัฒนาเป็น embryoid ที่มีสีเขียว และเมื่อนำแคลลัสจาก nucellus ของส้มพันธุ์ Trovita ที่เลี้ยงและย้ายในอาหารเป็นเวลา 5 ปี มาทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า 2 ใน 30 เซล มีจำนวนโครโมโซม 4x = 36 แต่เมื่อเลี้ยงและปลูกเป็นต้นแล้ว ไม่พบความแปรปรวนใน จำนวนส้มพันธุ์ Trovita 20 ต้นหรือพบความแตกต่างจากต้นที่กล่าวมาแล้วกับกล้าพันธุ์ Trovita ที่เจริญจาก nucellus โดยตรง ไม่ว่าจะเป็น รูปร่างใบ น้ำมันในใบ จำนวนโครโมโซม หรือ isoenzymes ก็ตาม (Kobayashi et al, 1985) แต่การเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

nucellus ของ C. clementina ชนิดพันธุ์ที่มีคัพภะเดียวที่ปราศจากเชื้อไวรัสนั้น จะเกิดความผิดปกติทาง phenotype 29% เมื่อทำการวิเคราะห์สายต้นด้วยวิธีทางอีเล็กโตรโฟเรซิส พบว่ามีความแตกต่างของความเข้มและการกระจายของแถบโปรตีน ระหว่างต้นปกติกับต้นที่ผิดปกติไป (Navarro et al, 1985) Pasqual et al (1985) นำ nucellus จากผล ซึ่งมีอายุ 12 สัปดาห์หลังการผสมเกสรของส้มพันธุ์ Valencia มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี i-inositol, pyridoxine. HCl, nicotinic acid และ thiamine. HCl เป็นปริมาณ 100, 1, 1 และ 0.2 มก/ล ตามลำดับ และเติม ME น้ำตาลซูโครสและวุ้นความเข้มข้น 500 500,000 และ 8,000 มก/ล ตามลำดับ พบว่าเกิดรากและส่วนเหนือรากซึ่งเจริญเป็นต้นในเวลาต่อมา เมื่อมีใบจริง 4 ใบ ก็สามารถย้ายปลูกลงดินในเรือนกระจกได้ Pasqual et al (1990) พบว่า การเลี้ยง nucellus ของส้มพันธุ์ Valencia จากผลที่มีอายุ 12 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.0 0.25 0.50 1.0 และ 1.5 มก/ล และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 และ 2.0 มก/ล โดยแบ่งเลี้ยงในที่มืด และมีแสงความเข้ม 1500 ลักซ์พบว่าแคลลัสจาก nucellus 1 ชิ้นจะให้ embryoid สูงสุดจำนวน 12 embryoid บนอาหารที่มี kinetin 0.25 มก/ล + 2,4-D 0.5 มก/ล นอกจากการเลี้ยงส่วนของ nucellus แล้ว Wang and Chang (1978) ได้นำแคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงเอนโดสเปอร์มของ C.grandis บนอาหารสูตร MT ที่มี 2,4-D 2 มก/ล + BAP 5 มก/ล + casein hydrolysate 1,000 มก/ล พบว่าเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่มี GA_3 2-5 มก/ล ชิ้นส่วนจะเกิดเป็น embryoid ที่มีราก ยอดและสามารถพัฒนาเป็นต้นในเวลาต่อมาได้ ในปีต่อมา Patena et al (1979) ชักนำการเกิดต้นที่มีรากได้จากแคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงเมล็ดส้มจี๊ด (calamansi) และส้มโอที่ ปราศจากคัพภะ บนอาหารสูตร MS หรือ Barba ที่มีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตและสารอินทรีย์อื่นๆ เช่นเดียวกันกับที่ Zdruikovskaya-Rikhter (1987) สามารถเลี้ยงคัพภะอ่อนของส้ม Satsuma และเอนโดสเปอร์มของส้มโอพันธุ์ White - Buntan บนอาหารสูตร White ได้ โดยไม่ผ่านระยะแคลลัสเลย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในปี 1988 Hidaka and Kajiura นำคัพภะของส้ม Washington Navel (C.sinensis) yoko(C.yoko) และponkan(C.reticulata) อายุ 3-4 เดือนหลังการผสมเกสรไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม ME และ kinetin พบว่าได้แคลลัสสีขาว ร่วนแคลลัสนี้เกิดจากส่วนใต้ใบเลี้ยงหลังการเลี้ยง 1-3 เดือน เมื่อแยก protoplast จากแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารที่มี zeatin 1 ไมโครโมลาร์ได้ embryoid ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ เมื่อย้าย embryoid เหล่านี้ไปเลี้ยงบนอาหารที่มี GA_3 1 ไมโครโมลาร์ และซูโครส 0.06 โมลาร์

ในเวลาต่อมา Hidaka and Omura (1990) พบว่าการใช้ galactose 0.1 โมลาร์ และ sorbitol 0.1 โมลาร์ ทำให้การเจริญเติบโตของต้นดีกว่าการใช้ซูโครส 0.06 โมลาร์

Navarro et al (1981) เลี้ยงรังไข่อ่อนของผลส้มพันธุ์ Navelina Washington Navel, Navelate และ Washington Navel Precoz ที่มีอายุผล 2, 4, 6 8 และ 10 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง พบว่า ต้นที่ได้ปราศจากโรคไวรัส exocortis psoriasis concave gum และ enation และมีการเจริญทางสัณฐานเป็นปกติและสม่ำเสมอ แต่การเลี้ยงไม่ผ่านพ้นระยะวัยอ่อน (juvenility)

ในปี 1988a Nel พบว่า การเลี้ยงรังไข่อ่อน จากผลอ่อน ส้มอายุ 4 สัปดาห์ หลังการผสมเกสรบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เกิดเป็นแคลลัสซึ่งสามารถเลี้ยงต่อโดยเปลี่ยนย้ายอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เมื่อนำแคลลัสที่ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MT ที่เติม glycerol 2.6% (ปริมาตร/ปริมาตร) + วุ้น 1% ได้ embryoid ซึ่งพัฒนาเป็นต้นที่ปราศจากไวรัส ในเวลาต่อมานอกจากนี้ Geraci and Tusa (1990) ยังพบว่าแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงรังไข่ของ C.limon Burn. พันธุ์ Femminello ที่มีอายุตั้งแต่ก่อนการผสมจน 60 วันหลังกลีบดอกร่วงบนอาหารสูตร MT การเกิดแคลลัสไม่ขึ้นกับระยะการพัฒนาของรังไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสและต้นที่ได้จากแคลลัสมีโครโมโซมเท่ากับ 2n

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved