การชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบส้มจี๊ด (*Citrus japonica* Thunb.) ในหลอดทดลอง

Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of Kumquat orange (*Citrus japonica* Thunb.)

ชาลินี ถังมณี [1*]
Chalinee Thangmanee [1*]

[1*]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต จังหวัดภูเก็ต
[1]Department of Science and Mathematics, Phuket Rajabhat University, Phuket
*Corresponding author: Chalinee Thangmanee, e-mail address: chalinee.t@pkru.ac.th

บทคัดย่อ

ผลส้มจี๊ด (*Citrus japonica* Thunb.) เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก โพลีฟีนอล และแคโรทีนอยด์ วิธีการปลูกส้มจี๊ดแบบดั่งเดิมเกษตรกรต้องเผชิญกับปัญหาต่าง ๆ เช่น ต้นกล้าเจริญเติบโตช้า โรคและแมลงตลอดจนศัตรูพืชต่าง ๆ เพื่อที่จะแก้ปัญหาเหล่านี้ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำมาประยุกต์ใช้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของส้มจี๊ดที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และการเติม N^6 benzyl adenine (BA) เพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ 1-naphthalene acetic acid (NAA) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Murashige and Skoog (MS) ต่อการเกิดแคลลัส การเกิดยอดจากแคลลัส การเพิ่มจำนวนยอดรวมจากยอดเดี่ยว และการเกิดรากในหลอดทดลอง ผลการศึกษาพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (73.53%) การเกิดยอดจากแคลลัสสูงสุด (100%) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพิ่มจำนวนยอดรวมเกิดขึ้นหลังจากย้ายเลี้ยงยอดที่พัฒนาจากแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวมต่อชิ้นส่วนพืชเฉลี่ยสูงสุด (9.35 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) ยอดที่ได้สามารถพัฒนาเกิดรากได้ดี (76.66%) ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.45 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต้นพืชที่มีรากสมบูรณ์ถูกย้ายไปปลูกในดิน และทำการอนุบาลในโรงเรือนต่อไป

คำสำคัญ: ส้ม, การชักนำแคลลัส, การพัฒนายอด, การเกิดราก, การเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

Abstract

Kumquat fruit (*Citrus japonica* Thunb.) is a great source of bioactive compounds such as ascorbic acid, polyphenols, and carotenoids. The conventional cultivation of this orange faces a lot of problems e.g., slow growth, insect, pests, and diseases. To solve these problems, the plant tissue culture technique is applied. In the current work, leaf derived from *in vitro* seedlings of Kumquat orange were used for explants and N^6 benzyl adenine (BA) alone or in combination with 1-naphthalene acetic acid (NAA) were added in Murashige and Skoog (MS) medium for callus formation, shoot regeneration from callus, multiple shoot proliferation from a single shoot, and rooting *in vitro*. The highest percentage of callus formation (73.53%) was obtained on MS medium supplemented with 1 mg/L BA in combination with 0.15 mg/L NAA. The regeneration percentage of callus as high as 100 % was obtained on MS medium supplemented with 1 mg/L BA. Multiple shoot formation was initiated after subculture regenerated shoot to the same medium for 4 weeks. MS medium supplemented with 1 mg/L BA gave the highest average number of shoots per explant (9.35 shoots per explant). Multiple shoots were rooted best (76.66%) under the treatment of 0.45 mg/L NAA after 4 weeks of subculture. Plantlets with healthy roots were transferred to soil and acclimatization in the greenhouse.

Keywords: *Citrus,* callus formation, shoot regeneration, rooting, *in vitro* culture

1. บทนำ

ส้มจี๊ด (*Citrus japonica* Thunb.) เป็นส้มที่มีผลขนาดเล็ก มีทั้งลักษณะกลม และรี จัดเป็นพืชในวงศ์ Rutaceae เป็นพรรณไม้ในกลุ่มเดียวกับมะนาว ส้มโอ และส้มเขียวหวาน เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อน ให้ผลดกตลอดปี ผลสมจี๊ดเป็นแหล่งของวิตามินหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เปลือกมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก โพลีฟีนอล และแคโรทีนอยด์ [1] มีประโยชน์ต่อการดูแลสุขภาพ ปัจจุบันสามารถนำผลส้มจี๊ดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด วิธีการขยายพันธุ์ส้มจี๊ดที่นิยมใช้กันในปัจจุบันคือ วิธีการปักชำ ตอนกิ่ง ทาบกิ่งและเสียบกิ่ง [2] [3] ซึ่งมีข้อเสียคือ ทำให้เชื้อโรคจากต้นแม่สามารถส่งต่อไปยังต้นลูกได้ง่ายขึ้น ไม่นิยมขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด เนื่องจากกล้าพันธุ์ที่ได้ให้ผลผลิตช้า และง่ายต่อการเกิดโรค [2] การปลูกส้มจี๊ดในปัจจุบัน เกษตรกรต้องเผชิญกับปัญหาผลผลิตส้มจี๊ดลดลงเนื่องจากหลายปัจจัย เช่น โรคและศัตรูพืช ความเครียดจากปัจจัยทางกายภาพ เช่น สภาวะแห้งแล้ง การมีน้ำท่วมขังบริเวณรากเป็นเวลานาน ๆ ความเค็มของดิน การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การขาดแคลนธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต การพักตัวอยู่ในระยะต้นอ่อนนานเกินไปและมีการเจริญเติบโตช้า ความเสียหายก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว การมีเมล็ดเป็นจำนวนมากในผล ผลผลิตต่ำ และอายุการเก็บรักษาผลผลิตสั้น [3] ทางเลือกหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวคือ การปรับปรุงสายพันธุ์พืช แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการปรับปรุงสายพันธุ์พืชโดยใช้วิธีการดั้งเดิมนั้นต้องใช้ระยะเวลายาวนาน ดังนั้นการนำองค์ความรู้เกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพที่ทันสมัยมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ส้มจี๊ดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีแนวโน้มที่จะประสบความสำเร็จสูง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเครื่องมือพื้นฐานของการปรับปรุงสายพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ และมีประสิทธิภาพสูงในการปรับปรุงสายพันธุ์พืชโดยเทคนิคนี้สามารถผลิตพืชที่ปลอดเชื้อได้ในปริมาณมาก ในระยะเวลาสั้น และต้นที่ได้จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ [4] จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้าพบว่า การถ่ายยีนในพืชหลายชนิดนิยมใช้แคลลัสเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น [5] [6] [7] [8] และในพืชหลายชนิดเช่นกันพบว่า การชักนำให้แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนแล้วพัฒนาไปเป็นพืชที่สมบูรณ์นั้นทำได้ยาก ในส้มจี๊ดก็เช่นกัน นอกจากนั้นยังพบว่าจำนวนยอดที่ได้ในหลอดทดลองมีปริมาณน้อยมาก ก่อนหน้านี้มีรายงานความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของส้มสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซินได้แก่ 2,4-D หรือ NAA ร่วมกับกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA เป็นหลัก โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.5 - 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) [9] [10] [11] แต่อย่างไรก็ตามมีบางงานวิจัยที่รายงานว่า NAA ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากชิ้นส่วนใบในขณะที่ 2,4-D จะชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ และไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในกลุ่มส้มแมนดาริน [12] [13] ส่วนการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสนั้นพบว่า งานวิจัยส่วนใหญ่จะเติม BA ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ถึง 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดความแตกต่างของสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซินและไซโทไคนินในแคลลัส ทำให้ยอดสามารถพัฒนาขึ้นมาได้ [9] [10] [11] [12] [13] และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ (1.0 – 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งเสริมให้เกิดการพัฒนารากจากยอดในหลอดทดลอง [10] [11] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของส้มจี๊ด และหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำยอดจากแคลลัส การเพิ่มปริมาณยอด และการชักนำรากในหลอดทดลอง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการถ่ายยีนในการปรับปรุงสายพันธุ์ส้มจี๊ดต่อไป

2. วิธีการศึกษา

ต้นอ่อนส้มจี๊ดอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง บนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) [14] ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ถูกนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง

2.1 การศึกษาผลของ BA ร่วมกับ NAA ต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของส้มจี๊ดในหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนใบ 2 คู่แรกของต้นอ่อนส้มจี๊ด (Figure 1a) มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.15 0.30 0.45 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมในการชักนำยอดและการเพิ่มจำนวนยอดรวมของส้มจี๊ดในหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนใบอ่อนจากต้นปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดจากการทดลองที่ 1 เพื่อชักนำแคลลัส จากนั้นย้ายแคลลัสที่มีอายุ 4 สัปดาห์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากแคลลัส ตัดแยกยอดเดี่ยว ๆ ที่ได้จากแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดรวม จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช และความยาวยอดเฉลี่ยในแต่ละการทดลอง

2.3 การศึกษาผลของ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเกิดรากจากต้นส้มจี๊ดในหลอดทดลอง

นำยอด อายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า ในการทดลองที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดต่อชิ้นส่วนพืชสูงสุดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0 0.15 0.30 0.45 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากต่อชิ้นส่วนพืช และความยาวราก หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สภาวะในการเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงทุกสูตรใช้น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 8.2 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล และกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ก่อนที่จะนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน จากหลอดไฟนีออน ขนาด 40 วัตต์ ซึ่งติดตั้งเหนือขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะประมาณ 30 เซนติเมตร ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) แต่ละการทดลองจะทำการทดลอง 4 ซ้ำ ๆ ละ 30 ชิ้นส่วนพืช วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การเกิดยอดจากแคลลัส การเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนพืช จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช ความยาวของยอดเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากต่อชิ้นส่วนพืช และความยาวรากเฉลี่ย ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชั่น 26.0

3. ผลการศึกษาและการวิจารณ์

จากการนำชิ้นส่วนใบที่ปลอดเชื้อแล้วของต้นอ่อนส้มจี๊ด อายุ 4 สัปดาห์ วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบในทุกการทดลองสามารถพัฒนาสร้างแคลลัสได้ (Table 1) โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่นมีสีเขียวอ่อนถึงเข้ม โดยจะเริ่มพัฒนาจากเส้นกลางใบและแผ่ปกคลุมไปทั่วทั้งแผ่นใบ (Figure 1b) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (การทดลองชุดควบคุม) และในการทดลองที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการทดลองอื่น ๆ โดยในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (73.53%) และในการทดลองชุดควบคุมให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำสุด (41.86%) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่า การเพิ่มระดับความเข้มข้นของ NAA ในอาหารชักนำแคลลัส ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง และในการทดลองที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.30 0.45 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสม มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนของส้มจี๊ด ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ [15] [16] โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซินถูกใช้กันมาอย่างแพร่หลายในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช โดยออกซินมีบทบาทสำคัญช่วยกระตุ้น

การยืดยาวของเซลล์และส่งเสริมการแบ่งเซลล์ ไซโตไคนินมีหน้าที่หลักคือ ช่วยเพิ่มการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเซลล์ไปทำหน้าที่เฉพาะ เพิ่มจำนวนใบในพืช การใช้ออกซิน (NAA) ร่วมกับ ไซโทไคนิน (BA) ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ เจริญเติบโตของเซลล์ และเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส [17]

Table 1 Effect of BA and NAA at different concentrations on callus formation from leaf explants of *C. japonica* after 4 weeks of culture

BA concentration (mg/l)	NAA concentration (mg/l)	Percentage of callus formation (mean ± S.E.)
1	0	41.86 ±7.61b
	0.15	73.53±7.67a
	0.30	63.89±8.11ab
	0.45	62.17±8.08ab
	0.60	58.83±8.56ab

Values within a column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$.

แคลลัสอายุ 4 สัปดาห์จากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นและวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในทุกระดับความเข้มข้นของ BA ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากแคลลัสที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และแตกต่างจากการทดลองชุดควบคุม (อาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Table 2) โดยในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากแคลลัสสูงสุด (100%) เมื่อตัดยอดที่เกิดขึ้นแยกออกเป็นยอดเดี่ยว ๆ (Figure 1c) และย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมอีก 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดรวม พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดรวมต่อชิ้นส่วนพืชสูงสุดด้วยเช่นกัน (9.35 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) (Figure 1d) โดยยอดรวมแต่ละยอดมีความยาวเฉลี่ย 1.31 เซนติเมตร ส่วนในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 66.66 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชเฉลี่ย 4.25 และ 1.47 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และให้ความยาวยอดเฉลี่ย 0.73 และ 0.19 เซนติเมตร ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ในกระบวนการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชไปเป็นยอดในหลอดทดลองนั้น เป็นผลมาจากทั้งปัจจัยภายในของพืช และปัจจัยภายนอก ได้แก่ อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช โดยพบว่า BA เป็นไซโตไคนินที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซีสในพืชวงศ์ส้ม [18] [19] [20] และเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการกระตุ้นให้เกิดตายอด และการเพิ่มจำนวนยอดรวมจากชิ้นส่วนข้อ [21] โดยจะกระตุ้นผ่านการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเพิ่มจำนวนยอดรวมในหลอดทดลอง [14] โดย BA ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงอาจจะไปมีผลต่อการชักนำให้เกิดการสลายสารอาหารในระดับเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งเสริมให้เกิดการผลิตฮอร์โมนพืชบางชนิดที่ชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนพืช [22]

Table 2 Effects of BA concentration on shoot initiation and multiple shoot proliferation from *C. japonica* callus explants on MS media after 4 weeks of culture.

BA concentration (mg/l)	Percentage of shoot regeneration (mean ± S.E.)	Number of shoots/explant (mean ± S.E.)	Shoot length (cm) (mean ± S.E.)
0	0.00±0.00d	0.00±0.00c	0.00±0.00c
1	100.00±0.00a	9.35±0.942a	1.31±0.08a
3	66.66±8.75b	4.25±0.62b	0.73±0.08b
5	43.33±9.20c	1.47±0.35c	0.19±0.05c

Values within a column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$.

หลังจากย้ายเลี้ยงต้นอ่อนส้มจี๊ดอายุ 4 สัปดาห์ ที่ได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำรากในการทดลองต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเติม NAA ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยส่งเสริมให้เกิดรากจากชิ้นส่วนยอดได้ดีกว่าการทดลองชุดควบคุม (อาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA) (Table 3) NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาของรากจากชิ้นส่วนยอดได้ดี (Figure 1e) และในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.45 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงสุด (76.66%) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการทดลองอื่น ๆ และให้จำนวนรากต่อชิ้นส่วนพืชสูงสุด (4.43 รากต่อยอด) โดยรากที่เกิดขึ้นมีความยาวเฉลี่ย 3.47 เซนติเมตร และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ NAA ขึ้นเป็น 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดรากลดลงต่ำสุด (33.33%) และให้จำนวนรากต่อชิ้นส่วนยอดต่ำสุด (1.10 รากต่อยอด) โดยรากที่เกิดขึ้นมีความยาวเฉลี่ย 1.50 เซนติเมตร นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดราก และจำนวนรากต่อยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า การเติม NAA ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดในหลอดทดลอง ซึ่งสังเกตได้จากในการทดลองที่ไม่มีการเติม NAA จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากต่ำ ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า ออกซินกระตุ้นการเกิดรากแขนง โดยกระตุ้น quiescent pericycle cells เพื่อชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และขยายขนาดของเซลล์ทำให้เกิดการพัฒนาของรากแขนงด้านข้าง [23] และพบว่าพืชวงศ์ส้มหลายชนิดที่สามารถสร้างรากได้ดีภายในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซิน (NAA หรือ IBA) [18] โดย NAA เป็นออกซินที่ดีที่สุดในการชักนำให้เกิดรากในพืชวงศ์ส้ม [24] [25] [26]

Table 3 Effect of different concentrations of NAA on *in vitro* rhizogenesis of *C. japonica*

NAA concentration (mg/L)	Rooting (%) (mean ± S.E.)	Number of roots/ micro shoot (mean ± S.E.)	length of roots (cm.) (mean ± S.E.)
0	40.00±9.09b	1.50±0.15bc	2.50±0.30b
0.15	60.00±9.09ab	2.16±0.24bc	2.58±0.10b
0.30	56.66±9.20ab	2.64±0.37b	3.91±0.21a
0.45	76.66±7.85a	4.43±0.49a	3.47±0.13a
0.60	33.33±8.75b	1.10±0.10c	1.50±0.18c

Values within a column followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.05$

Figure 1 *In vitro* plant regeneration of *Citrus japonica* Thunb. (a) *In vitro* leaf explant of *C. japonica* in MS basal media. (b) Callus induction from leaf explant and emergence of shoot bud from callus. (c) Regenerated shoot was separated from callus. (d) Multiple shoot proliferation from regenerated shoot derived callus in MS medium supplemented with 1 mg/L BA (4 weeks). (e) Rooted plant. (f) Plants grown in soil pots that were regenerated from *in vitro* culture of leaf explants of *C. japonica*. Bar showing 1 cm. scale.

4. สรุป

จากการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของส้มจี๊ดในหลอดทดลองพบว่าชิ้นส่วนใบอ่อนสามารถพัฒนาสร้างแคลลัสได้ดีบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช BA ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ โดย BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากแคลลัสสูงสุด และสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมมากที่สุด โดยยอดที่เกิดขึ้นสามารถพัฒนาสร้างรากได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.45 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Davies, C. V., Gerard, L. M., Ferreyra, M. M., Schvab, M. D. C. and Solda, C. A. 2017. Bioactive compounds and antioxidant activity analysis during orange vinegar production. Food Sci. Technol. 37(3): 449-455.

[2] Hasan, M. N., Hasan, M. R., Foysal, S. H., Hoque, H., Khan, M. F., Bhuiyan, F. H. and Prodhan, S. H. 2019. *In-Vitro* regeneration of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from mature seed derived embryogenic callus on different solid basal media. Am. J. Plant Sci. 10: 285-297.

[3] Khan, Md. F., Hoque, H., Islam, Md. Q., Ashrafuzzaman, Md. and Prodhan, S. H. 2019. An efficient regeneration system for native orange (*Citrus reticulata*) through *in-vitro* culture technique. Int. J. Agric. Sci. 10: 975-984.

[4] ชาลินี ถังมณี. 2560. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต, ภูเก็ตหน้า.

[5] Collado, R., Bermúdez-Caraballoso, I., García, L. R., Veitía, N., Torres, D., Romero, C. and Angenon, G. 2016. Epicotyl sections as targets for plant regeneration and transient transformation of common bean using *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant. 52:500–511.

[6] Ebrahimzadegan, R. and Maroufi, A. 2022. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Dragon's Head plant (*Lallemantia iberica*). Sci Rep. 12: 1784.

[7] Nomani, M. and Tohidfar, M. 2021. Plant regeneration and transformation of *Trachyspermum ammi* using *Agrobacterium tumefaciens* and zygotic embryos. J Genet Eng Biotechnol. 19: 68.

[8] Ye, S., Cai, C., Ren, H., Wang, W., Xiang, M., Tang, X., Zhu, C., Yin, T., Zhang, L. and Zhu, O. 2017. An Efficient plant regeneration and transformation system of Ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) started from young shoot as explant. Front. Plant Sci. 8: 1296.

[9] Savita, Singh, B., Virk, G. S. and Nagpal, A. K. 2011. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of *Citrus jambhiri* Lush. Physiol Mol Biol Plants. 17(2): 161–169.

[10] Pandey, A. and Tamta, S. 2016. Efficient micropropagation of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from cotyledonary explants suitable for the development of commercial variety. Afr. J. Biotechnol. 15(34): 1806-1812.

[11] Khan, M. F., Hoque, H., Islam, M. Q., Ashrafuzzaman, M. and Prodhan, S. H. 2019. An efficient regeneration system for native orange (*Citrus reticulata*) through *in vitro* culture technique. Int. J. Agric. Sci. 10: 975-984.

[12] Gill, M., Singh, Z., Dhillon, B. S. and Gosal, S. S. 1994. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calli derived from seedling explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* Lour. × *Citrus deliciosa* Tenora). J. Hort. Sci. 69: 231–236.

[13] Gill, M. I. S, Singh, Z., Dhillon, B. S. and Gosal, S. S. 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Sci. Hort. 63: 167–174.

[14] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

[15] Waoo, A. A., Khare, S. and Ganguli, S. 2013. *In-vitro* propagation of datura innoxia from nodal and shoot tip explants. World J. Environ. Eng.: 1: 1-4.

[16] Twaij, B. M., Taha, A. J. and Hasan, M. N. 2019. *In vitro* callus induction and regeneration of medicinal plant datura innoxia. Am J Biochem Biotechnol. 15(3): 150-156.

[17] Mayerni, R., Satria, B., Wardhani, D. K. and Chan, S. R. O. S. 2020. Effect of auxin (2,4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 583.

[18] Carimi, F. and De Pasquale, F. 2003. Micropropagation of *citrus*. In SM Jain, K Ishii, eds, Micropropagation of woody Trees and Fruits, Kluwer, Netherlands, pp. 589-619.

[19] Germana, M. A., Micheli, M., Chiancone, B., Macaluso, L. and Standardi, A. 2011. Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of *Carrizo citrange* [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirius trifoliate* (L.) Raf]. Plant Cell Tissue Organ Cult. 106:299-307

[20] Ali, S. and Amirza, B. 2006. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. Acta Bot. Croat. 65(2): 137–146.

[21] Rathore, J. S., Rathore, M. S., Singh, M., Singh, R. P. and Shekhawat, N. S. 2007. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. Indian J. Biotechnol. 6: 239-244.

[22] Ahmed, M. R. and Anis, M. 2014. Changes in activity of antioxidant enzymes and photosynthetic machinery during acclimatization of micropropagated *Cassia alata* L. plantlets. In vitro cell Dev Biol-Plant. 50:601-609.

[23] Fukaki, H. and Tasaka, M. 2009. Hormone interactions during lateral root formation. Plant Mol. Biol. 69, 437–449.

[24] Hiramatsu, J. K., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N. and Doi, Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). Plant Cell Rep. 13:541–545.

[25] Paudyal, K. P. and Haq, N. 2000. *In vitro* propagation of pummelo (*Citrus grandis* L. osbeck). In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. 36: 511–516.

[26] Mukhtar, R., Khan, M. M., Rafiq, R., Shahid, A. and Khan, F. A. 2005. In vitro regeneration and somatic embryogenesis in (*Citrus aurantifolia* and *Citrus sinensis*). Int J Agric Biol .7: 414-416.