

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าธนบุรี



ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การสำรวจและศึกษาโรคไวรัสกุหลาบในตำบลตลาดจินดา อำเภอ สามพราน จังหวัด นครปฐม
Survey and Study of Rose Mosaic Disease in Talard Jinda , Sampran District,
Nakhonpatham Province.



โดย

นางสาววรางคณา เทพสำราญ
นางสาววันเพ็ญ ศิริลพ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ร.พ. อาจารย์ ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน
๑๒๑๘๓
๒๕๓๗

เสนอ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 99079
วัน,เดือน,ปี..... 1๖ JUN 2๐๐๓

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พุทธศักราช ๒๕๓๗

ชื่อเรื่อง : การสำรวจ และศึกษาโรคไวรัสกุหลาบใน ตำบลตลาดจินดา อำเภอสามพราน
จังหวัดนครปฐม
Survey and Study of Rose Mosaic Disease in Talard Jinda ,Sampran District,
Nakhonpathom Province

โดย : นางสาว วรางคณา เทพสำราญ
นางสาว วันเพ็ญ ศิริลพ

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา :ด.ช. ๕๕/๕๕
(ดร. นवलพรรณ งามยี่สุ่น)

บทคัดย่อ

การสำรวจความเสียหายของต้นกุหลาบเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในแปลงปลูก พื้นที่
บ้านเลขที่ 24/1 หมู่ 2 ต.ตลาดจินดา อ.สามพราน จ.นครปฐม พบว่า กุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสแตร์พีช
แสดงอาการต่างเหลือของลักษณะเป็นลายแผนที่ (mosaic+line pattern) และ จุดแผลวงแหวน (ringspot)
พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ แสดงอาการใบย่น บิดเบี้ยว และ เป็นปื้นสีเหลืองกระจาย (puckering /
distortion + chlorotic patches) และ พันธุ์คริสเตียน ดิออร์ แสดงอาการต่างเหลือของลักษณะเป็น
ลายแผนที่ (mosaic+line pattern) ความเสียหาย 61.54% 53.00% และ 31.62% ตามลำดับ
การตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี Gel double-diffusion test โดยใช้ antisera ดังนี้ คือ antisera
prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) tobacco mosaic virus (TMV) และ cucumber mosaic virus
(CMV) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสและอาการที่ปรากฏบนใบ พบว่าอาการที่เกิดจาก
การเข้าทำลายของไวรัสที่ปรากฏบนใบทุกอาการทำปฏิกิริยาเกิด precipitation lines กับ antisera
ทุกชนิด แสดงว่ากุหลาบที่เป็นโรคไวรัสเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อหลายชนิดร่วมกัน (mixed
infection) การศึกษาผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบ พบว่า
ต้นกุหลาบมีการเจริญเติบโตลดลง ต้นหลุดโรมอย่างรวดเร็ว การสร้างดอกแต่ละรุ่นมีจำนวนน้อย
น้ำหนักรดอก และจำนวนกลีบดอกลดลง

ABSTRACT

Title : Survey and Study of Rose Mosaic Disease in Talard Jinda , Sampran District,
Nakonpathom Province.

By : Warangkana Tepsumran

Wanphen Sirilop

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Department : Pest Management Technology

Advisor : *N. Ngamyeesoon*

(Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

25 / May / 1999

A survey of foliage rose mosaic damage was studied at 24/1 village No. 2, Talard Jinda, Sampran District, Nakhonpathom Province on three hybrid tea roses : ' White Masterpiece ' , ' Eiffle Tower ' and ' Christain Dior ' . The symptoms on infected ' White Masterpiece ' were mosaic , line pattern and ringspot , while ' Eiffle Tower ' expressed more puckering , distortion and chlorotic patches on leaves. Furthermore, infected ' Christain Dior ' produced mosaic and line patterns. The damage on infected leaves of these three cultivars was 61.54%, 53.00% and 31.62% respectively. The serological test of all symptom types against antisera of prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), tobacco mosaic virus (TMV) and cucumber mosaic virus (CMV) in gel double-diffusion test demonstrated strong relatively precipitation line with all three antisera. As a result of this, the mosaic disease on roses were mixed infection of at least three tested viruses. Moreover, the viruses also caused growth reduction dwarf and the decrease of flower numbers, weight and petal numbers at each generation.

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความอนุเคราะห์ และอุปการคุณ จากบุคคลหลาย ๆ ท่านที่ให้การสนับสนุนและคำปรึกษาแนะนำในทุก ๆ ด้านข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวถึงเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย ได้แก่

1. คุณพ่อ คุณแม่ที่ให้การสนับสนุน และช่วยเหลือทางด้านปัจจัยต่าง ๆ พร้อมกับให้กำลังใจเสมอมา
2. อาจารย์ ดร. นวลพรรณ งามยี่สุน ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่เคารพ ได้ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ได้สำเร็จอย่างสมบูรณ์
3. คุณ ธีรศักดิ์ อิมประสิทธิ์ชัย เจ้าของแปลงกุหลาบที่เอื้อเพื่อสถานที่ ตัวอย่างโรค และข้อมูลเป็นอย่างดี
4. เจ้าหน้าที่หน่วยป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ 1 นครปฐม ที่ให้ข้อมูลสถานที่ปลูกกุหลาบ
5. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้
6. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ antisera ของ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) tobacco mosaic virus (TMV) cucumber mosaic virus (CMV)
7. เพื่อน ๆ ที่ให้ทั้งความช่วยเหลือและ กำลังใจในการทำปัญหาพิเศษให้สำเร็จได้ด้วยดี

วรางคณา เทพสำราญ

วันเพ็ญ ศิริลพ

สารบัญ

เนื้อเรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข) - (ค)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลอง	16
สรุปผลการทดลอง	35
วิจารณ์ผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	40

(ก)

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงผลการสำรวจความเสียหายของกุหลาบที่เกิดจากเชื้อไวรัส	19
2. แสดงรายชื่อพืชอาศัยที่นำมาปลูกเชื้อไวรัสกุหลาบ	27
3. แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง antiserum ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) tobacco mosaic virus (TMV) และ prunus necrotic ringspot (PNRSV) จากน้ำคั้นของใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และ คริสเตียน ดิออร์	34

ตารางผนวกที่

1. การเจริญเติบโตของกุหลาบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายจำนวน 10 กระถาง	45
--	----

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. สภาพพื้นที่แปลงปลูกกุหลาบของคุณ วีรศักดิ์ อิมประสิทธิ์ชัย	20
2. ลักษณะอาการแคระแกรนของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	21
3. แสดงอาการแผลวงแหวน และ ต่างลายแผนที่ของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	22
4. แสดงอาการต่างลายแผนที่ บนใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	22
5. แสดงอาการต่างเหลืองและ จุดเหลืองเป็นปื้นบนใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	23
6. แสดงอาการใบแคระแกรนของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	23
7. แสดงอาการใบจุดสีเหลือง และ แผลจุดแห้งของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	24
8. แสดงลักษณะก้านดอกสั้นของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	24
9. แสดงอาการ ต่างเหลืองลายแผนที่ และใบย่นบิดเบี้ยว บนกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์	25
10. แสดงอาการต่างเป็นร่างแห บนกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์	25
11. แสดงอาการ ลักษณะใบย่นบิดเบี้ยว และเหลืองปื้น บนใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์	26
12. แสดงอาการ ลักษณะต่างลายแผนที่ ของกุหลาบพันธุ์คริสเตียน ดืออร์	26
13. แสดงอาการ เหลืองเป็นปื้น และ บิดเบี้ยวของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา	28
14. แสดงอาการใบจุด บนใบอ่อน ของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา	29
15. แสดงอาการต่างที่กลีบเลี้ยง และก้านดอก ของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา	29
16. แสดงอาการต่างบริเวณกลีบดอก ของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา	30
17. แสดงการเกิดปฏิกิริยา Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	31

(ค)

ภาพที่	หน้า
18. แสดงการเกิดปฏิกิริยา Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum ของเชื้อ tobacco mosaic virus กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	31
19. แสดงการเกิดปฏิกิริยา Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum ของเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช	32
20. แสดงการเกิดปฏิกิริยา Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และ คริสเตียน ดิออร์	32
21. แสดงการเกิดปฏิกิริยา Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum ของเชื้อ tobacco mosaic virus (TMV) กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และ คริสเตียน ดิออร์	33
22. แสดงการเกิดปฏิกิริยา Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum ของเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และ คริสเตียน ดิออร์	33

คำนำ

กุหลาบ (*Rosa hybrida*) เป็นไม้ดอกประเภทไม้พุ่มผลัดใบ ส่วนมากมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียแทบทั้งสิ้น อาทิเช่น *Rosa chinensis* มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน (สมเพียร ,2528) กุหลาบนับเป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม ที่มีการซื้อขายเป็นอันดับหนึ่งมาตลอด ประเทศที่ผลิตกุหลาบเพื่อตัดดอกที่สำคัญคือ เนเธอร์แลนด์ (ธัญญา ,2534) ประโยชน์ของกุหลาบมีมากมาย ได้แก่ ปลูกเป็น ground cover หรือพืชคลุมดิน ปลูกเป็นไม้กระถาง ใช้ประดับตามตัวอาคาร ปลูกเป็นแนวรั้วเพื่อป้องกันเสียงและเพื่อความสวยงาม ปลูกประดับแปลง ตกแต่งสถานที่ ปลูกเป็นไม้ตัดดอก และใช้สกัดทำน้ำหอม สำหรับสกุลที่มีกลิ่นหอมค่อนข้างรุนแรง (สืบศักดิ์,2533)

การปลูกกุหลาบเป็นการค้าในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกที่สำคัญอยู่ในจังหวัดต่างๆเช่น จังหวัด นครปฐม บริเวณชานเมืองรอบกรุงเทพฯ จังหวัด นนทบุรี จังหวัด เชียงใหม่ จังหวัด เชียงราย และ จังหวัด สงขลา (เกียรติเกษตร,2532) ปัญหาที่พบบ่อยในการปลูกกุหลาบนอกจากแมลงศัตรูทำลายคือ ปัญหาที่เกิดจากโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคใบจุด โรคราแป้ง โรคหนามดำ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคไวรัส และ โรคไส้เดือนฝอย (กรมวิชาการเกษตร, 2534) โรคที่สร้างปัญหาและไม่สามารถใช้สารเคมี ในการป้องกันกำจัดได้คือ โรคไวรัส กุหลาบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายปรากฏอาการแตกต่างกันดังนี้ อาการปรากฏบนใบ เช่น อาการ chlorotic line-pattern ,อาการ vein-banding (Thomas ,1981) ,อาการ vein-clearing และ อาการ leaf curl (Slack และคณะ,1976) ,อาการ chlorotic patches (Secor and Nyland ,1978) อาการปรากฏที่ตาและลำต้น เช่น อาการballing หรือ อาการ rosetted growth (Slack et al.,1976), อาการ dwarf (Smith ,1972) และอาการบนกลีบดอก เช่น อาการ dark pink color break rings (Secor and Nylan,1978) เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของอาการดังกล่าวข้างต้นนี้ ได้แก่ เชื้อ apple mosaic virus (ApMV) และ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) (Thomas ,1984) ผลจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสทำให้การเจริญเติบโตของต้นกุหลาบ ใบ และดอกผิดปกติต้นเจริญเติบโตช้า ทрудโทรมและแคระแกรน ดอกกุหลาบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายไม่สามารถนำมาขายได้ หรือ อาจขายในราคาต่ำ แม้ว่าปัจจุบันการระบาดทำลายของโรคไวรัสยังไม่รุนแรงมากจนมีผลกระทบต่อการค้าก็ตาม แต่หากไม่มีการดูแลป้องกันการเข้าทำลายและการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเป็นอย่างดี อาจมีผลทำให้เชื้อไวรัสแพร่ระบาด จนไม่สามารถที่จะป้องกันกำจัดได้ในอนาคต และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจการค้าไม้ตัดดอกทั้งในประเทศและต่างประเทศได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจความเสียหายของต้นกุหลาบเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสและอาการที่ปรากฏบนใบกุหลาบโดยวิธีทาง

เซรัมวิทยา

3. เพื่อศึกษาผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบ

การตรวจเอกสาร

Fulton (1952) กล่าวถึง Rose Mosaic Virus ซึ่งสันนิษฐานว่า คุณสมบัติของไวรัสหรือน้ำคั้นพืช มีข้อจำกัดในการถ่ายทอดเชื้อ Bawden และ Kleczkowski พบว่า tannin ในน้ำคั้นของใบสตรอเบอร์รี่ตกตะกอน กับโปรตีนพืช ดังเช่น tannin ที่อยู่ในน้ำคั้นจะยับยั้งเชื้อ tobacco mosaic virus และ tobacco necrosis virus การถ่ายทอดเชื้ออาจจะถูกปกป้องด้วยคุณสมบัติของตัวเชื้อไวรัสในน้ำคั้นเอง วิธีการหลีกเลี่ยงอันตรายของน้ำคั้นในพืชทำได้โดยการถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังพืชอาศัยชนิดอื่น เช่น necrotic ringspot virus ถ่ายทอดจาก sour cherry ไปยังแตงกวาได้ พบว่า เชื้อไวรัสในน้ำคั้นแตงกวา สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัส ไปยังแตงกวาดังปกติได้อย่างรวดเร็ว การติดเชื้อไวรัสของกุหลาบ *Rosa setigera* Michx. แสดงอาการที่ใบดังนี้ เช่น อาการจุดสีเหลืองวงแหวน (chlorotic ringspot) และอาการ oak leaf pattern อาการบนใบพืชที่ปรากฏคล้ายคลึงกันพอจะสรุปได้ว่า rose mosaic มีเชื้อไวรัส 2-3 ตัวที่บ่งบอกว่าแตกต่างกัน ความแตกต่างอยู่ที่ระดับความรุนแรงของอาการ การปลูกเชื้อ rose mosaic virus บนต้นแตงกวาพบว่า ต้นแตงกวาเกิดจุดสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบเลี้ยงที่ปลูกเชื้อ โดยจุดจะขยายใหญ่ขึ้นเป็นสีน้ำตาล (necrotic) และภายใน 3 สัปดาห์ ส่วนบนตัวมีกยาว อาการเริ่มแรกเป็นแผลเฉพาะที่มีลักษณะ เป็นวงแหวนสีเหลือง (chlorotic ringspot) อาการของโรคจะพัฒนาไปเรื่อย ๆ จากเหลืองจะเขียว ร่วงและตายในที่สุด พืชอาศัยของเชื้อ rose mosaic virus ได้แก่ Rosaceae เช่น *Fragaria vesca* L., *Fragaria* sp., *Rosa setigera* Michx., *Rosa multiflora* etc. Apocynaceae เช่น *Nerium oleander* L., *Vinca rosea* L. etc. Cucurbitaceae เช่น *Cucumis sativus* L. etc. Solanaceae เช่น *Nicotina benthamiana* etc. Convolvulaceae เช่น *Convolvulus tricolor* L. etc. Compositae เช่น *Cynara cardunculus* L. etc. Leguminosae เช่น *Cynmopsis tetragonolobus* etc.

Fulton (1970) รายงานว่า การถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีการปลูกเชื้อโดยนำใบกุหลาบ *Rosa setigera* ที่อาการผิดปกติคือ แผลสีเหลือง (chlorotic) เส้นใบสีเหลือง (vein chlorosis) และใบบิดรูป (twisting) ไปปลูกเชื้อบนต้นแตงกวา และพืชอาศัยอื่น ส่วนมากใช้ใบอ่อนในการปลูกเชื้อ พืชอาศัยของเชื้อ tobacco streak virus มีมากมายเช่น แตงกวา กุหลาบ บานไม่รู้โรย ถั่วเหลือง ยาสูบ เป็นต้น กุหลาบ (*Rosa setigera*) เมื่อมีอาการติดเชื้อจะเกิดความผิดปกติ ทำให้ใบมีสีเหลืองบริเวณเส้นใบ โคนเป็นเกลียว และมีอาการแคะแกระร่วมด้วย ซึ่งต่างจากการติดเชื้อของ prunus necrotic ringspot virus หรือ rose mosaic virus ซึ่งมีอาการ เส้นสีเหลือง (chlorotic line) หรือ แถบเหลือง (band) เชื้อไวรัสชนิดนั้นนอกจากถ่ายทอดทางน้ำคั้นแล้วยังถ่ายทอดโดยการทาบกิ่งอีกด้วย

McDaniel และคณะ (1971) รายงานเกี่ยวกับ ไวรัสใบจุดวงแหวนยาสูบ (tobacco ringspot virus : TRSV) ไว้ว่า เมื่อนำกลีบดอกและใบของกุหลาบที่มีอาการต่างลายแผนที่ (line-pattern

mosaic) มาแยกเชื้อ ในการแยกเชื้อ TRSV บนยาสูบพันธุ์ Turkish เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส สำหรับศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ความร้อนที่เชื้อหมดสภาพการเป็นเชื้อก่อโรค (TIP) อยู่ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ส่วนจุดที่เชื้อไวรัสในน้ำคั้นเจือจางที่สุด ที่ยังสามารถทวีจำนวนได้ในพีชอาศัย (DEP) คือ ระหว่าง 1: 10,000 และ 1: 50,000 อายุของเชื้อไวรัสในหลอดเก็บที่อุณหภูมิห้องที่ยังก่อโรคได้ คือ 25 องศาเซลเซียส ก่อน 72 ชั่วโมง

Smith (1972) กล่าวถึง prunus necrotic ringspot virus หรือชื่ออื่นได้แก่ cherry(sour) necrotic ringspot virus , necrotic ringspot virus ,peach ringspot virus ,prunus ringspot virus ,ohreey ring spot virus และ ohreey tatter-leaf virus สามารถถ่ายทอดเชื้อโดยการทาบกิ่งและ ผ่านทางน้ำคั้นพืชที่เป็นโรค คุณสมบัติของน้ำคั้น อุณหภูมิความร้อนที่เชื้อหมดสภาพการเป็นเชื้อก่อโรค (TIP) 50-55 องศาเซลเซียส และจุดที่ไวรัสในน้ำคั้นพืชเจือจางที่สุด ที่ยังสามารถทวีจำนวนได้ในพีชอาศัย (DEP) คือ 1:50 - 1:100 โครงสร้างอนุภาคไวรัส PNRV มีขนาดใกล้เคียงกับ prune dwarf virus เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 28-29 นาโนเมตร PNRV เป็นสาเหตุของโรคบนพืชหลายชนิด เช่น *Prunus persica* ต้นท้อ อาการรุนแรงแตกต่างกัน ตามชนิดของต้นท้อ อาการที่พบคือ วงแหวนไม้ชัดเจน จำนวนวงแหวนจะเพิ่มขึ้น ส่วนของตายอดตาย จนกระทั่งตายทั้งต้น *Prunus amygdalus* (Almond) *Prunus armeniaca* (Apricot) ลายพันธุ์ส่วนใหญ่ของไวรัสทำให้เกิดอาการใบจุดวงแหวน (ring spot) หรือ จุดสีเหลือง (chlorotic) และอาการ oak -leaf *Prunus domestica* (Plam) อาการไม่รุนแรง มีลักษณะเป็นวงแหวน และ ลายแผนที่สีเหลือง (chlorotic pattern) *Prunus oerasus* (Sour cherry). *Prunus avium* (Sweet cherry). ปรากฏอาการจุดวงแหวน เป็นที่รู้จักกว้างขวาง ในสวนผลไม้ sweet และ sour cherries ที่ผลิตเพื่อการค้า อาการที่สังเกตได้บน sweet cherries ในสวนผลไม้ นี้ คือ ลายแผนที่วงแหวนสีเหลือง (chlorotic ring pattern) ชนิดของ Prunus วงศ์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช Rosaceae เช่น *Rosa* spp. ปรากฏอาการ rose yellow mosaic ถ่ายทอดโดยการทาบกิ่งจาก sweet และ sour cherry ไปที่กุหลาบทำให้เกิดการติดเชื้อ necrotic ringspot ก่อให้เกิดอาการต่างเหลือง (yellow mosaic) ไวรัสชนิดนี้เป็นตัวหนึ่งของ rose mosaic complex พีชอาศัยของ PNRV ได้แก่ ท้อ (peach) พลัม (plam) เชอร์รี่ (cherry) ทั้งชนิด sweet และ sour อัลมอนด์ (almond) และ apricot ส่วนกุหลาบ apple hop และไม้เนื้ออ่อน เช่น แตงกวา แตงโม ยาสูบ *Chenopodium* spp. squash petunia และ *Tithonia speciosa*

cucumber mosaic virus หรือชื่ออื่น ๆ คือ cucumber yellow mosaic virus , cucumber yellow mottle virus และ tomato fern-leaf virus การถ่ายทอดโรค เชื้อสามารถถ่ายทอดได้อย่างง่ายโดยวิธีกล มีผู้กล่าวว่าเชื้อไวรัสนี้ถ่ายทอดทางแมลงศัตรูแตงกวาป่า แต่ไม่ถ่ายทอดผ่านทางแมลงศัตรูแตงกวาที่เพาะปลูกปกติ โดยใช้มือปลูกจัดเป็น seed born ในแปลงเพาะปลูกแตงกวาและ การใช้แมลง

พันธุ์ที่สะอาดเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมโรค ไวรัสนี้พบในเมล็ดของแตงหอม นอกจากนี้พบว่า ชนิดของเพลี้ยอ่อนเป็นตัวกำหนดโรค CMV โดยเพลี้ยอ่อนที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ *Myzus persicae* ,*M. pseudosolani* ,*M. circumflexus* เป็นต้น คุณสมบัติของไวรัสในน้ำคั้นพืช TIP อยู่ระหว่าง 60-70 องศาเซลเซียส ,DEP 1:10,000 , LIV (อายุของเชื้อในหลอด เก็บในอุณหภูมิห้องที่ยังก่อโรคได้) ระหว่าง 72-96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -ไวรัสถูกทำลายโดยการทำให้แห้ง ด้านเศรษฐวิทยา antisera ได้จากการฉีดเข้าเส้นเลือด หรือกลัมน้ำอกระต่าย ด้วย CMV strain Y ที่บริสุทธิ์ antiserum titre 1:1024 อนุภาคไวรัส โครงสร้างอนุภาค มีเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 28-30 นาโนเมตร strain Y ของ CMV ประกอบด้วย phosphorus 1.8% และ nitrogen 16.4% อัตราส่วนของเบส คือ adenine 24.3% cytosine 23.4% และ uracil 29.0% RNA 18.5%

ตัวอย่างของพืชอาศัยที่ถูกเชื้อCMV เข้าทำลาย

1. RANUNCULACEAE. Delphinium. พืชชนิดนี้อ่อนแอต่อโรคมาก และพบ บ่อย ในสวนประเทศอังกฤษ อาการของพืชที่เป็นโรค คือ จุดสีเหลือง (chlorotic) ชีตบริเวณเส้นใบ บางครั้งพบอาการด่างเขียว (green mosaic mottle)

2. CHENOPODIACEAE : *Spinacia oleracea*. Spinach. Mc Clintock และ Smith แบ่งขั้นตอนการเกิดโรคบน *Chenopodium* ไว้ 8 ขั้น ดังนี้

- 1.) มีสีเหลืองจางมาก บนใบอ่อน ของพืชที่ติดเชื้อมากกว่าใบแก่
- 2.) ใบที่อ่อนกว่ายังคงเป็นสีเหลือง
- 3.) ใบอ่อนจะกลายเป็นอาการด่าง (mottle) รอยย่น และบางครั้ง พบอาการแคะแกระน
- 4.) อาการแคะแกระนจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช ใบอาจผิดปกติ
- 5.) มีสีน้ำตาล และตายบางส่วนของใบแก่ เริ่มจากปลายยอดเข้ามา
- 6.) อาการสีน้ำตาลกระจายทั่วทั้งหมดของใบ
- 7.) ใบอ่อนที่แตกใหม่มีสีน้ำตาล
- 8.) พืชจะตาย ซึ่งมีวงเล็ก ๆ เพิ่มขึ้นมากตรงบริเวณกลางใบ

3. CUCURBITACEAE : *Cucumis sativus* อาการเริ่มแรกปรากฏที่ใบอ่อน ซึ่งพัฒนาเป็นบริเวณ green-yellow ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1-2 มิลลิเมตร เป็นวงแต่ถูกจำกัดอยู่ในเส้นใบ จุดจะโปร่งแสง อาการเฉพาะคือด่างเหลือง (yellow mottle) บนใบทั้งหมด ใบถูกทำลายและแคะแกระน ใบมีวงลงข้างล่าง ผิวใบย่น ลำต้น ช้อจะสั้น ใบขนาดครึ่งหนึ่งของใบปกติ

4. SOLANACEAE. : *Nicotiana tabacum*อาการจะปรากฏจุดวงกลมสีเขียบบนใบที่ปลูกเชื้อ 2-3 วัน หลังจากปลูกเชื้อแต่แผลจุดแห้ง (necrotic)จะไม่เฉพาะ การติดเชื้อ systemic ครั้งแรกแสดงให้เห็น

เส้นใบขีด และต่างทั่ว ๆ ไป มีบางครั้งใบผอมลง : *Lycopersicon esculentum* tomato เป็น CMV ที่อยู่ในมะเขือเทศ เรียก โรคใบเฟริน เชื้อไม่เข้าทำลายเดียว ๆ มีเชื้ออื่น เข้าทำลาย TMV และ strain อื่น ลักษณะอาการเริ่มแรก เกิดหลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน ใบอ่อนม้วนเป็นเกลียว ม้วนลงล่างหรือขึ้น บน อาการต่างเหลือง (chlorosis) พบบนใบแก่

5.COMPOSITAE : *Zinnia elegans* Jacq. เกิดอาการต่างแพร่กระจายทั่วต้น ถ้าอาการรุนแรง สีของดอกจะผิดปกติ กลีบดอกแข็ง ก้านดอกสั้น จำนวนดอกน้อยลงกว่าปกติ

6.LEGUMINOSAE : *Vigna sinensis* Endl. Cowpea โรคต่างของถั่วฝักยาว สามารถถ่ายทอด โดยแมลงปากกัด ในกรณีของเชื้อ CMV ปัจจุบันไวรัสชนิดนี้แพร่ระบาดโดยเพลี้ยอ่อน 3 ชนิด คือ *Macrosiphum gaei*, *M. pisi* และ *Aphis gossypii* สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด อาการเริ่มแรก เริ่มต่างที่ใบ ส่วนมากเกิดอาการเส้นใบขีดเหลือง (vein-clearing) เห็นชัดเจน จากนั้นจะมีอาการต่าง เขียวเข้มชัดเจน บางครั้งพบอาการใบหงิก หรือย่นร่วมด้วย ใบอ่อนที่เพิ่งงอกก็จะบิดเบี้ยวโค้งงอ ใบที่เป็นโรคจะสั้นกว่าใบที่ปกติ

Slack และคณะ (1976) รายงานถึงต้นกุหลาบที่เป็นโรค rose spring dwarf (RSD) ซึ่ง แสดงอาการ balled หรือ rosetted growth ในช่วงฤดูใบไม้ผลิ ใบอ่อนที่เริ่มผลิจากตาจะมีขนาดเล็ก กว่าปกติ ใบโค้งงอ และปรากฏเป็นร่างแหซึ่งขยายกว้างเป็น vein-clearing ในระยะต่อมา ยอดอ่อนที่เข้าสู่ระยะยืดตัว (elongation) อาการดังกล่าวจะปรากฏลดลง และเมื่อมีการเจริญเติบโต มากขึ้น อาการจะไม่ค่อยปรากฏให้เห็น ลักษณะอาการพื้นฐานโดยทั่วไปของโรค RSD คือ กุหลาบจะแสดงอาการใบโค้งงออย่างเห็นได้ชัด เช่นกุหลาบพันธุ์ 'Burr' multiflora และ 'Dr. Huey' rootstocks จากการนำตาปกติของกุหลาบ 'Queen Elizabeth' และ 'Gold Cup' มาติดตามบนต้นตอกุหลาบ 'Dr. Huey' ที่มีการติดเชื้อไวรัสโรคRSDผลปรากฏว่าต้นกุหลาบส่วนใหญ่ มีการพัฒนาอาการของโรค RSD

Secor และ Nyland (1978) กล่าวถึง ชื่อของ rose ring pattern (RRP) ว่ามีอาการคล้ายกับ rose mosaic ซึ่งมีการบรรยายไว้ อาการที่พบ เป็นรูปวงแหวน ลายแผนที่ (line pattern) และอาการต่างเหลือง (chlorotic flecking) ของใบ และ color break rings ในกลีบ *Rosa multiflora* หรือ *Burr multiflora* เป็นพืชอาศัยใช้ตรวจสอบเชื้อ RRP อาการเกิดที่ราก รุนแรงทำให้แคระแกรน และเกิดความผิดปกติซึ่ง ปรากฏอาการต่างบนใบอ่อน การติดเชื้อส่วนมาก เกิดที่รากเป็นหลัก แต่ไม่ปรากฏอาการ การปลูกเชื้อโดยทาบกิ่งของ Shiro-tugen cherry พบว่าไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด แผลจุดแห้ง (necrotic) ความพยายามที่จะทำให้ไม้เนื้ออ่อนและไม้อื่น ๆ ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่ประสบ ผลสำเร็จ จากการสังเกตไม่พบว่าแพร่ระบาดในธรรมชาติ หลังจากตายอดที่มีเชื้อRRP แพร่ระบาด พบว่าที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์หรือมากกว่า จะอิสระจากการติดเชื้อ rose ring pattern มีลักษณะที่แตกต่างจากไวรัส ของกุหลาบชนิดอื่น ๆ แต่สารมีผลต่อกันซึ่ง ถ่ายทอด

อย่างรวดเร็ว โดย การทานกึ่ง

Thomas (1984) ได้ศึกษาลักษณะอาการของกุหลาบที่เกิดจาก single isolates จากต้นที่เป็น cherry serotype ของ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) และ an apple serotype (apple mosaic virus ; ApMV) ต่างกัน การตรวจสอบโดย immunospecific electron เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสแต่ละชนิด ที่เข้าทำลายกุหลาบ พบว่า ลักษณะอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดปรากฏ แยกจากกัน การทำ cross-protection ระหว่าง two isolates ให้ผลลัพธ์ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งการเกิด mixed infection เกิดจากการ graft-inoculated ด้วยเชื้อ ApMV และ PNRSV สู่ต้นกุหลาบพร้อม ๆ กัน หรือ เกิดจากเชื้อ ApMV เข้าทำลายซ้ำลงบนต้นกุหลาบ ซึ่งมีเชื้อ PNRSV เข้าทำลายอยู่ก่อนแล้ว

Robert และ Milbrath (1962) อธิบายว่า antiserum ที่เตรียมจาก tomato ringspot virus ทำปฏิกิริยากับ rose mosaic virus ที่เป็น isolate ของFulton และ ทำปฏิกิริยากับ tomato ringspot virus และ three Oregon rose mosaic virus isolates จากการทดสอบทำให้ทราบว่า อาการของโรคใบด่างกุหลาบนี้มีสาเหตุมาจาก strains of tomato ringspot virus

Fulton (1967) ศึกษาลักษณะทางเซรัมวิทยาของ rose mosaic virus (RMV) ซึ่งถูกทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงรอบสูงและต่ำ จากน้ำคั้นของแตงกวาไวรัส RMV มีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 นาโนเมตร การทำ Electrophoretic พบว่ามีการแยกเป็น 3 ชั้น ระหว่างการหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบสูง ชั้นที่อยู่บนสุดไม่เกิดการติดเชื้อ คุณสมบัติของไวรัส ที่แยกได้แต่ละชั้นจะแตกต่างกันออกไป rose mosaic virus ไม่มีความสัมพันธ์ทาง เซรัมวิทยาต่อ tomato ringspot virus และมีเพียงคุณสมบัติของ กับantigen ของ cherry necrotic virus

ในการตรวจสอบทางเซรัมวิทยา โดยการนำ antiserum ของ tobacco streak virus มาทดสอบวิธี agar double diffusion กับ tobacco streak virus ที่แยกจากยาสูบ และกุหลาบ พบว่า เกิดปฏิกิริยาซึ่งกันและกัน สังเกตได้จากตะกอน (Fulton, 1970)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางเซรัมวิทยาทำให้ยืนยันได้ว่าอาการของ rose line-pattern mosaic virus และ rose mosaic virus ไม่สามารถจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่ม rose mosaic virus หรือ cherry necrotic ringspot virus หรือ tomato ringspot virus ได้เนื่องจากไม่มีความสัมพันธ์กันทาง เซรัมวิทยาโดยการทดลองด้วยวิธี agar double diffusion (McDanile และ คณะ, 1971)

การควบคุมโรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อ rose ring pattern ให้เป็นผลสำเร็จสามารถทำได้โดย การใช้ฟอนพันธุ์ที่สะอาดปราศจากเชื้อในการแพร่ขยายพันธุ์ ต่อ ๆ ไป (Secor และ Nyland , 1978)

กรมส่งเสริมการเกษตร (2531) ได้รายงานการคัดเลือกต้นตอที่เหมาะสมกับสภาพดิน ฟ้า อากาศในแต่ละท้องถิ่น ต้นตอที่นิยมใช้ส่วนมากเป็นกุหลาบป่า (wild species) หรือกุหลาบเลื้อย

บางพันธุ์ ซึ่งเป็นต้นตอที่มีระบบรากที่แข็งแรง ทนร้อน มีอายุอยู่ได้นาน ด้านทานต่อโรค พันธุ์กุหลาบป่าที่นำมาใช้เป็นต้นตอ ได้แก่ *Rosa multiflora* ,*Rosa indica* หรือ *R. chinensis* ,Dr Huey, *Rosa canina* และ *Rosa bourboniana*

สุรกี (2538) ได้รายงานว่ โรคใบต่างของกุหลาบสามารถเกิดได้กับกุหลาบทุกพันธุ์ แม้แต่พันธุ์ป่า แต่จะแสดงอาการรุนแรงที่แตกต่างกัน ความเสียหายจะเกิดกับพันธุ์ที่อ่อนแอต่อไวรัส เช่น พันธุ์แยงกี้ แอง เจลเพชร เป็นต้น ซึ่งมีอาการของโรครุนแรงโดยต้นแคระแกรน ใบต่างชัดเจน เป็นทั้งแบบวงแหวน และมีเส้นหรือแถบเหลือง และบิดเบี้ยวผิดปกติรูปร่าง กลีบดอกแห้งไม่สมบูรณ์ ถ้าดอกสีเข้มจะมีลักษณะดอกต่าง ใบกุหลาบพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรค จะมีอาการต่างไม่ชัดเจน จะเห็นอาการต่างชัดเจนในช่วงใบอ่อน เท่านั้น เช่นพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีชการใช้กุหลาบพันธุ์ป่า นำมาเป็นต้นตอซึ่งมีความต้านทานต่อโรค แต่มักจะมีเชื้อไวรัสแฝงอยู่ เมื่อนำกุหลาบพันธุ์มาติดตาหรือ ทาบกิ่งบนต้นตอที่เป็นโรคไวรัสจึงเป็นการขยายโรคไปยังกิ่งพันธุ์ และอาการต่างของโรคไวรัสบนตอ ป่ามักมีอาการไม่ชัดเจนยากแก่การสังเกตแต่จะแสดงอาการชัดเจนบนกุหลาบพันธุ์ที่อ่อนแอ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสำรวจแปลงกุหลาบ

สมุดบันทึกพร้อมปากกา

ถุงพลาสติก ขนาด 8x10 นิ้ว

กรรไกรตัดแต่งกิ่ง

กระดิกใส่น้ำแข็ง

กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ Gel double-diffusion test

beaker 25, 50, 250 และ 500 มิลลิลิตร

โกร่ง

flask 25, 50, และ 250 มิลลิลิตร

แท่งแก้ว

cylinder 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร

ลูกยาง

test tube ขนาดเล็ก

กระดาษทิชชู

paster pipette

กระดาษกรอง

cock borror

กล่องพลาสติก ขนาด 7x10 นิ้ว

centrifuge

petri dishes

ใบกุหลาบ ที่เป็นโรคไวรัสพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช

พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และพันธุ์คริสเตียน ดิออร์

3. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการศึกษามลกระทบของการทำลายของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบ

ต้นกุหลาบที่เป็นโรคไวรัส

สมุดบันทึกพร้อมปากกา

ไม้บรรทัด

ถุงพลาสติก ขนาด 5x7 นิ้ว

เครื่องชั่งน้ำหนัก

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสกุหลาบ

เมล็ดพันธุ์ ได้แก่ เมล็ดพันธุ์แดงกวา : แดงกวาพันธุ์ผลเล็ก แดงกวาพันธุ์ผลสม แดงกวา

ของศวส. พิจิตร แดงกวาพันธุ์เบา Hokus Gurken แดงร้าน(เจียไต๋)

แดงร้าน(ราชบุรี)

เมล็ดพันธุ์ถั่ว : ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ถั่วดำ ถั่วฝักยาว

ต้น *Chenopodium quinoa* , *C. amaranticolor* และ ต้นยาสูบ

ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 8x16 เซนติเมตร

ดินผสม

โกร่ง

บีเปต ขนาด 10 ml.

กระดาษหนังสือพิมพ์

น้ำแข็ง

ถาด

ใบกุนลาบที่เป็นโรคไวรัส พันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีซ พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และ พันธุ์คริสเตียน ดือออร์

5. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ Gel double-diffusion test

อาหารรูน

Sodiumchloride (NaCl) 0.9% และ 1.8%

Sodiumazine (NaN₃)

Chloroform

Fomvar

Antisera ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร

prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)

tobacco mosaic virus (TMV)

cucumber mosaic virus (CMV)

6. สารเคมีที่ใช้ในการปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสกุนลาบ

Buffer (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ pH 7.0-7.5

Polyvinylpyrrolidone (PVP) 10% ใน Phosphate buffer (ดูส่วนประกอบในภาคผนวก)

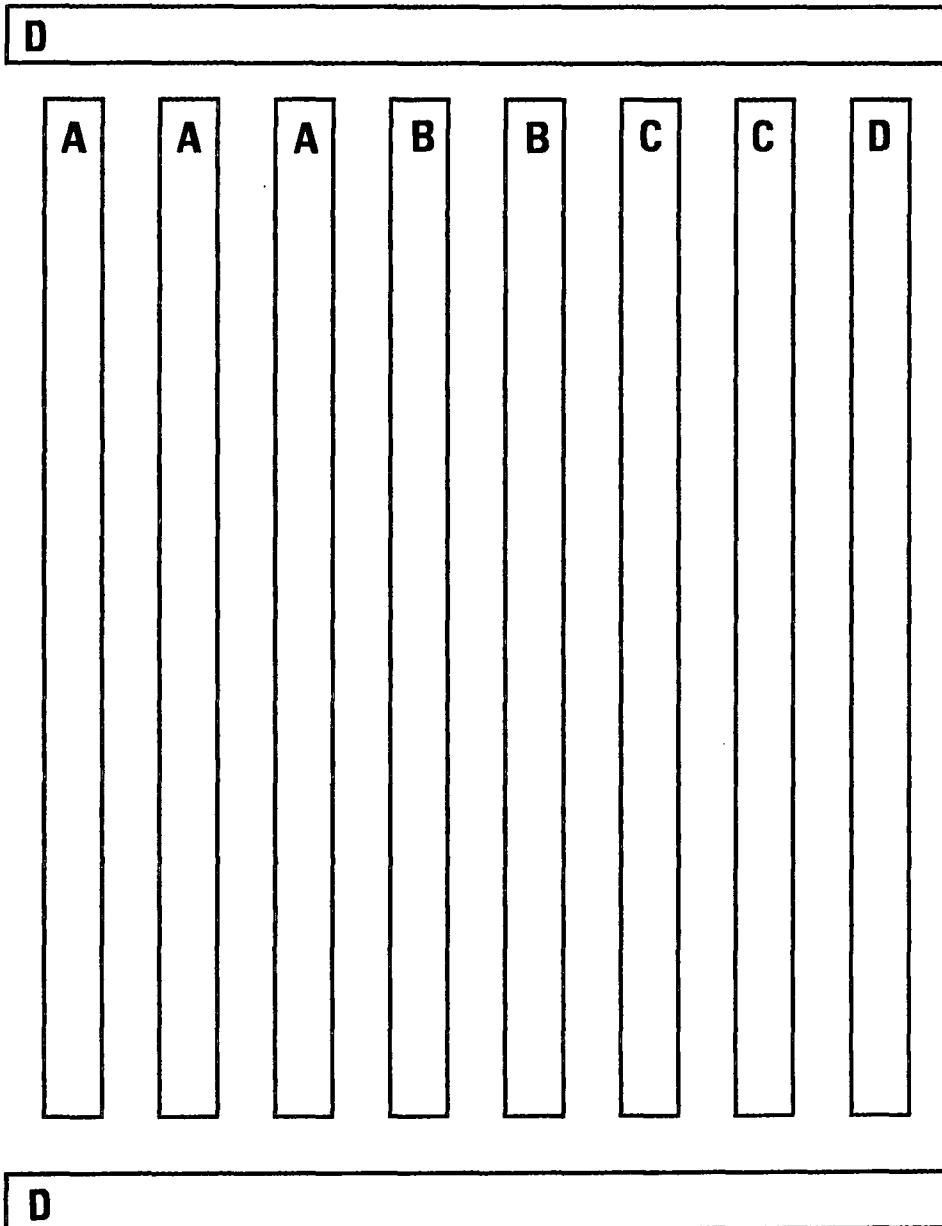
Celite 545

วิธีการทดลอง

1. การสำรวจความเสียหายของกุหลาบเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

การสำรวจกุหลาบจากแปลงกุหลาบที่ปลูกในแถบพื้นที่ ตำบล ตลาดจินดา อำเภอ สามพราน จังหวัด นครปฐม พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกกุหลาบเพื่อตัดดอกขายเป็นการค้า และมีการผลิตขยายพันธุ์เพื่อจำหน่าย และพบปัญหาโรคไวรัสระบาดแต่ไม่ทำความเสียหายมากนัก ต่อผลผลิต การสำรวจได้ทำการสุ่มตัวอย่างแปลงปลูกกุหลาบของเกษตรกรรายหนึ่ง ชื่อ นายธีรศักดิ์ อิ่มประสิทธิ์ชัย บ้านเลขที่ 24/1 หมู่ 2 ตำบล ตลาดจินดา อำเภอ สามพราน จังหวัด นครปฐม มีเนื้อที่ปลูกกุหลาบจำนวน 4 ไร่ โดยยกร่องปลูกจำนวนทั้งสิ้น 10 แปลง (ดังแผนผัง) เป็นกุหลาบตัดดอกพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ จำนวน 3 แปลง พันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช จำนวน 2 แปลง และกุหลาบตัดดอกพันธุ์คริสเตียน ดิออร์ 2 แปลง และแปลงที่เหลือเป็นกุหลาบหนู และกุหลาบชนิดอื่น ๆ จำนวน 3 แปลง แปลงที่ทำการศึกษาเป็นกุหลาบที่มีอายุประมาณ 3 ปี ใช้กุหลาบพันธุ์ป่า จากกรมส่งเสริมการเกษตร เป็นต้นต่อ แล้วจึงติดตามพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า การดูแลบำรุงต้นกุหลาบโดยใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 17-12-12 เพื่อบำรุงต้น และ 9-24-24 เพื่อเร่งดอกใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง/เดือน ฉีดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและฮอร์โมนพืชทุก 4 วัน การตัดดอกมักจะตัดวันละ 2 ครั้ง คือ เช้ามีด และ เย็น

แผนผัง แสดงแปลงปลูกกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ ในพื้นที่บ้านเลขที่ 24/1 หมู่ 2 ต. ตลาดจินดา อ. สามพราน จ. นครปฐม



- หมายเหตุ : A คือ แปลงกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์
B คือ แปลงกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีซ
C คือ แปลงกุหลาบพันธุ์คริสเตียน ดิออร์
D คือ แปลงกุหลาบพันธุ์อื่น ๆ

1. วาดแผนผังและถ่ายรูปแปลง
2. สุ่มตัวอย่างแปลงกุหลาบ โดยสุ่มพันธุ์กุหลาบพันธุ์ละ 1 แปลง ตรวจสอบความเสียหายของต้นกุหลาบ ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายซึ่งสังเกตจาก ลักษณะอาการที่ปรากฏบนใบ ลำต้นและดอก การสำรวจความเสียหายสำรวจเป็นแถวแนวนอนโดยสุ่ม 234 ต้นใน 1 แปลงแล้วจดบันทึก
3. เก็บตัวอย่างใบกุหลาบที่เป็นโรคไวรัสโดย เก็บใบอ่อนที่แสดงอาการของโรคให้เห็นอย่างชัดเจนแยกตามพันธุ์ และอาการที่แตกต่างออกจากกัน นำมาใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำไปเก็บในกระติกใส่น้ำแข็ง เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

การบันทึกผลการทดลอง

1. จดบันทึกและแบ่งระดับความเสียหายจากอาการที่ปรากฏบนต้นกุหลาบ จากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส โดยแบ่งระดับความเสียหายดังนี้
 - ระดับ 0 คือ แสดงอาการปกติ
 - ระดับ 1 คือ แสดงอาการของโรคเพียงเล็กน้อย
 - ระดับ 2 คือ แสดงอาการของโรคปานกลาง
 - ระดับ 3 คือ แสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง
2. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของกุหลาบที่เป็นโรคไวรัสจากลักษณะอาการที่ปรากฏ
3. ถ่ายรูปอาการ ที่ปรากฏบนกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และพันธุ์คริสเตียน ดิออร์

2. การปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสกุหลาบโดยวิธี Sap transmission

1. บรรจุดินลงในถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 8x16 เซนติเมตร หยอดเมล็ดแตงกวาลงในถุงๆ ละ 4-5 เมล็ดหลังจากนั้นประมาณ 6-7 วัน ต้นแตงกวาเจริญเติบโตโดยใบเลี้ยงทั้ง 2 คู่เต็มที่จะพร้อมที่จะปลูกเชื้อได้
2. แบ่งต้นแตงกวาออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก เป็นต้นแตงกวาที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับกลุ่มที่สองซึ่งจะทำการปลูกเชื้อ
3. การถ่ายทอดผ่านน้ำคั้น (sap transmission) โดยใช้น้ำคั้นจากใบกุหลาบที่แสดงอาการของโรคไวรัสต่างๆกันคือพันธุ์ไวท์มาสเตอร์พีช ได้แก่ อาการต่างชนิดรูป อาการต่างลายแผนหรืออาการใบแฉะแกรน อาการต่างร่างแห และอาการใบจุด พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ ได้แก่อาการต่างชนิดรูป อาการต่างร่างแห อาการใบแฉะแกรน และอาการใบจุด และพันธุ์คริสเตียน ดิออร์ ได้แก่อาการต่างปื้น และอาการต่างลายแผนที่ ก่อนการปลูกเชื้อไวรัส

กุหลาบลงบนต้นแดงกว่า ต้องคลุมต้นแดงกว่าด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความอ่อนแอให้กับพืชทดสอบ เมื่อครบกำหนดจึงนำกระดาษหนังสือพิมพ์ที่คลุมออก ล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่ก่อนทำการปลูกเชื้อ

4. นำใบกุหลาบที่เป็นโรคไวรัส แต่ละอาการใส่ในโถงที่แช่เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนของใบต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:3 หรือ 1:4 บดใบกุหลาบให้ละเอียด โดยทำที่อุณหภูมิต่ำไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของไวรัส

5. เติมผง celite ลงไปเล็กน้อย เพื่อให้พืชเกิดบาดแผล เชื้อไวรัสสามารถเข้าสู่ต้นพืชทดสอบได้ง่ายบดให้ทั่วอีกครั้งจากนั้นทำการปลูกเชื้อบนพืชอาศัย โดยใช้วิธีขี้จุ่มน้ำคั้นแล้วทาบนใบพืชอาศัยจากโคนใบสู่ปลายใบ และใช้มืออีกข้างรองรับใบพืชด้านล่าง เมื่อทาเสร็จแล้ว ทิ้งไว้สักครู่จึงนำไปพืชที่ทำการปลูกเชื้อแล้วมาล้างเศษพืชที่ติดบนใบออกโดยใช้น้ำสัลดลงบนใบเพียงเล็กน้อยเพราะน้ำคั้นที่เหลืออาจเป็นพิษต่อต้นพืชอาศัยได้

6. นำกระดาษหนังสือพิมพ์มาคลุมพืชอาศัยไว้ 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำกระดาษหนังสือพิมพ์ออก ดูแลรดน้ำพืชอาศัยทุกวัน พร้อมกับสังเกตอาการของโรคบนพืชอาศัยด้วย

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกผลการทดลองปลูกเชื้อไวรัสกุหลาบสู่พืชทดสอบ
2. ถ่ายรูปเปรียบเทียบอาการของพืชทดสอบที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ และอาการพืชที่ปลูกเชื้อไวรัส

กุหลาบ

3. การศึกษาผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบ

นำกุหลาบแกรนด์ฟลอร่า (Grandiflora หรือ Gr.) ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างกุหลาบพวง (Floribunda) กับกุหลาบตัดดอก (Hybrid Tea) ที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายจำนวน 10 กระถาง มาไว้ในโรงเรือน ทดลองโดยบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ของต้นกุหลาบดังนี้ บันทึกจำนวนดอกของแต่ละรุ่นที่กุหลาบออกดอก จำนวนกลีบของดอก ความยาวของก้านดอก น้ำหนักสดของดอก และ น้ำหนักแห้งของดอก

การดูแลและบำรุงต้นกุหลาบโดยการใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นระยะ รดน้ำพรวนดินอยู่เสมอ

การบันทึกผลการทดลอง

การบันทึกข้อมูลเริ่มปฏิบัติตั้งแต่ วันที่ 11 พฤศจิกายน 2537 จนกระทั่งถึง วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2538

4. การทดสอบ Gel double-diffusion

1. นำ antisera ของเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) , cucumber mosaic virus (CMV) และ tobacco mosaic virus (TMV) titre 1:1024 1:256 และ 1:128 ตามลำดับ หยดลงในหลุมของ agar gel ในแต่ละ petri dish ที่เจาะด้วย cork borer (ดูภาคผนวกที่ 5) โดย antiserum 1 ชนิดต่อ 1 petri dish จำนวน 2 ชุด

2. นำใบกุหลาบที่เป็นโรคไวรัส (ดูรายละเอียดภาคผนวกที่ 6) แต่ละอาการมาบดใน โกร่ง พร้อมกับหยดสารละลาย NaCl 1.8% อัตราส่วนใบกุหลาบ 1 กรัมต่อ สารละลาย NaCl 1.8% ประมาณ 70 หยด บดให้ละเอียด แล้วนำไปฟีซและน้ำคั้นที่ได้ใส่หลอดทดลอง ขนาด 5 ml. นำไปเข้าเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 2 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3-4 นาที

3. ดูดเอาน้ำคั้นที่อยู่ส่วนบนมาทำการหยดในหลุมของ agar gel ในแต่ละ petri dish ที่เจาะ หลุมด้วย cork borer (ดูรายละเอียดในภาคผนวกที่ 5) การทดลองทำ 2 ชุด

ชุดที่ 1 คือ น้ำคั้นจากกุหลาบพันธุ์ White Masterpieces

ชุดที่ 2 คือ น้ำคั้นจากกุหลาบพันธุ์ Eiffle Tower และ Christain Dior

4. ปิดฝา petri dish ซึ่งภายในฝาด้านบนบุด้วยกระดาษกรองหยดน้ำกลั่นพอหมาด ๆ และ เก็บในกล่องพลาสติกที่บุด้วยกระดาษทิชชูพรมน้ำเพื่อรักษาความชื้นของอาหารจุลินทรีย์ ไม่ควรพรมน้ำ ให้ชุ่มจนเกินไปเนื่องจากจะทำให้การเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างยากแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกปฏิกิริยาระหว่าง antiserum และ antigen

2. ถ่ายรูปผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

เวลา	เริ่มทดลอง	กันยายน	2537
	สิ้นสุดการทดลอง	มีนาคม	2538

สถานที่

ห้องปฏิบัติการโรคพืช และ โรงเรือน ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ผลการทดลอง

การทดลองที่1:การสำรวจความเสียหายของกุหลาบเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

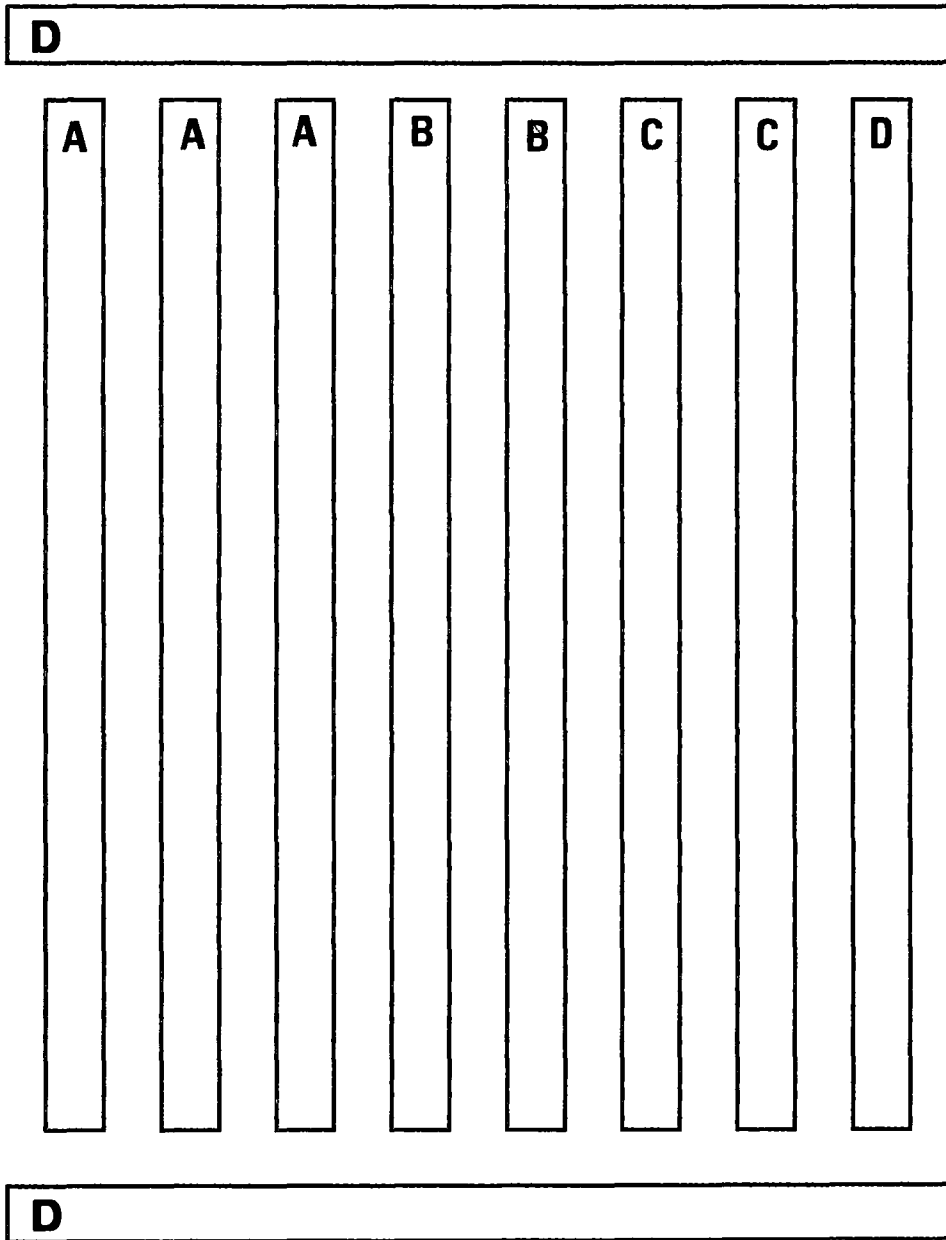
จากการสำรวจกุหลาบจากแปลงกุหลาบที่ปลูกในแถบพื้นที่ ตำบล ตลาดจินดา อำเภอ สามพราน จังหวัดนครปฐม พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกกุหลาบเพื่อตัดดอกขายเป็นการค้า และมีการผลิตขยายพันธุ์เพื่อจำหน่าย และพบปัญหาโรคไวรัสระบาดการสำรวจได้ทำการสุ่มตัวอย่างแปลงปลูกกุหลาบของเกษตรกรรายหนึ่ง ชื่อ นายธีรศักดิ์ อิมประสิทธิ์ชัย บ้านเลขที่ 24/1 หมู่ 2 ตำบล ตลาดจินดา อำเภอ สามพราน จังหวัด นครปฐม มีเนื้อที่ปลูกกุหลาบจำนวนทั้งสิ้น 4 ไร่ โดยยกทรงปลูกจำนวน 10 แปลง เป็นกุหลาบตัดดอกพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ จำนวน 3 แปลง กุหลาบตัดดอกพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีชจำนวน 2 แปลง กุหลาบตัดดอกพันธุ์คริสเตียน ดิออร์จำนวน 2 แปลง และแปลงที่เหลือเป็นกุหลาบหนู และกุหลาบชนิดอื่น ๆ อีกจำนวน 3 แปลง ซึ่งแสดงดังแผนผังในหน้าที่ 18

แปลงกุหลาบที่ทำการสำรวจเป็นกุหลาบที่มีอายุประมาณ 2ปีกว่า ใช้พันธุ์ป่าเป็นต้นตอ จากกรมส่งเสริมการเกษตร แล้วจึงติดตาพันธุ์ดีที่ปลูกเป็นการค้า การดูแลบำรุงต้นกุหลาบ โดยใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 17-12-12 เพื่อบำรุงต้น และ 9-24-24 เพื่อเร่งดอกใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง/เดือน โรคและแมลง ที่พบในสวนกุหลาบแห่งนี้ คือโรคราดำซึ่งเกิดขึ้นที่ใบ โรคราน้ำค้างพบมากที่ใบ และดอก ส่วนมากพบกับกุหลาบพันธุ์คริสเตียน ดิออร์ ระบาดมากในฤดูหนาว แมลงที่ทำความเสียหายเป็นประจำ ได้แก่ เพลี้ยไฟ ไรแดง และหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ คือ ไพรีทรอยด์ คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ หรือ เสนเนท และซิดยอร์โมนพืชทุก ๆ 4 วัน การตัดดอกมักจะตัดวันละ 2 ครั้ง คือ เช้ามีด และ เย็น ผลจากการสำรวจ พบปริมาณการเข้าทำลาย แสดงดังตารางที่ 1

ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่พบบนกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช ได้แก่ อาการแผลวงแหวน (ring spot) และ อาการต่างลายแผนที่ (line pattern) (ดังภาพที่3) อาการต่างลายแผนที่ (line pattern) (ดังภาพที่4) อาการต่างเหลือง (mosaic) และจุดเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) (ดังภาพที่5) อาการใบเหลืองแคระแกรน (ดังภาพที่6) อาการจุดเหลือง (chlorotic) และอาการแผลจุดแห้ง (necrotic) (ดังภาพที่7 a และ bตามลำดับ) และ อาการลักษณะก้านดอกสั้น (ดังภาพที่8) ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่พบบนกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ ได้แก่ อาการต่างเหลืองลายแผนที่ (mosaic line pattern) และ อาการใบย่นบิดเบี้ยว (puckering/ distortion) (ดังภาพที่9) อาการต่างเป็นร่างแห (vien netting)

(ดังภาพที่10) และ อาการใบย่นบิดเบี้ยว (puckering / distorting) เหลืองเป็นปื้น(chlorotic patches) (ดังภาพที่11) และ ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่พบบนกุหลาบพันธุ์คริสเตียน ดิออร์ คือ อาการต่างลายแผนที่ (ดังภาพที่12)

แผนผัง แสดงแปลงปลูกกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ ในพื้นที่บ้านเลขที่ 24/1 หมู่ 2 ต. ตลาดจินดา อ. สามพราน จ. นครปฐม



- หมายเหตุ : A คือ แปลงกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์
B คือ แปลงกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีซ
C คือ แปลงกุหลาบพันธุ์คริสเตียน ดิออร์
D คือ แปลงกุหลาบพันธุ์อื่น ๆ

ตารางที่ 1 ตารางแสดงตัวเลขความเสียหายของกุหลาบที่เกิดจากเชื้อไวรัส
โดยการสุ่ม จำนวน 234 ต้น ใน 1 แปลง ผลการสำรวจเป็นดังนี้

อาการ	White Masterpiece สีขาว		Christain Dior สีแดง		Eiffle Tower สีชมพู	
	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%
ปกติ (0)	90	38.46	160	68.38	110	47.00
เล็กน้อย (1)	52	22.27	40	17.10	102	43.60
ปานกลาง (2)	56	23.93	26	11.10	14	5.98
รุนแรง (3)	36	15.34	8	3.42	8	3.42
รวมทั้งหมด	234	100.00	234	100.00	234	100.00
รวมเป็นโรค	144	61.54	74	31.62	124	53.00

หมายเหตุ ระดับ 0 คือ แสดงอาการปกติ

ระดับ 1 คือ แสดงอาการของโรคเล็กน้อย

ระดับ 2 คือ แสดงอาการของโรคปานกลาง

ระดับ 3 คือ แสดงอาการของโรครุนแรง

การแสดงอาการของโรคไวรัสในกุหลาบแต่ละพันธุ์ปรากฏอาการรุนแรงแตกต่างกันดังนี้

Eiffle Tower แสดงอาการลักษณะใบย่น (puckering) หรือใบบิดเบี้ยว (distortion) และจุดเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches)

White Masterpiece แสดงอาการต่างเหลือง(mosaic) และลายแผนที่(line pattern) และ แผลจุดวงแหวน (ringspot)

Christain Dior แสดงอาการต่างเหลือง(mosaic) และ ต่างลายแผนที่(line patterns)



ภาพที่1 สภาพพื้นที่แปลงปลูกกุหลาบของคุณ ชีรศักดิ์ อิ่มประสิทธิ์ชัย บ้านเลขที่ 24/1 หมู่2 ต. ตลาดจินดา อ. สามพราน จ. นครปฐม



ภาพที่2 ลักษณะอาการแคระแกรนของกุหลาบพันธุไวท์ มาสเตอร์พีช ในสภาพแปลง



ภาพที่ 3 แสดงอาการแผลวงแหวน (ringspot) และด่างลายแผนที่ (line pattern) บนใบของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีซ



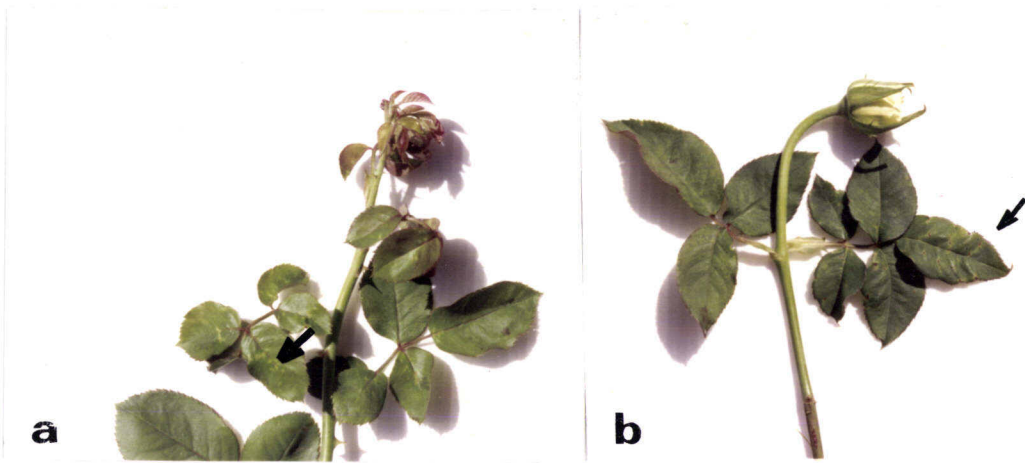
ภาพที่ 4 แสดงอาการด่างลายแผนที่ (line pattern) บนใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีซ



ภาพที่ 5 แสดงอาการต่างเหลือง (mosaic) และจุดเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) บนใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช



ภาพที่ 6 แสดงอาการใบเหลืองแฉะแฉกรนของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช



ภาพที่ 7 a: แสดงอาการจุดเหลือง (chlorotic) และ b : แสดงอาการแผลจุดแห้ง (necrotic) บนใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะก้านดอกสั้นของกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช อันเนื่องมาจากเชื้อไวรัส



ภาพที่9 แสดงอาการต่างเหลืองลายแผนที่ (mosaic line pattern) และ ใบย่นบิดเบี้ยว (puckering/ distortion) บนใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์



ภาพที่10 แสดงอาการต่างเป็นร่างแห (vein netting) บนใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์



ภาพที่11 แสดงอาการลักษณะใบย่นบิดเบี้ยว (puckering / distorting) และ เหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) บนใบของกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์



ภาพที่12 แสดงอาการลักษณะ ต่างลายแผนที่ (mosaic line pattern) บนใบของกุหลาบพันธุ์คริสเตียน ดิออร์

การทดลองที่ 2 : การปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสกุหลาบโดยวิธี Sap transmission

ได้ทำการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นของใบกุหลาบที่เป็นโรคสู่พืชอาศัยไม่ปรากฏการเข้าทำลายของเชื้อบนพืชทดสอบ ดังกล่าว พืชอาศัยที่ใช้ทดสอบแสดง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางแสดงรายชื่อ พืชอาศัยที่นำมาปลูกเชื้อไวรัสกุหลาบ

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ ภาษาอังกฤษ	ชื่อสามัญ ภาษาไทย	อายุของพืชทดสอบ ที่ทำการปลูกเชื้อ	พัฒนาการของพืชทดสอบ ที่ทำการปลูกเชื้อ
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativas</i>	cucumber	แตงกวา	7 - 10 วัน	ใบเลี้ยง
Leguminosae	<i>Glyna max</i> (L.) Merr.	soybean	ถั่วเหลือง	10 - 12 วัน	ใบแท้คู่ที่ 1
	<i>Vigna sesquipedalis</i>	wight yard long bean	ถั่วฝักยาว	2 สัปดาห์	ใบแท้คู่ที่ 1
	<i>Arachis hypopaea</i> L.	peanut	ถั่วลิสง	10 - 12 วัน	ใบแท้คู่ที่ 1
Solnaceae	<i>Nicotina tabaccum</i>	tobacco	ยาสูบใบใหญ่	5 สัปดาห์	ใบแท้ที่ 3 หรือ 4
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	quinoa	-	2 เดือน	ใบแท้ที่ 6
	<i>C. amaranticolor</i> Coste&Reyn	goosefoot	-	2 เดือน	ใบแท้ที่ 6

การทดลองที่ 3 : การศึกษาผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบ

จากการสังเกต การเจริญเติบโตของต้นกุหลาบ ที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย พบว่าต้นกุหลาบ มีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ต้นทรุดโทรมอย่างรวดเร็ว และพบการทำลายของเชื้อราตลอดเวลา โดยเฉพาะโรคราแป้ง เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายต้นกุหลาบส่วนใหญ่ จะปรากฏอาการที่ใบซึ่งแสดงอาการ เหลืองเป็นปื้นและบิดเบี้ยว ดังภาพที่ 12 อาการแผลจุดเฉพาะแห่งบริเวณใบอ่อนและใบแก่ (ภาพที่ 13) หรืออาจพบว่าแสดงอาการต่างลายแผนที่ (line pattern) บริเวณใบอ่อนและใบแก่ส่วนอาการผิดปกติที่เกิดบนดอกโดยดอกมีรูปร่างบิดเบี้ยว และ ดอกมีขนาดเล็กกว่าปกติ กลีบดอกบางดอก แสดงอาการที่กลีบดอกไม่สม่ำเสมอ พบกระจายทั่วดอกหรือเป็นหย่อม ๆ ซึ่งบางครั้งอาจไม่แสดง อาการต่างที่กลีบดอกให้เห็น แต่จะแสดงอาการต่างบริเวณกลีบเลี้ยง รังไข่ และก้านดอกที่อยู่ติดรังไข่ (ภาพที่ 14 และ 15) พบว่าการแตกตาเพื่อผลิตดอกแต่ละครั้งใช้ระยะเวลานานมากในการผลิตออกมา ใหม่ในแต่ละรุ่น ความยาวของช่อดอกมีขนาดสั้นและเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตรุ่นแรก



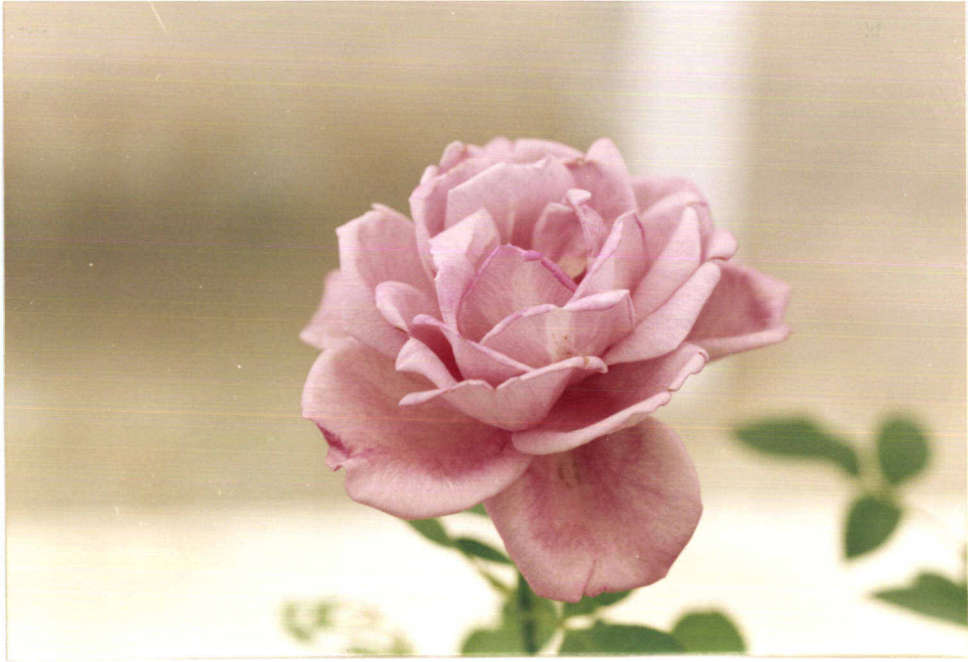
ภาพที่ 13 แสดงอาการลักษณะเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) และ บิดเบี้ยว(distortion) บริเวณใบอ่อนของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา (Grandiflora หรือ Gr.)



ภาพที่14 แสดงอาการใบจุด บนใบอ่อนของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา (Grandiflora หรือ Gr.)



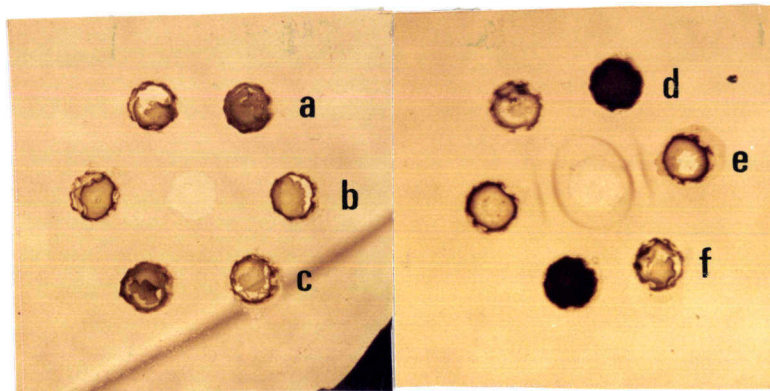
ภาพที่15 แสดงอาการด่างที่กลีบเลี้ยง และก้านดอก ของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา (Grandiflora หรือ Gr.)



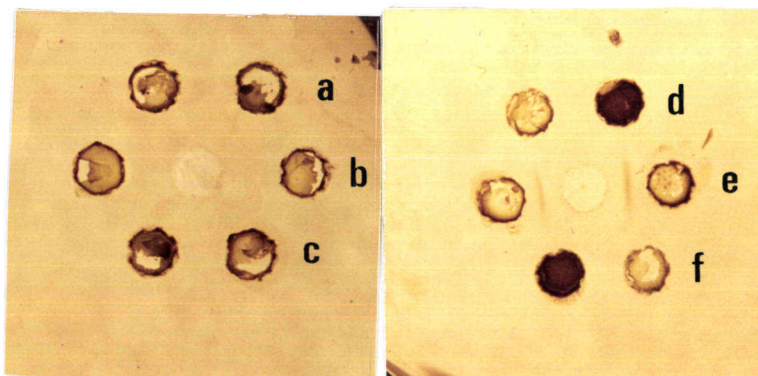
ภาพที่16 แสดงอาการต่างบริเวณกลีบดอก ของกุหลาบแกรนด์ฟลอรา
(Grandiflora หรือ Gr.)

การทดลองที่ 4 : การทดสอบ Gel double-diffusion test

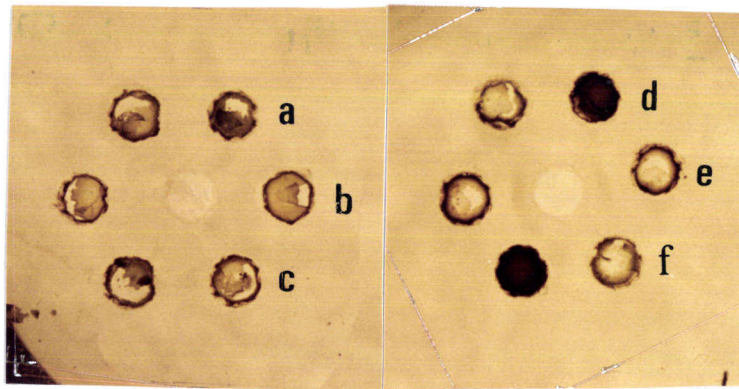
การทดสอบ Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum และ antigen จากน้ำคั้นใบกุหลาบเกิดปฏิกิริยา precipitation lines เฉพาะ antigen ของน้ำคั้นจากใบอ่อนเท่านั้น ดังภาพที่ 17 ,18 ,19, 20 ,21 และ 22



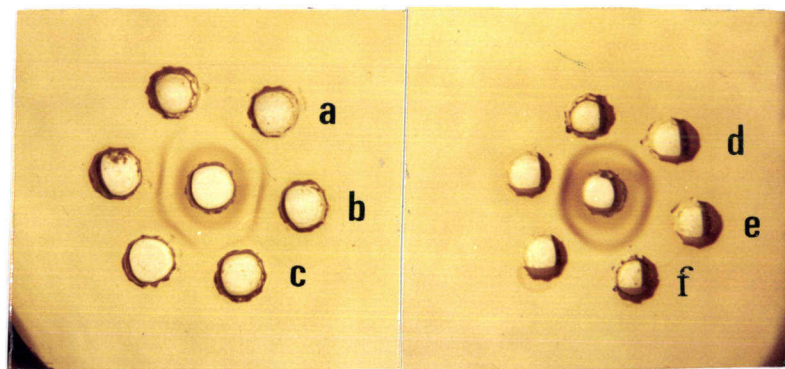
ภาพที่17 Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum cucumber mosaic virus (CMV) กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช As : antiserum cucumber mosaic virus (CMV) a : อาการใบด่างผิดรูป b : อาการใบแคระแกรน c : อาการใบด่างลายแผนที่ d : อาการใบด่างร่างแห e : อาการใบจุด และ f : ใบพืชปกติ



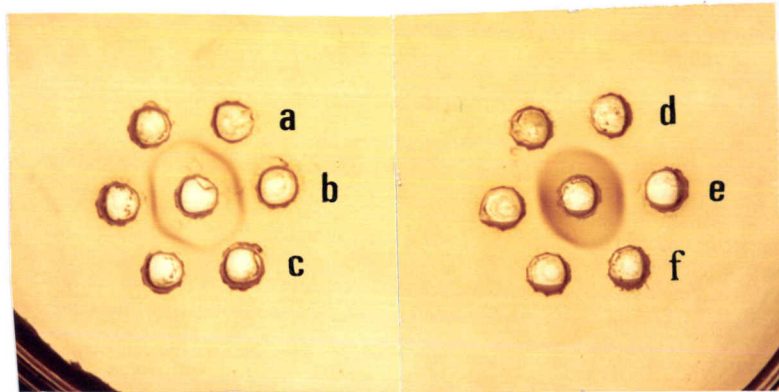
ภาพที่18 ใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช As : antiserum tobacco mosaic virus (Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum tobacco mosaic virus (TMV) กับ antigen น้ำคั้นกุหลาบ a: อาการใบด่างผิดรูป b : อาการใบแคระแกรน c: อาการใบด่างลายแผนที่ d : อาการใบด่างร่างแห e : อาการใบจุด และ f : ใบพืชปกติ



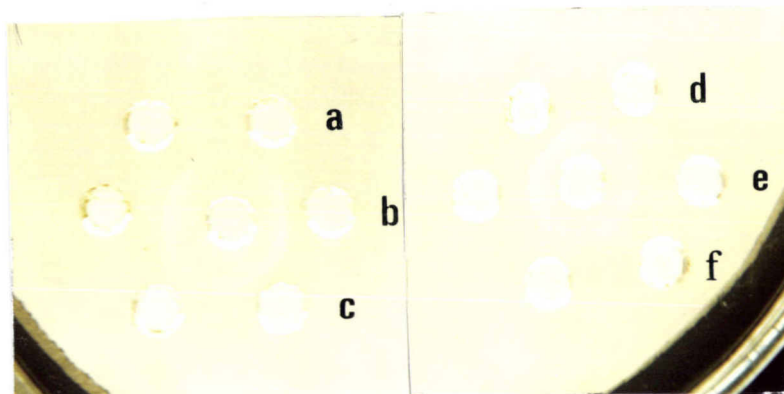
ภาพที่19 Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) กับ antigen น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีซ As : antiserum prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) a : อาการใบต่างผิดปกติ b : อาการใบแคระแกรน c : อาการใบต่างลายแผนที่ d : อาการใบต่างร่างแห e : อาการใบจุด และ f : ใบปกติ



ภาพที่20 Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum cucumber mosaic virus (CMV) กับ antigen น้ำคั้นของใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ (a , b , c และ d) และ พันธุ์คริสเตียน ดิออร์ (e และ f) As : antiserum cucumber mosaic virus (CMV) a : อาการใบต่างร่างแห b : อาการใบต่างผิดปกติ c : อาการใบแคระแกรน d : อาการใบจุด e : อาการใบต่างปื้น และ f : อาการใบต่างลายแผนที่



ภาพที่ 21 Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum tobacco mosaic virus (TMV) กับ antigen น้ำคั้นของใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ (a ,b ,c และd) และพันธุ์ คริสเตียน ดิออร์ (e และ f) As : antiserum tobacco mosaic virus (TMV) a : อาการใบต่างร่างแห b : อาการใบต่างผิดรูป c : อาการใบแคระแกรน d : อาการใบจุด e : อาการใบต่างป็น และ f : อาการใบต่างลายแผนที



ภาพที่ 22 Gel double-diffusion test ระหว่าง antiserum prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) กับ antigen น้ำคั้นใบกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ (a ,b ,c และ d) และพันธุ์คริสเตียน ดิออร์ (e และ f) As : antiserum prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) a : อาการใบต่างร่างแห b : อาการใบต่างผิดรูป c : อาการใบแคระแกรน d : อาการใบจุด e : อาการใบต่างป็น และ f : อาการใบต่างลายแผนที

ตารางที่ 3 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง antiserum ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ,tobacco mosaic virus (TMV) และ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) และ antigen น้ำคั้นจากอาการของกุหลาบพันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ ไวท์ มาสเตอร์พีช และ คริสเตียน ดิออร์

พันธุ์กุหลาบ	อาการของใบกุหลาบ	ปฏิกิริยาระหว่าง antiserum และ antigen		
		CMV	TMV	PNRSV
ไวท์ มาสเตอร์พีช	ต่างชนิดรูป (ใบแก่)	-	-	-
	ใบแคระแกรน (ใบแก่)	-	-	-
	ต่างลาย pattern (ใบแก่)	-	-	-
	ต่างร่างแห (ใบแก่)	-	-	-
	อาการใบจุด (ใบอ่อน)	+	+	+
	ใบปกติ (ใบอ่อน)	-	-	-
ไอเฟล ทาวเวอร์	ต่างร่างแห (ใบอ่อน)	+	+	+
	ต่างชนิดรูป (ใบอ่อน)	+	+	+
	ใบแคระแกรน (ใบอ่อน)	+	+	+
	อาการใบจุด (ใบอ่อน)	+	+	+
คริสเตียน ดิออร์	อาการต่างปื้น (ใบอ่อน)	+	+	+
	ต่างลาย pattern (ใบอ่อน)	+	+	+

จากตารางที่ 3 พบว่า antigen จากน้ำคั้นใบแก่ของกุหลาบที่แสดงอาการของโรคไวรัส ไม่ทำปฏิกิริยา precipitation lines กับ antisera cucumber mosaic virus (CMV) , tobacco mosaic virus (TMV) และ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจแปลงกุหลาบซึ่งถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ในเขตพื้นที่ บ้านเลขที่ 24/1 หมู่ 2 ตำบล ตลาดจินดา อำเภอ สามพราน จังหวัด นครปฐม พบการทำลายของเชื้อไวรัสปรากฏบนใบเป็นส่วน ใหญ่ ส่วนลำต้น และดอกแสดงอาการของโรคเพียงเล็กน้อยโดยเฉพาะดอกแทบไม่พบอาการเลย พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากเชื้อไวรัสในพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ และ พันธุ์คริสเตียน ดิออร์ ดังนี้ 61.54% 53.00% และ 31.62% ตามลำดับ การแสดงอาการของโรคจากเชื้อไวรัสในพันธุ์ต่าง ๆ จะแสดงอาการรุนแรงที่แตกต่างกัน เช่น พันธุ์ไอเฟล ทาวเวอร์ แสดงอาการ ลักษณะใบย่นหรือบิดเบี้ยว (puckering/distortion) และ จุดเหลืองเป็นมัน (chlorotic patches) พันธุ์ไวท์ มาสเตอร์ พีช แสดงอาการต่างเหลือง (mosaic) และอาการต่างลายแผนที่ (line patterns) และอาการแผลวงแหวน (ringspot) และ พันธุ์คริสเตียน ดิออร์ แสดงอาการต่างเหลือง (mosaic) และ อาการต่างลายแผนที่ (line patterns) เป็นส่วนใหญ่

การปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสกุหลาบสู่พืชทดสอบ ได้แก่ พืชตระกูลแตง พืชตระกูลถั่ว *Chenopodium amaranticolor* *C. quinoa* และ ต้นยาสูบ ปรากฏว่าไม่ประสบผลสำเร็จ

การศึกษาผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบ พบว่า เชื้อไวรัสมีอิทธิพล ต่อการเจริญเติบโตของดอก ก้าน ใบ และ ลำต้น ต้นกุหลาบมีการเจริญเติบโตลดลงเรื่อย ๆ ตามลำดับ พร้อมทั้งต้นทรุดโทรมอย่างรวดเร็ว การเจริญเติบโตของดอก พบว่าดอกมีขนาดเล็ก และมียูปร่างผิดปกติพบ แสดงอาการต่างในบางดอก จำนวนกลีบดอกและ น้ำหนักของดอกลดลง เป็นส่วนใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับอาการเจริญเติบโตในรุ่นแรก ๆ ของการผลิตดอก การเจริญเติบโต ของก้านดอก พบว่าความยาวของก้านช่อดอกสั้นลง และมีขนาดเล็กลง บางครั้งพบก้านแคระแกรน เมื่อเปรียบเทียบกับอาการเจริญเติบโตในรุ่นแรก ๆ ของการผลิตช่อดอก ยกเว้นบางช่วงในกรณีที่ถูกหนุ่มี เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกุหลาบ และมีการให้น้ำจึงทำให้ต้นกุหลาบสามารถเจริญเติบโต แข่งขันกับการทำลายของเชื้อไวรัสได้ดี

การศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสและ อาการที่ปรากฏบนใบกุหลาบแต่ละพันธุ์ โดยทดสอบ Gel double-diffusion test antisera ที่ใช้ทดสอบ คือ antisera cucumber mosaic virus (CMV) , tobacco mosaic virus (TMV) และ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) titre ที่ 1:256 ,1:128 และ 1:1024 ตามลำดับ antigen ที่ใช้คือ น้ำคั้นจากใบกุหลาบพันธุ์ ไอเฟล ทาวเวอร์ ไวท์ มาสเตอร์พีช และ คริสเตียน ดิออร์ ที่แสดงอาการ ต่าง ๆ พบว่า antisera ทุกชนิด ทำปฏิกิริยา precipitation line กับ antigen น้ำคั้นใบอ่อนของกุหลาบทุกอาการ แสดงว่ากุหลาบที่เป็นโรคไวรัส เกิดจากการทำลายของ เชื้อไวรัสหลายชนิดร่วมกัน (mixed infection)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจแปลงปลูกกุหลาบของเกษตรกรในเขต อ. สามพราน จ. นครปฐม พบอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ปรากฏอย่างชัดเจนในแต่ละครั้ง ของการสำรวจอาการจะปรากฏขึ้นเล็กน้อยแตกต่างกัน เช่น ฤดูหนาวพบว่าในแต่ละอาการเกิดขึ้นมากและชัดเจน ทั้งนี้เนื่องมาจากอุณหภูมิมีผลต่อการแสดงอาการของเชื้อไวรัสพันธุ์ของกุหลาบก็เป็นปัจจัยสำคัญในการแสดง อาการของเชื้อ จะพบว่ากุหลาบพันธุ์ไวท์ มาสเตอร์พีช แสดงอาการโรคชัดเจนและปรากฏอาการแตกต่างกันมากกว่ากุหลาบพันธุ์โอเฟล ทาวเวอร์ และ คริสเตียน ดืออร์ ตามลำดับ การปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสกุหลาบสู่ต้นพืชทดสอบ พืชทดสอบที่นำมาทดลอง คือ แดงกวา ยาสูบ *Chenopodium amaranticolor* และ *C. quinoa* โดยใช้ phosphate buffer และ PVP 10% ใน phosphate buffer ปรากฏว่าไม่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งแม้ว่าจะมีรายงานว่ามีพืชที่นำมาทดสอบเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสชนิดนี้ก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก กุหลาบเป็นไม้เนื้อแข็ง มีเมือกและสารยับยั้ง (tannin) สูง (Fulton, 1952) ประกอบกับอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสด้วย

การศึกษาผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบ จากผลการศึกษาพบว่าต้นกุหลาบมีการเจริญเติบโตลดลง ต้นทรุดโทรมอย่างรวดเร็ว น้ำหนักดอก จำนวนกลีบดอก และความยาวของก้านช่อดอกลดลง เนื่องมาจากการทำลายของเชื้อไวรัส แต่การบันทึกผลการเจริญเติบโตของต้นกุหลาบในบางช่วงมีการเจริญเติบโตดีขึ้นกว่าที่นำจะเป็น เช่น กลีบดอก น้ำหนักดอก หรือ ความยาวของก้านสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก อุณหภูมิ และ สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นกุหลาบสูงกว่าการพัฒนาของเชื้อไวรัส โดยเฉพาะในช่วงที่มีการใส่ปุ๋ย หรือการให้ฮอร์โมน จึงทำให้ผลการศึกษาที่มีความแปรปรวน

การทดสอบด้วยวิธี Gel double-diffusion จากผลการศึกษาพบว่า ใบอ่อนของกุหลาบทั้ง 3 พันธุ์ที่แสดงอาการของโรคไวรัส มาทดสอบจะเกิดปฏิกิริยา ของ precipitation line แต่ใบแก่จะไม่เกิดปฏิกิริยาทั้งนี้เนื่องมาจาก ใบอ่อนของกุหลาบมีสารที่ยับยั้ง หรือเมือกที่อยู่ภายในใบน้อยกว่าใบแก่ และอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อไวรัสที่แสดงอาการบนใบแก่ ได้เคลื่อนย้ายไปสู่ใบอ่อนแล้ว หลังจากทีปรากฏอาการให้เห็นอย่างชัดเจน และจากการทดลองยังพบว่าการเจือจาง antiserum มากเกินไปจะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาของ precipitation line

ข้อเสนอแนะสำหรับการดำเนินการต่อไป ควรศึกษาวิธีการแยกเชื้อไวรัสของกุหลาบ โดยวิธีการถ่ายทอดเชือบนพืชทดสอบเพื่อแยกเชื้อไวรัสให้เป็นเชื้อเดี่ยว ๆ เนื่องจากพบว่าเกิดอาการร่วม (mixed infection) และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ความคงทนของเชื้อไวรัสในน้ำคั้น ลักษณะ และขนาดของอนุภาคไวรัส เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2531. การผลิตไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออก. งานไม้ดอกไม้ประดับ กลุ่มพืชสวน กองส่งเสริมพืชพันธุ์ กรมส่งเสริมการเกษตร. 68 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2536. คู่มือการผลิตไม้ตัดดอก. งานไม้ดอกไม้ประดับ กลุ่มพืชสวน กองส่งเสริมพันธุ์พืช. 100 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2536. เทคโนโลยีการผลิตกุหลาบเพื่อการค้า. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร. 72 หน้า.

เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์. 2532. การปลูกกุหลาบ. ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท. 63 หน้า.

ณัฐยา ชินประยูร. 2534. พุดถึงกุหลาบในแง่ไม้ตัดดอก. เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตรการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 38-44.

ธัญญา เตชะศีลพิทักษ์. 2534. เทคโนโลยีการผลิตกุหลาบตัดดอก. เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. หน้า 28-30.

ปิฎกธะ บุนนาค. 2529. ไม้ดอกไม้ประดับ (ฉบับปรับปรุงแก้ไข). สำนักพิมพ์บรรณกิจ. 383 หน้า.

สมเพียร เกษมทรัพย์. 2528. การปลูกไม้ดอก. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 455 หน้า.

สุรภี กীরติยะชังกุล. 2538. การป้องกันโรคใบด่างกุหลาบ. เกษตรเกษตร 19(1) : 130-132.

สืบศักดิ์ นวจินดา. 2533. เทคโนโลยีการผลิตกุหลาบ. รายงานการสัมมนา เรื่อง เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 34-40.

- Casper, R. 1973. Serological Properties of Prunus Necrotic Ringspot and Apple Mosaic Virus Isolates from Rose. Phytopathology 63 : 238-240.
- Fulton, R.W. 1952. Mechanical Transmission and Properties of Rose Mosaic Virus. Phytopathology 42 : 413-416.
- Fulton, R.W. 1967. Purification and Serology of Rose Mosaic Virus. Phytopathology 57 : 1197-1201.
- Fulton, R.W. 1968. Serology of Viruses Causing Cherry Necrotic Ringspot, Plum Line Pattern, Rose Mosaic and Apple Mosaic. Phytopathology 58 : 635-638.
- Fulton, R.W. 1970. A Disease of Rose Caused by Tobacco Streak Virus. Plant Dis. Repr. 54 (11) : 949-951.
- McDaniel, G.L. , G.J. Buck, and R.E. Ford. 1971. Isolation of Tobacco Ringspot Virus from Rose. Phytopathology 61 : 45-49.
- Robert, S.H. , and J.A. Milbrath. 1962. Isolation and Identification of Tomato Ringspot Virus Associated with Rose Plants and Rose Mosaic Virus. Plant Dis. Repr. 46 : 555-557.
- Secor, G.A. , and G. Nyland. 1978. Rose Ring Pattern : A Component of The Rose-Mosaic Complex. Phytopathology 68 : 1005-1010.
- Slack, S.A. , J.A. Traylor, G. Nyland, and H.E. Williams. 1976. Symptoms, Indexing, and Transmission of Rose Spring Dwarf Disease. Plant Dis. Repr. 60 : 183-187.
- Smith, K.M. 1972. A Textbook of Plant Virus Disease. Academic Press, New York. 684 p.

Thomas, B.J. 1984. Rose Mosaic Disease : Symptoms Induced in Rose by Graft Inoculation with Both Prunus Necrotic Ringspot and Apple Mosaic Viruses. Plant Pathology 33 : 155-160.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

Potassium phosphate buffer 0.1 M ที่ pH 7.5 โดยการเตรียม

1. ละลาย di-potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4) 17.4 g ใน 1 lit
2. เติม potassium hydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) 3.4 g กรด dissolved in 250 ml ., distill water 0.1 M solution to achieve pH 7.5

ภาคผนวกที่ 2

PVP 10% ใน Potassium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.5 โดยการเตรียม

1. เท Potassium phosphate buffer 100 ml. ลงในบีกเกอร์
2. เติม Polyvinylpyrrolidone 10 g แล้วคนให้เข้ากัน

ภาคผนวกที่ 3

การเตรียมสารละลาย fotmvar 1% ใน chloroform

1. เตรียม chloroform 10 ml
2. เติมสาร fourmvar 1 g คนให้เข้ากัน

ภาคผนวกที่ 4

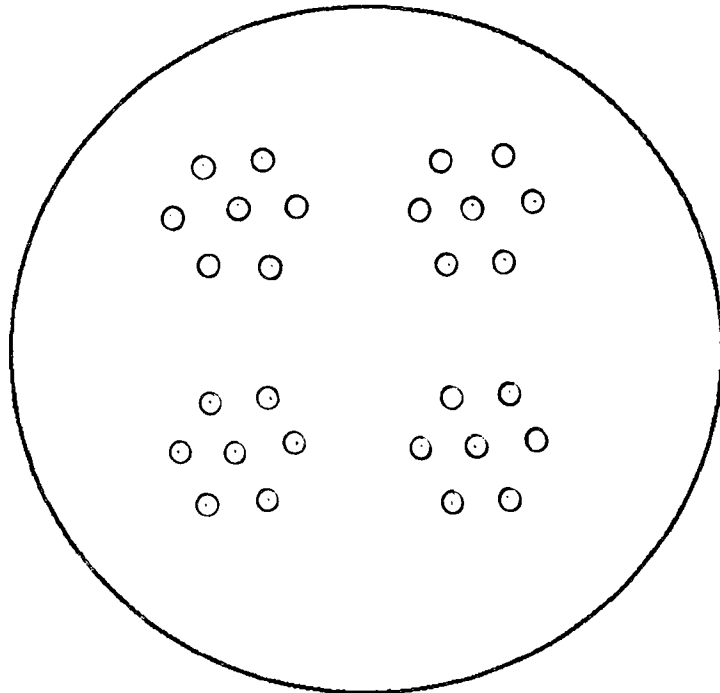
การเตรียม Agar Gel

1. เตรียม Agar 1.5 g NaCl 1.8 g NaN_3 0.1 g และ น้ำกลั่น 200ml
2. คนให้เข้ากัน นำไปตั้งไฟให้เดือดแล้วยกลง

ภาคผนวกที่ 5

การเตรียม Petri dishes เพื่อใช้ในการทดสอบ Gel double-diffusion test

1. นำ petri dishes ใหม่ที่ยังไม่ได้เคลือบด้วยสารละลาย formvar 1% โดยนำสารละลาย formvar 1% ในปิ๊กเกอร์ เทลงใน petri dishes ให้แผ่เต็ม petri dishes แล้วรีบเทออกอย่างรวดเร็ว
2. คว่ำ petri dishes ให้แห้ง
3. นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้เทลงใน petri dishes ปริมาตร 20 ml สูงประมาณ 5 mm
4. เมื่อวุ้นแห้งจึงเจาะหลุมสำหรับหยดน้ำคั้นจากใบกุหลาบ และ antisera ด้วย cock borer ดังรูป



5. นำกระดาษกรองบุฝา petri dishes แล้วหยดน้ำกลั่นที่กระดาษกรองให้ชุ่มพอเหมาะ ปิดฝา นำ petri dishes ที่ใส่วุ้นแล้วเก็บในกล่องพลาสติกที่บุด้วย กระดาษทิชชู ซึ่งพรมน้ำให้ชุ่มที่ก้น และฝากล่อง
6. การหยด antiserum และน้ำคั้นใบกุหลาบควรหยดให้พอดีกับผิวหน้าของวุ้นไม่ควรหยดสั้นหรือไม่เต็มหลุม

ภาคผนวกที่ 6

การเตรียมใบกุหลาบที่เป็นโรคไวรัสเพื่อทดสอบ Gel double-diffusion

1. ใบกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece

1.1	อาการต่างชนิดรูป	ใบแก่	น้ำหนัก	2.00	กรัม
1.2	อาการใบแคระแกรน	2.00	..
1.3	อาการต่างลาย pattern	2.00	..
1.4	อาการต่างร่างแห	2.00	..
1.5	อาการใบจุด	ใบอ่อน	..	2.00	..
1.6	ใบปกติ	2.00	..

2. ใบกุหลาบพันธุ์ Eiffle tower

2.1	อาการต่างร่างแห	ใบอ่อน	น้ำหนัก	1.50	กรัม
2.2	อาการต่างชนิดรูป	1.50	..
2.3	อาการใบแคระแกรน	1.50	..
2.4	อาการใบจุด	1.50	..

3. ใบกุหลาบพันธุ์ Christain Dior

3.1	อาการต่างปื้น	ใบอ่อน	น้ำหนัก	1.50	กรัม
3.2	อาการต่างลาย pattern	1.50	กรัม

ตารางผนวกที่ 1 การเจริญเติบโตของกุหลาบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายจำนวน 10 ต้น

ค่าเฉลี่ย						
ต้นที่	รุ่นที่	จำนวนดอก	จำนวนกลีบ	ความยาวก้าน (เซนติเมตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
1	1	3	15.0	7.67	2.82	0.48
	2	2	28.5	18.75	4.38	0.69
	3	2	27.0	14.00	3.29	0.49
	4	1	16.0	13.00	2.44	0.40
2	1	1	30.0	3.00	2.67	0.43
	2	2	22.5	6.75	4.13	0.68
	3	2	15.0	16.50	2.96	0.49
	4	1	23.0	17.00	3.42	0.51
3	1	1	29.0	8.50	1.83	0.35
	2	2	32.0	4.50	2.84	0.50
	3	3	24.0	5.00	2.27	0.36
4	1	3	20.0	7.77	3.32	0.53
	2	2	22.5	20.00	4.32	0.75
	3	1	19.0	15.00	2.80	0.57
5	1	1	24.0	10.00	5.22	0.92
	2	2	32.0	12.00	3.74	0.52

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ค่าเฉลี่ย						
ต้นที่	รุ่นที่	จำนวนดอก	จำนวนกลีบ	ความยาวก้าน (เซนติเมตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
6	1	1	18.0	5.00	2.89	0.37
	2	2	45.0	14.00	3.61	0.47
7	1	1	33.0	8.50	0.80	0.19
8	1	1	54.0	7.50	4.43	0.72
	2	1	168.0	28.00	5.26	0.67
	3	1	48.0	27.00	3.90	0.71
	4	2	58.5	24.00	3.82	0.64
9	1	1	38.0	4.50	2.36	0.35
10	1	1	14.0	14.70	4.47	0.84
	2	2	22.5	27.00	2.25	0.34
	3	2	20.5	35.50	2.69	0.43
	4	1	15.5	26.00	3.39	0.54
	5	1	17.0	39.50	1.50	0.36
	6	1	15.5	28.50	2.13	0.47

