รายงานการวิจัย

เรื่อง

การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสในกุหลาบ โดยเทคนิคการแยกกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ

Detection of Virus Diseases on Roses by Extraction of Double – Stranded RNA (ds RNA) method

เสนอ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ทุนอุดหนุนการวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2539

ผู้วิจัย

นวลพรรณ งามยี่สุ่น

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การสำรวจโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบในแหล่งปลูกจังหวัดเชียงราย นครปฐม และสงขลา ของกุหลาบพันธุ์ต่างๆพบกลุ่มของอาการที่ปรากฏบนใบดังนี้คือ แผลจุดเหลือง และจุดเหลืองเป็นปื้น อาการด่างร่างแห อาการด่างลายแผนที่ อาการด่างวงแหวน อาการใบย่น บิดเบี้ยว และแคระแกร็น อาการด่างและใบผิดรูปร่าง โดยเฉพาะในกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece, Lolita, Red masterpiece, Eiffel Tower, Red Success, Double Delight, White success, Bravo Friendship, Christian Dior และ Yonena Harmonie ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเป็น 61.54 , 57.50, 53.24, 53.00, 45.75, 42.75, 37.82, 37.70, 36.62 และ 35.00 ตามลำดับ จากการตรวจสอบเชื้อโดยการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อจากใบกุหลาบที่แสดงอาการเป็นโรค พบการเข้าทำลายของเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) และเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของการใช้สาร 1-Adamantanamine hydrochloride ผสมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BA 3 มิลลิกรัม/ลิตรและ IAA 0.3 มิลลิกรัม / ลิตร ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตากุหลาบพันธุ์ Lolita ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัม / ลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม / ลิตร กุหลาบมีการเจริญเติบโตดีใกล้เคียงกับต้นปกติและปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบกลุ่มนี้ลดลงโดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The survey of virus disease in rose varieties (cut-flower), growing in Chaing Rai, Nakorn Phatom and Songkla provinces, revealed a range of virus symptom as follow : chlorotic patches, vein netting, line pattern, concentric rings, leaf distrotion, mosaic and leaf deformation. The disease damage in rose varieties found in White Masterpiece, Lolita, Red Masterpiece, Eiffel Tower, Red Success, Double Delight, White Success, Bravo Friendship, Christian Dior and Yonena Harmonie in percentage are 61.54 , 57.50, 53.24, 53.00, 45.75, 42.75, 37.82, 37.70, 36.62, 35.00 respectively. Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) and cucumber mosaic virus (CMV) were detected by the extraction of dsRNA method using rose leaves with virus symptom. Study of 1-Adamantanamine hydrochloride to eliminate PNRSV infected Lolita rose was demonstrated in *in vitro* using 0, 25, 50 and 75 mg/l , corporated in MS medium with BA 3 mg/l and IAA 0.3 mg/l. The ELISA test result showed that, at 75 mg/l of this antiviral agent, the virus concentration declined and the growth of most plantlets were as good as the control.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประเภททั่วไปประจำปีงบประมาณ 2539 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และได้รับความร่วมมือและช่วยเหลือจากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณอย่างสูง

ผู้วิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาต่างประเทศ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vi
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลอง	15
สรุปผลและวิจารณ์	39
เอกสารอ้างอิง	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อพืชทดสอบในการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้น (Sap transmission)	10
2	แสดงระดับความเสียหายเนื่องจากความรุนแรงของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบ ในจังหวัดนครปฐม	22
3	แสดงระดับความเสียหายเนื่องจากความรุนแรงของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบ ในจังหวัดเชียงราย	22
4	แสดงระดับความเสียหายเนื่องจากความรุนแรงของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบ ในจังหวัดสงขลา	23
5	แสดงรายชื่อพืชทดสอบที่แสดงอาการเป็นโรคโดยการถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้น	25
6	แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาจากการตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA จากส่วนใบของกุหลาบที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของสารยับยั้งไวรัส 1- Adamantanamine hydrochloride	35
7	แสดงผลการทดสอบทางเซรุ่มวิทยาจากพืชทดสอบที่ได้รับการถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้นจากกุหลาบพันธุ์ต่างๆ	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงขั้นตอนการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสในกุหลาบ	12
2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA ตัวมาตรฐาน	13
3	แสดงอาการจุดเหลือง (chlorotic spot) บนใบอ่อนของกุหลาบพันธุ์ Red Masterpiece	16
4	แสดงอาการแผลเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) ของกุหลาบพันธุ์ Lolita	16
5	แสดงอาการด่างเป็นร่างแห (vein netting) บนกุหลาบพันธุ์ Eiffle Tower	17
6	แสดงอาการด่างลายแผนที่ (line pattern) บนกุหลาบพันธุ์ Lolita	17
7	แสดงอาการด่างลายแผนที่ (line pattern) บนกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece	18
8	แสดงอาการด่างแผลวงแหวน (concentric rings) ของกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece	18
9	แสดงอาการใบเปลี่ยนรูปร่าง (leaf deformation) และเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) บนกุหลาบพันธุ์ Eiffle Tower	19
10	แสดงอาการขอบใบย่นบิดเบี้ยว (leaf puckering) ร่วมกับอาการใบด่างลายแผนที่ (line pattern) ในระยะเริ่มต้นบนกุหลาบพันธุ์ Eiffle Tower	19
11	แสดงอาการขอบใบย่นบิดเบี้ยว (leaf puckering) ร่วมกับอาการใบด่างลายแผนที่ (line pattern) ที่อาการรุนแรงบนกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece	20
12	แสดงอาการด่างเหลืองลายแผนที่ (line pattern) และใบบิดเบี้ยว (leaf distortion) บนกุหลาบพันธุ์ Eiffle Towers	20
13	แสดงอาการใบด่าง (mosaic) บนกุหลาบพันธุ์ Bravo friendship	21
14	แสดงอาการด่าง (mosaic) บนกลีบเลี้ยงของดอกกุหลาบพันธุ์ Red Masterpiece	21
15	แสดงอาการด่างเป็นขีดเล็ก ๆ (streaking) บนดอกกุหลาบพันธุ์ Christian Dior	24
16	แสดงขนาดและจำนวนชั้นของกลีบดอกที่ลดลงรวมถึงความยาวก้านดอกสั้นบนกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece	24
17	เปรียบเทียบขนาดต้นกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece ที่แคระแกรนเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสกับต้นที่มีการเจริญเติบโตปกติในแปลงปลูก จังหวัดนครปฐม	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	แสดงอาการแผลจุดแห้งสีน้ำตาล (brown necrotic) บนใบแท้คู่แรกของถั่วเขียว (*Phaseolus aureus*) ที่ทำการปลูกเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV)	26
19	แสดงอาการด่างตามแนวเส้นใบบนใบแท้ของแตงกวา (*Cucumis sativus*) เนื่องจากเชื้อ cucumber mosaic virus	27
20	แสดงอาการแผลจุดแห้งบนใบยาสูบ (*Nicotiana glutinosa*) ที่ได้รับการปลูกเชื้อ cucumber-mosaic virus (CMV)	27
21	แสดงอาการแผลจุดเหลือง (chlorotic spots) บนใบยาสูบ *Nicotiana tabacum* 'White Burley' ที่ทำการปลูกเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV)	29
22	แสดงอาการด่างสีเขียวอ่อน (mottle) เริ่มจากโคนใบ ซึ่งเป็นอาการ systemic บน *C.henopodium quinoa* สาเหตุจากเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)	30
23	แสดงอาการแผลจุดเหลืองกระจายทั่วใบ (yellow mottle) บนใบแท้ของแตงกวา *Cucumis sativus* ซึ่งจัดเป็นอาการ systemic สาเหตุจากเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)	30
24	แสดงลักษณะ dsRNA ที่แยกได้จากกุหลาบที่แสดงอาการของโรคไวรัส	31
25	แสดงลักษณะ pattern ของ dsRNA บน agarose gel	32
26	แสดงลักษณะ pattern ของ dsRNA ที่แยกสกัดได้จากพืชทดสอบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายเปรียบเทียบกับตัวมาตรฐาน Lambda DNA ที่ถูกย่อยสลายโดย Hind III	33
27	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของกุหลาบพันธุ์ Lolita ที่ถูกเชื้อ PNRSV เข้าทำลายโดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 เดือน	35
28	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของกุหลาบที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่ผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1- Adamantanamine hydrochloride	36
29	แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาจากการทดสอบ ELISA test ของกุหลาบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 3 มิลลิกรัม/ลิตร IAA 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร และสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1- Adamantanamine hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสกุหลาบ โดยเทคนิคการแยกกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ

Detection of Virus Diseases on Roses by Extraction of Double – Stranded RNA (ds RNA) Method

นวลพรรณ งามยี่สุ่น

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล. กรุงเทพฯ 10520

Dept. of Plant Pest Management Technology,

Fac. of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok 10520.

คำนำ

กุหลาบจัดเป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ที่มีการปลูกเป็นการค้าอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยมีประเทศเนเธอร์แลนด์เป็นผู้ผลิตและส่งออกดอกกุหลาบเป็นอันดับหนึ่งของโลก ส่วนในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกุหลาบประมาณ 3,500 ไร่ จำนวนเกษตรกรประมาณ 6,000 คน ให้ผลผลิตมูลค่าประมาณปีละ 350 ล้านบาท แหล่งปลูกกุหลาบเป็นการค้าที่สำคัญบริเวณรอบนอกกรุงเทพฯ คือที่อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ในเขตภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ซึ่งผลิตกุหลาบตัดดอกโดยนำพันธุ์มาจากต่างประเทศ และมีแนวโน้มในการขยายการปลูกเพิ่มขึ้นในจังหวัดอื่น เช่น จังหวัดตาก ส่วนในเขตพื้นที่ภาคใต้มีการปลูกกุหลาบในจังหวัดสงขลา

การผลิตกุหลาบในประเทศไทย นอกจากจะเพื่อตัดดอกและปลูกเป็นไม้กระถางหรือปลูกเป็นแปลงใหญ่หรือสวนหย่อมเพื่อตกแต่งสถานที่ ยังใช้เป็นส่วนประกอบในการร้อยพวงมาลัยและเป็นวัตถุดิบในการทำดอกไม้แห้งหอมและการทำน้ำมันหอมระเหย ทำให้ปริมาณความต้องการในการใช้ดอกกุหลาบที่มีคุณภาพในประเทศมากขึ้น จนกระทั่งต้องมีการนำเข้าดอกกุหลาบจากต่างประเทศสูงขึ้น ตัวเลขที่แสดงปริมาณการนำเข้าดอกกุหลาบโดยผ่านด่านตรวจพืช ท่าอากาศยานกรุงเทพฯ ในปี พ.ศ. 2531 – 2533 พบว่าอัตราการนำเข้าเฉลี่ยใน 3 ปี เพิ่มขึ้นประมาณ 38.33 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นเพื่อการทดแทนการนำเข้ากุหลาบและการส่งเสริมการส่งออกในอนาคต การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการบริหารโรคอย่างมีประสิทธิภาพจึงจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิต

ในการปลูกกุหลาบเพื่อการค้า โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสนั้นเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่ง เนื่องจากเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านต้นพันธุ์ที่มีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual propagation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการปักชำ ติดตา หรือทาบกิ่ง ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์หลักของกุหลาบ ทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อเป็นไปอย่างกว้างขวางในหลายพื้นที่ ผลจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส ทำให้การเจริญเติบโตของต้นกุหลาบ ใบและดอกผิดปกติ เช่น ก้านดอกสั้น ขนาดดอกเล็ก ต้นแคระแกรน รวมถึงทำให้ต้นเจริญเติบโตช้า ทรุดโทรม ใบหงิกงอ ดอกกุหลาบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายทำให้กลีบดอกด่าง ขนาดดอกเล็กลงทำให้ขายได้ในราคาต่ำ ดังนั้นการนำเทคนิคการตรวจสอบเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพบนต้นตอและกิ่งพันธุ์ก่อนนำมาขยายพันธุ์หรือนำเข้าในแปลงปลูก รวมทั้งข้อมูลรายละเอียดเรื่องของโรคไวรัสจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรผู้ปลูกกุหลาบเป็นการค้า

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ
2. เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบเชื้อไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ โดยการแยกกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อไวรัสสาเหตุ
3. เพื่อประเมินความเสียหายของกุหลาบที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส
4. เพื่อหาแนวทางในการผลิตกุหลาบปลอดโรคไวรัสจากกิ่งพันธุ์ที่ติดเชื้อ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เทคนิคที่เหมาะสมในการแยกกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อไวรัส ซึ่งสามารถนำมาเป็นพื้นฐานในการวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการ Dot–Blot Hybridization จากน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรคและการสร้างดีเอ็นเอตัวตรวจ (cDNA probe) ซึ่งจะมีความไวของ ปฏิกิริยาและความเฉพาะของเชื้อมากขึ้น
2. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกุหลาบที่มีคุณภาพ โดยการนำเทคนิคการตรวจสอบเชื้อมาใช้ในการตรวจสอบกิ่งพันธุ์และต้นตอกุหลาบป่าก่อน การนำไปปลูกในแปลงเพื่อเป็นการป้องกันการนำเชื้อไวรัสเข้าสู่แปลงปลูกเป็นการลดความเสียหายที่จะเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ข้อมูลจากการสำรวจโรค เช่น ลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏในแปลงปลูกจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในการตรวจสอบอาการของโรคในแปลงปลูก เพื่อพิจารณาในการป้องกันกำจัดโรค

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไวรัสที่พบเกิดในกุหลาบ ได้แก่ โรคด่างในกุหลาบ (rose mosaic virus) มีการศึกษาครั้งแรกในปี 1928 พบทั่วไปในพื้นที่ปลูกกุหลาบทั้งหมด อาการเกิดแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อม แต่จะพบมากที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 15-20° C หรือ 59-69° F ตัวอย่างของอาการที่ปรากฏจะมีลักษณะเป็นจุด chlorotic โดยเริ่มจากจุดเล็ก ๆ แล้วขยายกว้างออกไปรอบข้างและอาจแพร่กระจายสู่ใบอื่น บางครั้งพบอาการเหลืองซีดเป็นวงแหวนหรือเป็นเส้นคลื่น เป็นผลให้การเจริญของต้นลดลง แคระแกร็น ก้านดอกสั้น และสีดอกซีดจาง ส่วนตามีอาการซีด ลำต้นสั้นไม่สมบูรณ์ (Krussmann, 1981 ; Westcott, 1971)

เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดได้โดยการติดตาหรือทาบกิ่ง (Krussmann, 1981) แต่ไม่พบว่ามีแมลงพาหะ (Bawden, 1964 ; Krussmann, 1981 ; Westcott, 1971) ส่วนการถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical transmission) จากกุหลาบสู่กุหลาบปรากฏว่าไม่ประสบผลสำเร็จ แต่ในพืชอาศัยชนิดอื่น สามารถถ่ายทอดได้ (Bawden, 1964)

Bawden (1964) กล่าวถึงอาการบนกุหลาบบางพันธุ์เนื่องจากเชื้อ rose mosaic virus ดังนี้

Rosa spp. อาการจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกุหลาบที่ถูกเข้าทำลาย ในกุหลาบตัดดอกจะมีอาการดังนี้ คือ ต้นแคระแกร็น ซึ่งความรุนแรงจะขึ้นกับชนิดของกุหลาบ ความรุนแรงของการติดเชื้อและสภาพแวดล้อม อาการแคระแกร็นจะเกิดได้ในทุกส่วนของพืช รวมไปถึงส่วนรากด้วย ส่วนตาของพืชที่ติดเชื้อมักจะมีอาการซีดขาว ลำต้นสั้นและไม่สมบูรณ์ ในพืชที่ติดเชื้อรุนแรง เช่นในพันธุ์ Madame Butterfly กลีบดอกจะมีสีขาวแทนที่จะเป็นสีชมพูตามปกติ ใบผิดรูปร่างบิดเบี้ยว ใบอ่อนจะแสดงอาการ chlorotic ตรงบริเวณเส้นกลางใบ และเกิดการพับย่นไม่เรียบ บางครั้งอาการ chlorotic อาจจะเกิดเพียงด้านใดด้านหนึ่งของใบ และทำให้เกิดอาการบิดเบี้ยวเพราะการเจริญของทั้ง 2 ด้านไม่เท่ากัน

Rosa manetti ในกุหลาบชนิดนี้ พบอาการ 2 ลักษณะ คือ จะมีอาการ chlorotic ในใบอ่อนหรือยอดอ่อนหรือรอบ ๆ ใบอ่อน ส่วนอาการอีกลักษณะนอกจากจะมีอาการ chlorotic แล้วยังมีอาการด่างเป็นจุด ๆ (mottle)

Rosa odorata พืชชนิดนี้จะไม่พบการติดเชื้อโดยทั่วไป แต่จะติดเชื้อเมื่อมีการทาบกิ่งกับ Madame Butterfly โดยจะแสดงอาการบิดเบี้ยว ผิดรูปร่างและแคระแกร็นที่ใบ ที่ลำต้นจะมีอาการ mottle อาการอื่น ๆ จะพัฒนาขึ้นในใบแก่ มีแถบสีเขียวค่อนข้างเหลืองที่บริเวณเส้นกลางใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rosa multiflora บางส่วนของลำต้นจะแคระแกร็นและใบผิดรูปร่าง แต่ไม่มีอาการอื่น ๆ ที่ใบ ที่ลำต้นมีอาการด่างเป็นจุด ๆ แต่จะน้อยกว่าใน *R. odorata*

Rose mosaic virus (RMV) และ Apple mosaic virus (ApMV) จะก่อให้เกิดอาการคล้ายกันในพืชอาศัยหลาย ๆ ชนิด เช่นใน *Rosa setigera* Michx. ที่ติดเชื้อ ApMV โดยการทาบกิ่ง ทำให้เกิดอาการ chlorotic lines ซึ่งมีอาการคล้ายกับต้นที่ติดเชื้อ RMV เชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด จะมีคุณสมบัติทางกายภาพ และขนาดใกล้เคียงกันและสามารถทำปฏิกิริยากับ antiserum ของอีกเชื้อหนึ่งได้ จึงจัดว่าเชื้อทั้ง 2 มีความสัมพันธ์กันในด้านของเซรุ่มวิทยา (Fulton, 1968)

Slack และคณะ (1976) รายงานถึงต้นกุหลาบที่เป็นโรค rose spring dwarf (RSD) ซึ่งแสดงอาการ balled หรือ rosetted growth ในช่วงฤดูใบไม้ผลิใบอ่อนที่เริ่มผลิตจากตาจะมีขนาดเล็กกว่าปกติ ใบโค้งงอ และปรากฏเป็นร่างแหซึ่งขยายกว้างเป็น vein-clearing ในระยะต่อมายอดอ่อนที่เข้าสู่ระยะยืดตัว (elongation) อาการดังกล่าวจะปรากฏลดลงและเมื่อมีการเจริญเติบโตมากขึ้น อาการจะไม่ค่อยปรากฏให้สังเกตเห็น ลักษณะอาการพื้นฐานโดยทั่วไปของโรค RSD คือ กุหลาบจะแสดงอาการใบโค้งงออย่างเห็นได้ชัด เช่น กุหลาบพันธุ์ Burr Multiflora และ Dr. Huey, rootstocks จากการนำตาปกติของกุหลาบพันธุ์ Queen Elizabeth และ Gold Cup มาติดตาบนต้นตอกุหลาบพันธุ์ Dr. Huey มีการติดเชื้อไวรัสโรค RSD ผลปรากฏว่าต้นกุหลาบส่วนใหญ่มีการพัฒนาอาการของโรค rose spring dwarf

Powell (1982) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของกุหลาบพันธุ์ Victoria ที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ PNRSV พบว่าการเจริญของทรงพุ่มจะลดลง มีขนาดเล็กกว่าต้นกุหลาบปลอดโรค นอกจากนี้ผลผลิตกุหลาบตัดดอกที่ได้มีจำนวนลดลงถึง 40% ลักษณะดอกผิดรูปร่างไม่ตรงตามพันธุ์ นอกจากนี้อาการด่างยังเกิดจากเชื้อ apple mosaic virus (ApMV) ซึ่งรายงานโดย Fulton (1968) และยังพบอาการด่างที่เกิดจากการเข้าทำลายร่วม (mixed infection) ของเชื้อ PNRSV และ ApMV (Casper, 1973)

Thomas (1984) รายงานว่า ในการทดลองปลูกเชื้อ PNRSV และ ApMV ลงบนกุหลาบ พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถเข้าทำลายกุหลาบได้ โดยจะเข้าทำลายในช่วงเวลาและอุณหภูมิต่างกัน แต่ในการปลูกเชื้อทั้งสองลงในกุหลาบพร้อมกัน จะทำให้เกิดอาการของโรคเช่นเดียวกับการปลูกเชื้อ PNRSV ลงก่อนแล้วปลูกซ้ำด้วยเชื้อ ApMV

อนุภาคของเชื้อ ApMV มีขนาด 25-29 nm. PNRSV ขนาด 22-23 nm. และ AMV ขนาด 30 nm. ระดับความร้อนที่ทำให้เชื้อไม่สามารถก่อโรคได้ (TIP) เมื่อถูกความร้อนนาน 10 นาที ใน ApMV คือ 25^0 C ใน PNRSV 55-62^0 C และใน AMV 55-61^0 C การถ่ายทอดเชื้อไวรัสในกุหลาบจะปรากฏอย่างจำกัด เมื่อส่วนที่ติดเชื้อ เช่น ส่วนตา กิ่งตอน หรือในต้นที่ถูกนำไปทาบ (graft) กับพืชปกติ (Horst, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี 1986 Curtis และ Moran ศึกษาโรคใบด่างบนกุหลาบพันธุ์ Victoria และพบว่าเชื้อสาเหตุคือเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (RNRSV) โดยพบอาการด่างทั่วใบ (mosaic) และด่างเป็นแถบหรือเส้น (line pattern) ซึ่งความรุนแรงของอาการจะขึ้นอยู่กับ strain ของเชื้อพันธุ์กุหลาบและสภาพแวดล้อม การเข้าทำลายของเชื้อจะมีผลให้การเจริญของดอกช้าลง ลักษณะดอกผิดปกติ

Horst (1989) กล่าวว่าโรค Rose mosaic virus พบทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกกุหลาบซึ่งที่มีรายงานคือ ในสหรัฐอเมริกา, อังกฤษ, นิวซีแลนด์, อิตาลี, เดนมาร์ก, เยอรมัน, อินเดีย, ออสเตรเลีย, เนเธอร์แลนด์, อเมริกาใต้ อาการของโรคจะมีลักษณะต่าง ๆ แตกต่างกันไป ได้แก่จุดเหลืองลายแผนที่ (chlorotic line patterns) จุดวงแหวน (ring spot) ใบด่างเหลืองเป็นแต้ม (mottles) อาการเหลืองเป็นร่างแหและอาการด่างเหลืองก็เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคด่างในกุหลาบเช่นกัน แม้ไม่มีการรายงานว่า มีผลในการทำลายดอก แต่ก็พบว่าใบถูกทำลายทั้งหมด การเข้าทำลายทำให้พืชอ่อนแอและตายได้ง่าย ในสภาพอากาศหนาวเย็นจะเกิดเป็นแถบที่เส้นใบ เมื่ออุณหภูมิสูงประมาณ 21^0 C หรือมากกว่า โรคด่างในกุหลาบนี้ อาการจะสังเกตเห็นได้ยากใน *Rosa manetti* แต่พบรุนแรงในพันธุ์ Madame Butterfly , Ophelia และ Rapture อาการจะแสดงออกมากหรือน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพืชและช่วงเวลาซึ่งโดยปกติจะแสดงอาการของโรคเด่นชัดในช่วงฤดูใบไม้ผลิ

เชื้อสาเหตุของโรคปกติจะเกิดจาก prunus necrotic ringspot virus (RNRSV) อาจเป็น PNRSV ตัวเดียว หรือมีเชื้อไวรัสตัวอื่นร่วมด้วยก็จะแสดงอาการคล้าย ๆ กัน เช่น เชื้อ apple mosaic virus (ApMV) arabis mosaic virus (AMV) ไม่ว่าจะร่วมกับ PNRSV หรือแยกกัน จะก่อให้เกิดอาการเหลืองเป็นลายแผนที่ เป็นจุดวงแหวนหรือด่างเป็นจุด ๆ บนใบ (mottle) แต่ถ้าเป็นเชื้อ AMV ร่วมกับ เชื้อ PNRSV จะก่อให้เกิดอาการเหลืองตามเส้นใบ ซึ่งอาการนี้อาจเกิดจากเชื้อ PNRSV เพียงตัวเดียวก็ได้ โดยจะเกิดอาการนี้เมื่อถูก PNRSV เข้าทำลาย ภายใต้อุณหภูมิสูงกว่า 21^0 C

โรค Rose yellow mosaic virus อาการที่เกิดจะคล้ายกันมากกับใน rose mosaic แต่อาการด่างจะมีสีเหลืองซีดกว่าและวินิจฉัยโรคได้ง่ายกว่า ความหลากหลายของอาการที่แสดงจะขึ้นอยู่กับจำนวนที่แตกต่างกันของ strains ของเชื้อไวรัส (Krussmann, 1981) ในพืชวงศ์ Rosaceae เช่น *Rosa* spp. พบอาการของโรค rose yellow mosaic ซึ่งถ่ายทอดโดยการทาบกิ่ง จาก sweet cherry หรือ sour cherry ไปสู่กุหลาบทำให้ติดเชื้อ necrotic ringspot เกิดอาการด่างเหลือง (yellow mosaic) ลักษณะอาการด่างในกุหลาบที่เป็นโรค rose yellow mosaic จะแตกต่างกันในแต่ละชนิด มีการเปรียบเทียบอาการด่างเหลืองในกุหลาบ 5 พันธุ์ คือพันธุ์ Briareliffe, Madame Butterfly, C.F. Meyer , Margaret McGredy และ Talisman แสดงให้เห็นว่ามีอาการแตกต่างกัน ข้อสังเกตความแตกต่างนี้ใช้ในการแยก strains ของเชื้อไวรัสในพันธุ์ Talisman จะแสดงอาการด่างอย่างชัดเจน ซึ่งจะแตกต่างกับอาการด่างในกุหลาบอื่น ๆ ยกเว้นพันธุ์ Paul's Scarlet Climber สำหรับพันธุ์ Briarcliffe จะก่อให้เกิดอาการด่างเหลืองซีดในลำต้นอ่อน ในต้นกล้าของพันธุ์ Multiflora จะเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเป็นริ้วสีน้ำตาลและเป็นรอยปุ่ปะที่เปลือกของลำต้น อาการต้นแคระแกร็นทั้งในใบและยอดมีอาการ die back นอกจากนั้นยังพบอาการ yellow watermark patterns (Smith, 1972)

เชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) หรือเรียกในชื่ออื่นได้ว่า necrotic rir:gspot virus, cherry ringspot virus, cherry tatter-leaf virus (Smith, 1972) ไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ โดยการทาบกิ่ง และโดยวิธีกลผ่านทางน้ำค้น (Brunt *et al*,. 1995 ; Smith. 1972) และทางเมล็ด (ใน *Prunus pensylvanica* มากกว่า 80% แต่พบน้อยมากใน peach) ถ่ายทอดทางเกสรในพืชที่ผสมเกสร (Brunt *et al*., 1995) และยังไม่มีข้อมูลใดกล่าวถึงการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ (Brunt *et al*., 1995 : Smith, 1972)

คุณสมบัติของอนุภาคไวรัส PNRSV ในน้ำคั้นพืช อุณหภูมิที่ทำให้สูญเสียสภาพการเป็นเชื้อก่อโรค (TIP) คือ 55-62^0 C (Brunt *et al*,. 1995) หรือ 50-55^0 C และจุดที่ไวรัสในน้ำคั้นพืชเจือจางที่สุดที่ยังสามารถทวีจำนวนได้ในพืชอาศัย (dilution end-points) คือ 1 : 50 – 1 : 100 (Smith, 1972)อายุของเชื้อในหลอดทดลองที่เก็บในอุณหภูมิห้องที่ยังก่อให้เกิดโรคได้คือ 0.4 – 0.75 วัน หรือ 6 –18 ชั่วโมง อนุภาคมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 23, 25, 27 nm. (Brunt *et al*., 1995) หรือประมาณ 28 –29 nm. (Smith, 1972)

พืชอาศัยของเชื้อ PNRSV มีอยู่มากได้แก่ peach, plum, cherry, almond, apricot และพืชอาศัยอื่น ๆ ที่อยู่ใน *Prunus* spp. ส่วนในพืชตระกูลอื่นก็ได้แก่ กุหลาบ แอปเปิ้ล พืชพวกแตง แตงโม ยาสูบ และพิทูเนีย เป็นต้น (Smith, 1972)

การนำเทคนิคการแยกการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อไวรัสพืชส่วนใหญ่ โดยอาศัยปรากฏการณ์ของขบวนการเข้าทำลายพืชโดยเชื้อไวรัสในระหว่างการทวีจำนวนของเชื้อ (multiplication) จะมีการสร้าง double stranded RNA (dsRNA) ก่อนที่สาย RNA ใหม่จะแยกตัวออกเพื่อสร้างโปรตีนห่อหุ้มเกิดเป็นอนุภาคใหม่ขึ้น ซึ่งขนาดของ dsRNA ที่เกิดขึ้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ > 0.1 x 10^6 dalton การวินิจฉัยชนิดของเชื้อจะพิจารณาจากลักษณะจำนวนและระยะทางการเคลื่อนที่ของ dsRNA บนตัวกลาง เช่น agarose หรือ polyacrylamide gel (Dodds *et al*., 1984) ขั้นตอนการปฏิบัติโดยการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคด้วยสารละลาย phenol อิ่มตัวและตกตะกอนด้วย ethanol 30% ก่อนนำมาแยกขนาดของกรดนิวคลิอิคสายคู่ด้วยเครื่องแยกสายไฟฟ้า (electrophoresis) เพื่อคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลของกรดนิวคลิอิคสายคู่นั้น ๆ วิธีนี้ได้ถูดกัดแปลงและนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส และกลุ่มของเชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น การตรวจสอบโรคไวรัสของเห็ด (Morris and Dodds, 1979) เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายยาสูบ (Ikegami and Fraendel – Conrat, 1979) เชื้อ lettuce speckles mottle (Fald *et al*., 1979) เชื้อ barley yellow dwarf (Gildow *et al*,. 1983) โรค avocado streak disease (Jordan *et al*,. 1983) โรค lettuce big vein (Mirkov and Dodds, 1983) ไวรัสในกลุ่ม closterovirus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Dodds and Bar – Joseph, 1983) ไวรัสใบด่างของ Cassia corymbosa (Nagmyeesoon and Hicks, 1988) และไวรัสในไม้ประดับเนื้อแข็ง (Hicks *et al.*, 1988)

การรักษาที่ดีที่สุดสำหรับโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส คือ การป้องกันโดยไม่ปลูกพืชลงในพื้นที่ที่มีเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ใช้เมล็ด และท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค การปฏิบัติทางการเกษตรที่พิเศษจำเป็นต่อการทำให้แน่ใจว่าพืชที่ปลูกนั้นไม่เป็นโรค ส่วนขยายพันธุ์ของพืชอันได้แก่ หัว ตา หน่อ ฯลฯ จะต้องแน่ใจว่าไม่มีอาการโรคปรากฏอยู่โดยเด็ดขาด เพราะหากมีอาการของโรคอยู่แม้เพียงเล็กน้อย แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อก็เป็นการแพร่ของเชื้อโรคได้ ดังนั้นในการขยายพันธุ์จึงจำเป็นต้องมั่นใจว่า ชิ้นส่วนที่ใช้ขยายพันธุ์นั้นปราศจากโรคอย่างแท้จริง ซึ่งมีวิธีการในการปฏิบัติดังนี้ คือ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นการนำส่วนที่มีชีวิตของพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ควบคุมได้ทั้งแสง ความชื้น และอุณหภูมิ ใช้สร้างต้นพืชที่ปราศจากโรคได้ (สุรวิช, 2524) เช่น จากรายงานของ De Vries-Paterson และคณะ (1992) กล่าวว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน apical shoot tips ที่ติดเชื้อ asparagus virus I (AV-I) และ asparagus virus II (AV-II) นั้น มีต้นพืชที่ได้ คิดเป็น 8.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจทำร่วมกับวิธีอื่น เช่น Heat treatment ก็ได้ในที่สุดก็จะได้พืชที่ปราศจากเชื้อไวรัส และจากต้นที่ได้นี้ จึงนำไปขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต่อไป (อรดี, 2522)

2. การกำจัดเชื้อไวรัสโดยใช้ความร้อน ได้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อผลิตพืชปลอดโรค โดยการนำพืชเหล่านั้นมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35-40^0 C ในช่วงระยะหนึ่ง อาจเป็น 1 – 2 เดือน เช่น ปริมาณของเชื้อ cymbidium mosaic virus ในหวายปอมปาดัวร์ จะลดลงเมื่อให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 35-40^0 C เป็นเวลา 1 เดือน (นวลพรรณ, 2538) โรค rose mosaic virus รักษาโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 52^0 C หรือ 126^0 F เป็นเวลา 5 นาที (Krussmann, 1981) ความสำเร็จในการกำจัดเชื้อไวรัสด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อที่จะเพิ่มจำนวน และเคลื่อนย้ายสู่เซลอื่น ๆ ของพืชได้รวดเร็วเพียงใดภายในพืชที่ถูกนำมาไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว พืชในกลุ่มไม้ประดับจะมีความสามารถในการทนความร้อนได้แตกต่างกัน (นวลพรรณ, 2538)

Monette (1983) รายงานว่า การทำ heat therapy ในห้องปฏิบัติการร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน shoot – tip ประสบความสำเร็จในการทำให้ grapevine (*Ranny vira*) ปราศจากเชื้อ grapevine fanleaf virus ได้ และมีความหวังในการใช้สารเคมีพวก Ribavirin ร่วมกับการเพาะเลี้ยง shoot-tip เพื่อผลิตพืชปราศจากไวรัส

3. การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดเชื้อไวรัส Raychaudhuri (1977) กล่าวว่า สารเคมีในกลุ่มต่างๆได้แก่ growth regulators, antibiotics, metabolites, anti-metabolites, amino acids, aflatoxins และ surfactants ช่วยรักษาโรคไวรัสได้ โดยการนำสารเคมีเหล่านี้มาผสมในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ติดเชื้อไวรัส ตัวอย่างเช่น ใช้ growth reguiators เช่น indolebutylic acia, indoleacetic

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acid, gibberellic acid และ 2,4- dichlorophenoxyacetic acid พบว่าช่วยลดความเข้มข้นของเชื้อ tobacco mosaic virus, cowpea mosaic virus, potato virus X และ potato virus Y ในเนื้อเยื่อพืช

ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสของ anti-viral ทดสอบโดยการผสมสารเหล่านั้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สารพวก Blasticidine, aflatoxin, surfactants, tannic acid, ellagic acid และน้ำคั้นพืช พบว่าสามารถลดปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ TMV, CpMV, PVX และ PVY ได้ และในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้สาร gallic acid และ gallotannin ช่วยยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสได้ (Raychaudhuri, 1977)

Mehrotra (1980) กล่าวว่า antiviral สามารถแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ พวกที่ยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสและพวกที่ยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส

antiviral ที่ยับยั้งเชื้อไวรัส จะยับยั้งการที่น้ำคั้นพืช microorganism และแมลงพาหะส่วน antiviral ที่ยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส จะไปยับยั้งขบวนการ metabolites ของเชื้อ ในญี่ปุ่นพบว่า Blasticidin S ซึ่งเป็นสาร antibiotic ที่แยกจาก *Streptomyces griseochromogenes* พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ TMV ในใบยาสูบได้และยังมีสาร antibiotic อื่น ๆ อีกหลายชนิด ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส เช่น Trichothecin ยับยั้งเชื้อ PVY ในใบยาสูบ gentamicin ยับยั้งเชื้อ TMV และ Actinomycin D ยับยั้ง เชื้อ cowpea yellow mosaic virus

ปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีใดที่ใช้ในการกำจัดเชื้อไวรัสโดยตรง แต่มีรายงานความสำเร็จในการใช้สารเคมีในการผลิตต้นเบญจมาศให้ปลอดเชื้อ aspermy virus และต้นคาร์เนชั่นที่ปลอดจากอาการด่าง นอกจากนี้ยังมีการนำสาร Amantadine ผสมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเบญจมาศเพื่อกำจัดเชื้อไวรอยด์และการกำจัดเชื้อ strawberry latent ringspot virus ในต้น *Caryopteris clandonensis* การใช้สาร 2-Thiouracil และสาร Aspirin ลดความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อ CyMV เมื่อฉีดสารเคมีเข้าภายในใบพืชทดสอบก่อนการปลูก การใช้สารพวก antiviral เพื่อผลิตต้นพืชที่ปลอดโรคไวรัสจะมีปัญหาอันเนื่องมาจากขบวนการ metabolism ของเชื้อไวรัส และในพืชที่เชื้อจะเข้าทำลายจะใกล้เคียงกันมาก จนอาจเป็นอันตรายกับเนื้อเยื่อเจริญของพืช (นวลพรรณ, 2538)

Cheplick and Agrios (1983) รายงานว่า สารเคมีสังเคราะห์ ได้แก่ Ribavirin เมื่อฉีดด้วยความดันลงบนต้น apple ที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ApMV ในช่วงฤดูใบไม้ผลิ จะช่วยกำจัดอาการของโรคได้อย่างสมบูรณ์ หลังช่วงฤดูใบไม้ร่วง ทั้งในสวนและใน greenhouse ที่ทำการปลูกเชื้อ apple mosaic virus

Kim และคณะ (1996) ทำการศึกษาโดยการทำการทดลองเลี้ยงส่วน shoot – tip ของ lily ที่ติดเชื้อ tulip beaking virus, cucumber mosaic virus และ lily symptomless virus ในอาหารที่ผสมสาร virazole ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสดังกล่าวลดลงมากขึ้น เมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างของกุหลาบที่แสดงอาการเนื่องจากเชื้อไวรัส

การสำรวจโรคไวรัสและเก็บตัวอย่างของกุหลาบที่แสดงอาการเนื่องจากเชื้อไวรัสได้ศึกษาต่อเนื่องตั้งแต่ช่วงเดือน ตุลาคม 2538-2539 โดยการสังเกตอาการที่ผิดปกติของกุหลาบ ซึ่งคล้ายคลึงกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส (virus – like symptom) จากแหล่งปลูกในเขตจังหวัดนครปฐม เชียงใหม่ เชียงราย และสงขลา โดยทำการบันทึกลักษณะอาการอย่างละเอียดและเก็บตัวอย่างใบกุหลาบที่เป็นโรคโดยแยกตามพันธุ์และอาการที่แตกต่างกันออก นำมาใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิทแล้วนำไปเก็บใส่ในกระติกเก็บความเย็น เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อและการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ (dsRNA) ของเชื้อต่อไป

2. การประเมินความเสียหายของกุหลาบที่เกิดจากเชื้อไวรัสในแปลงปลูก

การประเมินความเสียหายของกุหลาบเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2538-2539 โดยการสุ่มตัวอย่างจากแปลงปลูกกุหลาบในแหล่งต่าง ๆ โดยสุ่มพันธุ์กุหลาบพันธุ์ละ 1 แปลง (แปลงละประมาณ 200-300 ต้น) สำรวจความเสียหายของต้นกุหลาบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ซึ่งสังเกตจากลักษณะอาการที่ปรากฏบนใบ ลำต้น และดอก แล้วจดบันทึก

การบันทึกและแบ่งระดับความเสียหายจากอาการที่ปรากฏบนต้นกุหลาบจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส โดยแบ่งระดับความเสียหายดังนี้

ระดับ 0 คือ แสดงอาการปกติ

ระดับ 1 คือ แสดงอาการของโรคบนต้นเพียงเล็กน้อย

ระดับ 2 คือ แสดงอาการของโรคบนต้นปานกลาง

ระดับ 3 คือ แสดงอาการของโรคบนต้นอย่างรุนแรง

3. การศึกษาคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อ

พืชอาศัยที่ใช้ทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยน้ำคั้นของพืชเป็นโรค (Sap transmission) อยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae วงศ์ Cucurbitaceae วงศ์ Leguminosae และวงศ์ Solanaceae โดยพืชเหล่านี้จะถูกคลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อเพื่อเพิ่มความอ่อนแอในต้นพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปลูกเชื้อทำโดยการบดใบพืชที่เป็นโรคในสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.5 โดยมีการเติมสาร additive บางชนิดเพื่อช่วยลดปัญหาการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้นจากพืช พวกไม้เนื้อแข็ง เช่นสาร PVP (polyvinyl-pyrrolidone) 5-10% อัตราส่วนของส่วนใบพืชต่อ buffer คือ 1 : 4 (น้ำหนัก : ปริมาตร) สารที่ใช้ในการทำแผลบนใบพืชคือ celite 545 โดยการเติมสารนี้ลงในน้ำคั้นของพืชเป็นโรค ก่อนที่จะทาน้ำคั้นบนใบพืชอาศัยที่ใช้ทดสอบ แล้วจึงทำการล้างเศษพืชที่ตกค้างอยู่บนใบพืชที่ทำการปลูกเชื้ออย่างรวดเร็ว แล้วคลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เปียกน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่พืชเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเคลื่อนย้ายเข้าสู่เรือนทดลองกันแมลง ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อสังเกตอาการและทำ single lesion isolate 3 ครั้งต่อเนื่องก่อนนำพืชที่ได้ไปทำการศึกษาต่อ

รายชื่อของพืชทดสอบที่ใช้ศึกษาคุณสมบัติการถ่ายทอดเชื้อโดยผ่านทางน้ำคั้น(ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายชื่อพืชทดสอบในการการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้น (Sap transmission)

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ระยะการเจริญของพืชในขณะทำการปลูกเชื้อ
Chenopodiaceae	*Chenopodium quinoa*	ใบแท้ใบที่ 4 – 5
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	ใบเลี้ยง
	Cucurbita pepo	ใบเลี้ยง
Leguminosae	*Phaseolus aureus*	ใบแท้คู่ที่ 1
	Phaseolus vulgaris	ใบแท้คู่ที่ 1
	Vicia faba	ใบแท้คู่ที่ 4-5
	Vigna sesquipedalis	ใบแท้คู่ที่ 1
	Glycine max	ใบแท้คู่ที่ 1-2
Solanaceae	*Nicotiana tabacum*	ใบแท้ใบที่ 3-4
	Nicotiana glutinosa	ใบแท้ใบที่ 3-4

4. การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส โดยการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ (dsRNA) ของเชื้อ

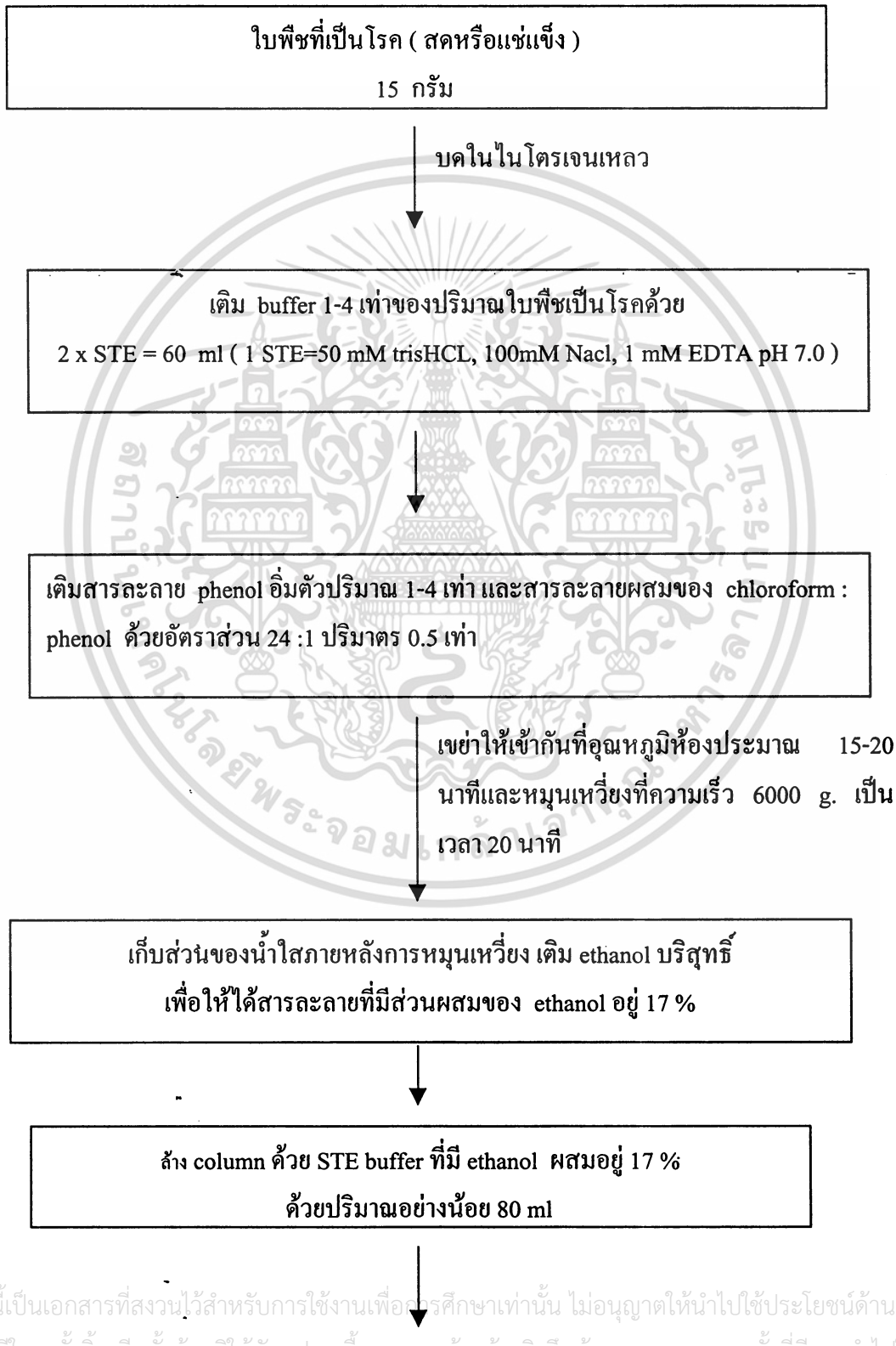
เทคนิคในการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อไวรัส (dsRNA) เพื่อการตรวจสอบและวินิจฉัยชนิดของเชื้อสามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ (dsRNA extraction)
2. การใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก dsRNA ของเชื้อ (electrophoresis)

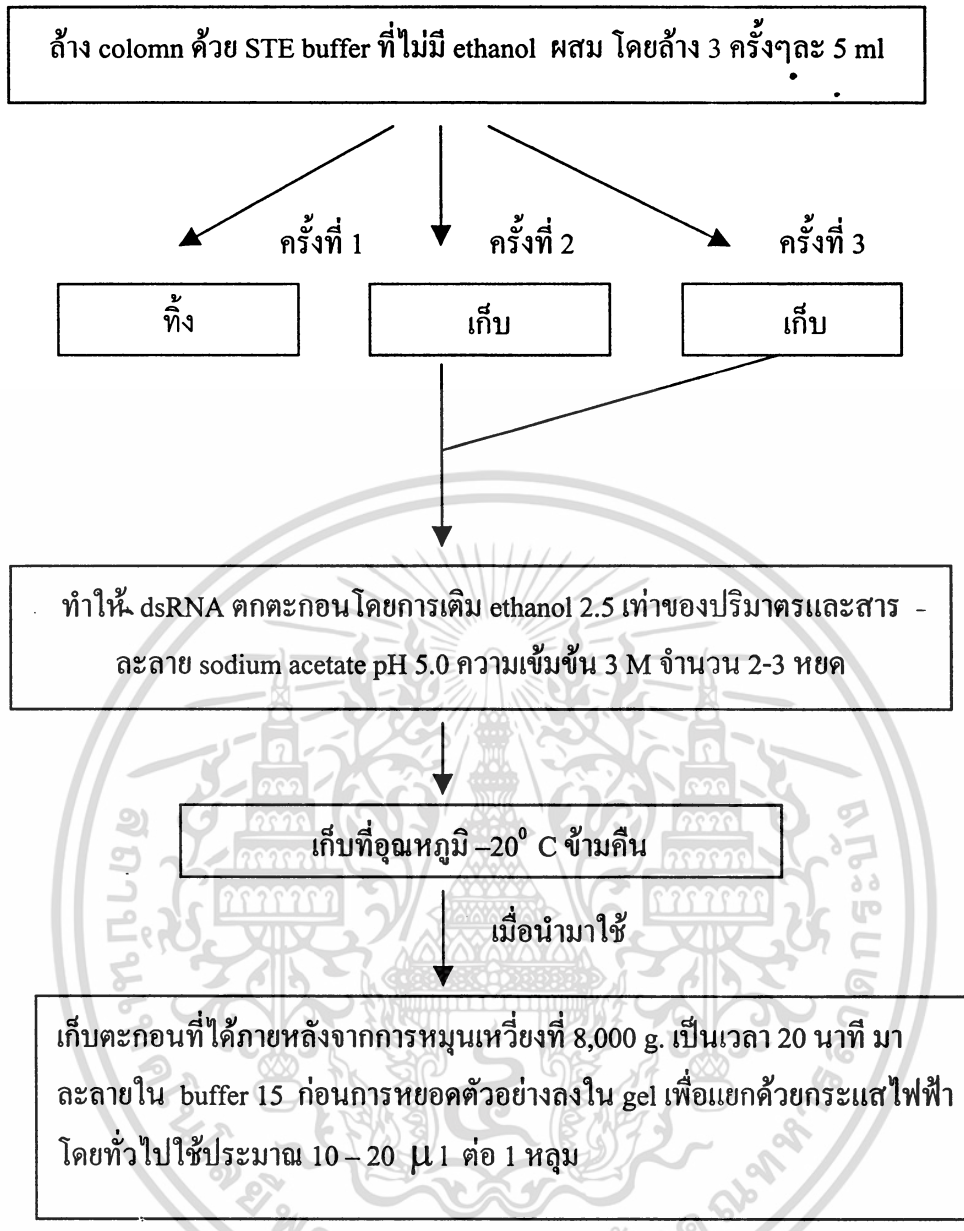
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยสังเกตจากลักษณะ จำนวน ระยะทางการเคลื่อนที่ของ dsRNA

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสในกุหลาบเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Jordand และ Dodds (1985) ซึ่งขั้นตอนการแยกสกัด ดังแสดงในภาพที่ 1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัด ds RNA ของเชื้อไวรัสในกุหลาบ

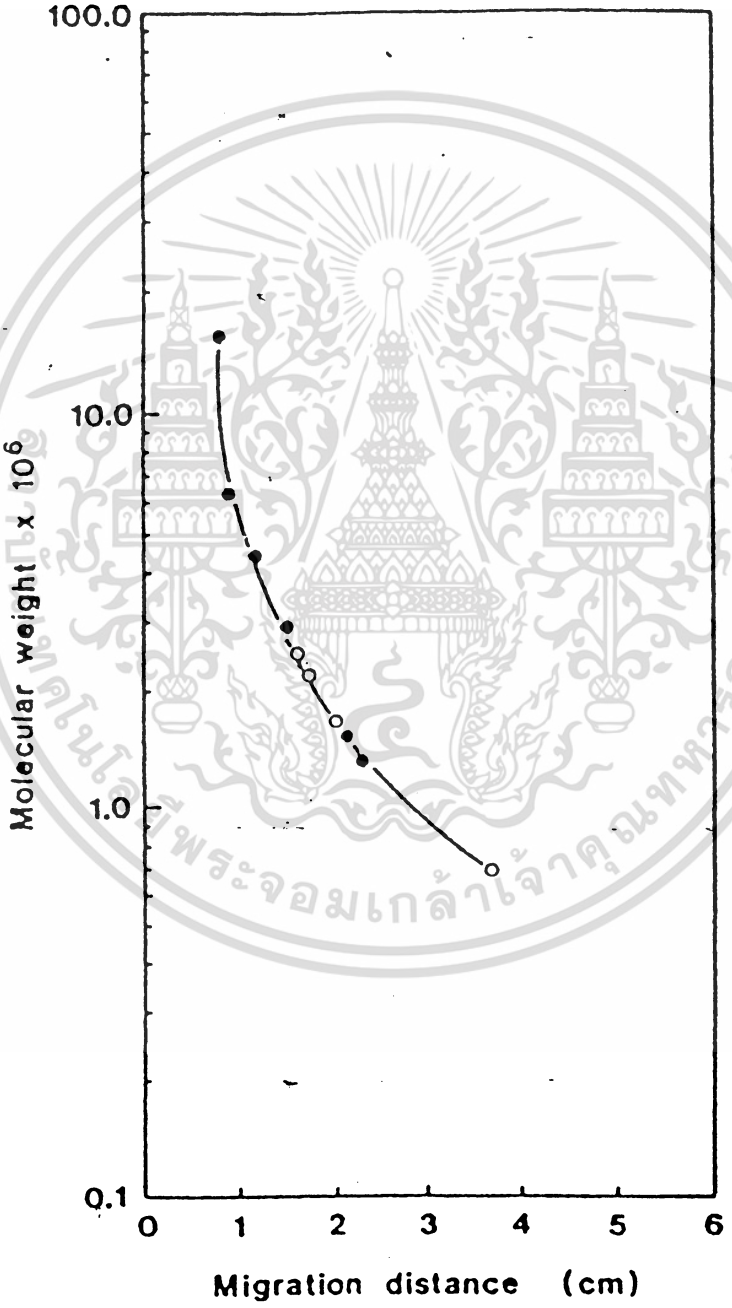
ขั้นตอนในการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก dsRNA ของเชื้อ (electrophoresis) ตัวกลางที่ใช้คือ agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.5 – 2% โดยในการเตรียมตัวอย่างเพื่อแยกสกัด dsRNA ด้วยกระแสไฟฟ้านั้น buffer ที่ใช้มี 2 ชนิดคือ

1. loading buffer ได้แก่ buffer ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายผสมของ bromophenol blue 0.25% xylene cyanol 0.25% และ glycerol 30%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. electrophoresis buffer ได้แก่ buffer ที่ใช้ในขณะการใช้กระแสไฟฟ้าซึ่งประกอบด้วย trizma base 40 mM, sodium acetate 20 mM และ EDTA 1 mM pH 7.8

กระแสไฟฟ้าที่ใช้คือที่ 20 voltage สำหรับ minigel โดยใช้ระยะเวลา 3 ชั่วโมงครึ่ง หลังจากนั้นจึงนำ gel มาทำการย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 20 ng/ml เพื่อสังเกตลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบ (band) dsRNA ที่ตรวจสอบได้นั้นสามารถนำมาเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานที่ใช้ เช่น enzyme Hind III หรือ Lambda แล้วนำมาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ตรวจสอบ โดยการเปรียบเทียบ linear curve



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA ที่ได้โดยการ plot กราฟ ● —— ● lambad DNA และ 0 —— 0 cucumber mosaic virus (CMV) (นวลพรรณ, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การผลิตท่อนพันธุ์ที่ปราศจากไวรัสโดยการใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กิ่งกุหลาบที่ใช้ในการศึกษาคือพันธุ์ Lolita จากแหล่งแปลงปลูกในเขตจังหวัดนครปฐม โดยนำกิ่งที่มีอาการใบด่างจากการติดเชื้อไวรัส prunus necrotic ringspot (RNRSV) ที่ได้รับการยืนยันชนิดของเชื้อโดยการตรวจสอบโดยวิธี ELISA (Clark and Adam, 1977) มาริดใบและหนามออกให้หมด แล้วตัดเป็นท่อน โดยแต่ละท่อนจะตัดห่างจากข้อด้านละประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำไปทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยการล้างผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนย้ายกิ่งกุหลาบที่เตรียมไปยังตู้ย้ายเนื้อเยื่อเพื่อทำการแช่ในสารละลายแอลกอฮอลล์ (ethanol) 70% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ในสารละลาย clorox ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (sterile distilled water) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เมื่อฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเรียบร้อยแล้ว เฉือนเฉพาะส่วนตาลงใส่ในขวดอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สูตร MS (Murashige & skoog) ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BA (6-Benzylaminopurine) 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ IAA (Indole 3-acetic acid) 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ปิดฝาให้สนิทเก็บขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อเหล่านี้ไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 20° C ความเข้มของแสง 3,000-10,000 lux และช่วงแสงในแต่ละวันมืด : สว่าง = 8 : 16 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) 4 สัปดาห์ จนตาของกุหลาบมีการแตกยอดอ่อนขนาดสูงประมาณ 15 เซนติเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 เดือน หลังจากนั้นจึงนำยอดอ่อนเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA 3 มก./ลิตร และ IAA 3 มก./ลิตร ซึ่งจะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบขวดละ 1 ยอด (Control) ในขณะที่ยอดอ่อนบางส่วนนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน แต่มีการเพิ่มส่วนผสมของสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1-Adamantanamine hydrochloride ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 25, 50 และ 75 มก./ลิตร โดยแบ่งเป็นความเข้มข้นละ 40 ขวด ไม่รวมชุด control อีก 40 ขวด เลี้ยงยอดอ่อนในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 1 เดือน เมื่อครบกำหนดทำการเปลี่ยนอาหารกลับมาใช้สูตรอาหารชุดเดียวกับชุด control อีก 1 เดือน ก่อนการตัดส่วนใบของชิ้นส่วนตัวอย่างละ 1-2 ใบ และชุดที่มีสารยับยั้งเชื้อไวรัสในแต่ละขวดทั้งชุด control มาทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในแต่ละตัวอย่างการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การสำรวจอาการของโรคไวรัสบนกุหลาบในแหล่งปลูกต่าง ๆ

ผลการสำรวจโรคไวรัสในกุหลาบตัดดอกในแหล่งปลูกเป็นการค้าที่ทำการตรวจสอบ 3 แหล่ง คือ ในเขตภาคเหนือ จังหวัดเชียงราย พบอาการของโรคไวรัสในกุหลาบพันธุ์ Red Masterpiece, White Snccess, Red Success, Yonena Harmonie ในเขตภาคใต้จังหวัดสงขลา พบอาการของโรคในกุหลาบพันธุ์ Red Masterpiece, Bravo friendship และ Double delight ในขณะที่แหล่งปลูกในเขตจังหวัดนครปฐม พบในกุหลาบพันธุ์ Eiffle Tower, Lolita, Christion Dior, White Masterpiece โดยอาการที่แบ่งออกเป็นหลายลักษณะดังนี้คือ

อาการแผลจุดเหลืองหรืออาการแผลเหลืองเข้มขึ้น (chlorotic spot or chlorotic patches) พบในใบอ่อนที่เพิ่งแตกจากตาหรือใบสีเขียวอ่อน โดยจุดแผลจะมีขอบเขตของแผลไม่แน่นอน พบบนแหวนเส้นใบและบางครั้งพบกระจายถังกันเป็นแผลปื้นใหญ่ ๆ สีเหลือง (ภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4)

อาการด่างร่างแห (vein netting) เนื่องจากพืชสูญเสียความสมดุลย์ในการสร้างคลอโรฟิลล์และเกิดการแตกสลายของคลอโรพลาสต์ พบในใบอ่อนและใบแก่สีเขียว (ภาพที่ 5)

อาการด่างลายแผนที่ (line pattern) พบในกุหลาบเกือบทุกพันธุ์ที่ทำการสำรวจโดยเฉพาะต้นที่มีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสอย่างรุนแรงพบบนใบแก่ (ภาพที่ 6 และ ภาพที่ 7)

อาการด่างแผลวงแหวน (concentric rings) ลักษณะเป็นแผลวงแหวนที่เกิดขึ้นเป็นหลายวงซ้อนกัน พบบนใบแก่โดยส่วนใหญ่จะพบร่วมกับอาการด่างลายแผนที่ (ภาพที่ 8)

อาการใบย่นบิดเบี้ยวและแคระแกรน (leaf distortion) พบอาการใบเล็กแคระแกรนผิดรูปร่าง ขอบใบย่นบิดเบี้ยว บนใบแก่ ส่วนใหญ่พบร่วมกับอาการด่างลายแผนที่ (ภาพที่ 9 – 12)

อาการด่าง (mosaic) พบบนหลีบเลี้ยงของดอกและกลีบดอกทำให้เกิดอาการด่างเป็นขีดเล็กๆ (streaking) ทำให้ดอกเกิดอาการแคระแกรน กลีบดอกบาง (ภาพที่ 13 – 15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3 แสดงอาการจุดเหลือง (chlorotic spot) บนใบอ่อนของกุหลาบพันธุ์ "Red Masterpiece"

ภาพที่ 4 แสดงอาการเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) ของกุหลาบพันธุ์ "Lolita"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5 แสดงอาการด่างร่างแห (vein netting) บนกุหลาบพันธุ์ "Eiffle Tower"

ภาพที่ 6 แสดงอาการด่างลายแผนที่ (line pattern) ของกุหลาบพันธุ์ "Lolita"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100926

ภาพที่ 7 แสดงอาการด่างลายแผนที่ (line pattern) ของกุหลาบพันธุ์ "White Masterpiece"

ภาพที่ 8 แสดงอาการด่างแผลวงแหวน (concentric rings) ของกุหลาบพันธุ์ "White Masterpiece"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9 แสดงอาการใบเปลี่ยนรูปร่าง (leaf deformation) และเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patohes) บนกุหลาบพันธุ์ “Eiffle Tower”

ภาพที่ 10 แสดงอากรขอบใบย่นบิดเบี้ยว (leaf puckering) ร่วมกับอาการใบด่างลายแผนที่ (line pattern) ในระยะเริ่มต้นบนกุหลาบพันธุ์ “Eiffle Tower”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 11 แสดงอาการขอบใบย่นบิดเบี้ยว (leaf puckering) ร่วมกับอาการใบด่างลายแผนที่ (line pattern) ที่อาการรุนแรง บนกุหลาบพันธุ์ "White Masterpiece"

ภาพที่ 12 แสดงอาการด่างเหลืองลายแผนที่ (line pattern) และใบบิดเบี้ยว (Leaf distortion) บนกุหลาบพันธุ์ "Eiffle Tower"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 13 แสดงอาการด่าง (mosaic) บนกุหลาบพันธุ์ "Bravo Friendship"

ภาพที่ 14 แสดงอาการด่าง (mosaic) บนกลีบเลี้ยงของดอกกุหลาบพันธุ์ "Red Masterpiece"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การประเมินความเสียหายของกุหลาบที่เกิดจากเชื้อไวรัสในแปลงปลูก

ผลการประเมินความเสียหายของกุหลาบจากการที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย โดยสำรวจจากลักษณะอาการที่ปรากฏบนใบ ลำต้น และดอกด้วยวิธีแบ่งระดับความเสียหายออกเป็น 4 ระดับ ตามความรุนแรงของโรคที่ปรากฏจากแหล่งปลูกในจังหวัดนครปฐม เชียงราย และสงขลา ปรากฏในตารางที่ 2 – ตารางที่ 4

ตารางที่ 2 แสดงระดับความเสียหายเนื่องจากความรุนแรงของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบในจังหวัดนครปฐม

ระดับอาการของโรคไวรัส	เปอร์เซ็นต์ (%) ต้นเป็นโรคในแปลงปลูก พันธุ์กุหลาบ			
	White Masterpiece	Christian Dior	Eiffel Tower	Lolita
อาการปกติ (0)	38.46	63.38	47.00	42.50
อาการเล็กน้อย (1)	22.27	17.10	43.60	18.00
อาการปานกลาง (2)	23.93	11.10	5.98	27.42
อาการรุนแรง (3)	15.34	3.42	3.42	12.08

ตารางที่ 3 แสดงระดับความเสียหาย เนื่องจากความรุนแรงของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบ ในจังหวัดเชียงราย

ระดับอาการของโรคไวรัส	เปอร์เซนต์ (%) ต้นเป็นโรคในแปลงปลูก พันธุ์กุหลาบ			
	Red Masterpiece	White Success	Red Success	Yonena Harmonie
อาการปกติ (0)	48.25	62.18	54.25	65.00
อาการเล็กน้อย (1)	18.25	33.32	26.40	12.37
อาการปานกลาง (2)	26.50	12.25	15.10	18.63
อาการรุนแรง (3)	7.00	2.25	4.25	4.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงระดับความเสียหาย เนื่องจากความรุนแรงของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบในจังหวัดสงขลา

ระดับอาการของโรคไวรัส	เปอร์เซนต์ (%) ต้นเป็นโรคในแปลงปลูก พันธุ์กุหลาบ		
	Red Masterpiece	Bravo Friendship	Double Delight
อาการปกติ (0)	45.27	62.30	57.25
อาการเล็กน้อย (1)	26.22	12.20	28.30
อาการปานกลาง (2)	23.18	23.25	10.12
อาการรุนแรง (3)	5.33	2.25	4.33

ผลจากตารางที่ 2 – ตารางที่ 4 แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในการเกิดโรคของกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ จากการประเมินความเสียหายที่เกิดจากเชื้อไวรัสในสภาพแปลงปลูก นอกจากอาการที่ปรากฏบนใบดังที่กล่าวในหัวข้อของผลการทดลองที่ 1 แล้ว ยังพบว่า ขนาดของดอกกุหลาบที่เป็นโรคดอกจะมีขนาดเล็กลง จำนวนชั้นของกลีบดอกลดลงและก้านดอกจะสั้นกว่าปกติ (ภาพที่ 16) ในขณะที่จำนวนดอกที่ได้ต่อต้นจะไม่แตกต่างจากดอกที่ได้จากต้นปกติ โดยเฉพาะในแปลงปลูกกุหลาบที่ทำการปลูกกุหลายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1-3 ปี ส่วนพื้นที่ที่ทำการปลูกกุหลาบมากกว่า 3 ปี ความเสียหายจะเห็นได้ชัดเจน โดยพบว่าต้นกุหลาบที่เป็นโรคไวรัสจะมีอาการต้นแคระแกร็นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติในแปลงปลูก (ภาพที่ 17)

3. การศึกษาคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อ

การศึกษาคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้นสู่พืชทดสอบใน 4 วงศ์ คือ วงศ์ Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae และ Solanaceae พบว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นได้เมื่อใช้สารละลาย phosphate buffer ที่ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.5 โดยมีการเติมสาร additive PVP (polyvinyl – pyrrolidone) 10% แต่ไม่ปรากฏการถ่ายทอดเชื้อสู่พืชทดสอบเมื่อใช้สารละลาย phosphate buffer ที่ไม่มีการเติมสาร additive

จากการสังเกตอาการที่ปรากฏบนพืชทดสอบภายหลังการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นอย่างน้อย 7-14 วัน บนใบที่ทำการปลูกเชื้อและ 14-28 วัน บนใบยอด สามารถจัดกลุ่มลักษณะอาการที่ใกล้เคียงกับอาการที่เกิดจากเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) และเชื้อ prunus necrotic ringspot (PNRSV) ซึ่งการยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสทำโดยการทดสอบด้วยวิธี ELISA (ตารางที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 15 แสดงอาการด่างเป็นขีดเล็กๆ (streaking) บนดอกกุหลาบพันธุ์ "Christian Dior"

ภาพที่ 16 แสดงขาดและจำนวนชั้นของกลีบดอกที่ลดลง รวมถึงขนาดก้านดอกสั้นบนกุหลาบพันธุ์ "White Masterpiece"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงรายชื่อพืชทดสอบที่แสดงอาการเป็นโรคโดยการถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้น

รายชื่อพืชทดสอบ	อาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส	
	CMV	PNRSV
Chenopodium quinoa	L	L / S
Cucumis sativus	L / S	L / S
Nicotina glutinosa	L / S	----
Nicotina tabacum 'White Burley'	L / S	----
Phasiolus aureus	L	----

หมายเหตุ L = อาการ local lesion symtom
S = อาการ systemic symtom
---- = ไม่เกิดโรค

ในกรณีของอาการที่ปรากฏบนพืชทดสอบที่เกิดจากเชื้อ CMV พบในพืชต่อไปนี้

Phasoolus aureus ปรากฏอาการแผลจุดแห้งสีน้ำตาลบนใบที่ทำการปลูกเชื้อ ภายใน 10 วัน แต่ไม่พบอาการแบบ systemic (ภาพที่ 18)

Cucumis sativus ปรากฏอาการแผลจุดเหลืองบนใบเลี้ยงที่ทำการปลูกเชื้อภายใน 7-10 วัน และอาการจุดแผลด่างตามแนวเส้นใบบนใบแท้ของแตงกวา จนถึงแผลด่างเหลือง (mosaic) บนยอดอ่อน (ภาพที่ 19)

Nicotiana glutinosa ปรากฏอาการแผลจุดแห้ง (necrotic) โดยตรงกลางแผลจะเห็นเป็นแผลแห้งสีขาวล้อมรอบด้วยขอบแผลเป็นวงสีน้ำตาล บนใบที่ทำการปลูกเชื้อภายใน 14 วัน (ภาพที่ 20) ตามมาด้วยอาการด่างเขียวอ่อนสลับแก่บนใบยอด

Nicotiana tabacum 'White Burley' ปรากฏอาการแผลจุดเหลืองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-0.5 มิลลิเมตร บนใบที่ทำการปลูกเชื้อภายใน 14 วัน (ภาพที่ 21) หลังจากนั้นอาการ systemic ที่พบบนใบอื่นที่อยู่เหนือขึ้นมาคือ อาการด่างเขียว ซึ่งจะแสดงให้เห็นอย่างน้อยภายใน 4 สัปดาห์ ภายหลังการปลูกเชื้อ

Chenopodium quinoa บนใบที่ทำการปลูกเชื้อ พบอาการแผลจุดเหลืองซึ่งปรากฏใน 7-14 วัน หลังจากนั้นจุดแผลจะแห้งเป็นสีน้ำตาล แต่ไม่พบอาการในลักษณะ systemic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 17 เปรียบเทียบขนาดต้นกุหลาบพันธุ์ "White Masterpiece" ที่แคระแกร็นเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสกับต้นที่มีการเจริญเติบโตปกติในแปลงปลูกจังหวัดนครปฐม

ภาพที่ 18 แสดงอาการจุดแผลแห้งสีน้ำตาล (brown necrotic) บนใบแท้คู่แรกของถั่วเขียว (*Phaseolus aureus*) ที่ทำการปลูกเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 19 แสดงอาการด่างตามแนวเส้นใบบนใบแท้ของแตงกวา (*Cucumis sativus*) เนื่องจากเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV)

ภาพที่ 20 แสดงอาการแผลจุดแห้งบนใบยาสูบ (*Nicotiana glutinosa*) ที่ได้รับการปลูกเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรณีของอาการที่ปรากฏบนพืชทดสอบที่เกิดจากเชื้อ PNRSV พบบนพืชต่อไปนี้

Chenopodium quinoa ไม่พบอาการบนใบที่ทำการปลูกเชื้อแต่ภายหลัง 21 วัน ปรากฏอาการด่างสีเขียวอ่อนบนใบยอดที่อยู่ถัดไป โดยอาการด่างจะลามเป็นปื้นจากโคนใบจนเติบโตในที่สุด พร้อมทั้งทำให้ต้นเกิดอาการแคระแกรน (ภาพที่ 22)

Cucumis sativus อาการบนใบเลี้ยงปรากฏแผลจุดเขียวไม่ค่อยชัดเจน ภายใน 10 วัน ภายหลังการปลูกเชื้อ แต่อาการ systemic บนใบแท้ปรากฏลักษณะแผลจุดเหลืองกระจาย (yellow mottle) ทั่วใบ (ภาพที่ 23)

อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการถ่ายทอดเชื้อผ่านน้ำคั้นจากใบกุหลาบที่เป็นโรคสามารถทำได้ดีเมื่อตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้มาจากการสำรวจในช่วงเดือนธันวาคม–มกราคม ซึ่งเป็นช่วงที่อุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละวันต่ำกว่าในช่วงอื่น ๆ ของปี

4. การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเบื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ (dsRNA) ของเชื้อ

จากการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ (dsRNA) ทั้งจากกุหลาบที่แสดงอาการของโรคไวรัสและจากพืชทดสอบที่ทำการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้น หลังจากนั้นนำใบที่แสดงอาการมาทำการแยกสกัด dsRNA ตามวิธีการข้างต้นแล้วจึงนำมาผ่านขั้นตอนการ electrophoresis ก่อนการตรวจสอบผลโดยการย้อมสี gel ด้วยสารละลาย ethedium bromide เพื่อดูลักษณะ pattern ที่ปรากฏบน gel บนกล่องแสง ultraviolet โดยการศึกษาเปรียบเทียบ pattern ด้วยตัวมาตรฐานคือ lambda DNA ซึ่งถูกย่อยสลายโดย enzyme Hind III และ dsRNA ที่สกัดจากต้น *Datura stramonium* ที่ปลูกด้วยเชื้อ CMV (cucumber mosaic virus)

ผลการตรวจสอบปรากฏว่าตัวอย่างจากใบของกุหลาบที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสมี pattern 2 ลักษณะดังนี้คือ ในกลุ่มแรกเป็นลักษณะของ dsRNA เกาะกันเป็นกลุ่มขาวขุ่นบน gel โดยไม่มีการแยกตัวให้เห็นชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับตัวมาตรฐาน dsRNA ของเชื้อ CMV (ภาพที่ 24) ส่วนอีกกลุ่มเป็นลักษณะของการเข้าทำลายร่วมโดยจะปรากฏแถบของ dsRNA ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อ CMV แต่ปริมาณค่อนข้างเจือจาง โดยแถบที่สามารถมองเห็นได้คือแถบที่ 1 แถบที่ 2 และ แถบที่ 3 จากด้านบนอยู่ร่วมกับ dsRNA ที่แยกตัวไม่เด่นชัดเกาะกันเป็นกลุ่มขาวขุ่นบน gel ซึ่งเป็นอาการของการเข้าทำลายร่วม (ภาพที่ 25 แถวที่ 7 และ 8)

ในการตรวจสอบ dsRNA ที่แยกได้จากพืชทดสอบถั่วเขียวและยาสูบ *N. glutinosa* 'White Burley'ที่ทำการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้นจนได้ isolate ที่บริสุทธิ์ภายหลังการทำ single lesion isolate ถึง 3 ครั้ง ปรากฏว่า pattern และความสว่างของแถบชัดเจนขึ้นโดยเฉพาะสำหรับเชื้อที่ปรากฏ pattern คล้ายตัวมาตรฐาน CMV ในขณะที่การแยกสกัด dsRNA จากต้น *C quinoa* ที่

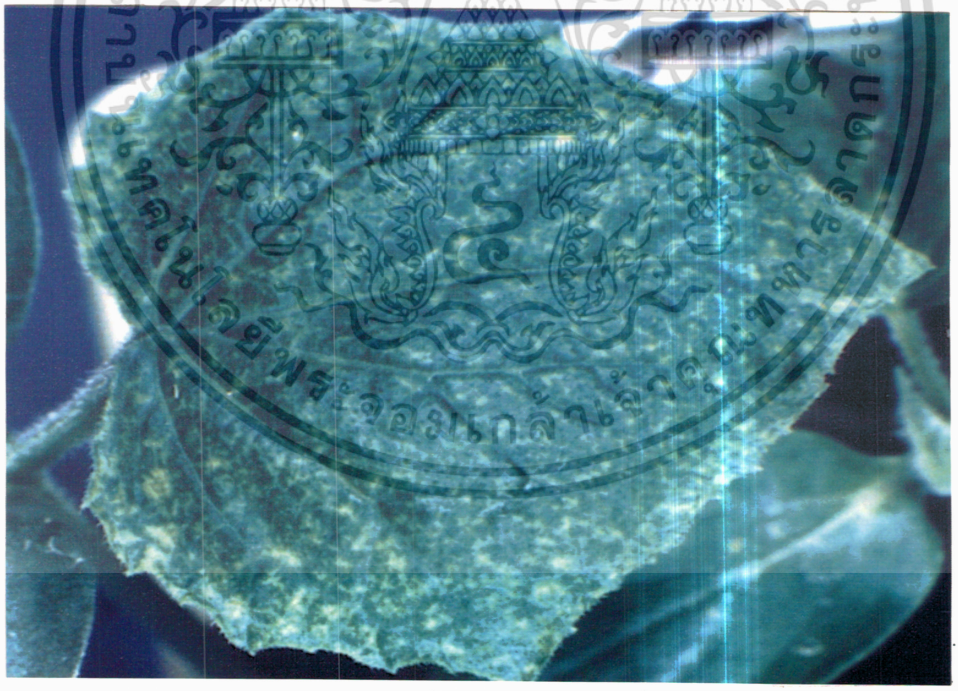
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับการปลูกเชื้อด้วยเชื้อ PNRSV ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากการแยกตัวของแถบไม่ชัดเจน (ภาพที่ 26) อย่างไรก็ตามจากการนำใบของต้น *C quinoa* ดังกล่าวไปทดสอบทางเซรุ่มวิทยาโดยการใช้เซรุ่มของเชื้อ PNRSV ด้วยวิธีการ Ouchterlony gel double- diffusion test ปรากฏผลของปฏิกิริยาเป็นบวก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายต้น *C. quinoa* เป็นเชื้อ PNRSV

ภาพที่ 21 แสดงอาการแผลจุดเหลือง (chlorotic spots) บนใบยาสูบ *Nicotiana. tabacum* 'White Burley' ที่ทำการปลูกเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 22 แสดงอาการด่างสีเขียวอ่อน (mottle) เริ่มจากโคนใบซึ่งเป็นอาการ systemic บน *Chenopodium quinoa* สาเหตุจากเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)



ภาพที่ 23 แสดงอาการแผลจุดเหลืองกระจายทั่วใบ (yellow mottle) บนใบแท้ของแตงกวา *Cucumis sativus* ซึ่งจัดเป็นอาการ systemic สาเหตุจากเชื้อ prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 24 แสดงลักษณะ dsRNA ที่แยกได้จากกุหลาบที่แสดงอาการของโรคไวรัสในแถวที่ 1 และ 2 โดย dsRNA ที่ได้จะเกาะกันเป็นกลุ่มขาวขุ่น ส่วนในแถบที่ 3 คือ dsRNA ที่แยกได้จากต้น *Datura stramonium* ที่ถูกเชื้อ CMV เข้าทำลายซึ่งใช้เป็นตัวมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 25 แสดงลักษณะ pattern ของ dsRNA บน agarose gel

แถวที่ 1 dsRNA ของเชื้อ CMV จากถั่วเขียว *Phaseolus aureus*

แถวที่ 2 และ แถวที่ 3 dsRNA ของเชื้อ CMV จากยาสูบ *N. tabacum* 'White Burley'

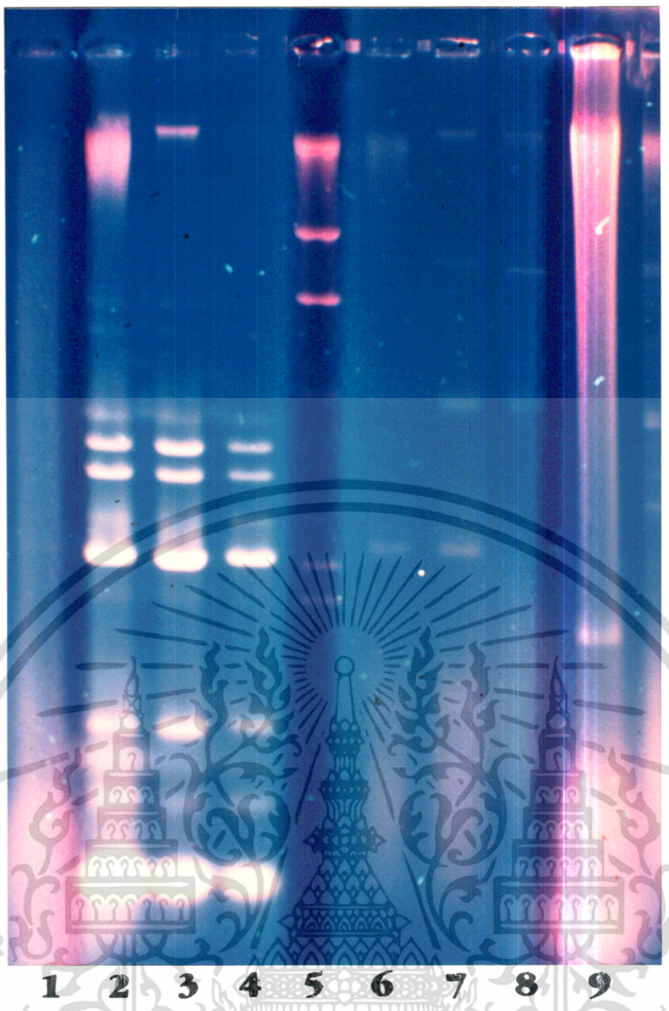
แถวที่ 4 dsRNA ของเชื้อ CMV จากต้น *Datura stramonium*

แถวที่ 5 Hind III

แถวที่ 6 Lamda DNA

แถวที่ 7 และ แถวที่ 8 dsRNA ที่สกัดได้จากใบกุหลาบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 26 แสดงลักษณะ pattern ของ dsRNA ที่แยกสกัดจากพืชทดสอบที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายเปรียบเทียบกับตัวมาตรฐาน Lambda DNA ที่ถูกย่อยสลายโดย Hind III

แถวที่ 1 dsRNA จากต้น *Chenopodium quinoa* ที่ถูกเชื้อ PNRSV เข้าทำลาย

แถวที่ 2 และ แถวที่ 3 dsRNA จากยาสูบ *Nicotiana tabacum* 'White Burley' ที่ถูกเชื้อ CMV เข้าทำลาย

แถวที่ 4 dsRNA จากต้น *Datura stramonium* ที่ถูกเชื้อ CMV เข้าทำลาย

แถวที่ 5 ตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ Lambda DNA ที่ถูกย่อยสลายโดย Hind III

แถวที่ 6, 7, 8 และ 9 dsRNA ที่สกัดได้จากใบกุหลาบที่แสดงอาการของโรคไวรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การผลิตท่อนพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อไวรัสโดยการใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการนำส่วนตาของกุหลาบพันธุ์ Lolita จากแหล่งปลูกในจังหวัดนครปฐมที่มีอาการใบด่างจากการติดเชื้อ prunus necrotic ringspot (PNRSV) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (Mursahige and Skoog, 1962) ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BA 3 มก./ลิตร และ IAA 0.3 มก./ลิตร เป็นเวลา 3 เดือน ปรากฏว่ายอดอ่อนของกุหลาบที่ได้มีการเจริญเติบโตช้า ลักษณะต้นเล็กใบผิดรูปร่าง (ภาพที่ 27)

เมื่อทำการทดลองเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BA 3 มก./ลิตรและ IAA 0.3 มก/ ลิตร ที่ผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 25, 50 และ 75 มก/ ลิตร เป็นเวลา 1 เดือน แล้วจึงย้ายกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารยับยั้งเชื้อไวรัสอีกเป็นเวลา 2 เดือน พบว่ามีความแตกต่างในการเจริญเติบโตของยอดอ่อนกุหลาบดังนี้คือ

ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 1-Adamantanamine hydrochloride 0 มก./ลิตร ต้นกุหลาบมีลักษณะต้นเล็กไม่เจริญเติบโต ใบเล็กและมีลักษณะบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง

ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 1-Adamantanamine hydrochloride 25 มก./ลิตร ต้นกุหลาบมีลักษณะต้นเล็กไม่เจริญเติบโต ใบเล็กและยังคงมีลักษณะบิดเบี้ยวผิดรูปร่างเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกุหลาบที่เลี้ยงโดยไม่มีสารยับยั้งเชื้อไวรัสจะพบว่าใบของกุหลาบในกลุ่มนี้มีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย

ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 1-Adamantanamine hydrochloride 50 มก./ลิตร ต้นกุหลาบมีการเจริญเติบโตมากขึ้น มีการแตกยอดอ่อนจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ 2 ตัวอย่างข้างต้น แต่ใบยังมีลักษณะใบเล็กและบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง

ที่ระดับความเข้มข้นของสาร I-Adamantanmine hydrochloride 75 มก./ลิตร ต้นกุหลาบมีลักษณะเจริญเติบโตที่ดีและสมบูรณ์กว่าที่ระดับอื่น ใบมีขนาดใหญ่ลักษณะไม่บิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ลักษณะของใบใกล้เคียงกับในกุหลาบปกติ (ภาพที่ 28)

การตรวจสอบเชื้อไวรัส PNRSV โดยวิธี ELISA ภายหลังการย้ายต้นกุหลาบจากอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ที่มีส่วนผสมของสารยับยั้งเชื้อไวรัสลงสู่อาหารสูตร MS ปกติเป็นเวลา 2 เดือน เพื่อศึกษาปริมาตรความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในแต่ละตัวอย่างการทดลอง โดยแบ่งสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการทดสอบเป็น 4 ระดับ คือ

ระดับ 0 ไม่มีสี หมายถึง ไม่มีปริมาณของเชื้อไวรัส

ระดับ 1 มีสีเหลืองอ่อน หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสในระดับต่ำ

ระดับ 2 สีเหลือง หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสในระดับปานกลาง

ระดับ 3 สีเหลืองเข้ม หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสในระดับสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

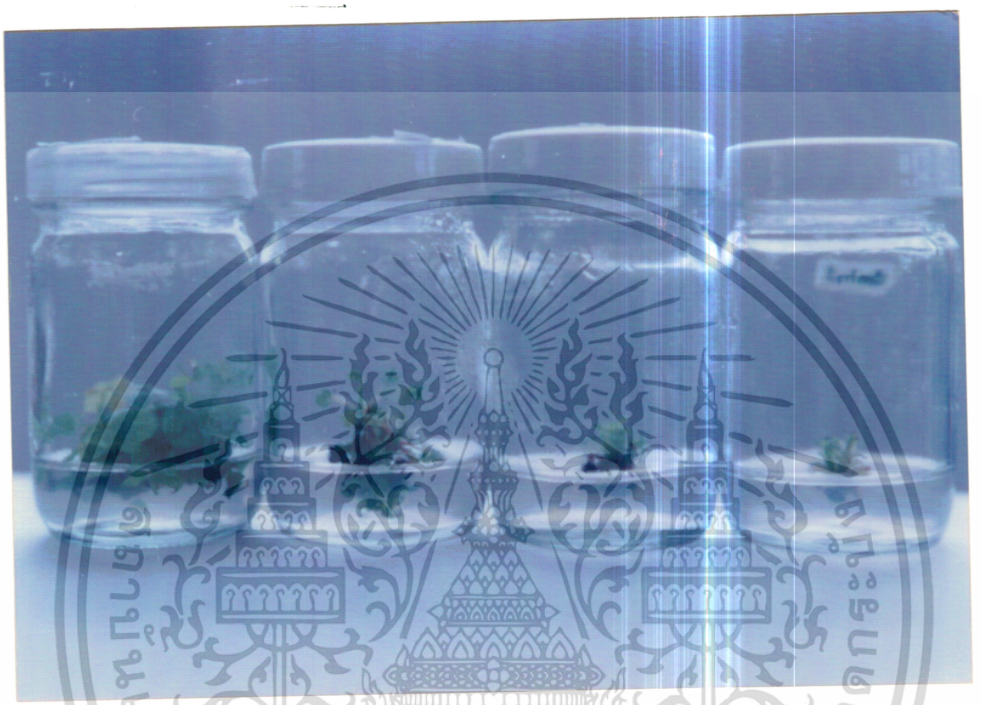
ตารางที่ 6 แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาจากการตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA จากส่วนใบของกุหลาบที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของสารยับยั้งไวรัส 1- Adamantanamine hydrochloride

ระดับความเข้มข้นของสาร Adamantanamine hydrochloride	ระดับสีของปฏิกริยาจากการทดสอบ ELISA Test
0	3
25	3
50	2
75	1

หมายเหตุ a จำนวนตัวอย่างความเข้มข้นละ 40 ขวด

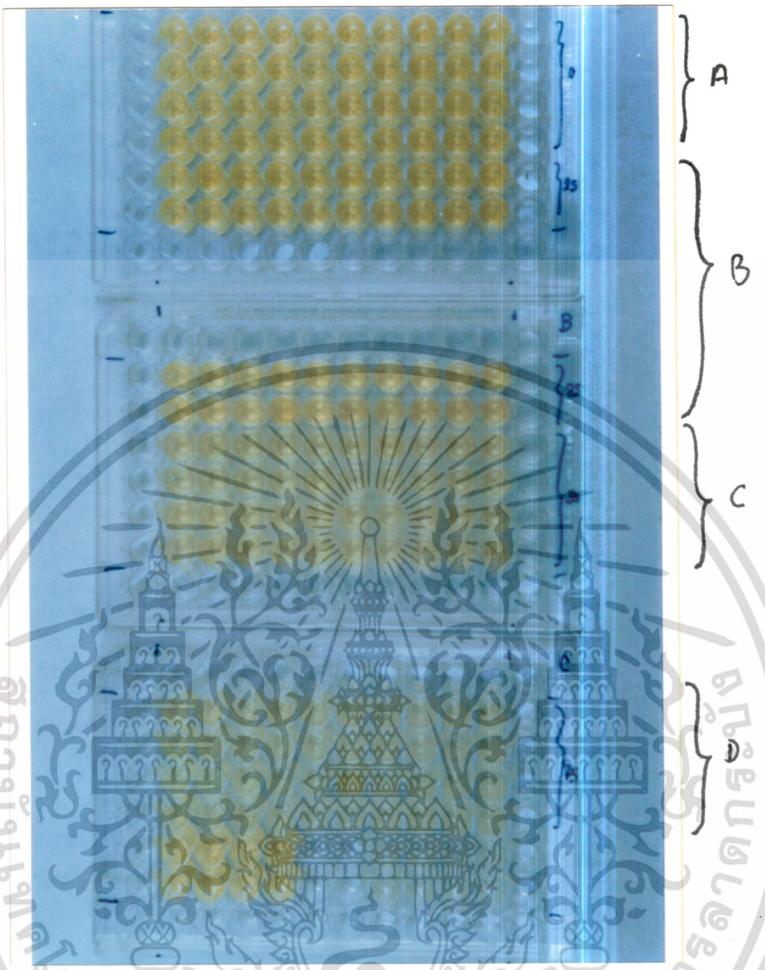
ภาพที่ 27 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของกุหลาบพันธุ์ "Lolita" ที่ถูกเชื้อ PNRSV เข้าทำลายโดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 3 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 28 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกุหลาบที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่ผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัม / ลิตร ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 29 แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาจากการทดสอบ ELISA test ของกุหลาบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA 3 มิลลิกรัม / ลิตร IAA 0.3 มิลลิกรัม / ลิตร และสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

A = 0 มิลลิกรัม / ลิตร

B = 25 มิลลิกรัม / ลิตร

C = 50 มิลลิกรัม / ลิตร

D = 75 มิลลิกรัม / ลิตร

E = substrate buffer ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ

F = disease control ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลและวิจารณ์

การสำรวจโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกุหลาบในแหล่งปลูกจังหวัดเชียงราย นครปฐม และสงขลา ของกุหลาบพันธุ์ต่างๆ พบกลุ่มของอาการที่ปรากฏบนใบดังนี้คือ แผลจุดเหลือง และจุดเหลืองเป็นปื้น (chlorotic spot or chlorotic patches) อาการด่างร่างแห (vein netting) อาการด่างลายแผนที่ (line pattern) อาการด่างวงแหวน (concentric rings) อาการใบย่นบิดเบี้ยวและแคระแกร็น (leaf distortion) อาการด่าง (mosaic) และใบเปลี่ยนรูปร่าง (leaf deformation) โดยเฉพาะในกุหลาบพันธุ์ White Masterpiece, Lolita, Red masterpiece, Eiffel Tower, Red Success, Double Delight, White Success, Bravo Friendship, Christian Dior และYonena Harmonie ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเป็น 61.54 , 57.50, 53.24, 53.00, 45.75, 42.75, 37.82, 37.70, 36.62 และ 35.00 ตามลำดับ โดยอาการที่ปรากฏจะแสดงความรุนแรงของการเข้าทำลายเมื่อปลูกกุหลาบในแปลงเป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 3 – 5 ปีขึ้นไป ซึ่งเมื่อนำส่วนของใบกุหลาบที่แสดงอาการเป็นโรคมาทำการถ่ายทอดเชื้อด้วยน้ำคั้นสู่พืชทดสอบใน 4 วงศ์คือ Cucurbitaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae และ Solanaceae พร้อมทั้งการทำ single lesion isolate 3 – 4 ครั้งอย่างต่อเนื่องก่อนที่จะทำการยืนยันชนิดของเชื้อด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี ELISA โดยใช้น้ำคั้นจากพืชทดสอบที่ถ่ายทอดเชื้อโดย sap transmissiom จากการตรวจสอบพบว่ากุหลาบที่แสดงอาการคล้ายการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในพันธุ์ต่างๆ ส่วนใหญ่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ PNRSV ในขณะที่บางพันธุ์ถูกเชื้อ CMV เข้าทำลาย และมีบางพันธุ์ถูกเข้าทำลายร่วมระหว่างเชื้อทั้งสอง (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามผลการทดลองโดยการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้นจากกุหลาบที่เป็นโรคสู่พืชทดสอบใน 4 วงศ์นั้นมีความปรวนแปรและปัญหาอย่างมากในแต่ละช่วงของการทดสอบซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างกันในระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในแต่ละช่วงของปี และกุหลาบจัดเป็นไม้กึ่งเนื้อแข็ง ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับรายงานของ Gibbs และ Harrison (1976) กล่าวว่าตามธรรมชาติพืชพวกไม้เนื้อแข็งหรือกึ่งเนื้อแข็งจะมีองค์ประกอบบางอย่างในน้ำคั้นที่ยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส เช่น สารพวก tannin หรือ oxidases ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการปรับ pH ของ buffer ให้สูงถึง 8 – 8.5 หรือการเติมสารพวก reducing agent, chelating agents หรือพวก protein-binder ลงใน extraction buffer ซึ่งในกรณีนี้ผู้วิจัยใช้สาร PVP (polyvinyl-pyrrolidone) เป็นตัว additive ซึ่งจะทำหน้าที่คล้าย peptide ‘mimic’ (Haslam *et al.* ,1989) นอกจากนี้ Hicks (1979) รายงานความปรวนแปรของอาการและระดับความเข้มข้นของเชื้อ prunus necrotic ringspot (PNRSV) ที่เข้าทำลายกุหลาบพันธุ์ Golden Fleece และความล้มเหลวของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากพืชพวกไม้เนื้อแข็งโดยวิธี sap transmission จะเกิดขึ้นเสมอเนื่องจากสารประกอบในน้ำคั้นเช่นสาร tannin (Gyorgy, 1982 ; Matthew, 1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา จากพืชทดสอบที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นจากกุหลาบพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์กุหลาบ	เชื้อ PNRSV	เชื้อ CMV
Red masterpiece	+	-
White Masterpiece	+	-
Eiffel Tower	+	+
Lolita	+	-
Red Success	+	-
Double Delight	+	-
White Success	+	+
Christian Dior	+	+
Bravo Friendship	-	+
Yonena Harmonie	+	-

จากการตรวจสอบเชื้อโดยการแยกสกัด dsRNA สายคู่ของเชื้อจากใบกุหลาบที่แสดงอาการเป็นโรคไม่ปรากฏผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจาก dsRNA ที่ตรวจสอบบน gel ภายหลังการ electrophoresis ไม่มีการแยกตัวอย่างชัดเจน โดยเฉพาะในกรณีของเชื้อ PNRSV ในขณะที่เชื้อ CMV ปรากฏ pattern บน gel ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยเปรียบเทียบกับ pattern ตัวมาตรฐานของเชื้อ CMV แยกสกัดจากต้น *Datura stramonium* แต่ pattern ที่ปรากฏจะไม่เด่นชัดนัก เมื่อเปรียบเทียบกับ pattern ที่ได้จากการแยกสกัดเชื้อ CMV บนพืชทดสอบอันได้แก่ ถั่วเขียว และยาสูบ จากความล้มเหลวที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้เป็น 2 ปัจจัยหลักคือ 1) ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในต้นกุหลาบที่เป็นโรคในช่วงที่ทำการสำรวจมีปริมาณต่ำ โดยเฉพาะระดับของ replicative – form RNA ในตัวอย่างที่ตรวจสอบถึงแม้ว่าอาการของโรคจะชัดเจน 2) ปัญหาการเกาะตัวระหว่าง dsRNA และ cellulose ในสภาพที่การแยกสกัดที่มีเมือกหรือยางของพืชเป็นองค์ประกอบในใบพืช (Hicks *et al.*, 1988) เพื่อให้วิธีการตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อพัฒนาไปสู่การวินิจฉัยการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมและดัดแปลงวิธีในการแยกสกัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบให้ชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาวิจัยนี้จัดว่าเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อเนื่องต่อไป ซึ่งอาจรวมไปถึงการพัฒนาตัวตรวจ (probe) ที่มีความไวในการตรวจสอบถึงแม้เชื้อไวรัสจะอยู่ในปริมาณต่ำ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลักษณะการเจริญของตากุหลาบในอาหาร MS ผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัส พบว่าการใช้สาร 1 – Adamantanamine Hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม / ลิตร ช่วยให้กุหลาบที่มีลักษณะอาการด่างเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสมีการเจริญเติบโตดีขึ้นมากที่สุดใกล้เคียงกับการเจริญของกุหลาบปกติ รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม / ลิตร ต้นกุหลาบมีการเจริญเติบโตขึ้นแต่ยังมีลักษณะที่ผิดปกติอยู่มากคือลักษณะอาการใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 0 มิลลิกรัม / ลิตร ยังมีอาการผิดปกติอยู่มากที่สุดคือต้นและใบกุหลาบมีขนาดเล็กและใบมีลักษณะบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Krussmann (1981) และ Westcott (1971) ที่กล่าวถึงอาการติดเชื้อไวรัสของกุหลาบจะทำให้ลำต้นสั้น เตี้ย แคระแกร็น การเจริญไม่สมบูรณ์ ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง พืชอ่อนแอและตายได้

การทดสอบปฏิกิริยาของ ELISA จากชิ้นส่วนใบของกุหลาบที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อตรวจสอบระดับปริมาณของเชื้อไวรัส พบว่าความเข้มข้นของสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1 – Adamantanamine Hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม / ลิตร สามารถยับยั้งการทวีจำนวนของเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม / ลิตร ซึ่งสามารถยับยั้งการทวีจำนวนของเชื้อได้บางส่วน และที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม / ลิตร ไม่สามารถยับยั้งการทวีจำนวนของเชื้อได้เลย เมื่อเปรียบเทียบกับชุด control ที่ไม่มีการใช้สารยับยั้งเชื้อไวรัส การทดลองนี้ยังเป็นการบอกให้ทราบว่า ถึงแม้การเจริญเติบโตของต้นกุหลาบภายหลังจากที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัส 1 – Adamantanamine Hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม / ลิตร จะมีลักษณะใกล้เคียงกับต้นกุหลาบปกติมากที่สุด แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าต้นกุหลาบดังกล่าวนั้นปราศจากเชื้อไวรัส

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงว่าการผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัสลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชลดลง หรือทำให้พืชนั้นปลอดจากเชื้อไวรัสได้ ดังเช่นรายงานของ Toussint และคณะ (1993) ทดลองเลี้ยง protocorms ของกล้วยไม้ (*Cymbidium* Sp.) ที่ติดเชื้อ odontoglossum ringspot virus ในอาหารเหลวที่ผสมสารจำพวก ribavirin ที่มีชื่อทางการค้าว่า Virazole ในปริมาณความเข้มข้น 35 ppm. พบว่าส่วนของ protocorms ที่เจริญขึ้นมาใหม่จะปลอดจากเชื้อไวรัส หรือจากรายงานของ Kim และคณะ (1996) ทดลองเลี้ยง shoot-tip ของ lily ที่ติดเชื้อ tulip breaking virus, cucumber mosaic virus และ lily symptomless virus ด้วยอาหารที่ผสมสาร Virszole ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม / ลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าปริมาณของเชื้อไวรัสดังกล่าวจะลดลงเมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นเพิ่มตามลำดับ

ผลของการใช้สาร 1 – Adamantanamine Hydrochloride ที่ปริมาณความเข้มข้นต่างๆนี้ถึงแม้ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม / ลิตร จะช่วยให้ปริมาณของเชื้อ PNRSV ในกุหลาบนั้นลดลงมากที่สุด แต่ก็ยังไม่สามารถทำให้กุหลาบนั้นปลอดจากเชื้อไวรัสดังกล่าวได้ ซึ่งสาเหตุที่อาจเป็นไปได้ก็คือ ระยะเวลาในการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารที่ผสมสารยับยั้งเชื้อไวรัสนั้นสั้นเกินไป หรืออาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเพราะปริมาณความเข้มข้นของสารยับยั้งเชื้อไวรัสที่ใช้ไม่เพียงพอ จึงน่าจะมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารและระยะเวลาในการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตกุหลาบปราศจากโรคไวรัส โดยทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารและระยะเวลาในการเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มากขึ้น ดังเช่นในรายงานของ Kim และคณะ (1996) ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นใช้ปริมาณ ความเข้มข้นของสารถึง 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม / ลิตร และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานถึง 4 เดือน ทำให้ชิ้นส่วนของ lily ที่เลี้ยงไว้มีปริมาณของเชื้อไวรัสลดลงตามลำดับ หรือจากรายงานของ Toussiant และคณะ (1993) ที่พบว่าถ้ายิ่งเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นส่วนมากขึ้นก็จะได้พืชที่ปลอดเชื้อไวรัสมากขึ้นตามลำดับ โดยเลี้ยง protocorms ของกล้วยไม้ (*Cymbidium* Sp.) ที่ติดเชื้อ odontoglossum ringspot virus ในอาหารเหลวที่ผสมสาร Virazole และทำการ subculture ทุกๆ 4 – 6 สัปดาห์ จะได้ protocorms ของกล้วยไม้ที่ปลอดเชื้อไวรัสตั้งแต่ในการ subculture ครั้งที่ 3 ขึ้นไป

ดังนั้นแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคไวรัสของกุหลาบทั้งในสภาพแปลงปลูกและโรคที่ติดมากับกิ่งพันธุ์จึงสามารถทำได้เป็น 2 วิธี คือ

1) ในกรณีของกิ่งพันธุ์ที่จะนำเข้ามาปลูกในแปลงควรจะได้รับการตรวจสอบอย่างแน่ชัดก่อนว่าไม่ใช่กิ่งพันธุ์ที่เป็นโรค
2) พยายามหลีกเลี่ยงการนำส่วนของตาหรือกิ่งพันธุ์ที่ไม่แน่ใจมาขยายพันธุ์ในแปลงปลูกซึ่งถือเป็นการเพิ่มแหล่งของเชื้อและการแพร่ระบาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2538. การผลิตพืชปลอดโรคไวรัสและการป้องกันการเข้าทำลายซ้ำ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 13(2) : 42-50.

นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2540. การตรวจสอบเชื้อไวรัสพืชโดยการแยกสกัดและวิเคราะห์กรดนิวคลิอิคแบบ RNA สายคู่. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 5(2) : 32-37.

สุรวิช วรรณโกรโรจน์. 2542. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารพืชสวน. 6(2) : 47-56.

อรดี สหวิชรินทร์. 2522. ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทางด้านการเกษตร. วารสารพืชสวน. 14(4) : 35-43.

Bawden, F. C. 1964. Plant Viruses and Virus Diseases The Ronald Press Company, New York.

Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson, 1995. Viruses of Plants. CAB International.

Casper, R. 1973. Serological properties of prunus necrotic ringspot and apple mosaic virus Isolates from roses. *Phytopathohogy*. 63: 238-240.

Cheplick, S. M. And G. N. Agrios. 1983. Effect of injected antiviral compounds on apple mosaic, scar skin and dapple disease of apple trees. *Plant Disease*. 67(10): 1130-1133.

Curtis, C.E. and Moran, F. R. 1986. The incidence of prunus necrotic ringspot virus in commercial ant flower roses grown under cover in Victoria. *Australian Plant pathology*. 15: 42-43.

De Vries-Paterson, R. M., Evans, T. A. And Stephens, C.T. 1992. The effect of aspragus virus Infection on asparagus tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31 : 31-35.

Dodds, J.A. and Bar-Joseph, M., 1983. Double-stranded RNA from plant infected wiht closteroviruses. *Phytopathology*.

Dodds, J.A., Morris, J. J. and Jordom, R. L. 1984. Plant iral double-stranded RNA. *Phytopathology*. 22 : 151-168.

Falk, B. W., Morris, T. J. And Duffus, J. E. 1979. Unstable infectivity and sedimentable dsRNA Associated with lettuce speckles mottle virus. *Virology*. 96 : 239-248.

Fulton, R. W. 1968. Serlogy of viruses eansing cherry necrotic ringspot, lum Line pattern, rose mosaic and apple mosaic. *Phytopathology*. 58 : 635-638.

Gildow, F. E., Ballinger, M. E. And Rochow, W. F., 1983. Identification of double-stranded RNAs Associated with barley yellow dwarf virus infection in oats. Phytopathology. 73 : 1507-1572.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gyorgy, B. (1992). Inhibitory and stimulating effect of plant substances on virus transmission. Acta Hort. 130 : 99-106

Haslam, E., Lilley, T.H., Cai, Y., Martin, R. and Magnolato, D. 1989. Traditional herbal medichines: the role of polyphenols. Planta Med. 55 : (1) 1-8.

Hick, R. G. T., Naamyeesoon, N. And Perkins, C. J. 1988. Double-stranded RNA analysis as a Method for detecting viruses in woody ornamentals. *Acta-Hort.* 226(2) ๙ 47-56.

Horst, R. K. I. 1989. Compodium of Rose Diseases. The American Phytopathological Society, USA.

Ikegami, M. And Fraenkel-Conrat, H. 1979. Characterization of double-stranded ribnucleic acid In tobacco leaves, *Proc. Natl. Acad. Sci. U & A.* 76 : 3637-3640.

Jordan, R. L., Ohr, H. D. And Zentmyer, G. A. 1983. Arocado blackstreak disease. A newly Reconized major disease of avocado in Califorma. *Phytopathology.* 73 : 970.

Jordan, R. L., and Dodds, J. A. 1985. Double-stranded RNA in detection of disease of known and Unproven viral etiology. *Acta-Hort.* 164 : 101-108.

Kim, J. Y., S. T. Choi, M.S. Roh. And T. S. ko. 1996. Production and delection of virus free lily plant by shoot tip culture and virazole treatment of bulbils. *Journal of the Vorean-Society for Horticultural Science.* 37(1) : 64-69.

Krussmann, G. 1981. The Complete book of Roses. Timber Prees, Portland, Oregon.

Matthews, R.E.F. 1981. 'Plant Virology' 2nd edu. Academic Press, New York.

Mehrotra, R. S. 1980. Plant Pathology. Tata Mc Graw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi.

Mirkov, T. E. And Dodds, J. A. 1983. Detection of dsRNA in lettuce big vein infected lettuce. *Phytopathology.* 73 : 961.

Monette, P. L. 1983. Virus eradication through *in vilro* techniques. Combined Proceedings, International Plant Propagators Society. 33 : 90-100.

Morris, T. J. And Dodds, T. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus Infected plant and fungal tissue. *Phytopathology.* 69 : 854-858.

Ngamyeesoon, N. And Hicks, R. G. T. 1988. Some properties of virus isolated from *Cassia corymbosa* with a mosaic disease. *Acta-Hort.* 234 : 45-52.

Raychaudhuri, S. P. 1977. A Manual of Virus Diseases of Tropical Plants. The Macmillian company of India Limited.

Powll, C. C. 1982. Virus-indexed rose plants : first year performance results. OHIO Agricnltural Research and Development Center Research Ciraellr. No. 286 : 29-30.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Slack, S. A. , J. A. Traylor, G. Nyland. And H. E. Williams. 1976. Symptoms, Indexing, and Transmission of rose sporing dwarf disease. *Plant Dis Reptr.* 60 : 183-187.

Smith, K. M. 1972. A Texbook of Plant Virus Diseases. Academic Press, New York and London.

Thomas, B. J. 1984. Rose mosaic disease : symptoms induced in roses by graft inoculation with Both prunus necrotic ringspot and apple mosaic viruses.

Toussaint, A., Kummert, J., Maroquin, C., Lebrun, A. and Roggemans, J. 1993. Use of Virazole to eradicate odontoglossum ringsport virus from *in vitro* culture of *Cymbidium* sp. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 32 ; 303-309.

Westcott, C. 1971. Plant Disease Handbood. Littou Edncational Publishing, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้