บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กุหลาบ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rosa spp.* จัดอยู่ในตระกูล Rosaceae สกุล Rosa มี species ต่างๆ มากกว่า 150 ชนิด มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน n = 7 (อดิศร, 2540) กุหลาบที่ปลูกเป็นการค้าส่วนใหญ่เป็นกุหลาบพันธุ์ลูกผสม (hybrid) พวกเตตราพลอยด์ 2 n = 4 x = 28 (พัชรินทร์, 2538) แหล่งปลูกกุหลาบที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย หนองคาย นครปฐม กรุงเทพมหานคร ราชบุรี ปทุมธานี ตาก สมุทรสาคร สมุทรปราการ นนทบุรี อุบลราชธานี ขอนแก่น และสงขลา (สุรภีและคณะ, 2540 ; สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2539)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกุหลาบ

กุหลาบเป็นไม้ดอกมีทั้งประเภทไม้พุ่มผลัดใบสูงประมาณ 1-3 m. และไม้เลื้อย (สำนักงานเสริมสร้างเอกลักษณ์ของชาติ, 2536)

ใบ : เป็นใบประกอบแบบขนนก ประกอบด้วยใบย่อย 5-7 ใบ การจัดเรียงของใบเป็นแบบสลับ ใบรูปไข่ กว้าง 1.8-4 cm. ยาว 3-7 cm. ปลายแหลม ส่วนโคนมน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย มีหูใบ 1 คู่ แนบติดกับก้านใบ

ลำต้น : มีทั้งชนิดที่เป็นลำต้นตั้งตรง พุ่ม และเป็นเถา ที่บริเวณลำต้นและกิ่งก้านจะมีหนามแหลมคม

ดอก : เป็นพืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ มีหลายสีแตกต่างกันตามพันธุ์ ดอกมีทั้งชนิดที่เป็นดอกเดี่ยวและเป็นดอกช่อ กลีบดอกใหญ่ ขอบเรียบกลม กลีบดอกในแต่ละดอกมีตั้งแต่ 5 กลีบขึ้นไป โดยเฉพาะพวกลูกผสมจะมีกลีบดอกมากซ้อนกันหลายชั้น กลีบเลี้ยง 5 กลีบ ฐานรองดอกเป็นรูปถ้วย

ผล : รูปไข่ เมื่อสุกสีแดง กว้าง 1.5-2 cm. ยาว 3-9 cm.

การจำแนกชนิดของกุหลาบ

กุหลาบสามารถแบ่งตามลักษณะได้เป็น 6 ชนิด ดังนี้ (วัฒนา, 2529 ; สมเพียร, 2532)

1. กุหลาบตัดดอก (Hybrid Tea) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียและยุโรป เป็นพวกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดคือเป็นไม้ตัดดอก โดยจะมีดอกเดี่ยวๆ ขนาดใหญ่ กลีบดอกซ้อน ก้านดอกใหญ่และแข็งแรง ต้นสูง 2.5 - 7 ฟุต เป็นกุหลาบลูกผสมระหว่างกุหลาบ 1-8 ชนิด

2. กุหลาบพวง (Floribunda) ลักษณะของกุหลาบพวงคือ จะออกดอกเป็นช่อๆ หนึ่งมีหลายดอก ดอกจะบานพร้อมกัน ก้านดอกจะสั้นและอ่อน มีช่วงการออกดอกนาน เหมาะสำหรับปลูกประดับอาคาร บ้านเรือนหรือประดับแปลง

3. กุหลาบหนู (Miniature หรือ Pygmy roses) มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน เป็นกุหลาบขนาดเล็ก ทรงพุ่มไม่เกิน 12 นิ้ว ดอกขนาดเล็ก ให้ดอกดก ปลูกเลี้ยงง่าย ทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เหมาะสำหรับปลูกประดับอาคารบ้านเรือน

4. กุหลาบเลื้อย (Climber และ Rambler) กุหลาบพวกนี้จะมีลำต้นหรือกิ่งที่ยาว อ่อนโค้ง สามารถพันกับหรือเกาะกับสิ่งต่างๆ ได้ดี จึงเหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้เลื้อยตกแต่งกำแพง หรือแนวรั้ว โดยพวก Climber จะให้ดอกที่ใหญ่ ดอกอาจจะออกเป็นพวง หรือเป็นดอกเดี่ยวๆ ส่วนพวก Ramber ดอกมีขนาดเล็กกว่า และจะออกดอกเป็นช่อ

5. พวก Grandiflora เป็นกุหลาบลูกผสมระหว่างกุหลาบตัดดอกกับกุหลาบพวง ต้นสูงประมาณ 7-10 ฟุต มีดอกแบบดอกเดี่ยวขนาดใกล้เคียงกับกุหลาบตัดดอก ก้านดอกยาว แข็งแรง ลักษณะการเจริญคล้ายกับกุหลาบพวง จึงปลูกเป็นไม้ตัดดอกหรือไม้ประดับสถานที่

6. พวกกุหลาบป่า (wild roses) เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานนิยมนำมาใช้เป็นต้นตอสำหรับการผลิตกุหลาบตัดดอก

ชนิดของต้นตอกุหลาบ

ต้นตอกุหลาบ (Rootstock หรือ Understock) นิยมใช้กุหลาบพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมในพื้นที่ปลูก ซึ่งอาจจะเป็นลักษณะเดียวหรือหลายๆ ลักษณะรวมกัน (อดิศร, 2540) ได้แบ่งชนิดของกุหลาบที่นิยมใช้ดังนี้

1. *Rosa canina* 'Intermis' เป็นต้นพันธุ์กุหลาบที่ผลิตในโรงเรือนในแถบยุโรป แต่ไม่ค่อยนิยมใช้ในแถบอื่น เนื่องจากอ่อนแอต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น การที่อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็ว หรือความร้อนที่สูงเกินไป มักจะทิ้งใบ ดูแลรักษายาก อ่อนแอต่อโรค และไม่เจริญในฤดูหนาว ข้อดีคือ ให้ผลผลิตสูง ให้สีดอกที่ดี ต้านทานต่อโรคราแป้ง

2. *Rosa indica* 'Major' เป็นพันธุ์ที่ใช้มากในอิสราเอล และแถบซีกโลกใต้ ข้อดีของกุหลาบพันธุ์นี้คือ สามารถเจริญได้ในพื้นที่ที่เป็นดินทรายและดินที่มี pH ค่อนข้างสูง ทนต่ออากาศร้อน ให้กุหลาบที่มีก้านยาว สีดอกที่ดี การดูแลรักษาไม่ยาก เจริญได้ดีในฤดูหนาว ข้อเสีย คือ จะไวต่ออากาศเย็น ตั้งตัวได้ช้าในระยะแรกของการปลูก แต่เมื่อตั้งตัวได้แล้วจะเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และจะกลับมาช้าลง มักให้อาการกิ่งแห้งตายจากส่วนปลายที่ตัดแต่ง

3. *Rosa manetii* เป็นต้นตอที่ใช้มากในแถบอเมริกากลาง และสหรัฐอเมริกา ข้อดีคือ เป็นต้นตอที่เหมาะสำหรับนำไปขยายพันธุ์เพราะไม่ไวต่อความเย็น โดยเมื่อขุดขึ้นจากดินสามารถนำเข้าสู่ห้องเย็นได้ทันที เจริญได้ดีในฤดูหนาว

4. *Rosa multiflora* มีต้นกำเนิดที่ญี่ปุ่น อิสราเอลและอาฟริกาใต้ ข้อดีคือ โตเร็วให้ผลผลิตสูง การดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก ต้านทานโรคหลายชนิด ข้อเสียคือ ให้ดอกที่มีสีอ่อน อายุการใช้ปลูกได้ไม่นาน

5. *Rosa natal* 'Brier' มีถิ่นกำเนิดจากอาฟริกาใต้ ให้ต้นที่มีก้านยาว ให้ผลผลิตสูงในสภาพที่มีอากาศอบอุ่น

เชื้อไวรัสที่พบในกุหลาบ

ไวรัสของกุหลาบที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม Ilarvirus มีรูปร่างกลม อาจเป็น Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) และ/หรือ Apple mosaic virus (APMV) โดยอาจพบชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือพบทั้งสองชนิดร่วมกัน (สุรภีและคณะ, 2538 ; Casper, 1973 ; Crosslin, 1992 ; Fulton, 1967 ; Johnstone *et al.*, 1995 ; Loebenstein, 1995) ส่วนไวรัสชนิดอื่นมีรายงานว่าพบไม่มากนักได้แก่ Tobacco ringspot virus (TRSV) (McDaniel *et. al.*, 1971) , Tobacco streak virus (TSV) (Fulton, 1970) และ Strawberry latent ringspot virus (SLRV) (Murant, 1974 อ้างจาก Loebenstein, 1995) นอกจากนี้ในปี 1984 Hick and Frost (อ้างจาก Cooper, 1993) รายงานการตรวจพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม tobamovirus บริเวณกลีบของดอกกุหลาบที่แสดงอาการดอกด่าง แต่ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของอาการดอกด่าง

Brunt *et. al* (1996) ได้รวบรวมลักษณะของเชื้อไวรัสสาเหตุ ดังนี้

Prunus necrotic ringspot virus : อนุภาคประกอบด้วย nucleic acid 16% protein 84% รูปร่างทรงกลม มีหลายขนาดปะปนกัน เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค 23 25 และ 27 nm. เป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วย 3 จีโนม คือ 3.662 2.507 และ 1.887 kb. มี Thermal inactivation point (TIP) 55-62 ° C. Longevity *in vitro* (LIV) 6-18 ชั่วโมง และ Dilution end point (DEP) 10^{-2}-10^{-3} การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จะถ่ายทอดผ่านการ

ปลูกเชื้อ ทาบกิ่ง และละอองเรณู ไม่ถ่ายทอดผ่านทางเครื่องมือที่ใช้ตัดแต่งกิ่ง พืชทดสอบไวรัส คือ *Momordica balsamina*, *Cucumis sativus* และ *Cyamopsis tetragonoloba*

Apple mosaic virus : อนุภาคประกอบด้วย nucleic acid 16% protein 84% รูปร่างทรงกลม มีหลายขนาดปะปนกัน เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค 25 และ 29 nm. เป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว มี TIP 54 ° C. LIV 2-4 ชั่วโมง และ DEP 10^{-3} การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จะถ่ายทอดโดยวิธีกล หรือการทาบกิ่ง ไม่ถ่ายทอดผ่านเมล็ด นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการถ่ายทอดผ่านทางละอองเรณู พืชทดสอบไวรัส คือ *Cucumis sativus* และ *Cyamopsis tetragonoloba*

Tobacco ringspot virus : แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม B ประกอบด้วย nucleic acid 40% protein 60% กลุ่ม M ประกอบด้วย nucleic acid 28% protein 72% และ กลุ่ม T ประกอบด้วย protein 100% มีรูปร่างทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 25-29 nm. เป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วย 2 จีโนม คือ 6.8 และ 4.364 kb. มีค่า TIP 55-65 ° C. LIV 22 วัน และ DEP 10^{-4} การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จะถ่ายทอดผ่านแมลงพาหะแบบ semi-persistent แมลงพาหะได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ ไร นอกจากนี้ยังถ่ายทอดโดยวิธีกล ผ่านเมล็ดและผ่านละอองเรณูแต่ไม่ถ่ายทอดผ่านทางการสัมผัสระหว่างต้นพืช พืชทดสอบไวรัส คือ *Cassia occidentalis* *Nicotiana tabacum* และ *Vigna unguiculata*

Tobacco streak virus : อนุภาคประกอบด้วย nucleic acid 14% protein 86% รูปร่างทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค 27, 30 และ 35 nm. เป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วย 3 จีโนม คือ 2.94 2.77 และ 2.205 kb. มีค่า TIP 64 ° C. LIV 1.5 วัน และ DEP 10^{-1}-10^{-4} การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสถ่ายทอดผ่านแมลงพาหะ เช่น เพลี้ยไฟ (*Thrips tabaci*) และ ไร (*Frankliniella occidentalis*) นอกจากนี้ยังถ่ายทอดโดยวิธีกล การติดตา ทาบกิ่ง ถ่ายทอดผ่านเมล็ด ดังที่พบใน *Chenopodium quinoa* หรือ *Phaseolus vulgalis* และผ่านทางละอองเรณู ไม่ถ่ายทอดโดยการเสียดสีกันระหว่างต้นพืช พืชทดสอบไวรัส คือ *Beta patellaris* *Cyamopsis tetragonoloba* *Macrotyloma uniflorum* *Phaseolus vulgaris cv. Manteiga* และ *Vigna unguiculata ssp. Cylindrica*

Rose Tobamovirus : อนุภาคประกอบด้วย nucleic acid 5% protein 95% รูปร่างท่อนตรง ยาวประมาณ 310-320 nm. เป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว มีค่า TIP 95 ° C. LIV 730 วัน และ DEP 10^{-6}-10^{-7} การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส มักถ่ายทอดโดยวิธีกล หรือ การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนการทาบกิ่งจะถ่ายทอดค่อนข้างยาก ไม่พบการถ่ายทอดผ่านเมล็ด พืชทดสอบไวรัส คือ *Cucumis sativus* และ *Chenopodium amaranticolor*

การตรวจสอบไวรัส

การตรวจสอบหาไวรัสในกุหลาบ อาจใช้วิธีการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ได้แก่ *Momordica balsamina, Cucumis sativus* , *Chenopodium amaranticolor, Phaseolus vulgaris* และ *Vigna unguiculata* (Brunt *et. al.*,1996 ; Casper, 1973 ; Desvignes *et. al.*, 1992 ; Fulton, 1967 and 1970 ; McDaniel *et. al.*, 1971) Loebenstein (1995) รายงานว่า *R. multiflora* "Burr" สามารถใช้เป็นพืชทดสอบได้ ทั้งนี้จะให้อาการที่ใบอ่อน โดยจะแคระแกรน รูปร่างผิดปกติและมีอาการด่างอย่างอ่อน นอกจากนี้ เชื้อ PNRSV มีอัตราการถ่ายทอดต่ำมากใน *Cucumis sativus* และ*Chenopodium quinoa* ApMV มีอัตราการถ่ายทอดต่ำเช่นกันใน *Cucumis sativus* และ *Vigna unguiculata* สุรภีและคณะ (2538) รายงานว่า ไวรัสในกลุ่ม Ilarvirus จะสลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาพน้ำคั้น ส่งผลให้อัตราการถ่ายทอดโรคต่ำมากและการใช้สารเคมีบางชนิดเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของไวรัส เช่น Na_2SO_3 หรือ 2- mercaptoethanol ไม่สามารถป้องกันการสลายตัวของไวรัสได้

การศึกษาคุณสมบัติทางซีรั่ม Halk *et. al.* (1984) รายงานว่าไวรัสในกลุ่มนี้ เป็น weak immunogens และเป็นไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์ยาก ดังนั้น antiserum ที่ใช้ควรได้จากการผลิต monoclonal antibody เช่นเดียวกับที่ Stein ได้รายงานไว้ (อ้างจาก Loebenstein ,1995) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค Immune-sorbent electron microscope (ISM) สุรภีและคณะ (2538) พบว่าไวรัสในกุหลาบมีปฏิกิริยาเป็นบวกกับ antiserum PNRSV

Loesch-Fries *et. al.* (1977) รายงานว่าการศึกษาโครงสร้างจุลภาคของเชื้อไวรัสกลุ่ม Ilarvirus ทำได้ยากและการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนทำได้ยากเช่นกัน ประกอบกับในเซลล์พืชที่มีเชื้อไวรัสในปริมาณไม่มาก จึงมักตรวจสอบไม่พบ Loebenstein (1995) รายงานว่า การตรวจหาไวรัส สามารถตรวจได้ในส่วนของกลีบดอกหรือใบอ่อนของกุหลาบ แต่ทั้งนี้ไม่ควรจะตรวจหาไวรัสในฤดูปลูกที่มีอากาศร้อน

MacKenenzie *et. al.* (1997)ได้ใช้วิธีการ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อตรวจสอบไวรัสพืชในกลุ่มพืชไม้เนื้อแข็งเช่นเดียวกับรายงานของ Rowhani (1995) (อ้างจาก Hadidi, 1998) Parakh *et. al.* (1995) และ Spiegel *et. al.*. (1996) (อ้างจาก Hadidi, 1998) หรือการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค IC-RT-PCR หรือ immunocapture RT-PCR ซึ่ง Candresse *et. al.* (1995) Crossley *et. al.* (1998) และ Wetzel *et. al.* (1992) ได้รายงานไว้ (อ้างจาก Hadidi, 1998)

ลักษณะอาการที่พบในกุหลาบ

กุหลาบที่เป็นโรคจะมีไวรัสแพร่กระจายอยู่ทั่วทั้งต้น โดยมีรูปแบบการแพร่กระจาย ดังนี้ คือ การแพร่กระจายระหว่างเซลล์ โดยจะผ่านทางช่องเปิดระหว่างเซลล์ (plasmodesmata) ของ mesophyll

ซึ่งมีรูเปิดขนาดเล็ก 8-10 รู สำหรับให้แลกเปลี่ยนสารที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 800-1,000 Da (Mezitt and Lucas, 1996) โดยอาศัยแรงดันเต่งของเซลล์กับระดับ ATP ที่มีอยู่ใน Cytoplasm การเคลื่อนที่ของไวรัสจะอาศัย movement protein (MP) ซึ่งทำให้ขยายรูเปิดได้มากกว่า 10 kDa แต่ไม่เกิน 20 kDa กับการแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ภายในต้นทางท่อลำเลียงอาหาร จะผ่านทาง sieve element และบริเวณนี้จะไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนและการทวีจำนวนของไวรัส ดังนั้นการเคลื่อนที่ของไวรัสจึงขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาร่วมกันของ capsid protein กับปัจจัยต่างๆ ภายในเซลล์ ทั้งนี้โปรตีนดังกล่าวจะแตกต่างจากโปรตีนที่ใช้เคลื่อนที่ระหว่างเซลล์ โดยบทบาทหน้าที่โปรตีนกลุ่มนี้มีการศึกษาไม่กระจ่าง สันนิษฐานว่าอาจเป็นโปรตีนที่ทำให้ไวรัสเคลื่อนที่ผ่าน bundle sheath เข้าสู่ท่อลำเลียงอาหาร (Carrington *et.al.*, 1996) ดังนั้นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจึงเท่ากับเป็นการส่งเสริมการแพร่กระจายของโรคไวรัส

พืชที่เป็นโรคไวรัส จะเกิดความเปลี่ยนแปลงของขบวนการต่างๆ ภายในพืช โดยจำแนกอาการ์ที่เกิดจากการทำลายของเชื้อได้เป็น 2 ระดับ คือ

อาการภายนอกที่เห็นด้วยตาเปล่า อาทิเช่น อาการด่างแบบต่างๆ ที่เกิดกับใบกับดอก อาการแคระแกรนของพืช และ อาการรูปร่างผิดปกติ (malformation) เป็นต้น

Cooper (1993) จัดแบ่งอาการของโรคไวรัสในกุหลาบ ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) อาการที่เกิดกับส่วนของใบกับดอกโดยมีอาการใบเหลืองอ่อนเป็นจ้ำอาจเปลี่ยนเป็นจุดแผลแห้งตาย (necrosis) ใบบิดเบี้ยว (malformation) อาการด่างเขียวเป็นวงแหวน (chlorotic ring pattern) ด่างแบบ oak-leaf pattern ด่างชนิดลายซิกแซก (line pattern) ด่างเขียวแบบมีขอบชัดเจน (mosaic) และไม่ชัดเจน (mottle) อาการเหลืองของเส้นใบบริเวณใบล่างโดยเกิดร่วมกับอาการด่างแบบชัดเจน ในดอกสีเข้มจะเห็นอาการดอกด่าง (flower breaking) กลีบนอกของดอกบิดเบี้ยวหรือฉีกขาด Loebenstein (1998) รายงานว่าอาการด่างที่เกิดกับต้นตอกุหลาบ *R. multiflora* "Burr" จะทำให้ใบอ่อนแคระแกรนรูปร่างผิดปกติและเกิดอาการด่างอย่างอ่อนได้ ในสภาพการปลูกที่มีอุณหภูมิ 10-15 °C และมีความเข้มแสงสูงจะทำให้ใบของ *R. indica* เกิดอาการใบมีสีม่วงได้ 2) ส่วนอาการที่เกิดกับลำต้น ได้แก่ ข้อปล้องสั้นผิดปกติ มีอาการเสื่อมสภาพหรือการไม่พัฒนาของตาข้าง และการแตกกิ่งข้างได้น้อยลง (Cooper, 1993)

อาการผิดปกติภายในเซลล์

ความผิดปกติในระดับเซลล์ของพืชที่เป็นโรคไวรัสโดยทั่วไปมักจะพบการสร้างสิ่งแปลกปลอม (inclusion body) ภายในเซลล์พืช โดยอาจมีรูปทรงเรขาคณิต (crystalline inclusion bodies) เช่น TMV (tobacco mosaic virus) จะสร้างเป็นผลึกรูปหกเหลี่ยม PVY (potato virus Y) จะสร้าง

เป็นรูป pin wheel หรือเป็นแบบไม่มีรูปทรงแน่นอน (amorphus inclusion bodies หรือ X-bodies) โดยขนาดและลักษณะจะเปลี่ยนแปรไปตามสภาวะของเซลล์ (ประสาทพร, 2530)

Ewardson *et. al.* (1993) สันนิษฐานว่า inclusion body อาจเกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคไวรัส หรือ coat protein หรือ non-capsid protein โดยส่วนใหญ่จะเกิดที่ cytoplasm เช่น Potyvirus potato virus X หรือเกิดที่ nuclei เช่น geminivirus หรือเกิดทั้ง 2 แห่งเช่น Bean yellow mosaic virus บางชนิดเกิดที่ vaculoes และ cytoplasm เช่น cucumovirus สำหรับไวรัสในกลุ่ม Ilarvius มีรายงานว่าพบการรวมตัวของอนุภาคไวรัสที่บริเวณ cytoplasm และที่บริเวณ nuleus

การผลิตพืชปลอดโรคไวรัส

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพืชปลอดโรคพบว่า สภาพอุณหภูมิมีผลต่อการทวีจำนวนของไวรัส การทวีจำนวนของไวรัสส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิเท่ากับ หรือ มากกว่า 37°C ทั้งนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นมากกว่า 35°C นั้น การสังเคราะห์โปรตีนพืชจะถูกยับยั้ง พืชจะมีการปรับตัวโดยเกิดการสังเคราะห์ heat shock protein (hsp) เพิ่มระดับ saturate fatty acid และบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไซโตพลาสซึม เพื่อเพิ่ม osmotic pressure ภายในเซลล์เพื่อรักษาขบวนการเมตาบอลิซึมให้เป็นปกติ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 40°C การสังเคราะห์ RNA ทั้งของพืชและไวรัสจะถูกระงับ และหากย้ายพืชเป็นโรคจากสภาพอุณหภูมิสูงมาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C จะพบว่า พืชมีสังเคราะห์ RNA ทันที ขณะที่การทวีจำนวนของ double-stranded RNA (dsRNA) virus จะไม่เกิดขึ้น ไม่มีการสร้าง coat protein และ movement protein ส่วน single-stranded RNA (ssRNA) virus นั้น การทวีจำนวนจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ (Mink *et.al.*, 1998)

การผลิตพืชปลอดไวรัส โดยทั่วไปจะใช้วิธีการเก็บพืชในสภาพอุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นจะตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชเพื่อนำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดย Mink *et.al.* (1998) ได้จำแนกการใช้สภาพอุณหภูมิสูงเพื่อใช้ผลิตพืชปลอดไวรัส (thermotherapy หรือ heat therapy) เป็น 3 ประเภท คือ

1.) การให้สภาพอุณหภูมิสูง (36-39 °C) อย่างต่อเนื่อง
2.) การให้สภาพอุณหภูมิสูง (36-40 °C) สลับกับสภาพอุณหภูมิค่อนข้างสูง (28-36°C)
3.) การให้สภาพอุณหภูมิค่อนข้างสูงอย่างต่อเนื่อง (30°C)

ระยะเวลาที่เก็บพืชแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดพืช ภายหลังการเก็บพืชในสภาพอุณหภูมิสูง จะนำส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อบริเวณยอด (shoot tip) ยาวประมาณ 5-15 cm. บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (meristem tip) ขนาด 0.25-0.5 mm. และตาข้าง

รายงานการผลิตกุหลาบปลอดโรคไวรัสยังมีไม่มากนัก แต่มีรายงานเกี่ยวกับพืชอื่น ๆ ที่ประสบผลสำเร็จในการทดลองเช่น Quak (1977) ได้รายงานว่าการนำเอาส่วนเนื้อเยื่อเจริญขนาดประมาณ 0.1-0.25 mm. จากต้นที่เป็นโรคมาเพาะเลี้ยงโดยตรง มีโอกาสจะได้ต้นที่ปลอดไวรัส และหากนำต้นที่เป็นโรคมาเลี้ยงในสภาพมีอุณหภูมิสูงก่อน จะเพิ่มเปอร์เซ็นต์การปลอดโรคมากยิ่งขึ้น Mink *et. al.*, 1998 ได้ตรวจสอบงานวิจัยต่างๆ พบว่าการเก็บพืชสกุล Rosa กับ Prunus ภายใต้สภาพอุณหภูมิสูง (thermotherapy) ประมาณ 38°C เมื่อนำมาตัดเนื้อเยื่อตาข้างมาเลี้ยง จะมีอัตราการรอดชีวิต 25-80 % ทั้งนี้ในรายงานไม่ได้ระบุระยะเวลาที่ใช้เก็บพืชและสภาพการปลูกว่าปลอดเชื้อหรือไม่ งานวิจัยของ Shu and Timon (1996) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3-1.0 mm. ของท้อพันธุ์ Redhaven, Maycrest และ Sunset ในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA 0.2 ppm. IBA 0.01 ppm. และ GA_3 0.1 ppm. มีอัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อเจริญของท้อพันธุ์ Redhaven, Maycrest และ Sunset เท่ากับ 10.9 4.0 และ 5.2% ตามลำดับ ส่วน Gella and Errea (1998) ได้ทดลองทำ thermotherapy ร่วมกับการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของ Apricot , peach และ sour cherry โดยเก็บพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลานาน 15-36 วัน พบว่า peach มีอัตราการปลอดจากเชื้อ PNRSV ประมาณ 37-100% Apricot มีอัตราการปลอดจากเชื้อ Apple chlorotic leaf spot tricovirus (ACLSV) ประมาณ 60-100 % และ sour cherry มีอัตราการปลอดจากเชื้อ Prune dwarf virus (PDV) ประมาณ 85-100 %

Spiegel *et. al.* (1995) ได้ทดลองทำ thermotherapy ของท้อ พันธุ์ Summerset และ Hermosa ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเก็บพืชในสภาพอุณหภูมิสลับ คือ เก็บที่อุณหภูมิ 38°C ในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมง สลับกับที่ 28°C ในสภาพมืด เป็นระยะเวลานาน 18-20 วัน หลังจากนั้นจะตัดเนื้อเยื่อบริเวณยอด(shoot tip) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ที่มีฮอร์โมน BA 0.2 ppm. พบอัตราการรอดชีวิตของยอดอ่อนของพันธุ์ Summerset และ Hermosa เท่ากับ 48 และ 88% ตามลำดับ Knapp *et. al.* (1995) รายงานว่า ต้นแอปเปิลพันธุ์ Summerred ที่พัฒนาจากตาข้างของต้นที่เป็นโรคไวรัส เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานานกว่า 18 เดือน จะปลอดจากเชื้อ ApMV และพืชในกลุ่ม *Prunus* ที่มีเชื้อไวรัสหลายชนิดภายในต้น หากนำตาข้างมาเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเจริญเป็นต้นพืชในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อนำมาตรวจสอบจะพบว่ามีไวรัสเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่คงอยู่ภายในต้น Loebenstein (1995) ได้รายงานว่ากุหลาบที่เกิดอาการด่างแบบ ring pattern หากนำต้นไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 38°C เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 3 สัปดาห์ขึ้นไปนั้น บริเวณตาข้างจะปลอดเชื้อไวรัส เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Bjarnason *et. al.* ในปี 1985(อ้างจาก Loebenstein, 1995)ได้ทดลองเก็บต้นกุหลาบในสภาพอุณหภูมิ 38°C เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่าตาข้างจะปลอดจากเชื้อ PNRSV ประมาณ 50%

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบ

การขยายพันธุ์กุหลาบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ นิยมใช้ตาข้าง (axillary bud) มาเลี้ยง (Ishioka and Tanimoto, 1990) โดยในปี 1982 Khosh-Khui and Sink (อ้างจากกาญจนา, 2531) อธิบายว่าการใช้ตายอดมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนั้น ตายอดมักจะได้รับอันตรายจากการใช้สารฆ่าเชื้อที่ผิว เช่น สารละลาย Clorox ได้ง่ายกว่าตาข้าง Rout *et. al.* (1991) พบว่าการเพาะเลี้ยงตาข้างของ *Rosa hybrida* ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่มีฮอร์โมนจะเจริญได้ดี ส่วนอาหารสังเคราะห์ที่กระตุ้นการแตกกอของต้นกุหลาบ มักจะมีส่วนผสมของฮอร์โมน BA กับ NAA ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Arnold *et. al.*, 1992) ทั้งนี้ Ma *et. al* (1996) รายงานว่าระดับฮอร์โมนที่เหมาะสมควรใช้ BA 0-2 ppm. กับ NAA 0-0.1 ppm ขณะที่ Lloyd (1988) จะใช้อาหารสูตร MS ที่มี sucrose 40 g./l.ร่วมกับ BAP 0.5 ppm. และ NAA 0.005 ppm. สำหรับ Hsia และ Korban (1996) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่มี BAP 8.8 µM. และ NAA 0.54 µM. เหมาะสมต่อการชักนำการแตกกอของ *R. hybrida* และ *R. chinensis* โดยพบว่าระดับฮอร์โมน BA จะมีอิทธิพลต่อการแตกกอมากที่สุด ส่วน *R. wichuraiana* นั้น Robert *et. al.* (1990) รายงานว่า จะใช้ BA 1 ppm. กับ NAA 0.005 ppm. นอกจากนี้ Salehi and Khosh-Khui (1997) พบว่าต้นกุหลาบที่มีความสูงประมาณ 9-10 mm. และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-3.5 mm. จะมีการเจริญเติบโตและแตกกอได้ดีที่สุด และ Sallanon and Maziere (1992) รายงานว่า ต้นอ่อนกุหลาบที่มีความสูงมากกว่า 1 cm. จะเหมาะต่อการชักนำให้เกิดราก โดยสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดรากนั้น Robert *et. al.* (1990) รายงานว่าอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับฮอร์โมน NAA 0.1 ppm. จะเหมาะต่อการชักนำให้ *R. wichuraiana* เกิดราก ขณะที่ Ma *et. al.* (1996) ทดลองพบว่าสามารถชักนำให้ *R. wichuraiana* เกิดรากได้เช่นกันในอาหารแข็งสูตร MSที่ผสม IAA 2 ppm. นอกจากนี้กาญจนา (2531) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.1 ppm. จะชักนำให้ *R. damascena* สร้างรากได้และ Lloyd *et. al.* (1988) ได้รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่มี IAA 0.1 ppm. เป็นสูตรที่ชักนำให้เกิดรากใน *R. hybrida* *R. rugosa* *R. wichuraiana* และ *R. laevigata*