บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยในเรื่องนี้ได้แบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่คือ ศึกษาลักษณะอาการ ความรุนแรงของโรคและทดสอบไวรัสในกุหลาบ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นตอกุหลาบระยะต่างๆในสภาพปลอดเชื้อ ศึกษาวิธีการย้ายปลูกในโรงเรือน และศึกษาวิธีการผลิตต้นตอกุหลาบปลอดไวรัสในสภาพปลอดเชื้อ ผลการทดลองในแต่ละกลุ่มสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาลักษณะอาการ ความรุนแรงของโรคและทดสอบไวรัสในกุหลาบ

ผลจากการทดลองพบว่าไวรัสที่มีอยู่ในต้นกุหลาบได้ก่อให้เกิดลักษณะผิดปกติขึ้น ในกุหลาบโดยมีลักษณะอาการภายนอกที่ปรากฏให้เห็นในรูปแบบต่าง ๆ ที่บริเวณใบ ดอก กิ่งอ่อนหรือยอด อาการที่พบอาจเป็นอาการอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือ ร่วมกันหลายลักษณะ อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาโครงสร้างจุลภาคของกุหลาบที่เป็นโรคไม่สามารถตรวจหาอนุภาคของไวรัสได้ ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคอยู่ในกลุ่ม Ilarvirus ที่ Loesch-Fries *et. al.* (1977) รายงานว่าเป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กมากขนาด 25-30 nm. สลายตัวได้ง่ายจึงยากต่อการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของพืชที่เป็นโรค เพราะในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาจะต้องผ่านการใช้สารเคมีหลายชนิดซึ่งอาจมีผลทำให้อนุภาคของไวรัสเกิดการแตกตัวไม่เป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ได้ อย่างไรก็ตามพบลักษณะความผิดปกติของเซลล์โดยเฉพาะการขดม้วนของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเซลล์กุหลาบที่เป็นโรค มีลักษณะผิดปกติที่เป็นสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์ในรูปแบบของ amorphus ซึ่ง Ewardson *et. al.* (1993) รายงานว่า ในเซลล์พืชอาจมีเชื้อไวรัส กลุ่มนี้รวมตัวกันอยู่ที่บริเวณ cytoplasm และที่ nucleus หรือจากรายงานของ Hull (1986) ชี้ให้เห็นว่าการศึกษาชนิดของไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะไม่สามารถบอกหรือตรวจสอบความแตกต่างของชนิดไวรัสได้อย่างแม่นยำ ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีปริมาณเชื้อในพืชไม่มากพอจะตรวจสอบไม่พบอนุภาคไวรัสอีกด้วย ซึ่งตามปกติไวรัสในกลุ่มนี้จะมีปริมาณต่ำมากในเซลล์ที่ถูกทำลาย จึงไม่อาจตรวจสอบโดยวิธีการดังกล่าวได้

จากการทดสอบหาไวรัสในกุหลาบโดยการปลูกเชื้อ พบอาการแบบ local lesion เกิดขึ้นบนใบพืชทดสอบ 2 ชนิด คือ *Cucumis sativus* และ *Momordica balsamina* ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าไวรัสในกุหลาบที่ทดสอบเป็นไวรัส 2 ชนิดร่วมกันคือ ApMV กับ PNRSV จากการทดสอบพบอาการ local lesion ไม่มากนัก สันนิษฐานว่าเชื้ออาจมีปริมาณน้อยหรือเชื้ออาจมีการสลายตัวเนื่องจากถูก

จับโดยสารเมือกที่พบขณะบดเนื้อเยื่อกุหลาบ ทำให้เชื้อเสื่อมประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคได้ ประกอบกับสภาวะอากาศที่ปลูกกุหลาบเพื่อนำมาทดสอบนั้นมีอุณหภูมิค่อนข้างสูงจึงอาจเกิดปัญหาในการแสดงอาการของพืชทดสอบได้ โดย Loebenstein (1995) รายงานว่า การตรวจหาไวรัสควรจะใช้ส่วนของกลีบดอกหรือใบอ่อนของกุหลาบและไม่ควรจะตรวจสอบในช่วงที่มีอากาศร้อน นอกจากนี้งานทดลองของสุรภีและคณะ (2538) ได้ยืนยันว่าเชื้อไวรัสที่พบในกุหลาบเป็นไวรัสที่สลายตัวง่าย มีอัตราการถ่ายทอดโรคต่ำมากถึงแม้ว่าจะเติมสารเคมีบางชนิดที่ป้องกันการสลายตัวของไวรัสลงในบัฟเฟอร์ เช่น 2-mercaptoethanol , Na_2SO_3 หรือ EDTA ก็ตาม Loebenstein (1995) ยังได้รายงานเพิ่มเติมอีกว่า เชื้อ PNRSV ที่ได้จากกุหลาบมักถ่ายทอดไปยัง *Cucumis sativus* และ *Momordica balsamina* ได้ยาก และเชื้อ ApMV ที่จะถ่ายทอดไปยัง *C. sativus* และ *Vigna unguiculata* ได้ยากเช่นกัน จากรายงานประกอบอื่นที่เสนอว่า การตรวจสอบหาไวรัสกลุ่ม Ilarvius และ NEPO virus ในไม้ผลที่ใช้พืชทดสอบ คือ *C. sativus* กับ *Chenopodium quinoa* นั้นจะตรวจสอบไม่ได้กับไวรัสทุกชนิดและทุกสายพันธุ์ที่มีอยู่ในกลุ่มดังกล่าว (Hadidi, 1998) ดังนั้นหากตรวจสอบโดยการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบไม่พบจึงควรศึกษาในระดับอณูโมเลกุลต่อไปเช่นการศึกษาโดยใช้เทคนิค RT-PCR หรือ reverse transcription – polymerase chain reaction (MacKenenzie *et. al.*, 1997 ; Rowhani, 1995 อ้างจาก Hadidi, 1998 ; Parakh *et. al.*.(1995) และ Spiegel *et. al.*, 1996 อ้างจาก Hadidi, 1998) เทคนิค IC-RT-PCR หรือ immunocapture RT-PCR [Candresse *et al* (1995) Crossley *et. al.*(1998) Wetzel *et.al.* (1992)อ้างจาก Hadidi, 1998] ส่วนการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยานั้น antiserum ที่ใช้ตรวจสอบต้องเป็นชนิดที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ไวรัส มากที่สุด โดย Halk *et. al.* (1984) พบว่าไวรัสในกลุ่ม Ilarvirus จัดเป็น weak immunogens และเป็นไวรัสที่ทำให้บริสุทธิ์ยาก จึงมักมีปัญหาในด้านความไม่จำเพาะของปฏิกิริยาในการตรวจสอบเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวการใช้ monoclonal antibody จึงเป็นต่อการตรวจสอบไวรัส กลุ่มนี้มากที่สุด

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นตอกุหลาบระยะต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างของกุหลาบในระยะแรกนั้น นอกจากสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแล้ว การสร้างสารประกอบฟีนอลจากรอยตัดของตาจะมีผลต่อการรอดชีวิตของตาข้าง ทำให้ต้องเปลี่ยนอาหารหลายครั้งอย่างต่อเนื่องซึ่งตรงกับที่ Salehi and Khosh-Khui (1997) รายงานไว้ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BAP เข้มข้น 0.20 ppm. กับ GA_3 เข้มข้น 0.1 ppm. จะชักนำให้สร้างต้นอ่อนจากตาข้างได้ดีจากตากุหลาบทั้ง 2 ชนิดโดยเกิดต้นอ่อน 64% ใน *R. indica* และ76% ใน *R. multiflora* Choudhary (1991) (อ้างจาก Hsia and Korban, 1996) รายงานว่า หากระยะเวลาในการย้ายอาหารของต้นพืชช้าไปจะมีผลต่อการพัฒนาและการตายของต้นอ่อนได้และจากการทดลองนี้ยังพบว่านอกจากตาข้างจะพัฒนาจนเกิดเป็นต้นอ่อนแล้ว ยังอาจเปลี่ยน

ไปเป็นแคลลัสได้ด้วยโดยแคลลัสที่เกิดมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์อัดแน่น สีเขียวอ่อน มีการเจริญช้า และไม่มีการพัฒนาต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบของเซลล์ที่มีแป้งชนิดต่าง ๆ มากเกินไป (Lloyd *et. al.*, 1988)

ในส่วนอาหารที่เหมาะต่อการเจริญเติบโต และการแตกกอในกุหลาบจะมีองค์ประกอบที่แตกต่างโดย Ma *et. al.* (1996)พบว่าชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนจะมีผลต่อการกระตุ้นการแตกกอและการสร้างรากในอาหารสังเคราะห์แตกต่างกันในกุหลาบแต่ละพันธุ์ ผลของการทดลองครั้งนี้เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญในด้านความสูงพบว่าสูตรอาหาร MS ที่มี BAP เข้มข้น 0.2 ppm. GA_3 เข้มข้น 0.1 ppm. และ sucrose 4 % จะให้อัตราการเจริญด้านความสูงได้ดีที่สุดในกุหลาบทั้ง 2 ชนิด ส่วนสูตรที่ชักนำให้กุหลาบทั้ง 2 ชนิดเกิดการแตกกอและให้จำนวนต้นต่อกอมากที่สุด คือสูตร MS ที่ผสม BAP 1 ppm. IAA 0.05 ppm.และ GA_3 0.2 ppm. หรือสูตร MS ที่ผสม BAP 0.63 ppm. NAA 0.01 ppm. และ GA_3 0.1 ppm. ทั้งนี้เนื่องจากว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Salehi and Khosh-Khui (1997) พบว่าต้นกุหลาบที่มีความสูงประมาณ 9-10 mm. และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-3.5 mm. จะมีพัฒนาการเจริญเติบโตและแตกกอได้ดีที่สุด และ Hsia and Korban (1996) พบว่าความเข้มข้นของฮอร์โมน BA จะมีอิทธิพลต่อการแตกกอของ *R. hybrida* และ *R. chinensis* มากกว่าปัจจัยอื่น ส่วนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดการสร้างรากในกุหลาบทั้ง 2 ชนิด พบว่าอาหารสูตร MS ที่มี IAA หรือ NAA เข้มข้น 0.1 ppm. และ GA_3 0.1 ppm.สามารถชักนำให้เกิดการสร้างรากได้ดีโดยมีอัตราการสร้างรากไม่ต่ำกว่า 80 % Ma *et. al.* (1996)พบว่า *R. wichuraiana* สามารถชักนำให้เกิดรากในสูตร MS ที่มี IAA 2 ppm. หรือจากรายงานของกาญจนา (2531) ที่พบว่าสูตรอาหาร MS ผสม NAA 0.1 ppm. เป็นสูตรที่เหมาะสมต่อชักนำให้ *R. damascena* สร้างรากได้ดี สำหรับ *R. hybrida* *R. rugosa* *R. wichuraiana* และ *R. laevigata* อาหาร MS ที่มี IAA เข้มข้น 0.1 ppm. จะให้ผลดีที่สุด (Lloyd *et. al.*, 1988) นอกจากนี้ Sallanon and Maziere (1992) ยังรายงานว่าต้นอ่อนของกุหลาบที่จะชักนำให้สร้างรากควรมีขนาดมากกว่า 1 cm.

3. การย้ายปลูกในโรงเรือน

การย้ายปลูกต้นกุหลาบที่เกิดการสร้างราก โดยสมบูรณ์ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าการใช้หรือไม่ใช้ฮอร์โมนเร่งราก (เซราดิกซ์ เบอร์ 1) ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก โดยกุหลาบทั้ง 2 ชนิดสามารถปรับตัวได้ดี มีอัตราการรอดชีวิตได้ไม่ต่ำกว่า 80% ทั้งนี้อาจเนื่องจากรากกุหลาบที่มีอยู่แล้วเป็นรากที่สมบูรณ์ ประกอบกับสภาพของเครื่องปลูกที่ใช้ที่มีส่วนผสมของดิน : ขี้เถ้าแกลบ ในอัตราส่วน 1 : 6 และสภาพตู้ควบคุมอุณหภูมิ และความชื้น โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25°C ความชื้น 85% แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นสภาพที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตและการปรับตัวของต้น

กุหลาบ หลังจากเก็บต้นไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จึงย้ายมาเก็บในสภาพโรงเรือนพบว่ากุหลาบมีการเจริญเติบโตได้ดี เมื่อย้ายต้นกุหลาบลงปลูกในกระถางเดี่ยวที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 นิ้วหรือมากกว่านั้นโดยใช้เครื่องปลูกที่มีส่วนผสมของดิน : ขี้เถ้าแกลบ อัตรา 3 : 1 โดยต้นกุหลาบมีการเจริญเติบโตดี ดังนั้นวิธีการย้ายปลูกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จึงมีความเหมาะสมสำหรับการย้ายปลูกกุหลาบทั้ง 2 ชนิด

4. การผลิตต้นตอกุหลาบปลอดไวรัสในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองเก็บต้นกุหลาบทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อไว้ในสภาพอุณหภูมิสูงสลับ คือ ให้อุณหภูมิ 36°C ให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิ 30°C ในที่มืด เป็นระยะเวลา 3 4 5 6 และ 7 สัปดาห์ นั้น อัตราการรอดชีวิตของพืชทั้ง 2 ชนิดจะแปรผกผันกับระยะเวลาที่เก็บกล่าวคือถ้าเก็บพืชไว้ในสภาพอุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน อัตราการรอดชีวิตของพืชจะลดต่ำลง โดย Mink *et. al.* (1998) อธิบายว่าสภาพอุณหภูมิสูง จะทำให้ขบวนการแบ่งเซลล์ลดลง ยับยั้งขบวนการสังเคราะห์แสง และมีผลให้ขบวนการหายใจเพิ่มขึ้น ขณะที่การสังเคราะห์โปรตีนปกติของพืชจะลดลง การที่พืชมีการหายใจสูงขึ้นภายใต้สภาพที่มีการระเหยของน้ำสูง ความสามารถในการดูดน้ำของพืชไม่ได้ลดลง แต่พืชจะมีการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตต่ำลง (Sallanon and Maziere, 1992) เมื่อทำ thermotherapy ของ *R. indica* กับ *R. multiflora* เป็นระยะนานกว่า 4 และ 5 สัปดาห์ ตามลำดับจะทำให้อัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50% สำหรับต้นพืชที่รอดชีวิตบางต้นพบว่า บริเวณส่วนยอดเกิดการยืดตัวมากกว่าปกติ และต้นสามารถแตกกอได้ ทั้งนี้สภาพอุณหภูมิสูง จะทำให้ระดับฮอร์โมนภายในต้นพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยพบว่าระดับของ cytokinin auxin และ gibberellin จะลดลง ขณะที่ ABA และ ethylene จะสูงขึ้น (Mink *et. al.*, 1998) ซึ่งการที่ระดับ ethylene สูงขึ้น จะชักนำให้กุหลาบมีอัตราการแตกกอเพิ่มขึ้น (Kevers *et. al.*, 1992)

เมื่อนำต้นที่ทำ thermotherapy โดยใช้อุณหภูมิ 35°C ให้แสง 16 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิ 30° C ในที่มืด เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 3 4 5 6 และ 7 สัปดาห์ ก่อนนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาดประมาณ 0.2-0.3 mm. เลี้ยงบนอาหารสูตร C (MS ที่ผสม BAP 0.2 ppm. และ GA_3 0.1 ppm.) พบว่าเนื้อเยื่อเจริญของต้นทำ thermotherapy สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อน เปลี่ยนเป็นแคลลัส หรือตายได้ โดยต้นทีทำ thermotherapy 3 สัปดาห์ เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญมาเลี้ยงบนอาหารสูตร C เนื้อเยื่อเจริญจะพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้สูงสุด โดยใน *R. indica* พบ 72.5% และใน *R. multiflora* พบ 80% ขณะที่ต้นที่ทำ thermotherapy ที่เป็นระยะนานมากกว่า 3 สัปดาห์พบอัตราการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของเนื้อเยื่อเจริญจะลดลง ขณะที่การตาย และการเปลี่ยนเป็นแคลลัสจะเพิ่มขึ้น สังเกตได้ว่าต้นกุหลาบที่ทำ thermotherapy เป็นระยะเวลามากกว่า 5 สัปดาห์ ลำต้นมีลักษณะฉ่ำน้ำ สีเหลืองอ่อนและเมื่อนำตัดส่วนเนื้อเยื่อเจริญมาเลี้ยง พบว่าเนื้อเยื่อเจริญของต้น *R. indica* และ *R. multiflora* จากต้นที่ทำ

thermotherapy เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ มีอัตราการพัฒนาเป็นต้นอ่อนประมาณ 20% และอัตราการตายสูงถึง 63% ทั้งนี้การนำส่วนเนื้อเยื่อเจริญของพืชปกติมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มักพบว่า อัตราการรอดชีวิตจะค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญให้ประสบความสำเร็จขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ขนาดของเนื้อเยื่อเจริญ และสภาพอุณหภูมิที่เลี้ยง (Faccioli and Marani, 1998 ; Quak , 1977)

เมื่อนำต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญจากต้นที่ทำ thermotherapy ในสภาพ *in vitro* เป็นระยะเวลา 3 4 5 6 และ 7 สัปดาห์ มาเปรียบเทียบอัตราการเจริญกับต้นที่พัฒนาจากตาข้าง มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร C คือสูตร MS ที่ผสม BAP 0.2 ppm. และ GA_3 0.1 ppm. จะพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนต้นที่แตกใหม่ การแตกกอ และค่าเฉลี่ยด้านความสูงของต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy มีแนวโน้มมากกว่าชุดเปรียบเทียบที่ได้จากเนื้อเยื่อของตาข้าง

เมื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของ *R. indica* เมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 4 สัปดาห์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นที่แตกใหม่ของชุดเปรียบเทียบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ที่ระยะเวลา 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ และเมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชุดเปรียบเทียบกับต้นจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ที่ระยะเวลาต่างๆ ส่วนค่าเฉลี่ยความสูงเมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ ชุดเปรียบเทียบจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับต้นจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ที่ระยะเวลา 4 6 และ 7 สัปดาห์ และถ้าเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ ชุดเปรียบเทียบจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ Thermotherapy ที่ระยะเวลา 3 4 6 และ 7 สัปดาห์

ส่วนค่าเฉลี่ยต้นที่แตกใหม่ของ *R. multiflora* เมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ ชุดเปรียบเทียบ จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ และเมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ พบว่าชุดเปรียบเทียบ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ที่ระยะเวลาต่างๆ ส่วนค่าเฉลี่ยความสูงเมื่อเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ ชุดเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ และที่ 6 สัปดาห์ ค่าเฉลี่ยความสูงของชุดเปรียบเทียบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญของต้นที่ทำ thermotherapy ที่ระยะเวลา 7 สัปดาห์

Mink *et. al.*, 1998 ได้ตรวจสอบการวิจัยพบว่าการเก็บพืชสกุล Rosa กับ Prunus ภายใต้สภาพอุณหภูมิสูง (thermotherapy) ประมาณ 38°C เมื่อนำมาตัดเนื้อเยื่อตาข้างมาเลี้ยง จะมีอัตราการรอดชีวิต 25-80 % ทั้งนี้ไม่ได้ระบุระยะเวลาที่ใช้เก็บพืชและสภาพการปลูกว่าปลอดเชื้อหรือไม่

จากงานวิจัยที่ต่างๆ ที่ได้ตรวจเอกสาร ทำให้สันนิษฐานได้ว่างานวิจัยผลิตต้นตอกุหลาบในครั้งนี้ มีความเป็นไปได้ที่จะได้ต้นตอกุหลาบคือ *R. indica* กับ *R. multiflora* ที่ปลอดไวรัสเป็นเปอร์เซนต์ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องจาก

1.) ขบวนการผลิตนั้น ได้ใช้ต้นกุหลาบที่พัฒนาจากตาข้างมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะนำมาเก็บไว้ที่สภาพอุณหภูมิสูง ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำให้กุหลาบปลอดโรค โดย Knapp *et. al.* (1995) รายงานว่าพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานาน ปริมาณของเชื้อที่มีอยู่ภายในต้นจะลดลงหรือสูญหายได้ ดังเช่น ต้นแอบเปิลพันธุ์ Summerred ต้นที่พัฒนาจากตาข้างของต้นที่เป็นโรค เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นระยะเวลานานกว่า 18 เดือน ต้นจะปลอดเชื้อ ApMV และ พืชในกลุ่ม *Prunus* ที่มีเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิดภายในต้น หากนำตาข้างมาเพาะเลี้ยงจนกระทั่งได้เป็นต้นพืช และให้เจริญในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่ง ต้นพืชนั้นจะมีเชื้อไวรัสคงอยู่ภายในต้นเพียงชนิดเดียวเท่านั้น

2.) เมื่อได้ต้นตอกุหลาบที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อ จะนำมาทำ thermotherapy โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 35°C แสง 16 ชั่วโมง สลับกับ อุณหภูมิ 30° C ในที่มืด เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 3 4 5 6 และ 7 สัปดาห์ จากนั้นนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาดประมาณ 0.2-0.3 mm. ซึ่งเป็นขนาดที่เล็กมากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร C (MS ที่ผสม BAP 0.2 ppm. และ GA_3 0.1 ppm.) ซึ่งวิธีการทำ thermotherapy ของพืชที่เจริญในสภาพปลอดร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตพืชปลอดโรคมากที่สุดวิธีหนึ่ง (ประสาทพร, 2540 ; Knapp *et.al.*, 1995 ; Loebenstein, 1995 ; Mink *et. al.*, 1998 ; Spiegel, 1996) และจากรายงานของ Loebenstein (1995) พบว่ากุหลาบแสดงอาการด่างแบบ ring pattern เมื่อนำต้นที่เจริญในสภาพ *in vivo* ไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 38°C เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 3 สัปดาห์ขึ้นไป ตาข้างจะปลอดเชื้อไวรัส เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Bjarnason *et. al.* (1985) ที่ทดลองเก็บต้นกุหลาบที่เจริญในสภาพ *in vivo* ไว้ที่อุณหภูมิ 38°C เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่าตาข้างจะปลอดจากเชื้อ PNRSV ประมาณ 50%(อ้างจาก Loebenstein, 1998)

3.) เมื่อเนื้อเยื่อเจริญดังกล่าวมีการพัฒนาเป็นต้นกุหลาบที่สมบูรณ์ ไม่พบว่าต้นกุหลาบทั้ง 2 ชนิด คือ *R. indica* และ *R. multiflora* แสดงอาการด่างหรืออาการผิดปกติใด ๆ เกิดขึ้นแม้ว่าจะปล่อยให้เจริญเป็นเวลานานก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับต้นอ่อนชุดเดียวกันที่ปลูกเชื้อไวรัส จะพบว่าแสดงอาการด่างหรืออาการผิดปกติที่ใบอย่างเด่นชัด จึงสามารถยืนยันความปลอดโรคของกุหลาบได้ดี โดยเฉพาะ Loebenstein (1995) ได้รายงานว่า *R. multiflora* สามารถใช้เป็นพืชทดสอบไวรัสได้ดี ทั้งนี้ถ้ามีไวรัสอยู่ภายในต้นจะให้อาการที่ชัดเจนที่ใบอ่อน ต้นแคระแกรน รูปร่างผิดปกติ และเกิดอาการด่าง