

การผลิตดองติง (*Gloriosa rothschildiana* O' Brien) ปลอดไวรัส CMV โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Production of CMV-free *Gloriosa rothschildiana* O' Brien Using Tissue Culture Techniques

พรสวรรค์ อุ่นศิลป์¹ ศิรินทร์ยา มีสวัสดิ์² และ เกวาลิน คุณาศักดากุล^{1*}
Pondsawan Unsilp¹, Sirinya Meesawat² and Kaewalin Kunasakdakul^{1*}

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ 50200

²Plant Biotechnology Research Centre, Royal Project Foundation, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: kaewalin.k3@gmail.com

(Received: 7 February 2019; Accepted: 29 April 2019)

Abstract: *Gloriosa rothschildiana* O' Brien tubers from Nong Khiaw Royal Project Development Center were collected and planted under greenhouse condition. After planting for 90 days, stripe mosaic and distortion of leaves, mosaic pale on flower petals were clearly observed. Infections were proved by RT-PCR of *Cucumber mosaic virus* (CMV) Five criteria severity levels 0-4 (healthy normal-severest) were used to evaluate the diseases in 100 leaf-samples, no healthy normal detected, severity level 3 was the major percentage found at 33.75% followed by level 4, 2, 1 and 0 at 25, 20, 13.75 and 7.5 % respectively. Additionally, more severe of the symptom was less flower number per plant. Virus type checking by ELISA technique was proved for CMV infection. Then RT-PCR showed CMV-free treatments studies 100% succeed, excision of meristem at size 0.3 mm and 40 mg/l ribavirin treatment of *in vitro* shoot removal on tuber at size 0.5 cm with the survival rates at 75 and 100%, respectively. Culture medium, MS supplemented with BAP 3.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L was proper for production of gloriosa plantlets at rate 2.27 shoots and 2.20 mini-tuber per explant after culture for 12 weeks.

Keywords: *Gloriosa*, tissue culture, CMV-free plantlets

บทคัดย่อ: นำหัวพันธุ์ทองดั่งจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ มาปลูกภายใต้โรงเรือนกันแมลง หลังปลูกได้ 90 วัน พบใบแสดงอาการต่างเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบ รูปร่างบิดเบี้ยว ส่วนของกลีบดอกแสดงอาการด่างสีซีด จากการประเมินระดับความรุนแรงโดยแบ่งเป็น 5 ระดับ (0-4) พบว่าระดับความรุนแรงมากที่สุด คือระดับ 3 คิดเป็น 33.75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ ระดับ 4, 2, 1 และ 0 คิดเป็น 25, 20, 13.75 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่าความรุนแรงในระดับสูงส่งผลให้จำนวนดอกต่อต้นน้อยลง การตรวจสอบชนิดไวรัสด้วยเทคนิค ELISA พบเกิดจากไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) เมื่อศึกษาวิธีการกำจัดไวรัส CMV โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร การเพาะเลี้ยงยอดจากหัวพันธุ์ขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน (ribavirin) ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร จากตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร และการเพาะเลี้ยงยอดจากหัวพันธุ์ขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราปลอดไวรัส 100 เปอร์เซ็นต์ และมีชีวิตรอดหลังการเพาะเลี้ยง 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของทองดั่ง ได้แก่ อาหาร MS ที่เติม BAP 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.27 ยอดต่อต้น และจำนวนหัวเฉลี่ยสูงสุด 2.20 หัวต่อต้น หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

คำสำคัญ: ทองดั่ง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นอ่อนพืชปลอดไวรัส CMV

คำนำ

ทองดั่ง (*Gloriosa rothschildiana* O' Brien) เป็นไม้ดอกประเภทหัวกึ่งไม้เลื้อย ดอกมีสีสันสวยงาม รูปทรงแปลกตา มีถิ่นกำเนิดจากประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกา และได้รับความนิยมปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อน สำหรับประเทศไทยพบว่าการปลูกเป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางโดยมีพื้นที่เพาะปลูกที่สำคัญ ได้แก่ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนี้ยังมีการใช้ทองดั่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และการเกษตร เช่น สารสกัดจากทองดั่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ (George and Pandalai, 1949) ปัจจุบันการผลิตหัวพันธุ์ทองดั่งกำลังเผชิญกับปัญหาการเข้าทำลายของไวรัส ส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิต จะพบอาการต่างที่ใบและกลีบดอก กลีบดอกมีขนาดเล็กลง และมีอายุในการปักแจกันของดอกลดลงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Royal Project Foundation, 2015) การระบาดของไวรัสเกิดจากเกษตรกรใช้หัวพันธุ์ที่มีการสะสมของไวรัสอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ไวรัสสำคัญที่เข้าทำลายทองดั่ง ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Gloriosa stripe mosaic virus* (GSMV) และ *Gloriosa*

fleck virus (GFV) โดยเฉพาะไวรัส CMV ซึ่งเป็นไวรัสที่ยากต่อการป้องกันกำจัดเนื่องจากมีพืชอาศัยกว้างและมักเข้าทำลายร่วมกับไวรัสหลายชนิดก่อให้เกิดอาการโรคที่รุนแรงมากขึ้น (Araki *et al.*, 1985) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตหัวพันธุ์ทองดั่งปลอดไวรัส CMV ด้วยเทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณหัวพันธุ์ปลอดไวรัสเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนหัวพันธุ์ปลอดไวรัสของเกษตรกรผู้เพาะปลูกทองดั่งตัดดอกในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ลักษณะอาการโรคไวรัสและการตรวจวินิจฉัย

1.1. การประเมินความรุนแรงของโรค

นำหัวพันธุ์ทองดั่งจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 80 หัว โดยเลือกหัวพันธุ์ที่มีน้ำหนักประมาณ 30-60 กรัม มาปลูกภายใต้โรงเรือนกันแมลง หลังปลูกได้ 90 วัน บันทึกอาการผิดปกติและประเมินความรุนแรงของโรคไวรัสในแต่ละต้น โดยเลือกประเมินใบที่ 1-5 นับจากยอด กำหนดเกณฑ์การประเมินพื้นที่ใบที่แสดงอาการใบด่างเทียบกับ

พื้นที่ใบทั้งหมด แบ่งเป็น 5 ระดับความรุนแรง (0-4) ตามวิธีการของ Akbar *et al.* (2015) คือ ระดับ 0 ไม่แสดงอาการใบด่าง ส่วนระดับ 1-4 แสดงอาการด่างบนพื้นที่ใบตามลำดับ ดังนี้ 1: 1-25, 2: 26-50, 3: 51-75 และ 4: 76-100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1) และ การศึกษามลกระทบของโรคไวรัสต่อการออกดอกของดองดิง โดยเลือกต้นดองดิงที่แสดงอาการโรคไวรัสในแต่ละระดับความรุนแรงระดับละ 6 ต้น วางแผนแบบบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design: RCBD) บันทึกผลโดยนำจำนวนการออกดอกและเปรียบเทียบจำนวนดอกต่อต้น หลังปลูกได้ 18 สัปดาห์

1.2 การตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา

นำใบดองดิงที่แสดงอาการใบด่างในสภาพโรงเรือนจำนวน 20 ตัวอย่าง มาตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาชนิดของไวรัสด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้แอนติซีรัมของไวรัส CMV (Agdia Elkhart, Indiana, USA) อ่านผลจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่ให้ผลเป็นบวก (positive) มีค่ามากกว่าค่าที่อ่านได้จากแอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับใบดองดิงที่ไม่แสดงอาการใบด่างเป็น 2 เท่า ซึ่งให้ผลเป็นลบ (negative control) หรือไม่พบไวรัส CMV และ positive control คือ ตัวอย่างไวรัส CMV ที่สกัดได้จากใบพริกที่แสดงอาการใบด่าง

2. การผลิตดองดิงปลอดโรคไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yadav *et al.* (2012) โดยนำหัวพันธุ์ดองดิงน้ำหนัก 40-50 กรัม มาตัดเอาเฉพาะปลายยอดความยาว 1-3 เซนติเมตร มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำไหล เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยแช่ลงในสารป้องกันและกำจัดเชื้อราแมนโคเซ็บ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วย 75% ethanol เป็นเวลา 25 นาที แล้วย้ายมาแช่ลงในน้ำ 1% electrolyzed oxidizing (EO) ที่ผสม 2-3 หยด ของ Tween 20 เขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง พักไว้ให้แห้งแล้วนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (meristem) ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบสเตอริโอที่กำลังขยายที่ 20-40 เท่า ใช้มีดผ่าตัดตัดเอาส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร มาเลี้ยงบนอาหาร MS แล้วเพาะเลี้ยงไว้ในอุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,200 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ และนำตัวอย่างใบดองดิงที่เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ไปตรวจสอบการปลอดไวรัสในขั้นต่อไป

2.2 การใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กของดองดิง

นำส่วนยอดของดองดิง ความยาว 0.5 เซนติเมตร จากหัวพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน (ribavirin) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sochacki and Podwyszyńska (2012) แบ่งออกเป็น 3 กรรมวิธี ๆ ละ 15 ซ้ำ ดังนี้

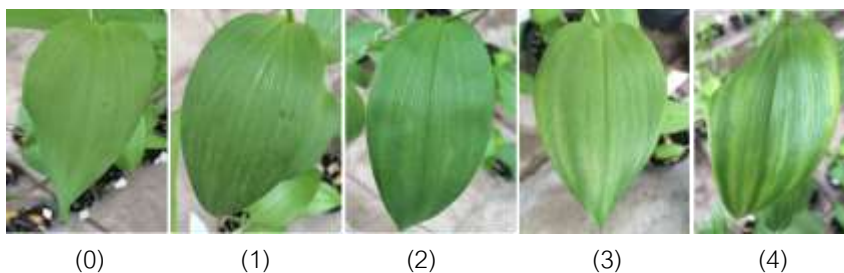


Figure 1. Strip mosaic symptoms of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien. Five criteria of severity levels rating at 0= No symptom, 1= 1-25%, 2= 26-50%, 3= 51-75%, 4= 76-100% observing in total leave area per plant

กรรมวิธีที่ 1 MS (control)

กรรมวิธีที่ 2 MS + 20 mg/L ribavirin

กรรมวิธีที่ 3 MS + 40 mg/L ribavirin

วางแผนการทดลองแบบ สุ่ม สมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) เพาะเลี้ยงไว้ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,200 lux นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนยอด ความสูงต้น จำนวนหัว ความยาวหัว ความยาวราก จำนวนราก และจำนวนใบ หลังเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ พร้อมทั้งร้อยละการรอดชีวิต เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และนำต้นที่เจริญสมบูรณ์ไป ตรวจสอบการปลอดไวรัสต่อไป

3. การตรวจสอบการปลอดไวรัส

นำต้นดองดั่งที่ผ่านการทำให้ปลอดไวรัสด้วย เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และการใช้ สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงยอดของดองดั่งขนาด 0.5 เซนติเมตร มาตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ คู่มือสำหรับตรวจหาไวรัส CMV ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang *et al.* (2017)

4. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการ เพาะเลี้ยงดองดั่ง

นำส่วนยอดดองดั่ง ความยาว 1 เซนติเมตร จาก หัวพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurine (BAP) และ naphthalene acetic acid (NAA) ที่ความเข้มข้น 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย

ดัดแปลงจากวิธีการของ Chatterjee and Ghosh (2015) จำนวนรวม 6 กรรมวิธี ๆ ละ 15 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 MS free hormone (control)

กรรมวิธีที่ 2 MS + 0.5 mg/L NAA

กรรมวิธีที่ 3 MS + 1.0 mg/L BAP

กรรมวิธีที่ 4 MS + 2.0 mg/L BAP

กรรมวิธีที่ 5 MS + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA

กรรมวิธีที่ 6 MS + 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA

วางแผนการทดลองแบบ CRD เพาะเลี้ยงไว้ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 1,200 lux นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนยอด และจำนวนหัว หลัง เพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการโรคไวรัส และการตรวจวินิจฉัย

1.1. การประเมินความรุนแรงของโรคไวรัส

จากการศึกษาอาการโรคไวรัสในดองดั่งในสภาพ โรงเรือน หลังปลูกได้ 90 วัน พบอาการใบด่างขีดสีเขียว เข้มสลับสีเขียวอ่อนเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบ (stripe mosaic) ใบหงิกงอ มีรูปร่างบิดเบี้ยว และดอกมีสีซีดจาง และด่าง (Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Koenig and Lesemann (1974) ที่พบการเข้าทำลายของ ไวรัส CMV ในดองดั่งส่งผลให้พืชแสดงอาการด่างที่ใบ และดอก หากมีอาการที่รุนแรงจะทำให้ลำต้นแคระแกร็น และไม่ออกดอก จากการประเมินระดับความรุนแรงของ



Figure 2. Viral symptoms in *Gloriosa rothschildiana* O' Brien after planting for 90 days: (A) stripe mosaic; (B) leaf curl and (C) pale mosaic on flower petals

อาการโรคไวรัสและการศึกษาผลกระทบของโรคไวรัสต่อการออกดอกของดอกรดิง พบว่ามีระดับความรุนแรงมากที่สุด คือ ระดับ 3 เฉลี่ย 33.75 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนดอกต่อต้นเฉลี่ย 3.17 ดอกต่อต้น รองลงมา ได้แก่ ระดับ 4, 2, 1 และ 0 ตามลำดับ เฉลี่ย 25, 20, 13.75 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีดอกเฉลี่ยต่อต้น 1.0, 4.0, 4.67 และ 5.33 ดอกต่อต้น ตามลำดับ และพบว่าความรุนแรงของโรคไวรัสต่อการออกดอกมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งหากดอกรดิงถูกไวรัสเข้าทำลายในระดับที่รุนแรงมากจะทำให้ไม่ออกดอก สอดคล้องกับการรายงานของ Niimi *et al.* (2003) ซึ่งศึกษาไวรัสที่เข้าทำลายพืชในสกุล *Lillium* ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าไวรัส CMV มีความสำคัญ ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต การเกิดตาดอกและทำให้ดอกมีขนาดเล็กผิดปกติ กลีบดอกมีอาการสีซีดและต่าง

1.2 การตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา

จากการนำตัวอย่างใบดอกรดิงที่แสดงอาการใบต่างในสภาพโรงเรือนจำนวน 20 ตัวอย่าง มาตรวจหาชนิดของไวรัสสาเหตุโรคด้วยเทคนิค ELISA อ่านผลจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยการเปรียบเทียบกับค่าของ negative control (0.457) โดยค่าที่สูงกว่าสองเท่าของค่า O.D.405 ของ negative control (0.194) จะถือว่าเป็นโรคหรือพบไวรัส จากการศึกษานำตัวอย่างที่แสดงอาการของใบต่าง จำนวน 20 ใบ พบไวรัส CMV ในตัวอย่างที่มีค่า ELISA (O.D.405) อยู่ในช่วง 0.924-1.495 จำนวน 17 ตัวอย่าง และไม่พบไวรัส CMV จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีค่า ELISA (O.D.405) 0.745, 0.836 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมที่เป็น positive control มีค่า ELISA (O.D.405) 2.545

2. การผลิตดอกรดิงปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีชีวิตรอดเฉลี่ย 75 เปอร์เซ็นต์ และหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดสามารถพัฒนาไปเป็นใบอ่อนคู่แรกได้ และสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์โดยมีความสูงจากโคนต้นจนถึงปลายใบประมาณ 3-4 เซนติเมตร ในเวลา 9 สัปดาห์ จากการสังเกตพบว่าใบดอกรดิงที่เจริญมาจากส่วนของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดนั้น ไม่พบอาการต่างเมื่อเปรียบเทียบกับต้นดอกรดิงที่ไม่ได้ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Figure 3)

2.2 การใช้สารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงยอดขนาดเล็กของดอกรดิง

จากการนำยอดของดอกรดิงขนาด 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร MS ที่ผสมสารยับยั้งการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้ในทุกกรรมวิธี โดยมีชีวิตรอดเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการเติมสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชที่ลดลง โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.00 ยอดต่อต้น มีความสูงยอดเฉลี่ย 2.79 และ 2.40 เซนติเมตร ตามลำดับ มีจำนวนหัวเฉลี่ย 1.00 และ 0.93 หัวต่อต้น ตามลำดับ มีความยาวหัวเฉลี่ย 0.39 และ 0.21 เซนติเมตร ตามลำดับ มีจำนวนรากเฉลี่ย 3.60 และ 3.00 รากต่อต้น ตามลำดับ มีความยาวรากเฉลี่ย 0.37 และ

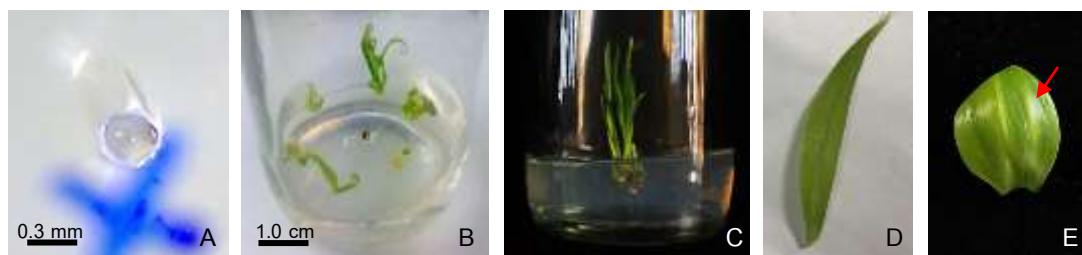


Figure 3. Growth and development of meristem-tip of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien on MS medium: (A) at day 1; (B) at 4 weeks; and (C) at 9 weeks after culture; (D) healthy leaf of 3-month old seedling compared to; (E) mosaic symptom of the infected control

0.26 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีจำนวนใบเฉลี่ย 2.53 และ 2.47 ใบต่อต้น ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม (MS) (Table 1)

4. การตรวจสอบการปลอดไวรัส

จากการตรวจสอบการปลอดไวรัส CMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำต้นดองดิงที่ผ่านการทำให้ปลอดไวรัสด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร มีการปลอดไวรัส 100 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิริน ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการปลอดไวรัส 26.67 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2, Figure 4) สอดคล้องกับการรายงานของ Masuda *et al.* (2011) ที่ได้ศึกษาการผลิตต้นลิลี (*Lilium brownii* var. *colchesteri*) ปลอดไวรัส CMV, LMoV และ LSV พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร สามารถกำจัดไวรัสได้ 2 ชนิด คือ CMV และ LMoV ซึ่งมีการปลอดไวรัส 100 และ 73.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการเติมสารริบาวิรินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหาร MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงยอดอ่อน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถกำจัดไวรัส 2 ชนิด คือ CMV และ LSV มีการปลอดไวรัส 100 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่การเติมสารริบาวิรินลงในอาหาร MS ส่งผลให้การเจริญของจำนวนยอดลดลง

5. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงดองดิง

จากการศึกษาสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ BAP และ NAA จำนวน 6 กรรมวิธี เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า กรรมวิธีที่ 6 ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอด และจำนวนหัวได้สูงที่สุด

Table 1. Effects of various concentrations of ribavirin supplemented in MS media on shoot formation and mini-tuber induction in *Gloriosa rothschildiana* O' Brien after 5 weeks of cultures

Ribavirin (mg/L)	Shoot number	Shoot length (cm)	Tuber number	Tuber length (cm)	Root length (cm)	Root number	Leaves (no/plant)
0	1.27 a ¹	3.78 a	1.13 a	0.70 a	0.94 a	6.67 a	3.53 a
20	1.00 b	2.79 b	1.00 ab	0.39 b	0.37 b	3.60 b	2.53 b
40	1.00 b	2.40 c	0.93 b	0.21 c	0.26 c	3.00 c	2.47 b
CV (%)	24.27	12.63	24.65	27.88	23.37	15.96	18.15
LSD	0.19	0.28	0.19	0.89	0.09	0.52	0.38

¹ Means followed by the difference letters were significantly different at $P \leq 0.05$ by the least significant difference (LSD)

Table 2. Survival rates and virus elimination percentages of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien after excision of meristem at size 0.3 mm and 20 and 40 mg/L ribavirin treatments

Treatment	No. of explants	No. of survival plant <i>in vitro</i>	survival rate (%) ¹	virus elimination (%) ²
meristem 0.3 mm	20	15	75	100
ribavirin 40 ppm ³	15	15	100	100
ribavirin 20 ppm ³	15	15	100	26.67

¹ Data were collected after 12 weeks of post-meristem tip culture on MS medium and after 4 weeks of post-shoot culture on MS medium + ribavirin 40, 20 mg/L

² Number of virus free plantlets, detection with PCR technique

³ Excision of *in vitro* shoot of the tuber at size 0.5 cm

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.27 ยอดต่อต้น และมีจำนวนหัวเฉลี่ยสูงสุด 2.20 หัวต่อต้น รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 5 ที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.60 ยอดต่อต้น และมีจำนวนหัวเฉลี่ย 1.93

หัวต่อต้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในขณะที่เติมเฉพาะ BAP 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ เติมนเฉพาะ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าต้นของดิงมีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์และไม่แข็งแรง (Figure 5)

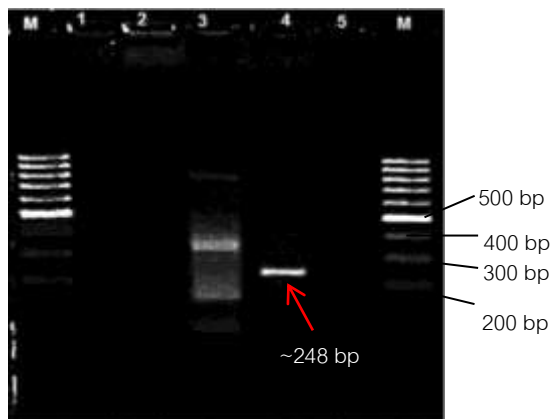


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products from leaves of gloriosa to detect CMV-free: (M) molecular marker 100 pb.; Lane 1: meristem culture; Lane 2: 40 mg/L ribavirin; Lane 3: in 20 mg/L ribavirin; Lane 4: primer for CMV (248 pb) and Lane 5: negative control

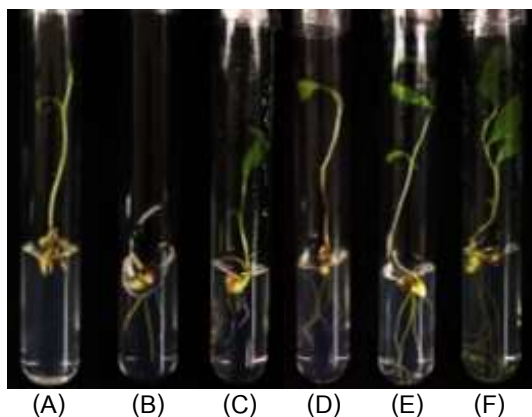


Figure 5. *In vitro* regeneration of *Gloriosa rothschildiana* O' Brien from shoot explants after 12 weeks cultured: (A) on MS medium with free-growth regulators; (B) MS + 0.5 mg/L NAA; (C) MS + 1.0 mg/L NAA; (D) MS + 2.0 mg/L BAP; (E) MS + 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA and (F) MS + 2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA

สรุป

จากการศึกษาลักษณะอาการใบต่างชนิดเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบของดองดึงพบมีความรุนแรงมากที่สุดในระดับ 3 คิดเป็น 33.75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาตรวจทดสอบชนิดของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และ EILSA พบไวรัส CMV เป็นสาเหตุโรค และเมื่อนำหัวพันธุ์ดองดึงที่เป็นโรคไวรัสมาทำให้ปลอดไวรัสด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร และการเพาะเลี้ยงยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิรินเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไวรัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีชีวิตรอด 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เพาะเลี้ยงยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร ในอาหาร MS ที่ผสมสารริบาวิรินเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดไวรัส CMV ได้ 26.67 เปอร์เซ็นต์ และมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นดองดึงโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.27 ยอดต่อต้น และมีจำนวนหัวเฉลี่ยสูงสุด 2.20 หัวต่อต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Taiwan ICDF Project in Royal Project Foundation (Thailand) โครงการ Gloriosa, Sweet Potato Virus-free Seedling and Grape Root Stock Production Project ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Akbar, A., Z. Ahmad, F. Begum, Ubairah and N. Raees. 2015. Varietal reaction of *Cucumber mosaic virus*. American Journal of Plant Sciences 6: 833-838.

Araki, M., S. Yamashita, Y. Doi and K. Yora. 1985. Three viruses from gloriosa (*Gloriosa*

rothschildiana O' Brien). Japanese Journal of Phytopathology 51(5): 632-636.

Chatterjee, T and B. Ghosh. 2015. An efficient method of *in vitro* propagation of *Gloriosa superba* L. - an endangered medicinal plant. Plant Science Research 37(1&2): 18-23.

George, M. and K. M. Pandalai. 1949. Investigation on plant antibiotics. part IV. future search for antibiotic substances in Indian medicinal plants. Indian Journal of Medical Research 37(2): 169-181.

Koenig, R. and D. Lesemann. 1974. A potyvirus from *Gloriosa rothschildiana*. Journal of Phytopathology 80(2): 136-142.

Masuda, J., N.Q. Thien, N.T. L Hai, M. Hiramatsu, M. Takeshita, J.H. Kim, M. Nakamura, H. Iwai and H. Okubo. 2011. Production of virus-free bulblets by meristematic tip culture with antiviral chemical in *Lilium brownii* var. *colchesteri*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 80(4): 469-474.

Niimi, Y., D.S. Han, S. Mori and H. Kobayashi. 2003. Detection of *Cucumber mosaic virus*, *Lily symptomless virus* and *Lily mottle virus* in *Lilium* species by RT-PCR technique. Scientia Horticulturae 97: 57-63.

Royal Project Foundation. 2015. Annual Report 2015. The Royal Project Foundation, Chiang Mai. 145 p. (in Thai)

Sochacki, D. and M. Podwyszyńska. 2012. Virus eradication in narcissus and tulip by chemotherapy. Floriculture and Ornamental Biotechnology 6(Special Issue 2): 114-121.

Yadav, K., A. Aggarwal and N. Singh. 2012. Actions for *ex situ* conservation of *Gloriosa superba* L. - an endangered ornamental cum medicinal plant. Journal of Crop Science and Biotechnology 15(4): 297-303.

Zhang, Y., Y. Wang, Z. Xie, G. Yang, Z. Guo and L.
Wang. 2017. Simultaneous detection of
three lily viruses using triplex IC-RT-PCR.
Journal of Virological Methods 249: 69-75.
