

การผลิตกล้าพริกพิโรธปลอดโรคไวรัสโดยเทคนิค การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Virus-free Seedling Production of Bhut Jolokia Chilli Using Tissue Culture Techniques

อัญชลี ตาคำ^{1/} และ เกวาลิน คุณาศักดากุล^{1/}

Anchalee Takham^{1/} and Kaewalin Kunasakdakul^{1/}

Abstract: Mosaic, dwarfing, ring spot, leaf curling and necrosis were indicated as the symptoms of viral diseases found in Bhut jolokia chilli grown at Pangda Station, Royal Project Foundation. Various techniques were applied to diagnose the majority mosaic symptom. The positive results of virus transmission by shoot grafting of infected plants on healthy stock plants were observed. For microscopic symptom observation; the micrographs of crystalline inclusion, cylindrical inclusion and amorphous inclusion in the infected plant were detected after the epidermis and vascular leaf cells were stained with Azure II, orange green, toluidine blue and acridine orange. A total of 60 lateral and shoot buds of the virus infected Bhut jolokia chilli plant were surface sterilized and cultured *in vitro* on MS medium. After 3 - 6 months, the mosaic symptom plantlets even in the second generative propagations were randomly diagnosed for a particular virus infection. However, thermotherapy and meristem tip culture for virus eradication procedures were conducted under two treatments of $35 \pm 1^\circ\text{C}$ and $38 \pm 1^\circ\text{C}$ using 40 infected plantlets per treatment. Total of 13 and 8 survived plantlets were obtained from $35 \pm 1^\circ\text{C}$ continuously treated conditions for 4 and 8 weeks respectively. The meristems of these survived plantlets were excised in 0.5 mm in size, then cultured in MS medium supplemented with 0.04 ppm of BAP and 0.1 ppm of GA₃. Three pieces of the meristem were successfully regenerated to complete plantlets while 13 pieces were generated to be calli and 5 pieces were necrosis deaths. The survived plantlets were grown and subcultured on MS medium. Viral symptoms on the plantlets grown *in vitro* were not found during the long term period of cultures. Diseased free plantlets were propagated on MS medium containing 10 ppm of BAP and 1 ppm of kinetin which produced 4.5 shoots per axillary bud in one month. The separated shoots were rooted successfully on MS medium containing 2 ppm of IAA. Acclimatization was carried out by transferring the bottle of *in vitro* plantlets to normal condition in greenhouse for 7 and 14 days with survival percentages at 85 and 90 of transferred plantlets in sterilized compost were observed.

Keywords: Bhut jolokia chilli, viral disease, micropropagation, thermotherapy, meristem-tip culture

^{1/} สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Division of Plant Pathology, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

บทคัดย่อ: จากการศึกษาอาการของโรคไวรัสในพริกที่ปลูก ณ สถานีเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง พบอาการหลายแบบ เช่น ใบด่าง เตี้ยแคระแกรน ใบจุดวงแหวน ใบหยด และอาการตายของเนื้อเยื่อส่วนตา และเส้นใบ เมื่อเลือกอาการที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่อาการใบด่างมาทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดโรคโดยวิธีเสียบยอด พบว่าสามารถถ่ายทอดลักษณะอาการใบด่างไปยังต้นพริกปกติได้ นอกจากนั้นเมื่อทำการลอกเซลล์เนื้อเยื่อผิวใบ และเซลล์เนื้อเยื่อท่อลำเลียงของใบพริกที่แสดงอาการต่าง ไปตรวจทดสอบความผิดปกติระดับเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังการย้อมด้วยสี Azure II, orange green, toluidine blue และ acridine orange พบ inclusion หลายแบบ คือ crystalline inclusion, cylindrical inclusion และ amorphous inclusion เมื่อทยอยตัดตาข้าง และตายอดของต้นพริกดังกล่าวมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวและเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS จำนวนรวม 60 ตา พบว่า ต้นอ่อนพริกที่เจริญส่วนใหญ่ยังคงแสดงอาการใบด่างเช่นเดียวกับต้นแม่ แม้จะเพาะเลี้ยงในรุ่นที่ 2 ในระยะเวลา 3-6 เดือน และจากการนำต้นอ่อนพริกที่แสดงอาการใบด่างอายุ 2 เดือน ไปเพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูงที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียสต่อเนื่อง เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ช่วงเวลาละ 20 ต้น พบว่าต้นอ่อนพริกอดตายจำนวน 13 และ 8 ต้น ตามลำดับ เมื่อนำต้นอ่อนพริกที่รอดตายมาตัดเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด และเลี้ยงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.04 ppm และ GA₃ ความเข้มข้น 0.1 ppm พบการเจริญของชิ้นเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอดไปเป็นต้นอ่อน จำนวนรวม 3 ชิ้น เจริญเป็นแคลลัส รวมจำนวน 13 ชิ้น และแห้งตายรวม 5 ชิ้น จากการนำต้นอ่อนพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอดจำนวน 3 ต้น ย้ายไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS นาน 2 เดือน พบว่าต้นอ่อนพริกที่ได้ทั้งหมดไม่แสดงอาการใบด่าง แม้ว่าจะปล่อยให้เจริญเป็นเวลานานกว่า 6 เดือนก็ตาม จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนพริกปลอดโรคไวรัสในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด เฉลี่ย 4.5 ยอดต่อชิ้นพืช ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 10 ppm ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1 ppm สำหรับการทดลองชักนำให้เกิดราก พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 ppm สามารถชักนำให้เกิดรากในปริมาณที่เหมาะสม และเมื่อย้ายขูดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นอ่อนพริกที่มีรากอายุ 1 เดือน ไปเก็บในสภาพโรงเรือนเป็นเวลา 7 และ 14 วันก่อนย้ายปลูก พบว่าต้นอ่อนพริกมีการรอดชีวิต 85 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: พริกพริโว โรคไวรัส การขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ การเก็บพืชในสภาพอุณหภูมิสูง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด

คำนำ

พริกพริโวเป็นพริกที่มีสาร capsaicin ซึ่งเป็นสารให้ความเผ็ดในปริมาณสูงถึง 715,000-1,400,000 SHU (Scoville heat unit) (อิทธิสุนทร และคณะ, 2552) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมหลายระดับ เช่น อุตสาหกรรมอาหารแปรรูป อาหารสำเร็จรูป อุตสาหกรรมสกัดสาร capsaicin และอุตสาหกรรมต่อเนื่องที่นำสาร capsaicin ไปเป็นส่วนประกอบในยาคน อาหารเสริม และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (จานุลักษณะ และคณะ, 2549; วสุ และคณะ, 2549) และจากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้การปลูกพริกพริโวได้รับความนิยมในกลุ่มเกษตรกร

มากขึ้น เนื่องจากพริกพริโวมีความอ่อนแอต่อโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่มีการแพร่ระบาดโดย แมลงพาหะ วิถีกล และเมล็ดพันธุ์ การระบาดของโรคทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตพริกพริโวเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะหากต้นพริกได้รับเชื้อไวรัสตั้งแต่ระยะกล้า การปลูกพริกพริโวให้ได้ผลผลิตคุณภาพดี จึงควรใช้ต้นกล้าและเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรค (อิทธิสุนทร และคณะ, 2552) เทคนิคการให้ความร้อนสูงแก่พืชที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อ และ/หรือ ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด สามารถนำมาใช้ในการผลิตพืชปลอดโรคไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ประสาทรพ, 2541) และเนื่องจากพริกชนิดนี้เป็นสายพันธุ์ที่ค่อนข้างยากต่อการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและยังไม่มีกรารายงานในประเทศไทย การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณกล้าพริกพิโรธปลอดโรคไวรัสโดยใช้เทคนิคการให้ความร้อนสูงร่วมกับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. โรคไวรัสของพริกพิโรธ

1.1 อาการ และการถ่ายทอดโรค

ศึกษาโรคของต้นพริกพิโรธที่มีลักษณะอาการจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในแปลงปลูก ณ สถานีวิจัยเกษตรหลวงปางดะ มูลนิธิโครงการหลวง บันทึกรายการที่สวนต่าง ๆ ของต้นที่เป็นโรค คัดเลือกต้นที่แสดงอาการใบด่าง และแคะแสร้งมาปลูกลงกระถาง และนำมาทดสอบการถ่ายทอดโรค ด้วยวิธีการเสียบยอด โดยนำต้นตอของพริกมาตัดยอดออก และใช้มีดผ่าลงไปที่รอยตัด บริเวณเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นที่มีขนาด 0.3 - 0.4 เซนติเมตร ให้แผลลึกลงไปประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำยอดพริกที่มีขนาดลำต้นใกล้เคียงกับต้นตอ มาตัดปลายให้มีลักษณะเป็นลิ้ม และเสียบลงตรงรอยผ่าที่เตรียมไว้ พันด้วยพลาสติก คลุมถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นโดยทำการทดลอง 2 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 นำยอดของต้นพริกที่ปกติเสียบลงบนต้นตอของพริกที่แสดงอาการใบด่าง กรรมวิธีที่ 2 นำยอดของต้นพริกที่แสดงอาการใบด่างเสียบลงบนต้นตอของต้นพริกที่ปกติ ทำซ้ำกรรมวิธีละ 4 ต้น จากนั้นสังเกตอาการบนใบของยอดปกติที่เจริญใหม่ เป็นระยะเวลา 4-6 สัปดาห์

1.2 ลักษณะความผิดปกติระดับเซลล์ของพริกพิโรธที่เป็นโรคไวรัส

นำใบพริกพิโรธที่แสดงอาการใบด่างจากต้นที่คัดเลือกในข้อ 1 มาลอกเนื้อเยื่อใบด้วยปากคิปปลายแหลม ให้ได้เนื้อเยื่อบริเวณผิวใบด้านใต้ใบ และเนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบ จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้ไปย้อมด้วยสี azure II และสี orange green ตัดแปลงตามวิธีการของ Christie and Edwardson (1986) ย้อมด้วยสี toluidine blue ตามวิธีการของ แสงชัย (2550) แล้วนำมาตรวจดูความผิดปกติภายในเซลล์พืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ

compound microscope ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า และย้อมด้วยสี acridine orange เพื่อตรวจดูความผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent microscope ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

2. การผลิตต้นอ่อนพริกพิโรธปลอดโรคไวรัส

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพริกพิโรธที่แสดงอาการใบด่าง

นำส่วนของตายอด และตาข้างของต้นพริกพิโรธที่เป็นโรคใบด่างในข้อ 1 จำนวนรวม 60 ชิ้น มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นพืชด้วย sodium hypochlorite 10% ผสม Tween-20 จำนวน 2 หยด นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skooge, 1962) ที่เติม IAA (indole-3-acetic acid) ความเข้มข้น 0.5 ppm, BAP (benzylaminopurine) ความเข้มข้น 0.04 ppm และ GA₃ (gibberellin) ความเข้มข้น 0.1 ppm สังเกตการเจริญ และลักษณะอาการใบด่างของต้นอ่อนพริกทุกระยะการเจริญ นาน 6 เดือน

2.2 การให้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด

นำต้นอ่อนพริกที่เจริญในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ต้นต่อขวด ไปทดลองเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator with forced air circulation, cooling and controlled humidity, CLIMACELL, MMM Medcenter Einrichtung GmbH, Germany) 2 ระดับอุณหภูมิได้แก่ 35 ± 1 และ 38 ± 1 องศาเซลเซียส แต่ละระดับอุณหภูมิแบ่งเป็น 2 กรรมวิธี ๆ ละ 20 ต้น กรรมวิธีที่ 1 เก็บพืชไว้นาน 4 สัปดาห์ กรรมวิธีที่ 2 เก็บพืชไว้นาน 8 สัปดาห์ โดยให้พืชได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1250 lux ความชื้นสัมพัทธ์ 70 เปอร์เซ็นต์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของต้นอ่อนพริกทุก ๆ สัปดาห์ และนำต้นอ่อนพริกที่รอดชีวิตมาตัดเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope ให้ได้ส่วนของโดมบริเวณเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.04 ppm และ GA₃ ความเข้มข้น 0.1 ppm สำหรับชุดควบคุม

ทำการตัดเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอดของต้นอ่อนพริกที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน จากนั้นสังเกตการเจริญ และอาการบนใบของยอดใหม่หลังการเพาะเลี้ยง 3 - 4 เดือน

2.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนพริกพิโรธ

ทดลองเพิ่มปริมาณตาข้างของต้นอ่อนพริกในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตามวิธีการของ Sanatombi and Sharma (2007) โดยการตัดยอดของต้นอ่อนพริกที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 2 เดือน เพื่อชักนำให้มีการเจริญของตาข้างในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 ppm, BAP ความเข้มข้น 0.04 ppm และ GA₃ ความเข้มข้น 0.1 ppm สังเกตการเจริญ และนับจำนวนตาข้างที่ได้ต่อต้น จากนั้นทดลองเพิ่มปริมาณยอดของต้นอ่อนพริกโดยการเพาะเลี้ยงตาข้างในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงจำนวน 15 สูตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (1) BAP ความเข้มข้น 2, 5 และ 10 ppm (2) kinetin ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ppm (3) IAA ความเข้มข้น 1 และ 2 ppm บันทึกการเจริญ จำนวนยอดที่ได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากและการย้ายปลูก

นำต้นอ่อนพริกมาชักนำให้เกิดรากในอาหารสังเคราะห์สูตร MS จำนวน 10 สูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxin 3 ชนิด ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric acid) และ NAA (1-naphthaleneacetic acid) 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1 และ 2 ppm บันทึกจำนวนต้นอ่อนพริกที่เกิดราก ลักษณะและระดับความหนาแน่นของราก เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จากนั้นทดลองย้ายปลูกต้นอ่อนพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมในการทำให้เกิดราก โดยการเก็บขวดเพาะเลี้ยงต้นอ่อนพริกในอุณหภูมิ และแสงในสภาพโรงเรือนเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน ระยะเวลาละ 20 ชั่วโมง จากนั้นล้างวันที่ติดรากออกให้หมด แล้วย้ายลงปลูกในวัสดุปลูกที่หนึ่งฆ่าเชื้อ รดน้ำและให้ความชื้น และใช้ถุงพลาสติก

ใส่คลุมต้นเป็นเวลา 21 วัน บันทึกจำนวนต้นอ่อนพริกที่รอดชีวิตหลังการย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. โรคไวรัสของพริกพิโรธ

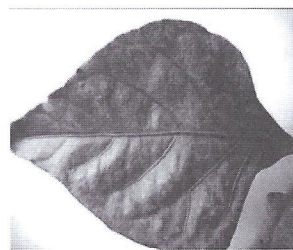
1.1 อาการ และการถ่ายทอดโรค

จากการสำรวจพริกพิโรธที่แสดงอาการของโรคไวรัส พบอาการผิดปกติ ที่สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนทั้งบริเวณใบ ยอด และผล โดยเฉพาะบริเวณใบพบอาการหลายแบบ ได้แก่ mosaic, mottling, ring spot, vein banding และ bud necrosis ดังภาพที่ 1 บางกรณีพบอาการของโรคไวรัสหลายแบบร่วมกัน ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด สอดคล้องกับรายงานของ Murphy and Bowen (2006) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการส่งเสริมการเกิดโรคไวรัสในพริก พบว่าการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัส CMV (*Cucumber mosaic virus*) และ PepMoV (*Pepper mottle virus*) ทำให้พืชแสดงอาการหลายรูปแบบ ได้แก่อาการต่างแบบ mottle และ mosaic

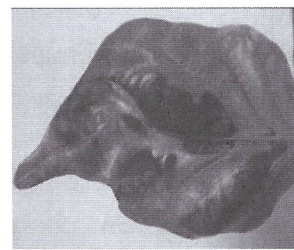
เมื่อคัดเลือกต้นพริกที่แสดงอาการใบต่างแบบ mosaic และ mottling มาปลูกลงกระถาง และทดสอบการถ่ายทอดโรคด้วยวิธีการเสียบยอด โดยใช้ยอดปกติเสียบบนต้นตอที่เป็นโรค พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ เริ่มมีการแตกใบใหม่จากยอดปกติที่ใช้เสียบ และสังเกตเห็นอาการต่างสีเขียวสลับเขียวอ่อน ใบมีลักษณะหงิกงอ ผิดรูปร่าง เช่นเดียวกับลักษณะใบของต้นตอที่เป็นโรค และอาการชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ และในทำนองเดียวกันกับการทดสอบโดยใช้ยอดที่เป็นโรคเสียบบนต้นตอปกติ เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ เริ่มมีการแตกใบใหม่จากต้นตอปกติ และแสดงอาการต่างสีเขียวสลับเขียวอ่อนอย่างชัดเจน เมื่อเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าต้นพริกพิโรธที่แสดงอาการใบต่าง ต้นแคระแกร็นนั้น มีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส เนื่องจากเกิดการถ่ายทอดของเชื้อไวรัสจากต้นตอไปยังยอด หรือจากยอดถ่ายทอดไปยังต้นตอได้ สอดคล้องกับทดลองของ Shah *et al.* (2008) ซึ่งทำการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดโรคของเชื้อไวรัส



mosaic, mottling and
malformation



chlorotic ring pattern



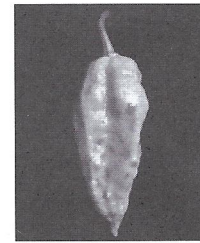
vein banding and malformation



bud necrosis



line pattern and malformation



chlorotic spot

Figure 1 Various symptoms of viral diseases found on leaves and fruits of Bhut jolokia chilli grown at Pangda Station, Royal Project Foundation

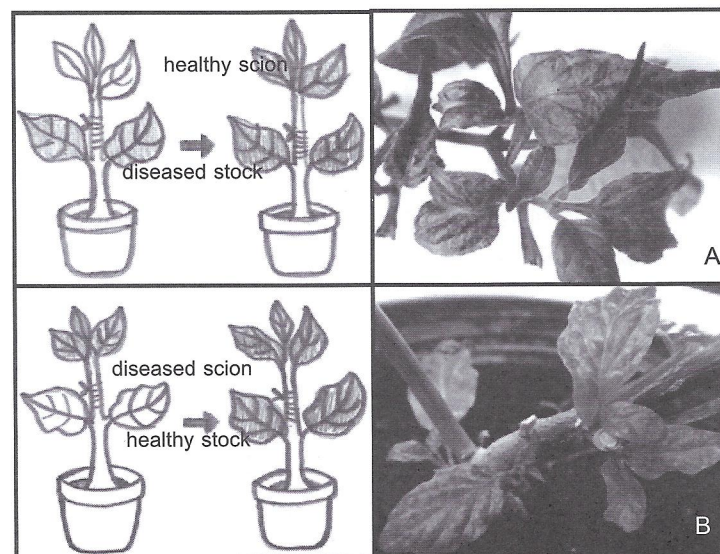


Figure 2 Successful transmissions of virus diseases from diseased stock to healthy scion (A) and from diseased scion to healthy stock (B) of Bhut jolokia chilli

ChimV (*Chilli veinal mottle virus*) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศปากีสถานด้วยวิธีเสียบยอด โดยนำยอดของต้นพริกที่แสดงอาการต่างแบบ systemic mottling เสียบยอดลงบนต้นตอที่ปกติ พบว่าอาการของโรคสามารถถ่ายทอดจากยอดที่เป็นโรคไปยังต้นตอที่ปกติได้

1.2 ลักษณะความผิดปกติระดับเซลล์ของพริกพิโรที่เป็นโรคไวรัส

จากการนำใบพริกพิโรที่แสดงอาการใบต่างจากต้นที่คัดเลือกในข้อ 1 มาตรวจสอบความผิดปกติในระดับเซลล์ พบว่าจากการย้อมเซลล์ผิวด้านใต้ใบด้วยสี azure II สามารถตรวจพบ inclusion body แบบ crystalline inclusion, cylindrical inclusion และ amorphous inclusion ในเซลล์เนื้อเยื่อผิวใบ และเซลล์ผิวบริเวณเส้นใบ จากการย้อมเซลล์ผิวด้านใต้ใบด้วยสี orange green สามารถตรวจพบความผิดปกติลักษณะขดเป็นวง และ inclusion body แบบ amorphous ในเซลล์เนื้อเยื่อผิวใบ และเซลล์ผิวบริเวณเส้นใบ จากการย้อมเซลล์ผิวด้านใต้ใบด้วยสี toluidine blue สามารถตรวจพบ crystalline inclusion บริเวณเซลล์เนื้อเยื่อผิวใบ และจากการย้อมเซลล์ผิวบริเวณเส้นใบด้วยสี acridine orange สามารถตรวจพบความผิดปกติ ที่ติดสีเหลืองบริเวณท่อลำเลียง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent microscope (ภาพที่ 3) จากลักษณะของ inclusion body ที่พบภายในเซลล์ สันนิษฐานได้ว่า inclusion body แบบ crystalline inclusion อาจเกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Cucumovirus และ Tobamovirus ส่วนลักษณะ inclusion body แบบ cylindrical inclusion อาจเกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus และลักษณะ inclusion body แบบ amorphous inclusion อาจเกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ดังรายงานของ Kucharek *et al.* (2004) ที่ตรวจหา inclusion body ด้วยการย้อมสีเนื้อเยื่อผิวใบของพริก *Capsicum annuum* ใน Florida ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย พบว่าสามารถตรวจพบ crystalline inclusion ในพืชที่ถูกเชื้อ CMV และ TMV (*Tobacco mosaic virus*) เข้าทำลาย cylindrical inclusion ในพืชที่ถูกเชื้อ PepMV และ PVY (*Potato virus Y*) เข้าทำลาย และจากงานทดลองของ แลงซ์ (2550) รายงานการตรวจหา inclusion body และ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ผิวใบของยาสูบ ที่ได้รับการปลูกเชื้อจากใบพริก และมะเขือเทศที่ถูกเชื้อ Tobamovirus เข้าทำลาย โดยการลอกเนื้อเยื่อผิวด้านท้องใบ มาแช่ใน Triton X-100 และย้อมด้วยสี 0.1% toluidine blue แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบผลึก 3 ลักษณะ คือ ผลึกแบบหกเหลี่ยมในเซลล์ชั้น ผลึกรูปเข็มในเซลล์เนื้อเยื่อผิวใบ และผลึกที่มีลักษณะไม่แน่นอน

2. การผลิตต้นอ่อนพริกพิโรปลอดโรคไวรัส

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพริกพิโรที่แสดงอาการใบต่าง

จากการนำตายอดและตาข้างของต้นพริกพิโรที่เป็นโรคใบต่างมาฟอกฆ่าเชื้อ และเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 ppm BAP ความเข้มข้น 0.04 ppm และ GA₃ ความเข้มข้น 0.1 ppm เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อนพริกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าต้นอ่อนพริกที่ได้สามารถเจริญเติบโตในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และส่วนใหญ่แสดงอาการใบต่าง เช่นเดียวกับต้นแม่พันธุ์ โดยพบอาการต่างตั้งแต่เริ่มแรกของการเจริญของยอดใหม่ที่ได้จากตายอดและตาข้างที่นำมาเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4)

2.2 การให้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด

จากการนำต้นอ่อนพริกที่แสดงอาการใบต่างในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูง ที่ระดับอุณหภูมิ 38 ±1 องศาเซลเซียส จำนวน 40 ต้น พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 และ 8 สัปดาห์ ไม่พบพืชที่รอดชีวิต ขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 35 ±1 องศาเซลเซียส พบว่าต้นอ่อนพริกมีการรอดชีวิตต่ำลงตามระยะเวลาที่เก็บ โดยที่ระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ มีต้นอ่อนพริกรอดชีวิต 13 และ 8 ต้น คิดเป็น 65 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งต้นอ่อนพริกจะแสดงอาการใบเหลือง หลุดร่วง และชะงักการเจริญเติบโต (ภาพที่ 5)

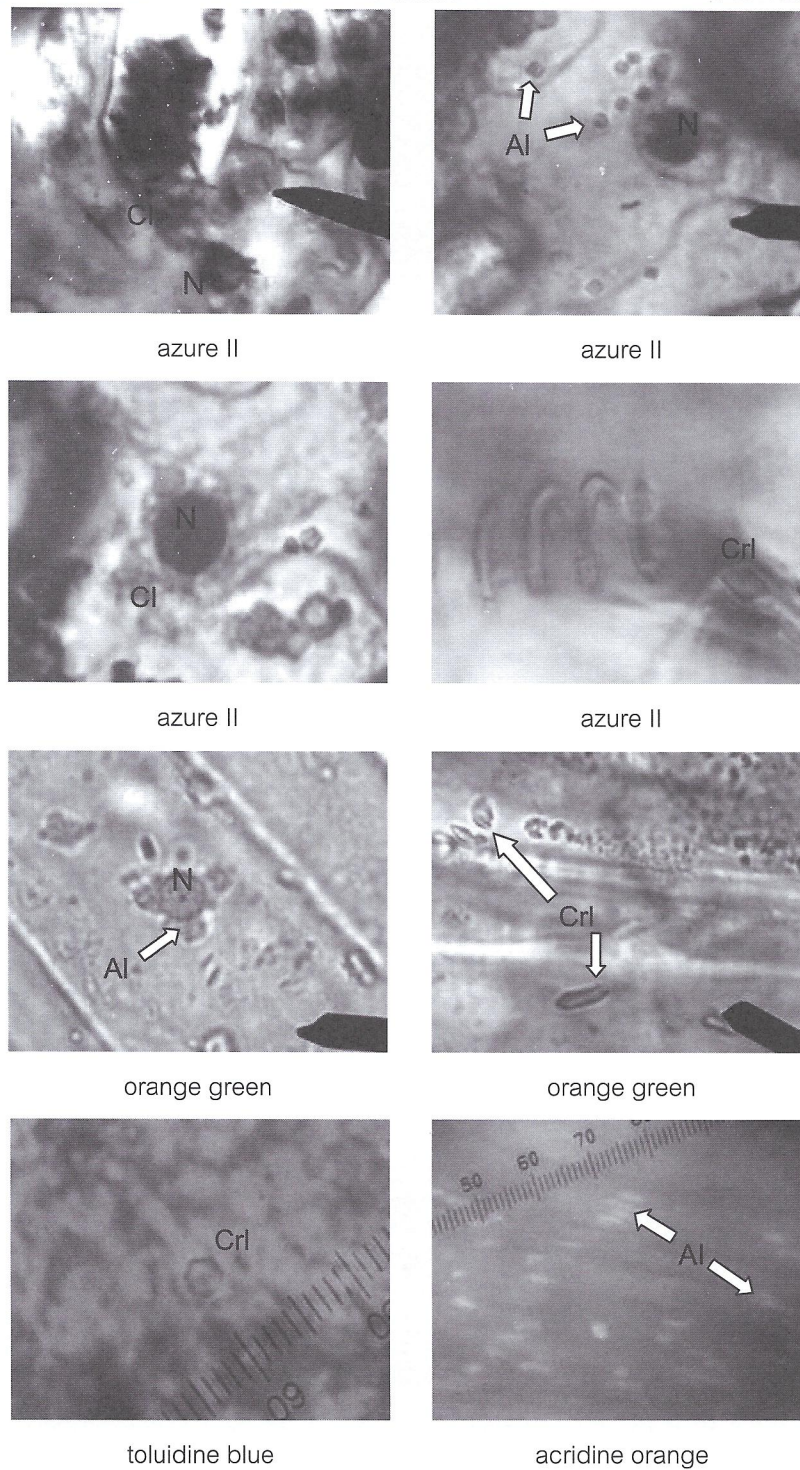


Figure 3 Microscopic observations on viral inclusions in the epidermal and vascular cells of infected Bhut jolokia chilli after staining with various dyes.

N = nucleus, Crl = Crystalline inclusion, Cl = Cylindrical inclusion, Al = Amorphous inclusion



Figure 4 Mosaic symptom of Bhut jolokia chilli plantlet derived from infected shoot bud cultured on MS medium for 8 weeks.

Table 1 Percentages of survival Bhut jolokia chilli plantlets after treated under thermotherapy conditions for 2 periods of time

Thermotherapy conditions	Survival percentage (%) ^{1/} / Treating periods (weeks)	
	4	8
Thermotherapy with <i>in vitro</i> grown plantlets under $38 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 h light	0 (0) ^{2/}	0 (0)
Thermotherapy with <i>in vitro</i> grown plantlets under $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 h light	65 (13)	40 (8)

^{1/} Calculated from a total of 20 plantlets per treating periods

^{2/} Figures in parenthesis are numbers of survival plantlets



Figure 5 Necrosis deaths of treated Bhut jolokia chilli plantlets under thermotherapy conditions at $38 \pm 1^\circ\text{C}$ for 4 weeks (A) and survival plantlets under the condition at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ for 8 weeks (B)

เมื่อนำต้นอ่อนพริกที่รอดชีวิตจากสภาพอุณหภูมิสูง ที่ระดับอุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 สัปดาห์ จำนวน 13 ต้น มาตัดเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด และเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS พบว่าเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอดที่ได้ มีการพัฒนาหลายแบบ คือเจริญเป็นต้นอ่อนพริกปกติจำนวน 2 ต้น เกิดเป็นแคลลัสจำนวน 8 ชิ้น และตาย 3 ชิ้น คิดเป็น 15.4, 61.5 และ 23.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนำต้นอ่อนพริกที่รอดชีวิตจากสภาพอุณหภูมิสูง ที่ระดับอุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 8 สัปดาห์ จำนวน 8 ต้น มาตัดเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอด และเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS พบว่ามีการเจริญเป็นต้นอ่อนพริก 1 ต้น เกิดเป็นแคลลัส 5 ชิ้น และตาย 2 ชิ้น คิดเป็น 12.5, 62.5 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยต้นอ่อนพริกที่ได้ทั้ง 3 ต้น ไม่แสดงอาการใบด่าง ใบหงิกงอ และลำต้นแคระแกร็นแต่อย่างใด สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ได้เก็บต้นอ่อน

พริกไว้ในสภาพอุณหภูมิสูงนั้น เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอดมาเพาะเลี้ยง พบว่า ได้ต้นอ่อนพริกที่ยังคงแสดงอาการใบด่าง เกิดเป็นแคลลัส และตายคิดเป็น 30, 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการติดตามการเจริญของต้นอ่อนพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณยอดที่ผ่านการเก็บในสภาพอุณหภูมิสูง มีการเจริญเป็นปกติ ไม่พบอาการต่างบนใบ แม้จะเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลายาวนานกว่า 6 เดือน แตกต่างจากชุดควบคุม ซึ่งแสดงอาการต่างเห็นได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 6) เช่นเดียวกับ Lozoya-Saldana and Merlin-Lara (1985) สามารถผลิตต้นมันฝรั่งปลอดเชื้อไวรัส PVX โดยการเพาะเลี้ยงต้นมันฝรั่งปลอดเชื้อในสภาพอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 ppm

Table 2 Percentages of plantlets, calli and necrosis death tissues derived from meristem tip cultures of Bhut jolokia chilli plantlets after treated under thermotherapy conditions at 35 ± 1 °C.

Condition		% of plantlet ^{1/}	% of callus	% necrosis death tissues
Thermotherapy of <i>in vitro</i> grown plantlets under 35 ± 1 °C, 16 h light	4 weeks	15.4 (2) ^{2/}	61.5 (8)	23.1 (3)
	8 weeks	12.5 (1)	62.5 (5)	25 (2)
Control (untreated thermotherapy)		30 (6)	50 (10)	20 (4)

^{1/} Calculated from the number of survival plantlets in each period of time per treatment

^{2/} Figures in parenthesis are numbers of plantlets, calli and necrosis death tissues

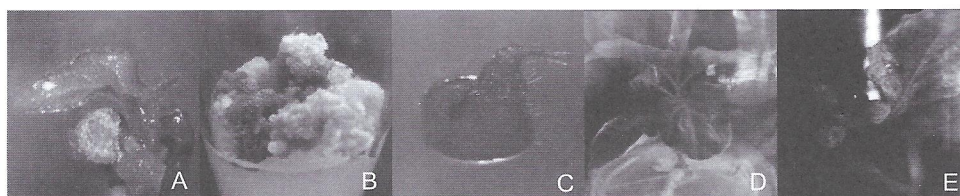


Figure 6 Healthy shoot (A), callus (B) and necrosis dead tissue (C) were observed after the Bhut jolokia chilli meristems were excised from the 35 ± 1 °C of thermotherapy treated plantlets and cultured on MS medium supplemented with 0.04 ppm BAP and 0.1 ppm GA₃ for 2 weeks, 4 weeks and 1 week respectively. Viral disease free plantlets derived from (A) after culture on MS medium for 4 months (D) compared to the systemic mosaic symptom of the untreated control (E)

2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนพริกพริโร

จากการทดลองเพิ่มปริมาณตาข้างของต้นอ่อนพริกในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการตัดยอดออก พบว่าสามารถชักนำให้ตาข้างเจริญได้ 2 - 6 ตาต่อต้น หรือจำนวนเฉลี่ย 3.8 ตาต่อต้น ซึ่งเป็นผลมาจากการลดอิทธิพลการข่มตาข้างโดยตายอด (apical dominant) สอดคล้องกับการทดลองของ Snow (1931) ที่รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดการเจริญของตาข้างบริเวณใบเลี้ยง (cotyledon) ภายหลังจากการตัดส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ของถั่ว garden pea (*Pisum sativum*) ออก และงานทดลองของ Sanatombi and Sharma (2007) ที่รายงานว่า การตัดยอดพริก *Capsicum frutescens* L. cv. 'Uchithi' ออก สามารถชักนำให้เกิดตาข้าง 2 - 6 ตาต่อต้น และจากการทดลองเพิ่มปริมาณยอดของต้นอ่อนพริกโดยการเพาะเลี้ยงตาข้างในอาหาร

สังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงจำนวน 15 สูตร พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร M ที่เติม BAP ความเข้มข้น 10 ppm ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1 ppm สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด เฉลี่ย 4.5 ยอดต่อชิ้นพืช รองลงมาคืออาหารสังเคราะห์สูตร H ที่เติม BAP ความเข้มข้น 5 ppm ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1 ppm สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 4.25 ยอดต่อชิ้นพืชในระยะเวลา 4 สัปดาห์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ปราศจากการควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 3 และภาพที่ 7) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ BAP ในอาหารสังเคราะห์สูตร H และ M ที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ไม่แตกต่างกันในเชิงสถิติ อาหารสังเคราะห์สูตร H ที่ใช้ BAP ในความเข้มข้นที่น้อยกว่า จึงจัดเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนพริกในสภาพปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Sanatombi and Sharma (2008) ได้ใช้ BAP

Table 3 Effects of plant growth regulators supplemented in MS medium for multiple shoot bud induction of *in vitro* grown Bhut jolokia chilli after the axillary buds were cultured for 4 weeks.

Media	BAP (ppm)	Kinetin (ppm)	IAA (ppm)	Shoot number
A	-	2	-	1.00 c ^{1/}
B	2	-	-	1.00 c
C	2	1	-	1.75 bc
D	2	-	1	1.00 ^a c
E	2	-	5	1.00 c
F	-	5	-	1.75 bc
G	5	-	-	1.00 c
H	5	1	-	4.25 a
I	5	-	1	1.00 c
J	5	-	5	1.00 c
K	-	10	-	1.00 c
L	10	-	-	2.00 bc
M	10	1	-	4.50 a
N	10	-	1	2.25 b
O	10	-	5	1.00 c
Control	-	-	-	1.00 c
LSD (0.01)				1.1614
%CV.				36.97

^{1/} Means followed by the same letters were not significantly different at $p = 0.01$ by the least Significant Difference (LSD).

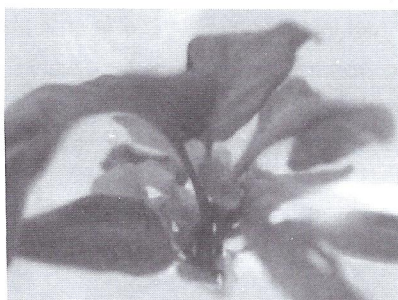


Figure 7 Healthy multiple shoots of Bhut jolokia chilli plantlets induced on MS medium supplemented with 10 ppm BAP and 1 ppm kinetin for 4 weeks.

ความเข้มข้น 7 ppm ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1 ppm สามารถเพิ่มยอดในการเพาะเลี้ยงพริก *Capsicum chinense* Jacq. ได้เท่ากับ 5.5 ยอดต่อชิ้นพืช

2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำต้นอ่อนพริกพิโรธให้เกิดราก

จากการทดลองการชักนำให้เกิดรากของต้นอ่อนพริก ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS จำนวน 10 สูตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม auxins 3 ชนิด (IAA, IBA และ NAA) 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1 และ 2 ppm สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนพริกสร้างรากได้ ภายใน 3 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง โดยจัดกลุ่มตามความหนาแน่นของราก เป็น 4 ระดับ ดังนี้ ระดับที่ 1 รากสีขาว ชุ่น บริเวณปลายรากมีการแตกแขนงน้อย มีความยาวรากประมาณ 1 เซนติเมตร ระดับที่ 2 มีลักษณะรากที่แข็งแรง สมบูรณ์ สีขาวชุ่น บริเวณปลายรากมีการแตกแขนงปานกลาง มีความยาวรากประมาณ 4 เซนติเมตร ระดับที่ 3 มีลักษณะรากที่สมบูรณ์ สีขาวชุ่น บริเวณปลายรากมีการแตกแขนงมาก มีความยาวรากประมาณ 1.5 เซนติเมตร และระดับที่ 4 มีลักษณะรากอ้วนน้ำ สีขาวชุ่น บริเวณปลายรากมีการแตกแขนงหลายแขนง ความยาวรากประมาณ 2 เซนติเมตร

ความหนาแน่นของรากในระดับที่ 2 เป็นรากที่มีความแข็งแรง เหมาะสมต่อการย้ายปลูกลงมากที่สุด จากการทดลองพบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดรากในระดับที่ 2 และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ถึง 100% (ตารางที่ 4) ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 ppm สามารถชักนำให้เกิดรากได้เร็วที่สุด และอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA ความ

เข้มข้น 1 ppm แต่พบว่าอาหารสูตรหลังสามารถชักนำให้เกิดรากช้ากว่าอาหารสูตรแรก ประมาณ 1 สัปดาห์ และยังทำให้ต้นอ่อนพริกมีลักษณะอวบน้ำ ส่งผลต่อการรอดชีวิตหลังการออกปลูกลงแปลง (ภาพที่ 8)

จากการทดลองย้ายปลูกลง ต้นอ่อนพริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการทำให้เกิดราก (อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 ppm) โดยการเก็บขวดเพาะเลี้ยงต้นอ่อนพริกในอุณหภูมิ และแสงในสภาพโรงเรือน เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน พบว่ามีจำนวนต้นอ่อนพริกที่รอดชีวิตเท่ากับ 17 และ 19 ต้น ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 85 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นการเก็บต้นอ่อนพริกเป็นเวลา 7 วัน ก่อนการย้ายปลูกลง จะทำให้สามารถประหยัดเวลาในการผลิตต้นอ่อนพริกได้ดีกว่า

สรุป

จากการศึกษาอาการของโรคไวรัสในพริกพิโรธ พบอาการหลายแบบ เช่นอาการใบด่าง แคร็กเกร็นใบ จุดวงแหวน ใบหยดน้ำ และอาการตายของเนื้อเยื่อส่วนตาและเส้นใบ ซึ่งอาจพบอาการเพียงแบบเดียว หรือร่วมกันหลายแบบ เมื่อทำการทดสอบสาเหตุของอาการใบด่าง โดยวิธีการเสียบยอด พบว่าสามารถทำให้ต้นพริกปกติแสดงอาการใบด่างได้หลังจากเสียบยอด 3 - 4 สัปดาห์ นอกจากนั้น เมื่อทำการลอกเซลล์เนื้อเยื่อผิวใบ และเซลล์ผิวบริเวณเส้นใบ มาตรวจทดสอบความผิดปกติระดับเซลล์ โดยการย้อมสี azure II, orange green, toluidine blue และ acridine orange พบ inclusion body ดังนี้

Table 4 Percentages of rooting and root intensity of Bhut jolokia chilli plantlets after cultured on MS medium supplemented with various concentrations of auxins for 4 weeks.

Media	IAA (ppm)	IBA (ppm)	NAA (ppm)	Root intensity	Rooting (%)
MS (Control)	-	-	-	-	0.0
MS + IAA 0.5 ppm	0.5	-	-	1	50.0
MS + IAA 1 ppm	1	-	-	1	66.7
MS + IAA 2 ppm	2	-	-	2	100.0
MS + IBA 0.5 ppm	-	0.5	-	2	83.3
MS + IBA 1 ppm	-	1	-	4	100.0
MS + IBA 2 ppm	-	2	-	4	100.0
MS + NAA 0.5 ppm	-	-	0.5	3	100.0
MS + NAA 1 ppm	-	-	1	2	100.0
MS + NAA 2 ppm	-	-	2	2	75.0

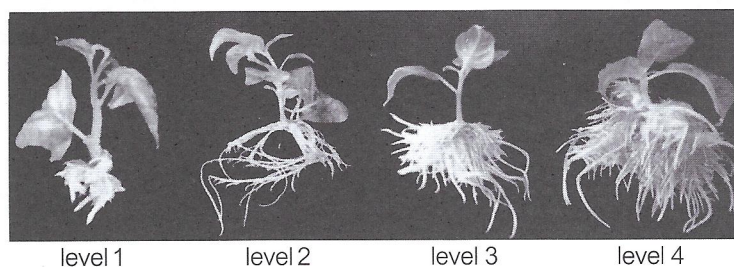


Figure 8 Levels of root intensities of Bhut jolokia chilli plantlets cultured on MS medium supplemented with various concentrations of auxins for 4 weeks.

crystalline inclusion, cylindrical inclusion และ amorphous inclusion ทำการเพิ่มปริมาณต้นพริกที่แสดงอาการต่าง โดยตัดตาข้าง และตายอดของต้นพริกมาพอกฆ่าเชื้อที่ผิว และเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS จากนั้นนำต้นอ่อนพริกที่แสดงอาการต่างในสภาพปลอดเชื้อไปเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูง 35 ± 1 องศาเซลเซียส ต่อเนื่อง เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.04 ppm และ GA₃ ความเข้มข้น 0.1 ppm พบว่ามีการเจริญของเนื้อเยื่อเจริญไปเป็นต้นอ่อนปกติ 3 ต้น เปลี่ยนเป็นแคลลัส 13 ชิ้น และตาย 4 ชิ้น โดยต้นอ่อนที่ได้ไม่แสดงอาการของโรคไวรัส เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แม้จะปล่อยให้เจริญเป็นเวลานานกว่า 6 เดือน และจากการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนพริกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า

สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 4.5 ยอดต่อชิ้นพืช ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 10 ppm ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 1 ppm และชักนำให้เกิดรากในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 2 ppm ซึ่งสามารถชักนำให้ต้นอ่อนพริกมีการสร้างรากในปริมาณที่เหมาะสม เมื่อนำยอดเพาะเลี้ยงต้นอ่อนพริกมาเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 และ 14 วันก่อนย้ายปลูก พบว่าต้นอ่อนพริกมีการรอดชีวิต 85 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้

การสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จามลลักษณ์ ขนบดี, พรนิภา เลิศศิลป์มงคล และปัทมา ศิริ
ธัญญา. 2549. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการ
การศึกษา สถานภาพการผลิต และ
ความสัมพันธ์ของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อ ผลผลิต
คุณภาพ และปริมาณสาร capsaicin ในพริก
พันธุ์การค้าในเขตจังหวัดนครสวรรค์
สุโขทัย และตาก. สำนักงานกองทุนสนับสนุน
การวิจัย, กรุงเทพฯ. 81 หน้า.

ประสาธพร สมิตะมาน. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช:
เทคนิคและการประยุกต์ใช้. สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 141 หน้า.

วสุ อมฤตสุทธิ, พรพิมล สุริยภัทร และรักเกียรติ แสน
ประเสริฐ. 2549. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการ
การศึกษสถานภาพการผลิต และความสัมพันธ์
ของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อผลผลิต คุณภาพ และ
ปริมาณสาร capsaicin ในพริกพันธุ์การค้า
กรณีศึกษา: จังหวัดอุบลราชธานี และศรีสะเกษ.
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.
139 หน้า.

แสนชัย คำหล้า และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2550,
คุณสมบัติทางชีววิทยา และเซรุ่มวิทยาของเชื้อ
Tobamovirus จากพริก และมะเขือเทศ. หน้า
21-25. ใน: เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ
เรื่องศักยภาพการผลิตพริกเพื่ออุตสาหกรรมการ
ส่งออกของไทยในปัจจุบัน และอนาคต. 21-22
กันยายน 2550. ห้องประชุมแสงแก้ว สาขาวิชา
พืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากร
การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ขอนแก่น. ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์คลังนานา
วิทยา, ขอนแก่น.

อิทธิสุนทร นันทิกิจ, จริยา วิสิทธิ์พานิช, พรหมมาศ คูหา
กาญจน์ และอุทัย วิชัย. 2552. ระบบการจัดการ
ผลิตพริกที่เผ็ดที่สุดในโลกอย่างมีประสิทธิภาพ

และปลอดภัย. เคหการเกษตร 33(10): 129,
131-135.

Christie, R.G. and J.R. Edwardson.1986. Light
microscopic techniques for detection of
plant virus inclusion (Online). Available:
[http://www.apsnet.org/publications/PlantDis
ease/BackIssues/Documents/1986
Articles/PlantDisease70n04_273](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n04_273.PDF) . PDF
(August 22, 2011).

Kucharek, T., D. Purcifil and E. Heibert. 2004. Plant
viruses found in Florida and their inclusions
(Online). Available: [http://www.freshfrom
florida.com/pi/enpp/pathology/florida_viruse
s/Florvirus.html# Solanaceae](http://www.freshfromflorida.com/pi/enpp/pathology/florida_viruses/Florvirus.html#Solanaceae) (August 22,
2011).

Lozoya-Saldana, H. and A. Madrigal-Vargas. 1985.
Kinetin, thermotherapy, and tissue culture to
eliminate *Potato virus X* (PVX) in potato.
American Journal of Potato Research 62(7):
339-345.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised
medium for rapid growth and bioassays
with tobacco cultures. Physiologia
Plantarum 15(3): 473-497.

Murphy, J.F. and K.L. Bowen. 2006. Synergistic
disease in pepper caused by the mixed
infection of *Cucumber mosaic virus* and
Pepper mottle virus. Phytopathology 96:
240-247.

Sanatombi, K. and G.J. Sharma. 2007.
Micropropagation of *Capsicum frutescens*
L. using axillary shoot explants. Scientia
Horticulturae 113 (1): 96-99.

Sanatombi, K. and G.J. Sharma. 2008. *In vitro*
propagation of *Capsicum chinense* Jacq.
Biologia Plantarum 52(3): 517-520.

Shah, H., T. Yasmin., M. Fahim., S. Hameed and M.J.
Haque. 2008. Transmission and host range

studies of Pakistan isolate of *Chilli veinal mottle virus*. Pakistan Journal of Botany 40(6): 2669-2681.

Show, R. 1931. Experiments on growth and inhibition. Part II. New phenomena of inhibition. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences 108(757): 305-316.
