วารสารเกษตร 5, 2: 123 - 135 (2532)
Journal of Agriculture 5, 2: 123 - 135 (1989)

การผลิตพันธุ์เบญจมาศปลอดเชื้อโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ

ปัจฉิมา สมิตะมาน ประสาทพร สมิตะมาน และ ปัญญาศรี ธน.ศานติ

PRODUCTION OF VIRUS-FREE CHRYSANTHEMUM BY USING THE COMBINATION OF HEAT TREATMENT AND MERISTEM CULTURE

Pajchima Smitamana, Prasartporn Smitamana and Panyasri Thanasanti

ABSTRACT:Chrysanthemum *(Chrysanthemum morifolium)* cv. Seiko-no-hana, which showed mosaic, mottle, veinal chlorosis, flower distortion and irregular blooming symptoms from the virus infection, were kept at 37 ± 2 C. for 1, 2, 3, 4, 5, and 6 weeks respectively before the meristems were cut and cultured on the modified Murashige and Skoog medium (1962) containing 0.4 ppm BAP and 0.05 ppm IAA. Plantlets about 3-4 cm. size with good root system were transferred in the sterilized soil mixture and tested for the viruses by using both indicator plants *(Chenopodium amaranticolor* and *Nicotiana glutinosa)* and electronmicroscopy. Chrysanthemum Virus B and other virus which could not yet be clearly identified as Tomato Aspermy Virus were found.

บทคัดย่อ: ได้นำเบญจมาศ *(Chrysanthemum morifolium)* พันธุ์ Seiko-no-hana ที่แสดงอาการเนื่องจากเชื้อไวรัสในรูป อาการใบด่าง ใบด่างอย่างอ่อน เส้นใบเหลือง กลีบดอกบิด และการคลี่บานของกลีบดอกไม่สม่ำเสมอมาทดลองเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 37 ± 2° C. เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 อาทิตย์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิปกติก่อนที่จะนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญ แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดัดแปลงจากของ Murashige and Skoog (1962) โดยใช้ BAP 0.4 ppm และ IAA 0.05 ppm หลังจากที่ต้นเบญจมาศเจริญจนมีขนาด 3-4 ซม. และมีระบบรากแข็งแรงแล้วนำมาย้ายปลูกในเครื่องปลูกที่ฆ่าเชื้อ เพื่อทดสอบหาไวรัส พบว่าเบญจมาศที่ได้จากกลุ่มที่เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิสูงติดต่อกันถึง 6 อาทิตย์จะปลอดจากเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของต้นที่ปลอดเชื้อและขนาดความยาวของก้านดอกจะแตกต่างกับต้นที่มีเชื้อไวรัสอย่างเห็นได้ชัด และจากการทดสอบบนพืชทดสอบ *(Chenopodium amaranticolor* and *Nicotiana glutinosa)* ตลอดจนรูปร่างของไวรัสที่ได้จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอนสามารถสรุปได้ว่า ไวรัสสาเหตุของโรคเบญจมาศในกลุ่มที่ศึกษาครั้งนี้เป็น Chrysanthemum Virus B กับไวรัสอีกชนิดหนึ่งที่ยังไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าเป็น Tomato Aspermy Virus หรือไม่

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50002
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50002

คำนำ

เบญจมาศ *(Chrysanthemum morifolium)* เป็นไม้ประดับที่อาจจัดอยู่ในกลุ่มของไม้ตัดดอก หรือ ไม้กระถาง ที่มีความสำคัญมากในแง่ของเศรษฐกิจ และมีบทบาทต่ออุตสาหกรรมการปลูกไม้ดอกอย่างมาก โดยเฉพาะประเทศในกลุ่มยุโรป และอเมริกา สำหรับประเทศไทยได้มีการนำเข้าพันธุ์เบญจมาศจากแหล่งต่างๆ มาเพื่อทดลองปลูกทั้งจากประเทศเนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น และไต้หวัน โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะหาพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย เพื่อที่จะส่งเสริมให้ปลูกในรูปของการค้าต่อไป ภาคเหนือของประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดเชียงใหม่ เป็นแหล่งปลูกที่สำคัญที่สุดของเบญจมาศ ทั้งนี้เนื่องจากสภาพอากาศที่เย็นในช่วงฤดูหนาวทำให้ได้ดอกที่มีคุณภาพสูงทัดเทียมกับดอกที่นำเข้าจากต่างประเทศ

เบญจมาศเป็นไม้ดอกที่สามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยวิธีการตัดยอด หรือ หน่อ มาปักชำ ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะเป็นวิธีการที่ช่วยให้การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสจากต้นแม่ไปยังต้นใหม่ได้อย่างดี นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะอีกด้วย จึงทำให้การระบาดของโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและในเปอร์เซ็นต์ที่สูงมาก ทำให้ได้ต้นที่อ่อนแอ มีผลผลิตและคุณภาพของดอกต่ำกว่ามาตรฐาน และที่สำคัญพันธุ์จะโทรมเร็วกว่าต้นปกติ

การผลิตเบญจมาศปลอดโรคโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบนอาหารสังเคราะห์ ประสบความสำเร็จค่อนข้างสูงในประเทศที่ปลูก และส่งออกเบญจมาศ เช่น ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Moldgate, 1977) โดยพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถที่จะกำจัด Chrysanthemum Virus B ที่ทำให้ต้นอ่อนแอ มีขีดสีน้ำตาลที่กลีบดอก ทำให้ดอกมีคุณภาพต่ำจนไม่เป็นที่ยอมรับของตลาด (Brierley, 1955) อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งต้นที่เป็นโรคอาจไม่แสดงอาการให้เห็นเด่นชัดนัก อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะต่อการแสดงอาการ การที่จะเพิ่มโอกาสให้ได้ต้นที่ปลอดจาก Chrysanthemum Virus B โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญนี้ อาจทำได้โดยการเพาะเลี้ยงพืชที่อุณหภูมิสูงก่อนที่จะนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญประมาณ 2 ถึง 8 เดือน (Brierley and Lorenty, 1960., Hakkart and Quak, 1964., Asatani, 1972) แต่เมื่อนำวิธีการเช่นเดียวกันมาใช้กับ Chrysanthemum Stunt Virus พบว่าไม่สามารถที่จะกำจัดเชื้อได้ (Hollings *et al.*, 1962) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสาเหตุดังกล่าวได้รับการพิสูจน์ในภายหลังว่าเป็นเชื้อไวรอยด์ที่สามารถทวีจำนวนได้ดีในพืชที่เก็บไว้ในอุณหภูมิสูง สำหรับเชื้อ Tomato Aspermy Virus ที่เป็นเชื้อสาเหตุอีกอย่างหนึ่งของเบญจมาศนั้น Asatani (1972) รายงานว่ากำจัดได้โดยการเพาะเลี้ยงพืชที่ 38 $\pm$ 2° C. เป็นเวลา 8 อาทิตย์ก่อนที่จะนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญ

ลักษณะของไวรัสที่เข้าทำลายเบญจมาศเท่าที่พบมีไม่ต่ำกว่า 3 ชนิด และเมื่อแบ่งตามรูปร่างของอนุภาค จะแยกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Chrysanthemum Virus B มีรูปร่างเป็นแท่งตรงยาวประมาณ 685 nm. (Hollings and Stone, 1971) และ อีกกลุ่มหนึ่งเป็นพวกที่มีรูปร่างกลม

มี 2 ชนิด คือ Cucumber Mosaic Virus และ Tomato Aspermy Virus โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 28 และ 30 nm. ตามลำดับ (Gibbs, 1979., Hollings and Stone, 1972)

อาการที่พบบนต้นเบญจมาศจะแตกต่างกันตามพันธุ์ที่ใช้ปลูก และชนิดของไวรัสที่เข้าทำลาย อย่างไรก็ตามพบว่าอาการที่เกิดจาก Chrysanthemum Virus B จะให้อาการที่ส่วนของเส้นใบจะมีลักษณะเหลืองใสกว่าปกติ (Vein clearing) ดอกมีขนาดเล็ก ดอกบิดเบี้ยวและการคลี่บานของดอกไม่สม่ำเสมอ และอาจพบอาการขีดสีน้ำตาลที่กลีบดอกได้อีกด้วย (Hollings and Stone, 1972) สำหรับ Tomato Aspermy Virus และ Cucumber Mosaic Virus ให้อาการคล้ายคลึงกัน คือ อาการใบด่างทั้งชนิดที่เป็นด่างแบบทั่วไป (Mosaic) และด่างอย่างอ่อน (Mottling) สำหรับ Cucumber Mosaic Virus ยังพบว่าอาจทำให้เบญจมาศที่อ่อนแอมากต่อการเข้าทำลายของเชื้อ มีสีดอกเปลี่ยนไปจากเดิมได้อีกด้วย

การศึกษาครั้งนี้นอกจากจะมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาสาเหตุของโรคที่พบในประเทศไทยแล้ว ยังต้องการที่จะผลิตต้นพันธุ์เบญจมาศที่ปลอดโรคไวรัส โดยใช้วิธีการเลี้ยงต้นในอุณหภูมิสูงร่วมกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบนอาหารสังเคราะห์ เพื่อที่จะนำต้นปลอดโรคที่ได้มาใช้ในการส่งเสริมและสนับสนุนอุตสาหกรรมไม้ตัดดอกและช่วยให้กสิกรมีต้นแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพที่จะใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไปอีกด้วย

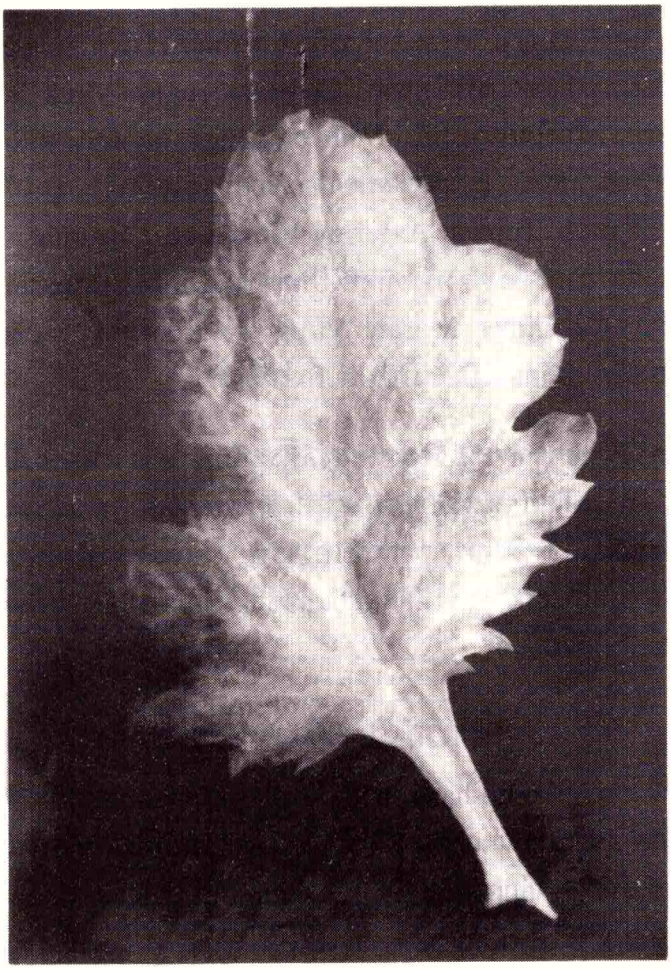
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เบญจมาศพันธุ์ Seiko-no-hana อายุ 1 เดือนที่มีขนาดของต้นใกล้เคียงกัน และแสดงอาการใบด่างทั้งชนิดด่างอย่างอ่อนและด่างทั่วไป และอาการเส้นใบเหลือง (ภาพที่ 1) ที่แยกปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว นำมาเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 37 ± 2° C. ให้แสงวันละ 16 ชั่วโมงโดยใช้หลอด Gro-lux ขนาด 40 Watt ปรับให้ความสูงของหลอดอยู่ห่างจากยอดเบญจมาศที่สูงที่สุดประมาณ 9 นิ้ว ให้น้ำวันละ 2 ครั้งในช่วงเช้าและเย็น และเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของส่วนหน่อให้เป็นไปได้อย่างดี จะให้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตทุก 2 อาทิตย์ โดยการละลายน้ำรด

การเก็บเบญจมาศเพื่อนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มเก็บเฉพาะส่วนของหน่อที่แตกมาหลังจากที่เลี้ยงในสภาพที่กล่าวข้างต้นทุกๆ 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 อาทิตย์ตามลำดับ สำหรับต้นที่ใช้ในการเปรียบเทียบจะปลูกภายในสภาพโรงเรือนปกติที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 22 ± 3° C. และจัดสภาพแวดล้อมต่างๆ ให้เหมือนกับต้นที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของเบญจมาศเริ่มจากการทำการตัดแต่งให้มีขนาดพอเหมาะโดยตัดใบด้านข้างออกจนเหลือเฉพาะส่วนยอด แล้วทำความสะอาดส่วนของหน่อที่เก็บมา โดยล้างด้วยน้ำกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำมาแช่ใน Clorox 10% ที่ผสม Tween 20

Figure 1. Veinal chlorosis, one of the symptoms on the virus infected chrysanthemum leaf.

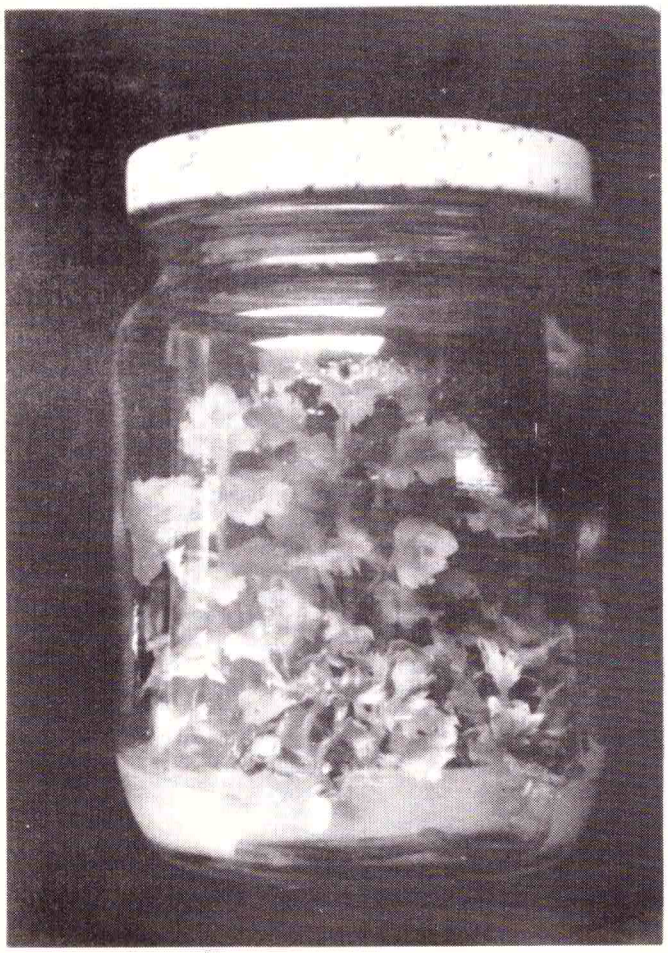


เล็กน้อย อีก 10-15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3-4 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 5 นาที เพื่อที่จะล้าง Clorox ออกให้หมด ตัดเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาด 0.3-0.5 มม. โดยใช้มีดเบอร์ 11 แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงจากของ Murashige and Skoog (1962) ที่ผสม 6 Benzyl aminopurine (BAP) 0.4 ppm และ Indoleacetic acid (IAA) 0.05 ppm ในแต่ละซ้ำจะใช้เนื้อเยื่อเจริญจำนวน 12 ชิ้น แยกเลี้ยงในหลอดทดสอบแต่ละหลอด เก็บในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงวันละ 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 ± 2° C.

Figure 2. Chrysanthemum shoot showing mosaic and mottling symptom before the heat treatment.

หลังจากต้นอ่อนที่เจริญจากเนื้อเยื่อเจริญมีอายุ 3-5 อาทิตย์ จะเปลี่ยนอาหารใหม่ที่บรรจุในขวดแยม เพื่อให้การเจริญเติบโตของต้นเป็นไปได้ดี และมีใบที่คลี่รับแสงได้เต็มที่ ไม่ซ้อนกันเช่นที่เลี้ยงในหลอดทดสอบ ในระหว่างการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต้นที่จะใช้ในการทดลอง จะตัดหน่อที่ได้จากการแตกทางด้านข้างของต้นที่เลี้ยงบนอาหารมาเลี้ยงเพิ่มเติมด้วย

Figure 3. Healthy chrysanthemum plantlets derived from the meristem-tip culture, after heat treatment at 37± 2 ° C. for 6 weeks, on modified Murashige and Skoog (1962) medium.



การย้ายต้นออกปลูกทำเมื่อต้นเบญจมาศสูงประมาณ 3-4 ซม. และมีระบบรากที่แข็งแรง ปลูกในวัสดุปลูกที่ได้จากส่วนผสมของทราย : ขี้เถ้าแกลบ ในอัตรา 1 : 1 อบฆ่าเชื้อที่ 121° C. เป็นเวลา 30 นาที เก็บในสภาพที่มีความชื้นสูง หลังจากต้นกล้าแข็งแรงดีแล้ว ย้ายปลูกในแปลง โดยแยกปลูกเป็นกลุ่มตามกลุ่มของระยะเวลาที่เลี้ยงพืชในอุณหภูมิสูง วัดความสูงของพืชในแต่ละกลุ่มทุก 2 อาทิตย์ เปรียบเทียบกับหน่อที่ได้จากต้นแม่ที่มีเชื้อไวรัส

หลังจากเบญจมาศออกดอก วัดความยาวของก้านดอก โดยวัดจากส่วนโคนดอกถึงปลายกิ่ง และวัดทุก ๆ 2 อาทิตย์หลังจากเริ่มสร้างดอกจนถึงช่วงที่ดอกเริ่มบาน ส่วนการศึกษาอายุการเก็บของดอกนั้น จะตัดดอกที่เริ่มบานให้มีขนาดความยาวของก้านดอก 6 นิ้ว แช่ในน้ำสะอาด และเปลี่ยนน้ำที่ใช้แช่ทุกวันจนกว่าดอกจะเริ่มโรย

การทดสอบหาเชื้อไวรัสและการจำแนกชนิดของไวรัส ใช้วิธีการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ 2 ชนิดคือ *Chenopodium amaranticolor* และใบยาสูบใบเล็ก *(Nicotiana glutinosa)* โดยบดตัวอย่างพืชที่ต้องการทดสอบในโกร่งที่แช่เย็นจัด และใช้ 1/15 M phosphate buffer, pH 7 ในอัตราส่วน น้ำหนักพืช : buffer = 1:10 หลังจากบดพืชจนละเอียดแล้ว นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง และนำน้ำที่กรองได้มาทาบนใบพืชที่โรยผง Carborundum ขนาด 600 mesh ล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาดหลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 2 นาที แล้วเก็บพืชไว้ในที่ร่มประมาณ 12 ชั่วโมงก่อนที่จะนำไปเก็บในโรงเพาะชำ

การศึกษาขนาดและอนุภาคของไวรัสใช้ Brandes' dip technique และใช้ Carbon coated grids ย้อมด้วย Potassium phosphotungstate 2% การวัดขนาดอนุภาคใช้วิธีคำนวณจากภาพขยายและกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอน

ผลการทดลอง

ต้นเบญจมาศที่เก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิสูงจะมีการเจริญเติบโตแตกต่างจากต้นเปรียบเทียบที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิปกติอย่างเห็นได้ชัด โดยจะสังเกตได้ตั้งแต่ช่วงเวลา 2 อาทิตย์ขึ้นไป ส่วนของใบมีสีเขียวเข้มมากขึ้น มีการแตกตาข้างมากกว่าต้นเปรียบเทียบ อาการด่างของใบจะเริ่มเลือนลงไปบ้าง แต่ในส่วนยอดยังคงมีอาการใบด่างอย่างอ่อน (ภาพที่ 2) อาการใบด่างนี้จะจางลงไปพร้อมกับสีของใบที่เขียวเข้มมากขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิสูง ในช่วงต้นของอาทิตย์ที่ 5 อาการใบด่างนี้จะเริ่มหายไปจนไม่พบเลยในอาทิตย์ที่ 6 ลักษณะที่เด่นอีกอย่างหนึ่งของเบญจมาศที่เก็บในสภาพที่ใช้ทดลองนี้คือ ส่วนของหูใบมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

เนื้อเยื่อเจริญที่ได้จากส่วนของตาข้างและหน่อใหม่ของเบญจมาศที่เก็บในสภาพทดลองทุกกลุ่ม เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน สามารถเจริญเติบโตได้อย่างดี (ภาพที่ 3) มีระบบรากที่แข็งแรง และรอดได้ถึง 100% เมื่อย้ายปลูกในกระบะชำและในแปลงตามลำดับ

จากการวัดเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเบญจมาศในกลุ่มที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของพืชที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิสูง กับกลุ่มที่ปลูกในสภาพปกติ พบว่าในกลุ่มแรกมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยเฉพาะในกลุ่มที่ปลูกในสภาพที่อุณหภูมิสูงติดต่อกันมากกว่า 4 อาทิตย์ขึ้นไป จะมีความแตกต่างระหว่างการวัดความสูงของลำต้นในช่วงอาทิตย์ที่ 10 ขึ้นไปอย่างชัดเจน ส่วนกลุ่มที่แสดงอัตราการเจริญเติบโตของต้นเร็วกว่ากลุ่มอื่น ๆ

อย่างชัดเจนที่สุด คือ กลุ่มที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูงถึง 6 อาทิตย์ โดยจะสังเกตความเปลี่ยนแปลงนี้ได้ตั้งแต่การวัดความสูงของลำต้นครั้งที่ 2 (2 อาทิตย์หลังการวัดครั้งแรก) และการเจริญเติบโตนี้จะเป็นไปอย่างต่อเนื่องในอัตราเฉลี่ยความสูง ของลำต้น 3.55 เซ็นติเมตร ต่อการวัดแต่ละครั้ง เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างกลุ่มที่ได้จากเนื้อเยื่อเจริญของพืชที่เก็บในสภาพปกติ กับกลุ่มที่ได้จากเนื้อเยื่อเจริญของพืชที่เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูง จะเห็นว่าเนื้อเยื่อเจริญที่ได้จากพืชที่เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูง จะมีความเจริญเติบโตในด้านความสูงของลำต้นสูงกว่าเนื้อเยื่อเจริญที่ได้จากพืชที่เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิปกติ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่เลี้ยงในสภาพดังกล่าวตั้งแต่ 4 อาทิตย์ขึ้นไป (a) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งกับกลุ่มที่เก็บในสภาพดังกล่าวถึง 6 อาทิตย์ (b) (ตารางที่ 1)

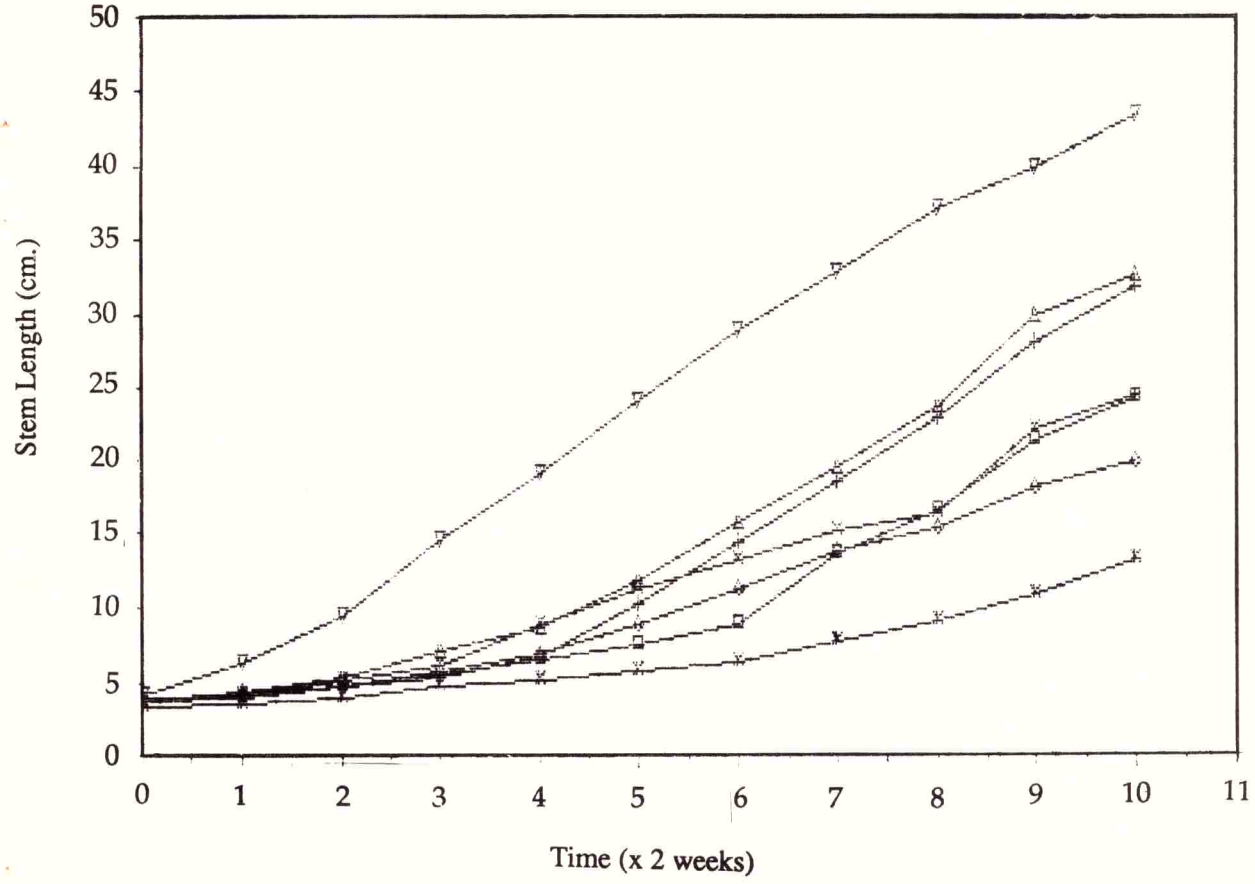
อัตราการเจริญเติบโตของเบญจมาศแต่ละกลุ่มที่ได้จากการทดลองครั้งนี้พบว่า จะผันแปรโดยตรงกับระยะเวลาที่เก็บในสภาพอุณหภูมิสูงอีกด้วย (ตารางที่ 1 และภาพที่ 4) ข้อแตกต่างที่พบอีกอย่างหนึ่งคือ สีใบของพืชที่ได้จากเนื้อเยื่อเจริญจากกลุ่มที่เก็บในสภาพอุณหภูมิสูง เป็นเวลานานกว่า 4 อาทิตย์ขึ้นไปจะมีสีเขียวเข้ม และมีขนาดของใบโตกว่าต้นในกลุ่มเปรียบเทียบอย่างเห็นได้ชัด

Table 1. Average height of the four chrysanthemum plants obtained from the meristem culture and heat treatment, measured every two weeks (cm.).

Duration of Heat Treatment (weeks)	Sampling Periods (weeks)										
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
1	3.900	4.025	4.725	5.775	6.975	8.725	11.175	13.675	15.175	18.175	19.825
2	3.875	4.050	4.750	5.475	6.400	7.375	8.775	13.425	16.600	21.250	24.200
3	3.650	4.175	5.050	6.100	8.725	11.212	13.025	15.025	16.425	21.900	24.350
4	3.600	4.100	4.750	5.400	6.775	10.175	14.175	18.550	22.725	28.000	31.650[a]
5	3.800	4.300	5.275	7.000	8.575	11.800	15.700	19.400	23.500	29.800	32.400[a]
6	4.175	6.300	9.350	14.500	19.100	23.950	28.825	32.750	36.900	39.900	43.300[ab]
Control (0)	3.125	3.350	4.000	4.775	5.050	5.575	6.375	7.700	9.050	10.700	13.075

LSD 0.05 = 12.674 LSD 1.01 = 25.190

Figure 4. Different growth rate of the chrysanthemum clones derived from the meristem--tip cultures after various heat treatment duration



Symbols representing duration of heat treatment before excised the meristem-tips

1 week	□ 2 weeks	x 3 weeks	+ 4 weeks
△ 5 weeks	▽ 6 weeks	* Control (without heat treatment)	

ผลจากการวัดความยาวของก้านดอกและขนาดของดอก จะให้ผลเช่นเดียวกับอัตราการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น โดยพบว่าต้นในกลุ่มเปรียบเทียบจะให้ความยาวของก้านดอกสั้นที่สุด (30.25 ซม.) มีขนาดดอกเฉลี่ย 8.34 ซม. และกลุ่มที่ให้ความยาวของก้านออกมากที่สุดคือ กลุ่มที่เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูงเป็น 6 อาทิตย์ (41.475 ซม.) โดยจะให้ดอกที่มีขนาดโตกว่าคือ 11.306 ซม. นอกจากนี้ยังคงพบอาการดอกซีดและแตกฝอยบิดเป็นเกลียวในกลุ่มเปรียบเทียบเช่นเดียวกับดอกที่ได้จากต้นที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ดอกที่มีคุณภาพดีจะได้จากกลุ่มที่เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิสูงนานที่สุดก่อนที่จะตัดเนื้อเยื่อเจริญ พืชในกลุ่มนี้จะให้ดอกสีเหลืองสดการเรียงตัวของกลีบดอกเป็นไปอย่างมีระเบียบ กลีบไม่เล็กหรือแตกเป็นฝอยแบบกลุ่มอื่น

ในด้านอายุการปักแจกันของดอกเบญจมาศที่ได้ในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันนัก โดยดอกที่ได้จากต้นในกลุ่มเปรียบเทียบจะเริ่มซีดและโรยหลังจากที่เก็บแล้วประมาณ 6.67 วัน และดอกที่ได้จากกลุ่มทดลองจะมีอายุในการปักแจกันประมาณ 7.77 วัน

การตรวจสอบชนิดของไวรัสที่พบในเบญจมาศในกลุ่มทดลองนี้ พบว่า เมื่อนำน้ำคั้นจากต้นที่แสดงอาการของไวรัสมาทาบน *C. amaranticolor* จะเห็นอาการตายของเนื้อเยื่อเป็นจุดในใบที่ได้รับเชื้อ อาการเช่นนี้จะแสดงภายใน 9-12 วัน แต่อาการดังกล่าวจะไม่พบเมื่อนำน้ำคั้นจากพืชกลุ่มทดลองที่เก็บในสภาพอุณหภูมิสูงก่อนตัดเนื้อเยื่อเจริญมากกว่า 4 อาทิตย์ขึ้นไป

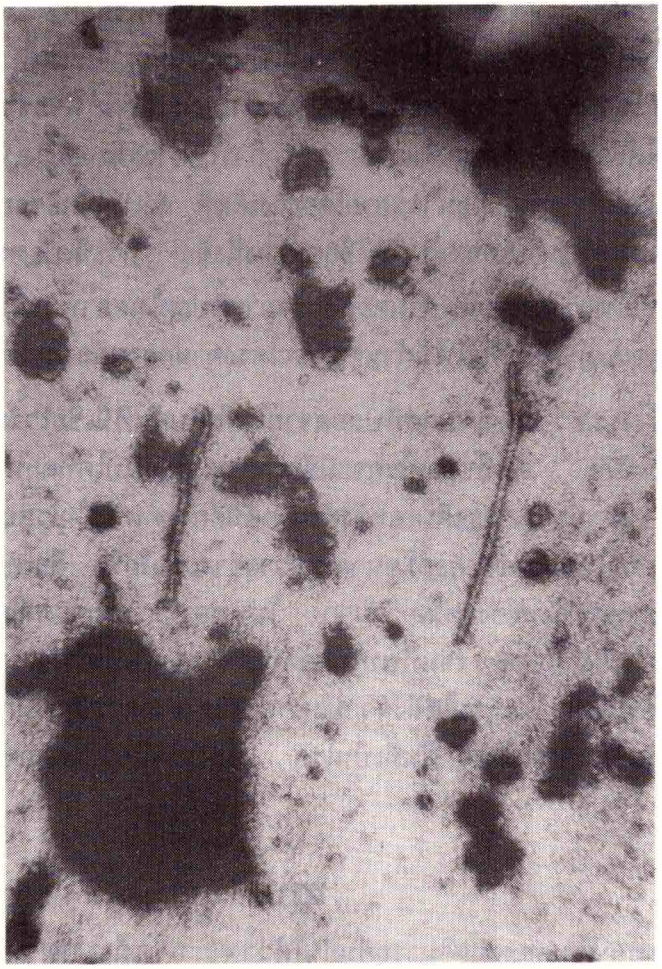
สำหรับอาการที่พบบนยาสูบใบเล็ก หลังจากทาด้วยน้ำคั้นจากพืชกลุ่มต่างๆ พบว่าจะเริ่มแสดงอาการจุดเหลืองบนใบที่ได้รับเชื้อในช่วง 17-20 วัน และต่อมาเนื้อเยื่อในบริเวณนี้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งบางครั้งนอกจากจะพบว่าเนื้อเยื่อที่ตายมีสีน้ำตาลแบบทั่วๆ ไปแล้วยังพบว่ามีวงแหวนสีน้ำตาลตรงจุดของเนื้อเยื่อที่ตายด้วย อย่างไรก็ตามไม่พบอาการดังกล่าวบนพืชทดสอบเมื่อนำน้ำคั้นจากพืชกลุ่มที่เก็บในสภาพอุณหภูมิสูงติดต่อกัน 6 อาทิตย์ ก่อนที่จะมาตัดเนื้อเยื่อเจริญ

การตรวจหาอนุภาคของไวรัสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอนนั้น พบอนุภาคของไวรัสที่มีรูปร่างเป็นแท่งยาวค่อนข้างตรง ขนาดประมาณ 680 nm.(ภาพที่ 5) ซึ่งมีลักษณะตรงกับ Chrysanthemum Virus B

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากลักษณะอาการของเบญจมาศในกลุ่มทดลองที่แสดงในรูปที่ 1 อาการใบด่างอย่างอ่อน ใบด่างอย่างทั่วไป อาการเส้นใบเหลืองและใส อาการดังกล่าวคล้ายคลึงกับอาการของไวรัส 2 ชนิดคือ Chrysanthemum Virus B และ Tomato Aspermy Virus อย่างไรก็ตามเมื่อทำการตรวจสอบชนิดของไวรัสโดยใช้ ยาสูบใบเล็กและ *C. amaranticolor* พบว่าพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิดแสดงอาการเหลืองเป็นจุด หรือ อาการตายของเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำตาล และบางครั้งยังพบอาการตายของเนื้อเยื่อเป็นรูปวงแหวนล้อมส่วนที่แสดงอาการนี้ด้วย ดังที่พบในยาสูบใบเล็ก

Figure 5. Virus particles with ca. 680 nm. length detected by Brandes' dip technique stained with 2% PTA.



อาการดังกล่าวเป็นอาการที่บ่งชี้ว่าเกิดจากไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ หลักฐานที่จะใช้ประกอบการยืนยันว่ามีไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ในเบญจมาศที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เห็นได้อย่างชัดเจนจากการแสดงอาการของเบญจมาศที่เจริญมาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจากที่เก็บต้นแม่ไว้ที่อุณหภูมิสูง คือ 37 $\pm$ 2° C. ในช่วงเวลาต่างๆ กัน เบญจมาศที่ได้จากวิธีการดังกล่าวจะแสดงอาการแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด คือ จะมีทั้งกลุ่มที่แสดงอาการใบด่างอย่างรุนแรงเช่นเดียวกับต้นแม่ ต้นที่แสดงอาการใบด่างอย่างอ่อน และ ต้นที่ไม่แสดงอาการใบด่างเลย แม้ว่าจะเก็บไว้ได้นานเท่าใดก็ตาม นอกจากนี้เมื่อนำน้ำคั้นจากเบญจมาศที่ได้ในกลุ่มดังกล่าวนี้ มาทาบนพืชทดสอบจะ

เห็นว่า หลังจากเก็บต้นแม่ในสภาพที่อุณหภูมิสูงติดต่อกันมากกว่า 4 อาทิตย์ จะเหลือไวรัสที่แสดงอาการได้บนยาสูบใบเล็กแต่เพียงอย่างเดียว และถ้าเก็บไว้นานกว่า 5 อาทิตย์ จะไม่พบอาการที่เกิดจากไวรัส ทั้งบนพืชทดสอบและต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ

ผลที่ได้รับจากการเก็บต้นเบญจมาศในอุณหภูมิสูงที่เห็นชัดคือ ต้นมีการยืดยาวกว่าต้นเปรียบเทียบที่เก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากการเก็บภายใต้สภาวะดังกล่าวจะระงับการทวีจำนวนของไวรัสได้อย่างดี และในขณะเดียวกันจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของต้นเบญจมาศได้อีกด้วย ซึ่งจะเห็นจากการที่อาการใบด่างลดลงอย่างเห็นได้ชัดตามระยะเวลาที่เลี้ยงไว้ และใบมีสีเขียวเข้ม มีขนาดขยายโตอย่างเต็มที่ สาเหตุที่จะช่วยให้เบญจมาศที่เลี้ยงในสภาพที่ทดลองมีการเจริญเติบโตของลำต้นดีอีกอย่างหนึ่งคือ การที่เบญจมาศได้รับแสงอย่างเต็มที่ถึง 16 ชั่วโมงทำให้การยืดตัวของก้านดอกดีกว่าการที่ปลูกในสภาพวันสั้น ข้อมูลด้านนี้สามารถนำมาใช้ในการปลูกเบญจมาศเพื่อให้มีก้านดอกยาวตรงตามความต้องการของตลาดได้อีกด้วย

ข้อแตกต่างระหว่างเบญจมาศที่ปลอดจากไวรัสกับต้นที่มีเชื้อไวรัสที่เห็นได้อย่างชัดเจนจากการทดลองครั้งนี้คือ ต้นที่ปลอดโรคจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดช่วงการเจริญเติบโต และมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นดีกว่าต้นที่เป็นโรคอย่างมาก ผลที่ได้จากความแตกต่างนี้จะทำให้ขนาดของดอกมีขนาดโตกว่าอย่างเห็นได้ชัด คือโตกว่าประมาณ 3 ซม. นอกจากนี้ยังพบว่าดอกมีสีเหลืองสดใสกว่ามาก ไม่พบอาการตายของกลีบดอก หรือกลีบดอกมีลายด่างขาว หรือขีดสีน้ำตาล เช่นที่พบในดอกที่ได้จากต้นที่เป็นโรคแต่อย่างใด อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ถึงความแตกต่างของอายุการปักแจกันระหว่างดอกที่ได้จากต้นที่ปลอดเชื้อไวรัสกับดอกซึ่งได้จากต้นที่เป็นโรค เนื่องจากมีความแตกต่างกันน้อยมากเพียง 1 วันเท่านั้น

สรุป

ผลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่า การเก็บเบญจมาศในสภาพอุณหภูมิสูงติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ก่อนที่จะนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญเพื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์จะช่วยให้โอกาสที่จะได้ต้นที่ปลอดโรค มีมากกว่าที่จะได้จากต้นที่เป็นโรคที่ไม่ผ่านขบวนการนี้โดยตรง และโอกาสดังกล่าวจะผันแปรโดยตรงกับช่วงเวลาการเก็บพืชในสภาพดังกล่าว ซึ่งตรงกับที่พบโดย Bierley and Lorenty (1960), Pouldan, (1973,) Hakkart and Quak (1964) Asatani (1972), Quak (1977) และ Walkey (1980) เป็นต้น

ข้อมูลที่ได้จากลักษณะอาการที่พบทั้งบนเบญจมาศที่เป็นโรค และอาการที่พบบนพืชทดสอบ รวมทั้งจากขนาดและรูปร่างของอนุภาคไวรัสที่พบจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่า Chrysanthemum Virus B เป็นไวรัสที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคของเบญจมาศในกลุ่มที่ทดลอง นอกจากนี้น่าจะมี Tomato Aspermy Virus

ร่วมอยู่ด้วยอีกชนิดหนึ่ง แต่ไวรัสดังกล่าวมีอนุภาครูปร่างกลมจึงยากแก่การตรวจสอบโดยการใช้ Brandes' dip Technique เพราะจะสับสนได้ง่ายกับสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่มีขนาดใกล้เคียงกับไวรัสที่พบในพืช แต่จากการศึกษายังพบลักษณะของอนุภาคที่คล้ายคลึงและมีขนาดใกล้เคียงกับไวรัสดังกล่าวมากเช่นกัน ซึ่งยังไม่อาจยืนยันได้แน่ชัดนัก ข้อสรุปที่เกี่ยวกับ Tomato Aspermy Virus จึงได้จากการทดสอบบนพืชที่ใช้ในการจำแนกชนิดของไวรัสเท่านั้น ดังนั้นจึงน่าที่จะศึกษาต่อไป โดยการเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์ ก่อนที่จะนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอน เพื่อขจัดปัญหาของการแปดเปื้อนของอนุภาคที่ใกล้เคียงกันจากพืชอาศัยของไวรัสชนิดนี้ จึงจะเป็นการยืนยันที่แท้จริงอีกครั้งหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

Asatani, M. (1972). Freeing chrysanthemum from the rod shaped leaf mottling viruses and tomato aspermy virus by a combination meristem-tip culture with heat treatment. Ber. Oharo. Inst. Landwirthsh. Biol. 15 : 169-179.

Gibbs, A. J. (1979). Cucumber mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses. No. 213.

Hakkart, F. A. and Quak, F. (1964). Effect of heat treatment of young plants on freeing chrysanthemum from virus B by means of meristems culture. Neth. J. Plant Path. 70 : 154-170.

Hollings, M. and Stone, O.M. (1970). Attempts to eliminate chrysanthemum stunt from chrysanthemum by meristem-tip culture after heat treatment. Am. Appl. Biol. 65 : 311 - 315.

Hollings, M. and Stone, O.M. (1971). Tomato aspermy virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses. No. 79

Hollings, M. and Stone, O.M. (1972). Chrysanthemum virus B. CMI/AAB Description of Plant Viruses. No. 110.

Mckay, M. E. (1977). Growing Chrysanthemum, Cut Flower and Pot Plants. Horticulture Branch Advisory Leaflet, H 30. Queensland Department of Primary Industries, 14 p.

Moldgate, D. P. (1977). Propagation of ornamentals by tissue culture. In : Plant Cell. Tissue and Organ Culture, edited by J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. Springer Verlag, Berlin. p 44 - 65.

Pouldan, N. (1963). Virus-free plants of chrysanthemum from approved varieties established by means of heat treatment and meristem-tip culture. Tiddskr Planteavl 77 : 689 - 696.

Quak, F. (1977). Meristem Culture and Virus-free Plant. In : Plant Cell, Tissue and Organ Culture, edited by J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. Springer Verlag, Berlin. p. 598-615.

Walkey, D. G. A. (1980). Production of Virus-free Plants by Tissue Culture. In : Tissue Culture Methods for Plant Pathologists, edited by D. S. Ingram and J. P. Helgeson. Blackwell Scientifics Publications, Oxford. p. 109-117.