3. <u>การศึกษาผลของ DTU และ Ribavirin ในการกำจัดเชื้อ *Cymbidium mosaic virus*</u> (*CymMV*)

3.1 *Mokara* Chark Kuan

การเพาะเลี้ยง PLBs ของ *Mokara* Chark Kuan ให้ได้รับ Ribavirin ตามด้วย DTU จนกระทั่งมีการสร้าง PLBs รุ่นใหม่รุ่นที่ 1 (C_1-PLBs) จากนั้นทำการตัดเอา C_1-PLBs ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วจึงนำเอา C_1-PLBs ที่ได้ไปทำการตรวจหาเชื้อ *CymMV* เบื้องต้นด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า C_1-PLBs ที่ได้จาก PLBs ที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 20 วัน ปราศจากเชื้อ *CymMV* สูงที่สุดร้อยละ 25 รองลงมาคือ C_1-PLBs ที่ได้จาก PLBs ซึ่งได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.20 และ 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 30 วัน ตามลำดับ โดยปราศจากเชื้อ *CymMV* ร้อยละ 12.25 และ 12.12 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) แต่เมื่อทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี RT-PCR (ภาพที่ 19) พบว่า C_1-PLBs ดังกล่าวทั้งสามกลุ่มปราศจาก *CymMV* เพียงร้อยละ 12.5, 6.25 และ 3.03 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอา C_1-PLBs ที่ยังคงมีเชื้อ *CymMV* ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้ได้รับ Ribavirin และ DTU ซ้ำอีกรอบหนึ่ง จนกระทั่งสร้าง PLBs ใหม่รุ่นที่ 2 (C_2-PLBs) จากนั้นจึงตัดเอา C_2-PLBs ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วนำเอา C_2-PLBs ที่ได้ไปตรวจสอบเชื้อ *CymMV* เบื้องต้นด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า C_2-PLBs ปราศจากเชื้อ *CymMV* เพิ่มขึ้น โดย C_2-PLBs ที่ได้จาก C_1-PLBs ซึ่งได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ และ DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ปราศจากเชื้อ *CymMV* มากที่สุดร้อยละ 66.67 รองลงมาคือ C_2-PLBs ที่ได้จาก C_1-PLBs ซึ่งได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ และ DTU เข้มข้น 0.20 และ 0.15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยปราศจากเชื้อ *CymMV* ร้อยละ 35.90 และ 25 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า C_2-PLBs ที่ได้จาก C_1-PLBs ที่ไม่ได้รับสารกำจัดไวรัส ก็ปราศจากเชื้อ *CymMV* ถึงร้อยละ 10 และเมื่อนำไปทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี RT-PCR (ภาพที่ 19) พบว่า PLBs ทั้งสามกลุ่มที่ได้รับสารกำจัดไวรัสปราศจาก *CymMV* ร้อยละ 50, 30.77 และ 18.18 ตามลำดับ ขณะที่ตรวจพบเชื้อ *CymMV* ใน C_2-PLBs ซึ่งไม่เคยผ่านการได้รับสารกำจัดไวรัส (ตารางที่ 16)

3.2 *Oncidium* Gower Ramsey

การเพาะเลี้ยง PLBs ของ *Oncidium* Gower Ramsey ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ให้ได้รับ Ribavirin และ DTU จนกระทั่งมีการสร้าง PLBs รุ่นใหม่รุ่นที่ 1 (C_1-PLBs) จากนั้นทำการตัดเอา C_1-PLBs ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วจึงนำเอา C_1-PLBs ที่ได้ไปทำการตรวจสอบเชื้อ *CymMV* เบื้องต้นด้วยวิธี DAS-ELISA พบว่า PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ นาน 40 วัน ปราศจากไวรัสสูงที่สุด ร้อยละ 83.87 รองลงมาคือ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ นาน 40 วัน และ PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 30 วัน โดยปราศจาก *CymMV* ร้อยละ 65.22 และ 52.17 ตามลำดับ (ตารางที่ 17) และเมื่อทำการตรวจยืนยันผลอีกครั้งด้วยวิธี RT-PCR (ภาพที่ 19) พบว่า C_1-PLBs ปราศจากเชื้อ *CymMV* เพียงร้อยละ 61.29, 47.83 และ 47.83 ตามลำดับ ส่วน C_1-PLBs ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารสูตรปกติไม่พบว่าปราศจากไวรัส (ตารางที่ 17)

3.3 *Dendrobium* Sonia ‘Ear-sakul’

การเพาะเลี้ยง PLBs ของ *Dendrobium* Sonia ‘Ear-sakul’ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ให้ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ และ 0.20 มิลลิโมลาร์ อีก 50 และ 40 วัน ตามลำดับ และ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ อีก 50 วัน จนกระทั่งมีการสร้าง PLBs ใหม่รุ่นที่ 1 (C_1-PLBs) เพื่อตัดเอา C_1-PLBs ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ไปเพาะเลี้ยงให้เพิ่มปริมาณ แล้วจึงนำเอา C_1-PLBs ที่ได้ไปทำการตรวจสอบเชื้อ *CymMV* ด้วยวิธี DAS-ELISA และ RT-PCR นั้น พบว่า ไม่สามารถเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารสูตรที่กำหนดไว้ได้นานจนครบกำหนดเวลา เนื่องจากความเป็นพิษของสารกำจัดไวรัสที่มีต่อพืช ทำให้ PLBs ซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม Ribavirin ทั้ง 2 ความเข้มข้น มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลปนเขียวและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อทำการย้าย PLBs ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี DTU ทุกความเข้มข้น นานเพียง 10 วัน ทำให้ PLBs เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แม้จะทำการย้ายเอา PLBs ที่ได้รับ Ribavirin และ DTU ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่ไม่เติมสารกำจัดไวรัสทั้ง 2 ชนิด แต่

PLBs ยังคงมีลักษณะอ่อนนิ่มและมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีสีน้ำตาลทั้งก้อน ทำให้ไม่สามารถผลิต C_1-PLBs ได้

อย่างไรก็ดี จากการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้ในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ หรือ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15, 0.20 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลานาน 100 หรือ 110 วัน ในการทดลองที่ 2 นั้น พบว่า สามารถสร้าง C_1-PLBs ได้ในระหว่างการทดลอง จึงได้ตัดเอา C_1-PLBs ไปเพาะเลี้ยงซึ่งเมื่อนำมาตรวจหา *CymMV* ด้วยวิธี DAS-ELISA และ RT-PCR (ภาพที่ 20) พบว่า C_1-PLBs ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่ไม่มีและมีสารกำจัดไวรัสทุกสูตร ปราศจาก *CymMV* ทั้งหมด (ตารางที่ 18)