

วิจารณ์

PLBs ของกล้วยไม้ ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Mokara Chark Kuan (Mkra.)*, *Oncidium Gower Ramsey (Onc.)* และ *Dendrobium Sonia 'Ear-sakul' (Den.)* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin มีสีเปลี่ยนแปลงไป จากความเป็นพิษของ Ribavirin ซึ่ง PLBs ของกล้วยไม้แต่ละชนิดเริ่มแสดงอาการหลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin ระยะเวลาต่างกัน และอาการจะรุนแรงขึ้นเมื่อได้รับ Ribavirin ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น หรือเป็นเวลานานขึ้น ขณะที่ PLBs ของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม Ribavirin นั้น มีสีเขียวปกติตลอดการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า PLBs ที่ได้รับ Ribavirin ทุกความเข้มข้น มีอัตราการรอดชีวิตลดลงหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาหนึ่ง แตกต่างกันไปตามชนิดของกล้วยไม้ ความสมบูรณ์แข็งแรงของ PLBs และความเข้มข้นของ Ribavirin โดยทำให้ PLBs เปลี่ยนเป็นสีเขียวซีดจนมีสีเหลือง จนกระทั่งเนื้อเยื่อผิวด้านนอกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ทั้งยังลุกลามเข้าสู่ภายในของก้อน PLBs ทำให้มีการเจริญเติบโตและขยายขนาดน้อยกว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี Ribavirin เนื่องจาก Ribavirin ทำให้พืชแบ่งเซลล์ช้าลงและเซลล์ของชั้นเนื้อเยื่อตาย (Toussaint *et. al.*, 1992; Nascimento *et. al.*, 2003) ความเป็นพิษดังกล่าวยังมีรายงานใน Sweet orange, Lime และ Citron (Greno *et. al.*, 1990) *Den. Sonia* (Loi *et. al.*, 1991) *Cymbidium* sp. (Toussaint *et. al.*, 1992) *Den. Jacquelyn Thomas 'Uniwai Mist'* (Porter and Kuenhle, 1997) และ *Den. Sonia 'BOM 17'* (สุรวิษและสุวรรณ, 2544) อย่างไรก็ตาม PLBs บางก้อนที่ยังมีสีเขียวอมเหลืองหรือสีน้ำตาลอมเหลือง สามารถกลับมาสีเขียวเข้มขึ้นได้อีกด้วย จึงตัดสินใจให้เป็น PLBs ที่รอดชีวิต ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ PLBs ส่วนที่ยังคงมีสีเขียวนั้นอาจปรับตัวให้ทนกับสารเคมีได้ จนสามารถขยายขนาดและเพิ่มปริมาณได้ ทำให้ความเข้มข้นของสารกำจัดไวรัสต่อปริมาณ PLBs ลดลง ความเป็นพิษของสารต่อพืชจึงลดลงด้วย

นอกจากนี้ ระดับความเข้มข้นของ Ribavirin ยังมีผลต่อการเกิด PLBs รุ่นใหม่ (C_1 -PLBs) ซึ่งใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนสูงถึงระดับหนึ่งจะไม่พบการสร้าง C_1 -PLBs เนื่องจาก Ribavirin ไปชะลอการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญ ทำให้การเจริญเติบโตและแตกออกของพืชลดลง และยังทำให้พืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมีการเจริญกลับเป็นต้นใหม่ (regeneration) ได้ช้าลง คล้ายกับที่ Greno *et. al.* (1990) รายงานว่า ส่วนข้อของส้ม Sweet orange Lime และ Citron ที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 50-5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสร้างยอดและรากได้จำนวนแตกต่างกันตามชนิดของส้ม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับไม่มีการสร้างยอดและราก ส่วน Parmessur and Saumtally (2001) รายงานว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดอ้อยพันธุ์

การค้ำมีการแตกกอลดลงเมื่อได้รับ Ribavirin เข้มข้น 30-10 มิลลิกรัมต่อลิตร และหยุดการแตกกอเมื่อได้รับ Ribavirin ตั้งแต่ 60 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป ขณะที่ Verma *et. al.* (2005) พบว่า *Begonia* spp. ที่ได้รับ Ribavirin เกินกว่า 35 มิลลิกรัมต่อลิตร มีโอกาสปลอดไวรัสมากขึ้นแต่กลับมีการเจริญของยอดลดลงและมียอดที่ตายเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ *Lilium* (Blom-Barnhoom and van Aartrijk, 1985) และมันฝรั่ง (Cassels and Long, 1982; Colombarini, 1990) เนื่องจาก Ribavirin นอกจากจะสามารถเข้าไปแทรกในสาย nucleotide ของไวรัสได้แล้ว ยังอาจเข้าไปแทรกในจีโนมของพืชจนอาจทำให้พันธุกรรมของพืชที่มีการแบ่งเซลล์ใหม่เปลี่ยนไป มีผลต่อความสามารถในการทนต่อสารกำจัดไวรัสของพืชได้ (James, 2001)

สำหรับ PLBs ของ *Onc.* ที่ได้รับ DTU เพียงอย่างเดียว นั้น แสดงอาการตอบสนองต่อความเป็นพิษของ DTU หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี DTU ทุกความเข้มข้น โดยอาการรุนแรงขึ้นเมื่อได้รับ DTU ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นระยะเวลานานขึ้น โดย PLBs มีสีเขียวจนเป็นสีขาวนวลหรือสีเหลือง จนมีสีคล้ำหรือสีน้ำตาลเข้มและตาย ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี DTU ยังคงมีสีเขียวสดใสปกติ ซึ่งคล้ายกับกรณีการเพาะเลี้ยงส่วนของส้ม Sweet orange, Lime และ Citron (Greno *et. al.*, 1990) *Den.* Jacquelyn Thomas ‘Uniwai Mist’ (Porter and Kuehnle, 1997) *Den.* Pompadour (โชคพิศิษฐ์, 2528) *Den.* Sonia (เฉลิมรัฐ, 2538) และ *Den.* Sonia ‘BOM 17’ (สุรวิชและสุวรรณ, 2544; ศิริพร, 2545) อย่างไรก็ตาม PLBs เหล่านี้ยังสามารถสร้าง PLBs ใหม่รุ่นที่ 1 (C₁-PLBs) หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี DTU ระยะเวลาหนึ่งแล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติที่ไม่เติม DTU นานราว 30 วัน

การที่ PLBs ของ *Mkra.*, *Onc.* และ *Den.* มีการตอบสนองต่อ Ribavirin หรือ DTU ต่างจาก *Den.* Jacquelyn Thomas ‘Uniwai Mist’ หรือ *Den.* Sonia ‘BOM 17’ อาจเกิดจากสภาพทางพันธุกรรม เพราะเป็นกล้วยไม้ต่างชนิดหรือต่างโคลนกัน (สุรวิชและสุวรรณ, 2544) นอกจากนี้การคัดเลือก PLBs เพื่อใช้ในการทดลองโดยการคัดขนาด PLBs ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางราว 4-3 มิลลิเมตร ขณะที่ PLBs แต่ละชิ้นมีความบอบช้ำและน้ำหนักสดเริ่มต้นที่ต่างกัน (เฉลิมรัฐ, 2538; ศิริพร, 2545) ทำให้ PLBs มีความสมบูรณ์และแข็งแรงต่างกัน จึงการทนต่อสารกำจัดไวรัสได้ต่างกัน นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่า PLBs ที่มีน้ำหนักเริ่มต้นสูงกว่า มักมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าพวกที่มีน้ำหนักสดเริ่มต้นต่ำกว่า ด้วยเหตุเดียวกันนี้ ยังพบว่า PLBs ของกล้วยไม้ที่ได้รับสารกำจัดไวรัสที่มีความเข้มข้นสูง มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า PLBs ที่ได้รับสารกำจัดไวรัสที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า เช่นที่พบในการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้ *Mkra.*

การที่ Ribavirin และ DTU มีโครงสร้างคล้ายกับนิวคลีโอไทด์เบส (nucleotide base-analog) จึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับสารพันธุกรรมของพืช การที่ PLBs ตอบสนองต่อ Ribavirin มากกว่า DTU อาจเป็น เพราะ Ribavirin มีโครงสร้างคล้ายกับเบส guanine (G) (Hardman *et. al.*, 1996) ซึ่งนอกจากจะสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัส โดยเป็น mutagenic nucleoside แทรกอยู่ในจีโนมของทั้ง DNA และ RNA ไวรัสแล้ว ยังยับยั้ง 5'-capping ของไวรัส จึงไม่สามารถ replication ได้สมบูรณ์ หรือมีการจำลองสาร RNA สายใหม่ที่ผิดไป จนทำให้เกิด lethal mutagenesis นอกจากนี้ Ribavirin monophosphate ยังทำให้ภายในเซลล์มีการสะสม GTP (guanosine triphosphate) ลดลง จึงมีผลรบกวนการเกิดปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์ จนอาจทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวหรือขยายขนาดได้ตามปกติ (O'Grady *et. al.*, 1997; Crotty *et. al.*, 2002; Freistadt *et. al.*, 2004) การที่ Ribavirin สามารถแทนที่ได้ทั้ง DNA และ RNA ของพืช เมื่อผ่านการจำลองตัวของ DNA ในรอบต่อไปอาจทำให้เกิดการเข้าคู่ใหม่ของเบสแทนที่เบสคู่เดิม หรือเกิด purine และ pyrimidine transition mutation กับเซลล์ที่มีการแบ่งตัวออกมาใหม่ พันธุกรรมของเซลล์พืชบางเซลล์อาจเปลี่ยนไป (ไพศาล, 2535) ซึ่งนอกจากทำให้การแบ่งเซลล์ลดลงแล้วยังทำให้เซลล์ที่ได้รับ Ribavirin ตายจากการที่เซลล์นั้นไม่สามารถสร้างสารที่จำเป็นต่อเซลล์ได้

ขณะที่ DTU ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเบส uracil (U) โดยมีกลุ่ม thio sulfur 2 กลุ่มเพิ่มจาก uracil จึงสามารถเข้าไปแทนที่เบส uracil ใน RNA ของไวรัส (Hardman *et. al.*, 1996) และสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ pyrimidine nucleotide ของ mRNA (Hardman *et. al.*, 1996; Wang *et. al.*, 2005) ทำให้นิวคลีโอไทด์ ที่เบสถูกแทนที่หรือถูกรบกวนมีการเปลี่ยนโครงสร้างไป (Commoner *et. al.*, 1951; Dawson and Boyd, 1987) หาก DTU ซึ่งมี thio sulfur อะตอมขนาดใหญ่และมีค่าการนำไฟฟ้า (Electronegativity) ต่ำกว่า oxygen อะตอม ที่มีในเบสปกติ (Wang *et. al.*, 2005) เข้าไปแทนที่หรือแทรกตัวในสาย RNA ที่เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ mRNA หรือ DNA อาจทำให้การสังเคราะห์ mRNA ถูกยับยั้งเพราะไม่สามารถเกิดการเข้าคู่ของคู่เบส เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนที่ไม่เสถียร หรือโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่มีลำดับเพิ่มขึ้น หรือเปลี่ยนไป เมื่อผ่านการจำลองตัวของ RNA อีกครั้ง คล้ายกับการแทนที่ของสารเคมีพวกสีย้อมต่างๆ (ประดิษฐ์, 2546)

การที่เพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่มี Ribavirin ได้สั้นกว่าและมีผลต่อการตายของเซลล์โดยแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์พืชได้รวดเร็วและชัดเจนกว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม DTU ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่ Ribavirin แทนที่ทั้ง DNA และ RNA ขณะที่ DTU แทนที่เฉพาะ RNA เท่านั้น ดังนั้นเมื่อใช้สารกำจัดไวรัสทั้ง 2 ชนิดต่อเนื่อง โดยเฉพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่มี Ribavirin

ได้เพียงระยะเวลาหนึ่ง แล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร ที่มี DTU เพื่อให้ได้รับสารกำจัดไวรัส ได้เป็นเวลานานขึ้น ทั้งนี้การตอบสนองต่อสารกำจัดไวรัสทั้งด้านความสามารถในการทนต่อสารกำจัดไวรัส ความเป็นพิษและความสามารถในการกำจัดไวรัส ขึ้นกับความเข้มข้นของสารกำจัดไวรัส ชนิดของพืช ชนิดของเนื้อเยื่อนำมาเพาะเลี้ยงและชนิดหรือสายพันธุ์ (strain) ของไวรัสที่เข้าทำลายพืชนั้น (Toussaint *et. al.*, 1992) คล้ายกับที่รายงานใน *Den. Jacquelyn Thomas 'Uniwai Mist'* (Porter and Kuehne, 1997) และ *Den. Sonia 'BOM 17'* (ศิริพร, 2545)

การที่ PLBs ของ *Mkra.*, *Onc.*, และ *Den.* ที่ได้รับ Ribavirin แล้วตามด้วย DTU มีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งที่อัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเฉพาะในช่วงหลังของการทดลอง แต่หากพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (% CV) ที่มีค่าสูงแสดงให้เห็นว่าอัตราการรอดชีวิตมีความแปรปรวนสูง ซึ่งอาจเกิดจาก PLBs ที่นำมาใช้นั้น แต่ละชิ้นจึงมีความสม่ำเสมอทางสรีรวิทยาค่อนข้างต่ำ งานทดลองลักษณะนี้จึงควรต้องมีการเพิ่มจำนวนซ้ำที่ใช้ทดลองสูงขึ้น และอาจเพิ่มระยะเวลาในการให้สารกำจัดไวรัสให้นานยิ่งขึ้นด้วย

การที่พบว่า ในการทดลองที่ 3 ซึ่งนำเอา PLBs ของ *Mkra.* ไปทดลองให้สารกำจัดไวรัสอีกครั้งเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 นั้น กลับเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่มีสารกำจัดไวรัสได้ระยะเวลาสั้นกว่าเดิม อาจเป็นเพราะ PLBs ที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 มีความสมบูรณ์และแข็งแรงไม่เท่ากัน นอกจากนี้ PLBs ที่นำมาใช้ในการทดลองที่ 3 ซึ่งได้จาก PLBs ที่มีการ subculture ต่อมาจาก PLBs ที่เตรียมไว้ใช้ในการทดลองที่ 2 อีกหลายครั้งนั้น อาจเกิดการกลายพันธุ์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง (somaclonal variation) ขึ้น เนื่องการเลือกสุทธอาหารจากการทดลองที่ 2 เพื่อนำมาใช้ในการผลิตกล้วยไม้ให้ปราศจากไวรัสในการทดลองที่ 3 นั้น พิจารณาจากลักษณะอาการ phytotoxic ของ PLBs ของกล้วยไม้ที่แสดงออกในการตอบสนองต่อสารกำจัดไวรัสคือ PLBs มีสีเขียวซีดลงหรือสีเขียวอ่อนอมเหลืองและเป็นสีเหลืองมากขึ้นจนกระทั่งเป็นสีน้ำตาลและตายลง รวมถึงอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักสดของ PLBs ซึ่งอยู่ในช่วงแรกของการทดลอง การที่ช่วงเวลาในการบันทึกผลมีระยะเวลาสั้น จึงอาจทำให้สารกำจัดไวรัสแสดงอิทธิพลที่มีต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของ PLBs ได้ไม่ชัดเจน เมื่อทดลองให้สารซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีการเดียวกัน จึงอาจทำให้เพาะเลี้ยง PLBs ได้ในอาหารที่เดิมสารกำจัดไวรัสในระยะเวลาดังเดิม ดังนั้นหากมีการทดลองลักษณะเดียวกันในครั้งต่อไป ควรทำการทดลองให้สารกำจัดไวรัสเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นหรือจนกระทั่ง PLBs แสดงอาการ phytotoxic ที่ชัดเจนจนตาย เพื่อให้แสดงผลของสารกำจัดไวรัสได้ชัดเจน แล้วจึงเลือกอาหารสุทธนั้นมาใช้ในการผลิตกล้วยไม้ปราศจากไวรัส

การที่ไม่พบการสร้าง C_1 -PLBs จาก PLBs ของ *Mkra.* และ *Onc* ในระหว่างที่ได้รับสารกำจัดไวรัส แต่ *Den.* มี C_1 -PLBs เกิดขึ้นจาก PLBs ที่มีสีเขียวอ่อนก่อนข้างชิด แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ *Den.* Sonia 'Ear-sakul' มีความทนต่อสารกำจัดไวรัสดีกว่ากล้วยไม้อื่นอีก 2 พันธุ์

ในการผลิต C_1 -PLBs ของ *Onc.* ให้ปราศจาก *CymMV* ซึ่งเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่มี Ribavirin และ DTU แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติเพื่อให้สร้าง C_1 -PLBs เนื่องจาก PLBs แสดงอาการ phytotoxic ก่อนที่จะมีการสร้าง C_1 -PLBs แต่พบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ DTU เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการปราศจากไวรัสสูงที่สุดเมื่อตรวจด้วยวิธี DAS-ELISA และวิธี RT-PCR แสดงว่าการเกิด C_1 -PLBs ที่ปราศจากไวรัสนั้น ไม่จำเป็นต้องมีสารกำจัดไวรัสในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจเนื่องจาก PLBs มีการสะสมสารกำจัดไวรัสไว้มากเพียงพอหลังจากได้รับสารกำจัดไวรัสนานถึง 61 วัน

การใช้ Ribavirin ความเข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ หรือ 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.20, 0.15 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์เพื่อกำจัด *CymMV* ใน *Den.* หรือการไม่ใช้สารกำจัดไวรัสรวม 117-114 วันนั้น สามารถผลิต C_1 -PLBs ที่ปราศจาก *CymMV* ได้ทั้งหมดเมื่อทำการตรวจด้วยวิธี DAS-ELISA โดยใช้ IgG-*CymMV* specific (Hu *et. al.*, 1993; Porter and Kuehnle, 1997) และวิธี RT-PCR โดยใช้ *CymMV* specific primer (Srifah *et. al.*, 1996) อาจเนื่องจากการ subculture หรือตัดแบ่งเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหาร 12-13 ครั้ง โดยเนื้อเยื่อพืชเติบโตได้เร็วขึ้น ทำให้ไวรัสถูกกำจัดออกไปในลักษณะ serial dilution ได้ (Lee and Lucas, 2001) นอกจากนี้ PLBs ที่มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ยังทำให้สารอาหารในเซลล์ลดลง จน plasmodesmata พัฒนาได้ไม่สมบูรณ์ หรืออาจเพราะ PLBs ซึ่งมีลักษณะคล้าย somatic embryo ที่การพัฒนาระบบท่อลำเลียงยังไม่สมบูรณ์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (Parmessur and Saumtally, 2001) แต่พบว่า PLBs รุ่นใหม่ของ *Mkra.* และ *Onc.* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสารกำจัดไวรัส มีอัตราการปราศจากไวรัสต่างกันอาจเนื่องจากไวรัสที่เข้าทำลาย *Mok.*, *Onc.* และ *Den.* ต่างสายพันธุ์ (strain) กัน หรืออาจเนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตของ PLBs ของกล้วยไม้ทั้ง 3 พันธุ์แตกต่างกัน

สรุป

การเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้ในอาหารที่มี Ribavirin ก่อน แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเดิม DTU พบว่า สามารถเพาะเลี้ยง PLBs ของ *Mokara Chark Kuan (Mkra.)* ในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ อีก 20 วัน และอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ ร่วมกับ DTU เข้มข้น 0.15 และ 0.20 มิลลิโมลาร์ ได้อีก 30 วัน ตามลำดับ ขณะที่ PLB ของ *Oncidium Gower Ramsey (Onc.)* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.10 และ 0.15 มิลลิโมลาร์ อีก 40 วัน รองลงมาคือ อาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ อีก 40 วัน ส่วน PLBs ของ *Dendrobium Sonia 'Ear-sakul (Den.)* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15 และ 0.20 มิลลิโมลาร์ ได้อีก 50 และ 40 วัน ตามลำดับ และอาหารที่มี Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ ร่วมกับ DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ได้อีก 50 วัน ทั้งนี้ PLBs ของกล้วยไม้แต่ละชนิดมี อาการผิดปกติที่น้อยที่สุดด้วย

PLBs ไหมรุ่นที่ 1 (C₁-PLBs) และรุ่นที่ 2 (C₂-PLBs) ของ *Mkra* ปรากฏจาก *CymMV* สูงที่สุดคือร้อยละ 12.5 และ 50 ตามลำดับ เมื่อได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ ตามด้วย DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ นาน 20 วัน ส่วน PLBs ของ *Onc.* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมี Ribavirin เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันที่มี DTU เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ สร้าง C₁-PLBs ที่ปรากฏจาก *CymMV* สูงที่สุดถึงร้อยละ 83.87 สำหรับ PLBs ของกล้วยไม้ *Den.* ที่เพาะเลี้ยง ในอาหารเหลวสูตร VW ที่มี Ribavirin ตามด้วย DTU หรืออาหารเหลวที่ไม่ใช้สารกำจัดไวรัสอีกนาน 100 และ 110 วัน สร้าง C₁-PLBs ให้ปรากฏจาก *CymMV* ทั้งหมด เมื่อนำ C₁-PLBs ไปตรวจด้วยวิธี RT-PCR

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระทรวงพาณิชย์. 2549. การส่งออกสินค้าสำคัญของไทยปี 2545-2549 (มกราคม-กุมภาพันธ์).

2549. กระทรวงพาณิชย์. แหล่งที่มา: www.opss2.moc.go.th/marketinf/bb.xls, 14 เมษายน 2549.

กรมวิชาการเกษตร. 2549. ฐานความรู้ด้านพืช กรมวิชาการเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.dao.go.th/pl_data/ORCHID/1STAT/sto1.html, 14 เมษายน 2549.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2545. กล้วยไม้: สถานการณ์ทั่วไป. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่ง

ที่มา: <http://www.doae.go.th/plant/orchid.htm>, 15 มิถุนายน 2545.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2548. กล้วยไม้: สถานการณ์ทั่วไป. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่ง

ที่มา: <http://www.doae.go.th/plant/orchid.htm>, 18 ตุลาคม 2548.

กลอยใจ ตำเรีจวณิชย์. 2534. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Cymbidium Mosaic Virus* และการ

พัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กุดฉวี ลีลพนัง และ ชีระ สูตะบุตร. 2519. ความผันแปรของอาการหวายปอมปาดัวร์ที่เป็นโรค

ไวรัส. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 9: 603-607.

_____. 2520. การศึกษาขั้นต้นในการใช้ความร้อนแห้งในการกำจัดเชื้อ *Cymbidium mosaic*

virus ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 10: 301-303.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้, สำนักพิมพ์อัมรินทร์พรินติ้ง แอนด์ พับลิช

ซิ่ง, กรุงเทพฯ.

_____. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้, สำนักพิมพ์อัมรินทร์พรินติ้ง แอนด์ พับลิชซิ่ง,

กรุงเทพฯ.

- เฉลิมรัฐ ทองอุทัย. 2538. ผลของอุณหภูมิและสารเคมีบางชนิดต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของ **protocorm-like bodies** ของกล้วยไม้หวายพันธุ์ชอนยา 'BOM 17'. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ์า. 2528. การศึกษาการควบคุมเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ในหวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium Pompadour*) โดยใช้ความร้อนและสารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธีระ สุตะบุตร. 2538. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นฤ อารยะสกุล. 2544. การวินิจฉัยไวรัสในกลุ่ม **Potexvirus Potyviridae Tobamovirus และ Rhabdovirus** ในกล้วยไม้ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- _____. 2544. การวินิจฉัยไวรัสในกลุ่ม **Potexvirus Potyviridae Tobamovirus และ Rhabdovirus** ในกล้วยไม้ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. อ้างถึง Korpraditskul, P. 1979. Untersuchungen zur differenzierung von isolation des cymbidim mosaic virus mit serologischen, elektronenmikroskopischen and viologischen vertahren unter besonderer berucksichtigung des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Dissertatin zur Erlangung des Doktorgrades der Land wirtschaftlichen Fakultat der Georg-August, Universtat zur Gottingen.**
- _____. 2544. การวินิจฉัยไวรัสในกลุ่ม **Potexvirus Potyviridae Tobamovirus และ Rhabdovirus** ในกล้วยไม้ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. อ้างถึง Gibbs, A., A. Mackenzie, A. Blanchfield, P. Cross, C. Wilson, E. Kitajima, M. Nighgate, and M. Clement. 2000. Viruses of orchids in Australia: Their identification, biology and control. **The Australian Orchid Review.** June/July: 10-21.
- _____. 2544. การวินิจฉัยไวรัสในกลุ่ม **Potexvirus Potyviridae Tobamovirus และ Rhabdovirus** ในกล้วยไม้ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. อ้างถึง Lim,

S. T., Wong, S. M., Yeong, C. Y., Lee, S.C. and Goh, C. J. 1993. Rapid detection of *Cymbidium mosaic virus* by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Virological Methods.** 41 : 37-46.

นัญวรรณ รุ่งโรจน์. 2538. การโคลนยีน การศึกษาการจัดเรียงลำดับเบสและการตรวจสอบยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค *Cymbidium mosaic virus* และ *Odontoglossum ringspot virus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. พันธุศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประสาทร สมิตะมาน, ชาตรี สุทธิกุล, ดนัย บุญเกียรติ, นิตยา สุวรรณรัตน์, นุชนารถ จงเลข, พิภพ ลำบอง, ภมรทิพย์ อักษรทอง, และสมบัติ ศรีชวงค์. 2534. โรคพืชวิทยา. ภาควิชา โรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปราณี สมุทสินธ์. 2514. การศึกษาไวรัสในกล้วยไม้บางชนิดในสกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____ และ ชีระ สุตะบุตร. 2514. การทดสอบเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายที่เป็นโรคไวรัสใน ระยะเริ่มแรก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 4: 297-300.

ปิยมล มีสกุล. 2541. การเปรียบเทียบสูตรอาหารที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ *protocorm-like bodies* ของกล้วยไม้ประเภทแวนด้า. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2544. ผลกระทบของเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของกล้วยไม้หวาย Jac – Hawaii พันธุ์ Uniwai Pearl. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยมล มีสกุล. 2544. ผลกระทบของเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของกล้วยไม้หวาย Jac – Hawaii พันธุ์ Uniwai Pearl. ปัญหาพิเศษปริญญาโท,

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. อ้างถึง Tanaka, S., Ishii, H., Ito, S. and Kameya, I.M. 1997. Detection of *Cymbidium Mosaic Virus* and *Odontoglossum Ringspot Tobamovirus* from Thai Orchids by Rapid Immunofilter Paper Assay. **Plant Disease**. 81: 167-170.

ไพบูลย์ ไพรีพายฤทธิ. 2521. ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. อาหารการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุศาสตร์. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ .

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2530. การปลูกกล้วยไม้. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, กรุงเทพฯ.

รัชณี สงประยูร. 2545. บทปฏิบัติการเชรุ่มวิทยาทางด้านโรคพืช ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชรินทร์ ชูศิลป์. 2525. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพทางเชรุ่มวิทยาในการตรวจสอบ *Cymbidium mosaic virus* และ *Tobacco Mosaic Virus-Orchid strain* ของกล้วยไม้ชนิดต่างๆ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพร เชื้อจัน. 2545. การใช้สาร Ribavirin และ Dithiouracil ขจัดเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวายโชเนี่ย พันธุ์ BOM 17. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาวิตร โพธิ์แก้ว. 2516. การศึกษาโรคดอกต่างของกล้วยไม้ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส. ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรวิษ วรรณไกรโรจน์. 2538. การขจัดเชื้อไวรัสจากกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้สารเคมีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. สิ่งพิมพ์ มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สุรวิษ วรรณไกรโรจน์และ สุวรรณ กัดัดพันธุ์. 2544. การขจัดเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ในกล้วยไม้หวายโซเนีย ‘บอม 17’ ด้วยสารเคมีในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 32 (พิเศษ): 285-290.
- สุเทพ รักจิต. 2543. การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออุปทานและอุปสงค์การส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกของประเทศไทยไปญี่ปุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. ดอกกล้วยไม้สด: ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมศุลกากร. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/export/13010C.xls>, 20 เมษายน 2549.
- อบจันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- อำไพวรรณ ภราดรน์วัฒน์. 2540. 33-58 น. โรคของกล้วยไม้, ใน สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ, การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์. สำนักพิมพ์สุริวงษ์บุ๊คเซ็นเตอร์, เชียงใหม่.
- Abdulllah, G., G. Loebenstein, and B. Raccah. 1978. Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Virology*. 86 : 542-545.
- Albouy, J., F. Flousat, C. Kusiak, and M. Tronchet. 1988. Eradication of orchid viruses by chemotherapy from *in vitro* culture of *Cymbidium spp.* *Acta Horticulturae*. 234: 413 – 420.
- Allison, A. 2005. **Viruses and orchids**. Available source: http://www.nhorchids.org/pages_growing/viruses.htm, 29 August 2005
- Anonymous a. 2005. **Viral disease**. Available source: <http://www.geocity.com/RainForest/Vines/7040/article.html!Viral%20disease>, 22 August 2005.

- Anonymous b. 2005. **Orchid; virus**. Available source: <http://agrolink.moa.my/doa/bdc/pestorchids.html>, 25 August 2005.
- Aszod, L. J. 2005. **Orchid Viruses; Don't Catch That Bugs**. Available source: <http://www.rv-orchidworks.com/nletter/n080104/newsletter/article080104.html/>, 22 August 2005.
- Blom-Barnhoom, G. J., J. van Aartrijk. 1985. The regeneration of plants free of LSV and TBV from infected liliium bulb-scale explants in the presence of virazole. **Acta Horticulturae**. 164. Available source: <http://www.actahort.org/books/164/>, 28 September 2006.
- Bodnaruk, W. H., G. R. Hennen, F. W. Zettler, and T. J. Shechan. 1979. *Odontoglossum Ringspot Virus* in wild and cultivated orchids of the *Cattleya* alliance surveyed in Florida. **American Orchid Society Bulletin**. 48: 26 – 27.
- Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, and L. Watson. 1995. **Viruses of Plants: Descriptions and Lists From the VIDE Database**. CAB international, Wallingford.
- _____, K. Crabtree, M. J. Dalwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher. 1996. **Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Databases, Version; 20th August 1996**. Available source; <http://image.fs.unidaho.edu/vidе/famly094.htm>. ([http://biological.anu.edu.au/Groups/MEA/vidе/Dalwitz\(1980\)](http://biological.anu.edu.au/Groups/MEA/vidе/Dalwitz(1980))), 29 August 2005.
- Cassels, A. C. and R. D. Long. 1982. The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant culture of potato in the presence of virazole. *Potato Research*. 25: 165-173. *In* Hadidi, A., R. K. Khetarpal, H. Koganezawa. 1993. **Plant Viruses Control**. APS. Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine tree. **Plant Molecular and Biology Report**. 11: 113-116.

- Chia, T. F. and J. He. 1999. Photosynthetic capacity in *Oncidium* (Orchidaceae) plant virus eradication. **Environment and Experimental Botany**. 42: 11-16.
- Colombarini, A. 1990. Individuazione dei Virus PVS e PVM in Patata e Risanamento Mediante Coltiva di Meristem Chemio- e Termoterapia. Dr.degree Thesis, University of Bologna, Italy. 65 p. *In* Hadidi, A., R. K. Khetarpal, H. Koganezawa. 1993. **Plant Viruses Control**. APS. Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Crotty S., C. Cameron and R. Andino. 2002. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?. **Journal of Molecular Medicine**. 80: 86-95
- Dawson, W. O . 1984. Effect of animal antiviral chemicals on plant viruses. **Phytopathology**. 74: 221-223.
- Dawson, W. O., and C. Boyd. 1987. Modifications of nucleic acid precursors that inhibit plant virus multiplication. **Phytopathology**. 77: 477-480.
- Dawson, W. O. 1987. Modifications of nucleic acid precursors that inhibit plant virus multiplication. **Phytopathology**. 77: 477-480. *Cited* B. Commoner, and F. Mercer. 1951. Inhibition of the biosynthesis of tobacco mosaic virus by thiouracil. **Nature** (London). 168: 113-114.
- Derrick, R. S. 1976. Immuno-specific grids for electron microscopy of plant viruses. **Phytopathology**. 62: 753 (Abstr).
- De Bokx, J. A., P. G. M. Piron and E. Cother. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato viruses S and M in potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**. 6: 285-290.

- De la Rosa, J. S. 2001. Catching the invisible enemy with ELISA. Department of Agriculture Official Quarterly Publication of the Bureau of Agricultural Research. **BAR Digest** 3. Available source: www.bar.gov.ph, 22 March 2004.
- Dressler, R. L. 1993. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family**. Cambridge University. Cambridge.
- Faccioli, G., and F. Marani. 1998. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting, pp. 346-372. *In* Hadidi, A., R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa. 1998. **Plant Virus Disease Control**. The Amer. Phytopathol. Soc, St. Paul.
- Fletcher, P. J., J. D. Fletcher, and S. L. Lewthwaite. 1998. *In vitro* elimination of *onion yellow dwarf* and *shallot latent viruses* in shallots (*Allium cepa* var. *ascalonicum* L.). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. 26: 23-26.
- Franken, A. A. J. M., D. Z. Maat, and G. C. Kamminga. 1990. Detection of squash mosaic virus in seeds of melon (*Cucumis melo*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **European Journal of Plant Pathology**. 96: 91-102.
- Francki, R. I. B. 1984. Cymbidium mosaic potexvirus. **Plant Viruses Online; Descriptions and Lists from the VIDE Database**. Available source; <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr274.htm>. 29 August 2005.
- Freistadt, M. S., G. D. Meades, and C. E. Cameron. 2004. Lethal mutagens: broad-spectrum antiviral with limited potential for development of resistance. **Drug Resistance Update**. 7: 19-24.
- Greno, V., M. Cambra, L. Navarro and N. Duran-Vila. 1990. Effect of antiviral chemicals on the development and virus content of citrus buds cultures in vitro. **Scientia Horticulturae**. 45: 75-87.

- Hardman, J. G., L. E. Limberd, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, and A. G. Gilman. 1996. **Goodman and Gilman's; The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th Edition.** McGraw-Hill Companies, New York.
- Hewings, A. D., and C. J. D'Arcy. 1984. Maximizing the detection capability of a beet western yellow virus ELISA system. **Journal of Virological Methods.** 9: 131-142.
- Hawkes, A. D. 1989. **Encyclopedia of Cultivated Orchids.** Butler & Tanner Ltd, London.
- Helliot, B., B. Panis, Y. Poumay, R. Swenner, P. Lepoivre, and E. Froson. 2002. Cryopreservation for the elimination of *cucumber mosaic virus* and *banana streak viruses* from banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Report.** 20: 1117-1122.
- Hollings, M. and O. M. Stone. 1967. **Orchid Viruses.** Rept. of the Glasshouse Crops. Res. Inst. Rustington.
- Hu, J. S., S.Ferreira, M. Wang, and M. Q. Xu. 1993. Detection of *cymbidium mosaic virus*, *odontoglossum ringspot virus*, *tomato spotted wilt virus* and *potyviruses* infecting orchids in Hawaii. **Plant Disease.** 77: 464-468.
- Hu, J. S. and S.Ferreira. 1994. Orchid viruses. **American Orchid Society Bulletin.** 63: 896 – 898.
- Ishii, M. 1974. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture. **Acta Horticulturae.** 36: 229 –293 .
- Jansen, D. D. 1951. Mosaic on black streak disease of *Cymbidium* orchids. **Phytopathology.** 41: 410 – 414.

- James, D. 2001. Long term assessment of the effect of *in vitro* chemotherapy as a tool for apple stem grooving virus elimination. **Acta Horticulturae**. 550: 459-462.
- Lee, J. Y., and W. J. Lucas. 2001. Phosphorylation of viral movement proteins-regulation of cell-to-cell trafficking. **Trends Microbiology**. 9: 5-8.
- Loi, J. S., S. M. Lee, L. T. Lam-Chan, S. Fan, and W. H. Yiang. 1991. Eradication of orchid viruses in *Dendrobium Sonia* using virazole. **Singapore Journal of Primary Industries**. 19: 16-22.
- Manganaris, G. A., A. S. Economou, I. N. Bouabourakas, and N. I. Katis. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. **Plant Cell Report**. 22: 195-200.
- Matthews, R. E. F., and J. D. Smith. 1955. Chemotherapy of viruses. **Advance in Virus Research**. 3: 51-52.
- Mekuria, G., S. A. Ramesh, E. Alberts, T. Bertozzi, M. Wirthensohn, G. Collins, and M. Sedgley. 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). **Journal of Virological Methods**. 114: 65-69.
- Miline, R. G. and E. Luisoni. 1977. Rapid immune electronmicroscopy of viruses preparation, pp. 265-281. In Maramorosch, K., and H. Koprowki (eds.). **Method of Virology**. Acedemic Press, New York.
- Miline, R. G. and D. E. Lesemann. 1978. An immunoelectron microscopic investigation of oat sterile dwarf and related viruses. **Virology**. 90: 299-304.

- Mink, G. I., R. Wample, and W. E. Howell. 1998. Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses, and viroids while maintaining plant survival, pp. 332-343. *In* Hadidi, A., R. K. Khetarpal, H. Koganezawa. 1998. **Plant Virus Disease Control**. The Amer. Phytopath. Soc. St. Paul, Minnesota.
- Morel, G. M. 1960. Producing virus – free Cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**. 29: 495 –497.
- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J. P., Candresse, T., Poupet, A. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay testing of shoots grown *in vitro* and the use of immunocapture-reverse transcription polymerase chain reaction improve the detection of Prunus necrotic ring spot virus in rose. **Phytopathology**. 90: 522-528.
- Mullin, R. H., S. H. Smith, N. W. Frazier, D. E. Schlegel, and S. R. Mc Call. 1974. Meristem culture frees strawberries of mild yellow edge, pallidosis and mottle diseases. **Phytopathology**. 64: 1425-1429.
- Njukeng, A. P., G. I. Atiri, and J. d' A. Hughes. 2005. Comparison of TAS- ELISA, dot and tissue blot, ISEM and immunocapture RT-PCR assays for the detection of *Yam mosaic virus* in yam tissues. **Crop Protection**. 24: 513-519.
- Nascimento, L. C., G. L. Pio-Ribeiro, and G. P. Andrade. 2003. Stock indexing and potato virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. **Scientia Agricola**. 60: 525-530.
- O'Grady, F., R. G. Finch, H. P. Lambert and D. Greenwood. 1997, **Antibiotic and Chemotherapy; Anti-infective Agents and their Use in Therapy 7th Edition**. Pearson Professional Limited, New York.
- Parmessur, Y., and A. Saumtally. 2001. **Elimination of sugarcane yellow leaf virus and sugarcane bacilliform virus by tissue culture**. Mauritius Sugar Industry Research

Institute. Available source; <http://www.gov.mu/portal/sitis/ncb/moa/farc/amasd2001/html/s4/s2.htm>, 25 June 2006.

- Porter, K. and A. R. Kuehnle. 1997. Using dithiouracil and ribavirin to eliminate *cymbidium mosaic virus* during micropropagation of 'Uniwai Mist' Dendrobium orchid. **Hort Technology**. 7:161-164.
- Rittershausen, W., and B. Rittershausen. 1999. **The Royal Horticultural Society; Orchids: A Practical Guide to the World's Most Fascinating Plants**. Quadrille Publishing Limited, London.
- Scullym, R.M. 1967. Aspect of meristem culture in *Cattleya* alliance. **American Orchid Society Bulletin**. 36:103-108.
- Sim, L. S., J. Goodchild, D. M. Meredith, R. A. Potter, R. H. Raper, J. Viney, and H. J. Wadsworth. 1983. Possible molecular basis for antiviral activity of certain 5-substituted deoxyuridines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 23: 416-421.
- Sobczykiewicz, D. 1979. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free strawberry plants. **Acta Horticulturae**. 95: 79-82.
- Soon, T. E. 1995. **Orchids of Asia**. Time Books International, Singapore.
- Srifah, P., S. Labprasert, and N. Rungroj. 1996. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction for cloning of coat protein-encoding genes of *cymbidium mosaic virus*. **Gene**. 179: 105-107.
- Stevens, M., R. Hull, and H. G. Smith. 1997. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of beet yellow closterovirus in plants and apids. **Journal of Virological Methods**. 68: 9-16.

- Street, H.E. 1969. Growth in organized and unorganized systems. pp. 3-224. **Knowledge Gained by Culture of Organs and Tissue Explants.** In F.C. Steward (ed.), *Plant physiology: A treatise.* Academic Press, New York.
- Torrance, L. 1987. Use of enzyme amplification in an ELISA to increase sensitivity of detection of Barley yellow dwarf virus in oats and in individual vector aphids. **Journal of Virological Methods.** 15: 131-138.
- Toussaint, A., J. T. Kummer, C. Maroquin, A. Lebrun, and J. Roggemans. 1993. Use of VIRAZOLE[®] to eradicate *Odontoglossum Ringspot Virus* from *in vitro* culture of *Cymbidium Sw.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 32: 303 –309.
- Vasil, I. K., and T. A. Thorpe. 1994. **Plant Cell and Tissue Culture.** Kluwer academic Pub. Dordrecht.
- Verbeek, M., P. van Dijk and P. M. A. van Well. 1995. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. **European Journal of Plant Pathology.** 101: 231-239.
- Verma, N., R. Ram, and A. A. Zaidi. 2005. In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus free begonias through chemo- and thermotherapy. **Scientia Horticulturae.** 103: 239-247.
- Wang, Q. C., M. Mawassi, P. Li, R. Gathy, I. Sela, and E. Tanne. 2003. Eliminateion of *Grapevine virus A* (GVA) by cryopreservation of *in vitro* –grown shoot tip of *Vitis vinifera* L. **Plant Science.** 165: 321-327.
- Wang, Z. H., S. G., Fang, Z. Y., Zhang, C. G., Han, D. W. Li, and J. L. Yu. 2006. Development of an ID-ELISA for the detection of *Rice black-streaked dwarf virus* in plants. **Journal of Virological Methods.** 134: 61-65.

- Wang, H., F. Meng, W. Xu, and C. Lui. 2005. The effect of incorporating 2,4-dithiouracil into uracil tetrad: a theoretical study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM.** 716: 137-141.
- Wimber, D. D. 1963. Clonal multiplication of cymbidium through tissue culture of the shoot meristem. **American Orchid Society Bulletin.** 32: 105-107.
- Wimber, D. D. 1965. Additional observation on clonal multiplication of *Cymbidium* through culture of shoot meristem. **Cymbidium Society News.** 20: 7-10.
- Wisler, G. C., F. W. Settler, and D. E. Purcifull. 1982. A serodiagnostic technique for detecting *cymbidium mosaic* and *odontoglossum ringspot* viruses. **Phytopathology.** 72: 835-837.
- Wong, S. M., F. Soo, C. G. Cha, and G. Limm. 1989. *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in commercial orchids in Singapore, (Abst.). **Phytopathology.** 79: 1149 –1150.
- Wu, R. Y., and H. J. Su. 2004. **Regeneration of healthy banana plantlets from *Banana bunchy top virus* – infected tissues cultured at high temperature.** Department of Plant Pathology and Entomology. National Taiwan University. Taiwan. Available source: <http://www.fftc.aqnet.org/library/article/tb163b.html>. 25 April 2006.
- Yam, T. W. and Thame, A. 1999. Magnificent Mokaras; Looking at the past, present and future of these Old World beauties. **Orchids:** 588-593.
- Zettler, F. W., N. J. Ko, G. C. Wisler, M. S. Elliott, and S. M. Wong. 1990. Viruses of orchids and their control. **Plant Disease.** 74: 621 – 626.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

อาหารสูตร Vacin & Went (VW) ดัดแปลง		อาหารสูตร WS (Wannakrairoj, 1992)	
มหธาตุ (10 เท่า)	กรัม/ลิตร	มหธาตุ (10 เท่า)	กรัม/ลิตร
KNO ₃	5.25	KNO ₃	5.25
KH ₂ PO ₄	2.50	KH ₂ PO ₄	2.50
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.50	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.50
จุลธาตุ (10 เท่า)		จุลธาตุ (100 เท่า)	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.057	H ₃ BO ₃	0.62
		MnSO ₄ ·H ₂ O	2.23
		ZnSO ₄ ·H ₂ O	0.86
		KI	0.083
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0025
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025
ธาตุเหล็ก (100 เท่า)		ธาตุเหล็ก (100 เท่า)	
Na ₂ -EDTA	3.725	Na ₂ -EDTA	3.725
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.785	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.785
- Ca ₃ (PO ₄) ₂ 0.2 กรัม/ลิตรละลายด้วย ค้ำวย HNO ₃ เข้มข้น 1 N จนใส		- Ca ₃ (PO ₄) ₂ 0.2 กรัม/ลิตร ละลายด้วย HNO ₃ เข้มข้น 1 N จนใส	
-เติม น้ำมะพร้าว 15 %		-เติม น้ำมะพร้าว 15 %	
-ปรับ pH 4.8-5.0		-ปรับ pH 5.5-5.8	

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของ ELISA buffer (ดัดแปลงจาก Hu *et. al.*, 1993, Porter and Kuehnle, 1997)

1. Phosphate-buffered saline (PBS buffer)	กรัม / ลิตร
Sodium phosphate	2.9
Sodium chloride	8.0
Potassium phosphate	0.3
Potassium chloride	0.2
2. Coating buffer	กรัม / ลิตร
Na ₂ CO ₃	1.59
NaHCO ₃	2.93
pH 9.6	
3. Phosphate buffered saline-tween (PBS-T)	กรัม / ลิตร
Sodium phosphate	2.9
Sodium chloride	8.0
Potassium phosphate	0.3
Potassium chloride	0.2
Tween 20	5 มิลลิลิตร
4. Conjugated buffer	
PBS-T	
skimmed milk	1 %
polyvinyl pyrrolidone ; molecular weight = 40,000	2 %
5. Substrate buffer	ปริมาตร 1 ลิตร
Diethanolamime	97 มิลลิลิตร
pH 9.8	

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ) องค์ประกอบของ ELISA buffer (ดัดแปลงจาก Hu *et. al.*, 1993, Porter and Kuehnle, 1997)

6. Substrate solution	
p-nitrophenylphosphate	5 มิลลิกรัม
substrate buffer	10 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ 3 องค์ประกอบของ RNA Extraction Buffer (Chang *et. al.*, 1993)

1. CTAB Buffer 2 % CTAB 2 % (stock CTAB 10 % ใน NaCl 0.7 M) ^{1/} Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์, pH 8.0 (stock Tris-HCl 2 M, pH 8.0) ^{1/} NaCl 1.4 มิลลิโมลาร์ (stock NaCl 5 M) ^{1/} EDTA 20 มิลลิโมลาร์ (stock EDTA 0.5 mM) ^{1/} Na ₂ SO ₃ 0.2 % PVP40 1 % ปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตร ด้วย DEPC-dH ₂ O	4 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร 5.04 มิลลิลิตร 0.8 มิลลิลิตร 0.04 กรัม 0.20 กรัม
2. CTAB 10 % ใน NaCl 0.7 M CTAB 1 M Tris-HCl EDTA NaCl ปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตรด้วย dH ₂ O, Autoclave	20 กรัม (10 %) ^{2/} 20 มิลลิลิตร (100 มิลลิโมลาร์) ^{2/} 1.47 กรัม (20 มิลลิโมลาร์) ^{2/} 8.18 กรัม (0.7 โมลาร์) ^{2/}
3. 1 x TE buffer + SDS 1 % SDS 10% 600 ไมโครลิตร + TE buffer 600 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 6 มิลลิลิตร ด้วย DEPC-dH ₂ O	
4. Chloroform : Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 :1 Chloroform Isoamyl alcohol	ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 182 มิลลิลิตร 8 มิลลิลิตร

^{1/} ความเข้มข้นของสารเคมีที่อยู่ในวงเล็บ () คือความเข้มข้นของสารละลายเข้มข้นที่เตรียมเป็น stock ของสารละลาย

^{2/} ความเข้มข้นของสารเคมีซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารละลายเข้มข้นที่เตรียมเพื่อใช้เป็น stock ของสารละลาย