วิธีเคมีบำบัดเพื่อการกำจัด *Cymbidium Mosaic Virus* (*CymMV*) ในกล้วยไม้พันธุ์การค้าบางพันธุ์

Chemotherapy for *Cymbidium Mosaic Virus* (*CymMV*) Elimination in Some Commercial Orchids

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญและเป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทยซึ่งกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548; กรมวิชาการเกษตร, 2549) โดยการส่งออกดอกกล้วยไม้ผ่านด่านตรวจพืช ไปยังประเทศต่างๆ ในปี พ.ศ. 2547 และพ.ศ. 2548 นั้น มีปริมาณ 18,627 และ 21,207 ตัน ตามลำดับ ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกยังสูง ถึง 2,136.06 ล้านบาทและ 2,538.05 ล้านบาท ตามลำดับ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) และยังมีการส่งออกต้นกล้วยไม้ถึง 26.38 ล้านต้น และ 29.98 ล้านต้น มีมูลค่าถึง 344.6 และ 445.4 ล้านบาท ตามลำดับ (กระทรวงพานิชย์, 2549) ซึ่งตลาดส่งออกนั้นมีมูลค่าสูงเกินกว่าร้อยละ 50 ของผลผลิตรวมทั้งประเทศ (สุเทพ, 2543) อย่างไรก็ตาม ในการผลิตกล้วยไม้พบว่ามีปัญหาหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคอันเนื่องจากเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายในกระบวนการผลิต ซึ่งอาจทำให้การเจริญเติบโตลดลงได้ถึงร้อยละ 19 และผลผลิตลดลงถึงร้อยละ 10 ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจกว่าปีละ 100 ล้านบาท (ปิยมล, 2544; ศิริพร, 2545) นอกจากนี้ปัญหาเรื่องโรคไวรัสยังถูกใช้เป็นข้ออ้างด้านสุขอนามัยพืชที่ประเทศคู่ค้าบางประเทศยังได้ยกเป็นข้อกีดกันทางการค้าด้วย (สุรวิช, 2538) ไวรัสสาเหตุโรคกล้วยไม้มีหลายชนิด (De la Rosa, 2001) แต่ที่พบว่ามีการเข้าทำลายและสร้างความเสียหายทั้งยังส่งผลกระทบต่อการปลูกเลี้ยงและการค้ามากที่สุดคือ *Cymbidium Mosaic Virus* (Zettler *et. al.*, 1990)

ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสม ในการผลิตต้นกล้วยไม้พันธุ์การค้าสกุลต่างๆ ให้ปราศจากเชื้อไวรัส เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่และขจัดปัญหาข้อกีดกันทางการค้า

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของสารกำจัดไวรัส (virucide) 2 ชนิด คือ Ribavirin และ Dithiouracil ต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของ Protocorm-like bodies ของกล้วยไม้ตัดดอกพันธุ์การค้าของไทยสกุล *Oncidium*, *Mokara* และ *Dendrobium*

2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตต้นกล้วยไม้ทั้ง 3 สกุลให้ปลอดเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ด้วยวิธีเคมีบำบัด

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์ Orchidaceae สามารถพบได้ทั่วโลก ยกเว้นเขตอาร์กติก แอนตาร์กติกและทะเลทราย (Bodnaruk *et. al.*, 1979) ลักษณะเด่นของพืชวงศ์นี้ อยู่ที่ก้านชูเกสรเพศผู้และก้านชูเกสรเพศเมียที่เชื่อมกัน มีลักษณะเป็นรูปแท่ง เรียก เส้าเกสร (column) อยู่ตรงกลางดอกและมีเกสรเพศผู้หรือเรณูมีลักษณะเป็นก้อนเรียกว่า pollinium มีฝาปิดเรียก operculum กล้วยไม้มีการเจริญทางลำต้น 2 แบบคือการเจริญเติบโตแบบฐานเดี่ยว (monopodium) คือ ตาที่ยอดจะแตกใบใหม่เจริญขึ้นไปเรื่อยๆ ไม่ค่อยแตกกิ่งข้าง และออกรากจากส่วนโคนไล่ตามยอดขึ้นไป มีข้อและปล้องที่ชัดเจน ใบติดอยู่ที่บริเวณข้อ ซอกใบมีตาข้างซึ่งเป็นตารวมสามารถเจริญไปเป็นช่อดอกหรือหน่ออ่อนก็ได้ กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตแบบนี้ได้แก่ สกุลกุหลาบ (*Aerides*) สกุลเข็ม (*Ascocentrum*) สกุลฟาแลนนอปซีส (*Phalaenopsi*s) สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) และสกุลแวนดา (*Vand*a) เป็นต้น (ไพบูลย์, 2521; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545) ส่วนพวกที่มีการเจริญเติบโตแบบฐานร่วม (sympodium) จะมีลำต้นจริงทอดยาวไปบนเครื่องปลูก เรียกว่า เหง้า (rhizome) มีตาข้างที่เจริญขึ้นมาเป็นลำต้นเทียมที่มีลักษณะโป่งพอง อวบน้ำ เรียกว่า ลำลูกกล้วย (pseudobulb) มีข้อ ปล้องและใบ ทำหน้าที่สะสมอาหารและน้ำ เช่น สกุลคัทลียา (*Cattleya*) สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium*) หวาย (*Dendrobium*), สกุลออนซิเดียม (*Oncidium*) สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) และสกุลเอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis*) เป็นต้น (ไพบูลย์, 2521; อบฉันท์, 2543)

กล้วยไม้ตัดดอกส่งออกของไทยมีหลายสกุลและหลายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะสำคัญของกล้วยไม้ตัดดอกบางสกุล ดังนี้

1.1 สกุลหวาย *(Dendrobium, Den.*)

กล้วยไม้สกุลหวายจัดอยู่ใน Tribe *Dendrobiea*e, subtribe *Dendrobiinae* แบ่งออกเป็น 20 หมวด (section) มีการเจริญเติบโตแบบฐานร่วม **ลำต้น** ส่วนใหญ่มีลำต้นเทียมลักษณะเป็นลำยาว

อวบน้ำ เรียก ลำลูกกล้วย **ใบ** เป็นแผ่นแบนรูปขอบขนานหรือรูปไข่ บางชนิดเรียวยาวคล้ายใบหญ้า **ดอก** มีกลีบชั้นนอกมีขนาดยาวใกล้เคียงกันทั้งกลีบเลี้ยงและกลีบดอก กลีบปากมีขนาดปลายกลีบใหญ่ โคนสอบ กลีบนอกคู่ล่างจะเชื่อมติดกับฐานที่ยื่นยาวออกไปของเส้าเกสร บริเวณรอยต่อเรียกว่า เดือยดอกหรือ คาง (mentum) มีเกสรเพศผู้ หรือ เรณู 4 ก้อนไม่มีก้านหรือเยื่อบางๆเชื่อมระหว่างคู่ ฝาปิดค่อนข้างหลุดร่วงง่าย ติดอยู่ที่ปลายเส้าเกสร เกสรเพศเมีย (stigma) เป็นแอ่งน้ำเหนียว กล้วยไม้สกุลนี้มีการแข็งตัวอย่างรวดเร็วมากของน้ำเหนียวที่จะงอยปาก (rostellar glue) ซึ่งช่วยในการเกาะของก้อนเกสรเพศผู้ (pollinium) (Dressler, 1993) ดอกออกเป็นช่อบริเวณส่วนปลายหรือใกล้ๆปลายลำลูกกล้วยและออกดอกได้ทั้งลำที่มีใบติดอยู่และลำที่ใบร่วงหมดแล้ว มีการกระจายพันธุ์ในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก (ไพบูลย์, 2521; อบฉันท์, 2543; Soon, 1995) พันธุ์ลูกผสมที่นิยมปลูกเพื่อตัดดอกเป็นการค้า ได้แก่ หวายโซเนียพันธุ์เอียสกุล (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545)

1.2 สกุลออนซิเดียม (*Oncidium, Onc.*)

กล้วยไม้สกุลออนซิเดียมจัดอยู่ใน Tribe *Odontogossum*, subtribe *Oncidiinae* มีการเจริญแบบฐานร่วม **ลำต้น** มีรูปทรง 2 แบบ คือ แบบที่มีลำลูกกล้วยชัดเจนและแบบที่มีลำลูกกล้วยขนาดเล็กสั้นซึ่งมีใบขนาดใหญ่ติดอยู่ **ใบ** เป็นใบเดี่ยว มีทั้งชนิดใบบาง ใบหนาและใบกลม **ดอก** มีกลีบดอกลักษณะคล้ายกับกลีบเลี้ยง แต่มีขนาดใหญ่กว่า กลีบเลี้ยงด้านข้างไม่ติดหรือติดกันบางส่วนอยู่ด้านหลังกลีบปาก ปลายกลีบปาก (labellum หรือ lip) มักมีขนาดใหญ่แผ่กว้าง มีตุ่มไฝที่โคนปาก ส่วนใหญ่เป็นสีเหลืองหรือพื้นสีเหลืองมีลายสีน้ำตาล เส้าเกสรมีปีกยื่นออกไปทั้ง 2 ข้าง ดอกออกเป็นช่อตั้งแบบช่อกระจะ (raceme) หรือช่อแบบแยกแขนง (panicle) มักมีช่อย่อยๆหลายช่ออยู่บนก้านช่อใหญ่ช่อเดียวกัน พันธุ์ลูกผสมที่มีการนิยมปลูกเป็นการค้าเช่น Goldiana และ Gower Ramsey เป็นต้น (ไพบูลย์, 2521; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545; Soon,1995, Rittershausen and Rittershausen,1999)

1.3 สกุลม็อคคารา (*Mokara, Mkra.*)

กล้วยไม้สกุลม็อคคาราเกิดจากการผสมข้ามสกุลระหว่าง 3 สกุล คือ *Arachnis, Ascocentrum* และ *Vanda* มีการเจริญเติบโตแบบฐานเดี่ยว **ลำต้น** เป็นลำตั้งตรงขึ้นไป มีรากออกตามข้อบริเวณซอกใบ **ใบ** เรียวยาวเป็นรูปขอบขนาน ลักษณะแบนหนา มีร่องตรงกลางแต่ไม่ลึก

คล้ายกับใบของแวนดาประเภทใบแบน **ดอก** รูปร่างคล้ายแมงป่อง (“scorpion” form) คือกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีลักษณะคล้ายกันโดยกลีบเลี้ยงคู่ล่างโค้งเข้าหากัน กลีบปากมีขนาดเล็กอยู่ติดกับฐานของเส้าเกสร ช่อดอกส่วนใหญ่เป็นแบบช่อกระจะ (raceme) บางชนิดเป็นช่อแบบแยกแขนง (panicle) สีกลีบดอกส่วนมากมีสีเหลือง น้ำตาล ม่วง หรือชมพูม่วง และมีลายประหรือลายจุด (ไพบูลย์, 2521; Hawkes, 1989; Yam and Thame, 1999) พันธุ์ลูกผสมที่ส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้า ได้แก่ Chark Kuan, พรรณี และ วอลเตอร์ โอมาย เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2545)

2. <u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้</u>

การขยายพันธุ์กล้วยไม้แบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก คือ แบบอาศัยเพศ (sex propagation) โดยการผสมเกสร (pollination) ให้เกิดการพัฒนาของรังไข่จนกลายเป็นฝัก (pod) จึงนำเอาเมล็ดภายในไปเพาะเป็นต้นกล้วยไม้ และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual propagation) ได้แก่ การตัดแยกลำหน้า การตัดแยกลำหลัง และการปักชำลำแก่ ซึ่งสามารถทำได้กับกล้วยไม้ประเภทแตกกอ การตัดยอด และการตัดตะเกียงหรือแขนงซึ่งสามารถทำได้ในกล้วยไม้ประเภทลำเดี่ยว และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้ได้ทุกประเภท (มาลินี, 2530; ครรชิต, 2547) วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่นิยมอย่างมากที่สุดในเชิงการค้าเนื่องจากสามารถผลิตต้นพืชได้ปริมาณมากตามที่ต้องการในระยะเวลาอันสั้น ต้นพืชที่ได้มีความสมบูรณ์ แข็งแรงและมีขนาดที่สม่ำเสมอ แต่ก็มีข้อเสียในบางครั้งคือ การทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคที่ติดต่อโดยวิธีสัมผัส เช่น ไฟโตพลาสมา แบคทีเรียและไวรัส ซึ่งเชื้อสาเหตุสามารถอาศัยอยู่ในพืชโดยไม่แสดงอาการของโรค ขณะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ต้นใหม่ที่ได้มีเชื้อโรคติดไป (ปราณีและธีระ, 2514; ไพบูลย์, 2521; นัญวรรณ, 2538; Brunt *et. al*., 1995)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้นั้นเริ่มจากการที่ Knudson (1925) ได้ทดลองเพาะเอ็มบริโอกล้วยไม้ในอาหารวิทยาศาสตร์ได้ประสบความสำเร็จและได้พัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะต่อการเจริญของต้นอ่อนและให้ชื่อว่า Knudson C (Vasil and Thorpe, 1994) ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายโคลนนั้น Morel (1960) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ในอาหารสูตร Knudson C ได้เป็นเนื้อเยื่อสีเขียวขนาดเล็กที่เดิมเรียกว่า “bulblet” แต่ต่อมาเรียกว่า “Protocorm – like bodies” (PLBs) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ต้นกล้วยไม้จำนวนมาก หลังจากนั้น Wimber (1963) ได้ทดลองเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ PLBs ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง โดยต้องเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อทำลาย

polarity ของเนื้อเยื่อ ยับยั้งไม่ให้เกิดต้นหรือราก และเพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศ (Wimber, 1965; Scullym,1967; Street, 1969)

3. <u>โรคเนื่องจากเชื้อไวรัสของกล้วยไม้</u>

โรคอันเนื่องจากเชื้อไวรัสในกล้วยไม้มีสาเหตุจากไวรัสกว่า 40 ชนิด ก่อให้เกิดอาการสีดอกผิดปกติ จุดเนื้อเยื่อตายตามแนวท่อลำเลียง ใบด่างแบบโมเสกเป็นสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม ใบเหลืองและมีจุดเนื้อเยื่อตายสีน้ำตาลตามแนวเส้นใบ จุดด่างวงแหวนรูปต่างๆ และจุดเนื้อเยื่อตายหรือยุบแบบต่างๆ ซึ่งเชื้อไวรัสเหล่านี้สามารถถ่ายทอดจากต้นที่เป็นโรคไปสู่ต้นปกติได้โดยวิธีกล เช่นติดไปกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่สัมผัสกับน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรค โดยอาจเป็นมีด กรรไกรตัดแต่งกิ่ง หลักค้ำยันต้นพืช ลวดสำหรับผูกยึดโต๊ะปลูก แม้กระทั่งกระถางที่นำมาใช้ซ้ำโดยไม่ผ่านการทำความสะอาด การเสียดสีกันของต้นหรือใบตลอดจนการสัมผัสของราก หรือแม้กระทั่งการใช้มือจับบุหรี่ก่อนที่จะไปสัมผัสกับต้นกล้วยไม้ นอกจากนั้นไวรัสบางชนิด ยังถ่ายทอดโดยแมลงจำพวกปากกัด และปากดูด เช่น ตั๊กแตน หรือ เพลี้ย ได้อีกด้วย (Allison, 2005; Aszod, 2005) ต้นกล้วยไม้ที่ติดเชื้อไวรัสหรือเป็นโรคเนื่องจากเชื้อไวรัส ไม่สามารถรักษาได้ ต้องกำจัดทิ้งออกจากแปลงปลูก เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อแพร่ระบาดไปยังต้นปกติต้นอื่นๆได้ (Anonymous a, 2005; Aszod, 2005) การที่เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายอยู่ได้จนถึงปัจจุบัน เนื่องจากการไม่รักษาความสะอาดเครื่องมือที่ใช้ในการตัดแต่งต้นพืชและพื้นที่ปฏิบัติงาน โรงเรือน รวมไปถึงมือของผู้ปฏิบัติเอง นอกจากนี้กรณีของ *Bean yellow mosaic virus* (*BYMV*) ยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางเพลี้ยอ่อน หรือผ่านทางเมล็ดได้ อนึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นแม่พันธุ์ที่มีเชื้อไวรัสก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดของเชื้อ (Allison, 2005; Aszod, 2005) สำหรับเชื้อไวรัสที่พบว่ามีการเข้าทำลายกล้วยไม้เป็นส่วนใหญ่มี 3 ชนิด คือ *Cymbidium mosaic virus* (*CymMV*), *Odontoglossum ringspot virus* (*ORSV*) หรือ *Tobacco mosaic virus – orchid strain* (*TMV-O*) และ *Orchid fleck virus* (*OFV*) โดยสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับอุตสาหกรรมกล้วยไม้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ซึ่งเชื้อ *CymMV* และ *ORSV* สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกลและอาจมีแมลงเป็นพาหะได้ (นฎา, 2544; Allison, 2005) อีกทั้งยังเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยอยู่มากมายหลายชนิด ทั้งในวงศ์กล้วยไม้เอง เช่น สกุล *Cattleya* สกุล *Cymbidium* สกุล *Epidendrum* สกุล *Laelia* สกุล *Laeliocattleya* สกุล *Oncidium* สกุล *Phalaenopsis* สกุล *Vanda* สกุล*Vanilla* และ สกุล *Zygopetalum* (Brunt *et. al*., 1996) และในวงศ์อื่นๆ เช่น วงศ์ถั่ว (Leguminosae) วงศ์มะเขือ (Solanaceae) วงศ์คีโนโปเดียม (Chenopodiaceae) (ประสาทพรและคณะ, 2534)

กล้วยไม้ออนซิเดียมที่ถูกเชื้อ *CymMV* หรือ *ORSV* เข้าทำลายอาจแสดงอาการ หรือไม่แสดงอาการของโรคขึ้นกับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง และความสมบูรณ์ของธาตุอาหารที่ได้รับ แต่อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้สกุลออนซิเดียมที่ปราศจาก *CymMV* หรือ *ORSV* มีการเจริญด้านความสูงเพิ่มขึ้นร้อยละ 17 และมีขนาดของช่อดอกที่เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 65 และมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงที่เพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 21 เมื่อเทียบกับต้นที่ถูกไวรัสทั้งสองชนิดเข้าทำลาย (Chia and He, 1999)

Cymbidium mosaic virus (*CymMV*)

เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายสร้างและความเสียหายซึ่งมีผลกระทบต่อการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้มากที่สุด คือ *CymMV* (Zettler, 1990) ซึ่งแพร่ระบาดและทำความเสียหายอยู่ทั่วไปทั้งในสหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส อังกฤษ และประเทศต่างๆที่มีการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ ซึ่งกล้วยไม้พันธุ์การค้าที่ปลูกในแถบอเมริกาเหนือก็ได้รับความเสียหายจากเชื้อนี้ถึงประมาณร้อยละ 15-70 (Jansen, 1951) *CymMV* จัดอยู่ในสกุล *Potexvirus* วงศ์ POTYVIRIDAE มีชื่อเรียกพ้องเช่น *Orchid mosaic virus* ไวรัสนี้มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว รูปร่างเป็นท่อนยาวคด ขนาด 480x13 นาโนเมตร มีการถ่ายทอดด้วยวิธีกล (Brunt *et. al*., 1995) เช่น ติดไปกับเครื่องมือ หรืออุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแต่ง เช่น มีดกรรไกร เป็นต้น การสัมผัสกันระหว่างพืช ก็ทำให้สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ อีกวิธีการหนึ่งที่ทำให้เชื้อมีการถ่ายทอดจนถึงระดับแพร่ระบาดคือ ติดไปกับหน่อที่ใช้ในการขยายพันธุ์ซึ่งมีเชื้ออยู่และใช้วิธีขยายพันธุ์โดยการตัดแยกหรือกระทั่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (สุพัฒน์, 2534; อำไพวรรณ, 2540) เชื้อไวรัสนี้ตรวจพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1943 ซึ่งสร้างความเสียหายให้แก่กล้วยไม้สกุล *Cymbidium* อย่างมาก (ธีระ, 2538) การศึกษาและสำรวจเกี่ยวกับการเข้าทำลาย อาการและความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *CymMV* อย่างต่อเนื่องในต่างประเทศนั้น เช่นในปี ค.ศ.1989 Wong และคณะ ได้ทำการสำรวจการเข้าทำลายกล้วยไม้ของเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ *CymMV* และ *ORSV* โดยทำการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี ELISA จากกล้วยไม้ที่สำคัญทางการค้า สกุล *Aranda* สกุล *Ascocentrum* สกุล *Arachnis* สกุล *Brassolaeliocattleya* สกุล *Cattleya* สกุล *Dendrobium* สกุล *Mokara* สกุล *Oncidium* สกุล *Paphiopedilum* สกุล *Spathoglottis* สกุล *Vanda* และ สกุล *Vandanopsis* จำนวนรวม 1,146 ต้น พบว่า กล้วยไม้ถูกเชื้อ *CymMV* เข้าทำลายร้อยละ 54.6 เชื้อ *ORSV* เข้าทำลายร้อยละ 4.0 ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อทั้งสองชนิดร้อยละ 14.2 และไม่พบการเข้าทำลายจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดอีกร้อยละ 27.2 นอกจากนี้ Gibbs *et. al*. (2000) ยังได้สำรวจกล้วยไม้ สกุล *Aerides* สกุล *Aporum* สกุล *Brassavola* สกุล *Bulbophylum* สกุล *Dendrobium* สกุล *Epidendrum* สกุล *Grammatophyllum* สกุล *Grastidium*

สกุล *Inobulbon* สกุล *Liparis* สกุล *Miltonia* สกุล *Monanthos* สกุล *Oeceoclades* สกุล *Oncidium* สกุล *Paphiopedilum* สกุล *Phaius* สกุล *Phalaenopsis* สกุล *Phragmipedium* สกุล *Renanthera* สกุล *Renantherella* สกุล *Sarcanthoopsis* สกุล *Stenoglottis* และ สกุล *Vandopsis* รวมจำนวน 128 ต้น ในประเทศออสเตรเลีย พบว่า *CymMV* นี้สามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ทั้งกล้วยไม้ป่าและที่ปลูกเป็นการค้าหลายชนิด สำหรับการเข้าทำลายของเชื้อในกล้วยไม้ของไทยนั้น Tanaka *et. al.* (1997) ได้สำรวจกล้วยไม้ 442 ต้น จาก 24 สกุลของโรงเรือนต่างๆ 43 แห่ง จาก 8 จังหวัดทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของไทยเพื่อตรวจหาเชื้อ *CymMV* และ *ORSV* โดยวิธี Rapid immunofilter paper assay (RIPA) พบว่ามีกล้วยไม้ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดอยู่ทั้ง 3 ภาคของประเทศไทย โดยพบเชื้อ *CymMV* มากกว่า *ORSV* และ พบเชื้อ *CymMV* เสมอในใบกล้วยไม้ทั้งที่ปรากฏและไม่ปรากฏอาการของโรค นอกจากนี้ นฎา (2544) ทำการตรวจวินิจฉัยการเข้าทำลายของเชื้อ *CymMV* จากการแสดงอาการอันเกิดจากเชื้อไวรัสดังกล่าวในกล้วยไม้จำนวน 77 ตัวอย่าง จาก 18 สกุล พบอาการด่างในกล้วยไม้สกุล *Aranda* สกุล *Bulbbophyllm* สกุล *Catasetum* สกุล *Cattaleya* สกุล *Dendrobium* สกุล *Grammatophyllum* สกุล *Kagawara* สกุล *Oncidium* และอาการแผลไหม้สีน้ำตาลวงแหวนในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* สกุล *Doritis* และ สกุล *Oncidium* และเมื่อนำตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงอาการดังกล่าวไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยนำไปทำปฏิกิริยากับแอนตีซีรัมของ *CymMV* พบการเกิดปฏิกิริยาของแอนตีซีรัมกับตัวอย่างกล้วยไม้สกุล *Grammatophyllum* สกุล *Kagawara* สกุล *Oncidium* และสกุล *Aranda*

Hu and Ferreira (1994) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ การถ่ายทอด และการจัดการเชื้อ *CymMV* และ *ORSV* โดยทำการปลูกเชื้อ *CymMV* และ *ORSV* ให้แก่กล้วยไม้หวายลูกผสม เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า เชื้อ *CymMV* สามารถแพร่กระจายจากตำแหน่งที่ได้รับการปลูกเชื้อไปได้ทั่วทั้งต้น และทำให้เกิดอาการแบบ systemic infection แต่ยังไม่พบว่ามีการถ่ายผ่านทางเมล็ด ซึ่งต่างจาก *ORSV* ที่ไม่มีการเคลื่อนที่จากตำแหน่งซึ่งทำการปลูกเชื้อ

เชื้อ *CymMV* สร้างความเสียหายแก่กล้วยไม้แต่ละสกุลโดยมีอาการของโรคแตกต่างกัน เช่น สกุล *Cymbidium* แสดงอาการ ด่าง และ แผลเนื้อเยื่อตาย (necrosis) สกุล *Phalaenopsis* แสดงอาการ ด่าง, แผลจุดฉ่ำน้ำ (Brunt *et. al.*, 1995) สกุลหวาย (*Dendrobium, Den.*) เช่น มีอาการใบด่างสีเขียวสลับเหลืองชัดเจนโดยหวายซีซาร์ (*Den*. Ceasar) มีอาการใบด่างเป็นขีดเล็กๆ สีขาวเริ่มจากโคนใบ และปรากฏเด่นชัดที่ใบอ่อนและลำที่เกิดใหม่ รูปดอกปกติแต่ขนาดดอกเล็กลง พบบางต้นมีสีซีด กลีบแคบยาว หวายปอมปาร์ดัวร์ (*Den*. Pompadour) (ปราณี, 2514; โชคพิศิษฐ์, 2528) มี

อาการยอดบิดซึ่งใบแต่ละชั้นมีการเรียงตัวผิดปกติ เมื่อดูจากยอดลงไปจะเห็นลักษณะบิดเป็นเกลียว ในหวายปอมปาดัวร์และหวายลูกผสม ทั้งนี้กล้วยไม้หวายที่ถูกเชื้อ *CymMV* เข้าทำลาย จะแสดงอาการแตกต่างกันถึง 6 ลักษณะคือ ด่างเหลืองเป็นทางยาว ด่างเหลืองอ่อนกระจายบนใบ เส้นนูนบนใบ ยอดบิดเป็นเกลียว เกิดจุดประสีขาวและสีเขียวอ่อนตามความยาวใบ (กุลฉวีและธีระ, 2519) โดยหวายแจ็คเกอร์ลีน คอนเสิร์ต (*Den.* Jacquelyn Concert) แสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายเป็น 3 ระดับ คือ ระดับแรก มีอาการใบด่างไม่ชัดเจน ระดับที่ 2 อาการใบด่างชัดเจน เนื้อใบไม่เรียบ ระดับสุดท้ายมีอาการใบด่างและยอดบิด ต้นเจริญเติบโตไม่ปกติ ยอดแกร็นและบิด (กลอยใจ, 2534) ขณะที่กล้วยไม้สกุลคัทลียาและสกุลใกล้เคียง ที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *CymMV* และ *ORSV* มีอาการใบด่าง อาการปลายรากเน่าและรากแตกเป็นฝอย ดอกด่างและขนาดเล็กลง รูปร่างบิดเบี้ยว โดยพบอาการดังกล่าวหลังจากได้รับเชื้อแล้ว 9 ถึง 12 เดือน (สาวิตร, 2516) ส่วนกล้วยไม้สกุลอื่นๆ เช่น กล้วยไม้สกุลแวนดา (*Vanda*) ที่ถูกเชื้อ *CymMV* เข้าทำลายมีอาการแผลตายสีดำบนใบ และสกุลออนซิเดียม (*Oncidium*) มีอาการผิวหน้าใบแห้งยุบตัวเป็นปื้นเล็กๆของ (Chia and He, 1999) ซึ่งต้นที่ติดเชื้อ *CymMV* เพียงชนิดเดียวไม่ปรากฏอาการให้เห็นมากนัก แต่เมื่อมีเชื้อ *ORSV* ร่วมอยู่ด้วยทำให้มีอาการใบด่างและเนื้อเยื่อใบตายเป็นจุด แสดงว่าอาการของโรคจะปรากฏเมื่อมีเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดอยู่ด้วยกัน (Tanaka *et. al.*, 1997)

การเข้าทำลายของเชื้อ *CymMV* มีผลกระทบต่อการเจริญและผลผลิตของกล้วยไม้ เช่น ในมลรัฐฮาวายพบว่าโรคนี้ ทำให้กล้วยไม้สกุลหวายมีผลผลิตลดลงถึงร้อยละ 9 และอาการที่เกิดขึ้นก็ทำให้ขายผลผลิตได้น้อยลง (ครรชิต, 2541) ขณะที่โรคนี้ทำให้ ความสูงของลำหน้า, ลำหลัง, จำนวนใบของลำหน้าและลำหลังของหวายแจ็ค ฮาวาย ‘Uniwai Pearl’ (*Den*. Jaq-Hawaii ‘Uniwai Pearl’) ลดลงร้อยละ 30.63, 30.43, 29.3 และ 28.27 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำให้จำนวนช่อดอกต่อกอ ความยาวช่อดอก และจำนวนดอกต่อช่อลดลงร้อยละ 11.88, 16.45 และ 20 ตามลำดับ อีกด้วย (ปิยมล, 2544)

4. <u>การผลิตพืชให้ปราศจากไวรัส</u>

การที่โรคเนื่องจากเชื้อไวรัส ไม่สามารถถูกทำลายได้ในแปลงปลูก จึงมีการเสนอแนะให้มีการผลิตต้นพืชที่ปราศจากไวรัสเพื่อใช้เริ่มต้นการผลิตและใช้ปลูกแทนต้นเก่าที่เป็นโรคในแปลง (Hu and Ferreira, 1994) สำหรับวิธีการผลิตต้นพืชให้ปราศจากไวรัสนั้นอาจกระทำได้โดย

4.1 การใช้ความร้อนบำบัด (Heat treatment / heat therapy/ thermotherapy) โดยการนำเอาต้นพันธุ์ไปเลี้ยงในที่อุณหภูมิสูงในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส นานเท่าที่ต้นพืชจะทนได้แล้วจึงนำเอาส่วนยอดของพืชมาขยายพันธุ์ เนื่องจากอุณหภูมิสูงจะไปยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัสในพืชโดยพบว่าทำให้ไวรัสไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและโปรตีนที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของไวรัสในพืช ทำให้เชื้อไม่สามารถแพร่กระจายไปทั่วต้นพืชจึงสามารถนำเอาส่วนยอดของพืชมาใช้ผลิตพืชปลอดโรคได้ แต่พบว่าวิธีการนี้ทำให้ต้นพืชทรุดโทรม มีความแข็งแรงและการเจริญเติบโตลดลง เพราะอุณหภูมิสูงทำให้พืชเกิดความเครียด (heat stress) จึงทำให้การสังเคราะห์แสงของพืช และการเคลื่อนที่ของธาตุอาหารในพืชลดลงในขณะที่พืชมีการหายใจเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าทำให้การสังเคราะห์เอ็นไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและสมดุลของฮอร์โมนพืชสูญเสียไป (Mink *et. al*., 1998) พืชที่ใช้วิธีความร้อนบำบัดในการกำจัดไวรัสได้สำเร็จ ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ ที่ติดเชื้อ *Strawberry mild yellow edge virus* (*SMYEV*) สามารถกำจัดได้ร้อยละ 82 หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 6 สัปดาห์ (Mullin *et. al.*, 1974) และปราศจาก *Strawberry latent A* และ *Strawberry mottle viruses* ได้ทั้งหมดเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 5 สัปดาห์ (Sobcykiewicsz, 1979) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของมันฝรั่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 40 วัน พบว่าสามารถกำจัด *PVY* ได้ เพียงร้อยละ 20 และ 37.5 ตามลำดับ (Nascimento *et. al*., 2003) การทดลองผลิตต้นเนคทารีนให้ปราศจาก *Plum pox virus* (*PPV*) และ *Prunus necrotic ringspot virus* (*PNRSV*) โดยให้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แก่ต้นแม่พันธุ์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วตัดเอายอดขนาด 1.3 ถึง 2.0 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงจนเกิดการแตกยอดจำนวนมาก พบว่าสามารถผลิตต้นที่ปราศจาก *PPV* และ *PNRSV* ถึงร้อยละ 86 และ 81 (Manganaris *et. al*., 2002) นอกจากการให้อุณหภูมิสูงแล้วการทำ vitrification cryopreservation กับกลุ่มเนื้อเยื่อกล้วยในสภาพปลอดเชื้อ ก็สามารถทำให้ปราศจากเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (*CMV*) และ *Banana streak virus* (*BSV*) ได้ร้อยละ 30 และ 90 ตามลำดับ (Helliot *et. al*., 2002)

สำหรับการใช้ความร้อนบำบัดกับต้นกล้วยไม้ในประเทศไทยนั้น กุลฉวี (2520) ได้ทดลองใช้ความร้อนอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กับต้นกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ นาน 1 เดือน ระบุว่าเพียงทำให้ปริมาณไวรัสในหน่อที่เกิดใหม่ลดลงเท่านั้น ต่อมาโชคพิศิษฐ์ (2528) ได้ศึกษาอีกครั้งโดยการควบคุมเชื้อ *CymMV* ในกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ นำเอาเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ *(Den.* Pompadure) ที่ได้จากหน่อที่ได้รับอุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส นาน 2 และ 4 สัปดาห์ ไปทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสามารถผลิตต้นที่ปลอดเชื้อได้เพียงร้อยละ

10 อย่างไรก็ตาม เมื่อเฉลิมรัฐ (2538) ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้หวายโซเนียพันธุ์บอม 17 พบว่า PLBs มีอัตรารอดชีวิตเหลือเพียงร้อยละ 16.67 หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน และตายทั้งหมดหลังเพาะเลี้ยง 14 วัน จึงไม่สามารถใช้วิธีนี้กำจัดไวรัสได้

4.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด (Meristem tip culture) โดยทำการตัดเอาเนื้อเยื่อส่วนปลายยอด (apical meristem) ขนาด 0.1 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นส่วนที่มีการแบ่งตัวและเจริญอย่างรวดเร็ว จึงมีโอกาสที่จะปราศจากไวรัส ไปเพาะเลี้ยง ทำให้ได้ต้นที่ปราศจากไวรัส วิธีการนี้ได้ถูกใช้ในการผลิตพืชปราศจากไวรัสในพืชชนิดต่างๆ (Faccioli and Marani, 1998) เช่น การกำจัดเชื้อไวรัส 4 ชนิดได้แก่ *Garlic common latent virus* (*GCLV*, carlavirus), *Leek yellow stripe virus - garlic strain* (*LYSV*-G), *Onion yellow dwarf virus- garlic strain* (*OYDV*-G) และ *Onion mite-born latent virus - garlic strain* (*OMbLV*-G) ในกระเทียมด้วยวิธี meristem-tip culture พบว่าสามารถผลิตต้นที่ปราศจาก *LYSV*-G ได้ทั้งหมด, *OYDV*-G ร้อยละ 92, *GCLV* ร้อยละ 62 และ *OMbLV*-G น้อยกว่าร้อยละ 54 ขณะที่การตัดเอาเนื้อเยื่อส่วนกลีบและหัวย่อย ขนาด 0.15 ถึง 1.0 มิลลิเมตร ไปชักนำเป็นต้นใหม่พบว่า ปราศจากไวรัสร้อยละ 38 และ 25 ตามลำดับ (Verbeek *et. al*., 1995) นอกจากนี้การใช้วิธี cryopreservation ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดอ่อน ขนาด 0.5 ถึง 2มิลลิเมตร ในการกำจัด *Grape vine virus A* (*GVA*) สามารถทำให้ปลอดเชื้อได้ถึงร้อยละ 97 (Wang *et. al*., 2003)

ในกรณีของกล้วยไม้นั้น Ishii (1974) ได้นำเอาเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล *Cattleya* ขนาด 0.2 ถึง 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยง แต่พบว่ายังคงมีเชื้อ *CymMV* อยู่ กลอยใจ (2534) พบว่า เนื้อเยื่อของ *Den.* Jacpuelyn Concert ที่มีขนาด 1.5 ถึง 2 มิลลิเมตร มีอัตราการปนเปื้อนต่ำ แต่อัตราการตายสูง PLBs ที่เกิดขึ้นยังคงมีเชื้อ *CymMV* 21 โคลน และไม่พบ 3 โคลน โดยได้มาจากตายอด 1 ตา และ ตาข้าง 2 ตา ทั้งนี้ปริมาณเชื้อที่พบใน PLBs รุ่น 1, รุ่น 2, รุ่น 3 และ รุ่น 4 แตกต่างกัน

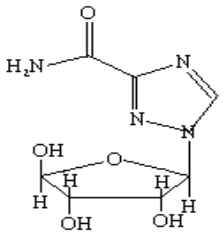
4.3 วิธีเคมีบำบัด (Chemotherapy) เป็นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารเคมีที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเพิ่มปริมาณ การกระจายตัวหรือการก่อเกิดอาการของไวรัสต่อพืช (Matthew and Smith, 1955, Hollings and Stone, 1967) ซึ่งสารเคมีส่วนใหญ่ที่ใช้จะมีโครงสร้างคล้ายคลึง (analogue) กับ nucleoside precursor ในการเพิ่มปริมาณของอาร์เอ็นเอของไวรัส (Dowson and Boyd, 1987) เช่น Adenine arabinoside, Ribavirin, Guanidine, Corducepin, Tubercidin, (s) 9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine, Distamycin A, 2,3-bis-(acetyl mercaptomethyl)–quinoxaline,

Cycloleuxine, 3-deazauridine, 2,3-diaminopyridine, 8-azaguanine, 2-thiouracil และ 5-azacytidine สามารถต้าน *Tobacco mosaic virus* (*TMV*) และ *Cowpea chlorotic mottle virus* (*CCMV*) จากแคลลัสและแผ่นใบของยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L. 'Xanthi') ได้ โดยส่วนใหญ่ทำให้แคลลัสพืชมีการเจริญเติบโตน้อยมาก ทั้งนี้พบว่า 2- thiouracil สามารถยับยั้งไวรัสได้โดยไม่มีผลต่อพืช และ Ribavirin มีผลในการกำจัดไวรัส *PVX* ได้เมื่อให้ในระยะเริ่มแรกของการเปลี่ยนเป็นตายอด แต่ยังไม่มีผลต่อโพรโทพลาสต์หรือแคลลัส (Dowson,1984) นอกจากนี้ Fletcher *et. al.* (1998)ได้ทดลองกำจัด *Onion yellow dwarf* (*OYDV*) และ *Shallot latent virus* (*SLV*) ในหัวหอม โดยใช้ Ribavirin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหอมพันธุ์ Jermor และพันธุ์ Mikor ปราศจากเชื้อไวรัสร้อยละ 60 และ 62 ตามลำดับ

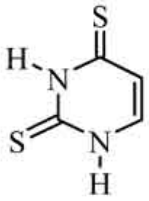
Dithiouracil (DTU) หรือ 2,4-dithiopyrimidine คือ nucleoside base ที่มีหมู่กำมะถันหรือ thio sulfur group ซึ่งเป็นอะตอมขนาดใหญ่เข้าไปแทนที่ excyclic oxo group ของ pyrimidine base ทำให้มีโครงสร้างเป็น pyrimidine base analogues พบว่ามีโครงสร้างคล้ายกับเบส uracil ปกติจะพบว่าเกิดการแทนที่ใน tRNA ดังนั้น thiobase จึงมีอิทธิพลต่อโครงสร้างของ DNA ทั้งยังสามารถเข้าไปยับยั้งการสังเคราะห์ pyrimidine nucleotide ของ mRNA นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง pyrimidine phosphorylation ทำให้ลดการเข้าไปรวมตัวในสาย DNA ของ thymidine triphosphate (TTP) (Sim *et. al*., 1983)จึงมีการทดลองนำอนุพันธ์ thiouracil มาใช้ในการกำจัดไวรัส *TMV* และ *CCMV* ทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (Commoner and Mercer, 1951; Dawson and Boyd, 1987; Hardman *et. al.,* 1996; Wang *et. al*., 2005) นอกจาก DTU จะยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัสได้แล้ว ยังอาจรบกวนการเคลื่อนที่ของไวรัสระหว่างเซลล์ได้ ซึ่งพบว่าการเกิด protein phosphorylation มีความสำคัญในการควบคุมการคมนาคมทั้งภายในเซลล์และระหว่างเซลล์ที่ระดับ nuclear pore complex ซึ่งไวรัสจะสร้าง movement protein (MP) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ระหว่างเซลล์ของ viral nucleic acid (vNA) ในรูป MP-vNA complex ซึ่งมีผลต่อการจำกัดการขยายขนาดของ plasmodesmata (size-exclusion limit : SEL) ส่งเสริมการเคลื่อนย้ายของ complex ไปยังเซลล์ข้างเคียง ซึ่งหากเกิด mutation ตรงตำแหน่งที่ควบคุมการเกิด phosphorylation ของ MP อาจทำให้ SEL ลดลงไวรัสจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ไปได้ (Lee and Lucas, 2001) จนสามารถกำจัดไวรัสโดยไม่มีผลเสียต่อพืช (Dowson, 1984)

ส่วน Ribavirin หรือ 1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายเบส guanine (G) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม purine base ที่เกาะกับน้ำตาล D-ribose หรือ

guanosine ซึ่ง Ribavirin สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของ RNA และ DNA ไวรัสได้ (Hardman *et. al*., 1996; O'Grady *et. al*., 1997, Crotty *et. al*., 2002; Freistadt *et. al*., 2004; Wang *et. al*., 2005) สารชนิดนี้ มักถูกใช้เป็นยาต้านไวรัสในสัตว์หรือมนุษย์ (Dawson, 1984; Hardman *et. al*., 1996) โดย Ribavirin monophosphaste ไปยับยั้ง protein monophosphate dehydrogenase (IMPDH) หรือ inosine-5'-phosphate dehydrogenase ภายในเซลล์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการ replication ของไวรัส จำกัดการสังเคราะห์ guanosine monophosphate นอกจากนี้ยังยับยั้ง guanyl transferase activity และ transcription และรบกวนกระบวนการสังเคราะห์ guanosine triphosphate (GTP) และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกอื่นๆ ทำให้ความเข้มข้นของ GTP ภายในเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นการเพิ่มความถี่ในการเข้าไปแทรกตัวของอนุพันธ์ Ribavirin ในจีโนมของไวรัส ส่วน Ribavirin triphosphate สามารถเข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมของไวรัสได้เช่นกันโดยการนำพาของ RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) หรือ viral polymerase เนื่องจากมีโครงสร้างคล้าย GTP หรือ ATP ของ RNA สายที่เป็นต้นแบบ ซึ่งอาจไปจับกับ cytidine หรือ uridine base มีการเปลี่ยนแปลงของ carboxamind เกิดการเข้าคู่ของเบสผิดพลาด เกิดเป็น pseudobase ทำให้เกิด transition mutation หลังจากมีการ replication สาย RNA ของไวรัสเกิดกลายพันธุ์ไป ทั้งยังยับยั้ง GTP- dependent 5'-capping ของ RNA virus (Hardman *et. al.,* 1996; Crotty *et. al*., 2002) หรือยับยั้งการสร้าง 5'-cap ของ mRNA หรือไปทำหน้าที่เป็น chain terminator ของสาย RNA ของไวรัส ทำให้สร้างสาย RNA ไม่สมบูรณ์และยังลด nucleotide pools และยับยั้ง RNA-dependent RNA polymerase ของไวรัสในการทำหน้าที่ต่อสาย nucleotide อีกด้วย มีผลให้ไวรัสหยุดการเจริญเติบโต ไวรัสจึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณในสิ่งมีชีวิต หรือทำให้จีโนมของไวรัสสูญหายหรือไวรัสตายไปได้ (lethal mutagenesis) (O'Grady *et. al*., 1997; Crotty *et. al*., 2002; Freistadt *et. al.*, 2004) เมื่อนำไปใช้ร่วมกับอาหารเหลวในการเพาะเลี้ยง PLBs ทำให้สารกำจัดไวรัสสัมผัสและแทรกซึมเข้าสู่ PLBs อย่างทั่วถึง จึงใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยลง แม้ใช้ Ribavirin ความเข้มข้นต่ำก็สามารถขัดขวางการเพิ่มปริมาณของไวรัสได้ (Parmessur and Saumtally, 2001)



Ribavirin



Dithiouracil (DTU)

สำหรับการผลิตกล้วยไม้ปราศจากไวรัสโดยใช้วิธีเคมีบำบัดในระยะแรกในต่างประเทศนั้น Albouy *et. al.* (1998) ใช้ VIRAZOLE®(Ribavirin) เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ที่มีการตัดแบ่ง PLBs 5 ครั้ง เป็นเวลา 18 วัน แล้วทำการตรวจไวรัสด้วยวิธี Biotin-Avidine System (B.A. ELISA) พบว่าความเข้มข้นของไวรัสลดลงอย่างรวดเร็วและต้นอ่อนที่เจริญมาปลอดไวรัสถึงร้อยละ 95 Loi *et. al.* (1991) ทดลองใช้ VIRAZOLE® เข้มข้น 5-15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 10-40 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดและแคลลัสของกล้วยไม้หวายโซเนีย (*Den*. Sonia) สามารถกำจัด *CymMV* และ *ORSV* จากเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดและแคลลัสได้ ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วยวิธี Double Antibody Sandwich-Enzyme linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) โดยแนะนำให้ใช้ VIRAZOLE® เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร และเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กับแคลลัสเมื่อใช้นาน 30 วัน ต่อมา Toussaint (1993) ใช้ VIRAZOLE® เข้มข้น 143.5 ไมโครโมลาร์ หรือ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร กำจัด *ORSV* จาก PLBs ของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าสามารถผลิต PLBs ที่ปราศจากไวรัสได้ร้อยละ 40-50 หลังจากทำการเปลี่ยนอาหาร 3 ครั้ง (18 วัน) ต้นอ่อนที่ได้จาก PLBs ซึ่งเกิดใหม่จาก PLBs ก้อนแม่ที่มีไวรัส ร้อยละ 90 นั้นไม่มีไวรัสเมื่อตรวจด้วยวิธี ELISA และไม่พบไวรัสอีกเลยในช่วง 5 ปี ต่อมา Porter และ Kuehnle (1997) ทดลองใช้ DTU และ Ribavirin ในการขจัดเชื้อ *CymMV* ในระหว่างเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Den.* Jacquelyn Thomas 'Uniwai Mist' พบว่าการเติม Ribavirin เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ DTU เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเหลว แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดียวกันที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ DTU เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นาน 17 สัปดาห์ สามารถกำจัดเชื้อ *CymMV* ได้ดีที่สุดถึงร้อยละ 20 และหากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติม Ribavirin หรือ DTU นาน 38-32 สัปดาห์ ทำให้สามารถผลิตต้นกล้วยไม้ที่ปราศจากไวรัสเพิ่มขึ้นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ต้นกล้วยไม้ยังปลอดไวรัสอยู่ได้ถึง 2 ปีครึ่ง หลังนำออกปลูก

ในประเทศไทยได้มีการทดลองนำเอาสารกำจัดไวรัสมาใช้ในการผลิตกล้วยไม้ปราศจากไวรัสเช่นกัน โดยในปี 2528 โชคพิศิษฐ์ ได้ใช้ 2-thiouracil เข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ กับเนื้อเยื่อปลายยอดที่มีขนาด 1.5 ถึง 2.0 มิลลิเมตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระยะหนึ่งก่อนย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่ผสม 2-thiouracil เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าไม่มี PLBs ปราศจาก *CymMV* เลย ต่อมา เฉลิมรัฐ (2538) พบว่า การใช้ 2-thiouracil เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ นาน 26 วัน ทำให้ PLBs กล้วยไม้สกุลหวายตายหมด และเมื่อใช้ NAA ร่วมด้วย ทำให้อัตราการรอดชีวิตในช่วง 26วันสูงกว่าการใช้นาน 14 วัน แต่ PLBs ที่ได้ยังคงมีไวรัสอยู่ สุรวิชและสุวรรณา (2544) ได้

รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยง PLBs ของ *Den*. Sonia 'Bom 17' ในอาหารเหลวที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1 สัปดาห์ตามด้วยอาหารเหลวที่เติม DTU เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 12 สัปดาห์ สามารถทำให้ PLBs ปลอดจาก *CymMV* ได้ร้อยละ 19.4 เมื่อตรวจผลด้วยวิธี Reverse Transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

5. <u>การตรวจหาเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (*CymMV*)</u>

วิธีการตรวจหาเชื้อ *CymMV* ในพืชสามารถทำได้ 4 วิธีหลัก ๆ ได้แก่

5.1 การใช้พืชทดสอบ (Bioassay) ทำโดยใช้พืชที่เป็นกลุ่มพืชอาศัย ซึ่งจำกัดอยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae, Leguminosae และ Solanaceae เช่น goose feet (*Chenopodium amaranticolor*) ขี้เหล็กเทศ (*Cassia occidentalis* L.) หรือ ต้นลำโพง (*Datura stramonium*) เป็นต้น ซึ่งพืชอาศัยแต่ละชนิดจะแสดงอาการของโรค เช่น การเกิดแผลจุด เฉพาะแห่งที่แตกต่างกันตามการตอบสนองของพืชอาศัยชนิดนั้นๆ (โชคพิศิษฐ์, 2528; ธีระ, 2538; นฎา, 2544) เมื่อทำการทดสอบในกล้วยไม้ เช่นสกุล *Cymbidium*, สกุล *Cattleya*, สกุล *Phalaenopsis* และ สกุล *Vanda* ทำให้เกิดอาการด่างลาย (mosaic) แผลจุดเซลล์ตาย (necrosis), ดอกด่างเป็นแผลจุดเซลล์ตาย (flower necrosis), แผลจุดฉ่ำน้ำ (water soaked local lesions) และ อาการด่างเป็นลายประ (chlorotic flecks) (Francki, 1984) และยังพบอาการยอดบิด, ก้านใบสั้น, ต้นแคระแกร็น และอาการใบด่างเป็นขีดยาวตามแนวเส้นใบ (Annonymous b, 2005)

5.2 การใช้วิธีการทางซีรัมวิทยา โดยอาศัยหลักการตกตะกอนของแอนติเจนและแอนติบอดี (Wisler *et. al*., 1982) วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือวิธี Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อที่มีประสิทธิภาพและความรวดเร็วอีกวิธีหนึ่งซึ่งเป็นที่ยอมรับและใช้กันอยู่ทั่วไป (นฎา, 2544; Korpraditskul, 1975) โดยการนำเอาแอนติเจนหรือแอนติบอดีติดอยู่กับวัสดุที่เป็นของแข็ง (solid phase assay) แล้วใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากซึ่งนิยมใช้ alkaline phosphatase แล้วตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยการเติมซับสเตรท(substrate) และตรวจการเปลี่ยนสีของซับสเตรทจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีอยู่วิธีนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละมากตัวอย่าง (รัชนี, 2545) วิธีการนี้สามารถใช้ได้ดีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ

เช่น *Cucumber mosaic virus* (*CMV*) (Abdulllah *et. al.*, 1978), *Potato viruses* S and M (*PVS* & *PVM*) (De Bokx *et. al*., 1980), *Beet western yellow virus* (*BWYV*) (Hewings and D'Arcy, 1984), *Barley yellow dwarf virus* (*BYDV*) (Torrance, 1987), *Squash mosaic virus* (*SqMV*, comovirus) (Franken *et. al.,* 1990), *Beet yellow closterovirus* (*BYV)* (Stevens *et. al*., 1997), *Prunnus necrotic ringspot virus* (*PNRSV*) และ *Prune dwarf virus* (*PDV*) (Mekuria *et. al.*, 2003), *Banana bunchy top* (*BBTV*) (Wu and Su, 2004), *Yam mosaic virus* (*YMV*) (Njkeng *et. al*., 2004), *Rice black-streaked dwarf virus* (*RBSDV*) (Wang *et. al*., 2006) เป็นต้น

สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสในกล้วยไม้นั้น Hu *et. al*. (1993) สามารถตรวจสอบ *CymMV, ORSV* และ *Tomato spotted wilt virus* (*TSWV*) และ *Potyvirus*es ที่เข้าทำลายกล้วยไม้ในมลรัฐฮาวายด้วยวิธี Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA โดยใช้น้ำคั้นพืชเจือจาง 1:10

ในประเทศไทยได้มีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพทางซีรัมวิทยาเพื่อใช้ในการตรวจสอบ *CymMV* และ *TMV* – O ในกล้วยไม้ พบว่าวิธี ELISA สามารถตรวจหาเชื้อจากตัวอย่างน้ำคั้นใบพืชได้ถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถใช้ชิ้นส่วนพืชจากใบกล้วยไม้แทนน้ำคั้นกล้วยไม้ให้ได้ผลดี อีกทั้งสามารถใช้แอนติซีรั่มของ *CymMV* เจือจางอัตรา 1:1024 การตรวจสอบไวรัสวิธีนี้ใช้เวลาเพียง 1-2 ชั่วโมง (วัชรีพร, 2525) โดยค่า OD_{405} มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงของอาการของโรค (นฎา, 2544)

5.3 การตรวจสอบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เช่น อิมมูโนอิเล็กตรอนไมโครสโคป (Immunoelectron Microscope, IEM) วิธีนี้ใช้หลักการของกล้องจุลทรรศน์ร่วมกับอิมมูโนวิทยาโดยใช้แอนติซีรัมทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีหรือไวรัสในรูปสารแขวนลอย (suspension) หรือเนื้อเยื่อพืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายแล้วตรวจผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและอาจย้อมสีแอนติซีรัมหรือเคลือบด้วยสารต่าง ๆ เช่น เฟอริติน (ferritin) เอนไซม์ อนุภาคทอง (colladium gold particle) เป็นต้น ซึ่งก็เป็นวิธีการหนึ่งที่มีความรวดเร็วและให้ผลการตรวจสอบได้เป็นอย่างดี (รัชนี, 2545) เช่น โชคพิศิษฐ์ (2528) ที่ใช้แอนติซีรัมเจือจาง 1:1,000 และ 1:100 และตรวจด้วยวิธี derrick method (โชคพิศิษฐ์, 2528; Derrick, 1976; Miline and Luisoni, 1977) และ decorate method (โชคพิศิษฐ์, 2528; Miline and Lesemann, 1978) ตามลำดับ ในการตรวจสอบเชื้อ *CymMV* พบว่าสามารถตรวจอนุภาคไวรัสได้ดี และวิธีแรกยังสามารถตรวจสอบไวรัสได้ที่ความเจือจางสูงถึง 1:30

และวิธี decorate method ยังสามารถมองเห็นอนุภาคที่ติดสีทึบได้ชัดเจนอีกด้วย (โชคพิศิษฐ์, 2528)

5.4 การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธีทางชีวโมเลกุล ด้วยวิธี Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถตรวจสอบได้แม้มีอาร์เอ็นเอตัวอย่างปริมาณเพียง 1 พิโคกรัม หรือมีอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์เพียง 10 พิโคกรัมก็สามารถตรวจสอบได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว โดยวิธี Immunocapture-Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction มีความไวในการตรวจสอบ *Prunus necrotic ringspot virus* (*PNRSV*) ในกุหลาบมากกว่า DAS-ELISA ถึงราวเกือบ 100 เท่า โดยมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อที่ใกล้เคียงกัน (Moury *et. al*., 2000) ส่วนในกล้วยไม้ Lim *et. al*. (1993) ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหา *CymMV* และ *Potexvirus* ในกล้วยไม้ พบว่าวิธีนี้สามารถให้ผลตรวจได้อย่างรวดเร็วภายใน 5 ชั่วโมง และใช้ตัวอย่างที่มี RNA ปริมาณน้อยเพียง 1 พิโคกรัม หรือมีอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์เพียง 10 พิโคกรัมเช่นกัน ในประเทศไทย นัญวรรณ (2538) ได้ตรวจสอบกล้วยไม้จำนวน 16 ตัวอย่างที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี ELISA มาแล้ว พบว่าการใช้ specific primer ของโปรตีนหุ้มอนุภาคไวรัส *CymMV* และ *ORSV* สามารถใช้ตรวจสอบไวรัสได้ถูกต้องแม่นยำด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. <u>การศึกษาผลของ Ribavirin ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของ Protocorm-like bodies (PLBs)</u>

1.1 สกุล *Mokara*

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Mokara* Chark Kuan (*Mkra.*) ที่มีเชื้อ *CymMV* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์จากยอดของต้นแม่พันธุ์ซึ่งตรวจแล้วว่ามีเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (*CymMV*) โดยเพาะเลี้ยงตาข้างของกล้วยไม้ *Mkra.* ในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.00, 0.075, 0.10 หรือ 0.125 มิลลิโมลาร์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 PLBs

ทั้งนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดันไอ 1.1 กก./ซม.^{2} อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเข้มข้น Ribavirin ที่เตรียมโดยใช้ Ribavirin หนัก 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 20.48 มิลลิลิตร แล้วกำจัดเชื้อโดยกรองผ่าน Nitrocellulose membrane รูขนาด 0.2 ไมครอน (ศิริพร, 2545) ในสภาพปลอดเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ ชนิด Daylight ความเข้มแสงประมาณ 18.2 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเปลี่ยนอาหารและบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ PLB, น้ำหนักสด, จำนวนของ PLBs ที่รอดชีวิต พร้อมทั้งสังเกตสร้าง PLB รุ่นใหม่ (C_1-PLBs) ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักของ PLBs ก่อนเปลี่ยนอาหารทุกครั้ง

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสด และอัตราการรอดชีวิตของ PLBs

1.2 สกุล *Dendrobium*

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia 'Ear-sakul' (*Den.*) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์จากหน่อของต้นแม่พันธุ์ซึ่งตรวจแล้วว่ามีเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (*CymMV*) โดยเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในอาหารเหลวสูตร Vacin & Went (VW) (ตารางผนวกที่ 1) ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 และน้ำตาลทรายร้อยละ 1 pH 4.8-5.0 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 และน้ำตาลทรายร้อยละ 1 pH 4.8-5.0 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.00, 0.075, 0.10 หรือ 0.125 มิลลิโมลาร์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 PLBs

ทั้งนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดันไอ 1.1 กก./ซม.^{2} อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเข้มข้น Ribavirin ที่เตรียมโดย ใช้ Ribavirin ปริมาณ 50 มิลลิกรัมละลายในน้ำ 20.48 มิลลิลิตร แล้วกำจัดเชื้อโดยกรองผ่าน Nitrocellulose membrane รูขนาด 0.2 ไมครอน (ศิริพร, 2545) ในสภาพปลอดเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส และได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ชนิด Daylight ความเข้มแสงประมาณ 18.2 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการเปลี่ยนอาหารทุกสัปดาห์ และบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ PLBs, น้ำหนักสด, จำนวนของ PLBs ที่รอดชีวิต และ สังเกตสร้าง PLB รุ่นใหม่ (C_1-PLBs) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักของ PLBs ก่อนเปลี่ยนอาหารทุกครั้ง

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำหนักสด และอัตราการรอดชีวิตของ PLBs

2. <u>การศึกษาผลของ Ribavirin ร่วมกับ Dithiouracil (DTU) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของ Protocorm-like bodies (PLBs)</u>

2.1 สกุล *Mokara*

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Mokara* Chark Kuan (*Mkra.*) ซึ่งมีเชื้อ *CymMV* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำ

มะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ และ 0.125มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 ที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 , 0.20 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 10 วัน เพื่อให้ได้รับ DTU เป็นเวลานานขึ้นซึ่งคาดว่าน่าจะสังเกตเห็นการตอบสนองของ PLBs ต่อ DTU ได้ชัดเจนขึ้น โดยอาจสรุปได้ดังนี้

Riba (R)[1/] (mM)	DTU (D)[1/] (mM)		
	D1 = 0.15	D2 = 0.20	D3 = 0.25
R1 = 0.075, 3 w[2/]	R1D1	R1D2	R1D3
R2 = 0.125, 1 w	R2D1	R2D2	R2D3

[1/] Riba : Ribavirin, DTU : Dithiouracil

[2/] w : สัปดาห์

ทั้งนี้ทำการเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารกำจัดไวรัสเพื่อใช้เปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 PLBs

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดันไอ 1.1 กก./ซม.^{2} อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเข้มข้น DTU ที่เตรียมโดย ใช้ DTU หนัก 1 กรัม ละลายด้วย KOH เข้มข้น 5 นอร์มอล 14 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย KOH เข้มข้น 1 นอร์มอล 12 มิลลิลิตร แล้วกำจัดเชื้อโดยกรองผ่าน Nitrocellulose membrane รูขนาด 0.2 ไมครอน (ศิริพร, 2545) ทำการเปลี่ยนอาหารและบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ PLBs, น้ำหนักสด, จำนวน PLBs ที่รอดชีวิต และสังเกตสร้าง PLBs รุ่นใหม่ (C_1-PLBs) ทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหาร จนครบ 8 ครั้ง วิเคราะห์น้ำหนักของ PLBs ทางสถิติ แล้วคัดเลือกความเข้มข้นสูงสุดและความเข้มข้นรองลงมาแต่เวลานานที่สุดที่ทำให้ PLBs มีอัตรารอดชีวิตสูงที่สุดและรองลงมาเพื่อใช้ในการทดลองที่ 3

2.2 สกุล *Oncidium*

2.2.1 การทดลองย่อยที่ 1 ผลของ Ribavirin หรือ DTU ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของ Protocorn-like bodies (PLBs)

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey (*Onc.*) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์จากหน่อของต้นแม่พันธุ์ซึ่งตรวจแล้วว่ามีเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (*CymMV*) โดยการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 15 และน้ำตาลทรายร้อยละ 2 pH 4.8-5.0 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 15 และ น้ำตาลทรายร้อยละ 2 pH 4.8-5.0 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.00, 0.075, 0.10, 0.125 หรือ 0.15 มิลลิโมลาร์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกสัปดาห์เป็นเวลา 9 สัปดาห์ และศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ Dithiouracil (DTU) ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตPLBs ของ *Onc.* โดยเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม DTU เข้มข้น 0.00, 0.10, 0.15, 0.20 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์โดยเปลี่ยนอาหารทุก 10 วัน เพื่อให้ PLBs ได้รับ DTU นานขึ้น แต่ยังคงได้รับ DTU จำนวนครั้งที่เท่ากับการได้รับ Ribavirin ซึ่งคาดว่า PLBs น่าจะแสดงการตอบสนองต่อ DTU ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ทั้งนี้ให้ DTU จำนวน 9 ครั้ง (90 วัน) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 PLBs

ทั้งนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดันไอ 1.1 กก./ซม.^{2} อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเข้มข้น Ribavin ที่เตรียมโดย ใช้ Ribavirin หนัก 50 มิลลิกรัมละลายในน้ำ 20.48 มิลลิลิตร แล้วกำจัดเชื้อโดยกรองผ่าน Nitrocellulose membrane รูขนาด 0.2 ไมครอน (ศิริพร, 2545) ในสภาพปลอดเชื้อและสารละลาย เข้มข้น Dithiouracil (DTU) เตรียมโดย ใช้ DTU หนัก 1 กรัมละลายด้วย KOH เข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 14 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย KOH เข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วกำจัดเชื้อโดยกรองผ่าน Nitrocellulose membrane รูขนาด 0.2 ไมครอน (ศิริพร, 2545) ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส และได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซ็นต์ชนิด Daylight ความเข้มแสงประมาณ 18.2 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ PLBs, น้ำหนักสด, จำนวน PLBs ที่รอดชีวิต และสังเกตการสร้าง PLB รุ่นใหม่ (C_1-PLBs) ทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหาร

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสด และอัตราการรอดชีวิตของ PLBs

2.2.2 การทดลองย่อยที่ 2 ผลของ Ribavirin ร่วมกับ Dithiouracil (DTU) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของ Protocorm-like bodies (PLBs)

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey (*Onc.*) ซึ่งมีเชื้อ *CymMV* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตรVW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 15 และ น้ำตาลทรายร้อยละ 2 pH 4.8 - 5.0 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 15 และ น้ำตาลทรายร้อยละ 2 pH 4.8-5.0 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ หรือเข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (ตารางผนวกที่ 1) ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 4.8-5.0 ที่เติม DTU เข้มข้น 0.10 หรือ 0.15 มิลลิโมลาร์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 10 วันเพื่อให้ได้รับ DTU เป็นเวลานานขึ้นซึ่งคาดว่าน่าจะสังเกตเห็นการตอบสนองของ PLBs ต่อ DTU ได้ชัดเจนขึ้น โดยอาจสรุปได้ดังนี้

Riba (R)[1/] (mM)	DTU (D)[1/] (mM)	
	D1 = 0.10	D2 =0.15
R1 = 0.075, 4 w[2/]	R1D1	R1D2
R2 = 0.125, 3 w	R2D1	R2D2

[1/] Riba : Ribavirin, DTU : Dithiouracil

[2/] w : สัปดาห์

โดยเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารกำจัดไวรัสเพื่อใช้เปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 PLBs

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดันไอ 1.1 กก./ซม.^{2} อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเข้มข้น DTU ที่เตรียมโดย ใช้ DTU หนัก 1 กรัม ละลายด้วย KOH เข้มข้น 5 นอร์มอล 14 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย

KOH เข้มข้น 1 นอร์มอล 12 มิลลิลิตรแล้วกำจัดเชื้อโดยกรองผ่าน Nitrocellulose membrane รู ขนาด 0.2 ไมครอน (ศิริพร, 2545) ทำการเปลี่ยนอาหารและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพของ PLBs, น้ำหนักสด, จำนวน PLBs ที่รอดชีวิต และสังเกตสร้าง PLBs รุ่นใหม่ (C_1-PLBs) ทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหาร จนครบ 11 ครั้ง วิเคราะห์น้ำหนักของ PLBs ทางสถิติ แล้วคัดเลือกความเข้มข้นสูงสุดและความเข้มข้นรองลงมาแต่เวลานานที่สุดที่ทำให้ PLBs มีอัตรารอดชีวิตสูงที่สุดและรองลงมาเพื่อใช้ในการทดลองที่ 3

2.3 สกุล *Dendrobium*

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia 'Ear-sakul' (*Den.*) ซึ่งมีเชื้อ *CymMV* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตรVW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 และ น้ำตาลทรายร้อยละ 1 pH 4.8-5.0 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (ตารางผนวกที่ 1) ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 และน้ำตาลทรายร้อยละ 1 pH 4.8-5.0 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ หรือเข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 4.8-5.0 ที่เติม DTU เข้มข้น 0.15, 0.20 หรือ 0.25 มิลลิโมลาร์ โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุก 10 วันเพื่อให้ได้รับ DTU เป็นเวลานานขึ้นซึ่งคาดว่าน่าจะสังเกตเห็นการตอบสนองของ PLBs ต่อ DTU ได้ชัดเจนขึ้น โดยอาจสรุปได้ดังนี้

Riba (R)[1/] (mM)	DTU (D)[1/] (mM)		
	D1 = 0.15	D2 = 0.20	D3 = 0.25
R1 = 0.075, 3 w[1/]	R1D1	R1D2	R1D3
R2 = 0.125, 1 w	R2D1	R2D2	R2D3

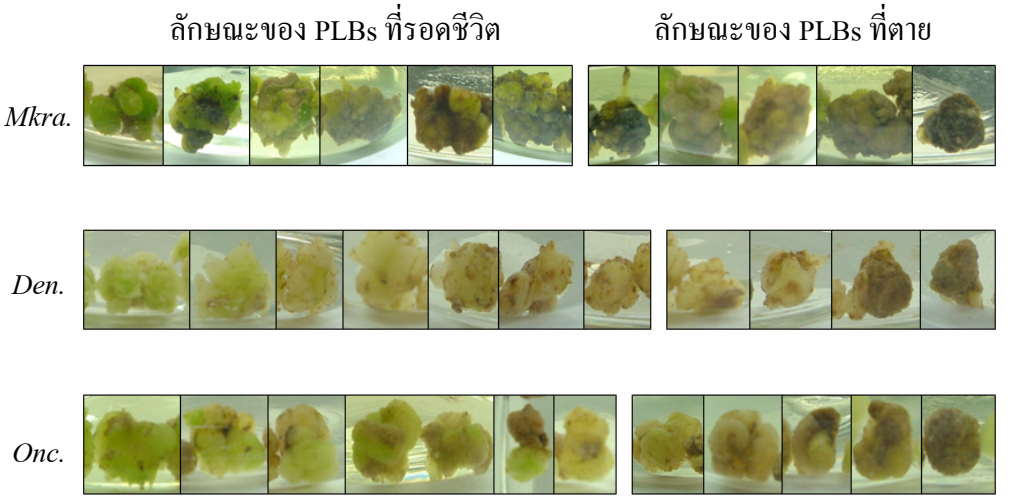
[1/] Riba : Ribavirin, DTU : Dithiouracil

[2/] w : สัปดาห์

ทั้งนี้เพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารกำจัดไวรัสเพื่อใช้เปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 5 PLBs

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดที่ความดันไอ 1.1 กก./ซม.^{2} อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย DTU เข้มข้นที่เตรียมโดย ใช้ DTU หนัก 1 กรัมละลายด้วย KOH เข้มข้น 5 นอร์มอล 14 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย KOH เข้มข้น 1 นอร์มอล 12 มิลลิลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพของ PLBs, น้ำหนักสด, จำนวน PLBs ที่รอดชีวิต และสังเกตการสร้าง PLBs รุ่นใหม่ (C_1-PLBs) ทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหาร จนครบ 8 ครั้ง วิเคราะห์น้ำหนักของ PLBs ทางสถิติ แล้วคัดเลือกความเข้มข้นสูงสุดและความเข้มข้นรองลงมาแต่เวลานานที่สุดที่ทำให้ PLBs มีอัตรารอดชีวิตสูงที่สุดและรองลงมาเพื่อใช้ในการทดลองที่ 3

ทั้งนี้ คัดเลือก PLBs ที่รอดชีวิต และ PLBs ที่ตาย ของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดไวรัส ในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 โดยพิจารณาจากลักษณะของ PLBs ที่ปรากฏ หลังได้รับสารกำจัดไวรัส ซึ่งมีลักษณะดังนี้



ภาพที่ 1 ลักษณะของ PLBs ที่รอดชีวิต และ PLBs ที่ตาย ของกล้วยไม้ *Mokara* Chark Kuan (*Mkra.*), *Oncidium* Gower Ramsey (*Onc.*) และ *Dendrobium* Sonia 'Ear-sakul' (*Den.*) หลังเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดไวรัส

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

3.1 สกุล *Mokara*

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Mokara* Chark Kuan (*Mkra.*) ซึ่งมีเชื้อ *CymMV* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 ที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุก 10 วัน จำนวน 2 ครั้ง (20 วัน) หรือเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวสูตร WS ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WS (ตารางผนวกที่ 1) ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.8-5.5 ที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 และ 0.20 มิลลิโมลาร์ โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 10 วัน จำนวน 3 ครั้ง (30 วัน) จากนั้นจึงย้ายไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WS (ตารางผนวกที่ 1) ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 pH 5.5-5.8 ที่ไม่เติม Ribavirin และ DTU จนกระทั่งสร้าง PLBs รุ่นใหม่รุ่นที่ 1 (C_1-PLBs) จากนั้นจึงทำการตัดเอา PLBs ใหม่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณก่อนนำไปตรวจหาเชื้อ *CymMV* ด้วยวิธี Double-antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) และวิธี Reversse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

3.2 สกุล *Oncidium*

เลือก PLBs กล้วยไม้ *Oncidium* Gower Ramsey (*Onc.*) ซึ่งมีเชื้อ *CymMV* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 15 และ น้ำตาลทรายร้อยละ 1.5 pH 4.8-5.0 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่เติม DTU เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 4 ครั้ง (40 วัน) หรือ DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ จำนวน 3 ครั้ง (30 วัน) และอาหารเหลวสูตรเดียวกันที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ นาน 3 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่เติม DTU

เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ จำนวน 4 ครั้ง (40 วัน) โดยทำการเปลี่ยนอาหารที่เติม DTU ทุกๆ 10 วัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่เติมสารกำจัดไวรัสแล้ว จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 15 และน้ำตาลทรายร้อยละ 1.5 pH 4.8-5.0 จนกระทั่งสร้าง PLBs รุ่นใหม่รุ่นที่ 1 (C_1-PLBs) จากนั้นจึงทำการตัดเอา PLBs ใหม่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณก่อนนำไปตรวจหาความปลอดเชื้อ *CymMV* ด้วยวิธี DAS-ELISA และวิธี RT-PCR

3.3 สกุล *Dendrobium*

เลือก PLBs ของกล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia 'Ear-sakul' (*Den.*) ซึ่งมีเชื้อ *CymMV* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตร VW (ตารางผนวกที่ 1) ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 และ น้ำตาลทรายร้อยละ 1 pH 4.8-5.0 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่ดัดแปลงโดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 20 และน้ำตาลทรายร้อยละ 1 pH 4.8-5.0 ที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ จำนวน 5 ครั้ง (50 วัน) หรือ 0.20 มิลลิโมลาร์ จำนวน 4 ครั้ง (40 วัน) โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุก 10 วัน และ Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ นาน 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม DTU เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ จำนวน 5 ครั้ง (50 วัน) โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุก 10 วัน จากนั้นจึงย้ายไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ปกติ จนกระทั่งสร้าง PLBs รุ่นใหม่รุ่นที่ 1 (C_1-PLBs) จากนั้นจึงทำการตัดเอา PLBs ใหม่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ *CymMV* ด้วยวิธี DAS-ELISA และวิธี RT-PCR

4. <u>การตรวจหาเชื้อ *Cymbidium Mosaic Virus* (*CymMV*)</u>

ทำการตรวจสอบเบื้องต้นและยืนยันผล 2 วิธี ตามลำดับ ดังนี้

4.1 วิธี Double-antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)

ชั่งตัวอย่างพืช 0.1 กรัม บดใน PBS บัฟเฟอร์ (ตารางผนวกที่ 2) แล้วเติม coating บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12, 000

รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดของเหลวใสส่วนบนของแต่ละตัวอย่างลงในช่องตัวอย่างละ 1 ช่อง โดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ของตัวอย่างต่อช่อง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เทสารละลายออก ล้างด้วย PBS-T บัฟเฟอร์ (ตารางผนวกที่ 2) นาน 5 นาที 3 ครั้ง เติม 1' antibody (IgG-*CymMV*) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่องของตัวอย่าง โดยเจือจางด้วย conjugate buffer (ตารางผนวกที่ 2) ด้วยอัตราส่วน 1:500 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เทสารละลายออกแล้วล้างด้วย PBS-T บัฟเฟอร์ นาน 5 นาที 3 ครั้ง เติม anti-rabbit IgG (บริษัท Sigma) ที่เจือจางด้วย conjugate buffer ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 ลงในแต่ละช่องตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เทสารละลายออกล้างด้วย PBS-T นาน 5 นาที 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย substrate (p-nitrophenyl phosphate ปริมาณ 5 มิลลิกรัม เจือจางใน substrate buffer 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่องตัวอย่าง บ่มในที่มืดนาน 30-60 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย เติม NaOH 3 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อช่องตัวอย่าง เมื่อต้องการหยุดปฏิกิริยา อ่านผลการทดลองที่ได้โดยใช้เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (OD_{405})

ทั้งนี้ใช้น้ำคั้นจากใบกล้วยไม้จากต้นที่เคยตรวจพบว่ามีเชื้อ *CymMV* เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวกและน้ำคั้นจากใบกล้วยไม้จากต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ เพื่อใช้เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาในการตรวจหาเชื้อ *CymMV* ในการทดลอง

4.2 วิธี ReverseTranscription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

4.2.1 การสกัด Total RNA จากกล้วยไม้ ด้วยวิธี CTAB (Chang *et. al*., 1993)

นำตัวอย่าง PLBs หนัก 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว แล้วเติม Extraction buffer (ตารางผนวกที่ 3) ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม Chloroform : Isoamyl

alcohol (24:1)ในปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำซ้ำในขั้นที่เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) อีกครั้ง ดูดเอาส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม LiCl เข้มข้น 4 โมลาร์ พลิกหลอดกลับไปมาเพื่อให้สารผสมกันได้ดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้งเก็บเอาตะกอนไว้ จากนั้นเติม 1 x TE buffer + SDS 1 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตร, NaCl เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร Isopropanol แช่เย็นจัด 300 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเพื่อให้สารผสมกันได้ดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบ ต่อนาที นาน 5 นาที 2 ครั้ง แล้วตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นทำการละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (DEPC-treated water)

ทั้งนี้ทำการสกัด Total RNA จากใบกล้วยไม้จากต้นที่เคยตรวจพบว่ามีเชื้อ *CymMV* เป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวกและจากใบกล้วยไม้จากต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ เพื่อใช้เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาในการตรวจหาเชื้อ *CymMV* ในการทดลอง

4.2.2 การสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) สายแรก

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรกของยีน Coat protein (CP) ด้วย M-MuLV Reverse Transcriptase ตามคำแนะนำของบริษัท Fermentas จำกัด หรือ บริษัท ไบโอเนีย จำกัดโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) สำหรับสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส *CymMV* (Srifah *et. al*., 1996) โดยมีลำดับเบสดังนี้

Specific primer

Antisense: 5’-TTG GAT CCT TTT TTT TTT TT-3’

โดยนำเอา Total RNA ที่สกัดได้จากพืช 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ *CymMV*-Antisense (3') เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำที่ปราศจาก RNase (DEPC-treated water) 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติม 5x RT-buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร dNTP เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ 1.6 ไมโครลิตร และ น้ำที่ปราศจาก RNase (DEPC-treated water) 2.4 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วจึงเติม M-MuLV Reverse Transcriptase 200 unit ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำเอา cDNA สายแรกที่สังเคราะห์ได้ไปใช้ในการทำ PCR ต่อไป

4.2.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR)

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ไปเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ด้วย specific primer (Srifah *et. al.*, 1996) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

<u>Specific primer</u>

Sense : 5'-TAG GAT CCT GGC GAG GGT TAA G-3'

Antisense : 5'-TTG GAT CCT TTT TTT TTT TT-3'

เตรียมสารผสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

สารผสม ตามคำแนะนำของ บริษัท EPICENTER จำกัด

dH_2O	7.9	ไมโครลิตร
Master Amp*Tth* 20 x buffer	1	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ 25 mM	2.4	ไมโครลิตร
Master Amp 10 x PCR Enhancer	4	ไมโครลิตร
dNTP Mix 2.5 mM	1.6	ไมโครลิตร
CymMV-Sense (5') Primer 20 µM	0.5	ไมโครลิตร

CymMV-Antisense (3') Primer 20 µM	0.5	ไมโครลิตร
Master Amp *Tth* DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร
cDNA Template	2	ไมโครลิตร

หรือ

สารผสมตามคำแนะนำของบริษัท FERMENTAS จำกัด

dH_2O	11.7	ไมโครลิตร
Taq Polymerase 10 x buffer	2	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ 25 mM	1.6	ไมโครลิตร
dNTP Mix 2.5 mM	1.6	ไมโครลิตร
CymMV-Sense (5') Primer 20 µM	0.5	ไมโครลิตร
CymMV-Antisense (3') Primer 20 µM	0.5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร
cDNA Template	2	ไมโครลิตร

สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 :	94 องศาเซลเซียส 3 นาที	1 รอบ
โปรแกรมที่ 2 :	94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	35 รอบ
โปรแกรมที่ 3 :	72 องศาเซลเซียส 10 นาที	1 รอบ

จากนั้นทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส *CymMV* ขนาดราว 813 คู่เบส ด้วยวิธี Electrophoresis โดยใช้ Agarose gel เข้มข้นร้อยละ 1.2 กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 40 นาที และใช้ 3 kb Marker เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอส่วนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ *CymMV* ที่ได้จากการสังเคราะห์

ผล

1. การศึกษาผลของ Ribavirin ต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตของ Protocorm-like bodies (PLBs)

1.1 สกุล *Mokara*

การเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารสูตร WS ร่วมกับ Ribavirin เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า PLBs ที่ได้รับ Ribavirin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปลี่ยนจากสีเขียวเข้มสดใสเป็นสีเขียวอ่อนลง และมีการเจริญเติบโตและเพิ่มขนาดและปริมาณได้บ้าง เมื่อเปรียบเทียบกับ PLBs ที่เพาะเลี้ยงอาหารในอาหารปกติ ซึ่งยังคงมีสีเขียวสดใสตลอดการทดลอง มีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นและขนาดใหญ่ และพบว่าสามารถสร้าง PLBs ใหม่รุ่นที่ (C_1-PLBs) หลังจากทำการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดย PLBs ในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ มีขนาดเพิ่มขึ้นมากและแตกออกเป็นก้อนย่อย เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน พบว่าเริ่มมี C_1-PLBs เกิดขึ้นหลังจากทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 5 สัปดาห์ และ C_1-PLBs สามารถเจริญต่อไปได้ การเพิ่มความเข้มข้นของ Ribavirin เป็น 0.10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ PLBs เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเขียวคล้ำ จนกระทั่งมีสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ ส่วน PLBs ที่ยังคงมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม มีการสร้าง PLBs ใหม่เกิดขึ้น ภายหลังจากทำการเพาะเลี้ยงได้นาน 5 สัปดาห์ และ C_1-PLBs ที่เกิดขึ้นนั้น สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้เป็นอย่างดีเช่นเดียวกับ PLBs ที่ได้รับ Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ส่วน PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ พบว่า เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนอมเหลืองหลังจากทำการเพาะเลี้ยงได้นาน 1 สัปดาห์ และมีสีเขียวคล้ำจนกระทั่งมีสีน้ำตาลหลังทำการเพาะเลี้ยงได้นาน 4 สัปดาห์ แต่ไม่มีการสร้าง C_1-PLBs ตลอดการทดลอง (ภาพที่ 2)

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลของ Ribavirin ต่อการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักสดของ PLBs ในแต่ละสัปดาห์ พบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติในช่วง 2 สัปดาห์แรก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปในสัปดาห์ที่ 3 พบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรมีการเจริญเติบโตทางด้านน้ำหนักสดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักสดของ PLBs ลดลง ตามระดับความเข้มข้นของ Ribavirin ซึ่ง PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 129.39 มิลลิกรัม

ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 95.39 มิลลิกรัม ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร มีน้ำหนักสดเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดย PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ ยังคงมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุด ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ ยังคงมีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่ำที่สุด (ตารางที่ 1)

เมื่อพิจารณาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด พบว่า ในช่วง 2 สัปดาห์แรก PLBs ยังคงมีน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุดตลอดการทดลอง โดยน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.075, 0.10 หรือ 0.125 มิลลิโมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดเฉลี่ยเป็นไปอย่างช้าๆ โดย PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.10 และ 0.125 มิลลิโมลาร์ มีการเพิ่มของน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 3)

เมื่อทำการวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของ PLBs หลังจากทำการเพาะเลี้ยง PLBs จำนวน 5 ก้อน ในอาหารสูตร WS ที่ไม่เติม และเติมสาร Ribavirin เข้มข้น 0.075, 0.10 และ 0.125 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ พบว่า ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึง สัปดาห์ที่ 4 นั้น PLBs ยังคงรอดชีวิตทั้งหมด แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 5 มีอัตราการรอดชีวิตของ PLBs ที่ได้รับ Ribavirin เริ่มลดลง โดย PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 96 (4.8 ก้อน จาก 5 ก้อน) ซึ่งไม่แตกต่างจากอัตรารอดชีวิตของ PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติ ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.10 และ 0.125 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการรอดชีวิตต่ำใกล้เคียงกันเพียงร้อยละ 50 (2.5 ก้อน จาก 5 ก้อน) และร้อยละ 44 (2.2 ก้อน จาก 5 ก้อน) ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 6 นั้น PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ยังคงมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 96 ซึ่งไม่แตกต่างจากอัตรารอดชีวิตของ PLBs ที่ไม่ได้รับ Ribavirin ขณะที่ PLBs ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Ribavirin เข้มข้น 0.125 มิลลิโมลาร์ มีอัตรารอดชีวิตต่ำที่สุดและลดลงจากสัปดาห์ที่ 5 คือร้อยละ 32 (1.6 ก้อน จาก 5 ก้อน) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจาก PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งเติม Ribavirin เข้มข้น 0.10 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตรารอดชีวิตร้อยละ 50 (2.5 ก้อนจาก 5 ก้อน) (ตารางที่ 2)