



ปัญหาพิเศษ



เรื่อง

การผลิตกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี  
Production of virus-free shoot in Dendrobium by chemotherapy in vitro

โดย

นางสาว สุนิย์รัตน์ ไชยเมืองจีน

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

เจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ปก. เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์)

88217

พ.ศ. 2538

2538

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 98908

รับซื้อวันที่..... 10 Jun 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี  
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

เรื่อง

การผลิตกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี

Production of virus-free shoot in Dendrobium by chemotherapy in vitro

โดย

นางสาว สุนิษฐ์รัตน์ ไชยเมืองชื่น

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

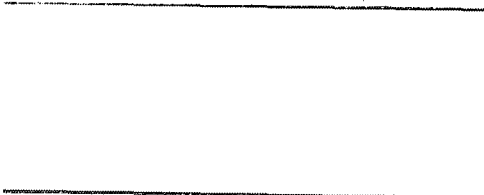
.....  
(อาจารย์ ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....  
(อาจารย์ สำเรึง คำทอง)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วันที่.....เดือน.....ปี.....



นพ.  
ศ 8217  
2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ พร้อมทั้งให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอมา กราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นवलพรรณ งามย์สุน อาจารย์ที่ปรึกษา ปัญหาพิเศษที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาคำเนิงงาน การช่วยเหลือในการแก้ไขนานาประการ พร้อมทั้งตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษให้สมบูรณ์ อาจารย์ สุเม อรัญนารด ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิต พืช สาขาพืชสวน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ และอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์เซรุ่มของเชื้อ *Cymbidium mosaic virus (CyMV)*

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โรคพืช ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาพืชสวน ที่อำนวยความสะดวกในด้านสารเคมีและอุปกรณ์ ในการทำปัญหาพิเศษ ขอบคุณเพื่อนๆ ที่เป็นกำลังใจในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ซึ่งเป็นสถานศึกษา และมีส่วนช่วยให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุนิษฐ์รัตน์ ไชยเมืองชื่น

19 เมษายน 2539

ชื่อเรื่อง การผลิตกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี  
โดย นางสาว สุนีย์รัตน์ ไชยเมืองชื่น  
ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช  
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน

### บทคัดย่อ

การทดสอบคุณสมบัติสารเคมี 1- Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับคือ 10,15,20 mg/l เพื่อใช้ในการผลิตกล้วยไม้ *Dendrobium* พันธุ์ Jaquelyn Thomas ให้ปลอดเชื้อโรคยอดคืบ *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) โดยทำการเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went ผสมสารเคมีเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นย้ายลงสู่อาหารแข็งสูตร Vacin and Went เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และอาหารแข็งสูตร Vacin and Went ผสมกล้วยหอมดิบและผงถ่านเป็นเวลา 7 สัปดาห์ เพื่อเร่งการเจริญจนกระทั่งโปรโตคอร์มเจริญเป็นยอดอ่อนนำมาตรวจเช็คเชื้อไวรัส CyMV โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่าสารเคมีระดับ 10 mg/l ตรวจพบการปลอดโรค 43.33 % สารเคมีระดับ 15, 20 mg/l ตรวจพบการปลอดโรค 56.66% และ 76.66% ตามลำดับ

## ABSTRACT

Title: Production of virus shoot in Dendrobium by chemotherapy in vitro

By: SUNIRAT CHAIMUANGCHUN

Degree: Bachelor of Science in Agriculture

Department: Pest Management Technology

Advisor: *N. Ngamyeesoon*

(Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

The testing of 1-Adamantanamine hydrochloride at 3 concentration 10, 15, 20 mg/l in tissue culture in order to eradicate Cymbidium mosaic virus in Dendrobium Jaquelyn Thomas was done . The infected protocorm-like bodies were cultured in Vacin and Went liquid media for 1 month and then tranfered to Vacin and Went agar media for 8 weeks before they were subcultured to Vacin and Went agar media mixed with banana and activated charcoal for another 7 weeks. The shoots were tested for virus-free by ELISA technique. The result showed that concentration of 1-Adamantanamine hydrochloride at 10, 15 and 20 mg/l incorporated into tissue culture medium on which infected protocorms were grown provided 43.33%, 56.66% and 76.66% virus free shoots respectively.

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	7
ผลการทดลอง	12
สรุปผลกาทดลอง	17
วิจารณ์ผลการทดลอง	18
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การตรวจเช็กลูกกล้วยไม้ที่เกิดโรคยอดบิด CyMV โดยวิธี ELISA เมื่อเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารสูตร Vacin and Went	16
ตารางผนวกที่		
1	สูตรอาหาร Vacin and Went (1949)	24
2	สูตรอาหาร Modified Vacin and Went สำหรับย้ายต้นกล้า	25
3	การเตรียมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride	26
4	การตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยใช้วิธี Indirect ELISA	27
5	ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ด้วยวิธี ELISA ของกล้วยไม้ ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ภายหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวผสมสาร เคมี 1-Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 1 เดือน	32

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มในอาหารเหลว	12
2	แสดงลักษณะโปรโตคอร์มในอาหารที่ผสมสาร1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆเปรียบเทียบกับขวดอาหารที่ไม่ผสมสารเคมี	13
3	แสดงการเลี้ยงโปรโตคอร์ม ในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went ภายหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารเหลว ผสมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆเปรียบเทียบกับขวดอาหารที่ไม่ผสมสารเคมี	14
4	แสดงการเจริญและการเกิดยอดอ่อนของโปรโตคอร์ม เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went และอาหารแข็งสูตร Vacin and Went ผสมกล้วยหอมดิบและผงถ่าน	15

## คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวายมีบทบาทสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ โดยประเทศไทยสามารถผลิตกล้วยไม้ส่งตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ เช่นประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และฝรั่งเศส เป็นมูลค่าถึงปีละ 500 ล้านบาท และยังได้รับการยกย่องเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดในโลกด้วย แต่ปัญหาที่เป็นอุปสรรคสำคัญในการส่งออกกล้วยไม้คือ มีโรคและแมลงรบกวนอยู่เสมอ โรคที่พบในกล้วยไม้สกุลหวาย คือ โรคยอดบิดเกิดจากเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) ทำให้ปริมาณช่อดอกของกล้วยไม้ลดลง และคุณภาพของช่อดอกต่ำลง โดยเฉพาะในหวายปอมปาควัวร์ พบการแพร่ระบาดอยู่ทุกแหล่งที่มีการปลูกกล้วยไม้ CyMV เป็นไวรัสที่มีความคงทนสูง และสามารถถ่ายทอดโรคได้ดีโดยวิธีกล ดังนั้นจึงเกิดการแพร่ระบาดไปได้ง่ายในขั้นตอนของการขยายพันธุ์จากต้นที่เป็นโรคติดไปกับเครื่องมือที่ใช้ตัดดอกและตัดแต่งผู้ต้นที่ไม่เป็นโรค หรือเชื้ออาจแพร่กระจายโดยวิธีแยกหน่อและการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดยทั่วไปไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคกล้วยไม้จะแพร่กระจายอนุภาคไวรัสไปทั่วทุกส่วนของพืชอาศัย (systemic) แล้วแสดงอาการออกมาต่างกันไป เช่นลักษณะใบต่าง ยอดบิด ยอดอ่อนม้วนงอ ช่อดอกสั้น ดอกค้างและดอกมีขนาดเล็ก ทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำและไม่ได้ราคา จึงมีการทดลองเพื่อที่จะหาแนวทางในการแก้ปัญหาเหล่านี้ โดยมุ่งสนใจถึงผลที่ทำให้ขบวนการทวีจำนวนของเชื้อไวรัสผิดปกติ ด้วยการให้สารเคมี (Chemotherapy) ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งการทดลองครั้งนี้อาจเป็นแนวทางหนึ่ง ในการที่จะกำจัดและทำลายโรคให้หมดไปก่อนที่จะเจริญเติบโตทำความเสียหายแก่ผลผลิตก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง

สุณีย์รัตน์ ไชยเมืองชื่น

19 เมษายน 2539

## วัตถุประสงค์

ศึกษาถึงคุณสมบัติของสารเคมี 1-Adamantanamine hydrochloride (Amatadine) ในระดับต่างๆ เพื่อผลิตกล้วยไม้ Dendrobium พันธุ์ Jaquelyn Thomas ให้ปลอดเชื้อไวรัส ร่วมกับการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตรวจเอกสาร

ปัจจุบันการผลิตกล้วยไม้ตัดดอกที่มีคุณภาพดีและมีความสม่ำเสมอทั้งขนาด และ สีของดอกปีละประมาณล้านๆต้นสามารถทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนของกล้วยไม้ที่นำมาขยายพันธุ์ได้แก่ ตายอด ตาข้าง ช่อดอกอ่อน และช่อดอก กล้วยไม้ตัดดอกที่สามารถผลิตได้ดีในประเทศไทยและเป็นที่ต้องการของตลาดมีหลายสกุลได้แก่ *Dendrobium* *Vanda* *Phalaenopsis* *Oncidium* และ *Cattleya* (อรดี, 2531) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีส่วนช่วยให้การพัฒนาทางการเกษตรรุดหน้าไปอย่างรวดเร็ว ไม่เฉพาะเพียงประโยชน์ทางการขยายพันธุ์พืชซึ่งจะได้พืชที่มีลักษณะเหมือนต้นพันธุ์เดิมให้ได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้นเป็นผลสำเร็จ หรือทำให้ต้นพันธุ์มีลักษณะที่เป็นที่ต้องการเท่านั้น การเลี้ยงเนื้อเยื่อจากบริเวณปลายยอด ร่วมกับวิธีอื่นๆยังช่วยกำจัดโรคไวรัสในพืชให้หมดไปด้วย (อรดี, 2532)

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการตื่นตัวมากทั้งในและต่างประเทศ ดังจะเห็นได้จากผลงานวิจัยและโครงการวิจัยที่กำลังค้นคว้าในสถาบันต่างๆตลอดจนการจัดตั้งบริษัทเกี่ยวกับเรื่องนี้ สำหรับประเทศไทยนั้นเริ่มมีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชครั้งแรกที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2509 ซึ่งเป็นการเริ่มต้นกระตุ้นให้มีผู้สนใจทางสาขานี้ทั้งภาครัฐบาลและเอกชน ต่อมา มีการจัดตั้งชมรมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแห่งประเทศไทยเมื่อ พ.ศ. 2525 (ถาวร, 2530) ในประเทศญี่ปุ่นเริ่มมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงส่วนเจริญของพืช (meristem cloning) เพื่อเพาะปลูกกล้วยไม้ ทำให้มีการผลิตกล้วยไม้พันธุ์ดีจำนวนมากในเวลารวดเร็ว และยังสามารถผลิตกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ๆ ที่มีคุณภาพตามต้องการ การใช้เทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนับว่าเป็นประโยชน์สูงต่อการผลิตพืชปราศจากไวรัส (พิศสุวรรณ, 2532)

ถึงแม้ว่าการผลิตกล้วยไม้ซึ่งเป็นการประยุกต์การเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการค้าจะได้เริ่มต้นก่อนพืชอื่น ๆ ก็ตามแต่ปรากฏว่ากล้วยไม้ที่วางตลาดในระยะแรกๆจำกัดเฉพาะกลุ่ม กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตเป็นกอ (sympodial) เช่นกล้วยไม้สกุลหวาย แคลทลียา เท่านั้น ยังไม่สามารถใช้วิธีที่มีอยู่เลี้ยงเนื้อเยื่อกลุ่มที่มีการเจริญเติบโตเป็นต้นเดี่ยว (monopodial) เช่นกล้วยไม้สกุลแวนดา สกุลเข็ม ได้ จนกระทั่งเวลาผ่านไป 10 ปี ขณะที่นักพฤกษศาสตร์ กำลังศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง ถาวร (2532) ได้รายงานการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้กลุ่ม monopodial ขึ้นเป็นครั้งแรกใน *America Orchid Society Bulletin* เมื่อ พ.ศ. 2513 ในความสำเร็จครั้งนั้นได้ค้นพบแนวทางในการเลี้ยงเนื้อเยื่อแครอตของศาสตราจารย์ Steward โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบที่สำคัญผนวกกับ naphthaleneacetic acid ซึ่งเป็น auxin ชนิดหนึ่งกรดอะมิโนและวิตามินในสัดส่วนที่ได้ทดลองจนได้ผลดี ภายหลังมีผู้รายงานเพิ่มเติมโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบทั้งสิ้น องค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมะพร้าวคือ ribosylzeatin ซึ่งจัดอยู่ในพวก cytokinin เป็นตัวกระตุ้นการเกิดการแบ่งนิวเคลียส และการพัฒนาไมวาร์ณิดๆ ทั้งสน อีกทั้งห้ามมิให้เกิดเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดี วิธีการใหม่นี้นับเป็นการบุกเบิกของการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้กลุ่มใหญ่ที่จนสามารถทำให้เกิดเป็นต้นได้ (ถาวร, 2532)

*Cymbidium mosaic virus (CyMV)* พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1943 โดย Jensen ทำความเสียหายแก่กล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ทำให้เกิดใบด่างและต้นแคระแกร็น การศึกษาโรคไวรัสกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เริ่มจริงจังเมื่อปี พ.ศ. 2510 เป็นต้นมาจึงเป็นระยะที่มีการค้นคว้าและส่งเสริมให้มีการปลูกเลี้ยง (ธีระ, 2535) เชื้อ *CyMV* ทำให้กล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium sp.* ลำต้นบิด ข้อสั้น ใบด่างลาย ช่อดอกสั้น ดอกด่าง ผลผลิตน้อยลง เชื้อ *CyMV* เป็นอนุภาคที่มีลักษณะเป็นท่อนขนาดประมาณ 450-500 nm สามารถถ่ายทอดโดยวิธีสัมผัส และติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ของกล้วยไม้ (สุรภีและคณะ, 2532) ลักษณะอาการของโรคยอดบิดซึ่งเกิดจากเชื้อ *CyMV* บนกล้วยไม้ป้อมป่าควรมีความแตกต่างของอาการหลายอย่างคือ เชื้อที่มีสายพันธุ์รุนแรงทำให้เกิดอาการค่างสีเหลือง เป็นทางยาวขนานไปกับความยาวของใบ อาการลักษณะนี้มักพบบนหน่อที่แตกใหม่ แต่อาการเช่นนี้ไม่พบบ่อยนัก ส่วนอาการที่พบเสมอคือ ใบยอดด่าง หรือเป็นจุดประสีต่างๆ สีเขียวอ่อน กระจายทั่วใบ ลำต้น แสดงอาการยอดบิดเล็กน้อย จนถึงใบบิดเป็นเกลียว ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ ในสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงกล้วยไม้สามารถให้ช่อดอกได้ สำหรับอาการบนดอกก่อนข้างสังเกตุยาก กล้วยไม้บางต้นให้ดอกที่มีขนาดเล็ก กลีบดอกแคบลง สีดอกด่าง และช่อดอกบริเวณปลายกลีบดอก และดอกร่วงเร็วกว่ากำหนด (สมศิริ, 2529)

การผลิตกล้วยไม้ในทางการค้าของเกาหลีอาศัยวิธีการขยายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการตรวจโรคไวรัสที่เกิดขึ้นในกล้วยไม้โดยวิธี *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* และ *Electron Microscopy (EM)* พบว่าในตัวอย่างกล้วยไม้ที่ทำการตรวจสอบ 186 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Cymbidium mosaic virus (CyMV)* 16 ตัวอย่าง และเชื้อ *Odontoglossum ringspot virus (ORSV)* 100 ตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าโรคไวรัส *ORSV* มีความรุนแรงกว่าโรคไวรัส *CyMV* และควรแก่การป้องกันกำจัดให้หมดไป (Ryo และคณะ, 1995)

Hu และคณะ (1993) ทำการศึกษาใน Hawaii พบว่ากล้วยไม้ 3600 ต้น จำแนกได้ 44 ชนิด นำมาทดสอบการเกิดโรค *CyMV* และ *ORSV* โดยวิธี *ELISA* โดยใช้ตัวอย่างกล้วยไม้ 132 ตัวอย่าง พบว่าเกิดโรค *CyMV* กับตัวอย่าง จำนวน 59 ตัวอย่าง และเกิดโรค *ORSV* จำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 45% และ 17% ของจำนวนทั้งหมด การติดเชื้อของ *CyMV* และ *ORSV* ทำให้เกิดปัญหาอย่างมากกับอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ของ Hawaii

ในห้องปฏิบัติการ Kim และ Kako (1984) ทำการศึกษาโดยการตัดยอดเจริญของ *Dendrobium* พันธุ์ Jaqualene (Jaquelyn) Thomas ขนาด 5-10 mm. จากเรือนทดลอง ผ่านการฆ่าเชื้อและลอกเอากาบใบออก จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร *Vacin and Went* ที่มีส่วนผสมของน้ำมะพร้าว 15% (Reimert และคณะ, 1977) การเกิดเป็น *protocorm-like body (plb)* เกิดในเวลา 4-5 สัปดาห์ และเจริญเป็นต้นในเวลา 8 สัปดาห์ จากการเลี้ยงกล้วยไม้ในอาหารเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพบว่าเนื้อเยื่อต้องการสาร Arginine , Aspartic acid , Kinetin , NAA( Naphthalene Acetic Acid) , Yeast extract ในการเจริญเติบโต

จากการศึกษาถึงการติดเชื้อและกลไกการเคลื่อนย้ายของเชื้อ CyMV และเชื้อ ORSV ในกล้วยไม้ที่มหาวิทยาลัย Hawii พบว่า Dendrobium ถูกผสม จะเกิดการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด หลังจากการปลูกเชื้อสู่ใบในเวลา 3 วัน CyMV จะเคลื่อนย้ายจากใบลงสู่ราก 10 วันหลังการปลูกเชื้อ และเคลื่อนย้ายสู่ใบอื่นๆในเวลา 20 วัน และจากการทดสอบด้วยวิธี DAS- ELISA เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีดังต่อไปนี้ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมไวรัส CyMV คือ sodiumhypochloride skim milk ethanol agribrom และ physan พบว่า skim milk และ ethanol มีประสิทธิภาพดี ในการป้องกันการติดเชื้อที่เกิดจาก CyMV (Hu และคณะ, 1994)

การใช้สารเคมีช่วยในการป้องกันกำจัดโรคไวรัสของพืชนั้นมีสารเคมีหลายชนิดที่นิยมใช้บางชนิดเป็นตัวเร่งการเจริญเติบโตของพืช เช่น 2,4-D เมื่อใส่ลงไปในการเลี้ยงตาขอดสามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสลง นอกจากนี้สารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติเป็น antimetabolite เช่น Virazole (Ribavirin) ก็สามารถนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อพืชได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับการใช้ความร้อน (พรทิพย์, 2528)

Walkey (1983) ศึกษาสารเคมีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพบว่า Virazole (Ribavirin) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีประสิทธิภาพสูง เมื่อใช้ร่วมกับการใช้ความร้อนเพื่อ กำจัดเชื้อไวรัสให้หมดไป Virazole สามารถกำจัดเชื้อ Potato virus X (PVX) ในยอดต้นยาสูบได้ และ Virazole ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l สามารถกำจัดเชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) จาก *Nicotina rustica* L. ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ John (1993) ที่ว่า มีสารเคมีหลายชนิดเติมลงในอาหารเพื่อให้พืชที่เพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อไวรัสแต่สารเคมีที่ใช้ประสบผลสำเร็จคือ 1β-D-1H-ribofuranosyl-1,2,4-triazole carboramide (ribavirin , virazole)

Horst (1990) ทำการทดลองกับต้นเบญจมาศ (chrysanthemum) เพื่อให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี cytovirin , virazol , phosphonoacetic acid , purine , pyrimidine ( โดยเฉพาะ 2-thiouracil และ 8-azaguanine) และ amantadine (50-100 mg/l) ร่วมกับการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงสามารถทำให้พืชชนิดนี้ปราศจากเชื้อ Chrysanthemum stunt viroid (ChSV) ได้

ธรรมศักดิ์ (2528) ได้รายงานถึงกลุ่มของสารเคมีที่มีคุณสมบัติของการดูดซึมมีผล ในการทำให้การสร้างอนุภาคไวรัสผิดปกติไป ดังนี้คือ

## 1. pyrimidine and purine

1.1 2-thiouracil มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอนุภาค และอาการของโรคไวรัสใบค่าง ยาสูบ ตั้งแต่ปี ค.ศ.1950-1952 โดย Commoner และ Merser ซึ่งใช้ความเข้มข้น  $4.3 \times 10^{-5}$  โมลลิตร ทำให้ต้นยาสูบ ต่อมาในปี ค.ศ.1954 2-thiouracil สามารถยับยั้งการผลิอนุภาคของเชื้อไวรัส X

และ Y ของมันฝรั่ง Potato Virus X และ Potato Virus Y เนื่องจาก 2- thiouracil เข้าไปแทนที่ uracil ที่เป็นสารประกอบของ RNA ทำให้ไวรัสขาด uracil ไป

1.2 8-azaguanine มีผลต่อ Alfalfa Mosaic Virus , Cucumber Mosaic Virus ถ้า นำสาร azaquanine ฉีดพ่นยาสูบที่มีเชื้อ AMV พบว่าไม่เกิดอาการของเชื้อไวรัสขึ้น นอกจากนี้สาร สามารถไปยับยั้งอาการของโรคไวรัสชนิดอื่นอีก เช่น ใบหงิกของมะเขือเทศ เนื่องจากสารนี้เข้าไป รบกวนหรือแข่งกัน กับสาร guanine อื่นๆในการสร้าง RNA ภายในเซลล์พืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้า ทำลาย

## 2. สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

สาร cyclohexamide (actidion) สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยเฉพาะ โปรตีนของอนุภาคไวรัส แต่เนื่องจากสารชนิดนี้มีพิษต่อพืชจึงทำให้ขอบเขตของการใช้แคบลงมี รายงานว่าสาร Blasticidin S มีอำนาจในการยับยั้งเชื้อ Tomato mosaic virus (TMV) ในยาสูบโดย รบกวนการผลิต RNA เช่นเดียวกับ Laurucin หรือ Formycin B สารปฏิชีวนะอื่นๆมีรายงานว่า ยับยั้งการเพิ่มอนุภาคไวรัสได้ เช่น abumycin, gentamycin, chloramphenical, daunomycin, mythramcin และ tubercidin เป็นต้น

## 3. Hormone

จากการเปรียบเทียบ hormone พืชปกติกับพืชที่เป็นโรคส่วนใหญ่แล้วพืชที่เป็น โรคไวรัสมีระดับ hormone บางชนิดลดลงมากกว่าปกติ มี hormone ที่ควบคุมการเจริญเติบโตอยู่ หลายชนิด เช่น auxin gibberin cytokinin ethylin เป็นต้น

จากการศึกษาโรคไวรัสใบม้วนของมันฝรั่ง (Potato Leaf Roll Virus -PLRV) พบ ว่าปริมาณ auxin ในหัวมันฝรั่งลดลงมากกว่าในหัวปกติ 53% จากการนำ auxin ชนิด IAA หรือ NAA ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบที่เป็นโรค TMVพบว่าสามารถลดอาการและปริมาณไวรัส ลงได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์ในการทดลอง

1. พืชทดลอง โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ Dendrobium พันธุ์ Jaquelyn Thomas
2. สารเคมี 1- Adamantanamine hydrochloride (Amatadine)
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร Vacin and Went (ตารางภาคผนวกที่ 1 )
- pipette ขนาด 1 ml , 5 ml
- beaker ขนาด 10 ml, 250 ml, 500 ml
- cylinder ขนาด 5 ml
- กระจกตวงขนาด 1L และ 2L
- dropper
- แท่งแก้วคน (glass rod)
- ข้อนตักสารเคมี
- ขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125 ml
- ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมฝาปิด ขนาด 125 ml
- ถุงพลาสติก
- หนั่งยาง
- กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil)
- เครื่องชั่ง
- pH meter
- magnetic stirrer

### 4. อุปกรณ์ในการย้ายเนื้อเยื่อ

- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow carbinet)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- สารเคมีที่ใช้นำเชื้อ
  - ethyl alcohol 95% และ 70%
  - clorox 10% และ 20%
- ปากคีบ
- มีดผ่าตัดพร้อมค้ำ

เอกสารนี้เป็น plate ออบฆ่าเชื้อ สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใด beaker หนึ่งฆ่าเชื้อ มิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ
- ผ้าขาวบางหนึ่งฆ่าเชื้อ
- ไม้จิ้มไฟ

5. หม้ออบความร้อน (hot air oven)

6. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)

7. หม้อนึ่งความดันใช้ฝาปิดแบบอัตโนมัติ (autoclave)

8. ตู้เย็น

9. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture room)

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature control)
- ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ
- เครื่องตั้งเวลา (timer)
- เครื่องเขย่า (shaker)

10. เซลล์ของเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ( CyMV) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก  
กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน

## วิธีการทดลอง

### 1. การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* พันธุ์ Jaquelyn Thomas

1.1 การเตรียมอาหารเหลวสูตร Vacin and went (ดังตารางภาคผนวกที่ 1) โดยนำสารละลายแต่ละส่วนมารวมกัน เติมน้ำตาล 20 g/l และน้ำมะพร้าว 150 ml จากนั้นปรับค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง 4.8-5.0 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1N หรือสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1N นำอาหารที่ได้ใส่ flask ขนาด 125 ml ปริมาณ 40 ml ต่อขวดปิดปากขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ทับด้วยพลาสติกแล้วใช้ยางรัดจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

1.2 เตรียมตู้ย้ายเนื้อเยื่อซึ่งเป็นตู้กรองอากาศให้บริสุทธิ์ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยเช็ดตู้ด้วยแอลกอฮอล์ 70% เปิดแสง ultraviolet (UV) ฆ่าเชื้อ โดยทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบเวลาปิดแสง UV ในขณะที่ทำการทดลองเปิดใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์

1.3 นำอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายโปรโตคอร์ม เช่น ปากคีบ มีดผ่าตัด plate beaker ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 160°C นาน 2 ชั่วโมง และตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ สำหรับจุ่มอุปกรณ์ลงไฟฆ่าเชื้อ นำเก็บในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ควรเช็ดอุปกรณ์ทุกอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 70% ก่อนเข้าตู้ทุกครั้ง

1.4 นำขวดโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* พันธุ์ Jaquelyn Thomas ซึ่งเป็นโรคยอดบิด (CyMV) และขวดอาหารใหม่ที่ใช้อาหารเหลวสูตร Vacin and Went เข้าตู้ย้าย นำหนัวยางและถุงพลาสติกออกจากปากขวด เหลือแต่กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ลนปากขวดด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ เปิดกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ออก แล้วเทโปรโตคอร์มลงใน beaker ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแล้ว ใช้ปากคีบคีบโปรโตคอร์มวางบน plate เพื่อทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อ โดยตัดส่วนที่เป็นสีน้ำตาลทิ้ง และตัดแต่งเพื่อมิให้โปรโตคอร์มเป็นกลุ่มหนาแน่นจากนั้นย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารใหม่ ก่อนเปิดขวดอาหารลงไฟฆ่าเชื้อที่ปากขวด นำโปรโตคอร์มใส่ลงในขวดประมาณ 20 ชิ้นต่อขวดลนปากขวดอีกครั้งหนึ่งก่อนปิดทับด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ทับด้วยพลาสติกรัดยางให้แน่นนำขวดอาหารวางบนเครื่องเขย่าเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่เนื้อเยื่อที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีใช้แสง 2500 ลักซ์เวลา 24 ชั่วโมงควรย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ เพื่อให้โปรโตคอร์มมีการเจริญเติบโตเต็มที่จนกว่าโปรโตคอร์มที่ได้จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตร

### 2. การทดสอบคุณสมบัติของสารเคมี 1-Adamantanamine hydrochloride ต่อปริมาณของ

#### เชื้อไวรัส CyMV ในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went

2.1 เมื่อโปรโตคอร์มได้ขนาดประมาณ 5-10 มิลลิเมตร ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (ดังข้อที่ 1.1) ซึ่งเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างๆ

กัน คือ 0,10,15,20 mg/l ความเข้มข้นละ 6 ชั่วโมง ใส่ขวด flask ขนาด 125 ml ปริมาณ 40 ml ปิดปากขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มด้วยพลาสติกและใช้ยางรัด ก่อนใส่ในหม้อนึ่งความดันฆ่าเชื้อ

2.2 การย้ายโปรโตคอร์รัมซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-10 มิลลิเมตร (วิธีการเดียวกับข้อ 1.4 )ใส่ลงในอาหารเหลวใหม่ที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride จำนวน 20 ชิ้นต่อขวด นำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 20 รอบต่อนาทีใช้แสง 2500 ลักซ์เวลา 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนอาหารที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ทุก 2 สัปดาห์

### 3. การย้ายโปรโตคอร์รัมด้วยไม้ Dendrobium พันธุ์ Jaquelyn Thomas ลงในอาหารแข็ง

#### สูตร Vacin and Went

3.1 เตรียมอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (ดังตารางภาคผนวกที่ 1) โดยการเติมน้ำปริมาณ 8 g/l ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง pH 4.8-5.0 ใส่ในขวดแก้วขนาด 120 ml ปริมาณ 20 ml ต่อขวด ปิดปากขวดให้สนิทจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

3.2 นำขวดโปรโตคอร์รัมอาหารเหลวของกล้วยไม้ Dendrobium พันธุ์ Jaquelyn Thomas ที่ทำการทดลองในสารเคมีระดับต่างๆ และขวดอาหารแข็งใหม่ที่ใช้อาหารแข็งสูตร Vacin and Went เข้าตู้ย้ายเนื้อเยื่อ นำหนัวยางและถุงพลาสติกออกจากปากขวดที่ทำการทดลองเหลือแต่กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ถนปากขวดด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ เปิดกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ออก แล้วเทโปรโตคอร์รัมลงใน beaker ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแล้ว ใช้ปากคีบ คีบโปรโตคอร์รัมในอาหารเหลวที่ทดลองระดับต่างๆเพื่อย้ายโปรโตคอร์รัมลงในอาหารแข็ง ก่อนเปิดขวดอาหารถนไฟฆ่าเชื้อที่ปากขวด นำโปรโตคอร์รัมใส่ลงในขวด ขวดละ 5 ชิ้นปิดฝาขวดให้สนิทจากนั้น นำไปวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้แสง 2500 ลักซ์ โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.3 ทำการเปลี่ยนอาหารแข็งทุก 2 สัปดาห์ เพื่อให้โปรโตคอร์รัมเจริญเกิดยอดอ่อนหรือย้ายลงอาหารแข็งสูตรที่ 2 (ดังตารางภาคผนวกที่ 2 ) โดยเติมน้ำตาลทรายขาว 10 g/l ผสมกล้วยหอมคิบป่น 100 g/l และผงถ่าน 0.5 g/l เพื่อเร่งการเจริญเติบโตให้เกิดยอดอ่อนเร็วขึ้น (ครรรชิต, 2530) สังเกตและบันทึกผลการเจริญของโปรโตคอร์รัมทุกสัปดาห์

#### 4. การตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้เทคนิค ELISA แบบ indirect

เมื่อ โปรโตคอร์มเกิดขอดก่อนนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้เทคนิค ELISA (ขั้นตอนการใช้ดังแสดงในภาคผนวก) โดยการตรวจสอบจากขอดอ่อนที่เจริญจากโปรโตคอร์ม ในอาหารที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ระดับความเข้มข้น 10,15,20 mg/l และ โปรโตคอร์มที่ไม่มีการผสมสาร (control) (เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปลอดโรคในระดับต่างๆ )

#### เวลาและสถานที่

เวลา	เริ่มทดลอง	มิถุนายน	2538
	สิ้นสุดการทดลอง	เมษายน	2539

#### สถานที่

ห้องปฏิบัติการ โรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช  
 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาพืชสวน  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## ผลการทดลอง

### 1. การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* พันธุ์ Jaquelyn Thomas

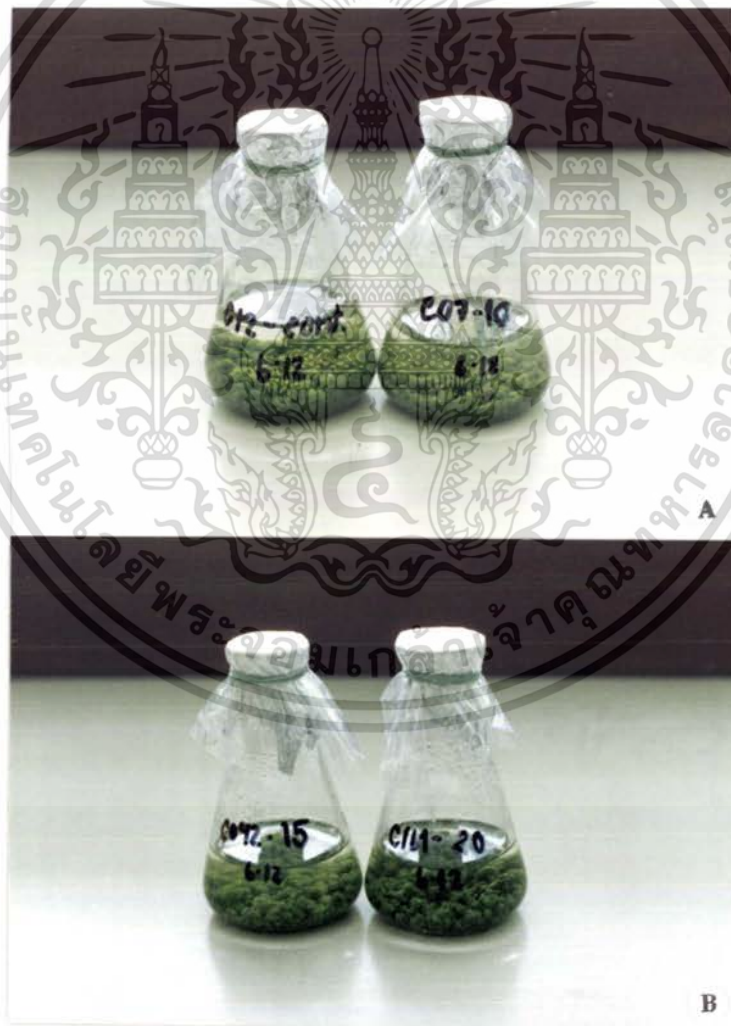
การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* พันธุ์ Jaquelyn Thomas ซึ่งเป็นโรคยอดบิด Cymbidium mosaic virus (CyMV) พบว่าโปรโตคอร์มจะมีการแบ่งตัว เพิ่มจำนวน เซลล์เป็นกลุ่ม และแตกออกเป็นก้อนขนาดเล็กๆ ปริมาณมาก เนื่องจากแรงเหวี่ยง ของเครื่องเขย่า เมื่อย้ายอาหารครบ 4 สัปดาห์ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโปรโตคอร์มได้ 3-5 มิลลิเมตร โปรโตคอร์มมีสีเขียวสด บางขวดมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ซึ่งเห็นเป็นคราบสีน้ำตาลรอบๆ ขวด ตามรอย การเขย่าของเครื่อง เมื่อครบเวลา 8 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์พบว่าขนาดของโปรโตคอร์มไม่เพิ่มขึ้นมากนัก แต่จะมีปริมาณก้อนโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อาจเนื่องจาก เครื่องเขย่ามีแรงเหวี่ยง สูง(ดังภาพที่1)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น **ภาพที่ 1** แสดงลักษณะการเจริญของโปรโตคอร์มในอาหารเหลว ซึ่งมีการนำไปใช้

## 2. การทดสอบคุณสมบัติของสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ต่อปริมาณของเชื้อไวรัส CyMV ในอาหารเหหลวงสูตร Vaccin and Went

การผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ลงในอาหารเหหลวงสูตร Vaccin and Went เมื่อโปรโตคอร์มได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 มิลลิเมตร ในระดับความเข้มข้นของสารเคมี 3 ระดับคือ 10, 15, 20 mg/l เปรียบเทียบกับโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหหลวงไม่ผสมสารเคมี พบลักษณะการเจริญดังภาพที่ 2 โปรโตคอร์มมีสีเขียวสดทั้งในขวดที่มีการผสมสารและไม่มีการผสมสารเคมี บางโปรโตคอร์มมีการเกาะกลุ่มแน่นจะพบเซลล์เนื้อเยื่อตายเป็นสีน้ำตาล ต่อมาจะหลุดจากก้อนเนื่องจากแรงเหวี่ยงของเครื่องเขย่า



ภาพที่ 2 A แสดงลักษณะโปรโตคอร์มในอาหารที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride 10 mg/l (ขวา) เปรียบเทียบกับขวดที่ไม่มีสารเคมี (control: ซ้าย)

B แสดงลักษณะโปรโตคอร์มในอาหารที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride 15 mg/l (ซ้าย) และ 20 mg/l (ขวา)

### 3. การย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Dendrobium* พันธุ์ Jaquelyn Thomas ลงในอาหารแข็ง

#### สูตร Vacin and Went

ภายหลังการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมสารเคมีในระดับต่างๆครบ 4 สัปดาห์ย้ายโปรโตคอร์ม เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went ไม่ผสมสารเคมีทำการจดบันทึกขนาดโปรโตคอร์ม แต่ละขวดที่ผ่านการผสมสารในระดับต่างๆดังภาพที่ 3 พบว่าโปรโตคอร์มในแต่ละขวดจะแบ่งเซลล์ เพิ่มขนาดสีเขียวอ่อน การเจริญของโปรโตคอร์มเป็นไปอย่างช้าๆ เลี้ยงในอาหารแข็งประมาณ 8 สัปดาห์ พบว่าก่อนโปรโตคอร์มจะมีการเกิดยอดอ่อนเล็กๆโดยทั่วไป โปรโตคอร์มสีเขียวสด วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ประมาณ 20 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโตคอร์มเริ่มต้น (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 มิลลิเมตร ) ต่อมาทำการย้ายโปรโตคอร์มลงในอาหาร แข็งสูตร Vacin and Went ที่ผสมกล้วยหอมดิบและผงถ่านเพื่อเร่งให้เกิดยอด ใบอ่อน และราก ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 3 แสดงการเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went ภายหลังการเลี้ยงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 อาหารเหลวผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ในระดับความเข้มข้น 10,15,20  
 ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น ลิขสิทธิ์ทั้งหมดและของลิขสิทธิ์สงวนโดยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่มีการนำไปใช้  
 mg/l เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับขวดโปรโตคอร์มที่ไม่ผสมสารเคมี (control)



ภาพที่ 4 A แสดงลักษณะการเจริญและการเกิดยอดอ่อนของโปรโตคอร์ัมเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Vaccin and Went เป็นเวลา 8 สัปดาห์

B แสดงการเลี้ยงโปรโตคอร์ัมในอาหารแข็งสูตร Vaccin and Went ที่มีการผสมกล้วยคิบและผงถ่านเพื่อเร่งการเจริญของเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหาร Vaccin and Went ที่ไม่ผสมกล้วยคิบและผงถ่านแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นเอกสารนี้แล้ว กรุณาส่งคืนเอกสารนี้ทันที ไม่ช้ากว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่หรือตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้เทคนิค ELISA แบบ indirect

การเลี้ยงโปรโตคอร์รัมในอาหารแข็งเป็นเวลา 4 เดือนพบว่า ยอดอ่อนของโปรโตคอร์รัม จะเกิดใบแตกออก ต่อมามีการเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อยๆ ไม่มีสีเขียวสดเกิดลักษณะของต้นกล้วยไม้ขนาดเล็ก ทำการตรวจสอบเชื้อยอดบิดของไวรัสในต้นกล้วยไม้พบว่า ที่ความเข้มข้นระดับ 10 mg/l ขึ้น ส่วนปลอดเชื้อ CyMV คิดเป็น 43.33% ที่ความเข้มข้น 15 mg/l ตรวจพบขึ้นส่วนปลอดเชื้อ 56.66% และที่ระดับความเข้มข้น 20 mg/l ตรวจพบขึ้นส่วนปลอดเชื้อ 76.66% เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ ที่ไม่มีการเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการตรวจเชื้อกล้วยไม้ที่เกิดโรคยอดบิด CyMV โดยวิธี ELISA เมื่อเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆในอาหารสูตร Vacin and Went

ลำดับที่	ยอดอ่อนกล้วยไม้ที่ผ่านการเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้น (mg/l)	เปอร์เซ็นต์ขึ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ CyMV จากการตรวจสอบโดยใช้ ELISA
1	0	25%
2	10	43.33%
3	15	56.66%
4	20	76.66%

### สรุปผลการทดลอง

การผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ในระดับความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0, 10, 15, 20 mg/l ลงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went โดยเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เป็นโรคยอดบิด Cymbidium mosaic virus เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ก่อนที่จะนำมาเลี้ยง ในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่มีการเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride จะเกิดการติดเชื้อไวรัสเมื่อทำการตรวจสอบคิดเป็น 75% ส่วนต้นที่มีการผสมสารเคมีในระดับ 10 mg/l จะมีอัตราการติดเชื้อโรคน้อยคิดเป็น 17 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ 43.33% สารเคมีระดับ 15, 20 mg/l จะมีอัตราการปลอดเชื้อคิดเป็น 56.66% และ 76.66% ตามลำดับ แสดงว่าสารเคมีในระดับ 20 mg/l มีประสิทธิภาพในการควบคุมและกำจัดโรคน้อยของกล้วยไม้ได้ดีที่สุด ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาและตรวจเช็คกล้วยไม้ในสภาพปลูกต่อไป



## วิจารณ์การทดลอง

จากการศึกษาถึงคุณสมบัติของสารเคมี 1-Adamantanamine hydrochloride (Amantadine) ในระดับต่างๆเพื่อใช้ในการผลิตกล้วยไม้ นั้น การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มให้ได้ปริมาณมากเป็นสิ่งจำเป็นในการทดลองนี้พบว่าขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มใช้เวลานานเนื่องจากโปรโตคอร์มไม่ได้ขนาดตามต้องการคือเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร แต่จะมีจำนวนปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเครื่องเขย่ามีแรงเหวี่ยงสูง แต่การใช้โปรโตคอร์มที่มีขนาดเล็กนั้นมีผลคือ ทำให้สารเคมีสามารถแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อเซลล์ของโปรโตคอร์มเพื่อทำลายเชื้อไวรัสได้ง่ายกว่าโปรโตคอร์มที่มีขนาดใหญ่และปัญหาที่พบระหว่างการเพิ่มโปรโตคอร์มคือการปนเปื้อนของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียในขวดอาหารเหลว สอดคล้องกับรายงานของพิศิษฐ์ ( 2532 ) ที่ว่าปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและการเจริญของเนื้อเยื่อ มีหลายประการเช่น ขนาดของเนื้อเยื่อที่ตัดออกมาเลี้ยง สัดส่วนที่เหมาะสมของแร่ธาตุต่างๆในอาหาร เช่นมีการเติมน้ำมะพร้าว เพื่อเร่งการเจริญของนิวเคลียส ซึ่งในน้ำมะพร้าวมีสารพวก ไคมิน(Kinin) ทำให้อัตราการแบ่งตัวของนิวเคลียสเร็วขึ้น (ถาวร,2532) ปริมาณอากาศที่เนื้อเยื่อนั้นๆต้องการ ความเข้มของแสงในระยะต่างๆของการเจริญเติบโต รวมไปถึงการเกิดเชื้อปนเปื้อนเข้ามาในขวดเพาะเลี้ยงเนื่องจากความสะอาดและความบริสุทธิ์ของอุปกรณ์และสารเคมีระหว่างการทดลอง Morel (1960)รายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้วา สามารถทำได้สำเร็จได้โดยการเติมน้ำมะพร้าว หรือน้ำสับปะรดในอาหารวุ้น เมื่อย้ายโปรโตคอร์มจากขั้นตอนการเลี้ยงอาหารผสมสารเคมีนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went พบว่า การเจริญของโปรโตคอร์มในระยะแรกช้ามากแล้วจึงค่อยๆเจริญเป็นเนื้อเยื่อสีเขียวอ่อนเกือบขาวต่อมาจึงเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม Sagawa (1962)ได้ทดลองถ่ายขวดต้นอ่อนกล้วยไม้ลงในอาหารวุ้น สูตร Vacin and Went ซึ่งคัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 20% พบว่าต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้ดี ต่อมาเมื่อย้ายลงในอาหารสูตรผสมกล้วยหอมคิบและผงถ่าน จะมีการเจริญเร็วขึ้นแทนที่จะเจริญในรูปโปรโตคอร์ม ดังที่ Morel (1964) รายงานว่า โปรโตคอร์มเจริญเป็นเนื้อเยื่อก้อนใหญ่มีรากขนเกือบรอบตัวเกิดยอดเกิดขึ้นมากมายพร้อมๆกัน คล้ายกับโปรโตคอร์มหลายๆอันที่มีโคนร่วมกัน สอดคล้องกับรายงานของ มานพ (2509) ซึ่งทำการเปรียบเทียบผลระหว่าง การใส่กล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า โดยใช้กล้วยชนิดละ 300 กรัม บดละเอียดลงในอาหารวุ้นพบว่า สูตรที่ใส่กล้วยหอมให้ผลดีที่สุด แสดงว่าในเนื้อกล้วยมีสารบางชนิดที่มีผลในการเร่งการเจริญเติบโตของลูกกล้วยไม้ในระยะหลัง โดยสังเกตจากการเปรียบเทียบกับอาหารวุ้นที่ไม่ใส่กล้วยในระยะแรก

จากการทดลองของ วิรุฬห์รัตน์และศิริพร (2538) โดยนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium Jaquelyn Thomas* ที่เกิดโรคยอดบิด *Cymbidium mosaic virus* เลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารแข็งสูตร Vacin and Went มีการเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ในความ

เข้มข้น 0,10,20,25,50,75 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้เทคนิค ELISA พบว่า โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหลวผสมสารเคมีระดับ 10 mg/l จะมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อไวรัส CyMV มากที่สุดคือ 48.64% ในการทดลองครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองของ วิรุฬห์รัตน์ และ ศิริพร (2538) พบว่าสารเคมีระดับ 20 mg/l จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า 10 mg/l ทั้งนี้อาจเนื่องจากการตรวจสอบเชื้อไวรัสทำในระยะเวลาที่กล้วยไม้เจริญแตกต่างกัน คือการทดสอบในระยะที่เป็นโปรโตคอร์มภายหลังการเลี้ยงในอาหารเหลวผสมสารเคมี 4 สัปดาห์ และการทดสอบเมื่อกล้วยไม้เกิดยอดอ่อนภายหลังการเลี้ยงในอาหารเหลวผสมสารเคมี 4 สัปดาห์ แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหารแข็งจนกระทั่งเกิดยอดอ่อน เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ทดลองนานกว่าอาจทำให้การแทรกซึมของสารเคมีเมื่อเจริญถึงจุดที่เป็นยอดอ่อนมีการเข้าทำลายอนุภาคไวรัสสูงกว่าในระยะที่เป็นโปรโตคอร์ม หรือ ต้นกล้วยไม้ในระยะที่เป็นยอดอ่อนมีกลไกในการทำลายเชื้อไวรัสเนื่องจากการเลี้ยงในอาหารผสมสารเคมีสูงกว่าในระยะที่เป็นโปรโตคอร์ม หรืออาจเนื่องจากการทดลองนี้ใช้โปรโตคอร์มที่มีขนาดเล็กเมื่อเลี้ยงในอาหารผสมสารเคมี จึงมีโอกาสที่สารเคมีจะแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อเซลล์ได้มากกว่าทำให้ผลที่ได้แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามในการผลิตกล้วยไม้ให้ปราศจากเชื้อไวรัส โดยใช้สาร 1-Adamantanamine hydrochloride ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีแนวโน้มในการผลิตได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ดังนั้นน่าจะมีการทดลองต่อเนื่องโดยการตรวจเช็คต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเคมีอย่างต่อเนื่องในระยะต่างๆ เช่น ทดสอบเชื้อไวรัสทุกๆ 3 เดือน สังเกตอาการผิดปกติ การเจริญเติบโตการออกดอกและคุณภาพช่อดอก เพื่อการวิเคราะห์อย่างถูกต้องและชัดเจนต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- ครรชิต ธรรมศิริ. 2530. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. สถานีทดลองพืชสวนบางกอกน้อย, กรุงเทพฯ.
- ถาวร วัชรภักย์. 2530. สภาพปัจจุบันของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในประเทศไทย. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช. 2:5-7.
- ถาวร วัชรภักย์. 2532. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความผันแปรของเมอร์โคลอน(Mericlone) แผนกวิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ถาวร วัชรภักย์. 2532. ความผันแปรของเซลล์ร่างกายกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช. 11:8-9.
- ธีระ สุตะบุตร. 2535. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของของพืชสำคัญในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 310 น.
- พรทิพย์ ธนุทอง. 2528. การผลิตพืชปราศจากไวรัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช 144 น.
- พรรณิภา ชุมศรี. 2532. การเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรมะเขือเทศ. ข่าวสารไม้ประดับสมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย 14(11): 17-20.
- พิศิษฐ์ วรอุไร. 2532. การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 87-91.
- พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ. 2332. เทคโนโลยีชีวภาพกับการเกษตรในประเทศไทย. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช 11:8-9.
- มานพ แก้วปารุง. 2509. การเปรียบเทียบสูตรวุ้นสำหรับถ่ายขวดเพาะกับการเจริญเติบโตของลูกช้าง. ปรินญาณิพนธ์ปรินญาตริ คณะสถิกรรมและสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วิรุฬห์รัตน์ พงษ์เศรฐเสนา และ ศิริพร ตรงมาลี. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- สมศิริ แสงโชติ. 2529. โรคพืชเบื้องต้น บทปฏิบัติการ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 324 น.
- สุรภี กิริติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร, นวลจันทร์ ดีมา. 2532. การตรวจ CyMV โดยวิธี DOT-ELISA และ DAS-ELISA. วารสารวิชาการเกษตร 7(1-3):38-43.
- อรดี สหัชรินทร์. 2531. กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช 5:7-8.
- อรดี สหัชรินทร์. 2532. โครงการวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืชศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 10:11-13.
- Horst, R..K. and Cohen, D..1980. Amadidine supplemented tissue culture medium: A method for obtaining chrysanthemums free of chrysanthemums stunt viroid . Acta Hort. 110:315-319.
- Hu, J.S., S. Ferreira, M.Q. Wang. 1993. Detection of Cymbidium mosaic virus , Odontoglossum ringspot virus , Tomato spotted wilt virus and Potyviruses orchids in Hawaii. Plant Disease 77:464-468.
- John, L.S..1993. Virus-free plants .Plant Cell Culture .Oxford University press 230 pp.
- Kim, K.W. and S. Kako. 1984. Studies on clonal propagation in the Cymbidium cloral organ culture in vitro. J.Kor.Soc Hort.Sci. 25:65-71.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 Morel, G.M..1960. Producing virus-free Cymbidium. AOS. Bull 29:495-497.  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดใจไปเผยแพร่เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า  
 ลาดกระบัง

- Morel, G.M..1964.Tissue Culture -A new means of clonal propagation of orchid.  
AOS.Bull. 33:473-477.
- Reinert, J., Y.P.S. Bajaj and A.N. Rao.1977.Tissue culture in the Orchid Industry.Plant Cell Tissue and Organ Culture.Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York : 44-65.
- Ryo, K.H., W.M. Park, S.Y. Chung and K.E.Yoon.1995.Occurrence of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum Ring spot Virus in Korea . Plant Disease 79(3):321.
- Sagawa, Y.and T. Shoji.1967.Clonal propagation of Dendrobium though shoot meristem culture.Amer.Orch.Soc.Bull 36:856-859.
- Walkey, D.G.A..1983.Production of virus-free plant by tissue culture methods for plants patholoyists. Black well scientific Publication 272 pp.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางภาคผนวกที่ 1

### สูตรอาหาร Vacin and Went (1949)

constituents	Chemical form	Amount per litre
Tricalcium phosphate <sup>a</sup>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0.20 g
Potassium nitrate	$\text{KNO}_3$	0.53 g
Monopotassium acid phosphate	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.25 g
Magnesium sulfate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
Ammonium sulfate	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50 g
Manganese sulfate <sup>b</sup>	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 ml
Sucrose		20 g
Agar <sup>c</sup>		8 g
Water		845 ml
Coconut water		150 ml
Ion chelate <sup>d</sup>		5 ml
pH 4.8-5.0		

#### หมายเหตุ

a = ละลายด้วย 1 N HCl

b = stock solution ใช้ 2.85 g/ น้ำ 500 ml

c = ใส่ลงในอาหารเมื่อต้องการทำอาหารแข็งในการทดลอง

d = stock solution โดยใช้  $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$  1.14 g/ น้ำ 100 ml

หรือใช้  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.56 g/l ผสม  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  7.46 g/l ดูกใช้ปริมาณ 5 ml/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางภาคผนวกที่ 2

### สูตรอาหาร Modified Vacin and Went (1949) สำหรับย้ายต้นกล้า

constituents	Chemical form	Amount per litre
Tricalcium phosphate <sup>a</sup>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0.20 g
Potassium nitrate	$\text{KNO}_3$	0.53 g
Monopotassium acid phosphate	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.25 g
Magnesium sulfate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
Ammonium sulfate	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50 g
Manganese sulfate <sup>b</sup>	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 ml
Sucrose		20 g
Agar <sup>c</sup>		8 g
Water		845 ml
Coconut water		150 ml
Ion chelate <sup>d</sup>		5 ml
กล้วยหอมคิบบด		100 g
ผงถ่าน		0.5 g
pH 4.8-5.0		

#### หมายเหตุ

a = ละลายด้วย 1 N HCl

b = stock solution ใช้ 2.85 g/ น้ำ 500 ml

c = ใส่รูลงไปในอาหารเมื่อต้องการทำอาหารแข็งในการทดลอง

d = stock solution โดยใช้  $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$  1.14 g/ น้ำ 100 ml

หรือใช้  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.56 g/l ผสม  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  7.46 g/l ดูกใช้ปริมาณ 5 ml/l

### ตารางภาคผนวกที่ 3

1-Adamantanamine hydrochloride โดยการเตรียม

1. stock solution = 0.5 g/น้ำ 200 ml

2. ในการเติม 1- Adamantanamine hydrochloride

ความเข้มข้น 10 mg/l คุค stock solution 1.6 ml/ อาหาร 400 ml

ความเข้มข้น 15 mg/l คุค stock solution 2.4 ml/ อาหาร 400 ml

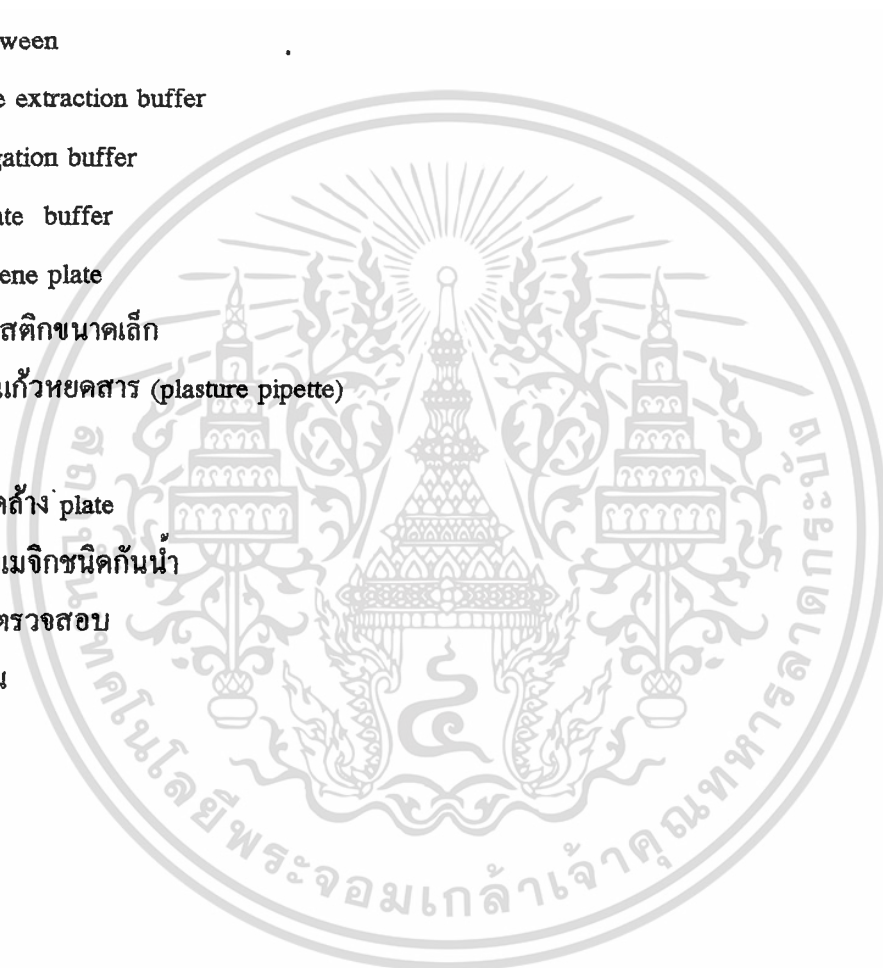
ความเข้มข้น 20 mg/l คุค stock solution 3.2 ml/ อาหาร 400 ml



## ตารางภาคผนวกที่ 4 การตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยใช้วิธี ELISA

### อุปกรณ์และสารเคมี

1. Anti-Goat IgG alkaline phosphate conjugate
2. เชื้อไวรัส Cymbidium mosaic virus (CyMV)
3. Coating buffer
4. PBS-Tween
5. Sample extraction buffer
6. Conjugation buffer
7. Substrate buffer
8. Polystyrene plate
9. ถังพลาสติกขนาดเล็ก
10. หลอดแก้วหยดสาร (plasture pipette)
11. ลูกยาง
12. ขวดฉีดล้าง plate
13. ปากกาเมจิกชนิดกันน้ำ
14. ตารางตรวจสอบ
15. น้ำกลั่น



การเตรียมบัฟเฟอร์**Coating buffer (pH 9.6)**

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1.59 g
--------------------------	--------

$\text{NaHCO}_3$	2.93 g
------------------	--------

$\text{NaN}_3$	0.20 g
----------------	--------

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

**PBS (pH7.4)**

$\text{NaCl}$	8.00 g
---------------	--------

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.20 g
--------------------------	--------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.90 g
---	--------

$\text{KCl}$	0.20 g
--------------	--------

$\text{NaN}_3$	0.20 g
----------------	--------

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

**PBS-Tween**

หยด 0.5 ml Tween 20 ลงใน PBS 1 ลิตร

**Sample extraction buffer**

ผสม 2%PVP- 4000 (Polyvinyl pyrotidine 4000) ลงใน PBS-Tween 300 ml

**Conjugation buffer**

ผสม 0.2% Ovalbumin ลงใน Sample extraction buffer 25 ml

**Substrate buffer**

Diethanolamine	97 ml
H <sub>2</sub> O	800 ml
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.8 ด้วย HCl เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี Indirect ELISA

1. วางแผนการตรวจสอบตัวอย่าง ลงบนตารางตรวจสอบและมีหลุมเปรียบเทียบ คือ
  - หลุมที่ 1 เป็นตัวอย่างของกล้วยไม้ที่ไม่เป็นโรค (Healthy)
  - หลุมที่ 2 เป็นตัวอย่างของกล้วยไม้ที่เป็นโรค (Disease)
  - หลุมที่ 3 เป็นตัวอย่างของ Coating buffer
  - หลุมที่ 4 เป็นตัวอย่างของ Anti-Goat IgG
  - หลุมที่ 5 เป็นตัวอย่างของ substrate
2. บดตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบ โดยนำตัวอย่างพืชใส่ในถุงพลาสติกขนาดเล็ก จำนวน 1 ตัวอย่างต่อ 1 ถุง จากนั้นหยด Coating buffer ลงในถุงตัวอย่างให้ได้น้ำคั้นเข้มข้น 1: 20 (W/V)
3. หยดน้ำคั้นตัวอย่างพืชทดสอบที่บดใน coating buffer ลงใน plate ปริมาณ 100  $\mu$ l ต่อหลุม (ประมาณหลุมละ 4 หยดโดยการใช้ pasture pipette) ควรระวังการปนเปื้อนใน plate หรือหลุมอื่น
4. นำ plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทแล้ววางบนพื้นเรียบในอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30°C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C
5. เมื่อครบกำหนด 2 ชั่วโมง ในการบ่ม plate แล้วทำการล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที โดย
  - 5.1 สะบัด plate แร้งๆ เพื่อให้ น้ำคั้นออกจากหลุม
  - 5.2 หยด PBS-Tween ลงในหลุม ควรระวังการปนเปื้อนระหว่างหลุม
  - 5.3 วาง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาทีเป็นการล้างครั้งที่ 1
  - 5.4 ทำการล้างเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง
  - 5.5 เมื่อล้างครบ 3 ครั้ง คว่ำ plate โดยตบแรงๆบนกระดาษซับหรือผ้า
6. หยอด antiserum 1: 100 ซึ่ง dilute ใน conjugate buffer โดยใช้ CyMV antiserum 60  $\mu$ l ใน conjugate buffer 6 ml
7. จากนั้นนำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
8. ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที (ตามข้อ 5)
9. หยอด Anti-Goat IgG (แอนติบอดีของแพะผลิตในกระต่าย) หลุมละ 100  $\mu$ l ที่ conjugate ไว้ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ dilute ใน conjugate buffer (ความเข้มข้น 1:2000 โดยเก็บไว้ใช้ต่อเนื่อง 3 ครั้ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสาร  
 10. นำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 11. ชุด Anti-Goat IgG เก็บเข้าตู้เย็นเพื่อใช้ในครั้งต่อไป ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. ล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
13. นำ Phosphate Substrate 5 mg/10 ml (2 เม็ด/1 plate) ละลายใน Substrate buffer แล้ว หยด Substrate ลงใน ELISA plate หลุมละ 100  $\mu$ l ทำการตรวจผลปฏิกิริยาหลังจากทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้สีเหลืองของปฏิกิริยาชัดเจนยิ่งขึ้น
14. การตรวจปฏิกิริยาที่เป็นบวก มีข้อสังเกตดังนี้คือ  
สีเหลืองเห็นชัดด้วยตาเปล่าเป็นบวกซึ่งแสดงว่าหลุมที่หยอดตัวอย่างเป็นโรคไวรัสและสำหรับหลุมเปรียบเทียบ(disease control)จะต้องมีปฏิกิริยาเป็นบวกเสมอและจะไม่เกิดสีในหลุมเปรียบเทียบอื่นๆ



ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ด้วยวิธี ELISA ของกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ภายหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวผสมสารเคมี 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 1 เดือน

การทดลองที่	ผลการตรวจเชิงปฏิบัติกริยาของกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลวผสมสารเคมีในระดับต่างๆ							
	0 mg/l		10 mg/l		15 mg/l		20 mg/l	
	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-	-
5	+	-	-	-	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	-	+
7	+	+	+	+	+	+	-	-
8	+	-	+	+	+	+	+	-
9	+	+	-	-	+	+	+	+
10	+	+	-	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	-	-
12	-	-	-	-	+	+	-	-
13	-	-	+	+	+	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

การทดลองที่	ผลการตรวจเชื้อปฏิกิริยาของกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหาร เหลวผสมสารเคมีในระดับต่างๆ							
	0 mg/l		10 mg/l		15 mg/l		20 mg/l	
	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2
16	+	+	-	-	-	-	-	+
17	+	+	+	+	+	-	-	+
18	+	+	+	-	+	-	-	-
19	+	+	+	+	-	+	-	-
20	+	+	-	+	-	+	-	+
21	+	+	-	-	-	-	-	+
22	+	-	-	-	-	-	-	-
23	+	+	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	-	-	-	-
25	+	+	+	+	-	-	-	-
26	+	+	-	-	-	-	-	-
27	+	+	-	-	-	-	-	-
28	+	-	+	+	-	-	-	-
29	-	-	+	+	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-
ตัวอย่างที่ตรวจ สอบไม่พบเชื้อ CyMV	5	10	14	12	15	19	25	21
เฉลี่ย	7.5		13		17		23	
เปอร์เซ็นต์การ ปลอดโรค	25		43.33		56.66		76.66	

หมายเหตุ + หมายถึง การเกิดปฏิกิริยาของเชื้อไวรัส CyMV

- หมายถึง ไม่เกิดปฏิกิริยาของเชื้อไวรัส CyMV

