



**สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง**

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อไวรัสใบด่างฟักทอง

The Effect of Antiviral Compound On Papaya Ring Spot

Virus of Pumpkin In Vitro



T099092

โดย

นางสาวศิริลักษณ์ ฤทธิรักษา

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.นवलพรรณ งามยี่สุ่น

ร/พ.  
ศ 484 ก  
8536

เสนอ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....99092.....
วัน,เดือน,ปี...15 Jun 2009.....

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2536

## คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความอนุเคราะห์และอุปการ-  
คุณจากบุคคลที่ทรงเกียรติหลาย ๆ ท่านที่ได้ให้การสนับสนุนและคำปรึกษาแนะนำในทุก ๆ ด้าน ซึ่ง  
หากขาดบุคคลเหล่านี้ ปัญหาพิเศษฉบับนี้ก็มีอาจสำเร็จได้อย่างแน่นอน

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ และขอขอบคุณทุกท่านที่ได้กล่าวถึงเป็นอย่างสูงมา ณ  
โอกาสนี้ด้วย ได้แก่

1. คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุน และช่วยเหลือทางด้านปัจจัย เงินทองทุกสิ่ง  
ทุกอย่าง พร้อมทั้งให้กำลังใจเสมอมา
2. อาจารย์ ดร.นवलพรรณ งามยี่ลู่่น ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่  
เคารพได้ให้คำปรึกษา และข้อแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จ  
อย่างสมบูรณ์
3. อาจารย์ ดร.ปัญญา โพธิ์จตุรัตน์ ที่ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำต่าง ๆ ใน  
การใช้โปรแกรมทางสถิติ เพื่อนำมาใช้ในการเรียบเรียงข้อมูลและประมวลผลข้อมูลต่าง ๆ ทาง  
สถิติได้เป็นอย่างดี
4. เพื่อน ๆ น้อง ที่เป็นทั้งแรงใจและแรงกระตุ้นที่ช่วยผลักดันให้ปัญหาพิเศษสำเร็จ  
ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศิริลักษณ์ ฤทธิรักษา

ชื่อเรื่อง การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งเชื้อไวรัสใบด่างฟักทอง

The Effect of Antiviral Compound On Papaya Ring

Spot Virus of Pumpkin In Vitro

โดย นางสาวศิริลักษณ์ ฤทธิรักษา

ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.นवलพรรณ งามยี่สุ่น

#### บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นฟักทองที่แสดงอาการใบด่างนั้นได้ใช้ชิ้นส่วนของลำต้น มาทำการฆ่าเชื้อด้วย ethanol 70 % นาน 1 นาที ตามด้วยการแช่ในสารละลาย clorox 20 % ซึ่งมีส่วนผสมของ Tween20 ประมาณ 2 หยด นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที การทดลองชักนำชิ้นส่วนให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารตัดแปลงสูตร Murashige and skoog (1962) ที่เติม benzyladenine 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด ส่วนการทดสอบสารยับยั้งเชื้อไวรัสใบด่างฟักทองโดยใช้สารเคมี 6-azauracil ที่อัตราความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ความเข้มข้น คือ 1 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เป็นพิษต่อการเจริญของต้นฟักทอง ที่ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปราศจากเชื้อ

## ABSTRACT

Title : The Effect of Antiviral Compound On Papaya Ring Spot Virus

By : SIRIRAK RITTILUKSA

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Department : Pest Management Technology

Advisor : .....*N. Ngamyeesoon*.....

(Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

.....*10 May 1994*.....

Infected pumpkin stems by papaya ring spot virus (PRSV) was used as explants to establish in tissue culture. These explants were surface sterilized with 70 % ethanol for 1 minute followed by 20 % clorox containing a few drops of Tween 20 for 20 minutes then washed three times with sterile distilled water (leave for 5 minutes each time). Murashige and Skoog (1962) supplemented with 20 % sucrose and 0.5 mg/litre of benzyladenine (BA) showed excellent proliferation and produced new shoot within 4 weeks. Antiviral compound (6-azauracil) at concentration of 1,10 and 100 mg/litre was added in the medium in order to eradicate the virus. However, phytotoxic effect on the explants was observed after 4-6 weeks.

## สารบัญ

เนื้อเรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการทดลอง	14
สรุปผลการทดลอง	22
วิจารณ์ผล	23
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	29

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลของการศึกษาสารฟอกฆ่าเชื้อที่มีต่อการทำความสะอาดชิ้นส่วน	15
2. ผลของการศึกษาสารเร่งการเจริญเติบโตของต้นผักทอง	17
 ตารางผนวกที่	
1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส	30
2. สูตรอาหารดัดแปลงของ Murashige + Skoog (1962)	31
3. แสดงค่าเฉลี่ยการเจริญของ Callus ผักทอง ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ของ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	33
4. แสดงค่าวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของ Callus ผักทอง ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ของ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	34
5. แสดงค่าเฉลี่ยของความสูง ในการใช้ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	35
6. แสดงค่าวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าเฉลี่ยความสูง ในการใช้ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	36
7. แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนข้อ ในการใช้ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	37
8. แสดงค่าวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าเฉลี่ยจำนวนข้อ ในการใช้ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	38

(ช)

### สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงลักษณะ ใบผักทองปกติ เนื่องจากไม่ได้รับการปลูกเชื้อ Papaya Ring Spot Virus (PRVS)	14
2. แสดงลักษณะ ใบต่าง เนื่องจากได้รับการปลูกเชื้อและถ่ายทอด เชื้อ Papaya Ring Spot Virus (PRVS)	14
3. แสดงลักษณะของต้นผักทองเมื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % นาน 1 นาที สารละลาย Clorox 20 % ซึ่งมีส่วนผสม ของ Tween 20 ประมาณ 2 หยด และ เบนโนมิล 0.5 g/l	16
4. แสดงการเจริญเติบโตของต้นผักทองใบต่างในระดับความเข้มข้น ของ BA ที่ต่างกัน	19
5. แสดงผลของการใช้เคมี 6-azauracil เพื่อยับยั้งเชื้อไวรัส ใบต่างผักทองในแต่ละความเข้มข้น	21

## คำนำ

ฟักทอง เป็นพืชผักที่คนไทยนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลายมานานแล้ว เพราะฟักทองสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายชนิดทั้งความและหวานและเป็นพืชผักที่มีแคโรทีนสูง เมื่อรับประทานเข้าไปสารแคโรทีนก็จะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอซึ่งช่วยบำรุงสายตา เนื้อฟักทองมีวิตามินเอถึง 2,220 หน่วยสากล ส่วนยอดฟักทองมีวิตามินเออยู่ถึง 2,780 หน่วยสากล ฟักทองมีชื่อภาษาอังกฤษ Pumpkin ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cucurbita moschata* (Duck) Pair อยู่ในวงศ์เดียวกับฟัก แพง และแตงกวา คือ วงศ์ Cucurbitaceae เป็นไม้เถาอ่อน (ฉลองชัย 2528) จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไวรัสของพืชตระกูลแตง จำนวน 635 ตัวอย่างใน 10 จังหวัดของภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ระหว่าง เดือนตุลาคม พ.ศ.2533 ถึง เดือน พฤศจิกายน พ.ศ.2534 พบว่าไวรัสพวก Papaya Ring Spot Virus (PRSV) ระบาดในฟักทองถึง 62 % (กลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร 2535) ซึ่งหากเราไม่หาวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวนี้ในฟักทอง จะทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพของผลไม่เป็นที่ต้องการของตลาด อีกทั้งยังสูญเสียคุณค่าทางสารอาหารได้ ดังนั้นการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดไวรัส แม้จะเป็นสิ่งที่ทำได้ยากมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคอื่น ๆ เช่น เชื้อรา และแบคทีเรีย แต่การศึกษาค้นคว้าหาสารเคมีและวิธีการใช้ที่เหมาะสมก็ยังเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อป้องกันการรักษาทหรือพวงให้พืชสามารถให้ผลผลิตได้ตามปกติ และนับตั้งแต่พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือเซลล์พืชให้เจริญและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็นับเป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างหนึ่งในการศึกษาหาวิธีป้องกันกำจัดไวรัส ซึ่งจำเป็นจะต้องทำการทดลองในห้องปฏิบัติการก่อนการประยุกต์ไปใช้อย่างจริงจังในสภาพไร่ ทั้งนี้การป้องกันกำจัดไวรัสนั้นจะได้ผลหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถของพืชในการรับเอาสารเคมีไปกระตุ้นให้เกิดผลยับยั้งไวรัสโดยสารเคมีนั้นไม่ทำอันตรายหรือสะสมในปริมาณมากจนเป็นพิษต่อพืช ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาและคำนวณปริมาณของสารเคมีที่จะใช้ รวมทั้งระยะเวลาการให้ เพื่อที่พืชจะมีความสามารถป้องกันหรือยับยั้งไวรัสได้ตลอดเวลา

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของต้นผักทองใบต่าง
2. เพื่อศึกษาหาปริมาณของสารฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นผักทองใบต่าง
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมี 6-azauracil ในอัตราความเข้มข้นที่ต่างกันต่อการแพร่กระจายเชื้อไวรัส ในต้นผักทองที่เพาะเลี้ยงในสภาพปราศจากเชื้อ

### การตรวจเอกสาร

การกำจัดเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิคเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วในพืชหลาย ๆ ชนิด โดยอาจนำสารเคมีหรือความร้อนเข้ามาช่วย Morel และ Martin (1952) ได้ทำการทดลองโดยกำจัดเชื้อไวรัสจากต้นรักเร่ โดยใช้ส่วน meristem tip ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และในปี 1955 ได้ทำการทดลองกับมันฝรั่ง เทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นได้แพร่หลายมากในการผลิตพืชหลายชนิดให้ปราศจากเชื้อไวรัส โดยเทคนิคพื้นฐานนั้นจะต้องตัดเอาส่วนต่าง ๆ ที่เหมาะสมจากต้นแม่ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย เอามาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากเชื้อ เมื่อเจริญเป็นต้นเล็ก ๆ แล้วจึงนำไปปลูกในดิน

สำหรับอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้กันอยู่ปัจจุบันจะใช้ Murashige and Skoog's Medium (1962) ซึ่งสามารถใช้กับพืชได้หลายชนิด (De Fossard 1976)

การใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อไวรัสนั้นได้มีการพยายามใช้ แต่ก็พบกับปัญหาเรื่องราคา และความเป็นพิษต่อพืช (Tomlinson 1982) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช เช่น ไซโตไคนิน (Cytokinins) ต่อการกำจัดเชื้อไวรัสในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยง Meristem tip (Quak 1961) และในความเข้มข้นสูงๆ จะกระตุ้นพืชอาศัยมากกว่าการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส อย่างไรก็ตามทฤษฎีนี้มีหลักฐานในการทดลองไว้น้อยมาก (John stone และ Wods 1946)

Cohen และ Walkey (1978) ได้ทำการศึกษาโดยทำการถ่ายทอดเชื้อไวรัส Cucumber Mosaic Virus (CMV) ลงในต้นยาสูบ และนำส่วนของ meristem tip มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีอัตราความเข้มข้นของปริมาณฮอร์โมน ไซโตไคนิน (Cytokinins) และออกซิน (Auxins) ในระดับที่แตกต่างกัน จากการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณฮอร์โมนที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน สามารถลดการเจริญ และการแพร่กระจายของไวรัส แต่ไม่สามารถกำจัดไวรัสให้หมดไปได้

Shepard (1977) Gassells และ Long (1980) รายงานว่าภายหลังที่ได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการกำจัดไวรัส ต่อมาก็ได้พัฒนาการใช้สารเคมี พวกที่มีฤทธิ์ต่อต้านขบวนการเมตาบอลิซึมของไวรัส เช่น Virazole ตัวอย่างสารเคมีพวก Virazole ที่ใช้ได้แก่ Ribavirin [1,2,4 - triazole - 3 - Carboxamide Syn

Virazole] โดยนำส่วนของพืชที่ต้องการทดลอง ไปเลี้ยงบนอาหารที่มีสารนี้ผสมอยู่ และนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากอุณหภูมิสูงและสารเคมีที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะขัดขวางการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อพืช ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญในอัตราสูงกว่า จึงทำให้เนื้อเยื่อพืชบางส่วนปลอดจากเชื้อ

Stone (1982) กล่าวว่า การนำสารเคมีมาใช้ในการกำจัดเชื้อไวรัสนั้น มีวิธีการทำแต่ในห้องทดลองเท่านั้น เนื่องจากราคาแพง และอาจเกิดพิษกับพืชได้ สำหรับสารพวก antiviral ตัวอื่นได้แก่ adenine arabinoside (Syn.Vira A, vidarabine) ได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไวรัสจากส่วน meristem tip ที่ติดเชื้อ

Antoniw และคณะ (1981) รายงานว่า ถึงแม้ว่าสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช จะไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้โดยตรง แต่จะมีผลในการกระตุ้นให้พืชเจริญได้เร็วกว่า อัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส

Pink และ Walkey (1984) รายงานว่า เทคนิคการทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ถูกพัฒนามาใช้สำหรับเพิ่มปริมาณผักทองให้เร็วขึ้น โดยทำการเพาะเมล็ดในอาหารสูตร MS ซึ่งมีปริมาณของไคเนติน (Kinetins) 2.5 mg/l และ IAA (3 - indoleacetic acid) 8 mg/l หลังจากนั้นจึงย้ายส่วน meristem-tip มาเลี้ยงในอาหาร MS ซึ่งปริมาณของ BA (benzyladenine) 1 mg/l โดยไม่มีออกซิน (Auxins) เพื่อกระตุ้นให้มีการเกิดหน่อจำนวนมาก หลังจากนั้น 2-3 อาทิตย์ ก็เปลี่ยนสูตรอาหารใหม่โดยมีปริมาณของ IAA (3-indoleacetic acid) 8 mg/l และไม่มีไซโตไคนิน (Cytokinins) พบว่าพืชจะหยั่งรากออกมาในอาหารนั้นมากมาย จากรายงานยังได้กล่าวว่าผักทอง (*Cucurbita pepo* L.) พันธุ์ Cinderella มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส เช่น Cucumber Mosaic Virus (MV) แต่ไม่สามารถกำหนดขึ้นสำหรับความต้านทานนี้ได้

Shepard (1977) ได้มีการศึกษาสาร antiviral ที่ชื่อว่า Virazole (1, 2,4-triazole-3-carboxamide) ในการลดการติดเชื้อของไวรัสในมันฝรั่ง (Potato Virus) โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) ของใบยาสูบ โดยทำการปลูกเชื้อ Potato Virus X (PVX) ลงในโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของยาสูบ จากนั้นจึงนำไปทดสอบการต้านเชื้อของ Virazole ในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ จากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 10 mg/l ของ virazole สามารถลดการติดเชื้อไวรัส PVX ได้อย่างรวดเร็ว

เหตุผลในการเลือกศึกษา Virazole เนื่องจากสาร virazole สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้อย่างกว้างขวางทั้งเชื้อไวรัสที่มี nucleic acid แบบ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) เกี่ยวกับฤทธิ์ของ Virazole ยังพบหลักฐานไม่มากนัก จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยต่อ ๆ มา

Huber และ Schuster (1992) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส PVX ของสารประกอบในกลุ่มพิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) โดยทำการปลูกเชื้อลงในใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) พบว่าสารประกอบเหล่านี้จะไปมีผลต่อการจำลองตัวเอง (replication) ของไวรัส ทำให้ไวรัสไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ สารประกอบเหล่านี้ได้แก่ 6-azauracil, 8-azadenine, 8-azaguanine และ 6-(n-propyl)-2-thiouracil

Haldeman และคณะ (1987) ได้ทำการทดลองหาประสิทธิภาพของเบนโนมิล (Benomyl) และไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อราและยาปฏิชีวนะตามลำดับ ในการป้องกันการเกิดปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรีย ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืช 2 ชนิด คือ *Camellia sinensis* และ *C. japonica* โดยใช้ส่วนของลำต้นมาล้างน้ำที่ผสมด้วยสารละลายทวิน 20 (Tween 20) 0.1% นาน 5 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด นาน 5 นาที และนำมาล้างด้วยอัลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ แล้วนาน 5 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ (clorox) 20% ผสมกับสารละลายทวิน 20 (Tween 20) 0.1% นาน 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ต่อกจากนั้นทำการตัดให้มีขนาดประมาณ 1.5-2.0 ซม. แล้วนำไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS โดยใช้อัตราส่วนผสมของยาทั้งสองชนิด ดังนี้คือ เบนโนมิล (Benomyl) ในอัตราส่วน 1 2 และ 4 g/lit และ ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ในอัตราส่วน 10 25 และ 50 mg/l ใส่พร้อมกับอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นก็นำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน โดยพบว่า *C. sinensis* เบนโนมิล (Benomyl) ที่ความเข้มข้น 1 g/l และ ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) 10 mg/l จะให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ส่วนใน *C. japonica* เบนโนมิล ที่ความเข้มข้น 4 g/l และ ไรแฟมพิซิน ที่ 10 mg/l จะให้ประสิทธิภาพดีที่สุด

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง แบ่งเป็น

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ Laminar Flow :

ปากคีบ มีดผ่าตัดเล็กพร้อมด้าม นาฬิกาจับเวลา ตะเกียงแอลกอฮอล์  
จานเลี้ยงเชื้อ (plate) ไม้ขีดไฟ บีกเกอร์ขนาด 250 ml

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสใบด่างผักทอง :

เมล็ดผักทอง ถูงพลาสติกสีดำขนาด 8x16 ซม. ดินผสม โกร่ง ใบผัก  
ทองที่เป็นโรคใบด่างจากเชื้อ Papaya Ring Spot Virus (RPSV) บีเบต  
ขนาด 10 ml กระจกนาฬิกาหึ่งสี่นิมฟ์

เชื้อ Papaya Ring Spot Virus (PRSV) บริสุทธิ์ ซึ่งได้รับ  
ความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร :

บีกเกอร์ขนาด 50 100 500 และ 1000 ml หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ  
เครื่องชั่งไฟฟ้า ช้อนคนสาร ช้อนตักสาร ชวดใส่อาหาร 120 ml  
เครื่องวัด pH ตะกร้า กระจกตวงขนาด 50 100 250 และ 1000  
ml ชวดปรับปริมาตรขนาด 500 และ 100 ml บีเบตขนาด 0.5 1 5  
และ 10 ml

4. สารเคมีที่ใช้ในการปลูกพืชและถ่ายทอดโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ Papaya  
Ring Spot Virus (PRSV) บนผักทอง :

Buffer : Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ pH  
7.0-7.5 (ดูส่วนประกอบในภาคผนวก)  
Celite 545

5. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

สารเคมีในสูตรตัดแปลงอาหาร Murashige and Skoog (1962)  
(ดูส่วนประกอบภาคผนวก)

สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช

- BA (Benzyladenine)

สารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส

- 6-Azauracil

6. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อ

- ethanol 70%

- clorox 20%

- Tween 20

- Benomyl

## วิธีการ

### 1. การปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัส Papaya Ring Spot Virus (PRSV)

บรรจุดินลงในถุงพลาสติกสีดำขนาด 8 x 16 ซม. หยอดเมล็ดฟักทองลงในถุง ๆ ละ 3-5 เมล็ด หลังจากนั้นประมาณหนึ่งอาทิตย์ เมื่อต้นโตโดยใบเลี้ยงทั้ง 2 คลี่เต็มที่ทำการแบ่งต้นฟักทองออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นต้นฟักทองที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ 25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับกลุ่มที่สองซึ่งจะทำการปลูกเชื้อเป็นจำนวน 75 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมด การถ่ายทอดเชื้อไวรัสเป็นการถ่ายทอดผ่านน้ำคั้น (sap transmission) โดยใช้ น้ำคั้นจาก ฟักทองที่แสดงอาการใบด่าง เนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายไปสู่ต้นฟักทองปกติ ก่อนการปลูกเชื้อ

ไวรัสต้นฟักทอง จะถูกคลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อเพิ่มความอ่อนแอให้กับพืชทดสอบ เมื่อครบกำหนดแล้วนำกระดาษหนังสือพิมพ์ที่คลุมออก ล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่ก่อนทำการปลูกเชื้อ นำโกร่งแช่เย็นครบ 24 ชม. ออกมา แล้วนำใบฟักทองที่เป็นโรคใบต่างจากเชื้อ PRSV ใส่ในโกร่ง เติมน้ำละลายยาฆ่าเชื้อในอัตราส่วนของใบต่อสารละลายยาฆ่าเชื้อ 1 : 4 บดใบฟักทองให้ละเอียดโดยทำที่อุณหภูมิต่ำไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของเชื้อเดิม Celite ลงไปเล็กน้อย เพื่อให้พืชเกิดบาดแผล เชื้อไวรัสจะเข้าสู่ต้นฟักทองได้ง่าย หลังจากนั้นทำการปลูกเชื้อโดยใช้นิ้วมือจุ่มน้ำคั้นแล้วทาบนใบจากโคนใบสู่ปลายใบ และใช้มืออีกข้างรองรับใบพืชด้านล่าง เมื่อทาครบทุกต้นแล้ว ล้างเศษพืชที่ติดบนใบฟักทองออกทันที โดยใช้น้ำสัลดลงบนใบเพียงเล็กน้อย เพราะน้ำคั้นที่เหลืออาจมีพืชต่อต้นฟักทองได้ นำกระดาษหนังสือพิมพ์มาคลุมไว้ 24 ชม. เมื่อครบกำหนดแล้วนำกระดาษหนังสือพิมพ์ออก รดน้ำทุกวัน พร้อมกับสังเกตอาการของโรค

## 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเชื้อพืช

การเตรียมอาหารสูตรดัดแปลง Murashige Skoog (1962) เตรียมจากสารละลายเข้มข้น (stock solution) โดยนำสารประกอบแต่ละตัวมารวมกัน แล้วเติมน้ำตาล 30 g/l หลังจากนั้นปรับค่า pH ของอาหารให้เท่ากับ 5.8 1 ด้วย NaOH 1N หรือ HCl 1N เติมน้ำ 7 g/l และละลายด้วยน้ำ โดยให้ความร้อน จากนั้นนำอาหารที่ได้กรอกใส่ขวดอาหาร ขนาด 120 ml ปริมาตร 20-30 ml ต่อขวด และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

## 3. วิธีทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารฟอกฆ่าเชื้อที่มีต่อการทำความสะอาดชิ้นส่วนพืช ฟักทองที่นำมาเพาะเลี้ยงลักษณะทั่ว ๆ ไปนั้นเป็นไม้เถาอ่อน ใบและลำต้นก็จะมีขนปกคลุมอยู่ เมื่อจับดูจะรู้สึกสากมือ ดังนั้นอาจมีเชื้อแบคทีเรีย และราปนเปื้อนอยู่ ซึ่งถ้ามีแม้แต่ตัวเดียวเมื่อเข้าไปอยู่ในอาหารพร้อมกับเนื้อเยื่อ ก็จะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น และแย่งอาหารของเนื้อเยื่อพืชทำให้พืชตายได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการที่เหมาะสมใน

การฆ่าเชื้อที่ผิวพืชรก่อนการนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สำหรับการเตรียมต้นพืชทอง เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดต้นพืชทองที่แสดงอาการใบต่างอย่างชัดเจนจากยอดลงมา ประมาณ 2-3 ข้อ ซึ่งเป็นข้อที่ตายอดเพิ่งแตก ตัดใบทิ้งเหลือก้านใบที่ใฝ่ล้นข้อประมาณ 1-2 ซม. และ ตัดระหว่างข้อ เป็นท่อน ๆ
2. ล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่ และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
3. นำชิ้นส่วนพืชทองไปทำการฆ่าเชื้อที่ผิวตามขั้นตอน ดังแสดงในการทดลองที่ 1
4. ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดส่วนปลายก้านใบที่มีสีเขียวซีด เนื่องจากการทำลายของสารฆ่าเชื้อออก หลังจากนั้นจึงตัดยอดพืชทองออกเป็นท่อนขนาดประมาณ 1.5-2.0 ซม. โดยให้แต่ละท่อนมีตาติดอยู่

วิธีที่ 1 มีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ล้างด้วยน้ำสะอาด นาน 5 นาที
2. ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที
3. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับหยดสารละลาย ทวิน 20 (Tween 20) ลงไป 2 หยด นาน 10 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

วิธีที่ 2 มีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที
2. ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที
3. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับหยดสารละลายทวิน 20 (Tween 20) ลงไป 2 หยด นาน 15 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ 5 นาที

วิธีที่ 3 มีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที
2. ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
3. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับหยดสารละลายทวิน 20 (Tween 20) ลงไป 2 หยด นาน 20 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ 5 นาที

วิธีที่ 4 มีขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อดังนี้

1. ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที
2. ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
3. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับหยดสารละลายทวิน 20 (Tween 20) และสารละลายเบนโซนิลลงไปในปริมาณ 0.5 g/l นาน 20 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ 5 นาที

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อแล้วในวิธีการต่าง ๆ ไปเลี้ยงบนสูตรอาหารพื้นฐาน (ดังแสดงในข้อ 2) โดยในแต่ละวิธีการใช้อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 25 ขวด การทดลองบันทึกผลการปนเปื้อนของชิ้นส่วนทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชต่อการเจริญของต้นผักทอง

การเจริญเติบโตของพืชจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังนั้น สารเร่งการเจริญเติบโตจึงมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการเจริญของพืช ซึ่งสารแต่ละชนิดก็จะมีคุณสมบัติที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกัน กัลยาณี และคณะ (2533) ได้ทำการศึกษาคูสมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยนำปลายยอดของกล้วยขนาด 1 ลูกบาศก์นิ้ว มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย clorox 10 % นาน 15 นาที ตัดแบ่งตามความยาวออกเป็น 4 ส่วน เลี้ยงบนอาหาร

สังเคราะห์สูตร MS ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 15 % และ BA 1 mg/l พบว่าเนื้อเยื่อมีการเพิ่มขนาด เปลี่ยนเป็นสีเขียวตายอด และตาข้างที่อยู่ระหว่างชอกใบมีการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าด้วยขนาดเล็ก ได้ภายในเวลา 2 เดือนและได้นำมาปรับใช้ในการทดลองในครั้งนี้โดยใช้ BA ในอัตราส่วน 0.5 1 และ 3 mg/l เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นผักทองเมื่อมีการเติม BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ซึ่งมี 10 ซ้ำ

#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.5 1 และ 3 g/l
2. บรรจุอาหารลงไปในขวดอาหาร 120 ml ปริมาตร 20-30 ml ของขวด
3. เช็ดโต๊ะที่จะถ่ายเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % จัดเตรียมอุปกรณ์ เช่น ใบมีด ปากคีบ และสำลีให้พร้อม
4. ล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่ และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 %
5. เตรียมต้นผักทอง (ดังแสดงในข้อ 3) โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อจากวิธีการที่ 3 ของการทดลองที่ 1
6. นำชิ้นส่วนที่ได้ไปเลี้ยงในขวดอาหารวุ้นที่เตรียมไว้
7. ลนปากขวดด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วปิดฝาให้เรียบร้อย
8. นำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

#### การบันทึกผล

บันทึกผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยวัดความสูง จำนวนข้อ และ Callus ทุก สัปดาห์ ประมาณ 4-6 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสต่อการแพร่กระจายของเชื้อไบต่างฟักทอง

การศึกษาค้นคว้าหาสารเคมีในการป้องกันกำจัดไวรัสโดยใช้ร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถของพืชในการรับเอาสารเคมีไปกระตุ้นให้เกิดผลยับยั้งไวรัส จากการค้นคว้า ได้นำสารเคมีจำพวก antiviral คือ 6-azauracil มาทำการทดลองซึ่งสารตัวนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสที่มี nucleic acid แบบ DNA (deoxyribonucleic acid) และ RNA (Ribonucleic acid) แต่การป้องกันกำจัดไวรัสจะได้ผลหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถของพืชในการรับเอาสารเคมีไปกระตุ้นให้เกิดผลยับยั้งไวรัสซึ่งจะไม่ทำอันตรายหรือสะสมในปริมาณมากจนเป็นพิษต่อพืช ดังนั้น จึงนำ 6-azauracil ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อต้องการทดสอบว่าในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารนั้น จะมีผลต่อต้นฟักทองที่เป็นโรคไบต่างหรือไม่โดยทำการทดลองซึ่งวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 20 ซ้ำ

วิธีการทดลอง

เตรียมอาหารวุ้น MS ที่มี BA 0.5 mg/l และเติม 6-azauracil ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 1 10 และ 100 mg/l ก่อนนำอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

การบันทึกผล

บันทึกผลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยวัดความสูงของต้น สังเกตอาการต่าง ๆ ที่ปรากฏบนใบทุกสัปดาห์ประมาณ 4-6 สัปดาห์ และตรวจการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส ในแต่ละใบตามตำแหน่งจากยอดลงมา

#### 4. สภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มของแสง 2500 Lux โดยมีช่วงแสง 16 ชม. ต่อวัน

#### เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มทดลอง ตุลาคม 2536

สิ้นสุดการทดลอง มีนาคม 2537

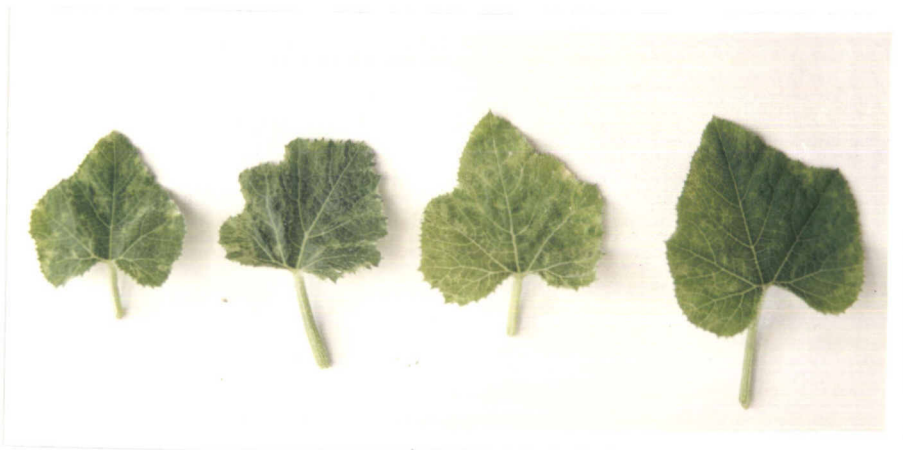
สถานที่ ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลการทดลอง

การปลูกเชื้อไวรัสผักทองใบต่าง สู่ต้นผักทองปกติ อาการใบต่างจะปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน เมื่อใบเลี้ยงเจริญเต็มที่ ซึ่งจะเปรียบเทียบกับต้นปกติ ดังภาพที่ 1 และ 2



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะใบปกติเนื่องจากไม่ได้รับการปลูกเชื้อ  
Papaya Ring Spot Virus (PRSV)



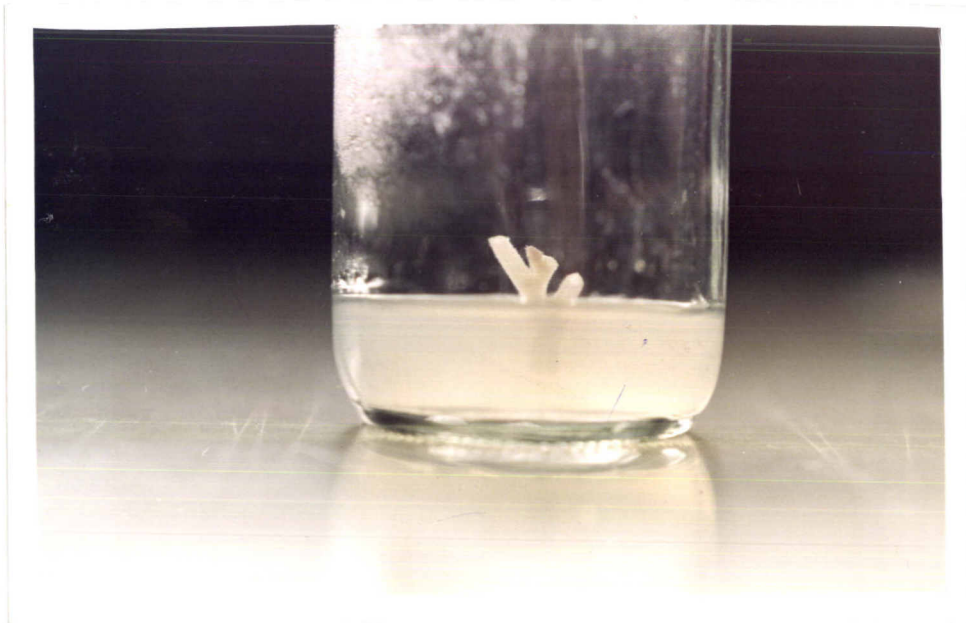
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะใบต่างเนื่องจากได้รับการปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อ  
Papaya Ring Spot Virus (PRSV)

การทดลองที่ 1 : การศึกษาผลของสารฟอกฆ่าเชื้อที่มีต่อการทำความสะอาดชิ้นส่วน

ตารางที่ 1 จำนวนชิ้นส่วนพืชที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียภายหลังการนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (MS)

วิธีการที่	จำนวนชิ้นส่วน เริ่มต้น	จำนวนต้นที่ปนเปื้อน				รวมจำนวนต้น ที่ปนเปื้อน
		สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	
1	30	14	6	3	2	25
2	30	10	4	4	-	18
3	30	7	3	-	-	10
4	30	0	0	0	0	0

จากตารางที่ 1 เห็นได้ว่าวิธีการที่ 4 ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียบนชิ้นส่วนพืชของที่นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่พบว่าต้นพืชของ มีลำต้นกลวง และช้ำขาว (ภาพที่ 3) จึงไม่สามารถนำไปทำการทดลองครั้งต่อไปได้ ดังนั้นวิธีการที่ 3 จึงให้ผลการทดลองดีที่สุดในการทดสอบครั้งนี้ เนื่องจากมีจำนวนต้นในการปนเปื้อนน้อยและพบว่ายังสามารถเจริญเติบโตได้ ฉะนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงใช้วิธีการที่ 3 ในการฟอกฆ่าเชื้อทำความสะอาดชิ้นส่วนของพืช



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของต้นฟักทองในวิธีการที่ 4 เมื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย แอลกอฮอล์ 70 % นาน 1 นาที สารละลาย clorox 20 % ซึ่งมีส่วนผสมของ ทวิน 20 (Tween 20) ประมาณ 2 หยด และเบนโนมิล 0.5 g/l เช้าเป็นเวลา 20 นาที

ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสารเร่งการเจริญเติบโตของต้นผักทอง

ตารางที่ 2 ผลของ BA ต่อการเจริญเติบโตของต้นผักทอง

วิธีการ	ความเข้มข้นของ BA (mg/l)	ค่าเฉลี่ยขนาด ของ callus	ค่าเฉลี่ยของความสูง	ค่าเฉลี่ยของ จำนวนข้อ
1	0.5	0.56 b	1.47 a	1.8 a
2	1.0	1.10 a	1.01 b	1.8 a
3	3.0	1.33 a	0.69 c	1.8 a
	CV %	31.99 %	23.03 %	40.46 %

ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ยถ้าเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ DMRT

สัปดาห์ที่ 1 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของต้นในช่วงสัปดาห์แรกทุกชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

สัปดาห์ที่ 2 ชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 0.5 mg/l เริ่มมีการแทงยอดสีเขียวอ่อนออกมาจากชิ้นส่วนเดิม โดยจะเกิดยอดยาวประมาณ 0.5-1.2 ซม. ส่วนชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 1 และ 3 mg/l ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง

สัปดาห์ที่ 3 พบว่าชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 0.5 g/l เริ่มมีการคลี่ใบเป็นต้นเล็ก ๆ โดยมีความสูงประมาณ 1.5 ซม. ใบมีสีเขียวเข้ม ส่วนชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 1 mg/l เริ่มมีการแทงยอดออกมาและจะเกิด callus กว้างประมาณ 0.5 ซม. มีสีเขียวเข้ม และชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 3 mg/l เริ่มมีการแทงยอดอ่อนออกมามีสีเหลืองอ่อนและเกิด callus สีเหลืองกว้างประมาณ 1 ซม.

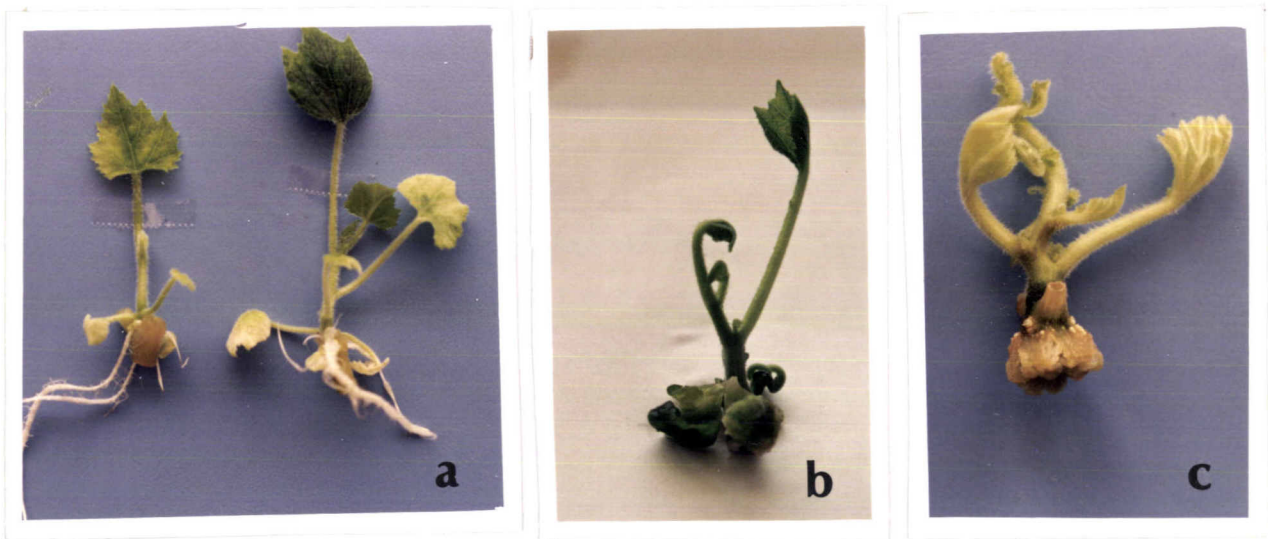
สัปดาห์ที่ 4 พบว่าชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 0.5 mg/l เริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยต้นสูงประมาณ 2.0 ซม. และเกิดรากออกมาประมาณ 2-3 ราก มีจำนวนข้อเพิ่มขึ้น 1 ข้อ

ส่วนชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 1 และ 3 mg/l ใบยังไม่คลี่ออกมาและไม่พบการเกิดรากชิ้นส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 1 mg/l มีขนาดต้นสูงประมาณ 1.8 ซม. มีสีเขียวเข้ม ส่วนชิ้นส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 3 mg/l ขนาดต้นสูงประมาณ 1.6 ซม. มีสีเหลืองอ่อน

สัปดาห์ที่ 5 ชิ้นส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 0.5 mg/l จะมีขนาดของต้นสูงขึ้นจากเดิมเล็กน้อย และมีใบขนาดใหญ่จำนวน 1-2 ใบ แสดงอาการใบต่างชัดเจน และมีจำนวนข้อเพิ่มขึ้น 1 ข้อ มีขนาด callus กว้างประมาณ 0.5 ซม. ชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 1 mg/l แทะยอดออกมาใหม่สูงประมาณ 0.7 ซม. มีสีเขียวเข้ม ใบไม่คลี่ ขนาดของ callus กว้างประมาณ 1.2 ซม. ไม่เกิดราก ส่วนชิ้นส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 3 mg/l แทะยอดออกมาใหม่ 1-2 ยอด สูงประมาณ 1.2 ซม. มีสีเหลืองอ่อน ใบยังไม่คลี่ขนาดของ callus กว้างประมาณ 1.7 ซม. ไม่เกิดราก

สัปดาห์ที่ 6 พบว่าชิ้นส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 0.5 mg/l เป็นต้นที่สมบูรณ์ คือมีใบ ลำต้นและราก ส่วนชิ้นส่วนที่ความเข้มข้นของ BA 1 mg/l ใบยังไม่คลี่ออกมาต้นสูงขึ้นจากเดิมเล็กน้อย ไม่เกิดราก พบแต่ callus ซึ่งมีสีเขียวเข้ม และชิ้นส่วนที่มีความเข้มข้นของ BA 3 mg/l ใบยังไม่คลี่ออกมา ขนาดของ callus โตขึ้น มีสีเหลืองอ่อน และมีจำนวนข้อเพิ่มขึ้น 2-3 ข้อ แต่ไม่พบการเกิดราก

จากการทดลองนี้พบว่า BA ที่ระดับความเข้มข้นของ BA 0.5 mg/l การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ว่า BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 mg/l (ดังภาพที่ 4) ค่าเฉลี่ยของ callus และค่าเฉลี่ยของความสูงในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนค่าเฉลี่ยของจำนวนข้อพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกความเข้มข้น (ดังตารางที่ 2)



ภาพที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของต้นผักทองใบต่าง ในระดับความเข้มข้นของ BA ที่ต่างกันดังนี้

a : BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/l

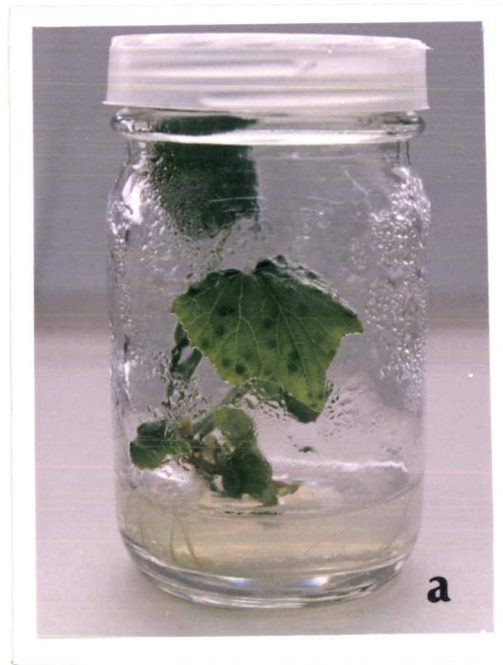
b : BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l

c : BA ที่ระดับความเข้มข้น 3 mg/l

### ผลการทดลองที่ 3

จากผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนต้นผักทองในอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของ 6-azauracil ในแต่ละความเข้มข้นเป็นปกติเมื่อเปรียบเทียบกับ ต้นควบคุมโดยชิ้นส่วนพืชยังคงมีสีเขียวสด แต่ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ขวดที่เติม 6-azauracil ในระดับความเข้มข้น 100 mg/l ลำต้นจะซีดขาว ต้นไม่เจริญเติบโตจนถึงระยะสัปดาห์ที่ 6 ก็ยังไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ต้นผักทองที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของ 6-azauracil ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 mg/l ปรากฏอาการเหลืองจากส่วนปลายของชิ้นส่วนพืชและส่วนอื่น ๆ ยังมีสีเหลืองอยู่บ้างประปรายจนถึงระยะสัปดาห์ที่ 6 ก็ไม่มีการเจริญเติบโตของตาข้างแต่อย่างใด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม (ดังแสดงในภาพที่ 5)

14416



ภาพที่ 5 แสดงผลของการใช้สารเคมี 6-azauracil เพื่อยับยั้งเชื้อไวรัสใบด่างผักทอง ในแต่ละความเข้มข้น

- a : ต้นเปรียบเทียบกับที่แสดงอาการใบด่างผักทอง โดยไม่เติมสาร 6-azauracil
- b : ต้นที่เติมสารเคมี 6-azauracil ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l
- c : ต้นที่เติมสารเคมี 6-azauracil ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l
- d : ต้นที่เติมสารเคมี 6-azauracil ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l

พืชสวนเทคโนโลยีการเกษตร  
สำนักเทคโนโลยีพืชสวน  
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### สรุปผลการทดลอง

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อทำความสะอาดชิ้นส่วนของต้นผักทองที่ให้ผลดีที่สุดคือใช้ alcohol 70 % เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย clorox 20 % ซึ่งมีส่วนผสมของ Tween 20 ประมาณ 2 หยด เช้าเป็นเวลา 20 นาที สูดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที สำหรับสารที่ชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของต้นผักเป็นต้นที่สมบูรณ์มากที่สุดโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าการใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลงและเติม BA 0.5 mg/l ให้ผลดีที่สุด ส่วนการใช้ สารยับยั้งไวรัสคือ 6-azauracil ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 mg/l พบว่าลำต้นไม่เจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์เพื่อเปรียบเทียบอาการของโรคได้

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองที่ 1 พบว่าวิธีการที่ 3 ที่ฆ่าเชื้อด้วย alcohol 70 % นาน 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วย clorox 20 % ซึ่งมีส่วนผสมของ Tween 20 ประมาณ 2 หยด เป็นเวลา 20 นาที จะสามารถฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนได้ดีกว่าวิธีการอื่นๆ ส่วนสาเหตุของการปนเปื้อน ส่วนมากเกิดจากเชื้อราซึ่งจะปรากฏเป็นกลุ่มเส้นใยสีดำ หรือสีเขียวรอบ ๆ ชิ้นส่วนหรือบนชิ้นส่วนพืช และเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นนั้นจะมีสีขาวขุ่น มีลักษณะเป็น colony กลม ๆ มันนวล เกิดขึ้นรอบ ๆ ขอบของชิ้นส่วน ถึงแม้จุลินทรีย์ที่ผิวของอวัยวะพืชจะมีอยู่มากก็สามารถทำการฆ่าเชื้อได้ง่าย แต่ก็มีบางชนิดแฝงอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช ในกรณีนี้การฆ่าเชื้อที่ผิวจะไม่ได้ผลจึงต้องใช้วิธีผสมยาปฏิชีวนะหรือยาฆ่าเชื้อราลงไปในการล้างล้างล้างล้างการทดลองของ J.H.Haldeman และคณะ (1987) ได้ทำการทดลองหาประสิทธิภาพของ เบนโนมิล (Benomyl) และ ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อราและยาปฏิชีวนะตามลำดับ ในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืช 2 ชนิด คือ Camellia sinensis และ C. japonica โดยใส่สารเคมีลงไปพร้อมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า C. sinensis ของ เบนโนมิล (Benomyl) ที่ความเข้มข้น 1 mg/l และ ที่ 10 mg/l ของ ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) จะให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด ส่วนใน C. japonica นั้นที่ความเข้มข้น 4 mg/l ของเบนโนมิล (Benomyl) และที่ 10 mg/l ของไรแฟมพิซิน (Rifampicin) จะให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด โดยสารเคมีนั้นไม่เป็นพิษกับพืชด้วย และจากการทดลองนี้ก็ได้นำวิธีการมาปรับใช้กับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นพืชของ ใบต่าง โดยใช้เบนโนมิล (Benomyl) 0.5 mg/l ผสมกับ clorox 20 % ซึ่งมีส่วนผสมของ Tween 20 ประมาณ 2 หยด และนำมาทำการฟอกฆ่าเชื้อพบว่า ไม่มีการปนเปื้อนแต่ลำต้นชืดขาวไม่เจริญเติบโตทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าพืชทองเป็นไม้เถาที่มีเนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและเมื่อเติมเบนโนมิล (Benomyl) ลงไปทำปฏิกิริยาร่วมกับ clorox ซึ่งเป็นสารฟอกฆ่าเชื้อ จึงทำให้มีความรุนแรงในการฟอกฆ่าเชื้อมากยิ่งขึ้น และเกิดการสะสมในปริมาณมากจนเป็นพิษต่อต้นพืชทองทำให้พืชทองชืดขาวไม่เจริญเติบโต

จากผลการทดลองที่ 2 พบว่าการชักนำทำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยเฉพาะ BA 0.5 mg/l ทั้งนี้ตรงกับการทดลองของ Hussey (1976) ซึ่งได้กล่าวว่าจะนอกจาก BA จะกระตุ้นให้ตาข้างมีการเจริญเติบโตและการพัฒนาไปเป็นยอดจำนวนมากแล้วยังไปยับยั้ง

การเจริญเติบโตของรากด้วย ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าต้นผักทองเป็นพืชที่มีความทนทานต่อ BA ในระดับที่ไม่สูงนักเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ เช่น กัญชง ซึ่งจะมีการเกิดหน่อได้มากที่สุดเมื่อใช้ BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 mg/l (ประภาสิริ 2529) ฉะนั้นในการที่จะนำ BA มาใช้กับพืชผักทองจึงไม่ควรใช้ในระดับที่สูงเกินไป

และจากการทดลองที่ 3 นั้น เมื่อเติม 6-azauracil ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 mg/l พบว่าทำให้ผักทองไม่มีการเจริญเติบโตและแตกตาข้าง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุมซึ่งสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งตรงกับรายงานของ Tomlinson (1982) กล่าวว่าการใช้สารเคมีเข้ามาช่วยในการกำจัดเชื้อไวรัสนั้น ได้มีการพยายามแต่ก็พบปัญหาเรื่องราคาและความเป็นพิษต่อพืชเอง ดังนั้นจากการทดลองที่ 3 จึงเป็นไปได้ที่สารเคมี 6-azauracil อาจมีปริมาณเกินไปจนทำให้เกิดการสะสมในผักทอง และผักทองไม่สามารถรับเอาสารเคมีไปกระตุ้นให้เกิดผลยับยั้งไวรัสได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาต่อเนื่องถึงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ให้เหมาะสมเพื่อที่จะไม่เป็นอันตรายต่อต้นผักทองต่อไปในห้องปฏิบัติการ

### เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี อรรถนัตร์, กวีศ วานิชกุล และจุลภาค คุ่มวงศ์. 2533. การเติบโตและการเพิ่มปริมาณต้นของต้นกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิชาการเกษตรศาสตร์. 8:2-9.

ฉลองชัย จันทรเพ็ญ. 2528. ภูเงินแหล่งผลิตไฟทองเนื้อดีของศรีสะเกษ. วารสารชาวเกษตร 51:17-18.

ประภาสินี รัตโนภาส. 2529. เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Antoniw , J.F., Kueh, J.S.H., Walkey, D.G.A. and White, R.F. 1981. The presence of pathogenesis-related protein in callus of Xanthi-ne tobacco. *Phytopathol Z* 101,179-84.

Cassells, A.C. and Long, R.D. 1980. The regeneration of virus-free plants from cucumber mosaic virus and potato virus Y infected tobacco explants cultured in the presence of virazole. *Zeitsch Nature* 35c,350-351.

Chiyochi Noda, เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์, พัน อินทร์จันทร์, ลักษณะ วรณภีร์ และ นวลจันทร์ ดีมา. 2535. การแพร่กระจายของไวรัสพืชตระกูลแตงและปฏิกิริยาของพืชตระกูลแตงต่อไวรัสบางชนิด. เอกสารการประชุมวิชาการเกษตร.

Cohen, D.and Walkey, D.G.A. 1978. Unpublished results.

De Fossard, R.A. 1976. Tissue culture for plant propagators.  
University of New England.

Haldeman, J.H., Thomas, R.L. and McKamy, D.L., 1987. Use of Benomyl and Rifampicin For in Vitro Shoot Tip Culture of Camellia sinensis and C. japonica. Hortscience, 22:306-307.

Huber, S., and Schuster, G. 1992. Investigations on the Inhibitory Activities of Purine and Pyrimidine Base Analogues Against Potato Virus X as well as on the Site of Action in the Virus Replication Cycle. Zeitschrift-Fuer-Pflanzenkrankheiten and Pflanzenschutz, 99(3) : 319-329.

Hussey, G. 1976. Plantlet Regeneration from Callus and Parent Tissue in Ornithogalum thyrosoides. J. Exp. Bot. 27 , 375.

Jelaska, C. 1974. Embryogenesis and Organogenesis in Pumpkin Explants. Physiol plant, 31:256-261.

Johnstone, G.R. and Wade, G.C. 1974. Therapy of Virus-Infected Plants by Heat Treatment. II. Host Protein Synthesis and Multiplication of Tomato Aspermy Virus at 36 C. Aust J Bot, 22:451-460.

Maugh, T.H., II. 1976. Chemotherapy: Antiviral Agents Come of Age. Science, 192:128-132.

Morel, G.M. and Martin, C. 1952. Guérison de Daklias atteints d'une Maladie à Virus. C R Hebd Seances Acad Sci, 235, 1324-5.

Morel, G.M. and Martin, C. 1955. Guérison de Pommes de Terre atteints de maladies à virus. C R Hebd Seances Acad Agric, 41 : 472-5.

Murashige T. Skoog F. 1962. A Revised Medium For Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-496.

Pink, D.A.C. and Walkey, D.G.A. 1984. Rapid Propagation of Cucurbita pepo L. by Culture of Meristem Tip. Scientia Hort, 24:107-114.

Quak, F. 1961. Heat Treatment and Substance Inhibiting Virus Multiplication Meristem Culture to Obtain Virus-free plants. Adv Hort Sci Appl, 1;144-149.

Shepard, J.F. 1977. Regeneration of Plants From Protoplasts of Potato Virus X Infected tobacco leaves. II. Influence of virazole in the frequency of infection. Virol, 78:261-266.

Stone, O.M. 1982. The Elimination of four viruses from Ullucus tuberosus by Meristem-Tip Culture and Chemotherapy. Ann Appl Biol, 101:79-83.

Tomlinson, J.A. 1982. Chemotherapy of Plant Viruses and Virus diseases. In Pathogens, Vectors and Plant Diseases (ed. Harris, K.F. and Maramorosch, K.). Academic Pres, London; 32-44.

Walkey, D.G.A. and Cooper, V.C. 1972. Some Factors Affecting the Behavior of Plant Viruses in Tissue Culture. *Physiol Plant*, 2:259-264.

## ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1

Potassium phosphate buffer 0.1 M at pH 7.5 โดยการเตรียม

1. ละลาย di-potassium hydrogen orthophosphate ( $K_2HOP_4$ ) 17.4 g

ใน 1 lit

2. เติม potassium dihydrogen orthophosphate ( $KH_2PO_4$ ) 3.4 g

กรด dissolved in 250 ml., distill water 0.1 M solution to achieve

pH 7.5

ตารางผนวกที่ 2 สูตรอาหารดัดแปลงของ Murashige + Skoog (1962)

stock solution	Ingredient	Amount (mg)	ML of stock solution per litre of medium multiplication
A:Macro 1 <sup>2</sup>	KNO <sub>3</sub>	95000	20
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82500	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	22000	
B:Macro 2 <sup>2</sup>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18500	20
C:Macro 3 <sup>2</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8500	20
D:Micro <sup>3</sup>	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1690	1
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	
	KI	83	
	ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	860	
	Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2.5	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.5	
E:Fe Stock <sup>4</sup>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2785	5
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	3725	

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

---

stock solution	Ingredient	Amount (mg)	ML of stock solution per litre of medium multiplication
F:Vitamins and amino acids <sup>3</sup>	Glycine	200	1
	Thiamine.HCl	40	
	Pyridoxin.HCl	50	
	Nicotinic acid	50	

---

ตารางผนวกที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยการเจริญของ Callus ฝักทองในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ของ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	ความเข้มข้นของ BA (mg/l)		
	0.5	1	3
1	0.5	1.0	1.5
2	0.7	1.2	1.6
3	0.8	1.3	1.7
4	0.6	1.0	1.3
5	0.5	0.9	1.4
6	0.5	1.0	1.5
7	0.8	1.2	1.4
8	0.7	1.3	1.5
9	0.5	1.1	1.4
10	0.8	1.0	1.6
ค่าเฉลี่ย x	0.56	1.10	1.33

ตารางผนวกที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของ Callus ฝักทองในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS ของ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01
Treatment	2	3.125	1.562	15.367**	3.35	5.49
Ex.Error	27	2.745	0.102			
Total	29	5.870	0.202			

Grand Mean = 0.996

CV = 31.99 %

\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญได้ 0.01

ตารางผนวกที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของความสูงในการใช้ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	ความเข้มข้นของ BA (mg/l)		
	0.5	1	3
1	1.0	0.8	1.0
2	1.5	0.7	0.9
3	2.0	0.6	1.1
4	1.5	0.6	0.8
5	1.8	0.8	1.2
6	2.0	0.7	1.1
7	1.3	0.8	0.8
8	1.5	0.6	0.9
9	1.0	0.7	1.3
10	1.1	0.6	1.0
ค่าเฉลี่ย x	1.47	1.01	1.69

ตารางผนวกที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าเฉลี่ยของความสูงในการใช้ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01
Treatment	2	3.075	1.537	25.959	3.35	5.49
Ex.Error	27	1.599	0.059			
Total	29	4.674	0.161			

Grand Mean = 1.056

CV = 23.03 %

\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญได้ 0.01

ตารางผนวกที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนข้อในการใช้ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	ความเข้มข้นของ BA (mg/l)		
	0.5	1	3
1	1	2	2
2	1	2	3
3	2	2	1
4	2	1	3
5	2	1	2
6	3	3	2
7	1	1	2
8	1	2	1
9	3	2	1
10	2	3	1
ค่าเฉลี่ย x	1.8	1.9	1.9

ตารางผนวกที่ 8 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าเฉลี่ยจำนวนข้อในการใช้ BA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01
Treatment	2	0.067	0.033	0.058*	3.35	5.49
Ex. Error	27	15.400	0.570			
Total	29	15.469	0.533			

Grand Mean = 1.866

CV = 40.46 %

\* ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ