14639

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี

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

โดย

นางสาววิรุฬห์รัตน์ พฤฒิเศรษฐ์เสนา

นางสาวศิริพร ตรงคมาลี

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน

วพ.
ว698ก
2537

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....99035
วัน,เดือน,ปี.....

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2537

ห้องสมุด
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1335

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี

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

โดย

นางสาววิรุฬห์รัตน์ พฤฒิเศรษฐ์เสนา

นางสาวศิริพร ตรงคมาลี

โดยพิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการอาจารย์ที่ปรึกษา .....

(อาจารย์ ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน)

วันที่ 19 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2538

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช .....

(อาจารย์สำเริง คำทอง)

วันที่ 19 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2538

13 ส.ค. 2541

ACC. NO.....
Date Received 30 ส.ค. 2538
Call No.....

ฝพ.
ว698ท
2537

คำนิยม

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ทุกๆท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ข้าพเจ้าในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ ซึ่งได้แก่

1. คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในด้านต่างๆ พร้อมทั้งให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอมา
2. อาจารย์ ดร. นวลพรรณ งามยี่สุน ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำปัญหาพิเศษ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี
3. อาจารย์สุเม อรัญนารถ และอาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ และอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้าน ชุดตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้ (ELISA KIT) และ Protocorm like-body ของกล้วยไม้พันธุ์ Dendrobium Jaqualene Thomus 'Pink' และพันธุ์ Dendrobium Jaqualene Thomus 'White'
5. เจ้าของรังกล้วยไม้ ที่ได้กรุณาอนุญาตให้ถ่ายรูปลักษณะอาการที่เป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้
6. ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และสารเคมีในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้
7. ญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จด้วยดีมาโดยตลอด

วิรุฬห์รัตน์ พฤฒิเศรษฐ์เสนา

ศิริพร ตรงคมาลี

เมษายน 2538

ชื่อเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี
โดย นางสาววิรุฬห์รัตน์ พฤฒิเศรษฐ์เสนา
นางสาวศิริพร ตรงคมาลี
ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. นวลพรรณ งามยิ่งสุน

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายที่แสดงอาการใบด่างซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส CyMV นั้นได้ใช้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้พันธุ์ Dendrobium Jaqualene Thomus 'Pink' และ Dendrobium Jaqualene Thomus 'White' มาทำการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มในอาหารสูตร Vacin and Went จนกระทั่งได้จำนวนโปรโตคอร์มที่ต้องการ นำมาใช้ในการทดลองผลิตโปรโตคอร์มปลอดเชื้อใบด่างไวรัส โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารแข็งสูตร Vacin and Went ที่มีการเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ในความเข้มข้น 0, 10, 20, 25, 50, 75 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำโปรโตคอร์มดังกล่าว มาทำการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้เทคนิค ELISA จากการตรวจสอบ พบว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีสารเคมี 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 10 mg / l จะมีเปอร์เซนต์ การปลอดเชื้อไวรัส CyMV มากที่สุด คือ 48.64 % ส่วนโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ที่มีสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ในความเข้มข้น 20 mg / l มีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อไวรัส CyMV มากที่สุด คือ 33.83%

ABSTRACT

Title : Production of virus-free protocorm in Dendrobium by chemotherapy in vitro

By : WIRUNRAT PRUTTISETSENA

SIRIPORN TRONGKAMALEE

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Department : Pest Management Technology

Advisor : .....N. Ngamyeesun.....

(Dr. Nualphan Ngamyeesun)

.....14 / May / 1995

The attempt to eradicate infected protocorm like bodies (plbs) with Cymbidium mosaic virus (CyMV) in Dendrobium Jaqualene Thomus 'Pink' and Dendrobium Jaqualene Thomus 'White' was demonstrated by the combination of chemotherapy and tissue culture.The infected plbs were cultured in Vacin and Went liquid media for multiplication.Then,they were transferred to either liquid or solid media incorporated with 1-Adamantanamine hydrochloride before autoclaving at concentration of 10, 20, 25, 50, 75 mg/l respectively.The virus-free plbs were tested by ELISA technique after 4 weeks.The result showed that plbs cultured in liquid media with the addition of 1-Adamantanamine hydrochloride at 10 mg/l provided the maximum of 48.64 % virus free plbs whereas,in solid media the best result was at 20 mg/l which gave 33.83 % of virus free plbs.

สารบัญ

เนื้อเรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ค)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลการทดลอง	18
สรุปผลการทดลอง	26
วิจารณ์ผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ผลการทดลองการใช้สาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went 23
2. ผลการทดลองการใช้สาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went 25

ตารางผนวกที่

1. สูตรอาหาร Vacin and Went (1949) 34
2. การเตรียมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride 35
3. การตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยใช้วิธี ELISA 36
4. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 0 mg/l 41
5. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 10 mg/l 42
6. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 20 mg/l 43
7. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 25 mg/l 44
8. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 50 mg/l 45
9. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 75 mg/l 46

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
10. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 0 mg/l	47
11. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 10 mg/l	48
12. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 20 mg/l	49
13. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 25 mg/l	50
14. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 50 mg/l	51
15. ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 75 mg/l	52

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. แสดงลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในขวดอาหารเหลว 18
2. แสดงลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่แตกยอดออกมาจำนวนมาก ภายในขวดอาหารเหลว 19
3. แสดงลักษณะการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียภายในขวดอาหารเหลว 20
4. แสดงลักษณะความขุ่นของอาหารเหลวสูตร VW หลังจากทำการทดสอบโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งเติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ 2 สัปดาห์ 21

ภาพผนวกที่

1. ไวรัสยอดบิด หรือ ไวรัสใบด่าง 53

คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชชนิดหนึ่งจัดอยู่ในวงศ์ออร์คิดดาซิอี้ (Family Orchidaceae) ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดของพืชมีดอก เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชที่มีความหลากหลายสูงเฉพาะกล้วยไม้ป่ามีถึงประมาณ 650 สกุล หรือประมาณกว่า 25,000 ชนิด และสามารถปลูกกระจายอยู่ได้ทั่วไปในทุกสภาพภูมิอากาศ จึงทำให้มีความแตกต่างทั้งลักษณะต้น ดอก ความงาม และกลิ่นหอม จากความมีเสน่ห์ของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์นี่เองจึงทำให้เกิดการซื้อขาย แลกเปลี่ยน และมีการลักลอบกล้วยไม้ระหว่างประเทศขึ้น อันเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งของการแพร่ระบาดโรคข้ามประเทศ โดยเฉพาะโรคไวรัส ประเทศไทยได้เริ่มศึกษาโรคไวรัสกล้วยไม้อย่างจริงจังเมื่อปี พ.ศ. 2510 เนื่องมาจากการสังเกตเห็นความผิดปกติในการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ลดลง ช่อดอกสั้น ขนาดดอกเล็ก และไม่ได้มาตรฐานสำหรับที่จะใช้เป็นไม้ตัดดอกส่งขายต่างประเทศ จากการศึกษาทำให้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริง และสามารถแยกเชื้อแสดงให้เห็นอนุภาคไวรัสตัวแรกในประเทศไทย ที่เป็นสาเหตุของโรคใบด่างกล้วยไม้ได้สำเร็จ คือเชื้อ Cymbidium mosaic virus (CyMV) และ ต่อมาได้พบเชื้อ Odontoglossum ringspot virus (ORSV) หรือ Tobacco mosaic virus-orchid strain (TMV-O) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคไวรัสกล้วยไม้อีกชนิดหนึ่ง

ปัจจุบันได้มีการขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง โดยวิธีนี้อาจทำให้มีการขยายพันธุ์กล้วยไม้ที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญทำให้เชื้อไวรัสแพร่ระบาดไปได้อย่างรวดเร็ว และอาจก่อให้เกิดความเสียหายได้ ดังนั้นควรมีวิธีการที่ดีในการควบคุมหรือกำจัดไวรัสให้หมดไป และขยายพันธุ์กล้วยไม้จากส่วนที่ปราศจากโรค โดยนำวิธีการต่างๆมาประยุกต์ร่วมกัน คือ การใช้สารเคมี การใช้ความร้อน และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อทำให้ส่วนขยายพันธุ์ปราศจากเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงเป็นแรงจูงใจให้ข้าพเจ้าทำการศึกษาหาปริมาณสารเคมีที่จะใช้ร่วมกับ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการใช้เลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) เพื่อให้ได้ส่วนขยายพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อไวรัส

วิรุฬห์รัตน์ พฤฒิเศรษฐ์เสนา
ศิริพร ตรงคมาลี

วัตถุประสงค์

ผลิตโปรโตคอร์มของกล้วยไม้พันธุ์ Dendrobium Jaqualene Thomus ปลอดโรคไวรัส โดยใช้สาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตรวจเอกสาร

ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ คือ ความเสียหายจากโรคและแมลงศัตรูในสภาพการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปนั้นมักพบว่ากล้วยไม้ต่างๆ มีความอ่อนแอต่อเชื้อโรค โดยเฉพาะกับเชื้อไวรัสหลายชนิด กล้วยไม้ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีการเจริญเติบโตไม่ดี คุณภาพดอกต่ำและไม่เป็นที่ต้องการของผู้ซื้อ (อุทัย , 2535)

ปราณี (2528) ; Lawson และ Ali (1975) รายงานว่าโรคไวรัสของกล้วยไม้มี 19 ชนิด แบ่งเป็น 3 กลุ่ม Isometric virus มีไวรัส 4 ชนิด ได้แก่ cymbidium ringspot virus , cucumber mosaic virus , tomato ringspot virus และ trichopilia isomatric กลุ่ม bacilliform virus มีไวรัส 8 ชนิด ได้แก่ Dendrobium virus , Phalaenopsis virus , Phalaenopsis bacilliform , Short orchid rhabdo (Bullets) (Skok) , Bacilliform virus , Grammatophyllum (Bacilliform) , Dendrobium rhabdovirus และ Long orchid rhabdo และ กลุ่ม filamentous virus มีไวรัส 7 ชนิด ได้แก่ cymbidium mosaic virus , odontoglossum ringspot virus หรือ tobacco mosaic virus-orchid strain , dendrobium mosaic virus , bean yellow mosaic virus , cypripedium filamentous , vanda mosaic virus และ dendrobium vein necrosis

ต่อมา พบว่า โรคไวรัสของกล้วยไม้นั้นมีอย่างน้อย 25 ชนิด แต่ cymbidium mosaic virus (CyMV) และ odontoglossum ringspot virus (ORSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม potexvirus และ tobamovirus groups ตามลำดับ นับว่ามีความสำคัญที่สุด เนื่องจากมีการระบาดก่อโรค และ ทำความเสียหายแก่กล้วยไม้เพาะเลี้ยงทั่วไป (อุทัย, 2535)

cymbidium mosaic virus (CyMV) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1943 โดย Jensen ทำความเสียหายแก่กล้วยไม้สกุล Cymbidium ทำให้เกิดอาการใบด่างและต้นแคระแกร็น ในประเทศไทยเชื้อ CyMV ทำให้เกิดความเสียหายกับกล้วยไม้สกุลต่างๆหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับกล้วยไม้สกุลหวาย เช่น *Dendrobium pompadour* ทำให้เกิดอาการยอดบิด ดอกเล็ก ช่อดอกสั้น ผลผลิตน้อยและคุณภาพต่ำไม่ได้มาตรฐาน (ธีระ , 2532) เชื้อนี้มีความสำคัญมากเป็นอันดับหนึ่ง โดยมีอนุภาคเป็นท่อนยาวคดงอ (flexuous rod) ขนาดประมาณ 450-500 x 13 นาโนเมตร พบระบาดกว้างขวางในกล้วยไม้สกุลต่างๆ คือ สกุลแวนด้า (Vanda) สกุลช้าง (Rhynchostylis) สกุลฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis) สกุลซิมบิเดียม (Cymbidium) และสกุลออนซิเดียม (Oncidium) เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดอาการดอกด่างกับสกุลแคทลียา (Cattleya) และสกุลใกล้เคียงด้วย (โชคพิศิษฐ์ , 2537 ธีระ, 2532 อุทัย, 2535)

.ธีระ (2532) รายงานว่า เชื้อ CyMV สามารถแพร่ระบาดได้ง่าย โดยน้ำค้นพืช เป็นโรคและไม่พบว่ามีพาหะนำโรค เชื้อนี้มีพืชอาศัยจำกัดอยู่ในวงศ์ Orchidacaea วงศ์ Chenopodiaceae และวงศ์ Leguminosae เท่านั้น

ลักษณะอาการบนพืชทดสอบจะมีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชอาศัย เช่น

Family Orchidaceae

หวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium pompadour*) จะแสดงอาการหลายแบบ เช่น

ลักษณะอาการแบบที่ 1 แสดงอาการ chlorotic streak อย่างรุนแรงตามความยาวของใบทุกใบของหน่อกล้วยไม้

ลักษณะอาการแบบที่ 2 แสดงอาการจุดประสีขาวเป็นทางยาวขนานกันไปตามความยาวตลอดทั้งใบ มักพบบนใบที่โตเต็มที่ ส่วนในบริเวณยอดแสดงอาการใบด่างเป็นทาง บางครั้งพบอาการดอกด่างเห็นได้ชัดเจนที่บริเวณกลีบดอก

ลักษณะอาการแบบที่ 3 แสดงอาการยอดบิดเป็นเกลียว

ลักษณะอาการแบบที่ 4 แสดงอาการด่างไม่ชัดเจน (mild mottling)

ลักษณะอาการแบบที่ 5 แสดงอาการเป็นเส้นนูนขึ้นมาบนแผ่นหน้าของใบคล้ายๆ จะมีใบซ้อนขึ้นมาใหม่ แต่มีลักษณะเป็นเส้นยาวเรียวเล็ก

ลักษณะอาการแบบที่ 6 แสดงอาการด่างแบบ mottle เป็นทางยาวขนานกันไปตามความยาวของใบ

หวายซีซาร์ (*Dendrobium caesar*) ในหน่อที่เริ่มแตกใหม่ ใบที่ยอดอ่อนจะแสดงอาการด่างเป็นทางสีเขียวสลับเหลือง เนื้อใบบางและมีสีอ่อนกว่าใบปกติ ใบบริเวณที่เป็นสีเขียวมักมีสีเข้มและไม่เรียบ บางครั้งขอบใบมีสีม่วง ถ้าอาการรุนแรงใบจะบิดม้วนและห้อยลง ส่วนในหน่อที่เจริญเต็มที่ใบจะแสดงอาการด่างอย่างชัดเจน ใบหนากระด้างและตั้งขึ้น ข้อปล้องสั้นโดยเฉพาะบริเวณยอดของช่อดอก และมีรูปร่างดอกผิดปกติ

Family Chenopodiaceae

goosefoot (*Chenopodium amaranticolor*) แสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง เริ่มเป็นกับใบแก่โดยเกิดวงแหวนสีเขียวเข้มตรงกลางสีม่วงแดง วงแหวนยังคงมีสีเขียวอยู่ เมื่อจุดภายในและบริเวณเนื้อใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและร่วง

Family Leguminosae

.ขี้เหล็กเทศ (*Cassia occidentalis*) แสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีเหลืองอ่อนขนาดเล็ก ต่อมา จุดนี้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนแดงมีสีเหลือง (chlorosis) ล้อมรอบแผล นิยมใช้เป็นพืช ตรวจสอบเชื้อ CyMV

odontoglossum ringspot virus (ORSV) หรือ tobacco mosaic virus-orchid strain (TMV-O) รายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1951 โดย Jensen และ Gold (ธีระ , 2532) แต่ได้พบว่า ภาพสีของดอกกล้วยไม้แคทลียาลูกผสม ที่พิมพ์ไว้เมื่อปี ค.ศ. 1900 แสดงอาการติดโรคจากไวรัส ORSV (อุทัย , 2535) ในประเทศไทยพบทำให้เกิดโรคดอกด่างกับกล้วยไม้สกุลแคทลียา (ธีระ , 2532) เชื้อนี้เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ TMV ที่ทำให้เกิดใบด่างของยาสูบ มีอนุภาคเป็นท่อนตรงยาว (rigid rod) ขนาดประมาณ 280-320 x 15-24 นาโนเมตร ก่อให้เกิดอาการคล้ายๆกับเชื้อ CyMV ทำให้ดอกด่าง รูปของดอกผิดไป (color breaking) เซลล์ตาย (necrosis) ในกล้วยไม้สกุลแคทลียา สกุลซิมบิเดียม รวมทั้งสกุลใกล้เคียงด้วย (โชคพิศิษฐ์ , 2537)

.ธีระ (2532) รายงานไว้ว่า เชื้อ TMV-O สามารถแพร่ระบาดได้ง่ายโดยน้ำคั้นพืชเป็นโรค และยังไม่มีรายงานว่ามีพาหะนำโรค เชื้อนี้มีพืชอาศัยกว้างขวาง ได้แก่ วงศ์ Orchidaceae วงศ์ Solanaceae วงศ์ Amaranthaceae วงศ์ Chenopodiaceae วงศ์ Fabaceae วงศ์ pedaliaceae และวงศ์ Labiatae เป็นต้น

ลักษณะอาการบนพืชทดสอบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชทดสอบ ดังต่อไปนี้

Family Orchidaceae

แคทลียา (*Cattleya sp.*) ต้นที่เป็นโรคจะแสดงอาการที่ดอก คือ จะพบกลีบดอกมีอาการด่างอย่างชัดเจน ส่วนใบจะมีลักษณะอาการแตกต่างกันไป เช่น อาการคล้ายถูกแดดเผา (sun burn) อาการด่าง (mosaic) บางครั้งพบอาการปุ่มทำให้เนื้อใบขรุขระ และอาจพบจุดไหม้หรือแผลไหม้เกิดขึ้นด้วย บริเวณหน่ออ่อนมักจะมีอาการด่าง บางครั้งจะเกิดแผลสีแดงเรื่อๆ ที่ของดอกจะมีวงแหวน (ring) เล็กๆกระจายทั่วไป อาการที่รากพบว่าปลายรากมีอาการเน่าแห้งและมีรากใหม่แตกออกมาเรื่อยๆ และพบว่าส่วนใหญ่กล้วยไม้สกุลแคทลียา มักถูกเชื้อเข้าทำลายร่วมระหว่างเชื้อ CyMV กับเชื้อ TMV-O

Family Solanaceae

tobacco (*Nicotiana glutinosa* Linn.) แสดงอาการจุดสีน้ำตาลดำ (necrosis)

Family Amaranthaceae

globe amaranth (*Gomphrena globusa* Linn.) แสดงอาการจุดสีน้ำตาล และมีวงแหวนใสๆ ล้อมรอบ

love lies bleeding (*Amaranthus caudatus* Linn.) เกิดอาการเส้นใบเป็นสีน้ำตาล (vein necrosis) และเหี่ยว (wilt)

Family Chenopodiaceae

chenopodium (*Chenopodium murale*) เกิดอาการเป็นวงแหวนสีขาวเล็กๆ

Family Fabaceae

mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) แสดงอาการจุดสีน้ำตาลลักษณะกลมบริเวณใต้เซลล์ผิวใบ

Family Pedaliaceae

sesame (*Sesamum indicum* Linn.) แสดงอาการเส้นใบเป็นสีน้ำตาล และเหี่ยว

Family Labiatae

holy basil (*Ocimum sanctum* Linn.) แสดงอาการสีซีดบริเวณยอดอ่อน (Chlorosis)

ในการป้องกันกำจัดเชื้อไวรัส CyMV โชคพิศิษฐ์ (2528) ได้รายงานว่าการขยายพันธุ์พืชให้ปลอดโรคจากเชื้อไวรัสเชื้อสาเหตุโดยวิธีไม่อาศัยเพศ สามารถทำได้ 6 วิธี ดังนี้

1. การหนีรอด (escape) จากการเข้าทำลายของเชื้อ
2. การใช้ nucellar embryony ใช้ได้ในกรณีของส้ม
3. การรักษาด้วยสารเคมี (chemotherapy)
4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ หรือปลายยอดของพืช (meristem or tip culture)
5. การตัดใบที่เป็นโรคออก ซึ่งใช้ได้ในกรณีของ Abution mosaic virus
6. การรักษาด้วยความร้อน (heat therapy)

อรดี (2522) กล่าวไว้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือการนำเอาเนื้อเยื่อหรือกลุ่มเซลล์พืชมาเลี้ยงในหลอดแก้ว หรือในขวดโดยมีธาตุอาหารเป็นโภชนาการ แร่ธาตุที่จำเป็นและฮอร์โมนบางชนิดในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งเนื้อเยื่อหรือกลุ่มเซลล์จะมีการเจริญเติบโตขึ้นมา

เป็นต้นพืช มีราก ลำต้น และใบครบเหมือนต้นไม้ปกติ โดยที่เนื้อเยื่อหรือกลุ่มเซลล์นั้นจะต้องมีคุณสมบัติที่เจริญเติบโตเพิ่มขนาดขึ้นได้ จากบริเวณปลายยอดอ่อน ตา หรือเนื้อเยื่อถาวรที่สามารถเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อเจริญได้ โดยในสภาพนั้นจะต้องปราศจากเชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย (บุญยืน,2528)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ครั้งแรก (Morel,1960) โดยการใช้เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของสกุล Cymbidium ขนาด 0.1 มิลลิเมตร ทำให้กล้วยไม้สกุล Cymbidium ปลอดเชื้อ CyMV (Cymbidium mosaic virus) และพืชในวงศ์กล้วยไม้ที่มีการผลิตเป็นการค้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ปลอดจากโรคได้แก่ *Cattyleya* sp., *Cymbidium* sp., *Phaelanopsis* sp. (Jone, 1977) ในปัจจุบันการขยายพันธุ์กล้วยไม้นิยมวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง เพราะสามารถเลี้ยงได้ด้วยเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของกล้วยไม้แทบทุกส่วน ได้แก่ หน่อ ปลายยอดเจริญ ปลายราก ใบ และส่วนอื่นๆตามชนิดของกล้วยไม้ นับเป็นจุดเริ่มต้นของการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ แต่ผู้เลี้ยงเนื้อเยื่อรายต่อมาไม่คำนึงถึงวัตถุประสงค์การปราศจากไวรัส (Lawson and Ali, 1975; Murashige,1974)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เริ่มขึ้นนับตั้งแต่มีการเพาะเมล็ดของกล้วยไม้ได้สำเร็จ ปกติเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมากภายในมีเพียงคัพภะ (embryo) แทบไม่มีอาหารสำรองไว้เพื่อใช้ในการงอกของเมล็ดเลย ดังนั้นเมล็ดจะงอกได้ต้องอาศัยอาหารจากภายนอก ทำให้มีผู้ศึกษาและหาวิธีเพาะเมล็ดกล้วยไม้ จนกระทั่งปี ค.ศ. 1899 Bernard พบว่า ในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้ได้รับอาหารจากเชื้อราพวก myohorrhiza ในสกุล *Rhizootonia* ซึ่งอาศัยอยู่ตามรากกล้วยไม้ และได้ศึกษาค้นคว้าต่อมาจนสามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ให้งอกได้สำเร็จในหลอดทดลอง แต่จะต้องใส่เชื้อราดังกล่าวลงไปในอาหารด้วย (Arditti,1977)

Knudson (1922) เป็นบุคคลแรกที่สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ได้โดยไม่ต้องอาศัยเชื้อราดังกล่าว โดยเพาะในอาหารวุ้นที่มีสารอินทรีย์และอนินทรีย์บางชนิดเป็นองค์ประกอบและมีน้ำตาลกลูโคส 2% วุ้น 1.5% รวมอยู่ด้วย แต่ต้นอ่อนที่งอกแล้วมีการเจริญที่ไม่ดีเท่าต้นอ่อนที่งอกในสภาพธรรมชาติ Knudson ได้ศึกษาค้นคว้าต่อมาจนถึง ค.ศ. 1946 ก็สามารถค้นพบสูตรอาหารใหม่ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ในอัตราที่พอเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อน และให้ชื่อสูตรอาหารนี้ว่า 'Knudson's C' ต่อมาปี ค.ศ. 1948 Vacin และ Went พบสูตรอาหารที่สามารถใช้เป็นอาหารเพาะเมล็ดกล้วยไม้และทำให้ต้นอ่อนเจริญเติบโตดี สูตรอาหาร Knudson's C และ Vacin and Went (VW) เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้

Morel (1960) พบว่าสูตรอาหาร Knudson's C นอกจากจะใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ได้สำเร็จ สูตรอาหารดังกล่าวยังมีองค์ประกอบของอาหาร เพียงพอสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* โดยคัดชิ้นส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารจนเกิดเป็นเนื้อเยื่อสีเขียวเล็กๆขึ้น และให้ชื่อว่า 'bulblet' ซึ่งต่อมาเปลี่ยนเป็น 'Protocorm-like bodies' (plbs)

Wimber (1963) ทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของ Cymbidium เช่นเดียวกับ Morel และได้ทดลองเพิ่มปริมาณของ plbs โดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณของ plbs ได้ และถ้าเลี้ยงต่อไป plbs นั้นยังสามารถแปรเป็นต้นอ่อนได้ในบางส่วน Wimber พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ขยายพันธุ์พืชได้

ต่อมาพบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มี 3 ระยะด้วยกัน คือ

1. การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อให้เกิด plbs ในระยะนี้นิยมเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากพบว่าถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวทุกส่วนของเนื้อเยื่อจะได้รับอาหารเท่ากัน และช่วยเพิ่มพื้นที่รับอาหารของเนื้อเยื่อให้มากขึ้น (Kako,1973) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจำเป็นต้องใช้เครื่องเขย่า (shaker) เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศ นอกจากนั้นการเขย่ายังทำลาย polarity ของเนื้อเยื่อซึ่งจะไปยับยั้งการเกิดเป็นต้นและราก (Scully,1967; Street,1969; Wimber,1963) จากสาเหตุดังกล่าว การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจะทำให้เกิด plbs ได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง (Wimber, 1965)

2. การเพิ่มปริมาณ plbs ซึ่งสามารถทำได้โดยเลี้ยง plbs ในอาหารเหลว และ อาหารแข็งต่อไป

3. การแปร plbs ให้เป็นต้นอ่อนซึ่งนิยมเลี้ยง plbs บนอาหารแข็ง เนื่องจาก plbs จะแปรสภาพเป็นต้น และรากได้ดีในสภาพอาหารแข็ง

Sagawa และ Shoji (1967) ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอด ตาข้าง และเนื้อเยื่อของลำต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ในอาหารสูตรพื้นฐานของ Knudson's C หรืออาหารสูตรดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 25% และ NAA 1 ppm พบว่าตายอดและตาข้างที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ Knudson's C จะเจริญจนเกิดเป็น plbs ได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น ต่อมาปี ค.ศ. 1970 Kim,Kunisaki และ Sagawa ได้ดัดแปลงอาหารที่ใช้เลี้ยงกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* พบว่าตายอดและตาข้างเจริญเกิดเป็น plbs ได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% ในระยะเวลา 3 เดือน

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1970) เลี้ยงตายอดและตาข้างของกล้วยไม้พวกกิ่งโดด คือ *Rhynoostylis gigantia* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ในอาหารสูตรดัดแปลงจากสูตรพื้นฐานของ Knudson's C โดยเติมอนุมูล K^+ และ Cl^- ลงไป นอกจากนี้ยังใช้ Fe-EDTA เพื่อให้ธาตุเหล็กและเติมธาตุอาหารย่อย glycine และวิตามิน

Morel (1960) พบว่าสูตรอาหาร Knudson's C นอกจากจะใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ได้สำเร็จ สูตรอาหารดังกล่าวยังมีองค์ประกอบของอาหาร เพียงพอสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* โดยคัดชิ้นส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารจนเกิดเป็นเนื้อเยื่อสีเขียวเล็กๆขึ้น และให้ชื่อว่า 'bulblet' ซึ่งต่อมาเปลี่ยนเป็น 'Protocorm-like bodies' (plbs)

Wimber (1963) ทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของ Cymbidium เช่นเดียวกับ Morel และได้ทดลองเพิ่มปริมาณของ plbs โดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณของ plbs ได้ และถ้าเลี้ยงต่อไป plbs นั้นยังสามารถแปรเป็นต้นอ่อนได้ในบางส่วน Wimber พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ขยายพันธุ์พืชได้

ต่อมาพบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มี 3 ระยะด้วยกัน คือ

1. การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อให้เกิด plbs ในระยะนี้นิยมเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากพบว่าถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวทุกส่วนของเนื้อเยื่อจะได้รับอาหารเท่ากัน และช่วยเพิ่มพื้นที่รับอาหารของเนื้อเยื่อให้มากขึ้น (Kako,1973) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจำเป็นต้องใช้เครื่องเขย่า (shaker) เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศ นอกจากนั้นการเขย่ายังทำลาย polarity ของเนื้อเยื่อซึ่งจะไปยับยั้งการเกิดเป็นต้นและราก (Soully,1967; Street,1969; Wimber,1963) จากสาเหตุดังกล่าว การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจะทำให้เกิด plbs ได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง (Wimber, 1965)

2. การเพิ่มปริมาณ plbs ซึ่งสามารถทำได้โดยเลี้ยง plbs ในอาหารเหลว และ อาหารแข็งต่อไป

3. การแปร plbs ให้เป็นต้นอ่อนซึ่งนิยมเลี้ยง plbs บนอาหารแข็ง เนื่องจาก plbs จะแปรสภาพเป็นต้น และรากได้ดีในสภาพอาหารแข็ง

Sagawa และ Shoji (1967) ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอด ตาข้าง และเนื้อเยื่อของลำต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ในอาหารสูตรพื้นฐานของ Knudson's C หรืออาหารสูตรดัดแปลงโดยเติมน้ำมะพร้าว 25% และ NAA 1 ppm พบว่าตายอดและตาข้างที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ Knudson's C จะเจริญจนเกิดเป็น plbs ได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น ต่อมาปี ค.ศ. 1970 Kim,Kunisaki และ Sagawa ได้ดัดแปลงอาหารที่ใช้เลี้ยงกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* พบว่าตายอดและตาข้างเจริญเกิดเป็น plbs ได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% ในระยะเวลา 3 เดือน

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1970) เลี้ยงตายอดและตาข้างของกล้วยไม้พวกกิ่งโดด คือ *Rhyncostylis gigantia* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ในอาหารสูตรดัดแปลงจากสูตรพื้นฐานของ Knudson's C โดยเติมอนุมูล K^+ และ Cl^- ลงไป นอกจากนี้ยังใช้ Fe-EDTA เพื่อให้ธาตุเหล็กและเติมธาตุอาหารย่อย glycine และวิตามิน

ของเครื่องเขย่า ถ้าเครื่องเขย่าหยุดทำงานนานเกิน 2 ชั่วโมงขึ้นไป จะมีผลทำให้ชลอการเจริญเติบโตของ plbs เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งและถ้าเครื่องเขย่าหยุดทำงานนานเกิน 16 ชั่วโมง ขึ้นไป จะไปมีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย

2.4 สภาพความเป็นกรดและด่างของอาหาร เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ถ้าค่า pH ของอาหารสูงหรือต่ำเกินไปจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อตายได้ ค่า pH ของอาหารที่เหมาะสม ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ประมาณ pH 5.0-5.5 แต่เนื่องจากการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันจะทำให้ค่า pH ลดลงประมาณ 0.4 การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้จึงควรเตรียมอาหารที่มีค่า pH ที่พอเหมาะ ซึ่งกล้วยไม้แต่ละชนิดอาจต้องการอาหารที่มีค่า pH แรกเริ่มต่างกันได้

สำหรับการป้องกันกำจัดเชื้อไวรัส CyMV โชคพิศิษฐ์(2528) ยังได้รายงานการรักษาโรคไวรัสด้วยความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการรักษาโรคไวรัสด้วยสารเคมี (Chemotherapy) ไว้ดังนี้

การรักษาโรคไวรัสด้วยความร้อน

cymbidium mosaic virus ที่เข้าทำลายหวายปอมปาดัวร์ จะมีปริมาณลดลงเมื่อให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 เดือน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าหวายปอมปาดัวร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนปลายยอดขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร ของหน่อที่ให้ความร้อนแห้งนาน 2 และ 4 สัปดาห์ ปลอดจากเชื้อ CyMV เพียงร้อยละ 10 ของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง

การรักษาโรคไวรัสด้วยสารเคมี

จากการทดสอบผลของสารเคมี 5 ชนิด ได้แก่ 2- Thiouracil , 2-4-Dichlorophenoxyacetic acid , Aspirin , Actinomycin D และ Hydrotonic ที่มีผลยับยั้งต่อ CyMV ในหวายปอมปาดัวร์ พบว่า 2-Thiouracil ความเข้มข้น 2×10^{-4} , 1×10^{-3} , 5×10^{-3} M และ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid ความเข้มข้น 1.3×10^{-4} , 6.8×10^{-4} M มีผลต่อการเข้าทำลายของ CyMV โดยทำให้จำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นบนพืชทดสอบลดลง 2-Thiouracil ความเข้มข้น 1×10^{-3} M และ Aspirin ความเข้มข้น 0.02 % ลดความสามารถในการเข้าทำลายของ CyMV เมื่อฉีดสารเคมีเข้าภายในใบพืชทดสอบ ก่อนการปลูกเชื้อ และจากการทดลองฉีดพ่น 2-Thiouracil ความเข้มข้น 1×10^{-3} , 5×10^{-3} M หรือ Hydrotonic ความเข้มข้น 0.0125-0.025 % ติดต่อกันทุกวันนาน 15 และ 30 วัน พบว่า ไวรัส ในหวายปอมปาดัวร์มีปริมาณลดลง เมื่อผสม Hydrotonic ความเข้มข้น 0.01 , 0.05 และ 0.1 % ลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะทำให้ต้นหวายปอมปาดัวร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีขนาด 0.5 และ 1 มิลลิเมตร บางส่วนปลอดจากเชื้อ CyMV แต่เนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่จะยังคงมี ไวรัสอยู่เช่นเดียวกับ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพียงอย่างเดียว

การวินิจฉัยโรคไวรัสโดยวิธี ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) มีรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1971 โดยการวิจัยทางการแพทย์ (Engvall and Perlmann 1971) โดยใช้แกมมาโกลบูลิน (gamma globulin , gamma immunoglobulin , r-G , r-IG , IgG) เป็นตัวบ่งบอกถึงการตรวจสอบปริมาณไวรัสของคนและสัตว์ ที่เฉพาะเจาะจงกับแกมมาโกลบูลินนั้น โดยการย่อยสับสเตรทให้เกิดสี วิธี ELISA ถูกนำมาใช้ร่วมกับวิธี microplate โดย Valler และคณะ (1974) (วัชรีพร , 2525) มีรายงานการใช้ ELISA กับงานวิจัยไวรัสพืชเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 (Clark Adams and Barbara 1976) ได้ดัดแปลงมาใช้กับไวรัสพืชได้สำเร็จ และศึกษาเริ่มแรกกับการผลิตพืชพวกไม้ผลและมันฝรั่งเพื่อให้ปลอดจากเชื้อไวรัส เช่น plum pox virus, prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus และปัจจุบันเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุ โรคพืชได้หลายชนิด เช่น ไวรัสพืชชนิด Sprioplasma (Clark , Flegg , Bar-Joseph and Rottem 1978) แบคทีเรีย (Cother and Vruggink 1980) และเชื้อรา (Casper and Mendgen 1979)

ในปี ค.ศ. 1976 มีการนำเทคนิค double antibody sandwich มาใช้เพื่อตรวจสอบไวรัส 2 ชนิด คือ Arabis mosaic virus (AMV) และ Plum pox virus (PPV) โดยไวรัสที่ทดสอบจะเข้าทำปฏิกิริยากับแกมมาโกลบูลิน ซึ่งติดแน่นกับผิวของ polysteryne microtitreplate และไวรัสนี้จะทำปฏิกิริยาอีกครั้งกับแกมมาโกลบูลิน ซึ่งมีเอนไซม์เกาะติดอยู่ (Enzyme conjugation r-globulin) เมื่อเติมสับสเตรทของเอนไซม์ลงไป เอนไซม์จะย่อยและเปลี่ยนสับสเตรททำให้เกิดสี วัดค่าความเข้มข้นของสีด้วย spectophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร คำนวณปริมาณไวรัสที่เฉพาะเจาะจงกับแกมมาโกลบูลินได้ (วัชรีพร , 2525) ELISA นำมาใช้ตรวจตัวอย่าง .จำนวนมากๆ ให้ผลแน่นอนในเวลาอันรวดเร็ว (Korpraditskul , Casper and Lesemann 1979) สามารถตรวจหาไวรัสที่มีปริมาณน้อย และอนุภาคแตกหัก ที่ไม่สามารถบอกได้แน่ชัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Korpraditskul , Casper and Lesemann 1980) สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของไวรัสชนิดเดียวกัน และไวรัสต่างชนิดกัน (Konig , 1978) วิธี ELISA สามารถตรวจสอบไวรัสที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ (วัชรีพร , 2525)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. พืชทดลอง คือ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้พันธุ์ Dendrobium Jaqualene Thomus 'Pink' และ Dendrobium Jaqualene Thomus 'White'
2. เครื่องชั่ง (balance)
3. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)ใช้ไฟฟ้า แบบอัตโนมัติ
4. หม้ออบความร้อน (hot air oven)
5. เตาอุ่นความร้อน และเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)
6. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
7. ตู้เย็น (refrigerator)
8. ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet)
9. สารเคมี
   9.1 สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ
      - ethyl alcohol 70 % และ 90 %
      - clorox 10 % และ 20 %
   9.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมสูตรอาหาร Vacin and Went (ภาคผนวก)
   9.3 สารเคมีที่ทดลองใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อลดปริมาณการเข้าทำลายของเชื้อ CyMV
      - 1- Adamantanamine hydrochloride
10. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
      - plate
      - cylinder ขนาด 25 ml 100 ml และ 250 ml
      - beaker
      - pipette ขนาด 1 ml 5 ml และ 10 ml
      - dropper
      - แท่งแก้วคน
      - ช้อนตักสารเคมี

- ขวดแก้วขนาด 120 ml และ 180 ml พร้อมฝาปิด
- ขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125 ml
- หนังยาง
- ถุงพลาสติก
- กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ (alumimium foil)
- pH meter

11. อุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet)
    - ตะเกียงแอลกอฮอล์
    - ปากคีบ
    - มีดผ่าตัดพร้อมด้าม
    - plate ที่อบฆ่าเชื้อ
    - กระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
    - ผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
    - beaker ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
    - ไม้ขีดไฟ
    - นาฬิกา เพื่อใช้จับเวลา

12. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Culture room)
    - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperture controlled)
    - ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ
    - เครื่องตั้งเวลา (timer)
    - เครื่องเขย่า (shaker or rotator)

13. ชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้ (ELISA KIT) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน

.วิธีการ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเตรียมอาหารสูตร Vacin and Went (1949) (ภาคผนวก) โดยเตรียมจากสารละลายเข้มข้น (stock solution) นำสารประกอบแต่ละตัวมารวมกัน แล้วเติมน้ำตาล 20 g / l หลังจากนั้นปรับค่า pH ของอาหารให้อยู่ในช่วง pH 4.8 - 5.0 ด้วย สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N หรือ สารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 N ในการเตรียมอาหารแข็งจะเติมวุ้น 8 g / l ลงไปในส่วนผสมดังกล่าว และละลายวุ้นโดยใช้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำอาหารที่ได้เทใส่ขวดอาหาร ปิดขวดอาหารและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 - 20 นาที

หมายเหตุ :- ก. ในการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มให้เทอาหารใส่ flask ขนาด 125 ml ปริมาตร 40 ml ต่อขวด ปิดปากขวดด้วยฟรอยส์ ทับด้วยพลาสติก แล้วใช้ยางรัด

ข. ในการทำการทดลอง ให้เทอาหารใส่ขวดอาหารขนาด 120 ml ซึ่งมีการเติม 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้น 0,10,20,25,50,75 mg / l ปริมาตร 20 ml ต่อขวด ปิดฝาขวดให้แน่นสนิท

2. การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) จากเนื้อเยื่อส่วนยอดของกล้วยไม้ซึ่งเป็นโรคใบด่างไวรัส (CyMV)

2.1 การเตรียมตู้ย้ายเนื้อเยื่อซึ่งเป็นตู้กรองอากาศให้บริสุทธิ์ปลอดจากจุลินทรีย์ โดยการเช็ดตู้ด้วยแอลกอฮอล์ 70 % แล้วทำการฆ่าเชื้อด้วยแสง UV โดยทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบกำหนดปิดแสง UV ในขณะทำการปฏิบัติจะเปิดใช้หลอดฟลูออเรสเซ็นท์ และระบบกรองอากาศ

2.2 เตรียมอุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการย้ายโปรโตคอร์มเช่น ปากคีบ มีดผ่าตัด ช้อนตัก plate , beaker ซึ่งนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์สำหรับจุ่มอุปกรณ์ลนไฟฆ่าเชื้อ นำไปเก็บไว้ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ อุปกรณ์ทุกอย่างที่จะเข้าตู้ควรมีการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ก่อนเข้าตู้ทุกครั้ง

2.3 ในการย้ายโปรโตคอร์มจะนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้พันธุ์ Dendrobium Jaqualene Thomus 'Pink' และ Dendrobium Jaqualene Thomus 'White' พร้อมขวดอาหารใหม่ใช้อาหารเหลวสูตร Vacin and Went เข้าตู้ย้าย โดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ที่บริเวณด้านนอกนำหนังยางและถุงพลาสติกออกจากปากขวด เหลือแต่กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ลนปากขวดด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์

เปิดกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ออกแล้วใช้ช้อนตักโปรโตคอร์มมาใส่ใน plate อาจมีการตัดแต่งได้ เพื่อไม่ให้เป็นกลุ่มก้อนแน่นมากเกินไป

2.4 ลนปากขวดอาหารเหลวใหม่ด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ เปิดกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ออกใส่โปรโตคอร์มลงไปประมาณ 20 ชิ้นต่อขวด ลนปากขวดอีกครั้งปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ทับด้วยพลาสติก แล้วรัดหนังยาง จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ใช้แสง 2500 ลักซ์ เวลา 24 ชั่วโมง

ในการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went ควรเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

3. การผลิตโปรโตคอร์มปลอดเชื้อใบด่างไวรัสโดยการใช้สาร 1-Adamantanamine hydrochloride ร่วมกับ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้มาเลี้ยงในอาหารสูตร Vacin and Went ซึ่งเติม 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ในอาหารเหลวและในอาหารแข็ง กลุ่มละ 6 ความเข้มข้น คือ 0,10,20,25,50,75 mg / l ความเข้มข้นละ 20 ซ้ำ

.วิธีการทดลอง

3.1 เตรียมอุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการย้ายโปรโตคอร์มเช่น ปากคีบ มีดผ่าตัด plate , beaker ซึ่งนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์สำหรับจุ่มอุปกรณ์ ลนไฟฆ่าเชื้อ นำไปเก็บไว้ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ อุปกรณ์ทุกอย่างที่จะเข้าตู้ ควรมีการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ก่อนเข้าตู้ทุกครั้ง

3.2 ในการย้ายโปรโตคอร์มโดยการนำโปรโตคอร์ม ของกล้วยไม้สกุลหวายซึ่งเป็นโรคใบด่างเนื่องจากเชื้อ CyMV พร้อมขวดอาหารเหลวใหม่ที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 0, 10, 20, 25, 50, 75 mg / l เข้าตู้ย้าย โดยเช็ดแอลกอฮอล์ที่บริเวณด้านนอก แล้วนำเข้าไปไว้ในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

3.3 นำหนังยางและถุงพลาสติกออกจากปากขวดอาหารเก่า เหลือแต่กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ลนปากขวดด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ เปิดกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์แล้วใช้ปากคีบคีบก้อนโปรโตคอร์มที่มีสีเขียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 - 10 มิลลิเมตร สูง 5 - 10 .มิลลิเมตร มาใส่ไว้ใน plate

3.4 ย้ายโปรโตคอร์มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 - 10 มิลลิเมตร สูง 5 - 10 .มิลลิเมตร ใส่ในขวดอาหารเหลวที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ในความเข้มข้น

แตกต่างกัน ดังนี้คือ 0, 10, 20, 25, 50, 75 mg / l โดยใช้โปรโตคอร์ม 5 ชิ้น ต่อขวด ในแต่ละการทดลองใช้ตัวอย่าง 20 ซ้ำ หลังจากนั้นลนปากขวดอีกครั้ง ปิดฝาขวดให้แน่นสนิท นำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ใช้แสง 2500 ลักซ์ เวลา 24 ชั่วโมง

ส่วนการทดลองผลิตโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายในอาหารแข็งสูตร VW โดยใช้สาร 1-Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 0,10,20,25,50,75 mg / l ใช้โปรโตคอร์ม 3 ชิ้นต่อขวด ในแต่ละการทดลองใช้ตัวอย่าง 20 ซ้ำ หลังจากนั้นลนปากขวดอีกครั้ง ปิดฝาขวดให้แน่นสนิท นำไปวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้แสง 2500 ลักซ์ โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.5 ทำการเปลี่ยนอาหารที่เติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ ทุก 14 วัน สังเกตผลทุกสัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ โดยบันทึกผลดังนี้

6.1 อาหารเหลว

6.1.1 ตรวจการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆของโปรโตคอร์ม โดยดูจากลักษณะความขุ่นของอาหาร

6.1.2 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง และ ความสูง

6.2 อาหารแข็ง

6.2.1 ตรวจการปนเปื้อนของโปรโตคอร์มจากเชื้อรา และแบคทีเรีย

6.2.2 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง และ ความสูง

โปรโตคอร์มที่มีการปนเปื้อน จะทำการล้างด้วย clorox 20 % ผสม tetracyclin ความเข้มข้น 20 mg/l เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 3 นาที ก่อนย้ายลงในอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่ผสมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride

4. การตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้ เทคนิค ELISA

เมื่อครบ 4 สัปดาห์แล้ว นำโปรโตคอร์มจากการทดลองมาตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้ ELISA KIT ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน โดยการตรวจสอบจากชิ้นโปรโตคอร์มในอาหารเหลวที่ผสมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride และการตรวจสอบจากยอดอ่อนที่เจริญจากโปรโตคอร์มในอาหารที่ผสมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride

เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การปลอดโรคจากเนื้อเยื่อทั้ง 2 กลุ่ม กับเนื้อเยื่อโปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวที่ไม่มีการผสมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ขั้นตอนในการใช้ ELISA KIT ดังแสดงไว้ในภาคผนวก

เวลาและสถานที่

<u>เวลา</u> เริ่มทดลอง กันยายน 2537

สิ้นสุดการทดลอง เมษายน 2538

<u>สถานที่</u>

ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาขาพืชสวน และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาขาพืชไร่ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

89085

ผลการทดลอง

ในการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย (Denerobium) ทั้ง 2 พันธุ์ที่ได้จากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคใบด่างไวรัส เนื่องจากเชื้อ CyMV พบว่า โปรโตคอร์ม มีการเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นและจะหลุดออกจากกันเนื่องจากแรงเหวี่ยงของเครื่องเขย่า ก้อนโปรโตคอร์มย่อยที่แตกหลุดออกมาก็จะค่อยเพิ่มขนาดขึ้น ในบางขวดมีโปรโตคอร์ม ที่แตกยอดออกมาจำนวนมากมีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ดังภาพที่ 1 และ ภาพที่ 2 และพบว่า ในระหว่างการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มจะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเห็นเป็น คราบเมือกสีดำรอบๆ ขวด และปะปนอยู่ในอาหารเหลวรวมกับโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ สกุลหวาย ดังภาพที่ 3

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในขวดอาหารเหลว

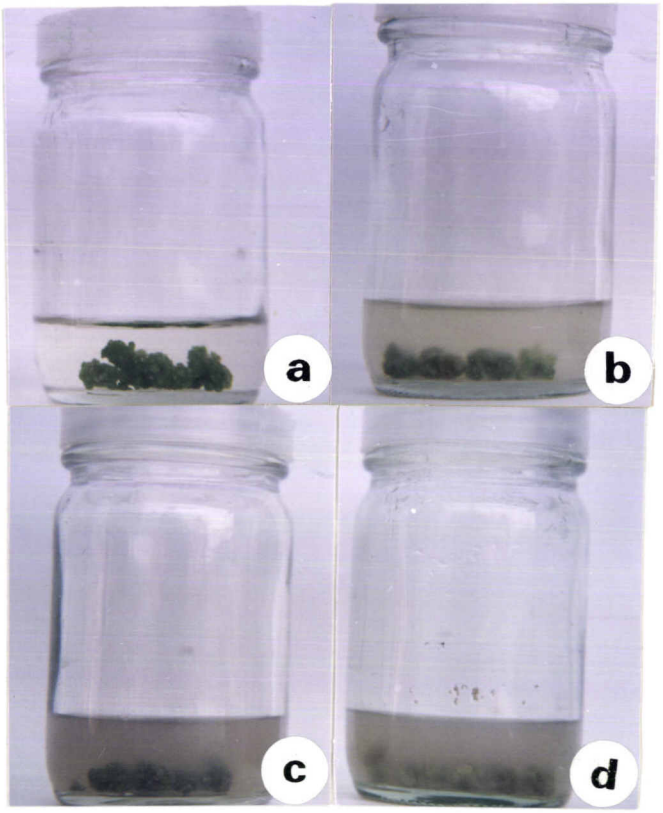
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ที่แตกยอดออกมาจำนวนมาก ภายในขวดอาหารเหลว

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียภายในขวดอาหารเหลว

14639

การผลิตโปรโตคอร์มปลอดเชื้อใบต่างไวรัสโดยการใช้สาร 1- Adamantanamine hydrochloride ร่วมกับ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภายหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลวสูตร VW โดยเติมสาร 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้ 2 สัปดาห์ พบว่าอาหารเหลวเกิดการปนเปื้อนทำให้อาหารเกิดความขุ่น ซึ่งแบ่งลักษณะความขุ่นได้ 4 ลักษณะ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะความขุ่นของอาหารเหลวสูตร VW หลังจากทำการทดสอบโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ 2 สัปดาห์

a ลักษณะความขุ่น 0 = อาหารเหลวไม่ขุ่นโปรโตคอร์มมีสีเขียวสด

b ลักษณะความขุ่น 1 = อาหารเหลวเริ่มขุ่นแต่โปรโตคอร์มยังมีสีเขียว

c ลักษณะความขุ่น 2 = อาหารเหลวขุ่นโปรโตคอร์มมีสีน้ำตาลปนเขียว

d ลักษณะความขุ่น 3 = อาหารเหลวขุ่นมากโปรโตคอร์มมีสีน้ำตาล

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จากการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลว พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ในตัวอย่างที่ผสมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ในทุกความเข้มข้น ดังตารางที่ 1 และในการตรวจสอบเชื้อ CyMV โดยการใช้ ELISA KIT จากตารางที่ 1 พบว่า ในอาหารเหลวซึ่งไม่มีการเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ในอาหารเหลว ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ปรากฏว่า ในทุกตัวอย่างมีการติดเชื้อไวรัสคิดเป็น 100% ในขณะที่โปรโตคอร์มในอาหารเหลวที่ผสมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้น 10 mg/l พบชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ CyMV 48.64% และที่ความเข้มข้น 20 mg/l พบชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ CyMV 21.81% สำหรับที่ความเข้มข้น 25, 50, 75 mg/l ไม่สามารถนำมาตรวจสอบได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย 100%

การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง และ ความสูง

ไม่สามารถวัดการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย และการตัดแต่งเนื้อเยื่อ หรือส่วนที่เกิดการปนเปื้อน ทำให้ขนาดของโปรโตคอร์มไม่คงที่

ตารางที่ 1 ผลการทดลองการใช้สาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went

อาหารเหลวที่เติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้น (mg / l)	เปอร์เซนต์การปนเปื้อน	เปอร์เซนต์ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ CyMV จากการตรวจสอบโดยใช้ ELISA KIT
0	40	0
10	70	48.64
20	50	21.81
25	100	-- 1/
50	100	– 1/
75	100	– 1/

1/ ไม่สามารถตรวจสอบได้ เนื่องจากตัวอย่างเกิดการปนเปื้อนทั้งหมด

จากการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ในทุกความเข้มข้น พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่เนื้อเยื่อแต่ละชิ้น โดยทำให้อาหารบริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อโปรโตคอร์มเป็นสีม่วง และเป็นเมือกก่อนกระจายไปในอาหารทำให้วุ้นเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม และในการตรวจสอบเชื้อ CyMV โดยการใช้ ELISA KIT จากตารางที่ 2 พบว่า ในอาหารแข็งซึ่งไม่มีการเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ปรากฏว่าในทุกตัวอย่างมีการติดเชื้อไวรัส คิดเป็น 100% ส่วนโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้น 10 mg/l ไม่สามารถนำมาตรวจสอบได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย 100% สำหรับโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในสารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 20 mg/l พบชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ CyMV 33.83% ที่ความเข้มข้น 25, 50 mg/l พบชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ CyMV 20% และที่ความเข้ม 75 mg/l พบชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ CyMV 25%

การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง และ ความสูง

ไม่สามารถวัดการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย และการตัดแต่งเนื้อเยื่อ หรือส่วนที่เกิดการปนเปื้อน ทำให้ขนาดของโปรโตคอร์มไม่คงที่

ตารางที่ 2 ผลการทดลองการใช้สาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went

อาหารแข็งที่เติมสาร 1 - Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้น (mg / l)	เปอร์เซนต์การปนเปื้อน	เปอร์เซนต์ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อ CyMV จากการตรวจสอบโดยใช้ ELISA KIT
0	46.66	0
10	100	–[1/]
20	33.33	33.83
25	75	20
50	75	20
75	93.33	25

1/ ไม่สามารถตรวจสอบได้ เนื่องจากตัวอย่างเกิดการปนเปื้อนทั้งหมด

สรุปผลการทดลอง

ในการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย จะมีโปรโตคอร์มบางส่วนเกิดการปนเปื้อนเนื่องจากเครื่องเขย่าไม่ทำงานเป็นเวลา 3 วัน เนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการทดสอบด้วยสารเคมีจะได้จากเนื้อเยื่อที่แตกออกมาจากก้อนโปรโตคอร์ม แล้วเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นและได้จากโปรโตคอร์มที่ไม่ค่อยมีคราบสีดำเกาะติดอยู่

จากการเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารที่มีการเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อผลิตเนื้อเยื่อพืชที่ปลอดเชื้อไวรัส แล้วจึงนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยวิธี ELISA เพื่อหาเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อไวรัส CyMV พบว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติม สาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 10, 20, 0 mg / l มีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อ 48.64% 21.81% และ 0% ตามลำดับ และในความเข้มข้น 25, 50, 75 mg / l ไม่สามารถนำมาตรวจสอบได้เนื่องจาก เกิดการปนเปื้อน

ส่วนโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีการเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 20, 75, 50, 25, 0 mg / l ให้เปอร์เซนต์การปลอดเชื้อไวรัส CyMV 33.84% 25% 20% 20% และ 0% ตามลำดับ และในความเข้มข้น 10 mg / l ไม่สามารถนำมาตรวจสอบได้เนื่องจากเกิดการปนเปื้อน สำหรับโปรโตรคอร์มบางส่วนที่เจริญไปเป็นยอดอ่อน Shoot ในอาหารแข็งที่มีการเติมสารเคมี 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 20 และ 0 mg/l เมื่อนำมาตรวจการปลอดเชื้อไวรัส CyMV พบเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อไวรัส 34.22% ในขณะที่ตัวเปรียบเทียบไม่มีการผสมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride พบว่ามีการ .ติดเชื้อไวรัส 100%

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการเลี้ยงเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มกล้วยไม้ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว แล้ววางบนเครื่องเขย่าให้ทำงานตลอดเวลาด้วยความเร็ว 120 รอบ / นาที มีความเข้มแสง 2500 ลักซ์ โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเครื่องเขย่าหยุดทำงานเป็นเวลา 3 วัน ทำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ขาดออกซิเจนในการเจริญเติบโต จึงมีการเน่าโดยเริ่มจากโปรโตคอร์มที่อัดแน่นกันตรงกลางขวด โปรโตคอร์มจะมีลักษณะสีเหลืองซีด หรือมีสีขาว และโปรโตคอร์มที่มีลักษณะดังกล่าวจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนโปรโตคอร์มบางส่วนตาย ซึ่งตรงกับรายงานของเรณู (2526) ว่า การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในระยะแรกให้เกิดเป็นโปรโตคอร์ม เนื้อเยื่อต้องการสภาพอาหารเหลว จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องเขย่า เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่ออยู่รอด ถ้าเครื่องเขย่าหยุดการทำงานเป็นเวลานาน ทำให้เนื้อเยื่อตายได้ และมีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย มีลักษณะเป็นคราบเมือกสีดำเกาะติดอยู่ที่ผนังรอบๆ ขวด และลอยปะปน อยู่ในอาหารเหลว และบางส่วนจะเกาะติดแน่นกับโปรโตคอร์มกล้วยไม้ เมื่อนำมาทำการล้างโปรโตคอร์มเหล่านั้นด้วย clorox 20% ผสม tetracyclin ความเข้มข้น 20 mg / l เป็นเวลานาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนย้ายลงในขวดอาหารใหม่ และวางบนเครื่องเขย่าทำงานตลอดเวลา พบว่า บางขวดยังมีคราบเมือกสีดำเกาะอยู่ที่ผนังขวด บางขวดจะมีลักษณะเป็นก้อนเนื้อเยื่อกลมๆ สีขาวนวล หรือบางครั้งมีสีชมพู และในขวดที่มีการเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มได้ดี พบว่า ขวดที่โปรโตคอร์มไม่เกาะกลุ่มแน่น จะมีจำนวนโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้นมาก ส่วนขวดที่มีโปรโตคอร์มเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ จะทำให้เกิดการแตกยอดเป็นจำนวนมาก เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง โปรโตคอร์มที่มีการปนเปื้อนจากในอาหารเหลวจะเน่า และมีน้ำเมือกไหล เมื่อน้ำเมือกไหลไปยัง โปรโตคอร์มที่ไม่มีการปนเปื้อนก็จะทำให้โปรโตคอร์มดังกล่าวเกิดการปนเปื้อนเช่นกัน

ในการตรวจสอบเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อไวรัส CyMV โดยวิธี ELISA พบว่าโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydochloride จะเกิดการปนเปื้อนในบางขวดระหว่างทำการทดลองอยู่ ทั้งนี้อาจเกิดจากโปรโตคอร์มบางส่วน นำมาขวดที่มีการปนเปื้อนแต่แรก และเมื่อทำการเปลี่ยนขวดอาหารใหม่ ถึงแม้ว่าจะทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อบริเวณที่เสียออกไป พร้อมทั้งล้างโปรโตคอร์มเหล่านั้นด้วย clorox 20 % ผสม tetracyclin ความเข้มข้น 20 mg / l เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แต่ก็พบว่ามีการปนเปื้อนจนโปรโตคอร์มในขวดนั้นๆ ไม่สามารถนำมาตรวจสอบ ELISA ได้

ส่วนโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride จะเกิดการปนเปื้อนที่เนื้อเยื่อแต่ละชิ้น ซึ่งเชื้อที่ปนเปื้อนเป็นเชื้อแบคทีเรีย โดยทำให้อาหาร

บริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อโปรโตคอร์มเป็นสีม่วง และเป็นเมือก ก่อนกระจายไปในอาหาร ทำให้วุ้นเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม และเมื่อทำการตัดแต่งเนื้อเยื่อ รวมทั้งล้างด้วย clorox 20 % ผสม tetracyclin ความเข้มข้น 20 mg / l เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนเปลี่ยนขวดใหม่ ทำให้ โปรโตคอร์มมีขนาดเล็กลง ไม่สามารถทำการบันทึกการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่ใช้ในการทดลอง และในที่สุด บางโปรโตคอร์มก็จะเน่าเละ มีสีน้ำตาล ไม่สามารถนำมาตรวจสอบ ELISA ได้

ในโปรโตคอร์มที่สามารถใช้ได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง และสามารถนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ได้โดยวิธี ELISA พบว่า โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 10 mg / l มีเปอร์เซนต์การปลอดเชื้อไวรัส CyMV มากกว่าในความเข้มข้น 20 mg / l ซึ่งตรงกันข้ามกับในอาหารแข็ง เนื่องจาก โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารเหลว มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งโปรโตคอร์มจะได้รับสารเคมีจากการดูดซึมขึ้นมา ทำให้โปรโตคอร์มมีเนื้อที่สัมผัส กับสารเคมีน้อยกว่า จึงไม่เกิด phytotoxic แต่ในอาหารเหลวอาจเกิด phytotoxic ในเนื้อเยื่อ ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไวรัส CyMV จึงทำให้อนุภาคไวรัสสลายไปไม่เกิดสีเหลืองในการตรวจเช็ค ELISA

และถ้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่จะใช้ในการทดสอบยิ่งมีขนาดเล็ก ก็จะทำให้ปริมาณของเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ลดลง โดยสารนั้นอาจจะไปยับยั้ง หรือทำลายเชื้อไวรัส CyMV ในขณะที่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ยังมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งโชคพิศิษฐ์ (2528) รายงานไว้ว่า เมื่อผสม Hydrotonic ความเข้มข้น 0.01, 0.05, และ 0.1% ลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะทำให้หวายปอมปาดัวร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ยังคงมีไวรัส อยู่เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างเดียว

ในการผลิตโปรโตคอร์มให้ปลอดจากเชื้อไวรัส CyMV โดยการใช้สาร 1- Adamantanamine hydrochloride ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีแนวโน้มในการผลิตโปรโตคอร์มให้ปลอดเชื้อไวรัส CyMV ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ดังนั้น น่าจะมีการทดลองนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารเคมีดังกล่าว มาเลี้ยงในอาหารแข็งให้เจริญเป็นต้นอ่อน เพื่อที่จะนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยวิธี ELISA ให้แน่ชัดอีกครั้งหนึ่ง และสังเกตอาการผิดปกติของต้นอ่อนที่ได้ ว่ามีความแตกต่างจากต้นกล้วยไม้ปกติหรือไม่ โดยสังเกตการผิดปกติ เช่น การเจริญเติบโต และการเกิดดอกพร้อมทั้งคุณภาพของช่อดอกด้วย

นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดสอบสารเคมี 5 ชนิด คือ 2-Thiouracil , 2-4-Dichlorophenoxyacetic acid , Aspirin , Actinomycin D และ Hydrotonic ในด้านวิธีการใช้สารและความเข้มข้นของสาร ดังกล่าว เพื่อลดปริมาณของเชื้อไวรัส CyMV ในหวายปอมปาดัวร์

ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด และใช้สารสิ้นเปลืองน้อยที่สุด (โชคพิศิษฐ์ 2528) .ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะใช้ในการศึกษาสาร 1- Adamantanamine hydrochloride และพัฒนาให้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา.2528.การศึกษาการควบคุมเชื้อ Cymbidium Mosaic Virus ในหวาย ปอมปาดัวร์ (*Dendrobium pompadour*) โดยใช้ความร้อนและสารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

โชคพิศิษฐ์ ชาญนันทพิพัฒน์.2537.โรคไวรัสของกล้วยไม้.ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. 4(2):5-8.

.ธีระ สูตะบุตร.2532.โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย.ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.310 น.

บุญยืน กิจวิจารณ์.2528.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.ภาควิชาวิวิทยา.คณะวิทยาศาสตร์.มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.165 น.

ประนอม พฤฒพงษ์,มนทกานติ วัชรภัย และถาวร วัชรภัย.2518.องค์ประกอบของวุ้นอาหาร .สำหรับเนื้อเยื่อกล้วยไม้,น. 269-283.รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยาแห่งชาติครั้งที่ 14.สาขาพืช,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

ปราณี ยัมเมอลิงค์.2528.เอกสารประกอบวิชาโรคไม้ดอกไม้ประดับ.ภาควิชาโรคพืช,คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

เรณู ชูวิศิษฐ์กุล.2526.การปรับปรุงวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

วัชรีพร ชูศิลป์.2525.การเปรียบเทียบประสิทธิภาพทางเซรุ่มวิทยาในการตรวจสอบ Cymbidium mosaic virus และ Tobacco mosaic virus-orchid strain ของกล้วยไม้ชนิดต่างๆ.วิทยา .นิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

อรดี สหวัชรินทร์.2521.การขยายพันธุ์ฟาเลนอปซิสจากก้านช่อดอก.วิทยาสาร สโมสรกล้วยไม้บางเขน.6:69-80.

อุทัย รุ่งเรืองศรี.2535.กล้วยไม้ที่เกิดไวรัส.วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร.9 (1) : 23 - 31.

Arditti, J. 1977.Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissue Culture.Orchid Biology.New York:Cornell University Press.p 205-293.

Casper, R. and K. Mendgen.1979:Quantitative Serological Estimation of a Hyperparasite Detection of *Verticillium lecanii* in Yellow Rust Infected Wheat Leaves by ELISA. Phytopathol.Z. 94, 89-91.

Clark, M.F. , A.N. Adams and D.J. Barbara.1976:The Detection of Plant Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).Acta Hort. 67, 43-49.

Clark, M.F. ,C. L. Flegg, M. Bar-Joseph, and S. Rottem.1978:The Detection of *Spiroplasma citri* by Enzyme-Linked Immnosorbent Assay (ELISA).Phytopathol.Z. 92, 332-337.

Cother, E.J. and H. Vrugg Ink.1980:Detection of Viable and Nonviable Cells of *Erwiia* var. *atroseptica* in Inoculated Tubers of var.Bintije with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).Potato Res. 23, 133-135.

Engvall, E. and P. Perlmann.1971:Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).Quantitative Assay of Immunosorbent G. Immunochemistry. 8, 871-874.

Jensen,D.D. and Gold.1951:A Virus Ringspot of Odontoglossum Orchid.Symptom,Transmission and Electron Microscopy.Phytopathol. 41, 6148-653.

Jones, J.B. 1977 :Commercial Use of Tissue Culture for the Production of Disease-free Plants. Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications.Columbus:Ohio State University Press.p. 441-452.

Kako,S. 1973:Clonal Propagation of *Cattleya* Through Shoot Meristem Culture.Japan Agris Res. Quart. 7, 109-115.

Kim, K.K. ,J.T. Kunisaka and Y. Sagawa. 1970:Shoot-tip Culture of *Dendrobiums*.Amer.Orchid Soc.Bull. 39, 1077-1080.

Knudson, L. 1922:Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds.Bot.Gaz. 73, 1-25.

Knudson, L. 1946:A New Nutrient for the Germintion of Orchid Seeds.Amer.Orchid Soc.Bull. 15, 214-217.

Konic, R. 1978:ELISA in the Study of Homologous and Heterogous Relations of Plant Viruses.J.gen.Virol. 40, 309-318.

Korpraditskul, P.R. Casper and D.E. Lesemann.1979:Evaluation of Short Reaction Times and Some Charactertics of Enzyme-Conjugation in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).Phytopathol.Z. 96, 281-285.

Korpraditskul,P.R. Casper and D.E. Lesemann.1980:Some Aspects of Estimating Virus Antigen Concentrations by ELISA.Acta Hort. 110, 99-105.

Lawson, R.H. and S. Ali.1975:Orchid Viruses and Their Detection by Bioassay, Serology and Electron Microscopy.Handbook and Orchid Pests and Disease No.4 of Amer.Ochid Soc. 112 p.

Morel, G.M. 1960:Production Virus-free *Cymbidiums*.Amer.Orchid Soc.Bull. 29, 495-479.

Murashige,T. 1974:Plant Propagation Through Tissue Culture.Ann.Rev.Plant Physiol. 25, 135-166.

Sagawa, Y. and T. Shoji.1967:Clonal Propagation of *Dendrobiums* Through Shoot Meristem Culture.Amer.Orchid Soc.Bull. 36, 856-859.

Sahavacharin, O. 1980:Multation in the Tissue Culture of Orchid.Proc.9 th World Orchid Conf.Bangkok.p.223-225.

Scully, R.M. 1967:Aspects of Meristem Culture in *Cattleya alliance*.Amer.Orchid Soc.Bull. 36, 103-108.

Street, H.E. 1969:Growth in Organised and Unorganised Systems.Knowledge Gained by Culture of Agar and Tissue Explants.Plant Physiology A Treatise.New York:Academic Press. p. 3-224.

Vacin, E.F. and F.W. Went.1949:Some pH Changes in Nutrient Solutions.Bot.Gaz. 110, 605-613.

Vajrabhaya, M. and T. Vajrabhaya.1970:Tissue Culture of *Rhynchostylis gigantea*, a Monopodia; Orchid.Amer.Orchid Soc.Bull. 39, 907-910.

Wimber, D.D. 1963:Clonal Multiplication of *Cymbidiums* Through Tissue Culture of the Shoot Meritem.Amer.Orchid Soc.Bull. 32, 105-107.

Wimber, D.D. 1965:Additional Observations on Clonal Multiplication of *Cymbidium* Through Culture of Shoot Meristem.Cymbidium Soc.New. 20, 7-10.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1

สูตรอาหาร Vacin and Went (1949)

Constituents	Chemical form	Amount per litre
Tricalcium phosphate [a]	$Ca_3(PO_4)_2$	0.25 g
Potassium nitrate	KNO_3	0.53 g
Monopotassium acid phosphate	KH_2PO_4	0.25 g
Magnesium sulfate	$MgSO_4.7H_2O$	0.25 g
Ammonium sulfate	$(NH_4)_2SO_4$	0.50 g
Manganese sulfate [b]	$MnSO_4 \cdot H_2O$	1 ml
Sucrose		20 g
Agar [c]		8 g
Water		845 ml
Coconut water		150 ml
Iron chelate [d]		5 ml

หมายเหตุ:-

a = ละลายด้วย 1 N HCl

b = stock solution ใช้ 2.85 g / น้ำ 500 ml

c = ใส่วุ้นลงไปในอาหารเมื่อต้องการทำอาหารแข็งใช้ในการทดลอง

d = stock solution โดยใช้ $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$ 1.14 g / น้ำ 100 ml

ตารางภาคผนวกที่ 2

1-Adamantanamine hydrochloride โดยการเตรียม

1. ทำ stock solution = 0.5 g / น้ำ 200 ml

2. ในการเติม 1-Adamantanamine hydrochloride ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้น 10 mg/l ดูด stock solution 1.6 ml / อาหาร 400 ml
- ความเข้มข้น 20 mg/l ดูด stock solution 3.2 ml / อาหาร 400 ml
- ความเข้มข้น 25 mg/l ดูด stock solution 4.0 ml / อาหาร 400 ml
- ความเข้มข้น 50 mg/l ดูด stock solution 8.0 ml / อาหาร 400 ml
- ความเข้มข้น 75 mg/l ดูด stock solution 12.0 ml/ อาหาร 400 ml

ตารางภาคผนวกที่ 3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยใช้วิธี ELISA

ใช้ ELISA KIT ของกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

อุปกรณ์และสารเคมี

1. แกมม่าโกลบูลิน (IgG)
2. แกมม่าโกลบูลินเชื่อมติดกับเอนไซม์ (IgG-conjugate with enzyme)
3. Coating buffer
4. PBS-tween
5. Sample extraction buffer
6. Conjugation buffer
7. Substrate buffer
8. Polystyrene plate
9. ถุงพลาสติกขนาดเล็ก และขนาดกลาง
10. หลอดแก้วหยดสาร (plasture pipette)
11. ลูกยาง
12. ตัวอย่างพืชแห้ง
13. ขวดฉีดล้างเพลท
14. ปากกาเมจิกชนิดกันน้ำ
15. ตารางตรวจสอบ
16. น้ำกลั่น

การเตรียมบัฟเฟอร์

Coating buffer (pH 9.6)

Na_2CO_3	1.59 g
$NaHCO_3$	2.93 g
NaN_3	0.20 g

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

PBS (pH 7.4)

NaCl	8.00 g
KH_2PO_4	0.20 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.90 g
KCl	0.20 g
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-4,000 (Polyvinyl pyrotidone 4,000) ลงใน PBS-Tween 300 ml

Conjugation buffer

ผสม 0.2% Ovalbumin ลงใน Sample extraction buffer 25 ml

Substrate buffer

Diethanolamine	97 ml
H_2O	800 ml
NaN_3	0.2 g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.8 ด้วย HCl เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA

1. วางแผนการตรวจสอบตัวอย่าง โดยกำหนดว่าจะตรวจสอบกี่ตัวอย่าง อะไรบ้าง ลงบนแผ่นตารางตรวจสอบ และทุกครั้งจะต้องมีหลุมเปรียบเทียบ 3 หลุมคือ

หลุมที่ 1 เป็น Substrate buffer

หลุมที่ 2 เป็นตัวอย่างกล้วยไม้ไม่เป็นโรค (Healthy)

หลุมที่ 3 เป็นตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค (Disease)

2. เตรียมแกมม่าโกลบูลินของเชื้อ CyMV โดยตวงน้ำกลั่น 20 ml แล้วเติมด้วย coating buffer 5 ml ใช้หลอดแก้วหยดสารดูดแกมม่าโกลบูลินลงในเพลท โพลีสไตลีน (polystylene) หยดลงในส่วนผสมดังกล่าวจำนวน 25 ไมโครลิตร ซึ่งส่วนผสม ดังกล่าวเพียงพอสำหรับหยอด 1 เพลท

3. ใช้หลอดแก้ว หยดสารละลายในข้อ 2 ลงในหลุมที่วางแผนการตรวจสอบไว้แล้ว โดยหยอดหลุมละ 75 ไมโครลิตร ตั้งหลอดหยดสารละลายให้ตั้งตรงในการหยดแต่ละครั้ง และระวัง อย่าให้ปนเปื้อนบนเพลทหรือหลุมอื่น

4. นำเพลทใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิทแล้ววางไว้บนพื้นเรียบในที่ ที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 27-40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ควรอยู่ในที่ร่มและปลอดภัยจากการตกหรือพลิกคว่ำลงมา

5. เตรียมบดตัวอย่างพืชที่ต้องการทดสอบ โดยนำแต่ละตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก ขนาดเล็ก จำนวน 1 ตัวอย่างต่อ 1 ถุงและทำเครื่องหมายไว้ว่า เป็นตัวอย่างพืชทดสอบใดแล้วใช้หลอดแก้วหยดสารดูด sample extraction buffer หยดลงไปในแต่ละถุงตัวอย่างจำนวน 188 ไมโครลิตร

6. บดตัวอย่างพืชโดยใช้ด้ามของหลอดแก้วหยดสารทุบหรือขยี้ไปมานอกถุงจนตัวอย่างพืชแหลกอยู่ในถุง ระวังอย่าให้ถุงแตก

7. เมื่อครบกำหนด 1 ชั่วโมง ในการบ่มเพลทแล้วนำ IgG ออกจากหลุมโดยอาจจะเททิ้งหรือดูดเก็บไว้ใช้ได้อีก 3 ครั้งติดต่อกัน แต่ต้องใช้ภายในเดือนเดียวกัน

8. เตรียม PBS-Tween ใส่ในขวดสำหรับฉีดล้างเพลท แล้วบีบหยอดลงในหลุม จำนวน 75 ไมโครลิตรทุกหลุม ทิ้งไว้ 3 นาที จึงสลัดเพลทเพื่อเททิ้งไป แล้วหยอดล้างใหม่เช่นนี้อีก 2 ครั้ง เพื่อล้าง IgG ที่มีมากเกินไปออกให้เหลือแต่ IgG ที่ติดกับผนังเพลทเท่านั้น สลัดเพลทแรงๆ ให้หยดน้ำในเพลทหมด และไม่มีฟองอากาศติดก้นหลุม

9. ใช้หลอดแก้วหยดสารดูดน้ำคั้นตัวอย่างพืชที่เตรียมไว้ หยอดลงในแต่ละหลุมตามแบบตารางที่วางแผนไว้หยอดตัวอย่างละ 75 ไมโครลิตร ระวังการปนเปื้อนระหว่างหลุม

10. หยอดหลุมเปรียบเทียบ 3 หลุมทุกครั้ง คือ หลุมบัฟเฟอร์ หลุมตัวอย่างพืชเป็นโรค และหลุมตัวอย่างพืชปกติเมื่อหยอดน้ำคั้นพืชและหลุมเปรียบเทียบเสร็จแล้ว นำเพลทใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุง วางไว้ 1 ชั่วโมง

11. เตรียม conjugate buffer หยดแกมม่าโกลบูลินที่ต่อเชื่อมกับเอนไซม์ของไวรัส CyMV ลงใน conjugate buffer จำนวน 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

12. เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ล้างเพลทเช่นเดียวกับข้อ 8 ระวังอย่าให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างหลุมต่อหลุม

13. ใช้หลอดแก้วหยดสาร ดูดสารละลายแกมม่าโกลบูลินที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ในข้อ 11 หยอดทุกหลุม ๆ ละ 75 ไมโครลิตร นำเพลทใส่ถุงพลาสติกวางบ่มไว้อีก 1 ชั่วโมง

14. เตรียม substrate buffer แล้วใส่เม็ด P-nitrophenyl สีขาวนวลขนาดความเข้มข้น 5 mg/l จำนวน 1 เม็ด เขย่าให้ละลายจนหมด

15. ล้างเพลทเมื่อครบ 1 ชั่วโมง ทาเช่นเดียวกับข้อ 8

16. ใช้หลอดแก้วหยดสาร ดูดสารละลาย Substrate buffer หยอดลงหลุมละ 75 ไมโครลิตร ทำการตรวจผลปฏิกิริยาหลังจากทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อรอให้สีเหลืองของปฏิกิริยาชัดเจนมากขึ้น

17. การตรวจปฏิกิริยาที่เป็นบวก มีข้อสังเกต ดังนี้คือ

สีเหลืองเห็นชัดด้วยตาเปล่า เป็นบวก ซึ่งแสดงว่า หลุมที่หยอดตัวอย่างเป็นโรคไวรัส และสำหรับหลุมเปรียบเทียบ (disease control) จะต้องมีสีเหลืองปฏิกิริยาเป็นบวกเสมอ

การตรวจปฏิกิริยา นำแผ่นตาราง ตรวจสอบมาทำเครื่องหมายปฏิกิริยาบวกและลบ ควรตรวจสอบปฏิกิริยาภายใน 30-60 นาที

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 0 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	5	5	---	---	---	---
2	5	---	5	---	5	---
3	5	5	---	---	---	---
4	5	---	5	---	5	---
5	5	5	---	---	---	---
6	5	5	---	---	---	---
7	5	---	5	---	5	---
8	5	---	5	---	5	---
9	5	---	5	---	5	---
10	5	5	---	---	---	---
11	5	---	5	---	5	---
12	5	---	5	---	5	---
13	5	---	5	---	5	---
14	5	---	5	---	5	---
15	5	5	---	---	---	---
16	5	5	---	---	---	---
17	5	---	5	---	5	---
18	5	5	---	---	---	---
19	5	---	5	---	5	---
20	5	---	5	---	5	---
รวม	100	40	60	---	60	---

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 10 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	5	5	—	—	—	—
2	5	5	—	—	—	—
3	5	—	6	—	3	3
4	5	—	6	—	1	5
5	5	5	—	—	—	—
6	5	5	—	—	—	—
7	5	5	—	—	—	—
8	5	5	—	—	—	—
9	5	5	—	—	—	—
10	5	5	—	—	—	—
11	5	—	6	—	5	1
12	5	—	6	—	5	1
13	5	—	6	—	5	1
14	5	—	7	—	—	7
15	5	5	—	—	—	—
16	5	5	—	—	—	—
17	5	5	—	—	—	—
18	5	5	—	—	—	—
19	5	5	—	—	—	—
20	5	5	—	—	—	—
รวม	100	70	37	—	19	18

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 20 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	5	---	6	---	4	2
2	5	---	6	---	4	2
3	5	5	---	---	---	---
4	5	5	---	---	---	---
5	5	5	---	---	---	---
6	5	---	5	---	4	1
7	5	5	---	---	---	---
8	5	---	6	---	4	2
9	5	---	6	---	4	2
10	5	---	6	---	4	2
11	5	---	5	---	5	---
12	5	---	5	---	4	1
13	5	5	---	---	---	---
14	5	5	---	---	---	---
15	5	5	---	---	---	---
16	5	5	---	---	---	---
17	5	---	5	---	5	---
18	5	5	---	---	---	---
19	5	5	---	---	---	---
20	5	---	5	---	5	---
รวม	100	50	55	---	43	12

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 25 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	5	5	---	---	---	---
2	5	5	---	---	---	---
3	5	5	---	---	---	---
4	5	5	---	---	---	---
5	5	5	---	---	---	---
6	5	5	---	---	---	---
7	5	5	---	---	---	---
8	5	5	---	---	---	---
9	5	5	---	---	---	---
10	5	5	---	---	---	---
11	5	5	---	---	---	---
12	5	5	---	---	---	---
13	5	5	---	---	---	---
14	5	5	---	---	---	---
15	5	5	---	---	---	---
16	5	5	---	---	---	---
17	5	5	---	---	---	---
18	5	5	---	---	---	---
19	5	5	---	---	---	---
20	5	5	---	---	---	---
รวม	100	100	---	---	---	---

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 50 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	5	5	---	---	---	---
2	5	5	---	---	---	---
3	5	5	---	---	---	---
4	5	5	---	---	---	---
5	5	5	---	---	---	---
6	5	5	---	---	---	---
7	5	5	---	---	---	---
8	5	5	---	---	---	---
9	5	5	---	---	---	---
10	5	5	---	---	---	---
11	5	5	---	---	---	---
12	5	5	---	---	---	---
13	5	5	---	---	---	---
14	5	5	---	---	---	---
15	5	5	---	---	---	---
16	5	5	---	---	---	---
17	5	5	---	---	---	---
18	5	5	---	---	---	---
19	5	5	---	---	---	---
20	5	5	---	---	---	---
รวม	100	100	---	---	---	---

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 75 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	5	5	---	---	---	---
2	5	5	---	---	---	---
3	5	5	---	---	---	---
4	5	5	---	---	---	---
5	5	5	---	---	---	---
6	5	5	---	---	---	---
7	5	5	---	---	---	---
8	5	5	---	---	---	---
9	5	5	---	---	---	---
10	5	5	---	---	---	---
11	5	5	---	---	---	---
12	5	5	---	---	---	---
13	5	5	---	---	---	---
14	5	5	---	---	---	---
15	5	5	---	---	---	---
16	5	5	---	---	---	---
17	5	5	---	---	---	---
18	5	5	---	---	---	---
19	5	5	---	---	---	---
20	5	5	---	---	---	---
รวม	100	100	---	---	---	---

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 0 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	3	3	---	---	---	---
2	3	2	---	1	1	---
3	3	2	---	1	1	---
4	3	1	1	1	2	---
5	3	1	1	1	2	---
6	3	1	---	2	2	---
7	3	3	---	---	---	---
8	3	---	1	2	3	---
9	3	---	2	1	3	---
10	3	1	---	2	2	---
11	3	1	1	1	2	---
12	3	1	1	1	2	---
13	3	2	---	1	1	---
14	3	1	---	2	2	---
15	3	3	---	---	---	---
16	3	---	1	2	3	---
17	3	2	---	1	1	---
18	3	2	1	---	1	---
19	3	1	---	2	2	---
20	3	1	2	---	2	---
รวม	60	28	11	21	32	---

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 10 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	3	3	---	---	---	---
2	3	3	---	---	---	---
3	3	3	---	---	---	---
4	3	3	---	---	---	---
5	3	3	---	---	---	---
6	3	3	---	---	---	---
7	3	3	---	---	---	---
8	3	3	---	---	---	---
9	3	3	---	---	---	---
10	3	3	---	---	---	---
11	3	3	---	---	---	---
12	3	3	---	---	---	---
13	3	3	---	---	---	---
14	3	3	---	---	---	---
15	3	3	---	---	---	---
16	3	3	---	---	---	---
17	3	3	---	---	---	---
18	3	3	---	---	---	---
19	3	3	---	---	---	---
20	3	3	---	---	---	---
รวม	60	60	---	---	---	---

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 20 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	3	---	2	4	3	3
2	3	2	1	---	1	---
3	3	2	1	---	---	1
4	3	2	1	---	1	---
5	3	2	---	1	1	---
6	3	---	2	5	4	3
7	3	---	2	3	3	2
8	3	2	1	---	1	---
9	3	1	1	3	3	1
10	3	1	2	---	2	---
11	3	---	2	4	4	2
12	3	---	2	6	4	4
13	3	2	1	---	1	---
14	3	2	1	---	---	1
15	3	1	1	3	3	1
16	3	---	2	4	4	2
17	3	2	1	---	1	---
18	3	---	3	---	2	1
19	3	1	2	---	2	---
20	3	---	2	5	5	2
รวม	60	20	30	38	45	23

ตารางภาคผนวกที่ 13 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 25 mg / l

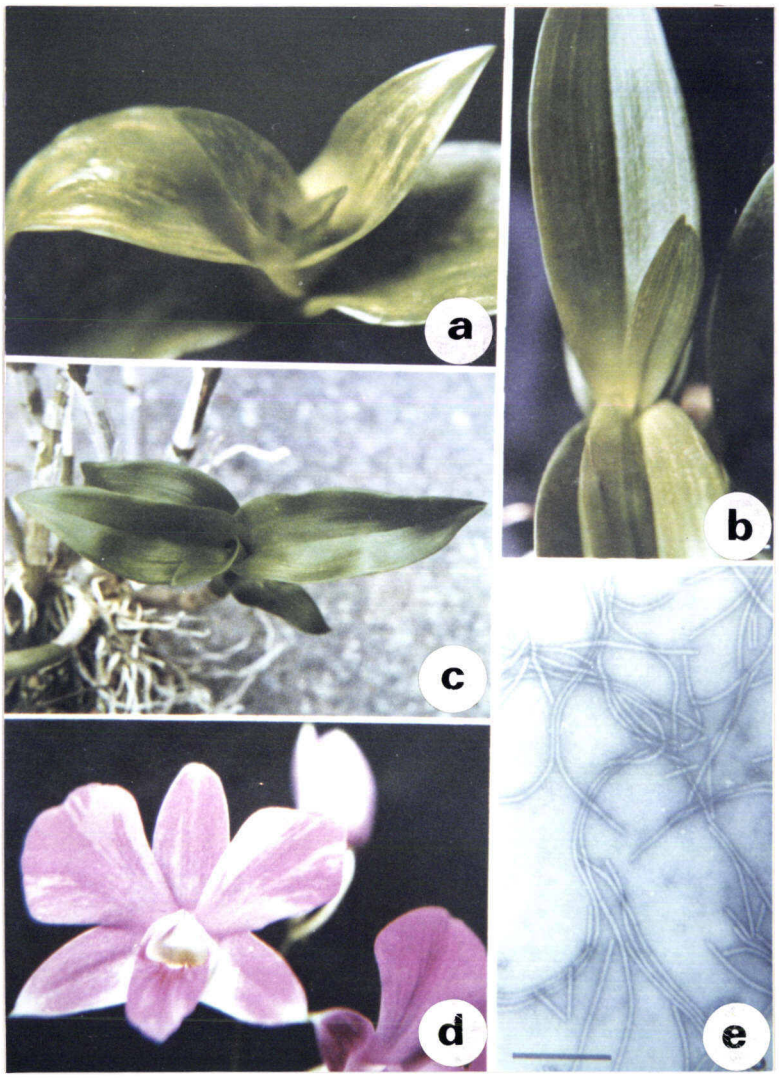
จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	3	3	---	---	---	---
2	3	3	---	---	---	---
3	3	3	---	---	---	---
4	3	2	1	---	1	---
5	3	3	---	---	---	---
6	3	2	1	---	1	---
7	3	3	---	---	---	---
8	3	3	---	---	---	---
9	3	---	3	---	2	1
10	3	3	---	---	---	---
11	3	1	2	---	2	---
12	3	3	---	---	---	---
13	3	2	1	---	1	---
14	3	---	3	---	2	1
15	3	2	1	---	1	---
16	3	1	2	---	1	1
17	3	3	---	---	---	---
18	3	3	---	---	---	---
19	3	3	---	---	---	---
20	3	2	1	---	1	---
รวม	60	45	15	---	12	3

ตารางภาคผนวกที่ 14 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 50 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	3	---	3	---	2	---
2	3	2	1	---	1	---
3	3	3	---	---	---	---
4	3	3	---	---	---	---
5	3	3	---	---	---	---
6	3	2	1	---	---	1
7	3	3	---	---	---	---
8	3	3	---	---	---	---
9	3	1	2	---	2	---
10	3	3	---	---	---	---
11	3	2	1	---	---	1
12	3	2	1	---	1	---
13	3	2	1	---	1	---
14	3	3	---	---	---	---
15	3	1	2	---	1	1
16	3	3	---	---	---	---
17	3	2	1	---	1	---
18	3	2	1	---	1	---
19	3	2	1	---	1	---
20	3	3	---	---	---	---
รวม	60	45	15	---	12	3

ตารางภาคผนวกที่ 15 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งเติมสาร 1- Adamantanamine hydrochloride ความเข้มข้น 75 mg / l

จำนวนการทดลอง (ซ้ำ)	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น	จำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน	จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อน		จำนวนปฏิกิริยาที่ได้จากการตรวจสอบ ELISA	
			protocorm	shoot	เป็นบวก	เป็นลบ
1	3	3	---	---	---	---
2	3	3	---	---	---	---
3	3	3	---	---	---	---
4	3	2	1	---	1	---
5	3	3	---	---	---	---
6	3	3	---	---	---	---
7	3	3	---	---	---	---
8	3	3	---	---	---	---
9	3	3	---	---	---	---
10	3	1	2	---	2	---
11	3	3	---	---	---	---
12	3	3	---	---	---	---
13	3	3	---	---	---	---
14	3	3	---	---	---	---
15	3	3	---	---	---	---
16	3	3	---	---	---	---
17	3	2	1	---	---	1
18	3	3	---	---	---	---
19	3	3	---	---	---	---
20	3	3	---	---	---	---
รวม	60	56	4	---	3	1



ภาพผนวกที่ 1 ไวรัสยอดบิด หรือ ไวรัสใบด่าง

a อาการเป็นรอยขีดเป็นทางสีเหลืองไปตามความยาวของใบ

b อาการด่างเป็นจุดประสีขาวเป็นทางยาวขนานไปตามเส้นใบ และอาการด่างประ

c ยอดของหวายบิดเป็นเกลียวใบเป็นคลื่น

d อาการดอกด่างของกล้วยไม้สกุลหวาย

e อนุภาคไวรัสยอดบิดหวายมาตาม ขนาดความยาวประมาณ 480 นาโนเมตร

ที่มา: ธีระสูตะบุตร.2535.โรคไวรัสของกล้วยไม้.โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย.

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ท้องสมุด สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง