รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

แผนงานวิจัยที่ **การวิจัยและพัฒนากลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ**

โครงการวิจัยที่ 1 **การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้**

กิจกรรมที่ 1 **การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์การค้า**

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 **การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย**

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) **การผลิตกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าให้ปลอดเชื้อ *Cymbidium Mosaic Virus* (CyMV) และ *Odontoglossum Ringspot Virus* (ORSV)**

ชื่อการทดลอง(ภาษษอังกฤษ) Free *Cymbidium Mosaic Virus* (CyMV) and *Odontoglossum Ringspot Virus* (ORSV) production of commercial Dendrobium Orchids

ผู้ดำเนินงาน

นางวิมล แก้วสีดา[1/] นางสาวสุปัน ไม้ดัดจันทร์[1/]

นายปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[2/]

บทคัดย่อ

ศึกษาวิธีการผลิตกล้วยไม้สกุลหวายปลอดเชื้อ CyMV และ ORSV โดยใช้ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอียสกุล จำนวน 20 ต้น ซึ่งบางตัวอย่างแสดงอาการใบด่างหรือมีจุดด่างสีเหลือง มีแผลไหม้ ยอดมีอาการบิด มีจุดช้ำน้ำ แต่เมื่อนำตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมดมาตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี RT-PCR พบว่าตัวอย่างทั้งหมดปนเปื้อนเชื้อ CyMV แต่ไม่พบเชื้อ ORSV นำตาข้างของต้นกล้วยไม้ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ CyMV มาทำการผลิตโปรโตคอร์ม เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 1 เดือน จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อมีการแตกหน่อขนาดเล็ก นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุกเดือน โปรโตคอร์มที่ได้จะมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ให้แสงประมาณ 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีเขียวมีขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มมีการเจริญเป็นยอด เมื่อย้ายโปรโตคอร์มรุ่นแรกไปวางบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH 4.6 พบโปรโตคอร์มรุ่นใหม่เกิดขึ้นในลักษณะเดิม และทำซ้ำ เพื่อให้ได้โปรโตคอร์มรุ่นใหม่หลายรุ่น และสุ่มตรวจเชื้อ CyMV ในทุกรุ่นของโปรโตคอร์ม พบว่าตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 17 ที่สามารถผลิตโปรโตคอร์มรุ่นที่ 9 ตรวจไม่พบเชื้อ CyMV ด้วยเทคนิค RT-PCR เมื่อชักนำให้เป็นต้นเนื้อเยื่อ ทำการตรวจหาเชื้อ CyMV ก็ไม่พบเช่นกัน ส่วนโปรโตคอร์มที่ได้จากตัวอย่างกล้วยไม้อื่นตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV แต่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มลดลง

รหัสการทดลอง 01 – 29 – 54 – 01 – 07- 00 – 01 – 56

[1/] ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน

[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย เป็นพืชที่นิยมปลูกในเชิงการค้าเพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ มีการส่งออกในรูปของกล้วยไม้ตัดดอก ต้นกล้วยไม้ ต้นกล้าในขวด และผลิตภัณฑ์จากดอกกล้วยไม้ เช่น พวงมาลัย เป็นต้น โดยมีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี ตลาดต่างประเทศที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี สหรัฐอเมริกา เยอรมัน ไต้หวัน เนเธอร์แลนด์ เกาหลีใต้ ฝรั่งเศส อังกฤษ ฮ่องกง และแคนาดา เป็นต้น มีมูลค่าการส่งออกในปี 2550 รวมทั้งสิ้น 3,791.1 ล้านบาท ปัญหาการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยนอกจากจะมีประเทศคู่แข่งที่สำคัญ เช่น สิงคโปร์ และมาเลเซียแล้ว ยังมีปัญหาเรื่องโรคและแมลงศัตรูของกล้วยไม้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อตลาดการส่งออกกล้วยไม้โดยตรง เนื่องจากเป็นเงื่อนไขทางการค้าที่สำคัญของประเทศคู่ค้า ซึ่งหากเป็นไปตามเงื่อนไขจะทำให้ไม่สามารถส่งออกสินค้าเกษตรนั้นๆ ไปยังประเทศผู้นำเข้าได้ นอกจากนี้ยังส่งผลไปถึงเรื่องการต่อรองทางการค้า การเพิ่มต้นทุนในการผลิตให้กับประเทศไทยอีกด้วย ส่งผลทำให้ประเทศสูญเสียรายได้ ปัญหาศัตรูพืชที่สำคัญของกล้วยไม้ส่งออกคือเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีการระบาดในประเทศไทยและจำเป็นต้องมีการตรวจรับรองตามเงื่อนไขการส่งออก ได้แก่ CyMV และ ORSV ซึ่งเชื้อไวรัสจะเข้าทำลายกล้วยไม้ทำให้เกิดอาการผิดปกติ เช่น ต้นแคระแกร็น แผลตายบนใบ ใบด่าง ช่อดอกไม่สมบูรณ์ อาการผิวหน้าใบแห้ง ยุบตัวเป็นปื้นเล็กๆ ดอกด่าง กลีบดอกบางส่วนหายไป (ธีระ, 2532) เนื่องจากเชื้อไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบปรสิตถาวร จะเจริญเพิ่มปริมาณในเซลล์ของพืชและแพร่กระจายทั่วไปทั้งต้น ทำให้ไม่สามารถใช้ยาหรือสารเคมีใดๆ กำจัด หรือรักษาได้ ดังนั้นการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่อาจติดไปกับพืชส่งออกที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพ จึงต้องทำการตรวจวินิจฉัยตั้งแต่ในขั้นตอนการเลือกตาหรือหน่อพ่อแม่พันธุ์ที่จะนำมาผลิตเพื่อให้ต้นกล้วยไม้ที่ได้ปลอดจากโรคไวรัส ซึ่งจากการศึกษาของ Yupin *et.al.,* (2007) พบว่าการใช้เทคนิค RT – PCR แบบ one step สามารถตรวจพบเชื้อ CyMV ในโปรโตคอร์มได้ดีและมีความถูกต้องแม่นยำที่มากกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค indirect – ELISA และอรอุสา (2549) ได้ศึกษาการใช้สารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อกำจัดเชื้อ CyMV ในโปรโตคอร์มของกล้วยไม้พันธุ์การค้าชนิดต่างๆ พบว่าโปรโตคอร์มรุ่นที่ 1 ปราศจากเชื้อ CyMV ร้อยละ 12.5 แต่สารเคมีที่ใช้มีราคาแพงทำให้มีต้นทุนสูงดังนั้นจึงได้นำเอาเทคนิคดังกล่าวเข้ามาประยุกต์ร่วมในงานวิจัยการผลิตกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าเพื่อให้ปลอดจากเชื้อ CyMV และ ORSV ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่ได้ผลวิธีหนึ่งด้วย

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. ต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า ได้แก่พันธุ์เอียสกุล
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
3. ชุดน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอพืช
4. ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV

วิธีการ

1. การตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ในตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า

สำรวจและตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ในตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าด้วยเทคนิค RT – PCR แบบ one step และ strip test kit โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT – PCR แบบ one step นั้น ทำโดยการตัดใบจากตัวอย่างกล้วยไม้มาสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB (ดัดแปลงจาก วิมล, 2548) นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV โดยเตรียมส่วนผสมในหลอดทดสอบขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้ RNase free water 5.2 ไมโครลิตร 2x reaction mix buffer 10 ไมโครลิตร 10 pmol forward primer 1 ไมโครลิตร 10 pmol reverse primer 1 ไมโครลิตร Superscript III enzyme mix 0.8 ไมโครลิตร RNA tempate 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี และนำหลอดปฏิกิริยาไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler) โดยตั้งโปแกรมอุณหภูมิ ดังนี้คือ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis เพื่อแยกขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้กระแสไฟฟ้าใน Agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1x Tris- borate buffer (TBE) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลล์ ประมาณ 35 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator และบันทึกผล

2. **การผลิตโปโตคอร์ม**

นำหน่ออ่อนจากตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่ตรวจพบเชื้อ CyMV ฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที สารละลายคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ลอกกาบหุ้มตาข้างออก นำส่วนตาข้างแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที นำตาข้างเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 1 เดือน ย้ายเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน ประมาณ 2 เดือน เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน จนกระทั่งเกิดโปรโตคอร์ม เมื่อโปรโตคอร์มมีจำนวนมาก แบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went pH 4.6 ชุดใหม่ และทำแบบเดียวกันนี้เพื่อให้ได้โปรโตคอร์ม รุ่นใหม่ต่อไป

3. **การตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ในโปรโตคอร์ม**

สุ่มโปรโตคอร์มที่ผลิตได้ในแต่ละรุ่นไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB เช่นเดียวกับข้อ 1 และตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR แบบ one step เช่นเดียวกับข้อ 1

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ตุลาคม 2555 – กันยายน 2558 รวม 3 ปี

สถานที่ดำเนินการ

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **การตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ในตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า**

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลจำนวน 20 ต้น โดยแสดงอาการผิดปกติดังนี้

- แสดงอาการใบด่าง ใบและดอก มีลักษณะอาการด่าง มีแผลไหม้ มีจุดช้ำน้ำ หรือจุดด่างสีเหลือง (ภาพที่ 1)

- แสดงอาการลักษณะยอดบิด ลำต้นแคระแกร็น ดอกไม่สมบูรณ์ กลีบดอกบิดเบี้ยว สีซีดด่าง ช่อดอกสั้น และผลิตดอกลดลงและไม่ได้คุณภาพ

- ไม่แสดงอาการผิดปกติ

เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV จากตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 20 ต้น โดยวิธี strip test kit พบว่าตรวจพบเชื้อ CyMV ในบางตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อ ORSV ในทุกตัวอย่าง ส่วนวิธี RT- PCR แบบ one step สามารถตรวจพบเชื้อ CyMV ได้ในทุกตัวอย่าง และไม่พบเชื้อ ORSV

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของกล้วยไม้สกุลหวายที่ตรวจพบ

ก. อาการใบด่างเหลือง ใบบิด บนใบกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ 10

ข. อาการใบด่าง ต้นแคระแกร็นในต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสุกล ต้นที่ 20

2. การผลิตโปโตคอร์ม

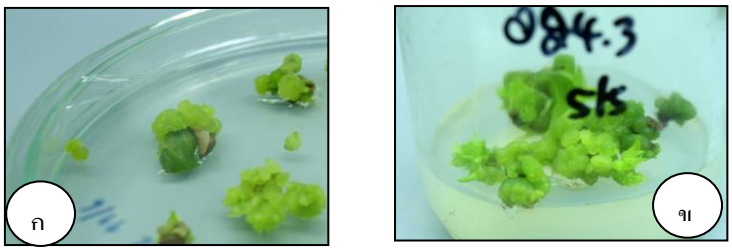
การผลิตโปรโตคอร์มโดยใช้ตาข้างจากหน่ออ่อนของต้นที่ตรวจพบเชื้อ CyMV (ภาพที่ 2) ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล เบอร์ 16 , 17 , 24 และ 26 ฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 1 เดือน และย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของหน่อขนาดเล็ก มากกว่า 1 ชิ้น ดังนี้ 15 , 15 , 9 และ 9 หน่อ ตามลำดับ นำหน่อที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH 4.6 นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน โปรโตคอร์มที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ 0.1 มิลลิเมตร นำออกให้แสงประมาณ 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 3) สุ่ม 90 เปอร์เซ็นต์ของโปรโตคอร์มที่ได้ไปตรวจหสเชื้อ CyMV และ ORSV โปรโตคอร์มรุ่นแรกที่เหลือนำไปวางบนอาหารสูตร Vacin and Went pH 4.6 ชุดใหม่ พบโปรโตคอร์มรุ่นใหม่เกิดขึ้นในลักษณะเดิม คือเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ 0.1 มิลลิเมตร และเมื่อให้แสงประมาณ 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมี

ขนาดใหญ่ขึ้น ทำซ้ำเพื่อให้ได้โปรโตคอร์มรุ่นใหม่หลาย รุ่น และทุกรุ่นก็ทำการสุ่มไปตรวจหาเชื้อไวรัส ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่สามารถผลิตโปรโตคอร์มได้คือพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ 16, 17 และ 24 (ตารางที่ 1) นำโปรโตคอร์มแต่ละรุ่น ไปตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT- PCR แบบ one step ในขั้นตอนต่อไป

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะหน่ออ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ 17 ที่นำไปผลิตโปรโตคอร์ม

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนรุ่นของโปรโตคอร์มที่ผลิตได้ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลแต่ละสายต้น

สายต้นที่	จำนวนรุ่นโปรโตคอร์มที่ผลิตได้	หมายเหตุ
16	6	พบแถบดีเอ็นเอของ cp ของเชื้อ CyMV แต่ความเข้มลดลง
17	9	ไม่พบแถบดีเอ็นเอของ cp ของเชื้อ CyMV
24	5	พบแถบดีเอ็นเอของ cp ของเชื้อ CyMV แต่ความเข้มลดลง



ภาพที่ 3 ลักษณะของโปรโตคอร์มที่ผลิตได้ของกล้วยไม้สกุลหวาย

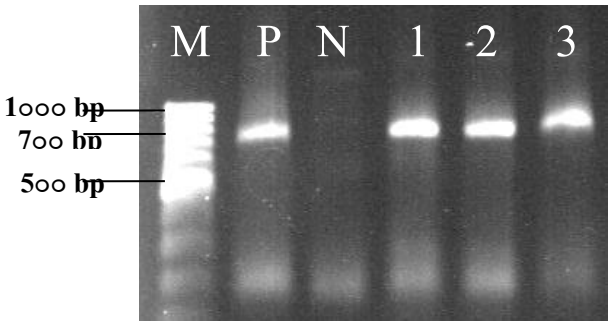
ก. ลักษณะโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ 17

ข. ลักษณะโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ 24

3. การตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ในโปรโตคอร์ม

สุ่ม 90 เปอร์เซนต์ของโปรโตคอร์มของพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 16, 17 และ 24 แต่ละรุ่นไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB และตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR แบบ one step และนำผลของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบขนาดด้วย 1 % Agarose gel elecrophoresis ใน 1x Tris- borate buffer (TBE) ใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลล์ ประมาณ 35 นาที ย้อมดีเอ็นเอในเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 16 ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ 6 ตรวจพบความเข้มแถบดีเอ็นเอลดลง โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 17 รุ่นที่ 1-4 ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ 5-8 พบว่าความเข้มของแถบอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ลดลง และโปรโตคอร์มรุ่นที่ 9 ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ CyMV และโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้สกุลหวายต้นที่ 24 ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV (ภาพที่ 4 และ 5)

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายต้นที่ 17 รุ่นที่ 9 ที่ตรวจไม่พบเชื้อ CyMV ไปชักนำให้เกิดต้นเนื้อเยื่อ และทำการตรวจหาเชื้อ CyMV ในต้นเนื้อเยื่อ ซึ่งไม่พบเชื้อ CyMVเช่นกัน



ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV ด้วยวิธี RT – PCR แบบ one step โดยใช้ไพรเมอร์ CyMV – CP – F และ CyMV – CP –R วิเคราะห์ด้วย 1 % Agarose gel elecrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

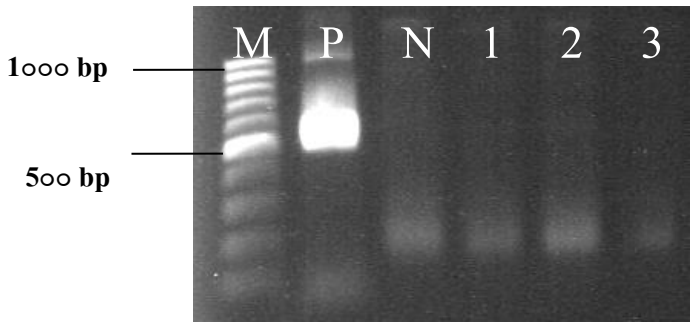
P = Positive control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม

N = Negative control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม

ช่องที่ 1 = โปรโตคอร์มรุ่นที่ 1 จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 16

ช่องที่ 2 = โปรโตคอร์มรุ่นที่ 1 จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 17

ช่องที่ 3 = โปรโตคอร์มรุ่นที่ 1 จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 24



ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ORSV ด้วยวิธี RT – PCR แบบ one step โดยใช้ไพรเมอร์ ORSV – CP – F และ ORSV – CP –R วิเคราะห์ด้วย 1 % Agarose gel elecrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

P = Positive control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม

N = Negative control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม

ช่องที่ 1 = โปรโตคอร์มรุ่นที่ 1 จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 16

ช่องที่ 2 = โปรโตคอร์มรุ่นที่ 1 จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 17

ช่องที่ 3 = โปรโตคอร์มรุ่นที่ 1 จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 24

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล จำนวน 20 ต้น พบอาการโรคใบด่าง มีแผลไหม้ หรือจุดด่างสีเหลือง ลักษณะยอดบิด มีจุดช้ำน้ำ ซึ่งบางต้นไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่ตรวจพบเชื้อ CyMV ทุกตัวอย่าง และไม่พบเชื้อ ORSV ในทุกตัวอย่างเช่นกัน นำตาข้างของหน่ออ่อนไปผลิตโปรโตคอร์มพบว่า ส่วนของตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อนำมาวางบนอาหารแข็งและเหลว สูตร Vacin and Went pH 4.6 นานประมาณ 5 เดือน พบโปรโตคอร์มที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ 0.1 มิลลิเมตร และเมื่อได้รับแสงประมาณ 1 สัปดาห์ โปรโตคอร์มจะสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นสีเขียว มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยพบว่าบางชิ้นเริ่มมีการแทงยอด และเมื่อย้ายโปรโตคอร์มรุ่นแรกไปวางบนอาหารสูตร Vacine and Went pH 4.6 ชุดใหม่ พบโปรโตคอร์มรุ่นใหม่เกิดขึ้นในลักษณะเดิม และทำซ้ำเช่นนี้เพื่อให้ได้โปรโตคอร์มรุ่นใหม่หลายรุ่น ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่สามารถผลิตโปรโตคอร์มได้คือพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ 16, 17 และ 24 ได้ตัวอย่างละ 6, 9 และ 5 รุ่น ตามลำดับ เมื่อสุ่มโปรโตคอร์มแต่ละรุ่นไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB เพื่อตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT- PCR แบบ one step โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้

สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 16 ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ 6 ตรวจพบความเข้มแถบดีเอ็นเอลดลง โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ 17 รุ่นที่ 1-4 ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ 5-8 พบว่าความเข้มของแถบอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ลดลง และโปรโตคอร์มรุ่นที่ 9 ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ CyMV และนำโปรโตคอร์มรุ่นที่ 9 ไปชักนำให้เกิดต้นเนื้อเยื่อ สุ่มต้นเนื้อเยื่อที่ได้ไปตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งไม่พบเชื้อ CyMV เช่นกัน และโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้สกุลหวายต้นที่ 24 ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV ในทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อ ORSV

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เทคนิคการย้ายอาหารให้โปรโตคอร์ม(subculture) ทำให้ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ CyMV สามารถนำไปปรับใช้ในการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรคเพื่อการส่งออก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อนุญาตให้ใช้สารเคมีต่างๆ เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล

เอกสารอ้างอิง

ธีระ สูตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. หจก. ฟันนี่ทับบลิชชิ่ง. กรุงเทพมหานคร. 310 หน้า.

วิมล สีเทา. 2548. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสโพไวรัสของพริก มะขือเทศ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาโรคพืช คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. บางเขน. กรุงเทพ. 81 หน้า.

อรอุสา ลอยทะเล. 2549. วิธีเคมีบำบัดเพื่อการกำจัด *Cymbidiu, Mosaic Virus (CymMV)* ในกล้วยไม้พันธุ์การค้าบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. บางเขน. กรุงเทพ. 131 หน้า.

Yuphin Khentry, Srimek Chowpongpang, Ampaiwan Paradornuwat, Sureeya Tantiwiwat and Niphone Thaveechai. 2007. Detection of *Cymbidium mosaic virus* in Protocrom-like Bodies in *Dendrobium* Sonia using One-Step RT – PCR. J. Plant Biochemistry & Biotechnology. Vol. 16(2). 123-125. July 2007.

ภาคผนวก

1. วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอพืช (ดัดแปลงจาก วิมล, 2548)

ชั่งตัวอย่างพืช (ใบ/โปรโตคอร์ม) น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ใส่ถุงพลาสติกใสขนาด 3 x 5 นิ้ว เติม CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% Na_2 SO_3 , 2%PVP) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดตัวอย่างพืชให้ละเอียด เติม CTAB buffer อีก 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ย้ายน้ำคั้นมาใส่หลอดทดสอบขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่า ของส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่า ของส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อีกครั้ง ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 4 M LiCl ปริมาตร 1 เท่า ของส่วนใส เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13, ,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทสารละลายออก และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 200 ไมโครลิตร TE buffer ที่ผสม 1% SDS เติม 100 ไมโครลิตร 5 M NaCl และ 300 ไมโครลิตร isopropanal ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทสารละลายออก ล้างตะกอนด้วย 70% แอลกอฮอล์ หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วย 50 ไมโครลิตร RNase free water เก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR แบบ one step สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนนิวคลีโอ	ชนิดไวรัส	ที่มา

		ไทด์		
CyMV-CP-F	5’ AAG CTT TTA TTC AGT AGG GGG GGC 3’	24	CyMV	GI : 37139652
CyMV-CP-R	5’ GGA TCC ATG GGA GAG CCC ACT 3’	21	CyMV	GI : 37139652
ORSV-CP-F	5’ GGA TCC ATG TCT TAC ACT ATT ACA GAC CCG 3’	30	ORSV	GI : 37139668
ORSV-CP-R	5’ AAG CTT TTA GGA AGA GGT CC 3’	20	ORSV	GI : 37139668