

การผลิตกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าให้ปลอดเชื้อ *Cymbidium Mosaic Virus*

(CyMV) และ *Odontoglossum Ringspot Virus* (ORSV)

Free *Cymbidium Mosaic Virus* (CyMV) and *Odontoglossum Ringspot Virus*

(ORSV) production of commercial *Dendrobium* Orchids

นางวิมล แก้วสีดา^{๑/} นางสาวสุปิ่น ไม้ตัดจันทร์^{๑/} นายปรีเชษฐ ตั้งกาญจนภาสน^{๒/}

บทคัดย่อ

ศึกษาวิธีการผลิตกล้วยไม้สกุลหวายปลอดเชื้อ CyMV และ ORSV โดยใช้ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอียสกุล จำนวน ๒๐ ต้น ซึ่งบางตัวอย่างแสดงอาการใบต่างหรือมีจุดด่างสีเหลือง มีแผลไหม้ ยอดมีอาการบิด มีจุดข้ำน้ำ แต่เมื่อนำตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมดมาตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี RT-PCR พบว่าตัวอย่างทั้งหมดปนเปื้อนเชื้อ CyMV แต่ไม่พบเชื้อ ORSV นำตาข้างของต้นกล้วยไม้ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ CyMV มาทำการผลิตโปรโตคอร์ม เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๑ เดือน จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๒ เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๒ สัปดาห์ เนื้อเยื่อมีการแตกหน่อขนาดเล็ก นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๒ เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุกเดือน โปรโตคอร์มที่ได้จะมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ ๐.๑ มิลลิเมตร ให้แสงประมาณ ๑ สัปดาห์ โปรโตคอร์มดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีเขียวมีขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มมีการเจริญเป็นยอด เมื่อย้ายโปรโตคอร์มรุ่นแรกไปวางบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ พบโปรโตคอร์มรุ่นใหม่เกิดขึ้นในลักษณะเดิม และทำซ้ำ เพื่อให้ได้โปรโตคอร์มรุ่นใหม่หลายรุ่น และสุ่มตรวจเชื้อ CyMV ในทุกรุ่นของโปรโตคอร์ม พบว่าตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๗ ที่สามารถผลิตโปรโตคอร์มรุ่นที่ ๙ ตรวจไม่พบเชื้อ CyMV ด้วยเทคนิค RT-PCR เมื่อชักนำให้เป็นต้นเนื้อเยื่อ ทำการตรวจหาเชื้อ CyMV ก็ไม่พบเช่นกัน ส่วนโปรโตคอร์มที่ได้จากตัวอย่างกล้วยไม้อื่นตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV แต่แถบดีเอ็นเอมีความเข้มลดลง

^{๑/} ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชสวน

^{๒/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย เป็นพืชที่นิยมปลูกในเชิงการค้าเพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ มีการส่งออกในรูปแบบของกล้วยไม้ตัดดอก ต้นกล้วยไม้ ต้นกล้าในขวด และผลิตภัณฑ์จากดอกกล้วยไม้ เช่น พวงมาลัย เป็นต้น โดยมีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี ตลาดต่างประเทศที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี สหรัฐอเมริกา เยอรมัน ไต้หวัน เนเธอร์แลนด์ เกาหลีใต้ ฝรั่งเศส อังกฤษ ฮองกง และแคนาดา เป็นต้น มีมูลค่าการส่งออกในปี ๒๕๕๐ รวมทั้งสิ้น ๓,๗๙๑.๑ ล้านบาท ปัญหาการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยนอกจากจะมีประเทศคู่แข่งที่สำคัญ เช่น สิงคโปร์ และมาเลเซียแล้ว ยังมีปัญหาเรื่องโรคและแมลงศัตรูของกล้วยไม้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อตลาดการส่งออกกล้วยไม้โดยตรง เนื่องจากเป็นเงื่อนไขทางการค้าที่สำคัญของประเทศคู่ค้า ซึ่งหากเป็นไปตามเงื่อนไขจะทำให้ไม่สามารถส่งออกสินค้าเกษตรนั้นๆ ไปยังประเทศผู้นำเข้าได้ นอกจากนี้ยังส่งผลไปถึงเรื่องการต่อรองทางการค้า การเพิ่มต้นทุนในการผลิตให้กับประเทศไทยอีกด้วย ส่งผลทำให้ประเทศสูญเสียรายได้ ปัญหาศัตรูพืชที่สำคัญของกล้วยไม้ส่งออกคือเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีการระบาดในประเทศไทยและจำเป็นต้องมีการตรวจรับรองตามเงื่อนไขการส่งออก ได้แก่ CyMV และ ORSV ซึ่งเชื้อไวรัสจะเข้าทำลายกล้วยไม้ทำให้เกิดอาการผิดปกติ เช่น ต้นแคระแกร็น ผลตายบนใบ ใบด่าง ช่อดอกไม่สมบูรณ์ อาการผิวหน้าใบแห้ง ยุบตัวเป็นปื้นเล็กๆ ดอกต่าง กลีบดอกบางส่วนหายไป (ธีระ, ๒๕๓๒) เนื่องจากเชื้อไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบปรสิตถาวร จะเจริญเพิ่มปริมาณในเซลล์ของพืชและแพร่กระจายทั่วไปทั้งต้น ทำให้ไม่สามารถใช้ยาหรือสารเคมีใดๆ กำจัด หรือรักษาได้ ดังนั้นการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่อาจติดไปกับพืชส่งออกที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพ จึงต้องทำการตรวจวินิจฉัยตั้งแต่ในขั้นตอนการเลือกตาหรือหน่อพ่อแม่พันธุ์ที่จะนำมาผลิตเพื่อให้ต้นกล้วยไม้ที่ได้ปลอดจากโรคไวรัส ซึ่งจากการศึกษาของ Yupin *et.al.*, (๒๐๐๗) พบว่าการใช้เทคนิค RT – PCR แบบ one step สามารถตรวจพบเชื้อ CyMV ในโปรโตคอร์มได้ดีและมีความถูกต้องแม่นยำที่มากกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค indirect – ELISA และออรูสา (๒๕๔๙) ได้ศึกษาการใช้สารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อกำจัดเชื้อ CyMV ในโปรโตคอร์มของกล้วยไม้พันธุ์การค้าชนิดต่างๆ พบว่าโปรโตคอร์มรุ่นที่ ๑ ปราศจากเชื้อ CyMV ร้อยละ ๑๒.๕ แต่สารเคมีที่ใช้มีราคาแพงทำให้มีต้นทุนสูงดังนั้นจึงได้นำเอาเทคนิคดังกล่าวเข้ามาประยุกต์ร่วมในงานวิจัยการผลิตกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าเพื่อให้ปลอดจากเชื้อ CyMV และ ORSV ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่ได้ผลวิธีหนึ่งด้วย

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

๑. ต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า ได้แก่พันธุ์เอียสกุล
๒. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
๓. ชุดน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอพืช

๔. ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV

วิธีการ

๑. 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, ๒๕๔๘) นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV โดยเตรียมส่วนผสมในหลอดทดสอบขนาด ๐.๒ มิลลิลิตร ดังนี้ RNase free water ๕.๒ ไมโครลิตร ๒x reaction mix buffer ๑๐ ไมโครลิตร ๑๐ pmol forward primer ๑ ไมโครลิตร ๑๐ pmol reverse primer ๑ ไมโครลิตร Superscript III enzyme mix ๐.๘ ไมโครลิตร RNA template ๒ ไมโครลิตร ปริมาตรรวม ๒๐ ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี และนำหลอดปฏิกิริยาไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ ดังนี้คือ ๕๐ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที จำนวน ๑ รอบ ๙๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที จำนวน ๑ รอบ ๙๕ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ วินาที, ๕๕ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ วินาที และ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที จำนวน ๓๐ รอบ และ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาที ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis เพื่อแยกขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้กระแสไฟฟ้าใน Agarose gel ๑ เปอร์เซ็นต์ ใน ๑x Tris- borate buffer (TBE) โดยใช้กระแสไฟฟ้า ๑๑๐ โวลต์ ประมาณ ๓๕ นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น ๑ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator และบันทึกผล

๒. การผลิตโปรโตคอร์ม

นำหน่ออ่อนจากตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่ตรวจพบเชื้อ CyMV ฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ๒๐ เปอร์เซ็นต์ นาน ๑๕ นาที สารละลายคลอโรกซ์ ๕ เปอร์เซ็นต์ นาน ๕ นาที ลอกกาบหุ้มตาข้างออก นำส่วนตาข้างแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ๑ เปอร์เซ็นต์ นาน ๑ นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ๓ ครั้งๆ ละ ๒ นาที นำตาข้างเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๑ เดือน ย้ายเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ประมาณ ๒ เดือน เปลี่ยนอาหารทุก ๒ สัปดาห์ จากนั้นเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๒ เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๑ เดือน จนกระทั่งเกิดโปรโตคอร์ม เมื่อโปรโตคอร์มมีจำนวนมาก แบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ ชุดใหม่ และทำแบบเดียวกันนี้เพื่อให้ได้โปรโตคอร์ม รุ่นใหม่ต่อไป

๓. การตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ในโปรโตคอร์ม

สุ่มโปรโตคอร์มที่ผลิตได้ในแต่ละรุ่นไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB เช่นเดียวกับข้อ ๑ และตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR แบบ one step เช่นเดียวกับข้อ ๑

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ตุลาคม ๒๕๕๕ – กันยายน ๒๕๕๘ รวม ๓ ปี

สถานที่ดำเนินการ

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

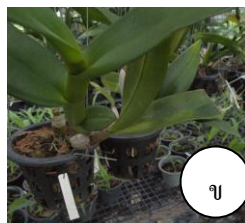
ผลการทดลองและวิจารณ์

๑. การตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ในตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลจำนวน ๒๐ ต้น โดยแสดงอาการผิดปกติดังนี้

- แสดงอาการใบต่าง ใบและดอก มีลักษณะอาการต่าง มีแผลไหม้ มีจุดข้ำน้ำ หรือจุดด่างสีเหลือง (ภาพที่ ๑)
- แสดงอาการลักษณะยอดบิด ลำต้นแคระแกร็น ดอกไม่สมบูรณ์ กลีบดอกบิดเบี้ยว สีซีดต่าง ช่อดอกสั้น และผลิตดอกลดลงและไม่ได้คุณภาพ
- ไม่แสดงอาการผิดปกติ

เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV จากตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง ๒๐ ต้น โดยวิธี strip test kit พบว่าตรวจพบเชื้อ CyMV ในบางตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อ ORSV ในทุกตัวอย่าง ส่วนวิธี RT-PCR แบบ one step สามารถตรวจพบเชื้อ CyMV ได้ในทุกตัวอย่าง และไม่พบเชื้อ ORSV



ภาพที่ ๑ ลักษณะอาการของกล้วยไม้สกุลหวายที่ตรวจพบ

ก. อาการใบต่างเหลือง ใบบิด บนใบกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล ต้นที่ ๑๐

ข. อาการใบต่าง ต้นแคระแกร็นในต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ ๒๐

๒. การผลิตโปรโตคอร์ม

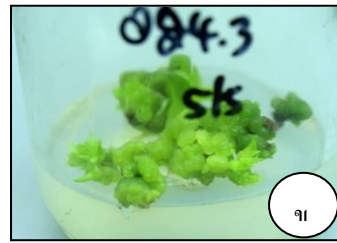
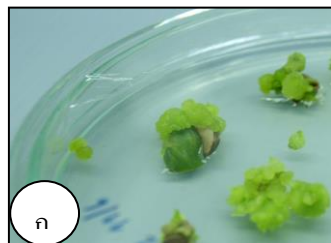
การผลิตโปรโตคอร์มโดยใช้ตาข้างจากหน่ออ่อนของต้นที่ตรวจพบเชื้อ CyMV (ภาพที่ ๒) ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล เบอร์ ๑๖ , ๑๗ , ๒๔ และ ๒๖ พอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๑ เดือน และย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๒ เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๒ สัปดาห์ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของหน่อขนาดเล็ก มากกว่า ๑ ชั้น ดังนี้ ๑๕ , ๑๕ , ๙ และ ๙ หน่อ ตามลำดับ นำหน่อที่ได้เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นาน ๒ เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๑ เดือน โปรโตคอร์มที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ ๐.๑ มิลลิเมตร นำออกให้แสงประมาณ ๑ สัปดาห์ โปรโตคอร์มสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ ๓) สุ่ม ๙๐ เปอร์เซ็นต์ของโปรโตคอร์มที่ได้ไปตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV โปรโตคอร์มรุ่นแรกที่เหลือนำไปวางบนอาหารสูตร Vacin and Went pH ๔.๖ ชุดใหม่ พบโปรโตคอร์มรุ่นใหม่เกิดขึ้นในลักษณะเดิม คือเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ ๐.๑ มิลลิเมตร และเมื่อให้แสงประมาณ ๑ สัปดาห์ โปรโตคอร์มสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำซ้ำเพื่อให้ได้โปรโตคอร์มรุ่นใหม่หลาย รุ่น และทุกรุ่นก็ทำการสุ่มไปตรวจหาเชื้อไวรัสตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่สามารถผลิตโปรโตคอร์มได้คือพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ ๑๖, ๑๗ และ ๒๔ (ตารางที่ ๑) นำโปรโตคอร์มแต่ละรุ่น ไปตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT- PCR แบบ one step ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ ๒ แสดงลักษณะหน่ออ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ ๑๗ ที่นำไปผลิตโปรโตคอร์ม

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนรุ่นของโปรโตคอร์มที่ผลิตได้ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลแต่ละสายต้น

สายต้นที่	จำนวนรุ่นโปรโตคอร์มที่ผลิตได้	หมายเหตุ
๑๖	๖	พบแถบดีเอ็นเอของ cp ของเชื้อ CyMV แต่ความเข้มลดลง
๑๗	๙	ไม่พบแถบดีเอ็นเอของ cp ของเชื้อ CyMV
๒๔	๕	พบแถบดีเอ็นเอของ cp ของเชื้อ CyMV แต่ความเข้มลดลง



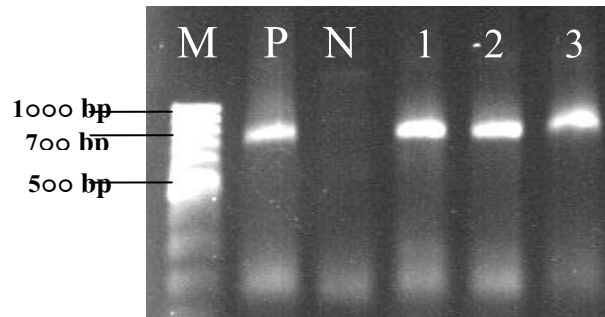
ภาพที่ ๓ ลักษณะของโปรโตคอร์มที่ผลิตได้ของกล้วยไม้สกุลหวาย

- ก. ลักษณะโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ ๑๗
- ข. ลักษณะโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ต้นที่ ๒๔

๓. การตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ในโปรโตคอร์ม

สุ่ม ๙๐ เปอร์เซ็นต์ของโปรโตคอร์มของพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๖, ๑๗ และ ๒๔ แต่ละรุ่นไปสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB และตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR แบบ one step และนำผลของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจสอบขนาดด้วย ๑ % Agarose gel electrophoresis ใน ๑x Tris- borate buffer (TBE) ใช้กระแสไฟฟ้า ๑๑๐ โวลต์ ประมาณ ๓๕ นาที ย้อมดีเอ็นเอในเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น ๑ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๖ ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ ๖ ตรวจพบความเข้มแถบดีเอ็นเอลดลง โปรโตคอร์ม กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๗ รุ่นที่ ๑-๔ ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ ๕-๘ พบว่าความเข้มของแถบอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ลดลง และโปรโตคอร์มรุ่นที่ ๙ ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ CyMV และโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้สกุลหวายต้นที่ ๒๔ ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV (ภาพที่ ๔ และ ๕)

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายต้นที่ ๑๗ รุ่นที่ ๙ ที่ตรวจไม่พบเชื้อ CyMV ไปชักนำให้เกิดต้นเนื้อเยื่อ และทำการตรวจหาเชื้อ CyMV ในต้นเนื้อเยื่อ ซึ่งไม่พบเชื้อ CyMV เช่นกัน



ภาพที่ ๔ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV ด้วยวิธี RT – PCR แบบ one step โดยใช้ไพรเมอร์ CyMV – CP – F และ CyMV – CP –R วิเคราะห์ด้วย ๑ % Agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (๑๐๐ bp DNA ladder)

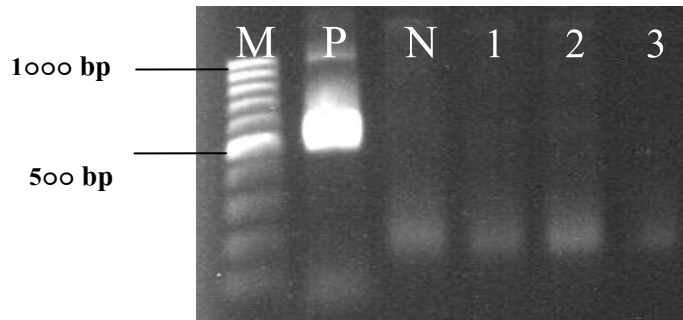
P = Positive control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม

N = Negative control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม

ช่องที่ ๑ = โปรโตคอร์มรุ่นที่ ๑ จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๖

ช่องที่ ๒ = โปรโตคอร์มรุ่นที่ ๑ จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๗

ช่องที่ ๓ = โปรโตคอร์มรุ่นที่ ๑ จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๒๔



ภาพที่ ๕ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ORSV ด้วยวิธี RT – PCR แบบ one step โดยใช้ไพรเมอร์ ORSV – CP – F และ ORSV – CP –R วิเคราะห์ด้วย ๑ % Agarose gel electrophoresis

- M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (๑๐๐ bp DNA ladder)
- P = Positive control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม
- N = Negative control ตัวอย่างใบกล้วยไม้ออนซิเดียม
- ช่องที่ ๑ = โปรโตคอร์มรุ่นที่ ๑ จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลต้นที่ ๑๖
- ช่องที่ ๒ = โปรโตคอร์มรุ่นที่ ๑ จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลต้นที่ ๑๗
- ช่องที่ ๓ = โปรโตคอร์มรุ่นที่ ๑ จาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลต้นที่ ๒๔

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล จำนวน ๒๐ ต้น พบอาการโรคใบต่าง มีแผลไหม้ หรือจุดต่างสีเหลือง ลักษณะยอดบิด มีจุดข้ำน้ำ ซึ่งบางต้นไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่ตรวจพบเชื้อ CyMV ทุกตัวอย่าง และไม่พบเชื้อ ORSV ในทุกตัวอย่างเช่นกัน นำตาข้างของหน่ออ่อนไปผลิตโปรโตคอร์มพบว่า ส่วนของตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อนำมาวางบนอาหารแข็งและเหลว สูตร Vacin and Went pH ๔.๖ นานประมาณ ๕ เดือน พบโปรโตคอร์มที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขนาดประมาณ ๐.๑ มิลลิเมตร และเมื่อได้รับแสงประมาณ ๑ สัปดาห์ โปรโตคอร์มจะสังเคราะห์แสงเปลี่ยนเป็นสีเขียว มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยพบว่าบางชิ้นเริ่มมีการแทงยอด และเมื่อย้ายโปรโตคอร์มรุ่นแรกไปวางบนอาหารสูตร Vacine and Went pH ๔.๖ ชุดใหม่ พบโปรโตคอร์มรุ่นใหม่เกิดขึ้นในลักษณะเดิม และทำซ้ำเช่นนี้เพื่อให้ได้โปรโตคอร์มรุ่นใหม่หลายรุ่น ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่สามารถผลิตโปรโตคอร์มได้คือพันธุ์เอี้ยสกุล ต้นที่ ๑๖, ๑๗ และ ๒๔ ได้ตัวอย่างละ ๖, ๙ และ ๕ รุ่น ตามลำดับ เมื่อสุ่มโปรโตคอร์มแต่ละรุ่นไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB เพื่อตรวจหาเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT- PCR แบบ one step โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV พบว่าโปรโตคอร์

มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๖ ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ ๖ ตรวจพบความเข้มแถบตีเอ็นเอ ลดลง โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลต้นที่ ๑๗ รุ่นที่ ๑-๔ ตรวจพบเชื้อ CyMV แต่รุ่นที่ ๕-๘ พบว่า ความเข้มของแถบอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ลดลง และโปรโตคอร์มรุ่นที่ ๙ ตรวจไม่พบตีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้ม อนุภาคเชื้อ CyMV และนำโปรโตคอร์มรุ่นที่ ๙ ไปชักนำให้เกิดต้นเนื้อเยื่อ สุ่มต้นเนื้อเยื่อที่ได้ไปตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งไม่พบเชื้อ CyMV เช่นกัน และโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้สกุลหวายต้นที่ ๒๔ ทุกรุ่น ตรวจพบเชื้อ CyMV ในทุก ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อ ORSV

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เทคนิคการย้ายอาหารให้โปรโตคอร์ม(subculture) ทำให้ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ CyMV สามารถนำไปปรับใช้ในการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรคเพื่อการส่งออก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อนุญาตให้ใช้สารเคมีต่างๆ เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล

เอกสารอ้างอิง

- ธีระ สุตะบุตร. ๒๕๓๒. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. หจก. ฟันนี้ทับบลิซซิ่ง. กรุงเทพมหานคร. ๓๑๐ หน้า.
- วิมล สีเทา. ๒๕๔๘. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสปोไวรัสของพริก มะขีเทศ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาโรคพืช คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. บางเขน. กรุงเทพฯ. ๘๑ หน้า.
- อรอุสา ลอยทะเล. ๒๕๔๘. วิธีเคมีบำบัดเพื่อการกำจัด *Cymbidium Mosaic Virus (CymMV)* ในกล้วยไม้พันธุ์การค้าบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. บางเขน. กรุงเทพฯ. ๑๓๑ หน้า.
- Yuphin Khentry, Srimek Chowpongpan, Ampaiwan Paradornuwat, Sureeya Tantiwivat and Niphone Thaveechai. ๒๐๐๗. Detection of *Cymbidium mosaic virus* in Protocrom-like Bodies in *Dendrobium Sonia* using One-Step RT – PCR. J. Plant Biochemistry & Biotechnology. Vol. ๑๖(๒). ๑๒๓-๑๒๕. July ๒๐๐๗.

ภาคผนวก

๑. วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอพืช (ดัดแปลงจาก วิมล, ๒๕๔๘)

ชั่งตัวอย่างพืช (ใบ/โปรโตคอร์ม) น้ำหนัก ๑๐๐ มิลลิกรัม ใส่ถุงพลาสติกใสขนาด ๓ x ๕ นิ้ว เติม CTAB buffer (๒% CTAB, ๑๐๐ mM Tris-HCl pH ๘.๐, ๒๐ mM EDTA, ๑.๔ M NaCl, ๑% Na_๒ SO_๓ , ๒%PVP) ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร บดตัวอย่างพืชให้ละเอียด เติม CTAB buffer อีก ๕๐๐ ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ย้ายน้ำคั้นมาใส่หลอดทดสอบขนาด ๑.๕ มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ ๖๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๕ นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (๒๔ : ๑) ปริมาตร ๑ เท่า ของส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๕ นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (๒๔ : ๑) ปริมาตร ๑ เท่า ของส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๕ นาที อีกครั้ง ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม ๔ M LiCl ปริมาตร ๑ เท่า ของส่วนใส เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๓๐ นาที เทสารละลายออก และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ๒๐๐ ไมโครลิตร TE buffer ที่ผสม ๑% SDS เติม ๑๐๐ ไมโครลิตร ๕ M NaCl และ ๓๐๐ ไมโครลิตร isopropanal ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส นาน ๓๐ นาที หมุนเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๑๕ นาที เทสารละลายออก ล้างตะกอนด้วย ๗๐% แอลกอฮอล์ หมุนเหวี่ยงที่ ๑๓,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๕ นาที ทำตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วย ๕๐ ไมโครลิตร RNase free water เก็บที่ อุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส

๒. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR แบบ one step สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CyMV และ ORSV

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนนิวคลีโอไทด์	ชนิดไวรัส	ที่มา
CyMV-CP-F	๕' AAG CTT TTA TTC AGT AGG GGG GGC ๓'	๒๔	CyMV	GI : ๓๗๑๓๙'๖๕๒
CyMV-CP-R	๕' GGA TCC ATG GGA GAG CCC ACT ๓'	๒๑	CyMV	GI : ๓๗๑๓๙'๖๕๒
ORSV-CP-F	๕' GGA TCC ATG TCT TAC ACT ATT ACA GAC CCG ๓'	๓๐	ORSV	GI : ๓๗๑๓๙'๖๖๘
ORSV-CP-R	๕' AAG CTT TTA GGA AGA GGT CC ๓'	๒๐	ORSV	GI : ๓๗๑๓๙'๖๖๘

