

การยับยั้งเชื้อ odontoglossum ringspot tobamovirus โดยใช้สายเปปไทด์
สังเคราะห์ melittin

นางสาว จุฑามาศ เพ็ญชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสุรนารี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2545
ISBN 974-533-244-5

**THE INHIBITION OF ODONTOGLOSSUM RINGSPOT TOBAMOVIRUS
BY MELITTIN.**

Miss Chuthamard Piasai

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Crop Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2002

ISBN 974-533-244-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การยับยั้งเชื้อ odontoglossum ringspot tobamovirus โดยใช้สายเปปไทด์สังเคราะห์ melittin

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ
ศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หัสไชย บุญจูง)
ประธานกรรมการ

.....
(อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

.....
(ดร. สุมิตรา กันตรง)
กรรมการ

.....
(อาจารย์ ดร. ปิยะดา ทิพย์ผ่อง)
กรรมการ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทวีช จิตรสมบูรณ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. กนก ผลารักษ์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จุฬามาศ เพ็ญชัย : การยับยั้งเชื้อ *odontoglossum ringspot tobamovirus*
 โดยใช้สายเปปไทด์สังเคราะห์ *melittin* (THE INHIBITION OF
 ODONTOGLOSSUM RINGSPOT TOBAMOVIRUS BY MELITTIN.)
 อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว, 51 หน้า. ISBN 974-533-244-5

การตรวจสอบไวรัสในกล้วยไม้จากแหล่งปลูก จำนวน 50 ตัวอย่าง ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าตัวอย่างกล้วยไม้ 84 เปอร์เซ็นต์ มีการเข้าทำลายร่วมกันระหว่างเชื้อ *cymbidium mosaic potexvirus* (CyMV) และ *odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) ขณะที่ตัวอย่างจำนวน 6 เปอร์เซ็นต์มีการเข้าทำลายเฉพาะจากเชื้อ ORSV และ 10 เปอร์เซ็นต์มีการเข้าทำลายเฉพาะจากเชื้อ CyMV ในการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค immunodetection 4 วิธี คือ western blot analysis, tissue printing, dot blot analysis และ ELISA พบว่าวิธี ELISA เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดี และมีความเหมาะสมมากกว่าวิธีอื่น การใช้วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ในการตรวจสอบให้ผลเช่นเดียวกันกับการใช้เทคนิค immunodetection แต่เป็นวิธีการที่ยุ่งยากกว่า การทดสอบชนิดพืชอาศัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ ORSV พบว่า บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa*) และ *Chenopodium amaranticolor* เป็น local lesion host ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ ORSV แต่ยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) เป็น systemic host ที่มีข้อจำกัดในการเพิ่มปริมาณของเชื้อ ORSV การเตรียมไวรัส ORSV บริสุทธิ์โดยใช้บานไม่รู้โรยเป็นพืชเพิ่มปริมาณ และใช้วิธีการของ Gooding (1967) พบว่าได้ไวรัส ORSV บริสุทธิ์ ปริมาณ 13.5 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมของใบบานไม่รู้โรย เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย *melittin* ในบานไม่รู้โรย โดยใช้ ORSV บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับ *melittin* ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครโมล นำส่วนผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตรทาบนใบบานไม่รู้โรยแต่ละใบโดยใช้แท่งแก้ว วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า จำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันระหว่างความเข้มข้นของ *melittin* แต่ละระดับ จากจำนวนแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อ ORSV อย่างเดียว แสดงให้เห็นว่า *melittin* ไม่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของ ORSV ในบานไม่รู้โรย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่อนักศึกษา.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

**CHUTHAMARD PIASAI: THE INHIBITION OF ODONTOGLOSSUM
RINGSPOOTOBAMOVIRUS BY MELITTIN. THESIS ADVISOR:
SOPONE WONGKAEW, Ph.D. 51 PP. ISBN 974 533 244 5**

By using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect virus contamination in 50 orchid samples, it was found that 84% were mixed infected with both cymbidium mosaic potexvirus (CyMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV), while only 6% of the samples were infected with ORSV and 10% of the samples were infected with CyMV. By comparing the efficiency of various methods of immunodetection technique using the same set of orchid samples for the presence of CyMV and ORSV, it was found that ELISA was as effective as other methods but was easier to handle and less confused in interpretation of the results. The reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was also employed with similar results to that obtained by immunodetection technique but the technique required more skill. By testing various indicator hosts for ORSV, it was found that the *Gomphrena globosa* and *Chenopodium amaranticolor* were most suitable while the virus failed to propagate in *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. By using *G. globosa* as ORSV propagation host and the purification method of Gooding (1967), 13.5 mg of purified ORSV was obtained from 1 kg of infected leaves. The infection inhibition test was done by preincubating 100 ng/ml virus in inoculating buffer with 5 concentrations of melittin, 0, 5, 10, 20 and 50 μ M. Each of the 200 μ l mixtures was placed on each leaf of *G. globosa* and mechanically inoculated with a glass rod. The experiment was performed in completely randomized design (CRD) with 10 replications. The numbers of lesions resulted from all melittin concentrations were not different from that obtained from ORSV alone indicating that melittin could not inhibit ORSV infection in *G. globosa*.

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ทัศนั้วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความเป็นมาและความสำคัญของ ORSV ต่อกล้วยไม้.....	4
2.2 องค์ประกอบและโครงสร้างของ ORSV.....	5
2.3 การตรวจสอบวินิจฉัยโรค.....	6
2.4 การป้องกันและควบคุมโรค.....	8
2.5 การใช้ melittin ในการควบคุมโรค.....	9
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	11
3.1 การตรวจสอบไวรัสในกล้วยไม้จากแหล่งปลูก.....	11
3.2 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค immunodetection.....	12
3.3 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR.....	14
3.4 การทดสอบชนิดพืชอาศัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ ORSV.....	14
3.5 การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์.....	15
3.6 การทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin.....	16
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	17
4.1 ผลการทดลองที่ 1 การตรวจสอบไวรัสในกล้วยไม้จากแหล่งปลูก.....	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค immunodetection.....	17
4.3 ผลการทดลองที่ 3 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR.....	25
4.4 ผลการทดลองที่ 4 การทดสอบชนิดพืชอาศัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบ เชื้อ ORSV.....	27
4.5 ผลการทดลองที่ 5 การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์.....	33
4.6 ผลการทดลองที่ 6 การทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin.....	35
5 สรุปผลการทดลอง.....	38
รายการอ้างอิง.....	39
ภาคผนวก.....	44
ประวัติผู้เขียน.....	51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.2.1	แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรในกล้วยไม้ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA.....24
4.4.1	เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรในตัวอย่างบานไม่รู้โรย, <i>C. amaranticolor</i> และถั่วเขียว หลังจากปลูกเชื้อ ORSV ได้ 7 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA.....29
4.4.2	เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรในตัวอย่างยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun และมะเขือเทศ หลังจากปลูกเชื้อ ORSV ได้ 14 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA.....29
4.6.1	แสดงจำนวนจุดแผลบนบานไม่รู้โรยที่เกิดจากการปลูกเชื้อ ORSV และ ORSV ร่วมกับ melittin ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ.....37
4.6.2	ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ.....37

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	แสดงลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน coat protein ของเชื้อ TMV เปรียบเทียบกับสายเปปไทด์ melittin.....10
4.2.1	แสดงแถบโปรตีนจากกล้วยไม้เมื่อใช้ extraction buffer I (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8)20
4.2.2	แสดงแถบโปรตีนจากกล้วยไม้เมื่อใช้ extraction buffer II (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM Na ₂ EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100)20
4.2.3	แสดงผลการทำ western blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้โดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum21
4.2.4	แสดงผลการทำ western blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้โดยใช้ antiserum ของ ORSV เป็น primary antiserum21
4.2.5	แสดงผลการทำ tissue printing ของตัวอย่างกล้วยไม้ปกติ โดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum.....22
4.2.6	แสดงผลการทำ tissue printing ของตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคโดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum.....22
4.2.7	แสดงผลการทำ dot blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้ โดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum23
4.2.8	แสดงผลการทำ dot blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้ โดยใช้ antiserum ของ OSRV เป็น primary antiserum23
4.3	แสดงผลการทำ RT-PCR โดยใช้ primer coat protein RNA ของ CyMV และ ORSV26
4.4.1	แสดงลักษณะจุดแผลบนบานไม่รู้โรย หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 7 วัน.....30
4.4.2	แสดงลักษณะจุดแผลบน <i>C. amaranticolor</i> หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 7 วัน.....30
4.4.3	แสดงลักษณะอาการของยาสูบใบใหญ่ หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 14 วัน.....31
4.4.4	แสดงลักษณะอาการบนใบมะเขือเทศ หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 14 วัน.....31
4.4.5	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของอนุภาค ORSV (ลักษณะเป็นท่อนตรง) และ CyMV (ลักษณะเป็นท่อนคดงอ) ในยาสูบใบใหญ่ หลังจากได้รับปลูกเชื้อ 14 วัน ย้อมสี uranyl acetate.....32

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.5	แสดงลักษณะจุดแผลบน <i>C. amaranticolor</i> หลังจากได้รับการปลูกเชื้อด้วย ไวรัส ORSVบริสุทธิ์ 7 วัน.....34
4.6	แสดงลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน coat protein ของเชื้อ ORSV และ TMV เปรียบเทียบกับสายเปปไทด์ melittin.....36

บทที่ 1

บทนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีมูลค่าการส่งออกที่สูงขึ้นทุกปี จากสถิติกรมพาณิชย์ สัมพันธ์ กระทรวงพาณิชย์รวบรวมไว้ จากปี พ.ศ. 2526 - 2529 มีมูลค่าเฉลี่ยปีละกว่า 400 ล้านบาท (Anonymous, 1986) และในปี พ.ศ. 2531 - 2535 สูงขึ้นเป็นประมาณ 580 ล้านบาท (สุรภี กิระดิยะอังกูร, 2536) จึงนับว่ากล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีอนาคตพืชหนึ่ง กล้วยไม้ของไทยถูกส่งไปยังตลาดทั่วโลกมากกว่า 40 ประเทศ ประเทศที่ส่งไปมากที่สุด คือ ญี่ปุ่น รองลงไปได้แก่ เยอรมันนี อิตาลี เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541) ตลาดส่งออกมีโอกาที่จะขยายได้อีกมากในอนาคต และประเทศไทยมีความเหมาะสมในการปลูกกล้วยไม้ได้ดี คือสภาพอากาศที่สามารถปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ได้ตลอดปีในทุกภาคของประเทศ อัตราค่าแรงงานยังไม่สูง นอกจากนั้นชนิดและสีของกล้วยไม้ไทยยังมีความสวยงามไม่แพ้ประเทศคู่แข่ง เนื่องจากมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ๆ ทั้งทางด้านสีและรูปร่างของดอกอยู่ตลอดเวลา

การปลูกกล้วยไม้มีอุปสรรคที่นับว่าสำคัญมากคือ การเข้าทำลายของโรค โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราหรือแบคทีเรียสามารถควบคุมได้ด้วยการใช้สารเคมีแต่โรคที่มีสาเหตุจากไวรัสไม่สามารถใช้สารเคมีควบคุมได้เพราะไวรัสมีอนุภาคขนาดเล็กมาก เพิ่มปริมาณอยู่ในเซลล์พืช และมีองค์ประกอบที่คล้ายกันกับสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ของพืช การกำจัดไวรัสจึงเป็นการทำลายเซลล์พืชด้วย เชื้อไวรัส 2 ชนิดที่พบว่ามีผลกระทบเข้าทำลายกล้วยไม้มากที่สุด คือ cymbidium mosaic potexvirus (CyMV) และ odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) หรือที่รู้จักในชื่อเดิมว่า tobacco mosaic virus-orchid (TMV-O) (Lawson and Brannigan, 1986) พบเข้าทำลายกล้วยไม้หลายสกุล โดย CyMV จะมีผลทำให้ปริมาณดอกลดลงและทำให้ใบเกิดแผลจุดสีน้ำตาลได้ในกล้วยไม้บางสกุล สำหรับ ORSV ทำให้เกิดแผลจุดที่ใบและดอกต่าง (จารุวรรณ จาติเสถียร และคณะ, 2540) เมื่อใดที่ไวรัสทั้งสองชนิดเข้าทำลายร่วมกัน จะทำให้ต้นกล้วยไม้ทรุดโทรม มีผลทำให้ต้นกล้วยไม้คุณภาพด้อยลง จากการสำรวจโรคไวรัสกล้วยไม้ทั้งสองชนิดในประเทศไทย พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายและสกุลออนซิเดียมถูกผสมใหม่เป็นโรคร้อยละ 20-30 และถูกผสมสายพันธุ์เก่าเป็นโรคร้อยละ 60-90 ส่วนสกุลแวนด้าและสกุลแคทลียา พบเป็นโรคร้อยละ 20-30 จากการสำรวจกล้วยไม้ในมลรัฐฮาวาย 3,600 ต้น 44 สกุล พบว่ามี CyMV ร้อยละ 61 ORSV ร้อยละ 25

และเชื้อเข้าทำลายร่วมกันร้อยละ 20 (Hu, Ferreira, Wang and Xu, 1993) ประเด็นสำคัญ คือ เชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดสามารถอยู่ในเซลล์ทุกส่วนของพืช แม้ในเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (meristem tissue) ดังนั้นการตัดเอาส่วน single meristem tip มาขยายพันธุ์ด้วยการปักตา เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็ยังมีโอกาสติดเชื้อไปได้ การขยายพันธุ์ด้วยการแยกหน่อหรือปักตาจากต้นพันธุ์ที่เป็นโรค หากไม่มีการตรวจสอบสภาพติดเชื้อของต้นที่ได้ อาจเป็นสาเหตุให้โรคไวรัสแพร่กระจายออกไปอย่างกว้างขวางได้ (สุรภิ กิริติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร และนวลจันทร์ ศิมา, 2532)

ORSV เป็นไวรัสในกลุ่ม tobamovirus กลุ่มเดียวกับ TMV แต่มีชนิดของพืชอาศัยน้อยชนิดกว่า (Jensen and Gold, 1951) มีรายงานพบเข้าทำลายกล้วยไม้ถึง 20 สกุล ORSV อนุภาคเป็นท่อนตรงขนาด 300 x 18 นาโนเมตร ที่ประกอบด้วย plus - sense genomic RNA ขนาดความยาว 6,609 nucleotides ปลายส่วน 5' เกาะด้วย cap และด้าน 3' ต่อด้วย Histidine tRNA และพบว่าด้านปลาย 3' ประกอบด้วยยีนสร้าง coat protein ซึ่งมีการแสดงออกในลักษณะเป็น subgenomic RNA

การควบคุมโรคที่เกิดจากไวรัสในกล้วยไม้ มีการทดลองหลายวิธี เช่น การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตกล้วยไม้สกุลเข็มมิเดียมิให้ปลอดไวรัส ซึ่งต่อมามีการศึกษาในกล้วยไม้หลายชนิด (Morel, 1960) และมีการศึกษาควบคู่ไปกับการใช้ความร้อนและสารเคมีในการควบคุมหรือลดปริมาณเชื้อก่อนนำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งทำการทดลองในกล้วยไม้สกุลออนซีเดียม (จารุวรรณ จาติเสถียร, สุรภิ กิริติยะอังกูร และสิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์, 2540) นอกจากนี้การใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้ปลอดไวรัส ซึ่งเป็นวิธีการที่ผลิตกล้วยไม้ให้ต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยได้มีการศึกษาการเรียงลำดับยีนไวรัส ทำการตัดต่อยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส เข้าไปในพืช ทำให้พืชมีการต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัส (Chia, Chan and Chua, 1992)

นอกจากวิธีการทางพันธุวิศวกรรม ในธรรมชาติพบว่ามีพืชหลายชนิดที่สามารถสร้างสารยับยั้งไวรัส ประเภทที่เป็น protein glycoprotein หรือ polysaccharide ได้ ตัวอย่างเช่น pokeweed (*Phytolacca americana*) สามารถผลิต pokeweed antiviral protein (PAP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้หลายชนิดทั้งที่เป็นสาเหตุของโรคพืชและสัตว์ (Verma, Versha and Baranwal, 1995) เนื่องจากสารยับยั้งไวรัสมีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ ในปัจจุบันจึงมีผู้สนใจในการสกัดและสังเคราะห์สารยับยั้งไวรัสที่มีกลไกการต้านทานแบบต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง โดยมีรายงานพบว่า melittin ซึ่งเป็น amphipathic peptide ที่ประกอบด้วย amino acid 26 ตัวและเป็นองค์ประกอบสำคัญของพิษผึ้ง มีความสามารถในการลดการเพิ่มจำนวนของ HIV ได้ (Wachinger *et al.*, 1998) และมีรายงานการศึกษาถึงการยับยั้งการติดเชื้อของ TMV ในยาสูบโดยใช้ melittin และ analogs ของ melittin พบว่าสามารถลดการติดเชื้อของ TMV

ในยาสูบได้ (Marcos, Houghten, Blondelle and Paya, 1995) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ melittin กับ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein, CP) ของ TMV ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มเดียวกับ ORSV พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างคล้ายกับส่วนของ TMV-CP ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ protein-protein และ protein-RNA interaction ในกระบวนการเข้ารวมตัวเป็นอนุภาคไวรัส (Marcos *et al.*, 1995) ดังนั้นการศึกษาถึงการใช้ melittin เพื่อผลการยับยั้งเชื้อ ORSV จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการควบคุม ORSV ในกล้วยไม้ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการตรวจสอบไวรัส CyMV และ ORSV ในตัวอย่างกล้วยไม้
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ melittin ในการยับยั้งการเข้าทำลายของ ORSV ในพืชทดสอบ

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเป็นมาและความสำคัญของ ORSV ต่อกล้วยไม้

พืชวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) จัดเป็นพืชมีดอกวงศ์ใหญ่ที่สุด เฉพาะพันธุ์ป่ามีประมาณ 650 สกุล (ไพบุลย์ ไพริพ่ายฤทธิ์, 2521) มีแหล่งปลูกกระจายทั่วทุกสภาพภูมิอากาศของประเทศ เนื่องจากกล้วยไม้มีดอกที่สวยงามมากและมีความหลากหลายของสายพันธุ์ ทำให้มีการซื้อขายแลกเปลี่ยนกล้วยไม้ทั้งภายในประเทศและระหว่างประเทศจำนวนมาก อันเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งของการแพร่ระบาดของโรค โดยเฉพาะโรคไวรัส การเข้าทำลายของโรคไวรัสจึงนับเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการปลูกกล้วยไม้ ไวรัสที่พบในกล้วยไม้ต่าง ๆ มีรายงานว่ามียังน้อย 25 ชนิด (Zetter, Ko, Wister, Elliott and Wong, 1990) แต่ที่มีการระบาดและมีการศึกษามากที่สุดมีเพียง 2 ชนิด คือ CyMV และ ORSV (Lawson and Brannigan, 1986) โดย Jensen (1951) ได้รายงานอาการของโรคดอกค้างของ *Cattleya labiata* var. *alfrediana* ซึ่งทราบภายหลังว่าเกิดจาก ORSV โดยเรียกชื่อโรคว่า cattleya colour break virus ลักษณะอาการของโรค คือ ดอกมีอาการค้าง กลีบดอกบางส่วนหายไปทำให้ดอกมีรูปร่างผิดปกติ (Jensen, 1951) สำหรับปัญหาโรคไวรัสของกล้วยไม้ในประเทศไทย ได้เริ่มศึกษาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2514 อาการโรคไวรัสของกล้วยไม้ที่ศึกษาและรายงานในประเทศไทย ได้แก่ ยอดบิด ใบลายตามความยาวใบ จุดประขาวตามความยาวใบ จุดขาวไม่เด่นชัด ค้างขอบแผลชัดเจน ค้างขอบแผลไม่ชัดเจน ซึ่งพบในกล้วยไม้สกุลหวาย ส่วนในสกุลแคทลียาและสกุลใกล้เคียง พบอาการดอกค้างและใบจุด (ปราณี สมุทสินธุ์ และธีระ สุตะบุตร, 2514)

ORSV ทำให้เกิดโรคกับกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ เช่น แคทลียา อพิเคนดรัม ชิมบิเดียม รวมทั้งสกุลใกล้เคียง โดยทำให้เกิดแผลจุดที่ใบ และอาการดอกค้าง (โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิธา, 2537) และทำให้เกิดแผลจุดตายกับพืชอาศัยชนิดอื่น ที่ใช้เป็นพืชทดสอบ ได้แก่ บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa*) ยาสูบ (*Nicotiana glutinosa*) และคีนโโปเดียม (*Chenopodium quinoa* และ *C. amaranticolor*) (Lawson, 1990) ได้มีการสำรวจกล้วยไม้ในฮาวายจำนวน 3,600 ต้น จาก 44 สกุล พบว่าถูก ORSV เข้าทำลายร้อยละ 25 และ CyMV ร้อยละ 61 และมีการเข้าทำลายร่วมกันของ ORSV และ CyMV ร้อยละ 20 (Hu *et al.*, 1993) ส่วนในประเทศเกาหลีซึ่งทำการตรวจสอบกล้วยไม้ 186 ต้น พบว่าสามารถตรวจพบ ORSV 100 ต้น และ CyMV 16 ต้น (Ryu, Park, Chung and Yoon, 1995) สำหรับในประเทศไทยการตรวจสอบกล้วยไม้ พบว่าโดยทั่วไป ORSV และ CyMV มักเข้าทำลายร่วมกันและมักพบว่า CyMV เป็นสาเหตุหลักของโรคกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ส่วน ORSV พบในกล้วยไม้บาง

สกุล เช่น แคทลียา และออนซิเดียม (วัชรินทร์ ชูศิลป์, 2525) ในกล้วยไม้สกุลแคทลียาที่เป็นโรคนี้อาจเกิดจาก ORSV และ CyMV ร่วมกันทำให้เกิดอาการที่รุนแรงกว่าต้นที่มี CyMV เพียงอย่างเดียว โดยพืชแสดงอาการดอกค้าง ดอกมีขนาดเล็กลง จำนวนดอกและความแข็งแรงน้อยลง การเจริญเติบโตของต้นลดลงจนถึงหยุดการเจริญเติบโต ใบซีด ต้นแคระแกรน และบางต้นตายในที่สุด ในขณะที่ ORSV เพียงชนิดเดียวไม่มีผลต่อพืชมากนัก พืชยังคงสามารถเจริญให้หน่อใหม่ที่ค่อนข้างแข็งแรงและให้ดอกใหญ่ แม้ใบแสดงอาการค้างก็ตาม (โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ, 2537)

การถ่ายทอดเชื้อ ORSV สามารถถ่ายทอดได้ง่ายโดยวิธีการสัมผัส ทำให้มีการแพร่กระจายโรคไวรัสของกล้วยไม้จากต้นไม้เป็นโรคไปยังต้นปกติ ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่ทำการตัดดอกและตัดแต่งต้น โดยติดไปกับอุปกรณ์ที่ใช้ แต่ไม่มีการถ่ายทอดทางเมล็ด และไม่พบว่ามีแมลงพาหะในธรรมชาติ (สุรณี กิริยะอังกูร, 2536) สำหรับคุณสมบัติทางกายภาพของ ORSV คือ ความเสถียรสูงสุดของน้ำคั้นที่ยังคงความสามารถในการเกิดโรคได้ (dilution end point : DEP) มีค่ามากกว่า 1 : 100,000 มีความคงทนต่อความร้อนในสภาพน้ำคั้น (thermal inactivation point : TIP) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และความคงทนในสภาพน้ำคั้นที่อุณหภูมิห้อง (longevity in vitro หรือ aging in vitro) ได้นานกว่า 1 เดือน (สาวิตร โพธิ์แก้ว และธีระ สูตะบุตร, 2517)

2.2 องค์ประกอบและโครงสร้างของ ORSV

Odontoglossum ringspot virus (ORSV) หรือ tobacco mosaic virus-orchid strain (TMV-O) ซึ่งแต่เดิมแยกจากกล้วยไม้ *Rossioglossum grande* (Helmut, Cribb and Launert, 1992) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *Odontoglossum grande* (Jensen and Gold, 1951) ORSV จัดอยู่ในกลุ่ม tobamovirus อนุภาคเป็นท่อนตรง (stiff rod) ขนาด 18-25 x 280-325 นาโนเมตร ประกอบด้วยสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายบวก (positive-sense genomic RNA) ขนาด 6.6 กิโลเบส (Jensen and Gold, 1951) ปลายด้าน 5' ต่อด้วย cap และด้าน 3' เป็นโครงสร้างคล้าย tRNA (tRNA-like structure) ของ histidine โครงสร้างในส่วน coding region ประกอบด้วย 5-6 ORF ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 126 K และ 183 K สำหรับทำหน้าที่เป็น polymerase โปรตีนขนาด 54 K ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ โปรตีนขนาด 30 K สำหรับการเคลื่อนย้ายของอนุภาค และโปรตีนขนาด 17.6 K สำหรับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส สร้าง subgenomic mRNA ของโปรตีนแบบ read through ของโปรตีนขนาด 126 K และ 183 K ได้โดยผ่าน UAG stop codon (Matthew, 1992) คาดว่าการจัดเรียงตัวของ nucleic acid sequence ของ RNA ของ ORSV น่าจะคล้ายคลึงกับ TMV

การศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ORSV ได้มีการศึกษาโดย Ryu *et al.*, (1995) ซึ่งแยกจากกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium goeringii*)

Reichenbach) พบว่ายีนดังกล่าวประกอบด้วยสายโพลีนิวคลีโอไทด์ขนาด 474 เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 158 เรซิดิว น้ำหนักโมเลกุล 17,785 ดาลตัน และลำดับเบสทางปลาย 3' ซึ่งไม่ได้กำหนดการสร้างโปรตีน จะจับคู่กันเป็นโครงสร้างที่คล้าย tRNA (tRNA-like structure) การเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสของยีนส่วนนี้กับสารพันธุกรรมของ ORSV ที่แยกได้ในประเทศญี่ปุ่น และเยอรมัน (Isomera *et al.*, 1991) พบว่ามีความเหมือนกัน ร้อยละ 98.1 และ 98.3 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนองค์ประกอบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ORSV กับไวรัสชนิดอื่นในกลุ่ม tobamovirus พบว่ามีความเหมือนกันในกลุ่มไวรัส tobacco mosaic virus (TMV) สายพันธุ์ต่าง ๆ ในระดับความเหมือนร้อยละ 73.4, 70.9, 71.5, 69.6, 71.3, 51.3 และ 49.4 กับ tobacco mosaic virus-tomato strain (TMV-L), tobacco mosaic virus-vulgare strain (TMV-V), tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), tobacco mosaic virus-Rakkyo strain (TMV-R), pepper mild mottle virus (PMMV), sunn-hemp mosaic virus (SHMV) และ cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) ตามลำดับ

การเรียงลำดับเบสด้านปลาย 3' ที่ไม่ได้กำหนดการสร้างโปรตีน พบว่า RNA ของ ORSV มีขนาด 414 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะมีการจัดเรียงลำดับเบสในส่วนปลายที่มี 3 domain ยาวประมาณ 57 นิวคลีโอไทด์ คือ (CCGUNGUGNANACGAUANUNCAUAGUGNNUNUCCCUCACUUA--AUCGAAGGGUNNU) ซึ่งในแต่ละ domain จะมีส่วนอนุรักษ์ คือ CACUAAAUCGAA ยาว 13 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมักพบเสมอในไวรัสกลุ่ม tobamovirus ในส่วนปลายสุดของด้าน 3' จะพบว่าเกิดเป็นโครงสร้าง tRNA like structure ที่มีรหัส GUG (anticodon ของ histidine) อยู่ในตำแหน่ง 70-74 (Ryu *et al.*, 1995)

2.3 การตรวจสอบวินิจฉัยโรค

วิธีการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคที่เกิดจากไวรัสในพืชที่นิยมใช้มีหลายวิธีด้วยกัน คือ

2.3.1 การศึกษาลักษณะอาการบนพืชอาศัย (bioassay) ซึ่งจะตรวจสอบผลการเกิดแผลจุดตายบนพืชทดสอบซึ่งใช้เวลาในการตรวจสอบและอ่านผลได้ในระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ พืชที่นิยมใช้เป็นพืชทดสอบสำหรับ ORSV ได้แก่ บานไม่รู้โรย ยาสูบ และ คีโนโปเดียม (Lawson, 1990)

2.3.2 วิธีทางเซรุ่มวิทยา (serodiagnosis technique) เป็นวิธีการตรวจสอบโดยใช้หลักการเกิดตะกอนของแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยาเป็นวิธีที่ให้ผลค่อนข้างเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจโดยใช้พืชทดสอบ แต่การจะใช้วิธีนี้จำเป็นต้องมีแอนติบอดีที่เชื่อถือได้เป็นตัวตรวจสอบ (reference) นอกจากนั้นยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ประกอบมากกว่าการใช้พืชทดสอบ (โสภณ วงศ์แก้ว, 2536) วิธีที่นิยมและสามารถตรวจวินิจฉัยได้ดีคือ

1. **Immunoelectron microscopy (IEM)** เป็นการตรวจสอบโดยนำคุณสมบัติความเฉพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีร่วมกับวิธีทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)** เป็นการตรวจสอบเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วไปว่ามีความไวต่อการตรวจหาเชื้อไวรัสพืช (Intasotti, 1992) โดยใช้หลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเช่นกัน ซึ่งสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาได้โดยดูปฏิกิริยาของเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่เกาะบนโมเลกุลแกมมาโกลบูลิน ซึ่งทำให้ซับสเตรทเปลี่ยนเป็นสารที่มีสี และยังเป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีการตรวจหาไวรัสที่มีความไวสูง (high sensitivity) สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้แม้จะมีจำนวนน้อย และสามารถตรวจสอบตัวอย่างเป็นจำนวนมากในแต่ละครั้งได้อย่างรวดเร็ว (กิตติศักดิ์ กิตติยะอังกูร, 2534) ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงเทคนิคและจัดหาอุปกรณ์ให้เหมาะสมที่จะเป็นเครื่องมือเผยแพร่ให้เกษตรกรได้มีโอกาสตรวจสอบต้นพันธุ์กล้วยไม้ของตนก่อนนำไปขยายพันธุ์ (สุรณี กิตติยะอังกูร และคณะ, 2534)

2.3.3 การตรวจสอบกรดนิวคลีอิก ได้แก่

1. **วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization technique)** เป็นวิธีการที่ตรวจสอบไวรัสในระดับยีนหรือกรดนิวคลีอิก สามารถตรวจสอบไวรัสได้แม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อยในเนื้อเยื่อพืช โดยอาศัยหลักการของการจับคู่กันของกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นตัวตรวจสอบ (nucleic acid probe) กับกรดนิวคลีอิกของไวรัส (Matthews, 1992)

2. **วิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)** ปัจจุบันเทคนิค RT-PCR เข้ามามีบทบาทในการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการจากอาร์เอ็นเอต้นแบบ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอสามารถทำได้จากอาร์เอ็นเอต้นแบบเพียงเส้นเดียว ทำให้มีการพัฒนาวิธีดังกล่าว เพื่อตรวจสอบไวรัสพืชชนิดอาร์เอ็นเอหลายชนิดทั้งในเนื้อเยื่อพืชและในแมลงพาหะ การตรวจสอบไวรัสด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพเพราะสามารถตรวจไวรัสที่มีปริมาณต่ำได้ดีกว่าวิธี ELISA ถึง 10^3 - 10^4 เท่า ในไวรัสบางชนิด เช่น potato leafroll virus (PLRV) ในใบและหัวของมันฝรั่งที่ถูกเชื้อเข้าทำลายและในเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) ซึ่งเป็นแมลงพาหะ (Van den Heuvel and Peters, 1989) การตรวจส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสของ grapevine fanleaf virus (GFLV) ในเนื้อเยื่อส่วนใบ ยอด ราก และเปลือกของต้นองุ่น และในไส้เดือนฝอย (*Xiphinema index*) พาหะของโรค (Rowhani, Chay, Golino and Falk, 1993) การตรวจสอบ rice tungro bacilliform virus (RTBV) ในข้าว และการตรวจสอบในเพลี้ยจักจั่น (*Nephotettix virescens*) ซึ่งเป็นพาหะแบบ semipersistent ในขณะที่วิธี ELISA ไม่สามารถตรวจสอบพบได้ (Takahashi *et al.*, 1993) การตรวจสอบ beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) ใน sugar beet

(Kruse *et al.*, 1994) และการตรวจสอบ tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) ในถั่วแดง (Fonseca, Boiteux, Avila, Lima and Kitajima, 1995) รวมทั้งการพัฒนาเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบไวรัสของไม้เนื้อแข็ง เช่น cherry leafroll virus (CLRV) grapevine fanleaf virus (GFLV) apple mosaic virus (ApMV) และ citrus tristeza closterovirus (CTV) เป็นต้น โดยตรวจพบตั้งแต่ความเข้มข้นของไวรัสในระดับต่ำ (Rowhani *et al.*, 1995)

2.4 การป้องกันและควบคุมโรค

การป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากไวรัสมีหลายวิธีคือ การใช้สารเคมี การใช้ความร้อน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และวิธีทางพันธุวิศวกรรม

2.4.1 การใช้สารเคมี พบว่า Actinomycin D, Aspirin, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, Hydrotonic และ 2-Thiouracil สามารถทำให้ปริมาณไวรัสลดลงได้แต่ไม่สามารถใช้ควบคุมโรคไวรัสในกล้วยไม้ได้ทั้งหมด (โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ์, 2528)

2.4.2 การใช้ความร้อน พบว่าการให้ความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส กับกล้วยไม้สกุลเข็มบีเดียไม่สามารถกำจัด CyMV ได้ (Jensen, 1951) และได้มีการใช้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำให้ปริมาณ CyMV ลดลงได้ แต่ไม่สามารถกำจัดไวรัสให้หมดไปได้ ส่วนที่ระดับอุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดอันตรายกับหวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium* Pompadour) ในสัปดาห์ที่ 4 จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการกำจัด CyMV ในหวายปอมปาดัวร์ (กุลฉวี ลีลพนัง และ ชีระ สูตะบุตร, 2520 ; โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ์, 2528)

2.4.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) จากส่วนปลายยอดที่มีขนาดเล็กมากเท่าใดก็จะปลอดต่อเชื้อโรคมก แต่มีโอกาสรอดชีวิตน้อยลง โดยมีการทดลองที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดขนาด 0.1 มิลลิเมตร ของกล้วยไม้สกุลเข็มบีเดีย และได้ต้นที่ปลอดจาก CyMV (Morel, 1960) และมีการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายแจคเคอลินคอนเซิต (*Dendrobium* Jacquelyn Concert) จากส่วนของตา ยอดขนาด 1.5-2 มิลลิเมตร และจากส่วนของตาข้างขนาด 3-4 มิลลิเมตร พบว่าได้ต้นที่ปราศจาก CyMV เมื่อตรวจด้วยวิธี ELISA คิดเป็นร้อยละ 12.5 (กลอยใจ สำเร็จพาณิชย์, 2534)

2.4.4 วิธีผสมผสาน คือการนำวิธีควบคุมโรคไวรัสหลาย ๆ วิธีมาปรับใช้ร่วมกัน ได้มีการทดลองใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกล้วยไม้สกุลหวาย การใช้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน จากนั้นตัดปลายยอดขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงได้ต้นที่ปลอดเชื้อ CyMV เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น (โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ์, 2528)

2.4.5 การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรม ได้เข้ามามีบทบาทต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มลักษณะที่ดีบางประการทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณให้กับพืช โดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในระดับยีนหรือดีเอ็นเอของพืช ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ต้านทานต่อไวรัส ได้มีการศึกษาการเรียงลำดับยีนไวรัส แล้วทำการถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเข้าไปในพืช เพื่อให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ หรือชนิดใกล้เคียง ได้มีการทดลองทำในกล้วยไม้ โดยการถ่ายยีนรายงานผล (reporter gene) โดยวิธียิงอนุภาค (particle bombardment) เข้าไปยังโปรโตพลาสมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า และตรวจพบการแสดงออกของยีนรายงานผลดังกล่าวหลังจากทำการยิงอนุภาคแล้ว 6 สัปดาห์ (Chia *et al*, 1990) แต่พบว่าการพัฒนาของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากผลของกานามัยซินต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสมและการพัฒนาไปเป็นต้นของกล้วยไม้ (Kuehnle and Sugii, 1992)

2.5 การใช้ melittin ในการควบคุมไวรัส

นอกจากวิธีการทางพันธุวิศวกรรม ในธรรมชาติพบว่ามีพืชหลายชนิดที่สามารถสร้างสารยับยั้งไวรัส ประเภท protein glycoprotein หรือ polysaccharide ได้ ตัวอย่างเช่น pokeweed (*Phytolacca americana*) สามารถผลิต pokeweed antiviral protein (PAP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสได้หลายชนิดทั้งที่เป็นโรคพืชและสัตว์ (Verma *et al*, 1995) เนื่องจากสารยับยั้งไวรัสมีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ ในปัจจุบันจึงมีผู้สนใจในการสกัด และสังเคราะห์สารยับยั้งไวรัสที่มีกลไกการต้านทานแบบต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ในระยะเวลาเมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบ antiviral peptides หลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการต้านทาน human immunodeficiency virus (HIV) หรือ herpes simplex virus ได้ โดยพบว่าความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์สังเคราะห์เหล่านี้กับโปรตีนของเชื้อไวรัสมีผลสำคัญต่อการลด infectivity ของไวรัสชนิดนั้น ๆ ลง ซึ่งเปปไทด์สังเคราะห์เหล่านี้จะมีผลต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคในกระบวนการเข้าร่วมตัวเป็นอนุภาคไวรัส (assembly) (Wachinger, Samtleben, Gerhauser, Wagner and Erfle, 1993) นอกจากนี้มีการรายงานว่า melittin ซึ่งเป็น amphipathic peptide ที่ประกอบด้วย amino acid 26 ตัวและเป็นองค์ประกอบสำคัญของพิษผึ้ง มีความสามารถในการลดการเพิ่มจำนวนของ HIV ได้ เนื่องจาก melittin สามารถจับกับ gag/pol precursor และป้องกัน processing ของ gag/pol โดย HIV protease (Wachinger *et al*, 1993) เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ melittin กับ CP ของ TMV ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มเดียวกับ ORSV พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างคล้ายกับส่วนของ TMV-CP ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ protein-protein

คือ บริเวณ Ala-74 และ Val-75 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับ intersubunit CP hydrophobic contacts และ Asp-77 ทำหน้าที่เกี่ยวกับ intersubunit pairs of carboxyl group ในขณะที่ Arg-90 และ Arg-92 เกี่ยวข้องกับ RNA binding (Marcos *et al.*, 1995) เมื่อนำ melittin และ melittin analogs มาผสมกับ เชื้อ TMV ก่อนปลูกเชื้อลงบนใบยาสูบ Marcos *et al.*, (1995) พบว่า melittin และ melittin analogs สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของ TMV และไวรัสอื่นที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับ TMV ได้ และการยับยั้งนี้อาจมีผลเนื่องมาจากสายเปปไทด์เหล่านี้ไปขัดขวางการจับตัวของ CP กับ RNA ของไวรัส หรืออาจทำปฏิกิริยากับอนุภาคไวรัสโดยตรง ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวถึงผลของการใช้ melittin ยับยั้งเชื้อ ORSV จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการควบคุมเชื้อ ORSV ในกล้วยไม้ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

TMV CP 71 - R Y N A V L D P L V T A L L G A F D T - - R N R I I - 94

Melittin G I G A V L K V L T T G L P A L I S W - - R K R Q Q

ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน coat protein ของเชื้อ TMV เปรียบเทียบกับสายเปปไทด์ melittin (ที่มา : Marcos *et al.*, 1995)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การทดลองมี 6 ขั้นตอน คือ การตรวจสอบไวรัสในกล้วยไม้จากแหล่งปลูก, การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค immunodetection, การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR, การทดสอบชนิดพืชอาศัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ ORSV, การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ และการทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin (infection inhibition)

3.1 การตรวจสอบไวรัสในกล้วยไม้จากแหล่งปลูก

เนื่องจากในธรรมชาติ พบว่าเชื้อ CyMV และ ORSV มักเข้าทำลายพืชร่วมกัน ตัวอย่างกล้วยไม้จากรังกล้วยไม้ของเกษตรกร จึงน่าจะมีการเข้าทำลายของเชื้อทั้งสองชนิด ในการทดลองครั้งนี้มีความจำเป็นที่จะต้องทดลองค้นหากล้วยไม้ที่มีเฉพาะเชื้อ ORSV เข้าทำลายเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง โดยได้สุ่มเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากรังกล้วยไม้ 3 รัง ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา จำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ซึ่งกล้วยไม้ที่นำมาตรวจสอบมีลักษณะดังนี้ คือ ใบค่าง ตามแนวยาวของใบโดยมีสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม, ยอดบิด ช่วงข้อถี่สั้น แคระแกรน, ช่อดอกสั้น กลีบดอกบิด มีเนื้อเยื่อหนาแข็งกระด้าง กลีบดอกสีซีดตรงโคนกลีบ และดอกมีขนาดเล็ก นำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส โดยวิธี ELISA

การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA มีวิธีการ คือ บดชิ้นส่วนของพืชที่ต้องการตรวจสอบใน carbonate coating buffer อัตรา 1 :20 (w/v) โดยใช้โกร่งบด ถ้าน้ำคั้นลงไว้ในหลอดทดสอบ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที โดยเตรียมตัวอย่างจากใบพืชปกติเพื่อใช้เป็น negative control และเตรียมตัวอย่างจากพืชที่มีเชื้อ CyMV และ ORSV เพื่อใช้เป็น positive control ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างของพืชที่ต้องการตรวจสอบ หลังจากนั้นใช้ไมโครไปเปตดูคือน้ำใส (supernatant) ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของจานทดสอบ (microtitre plate) และให้มี negative และ positive control ด้วย โดยทำ 2 จานทดสอบ และใส่ตัวอย่างละ 2 ซ้ำในแต่ละจานทดสอบ จากนั้นนำจานทดสอบไปบ่มในกล่องขึ้น (กล่องพลาสติกใส่กระดาษขึ้น) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือเก็บใส่ตู้เย็นค้างไว้ 1 คืน หลังจากนั้นเทน้ำใสที่บ่มทิ้งไว้ แล้วล้างหลุมให้สะอาดด้วย phosphate buffer saline-Tween (PBS-T) 3 ครั้ง

โดยแช่ไว้ 5 นาทีต่อครั้ง จากนั้นใช้ไมโครไปเปิดดูเอา blocking solution ซึ่งมี skim milk 0.1% ใน carbonate coating buffer จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ลงในแต่ละหลุมของจานทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างเช่นเดียวกันโดยใช้ PBS-T ต่อจากนั้นเตรียม anti-CyMV และ anti-ORSV อัตรา 1 : 1000 (v/v) ใน conjugate buffer นำไปหยอดในหลุมที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยแยกทำ antiserum ละ 1 จานทดสอบ แล้วบ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วย PBS-T ต่อจากนั้นเตรียม anti rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate อัตรา 1 : 1000 (v/v) ใน conjugate buffer นำไปหยอดในหลุมที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วย PBS-T ต่อจากนั้นเตรียม 0.1% p-nitrophenyl phosphate ใน substrate buffer เท่าที่ต้องการใช้นำมาหยอดลงในหลุมที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ในกล่องขึ้นในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45-60 นาที นำออกมาตรวจสอบปฏิกิริยา โดยเมื่อมีสีเหลืองปรากฏขึ้นบนหลุม positive control จนเห็นชัดด้วยตาเปล่าแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วย 3M KOH อัตรา 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำจานทดสอบไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วย ELISA reader (Packard Spectra Count™) ที่ความยาวช่วงคลื่น 405 นาโนเมตร

3.2 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค

immunodetection

ในการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธีเทคนิค immunodetection ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีน, การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี Western blot analysis , วิธี tissue printing, วิธี dot blot analysis และ วิธี ELISA ใช้ตัวอย่างกล้วยไม้จำนวน 4 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันสำหรับทำการตรวจสอบทั้ง 5 วิธี เพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละวิธี

3.2.1 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีน

ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีน 2 วิธี คือ วิธีแรก นำใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและใบปกติจำนวนตัวอย่างละ 1 กรัม มาบดใน extraction buffer I ซึ่งประกอบด้วย (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) ปริมาตร 1 มิลลิตร และ วิธีที่ 2 นำใบกล้วยไม้จำนวน 0.1 กรัม มาบดใน extraction buffer II (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM Na_2EDTA , 0.1% (v/v) Triton X-100) ปริมาตร 1 มิลลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใส (supernatant) มาทำการศึกษาโปรตีนเพื่อตรวจหา CyMV และ ORSV ด้วยวิธี sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel

electrophoresis (SDS-PAGE) โดยนำน้ำใส่ที่ได้จากการสกัดโปรตีนมารวมกับ sample buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 20% (w/v) SDS, 0.05% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.02% (w/v) bromphenol blue) ในอัตรา 1 : 1 โดยปริมาตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำมาทำการแยกโปรตีนใน 12.5% acrylamide slab gel ด้วยชุด mini-protein III (Bio-rad) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ โดยใส่ปริมาณของตัวอย่าง ตัวอย่างละ 0.02 มิลลิลิตร หลังจากทำ electrophoresis แล้วทำการย้อมสีโปรตีนด้วย coomassie brilliant blue R-250 ตามวิธีการของสมิตรา กันตรง (2541)

3.2.2 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี Western blot analysis

นำน้ำใส่ที่ได้จากการสกัดโปรตีนด้วยวิธีการสกัดโปรตีนวิธีที่ 2 จากใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคและใบปกติ มาทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใส่ปริมาณตัวอย่าง 0.02 มิลลิลิตรต่อ 1 ช่อง หลังจากทำ SDS-PAGE แล้วย้ายแผ่นเจลมาถ่ายโปรตีนลงบน PVDF membrane ด้วย mini-transbloter (Bio-rad) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำ PVDF membrane มาแช่ใน blocking solution (Tris-buffered saline (TBS), pH 7.5 ผสม 5% (w/v) skim milk) นำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย TBS ที่มี 0.5% (v/v) Tween 20 (TBS-T20) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำ PVDF membrane มาแช่ใน antiserum ของ CyMV และ ORSV ที่เจือจาง 1 : 2000 ใน TBS-T20 ที่ผสม 1% (w/v) skim milk นำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ด้วย TBS-T20 แล้วนำ PVDF membrane มาแช่ใน horseradish peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG (IgG-HRP) ที่เจือจาง 1 : 2000 ใน TBS-T20 ที่ผสม 1% skim milk นำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ด้วย TBS-T20 แล้วล้างด้วย TBS อีก 1 ครั้ง แล้วนำไปตรวจปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจสอบ 4 CN Plus (Promega) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ

3.2.3 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี Tissue-printing

นำใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคและใบปกติมาตัดตามแนวขวางของใบ แล้วพิมพ์โดยกดด้านที่เป็นรอยตัดบน PVDF membrane แล้วนำ PVDF membrane มาทำปฏิกิริยากับ antiserum และกระบวนการต่าง ๆ พร้อมตรวจผลด้วยวิธีการเช่นเดียวกับ western blot analysis

3.2.4 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี Dot blot analysis

นำใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคและใบปกติ จำนวนตัวอย่างละ 0.1 กรัม มาบดใน extract buffer ตามวิธีการสกัดโปรตีนวิธีที่ 2 แล้วนำน้ำใส่ที่ได้ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร มาหยดลงบน

PVDF membrane หลังจากนั้นนำ PVDF membrane มาทำปฏิกิริยากับ antiserum และกระบวนการต่าง ๆ พร้อมตรวจสอบผลด้วยวิธีการเช่นเดียวกับ western blot analysis

3.2.5 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี ELISA

นำใบกล้วยไม้ที่เป็นโรคมานวดใน carbonate coating buffer อัตรา 1 :20 (w/v) โดยใช้โกร่งบด ถายน้ำคั้นลงไว้ในหลอดทดสอบ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที โดยเตรียมตัวอย่างจากใบพืชปกติเพื่อใช้เป็น negative control และเตรียมตัวอย่างจากพืชที่มีเชื้อ CyMV และ ORSV เพื่อใช้เป็น positive control ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างของพืชที่ต้องการตรวจสอบ หลังจากนั้นใช้ไมโครไปเปตดูคือน้ำใส (supernatant) ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของจานทดสอบ (microtitre plate) โดยให้มี negative (ใบกล้วยไม้ปกติ) และ positive control (ใบพืชที่เป็นโรคจาก CyMV และ ORSV) ด้วย หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผลด้วยวิธี ELISA ตามขั้นตอนตามที่ระบุใน 3.1

3.3 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR

นำตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคและใบปกติ มาทำการสกัดแยก ssRNA ของเชื้อทั้งสองด้วยสารผสม TRIzol (Gibco) ตามวิธีการของสุรภี กิระดิยะอังกูร และคณะ (2540) ต่อจากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อ CyMV และ ORSV (ภาคผนวกที่ 8) และชุด Access RT-PCR system (Promega) ทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อให้เป็น cDNA ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำ cDNA ไปสังเคราะห์ DNA ในปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง thermocycler ที่ตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ DNA ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ด้วยการทำ electrophoresis บน 1% (w/v) agarose gel โดยอ่านผลจากขนาดของ DNA ที่เกิดเป็น band เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide ส่องดูด้วยแสง UV เทียบกับ positive control ของ DNA ขนาด 323 bp และ molecular marker คือ 100 bp DNA ladder (Promega)

3.4 การทดสอบชนิดพืชอาศัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ ORSV

ทำการปลูกเชื้อ ORSV บนพืชอาศัยที่เป็น local lesion host คือ บานไม่รู้โรย (*Gonphrena globosa*), ถั่วเขียว (*Vigna radiata*), *Chenopodium amaranticolor* และพืชอาศัยที่เป็น systemic host คือ ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun.), งา (*Sesamum indicum*,

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) โดยเก็บพืชที่จะทดสอบไว้ในที่มืด 3-10 ชั่วโมงก่อนที่จะนำมาทำการปลูกเชื้อ แล้วเตรียมน้ำคั้นพืชที่มีเชื้อ ORSV โดยบดพืชที่มีเชื้อ ORSV ใน extraction buffer ที่แช่เย็น ซึ่งมี β -mercaptoethanol 0.2% และ celite 1% ใน 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 โดยบดในโกร่งและสากที่แช่เย็น ในอัตราส่วน 1 : 10 (w/v) หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน (local lesion host) และ 14 วัน (systemic host) นำพืชมาทำการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี ELISA โดยมีตัวอย่างที่เป็น positive control และ negative control เพื่อนำไปเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างที่ได้รับการปลูกเชื้อ

3.5 การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

เตรียมเชื้อไวรัส ORSV บริสุทธิ์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Gooding (1967) และ ธนากร จารุพัฒน์ (2526) โดยนำน้ำคั้นจากใบ *C. amaranticolor* ที่มีเชื้อ ORSV (ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณสุรณี กิระติยะอังกูร) มาทำการปลูกเชื้อบนบานไม้รัฐโรย (*G. globosa*) และยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun (*N. tabacum* cv. Samsun.) หลังจากทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ โดยในบานไม้รัฐโรยจะแสดงอาการแผลจุดสีเหลือง นำใบของบานไม้รัฐโรย จำนวน 40 กรัม และ ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun จำนวน 400 กรัม มาบดใน 0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 ที่ผสม β -mercaptoethanol 1% โดยปริมาตร ในอัตราส่วน 1 : 1 (ใบ : บัฟเฟอร์) กรองน้ำคั้นผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น เติม n-butanol ในอัตราส่วน 8/100 ของปริมาตรของน้ำคั้นพืช กวนให้เข้ากันอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วย Sorvall superspeed RC- 5 refrigerated centrifuge (SS-34 rotor) แรงหมุนเหวี่ยง 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสเติม PEG 6,000 ให้มีความเข้มข้น 4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กวนให้เข้ากันที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราส่วน 1/5 ของปริมาตรน้ำคั้นพืช แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสเติม NaCl และ PEG 6,000 ให้มีความเข้มข้น 4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กวนให้เข้ากันที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนไวรัสด้วย 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วย Beckman XL-100 ultracentrifuge (70.1 Ti rotor) ด้วยแรงหมุนเหวี่ยง 30,000 g เป็นเวลา 60 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนไวรัสที่ได้มาละลายใน 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 จำนวน 200 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นของสารแขวนลอยไวรัสโดยใช้เครื่อง spectrophotometer คู่ค่า

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรจากค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร นำมาหาความเข้มข้นของไวรัสโดยคำนวณจากค่า Specific extinction coefficient ของเชื้อ ORSV ซึ่งเท่ากับ 3.0 (Paul, 1975) และตรวจสอบไวรัสบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยวิธี ELISA

3.6 การทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin (infection inhibition)

การทดสอบ inhibition ใช้บานไม่รู้โรย ซึ่งเป็น local lesion host เป็นพืชทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 10 ซ้ำในแต่ละคำรับทดลอง ซึ่งได้แก่ไวรัสบริสุทธิ์ผสม melittin เข้มข้น 5, 10, 20 และ 50 ไมโครโมล ใน 3-(*N*-morpholino) propane sulfonic acid (Mops) โดยใช้ไวรัส ORSV บริสุทธิ์ เข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร inoculation buffer ในทุกความเข้มข้นของ melittin บ่มเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ กับ melittin ก่อนปลูกเชื้อ 15 นาที ใช้บานไม่รู้โรยอายุ 28 วัน โดยเก็บพืชไว้ในที่มืด 1 วันก่อนปลูกเชื้อ และใช้เฉพาะใบคู่ที่ 2 จากโคนต้นเป็นใบทดสอบ ปลูกเชื้อโดยหยดส่วนผสมของไวรัสบริสุทธิ์กับ melittin ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงบนใบทดสอบ จากนั้นใช้แท่งแก้วกลิ้งลงบนใบที่หยดส่วนผสมของไวรัสบริสุทธิ์กับ melittin กลับ-ไปมา จำนวน 5 ครั้ง ใช้ใบ 10 ใบ (ซ้ำ) ทดสอบ melittin แต่ละความเข้มข้น เปรียบเทียบกับใบข้างที่เหลือที่ปลูกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ที่ไม่ได้ผสม melittin รวมทั้งมีการปลูกเชื้อโดยใช้ inoculate buffer และ melittin เพียงอย่างเดียวเพื่อตรวจสอบผลการทดลอง หลังจากทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ทำการนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกันระหว่างการปลูกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียวกับการปลูกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ร่วมกับ melittin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองที่ 1 การตรวจสอบไวรัสในกล้วยไม้จากแหล่งปลูก

จากการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้ที่น่าจะมีการเข้าทำลายของเชื้อ CyMV และ ORSV จากกล้วยไม้ของเกษตรกรในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 50 ตัวอย่างด้วยวิธี ELISA พบว่ามีตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีการเข้าทำลายของเชื้อ CyMV ร่วมกับ ORSV จำนวน 42 ตัวอย่าง คิดเป็น 84 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมด และตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีการเข้าทำลายเฉพาะเชื้อ CyMV จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมด ส่วนตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีการเข้าทำลายเฉพาะเชื้อ ORSV จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมด

จากผลการตรวจสอบดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการตรวจสอบกล้วยไม้ที่ปลูกในประเทศไทยซึ่งพบว่าโดยทั่วไปเชื้อ CyMV และ ORSV มักมีการเข้าทำลายร่วมกัน และมักพบว่า CyMV เป็นสาเหตุหลักของโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ส่วน ORSV พบในกล้วยไม้บางสกุล (วัชรพร ชูศิลป์, 2525) และจากตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีการเข้าทำลายของเชื้อ ORSV จำนวน 3 ตัวอย่าง นำมาใช้เพิ่มปริมาณบนพืชอาศัยที่เหมาะสม เพื่อเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ในการทดลองต่อไป

4.2 ผลการทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค immunodetection

4.2.1 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีน จากการทดลองพบว่าการสกัดโปรตีนวิธีที่ 2 โดยใช้ extraction buffer II ที่ประกอบด้วย 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM Na_2EDTA , 0.1% (v/v) Triton X-100 สามารถสกัดโปรตีนได้ปริมาณใกล้เคียงกับการสกัดโปรตีนวิธีแรกซึ่งใช้ extraction buffer I ที่ประกอบด้วย 0.5 M Tris-HCl,

pH 6.8 ทั้งๆ ที่ใช้เนื้อเยื่อปริมาณน้อยกว่าดังแสดงในภาพที่ 4.2.1 และ 4.2.2 เหตุที่เป็นเช่นนั้น น่าจะเนื่องมาจากใน extraction buffer II มี Triton X-100 เป็น detergent ที่จะใช้เพื่อแยกโปรตีนออกจากสารอื่น และ β -mercaptoethanol เป็นสารที่ทำหน้าที่เป็น antioxidant เพราะจะไปยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ของ phenolic compound จากการที่มีสารซึ่งมีคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้ extraction buffer II มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนได้ดีกว่า Tris-HCl

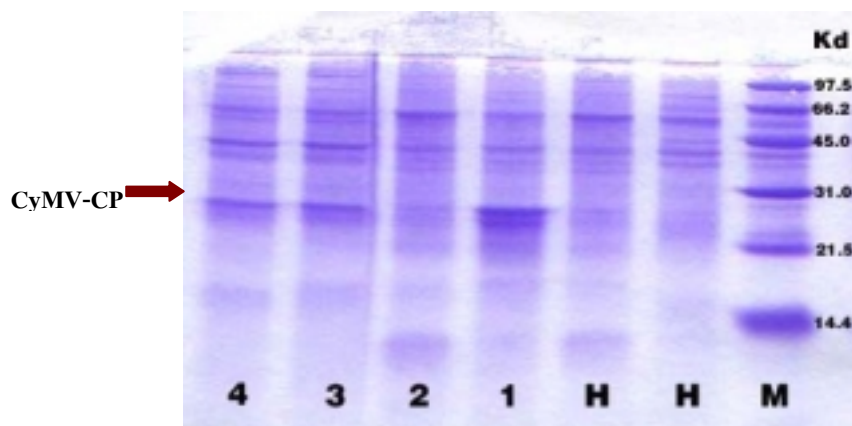
4.2.2 Western blot analysis การตรวจสอบกล้วยไม้ที่เป็นโรคจำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum ปรากฏแถบสีของโปรตีนสำคัญ บน PVDF membrane ในกล้วยไม้ทั้ง 4 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อคำนวณจากระยะทางการเคลื่อนที่เทียบกับ MW standard มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนประมาณ 23,600 ดาลตัน (ภาพที่ 4.2.3) ส่วนใน PVDF membrane ที่ทำปฏิกิริยากับ antiserum ของ ORSV เป็น primary antiserum เกิดแถบสีของโปรตีนเฉพาะในกล้วยไม้ตัวอย่างที่ 2 เมื่อคำนวณจากระยะทางการเคลื่อนที่ของ MW standard มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนประมาณ 17,800 ดาลตัน (ภาพที่ 4.2.4) ส่วนกล้วยไม้ที่ไม่เป็นโรคไม่มีแถบสีของโปรตีนเกิดขึ้น เมื่อใช้ทั้ง antiserum ของ CyMV และ ORSV เป็น primary antiserum ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธี Western blot analysis นั้นสามารถตรวจผลได้แม่นยำและมีความจำเพาะเจาะจงสูงซึ่งดูได้จากการจับยึดของ antibody ซึ่งอยู่ใน antiserum ที่ตำแหน่งของโปรตีน (นงลักษณ์ ศรีนทุ และ เอ็ม เอฟ คลาค, 2536) โดยผลการตรวจสอบที่ได้คือการจับยึดของ antibody ซึ่งอยู่ใน antiserum ที่ตำแหน่งโปรตีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับ coat protein ของแต่ละเชื้อ โดยเมื่อคำนวณจากระยะทางการเคลื่อนที่เทียบกับ MW standard พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน เท่ากันกับ coat protein ของ CyMV ในตัวอย่างที่ 1-4 คือ 23,600 ดาลตัน (Chia., *et al* 1992) และเท่ากับ coat protein ของ ORSV ในตัวอย่างที่ 2 คือ 17,785 ดาลตัน (Ryu., *et al* 1995) แสดงให้เห็นว่า antibody มีความจำเพาะเจาะจงกับ CyMV หรือ ORSV จริง

4.2.3 Tissue printing จากการตรวจสอบด้วยวิธี tissue printing พบว่ารอยพิมพ์จากเนื้อเยื่อใบของตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคมึลิม่วงเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงระหว่าง antigen กับ antibody ของ CyMV (ภาพที่ 4.2.6) และ ORSV ส่วนกล้วยไม้ที่ไม่เป็นโรคไม่มีสีที่มาจากการทำงานปฏิกิริยาของ antibody เกิดขึ้น พบเฉพาะสีเขียวของคลอโรฟิลล์จากเนื้อเยื่อพืช (ภาพที่ 4.2.5) เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค มี CyMV หรือ ORSV อยู่ในเนื้อเยื่อส่วน epidermis, mesophyll, vascular tissue โดยเฉพาะในส่วน vascular tissue มีอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งทำให้สามารถระบุได้ว่าเนื้อเยื่อชนิดใดเกิดการติดเชื้อมากน้อยเพียงใดอย่างคร่าว ๆ ด้วย

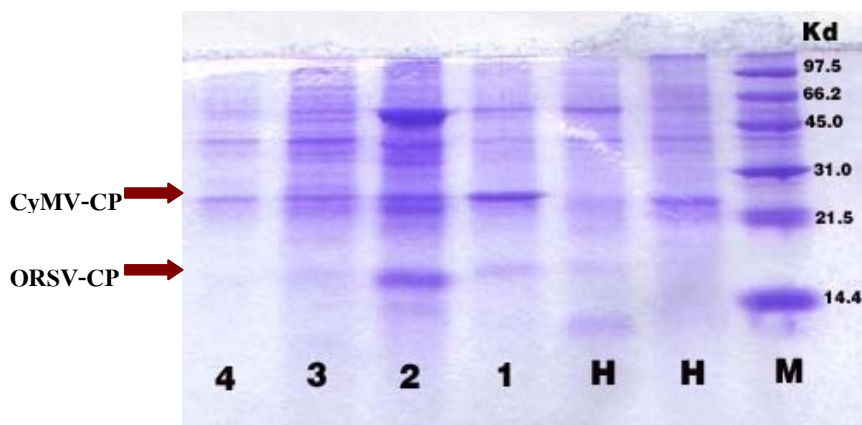
4.2.4 Dot blot analysis จากการตรวจสอบด้วยวิธี dot blot analysis พบว่าน้ำสกัดโปรตีนของกล้วยไม้ตัวอย่างที่ 1-4 มีสีม่วงที่เกิดขึ้น เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับ antiserum ของ CyMV แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงระหว่าง antigen กับ antibody ของ CyMV โดยตัวอย่างที่ 4 จะมีสีเข้มที่สุด ตามด้วยตัวอย่างที่ 1, 3 และ 2 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2.7) แต่เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับ antiserum ของ ORSV พบว่าเฉพาะกล้วยไม้ตัวอย่างที่ 2 มีสีม่วงเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงระหว่าง antigen กับ antibody ของ ORSV (ภาพที่ 4.2.8) ส่วนกล้วยไม้ที่ไม่เป็นโรค ไม่มีสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ antiserum ทั้งสองชนิด (ภาพที่ 4.2.7 และ 4.2.8) ซึ่งจากความเข้มขึ้นของสีที่เกิดขึ้นทำให้สามารถใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบเชิงปริมาณได้ด้วย

4.2.5 ELISA จากการตรวจสอบ ด้วยวิธี ELISA พบว่า ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ 1-4 มีสีเหลืองของปฏิกิริยาเกิดขึ้น เมื่อใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum แสดงว่ามีเชื้อ CyMV ในขณะที่เฉพาะกล้วยไม้ตัวอย่างที่ 2 ให้ปฏิกิริยาสีเหลืองกับ antiserum ของ ORSV ส่วนกล้วยไม้ปกติที่เป็น negative control ไม่มีสีของปฏิกิริยาเกิดขึ้น และเมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร พบว่า ตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีสีเหลือง ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antibody มีค่าดูดกลืนแสงสูงกว่าตัวอย่างที่เป็น negative control และมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เป็น positive control (ตารางที่ 4.2.1)

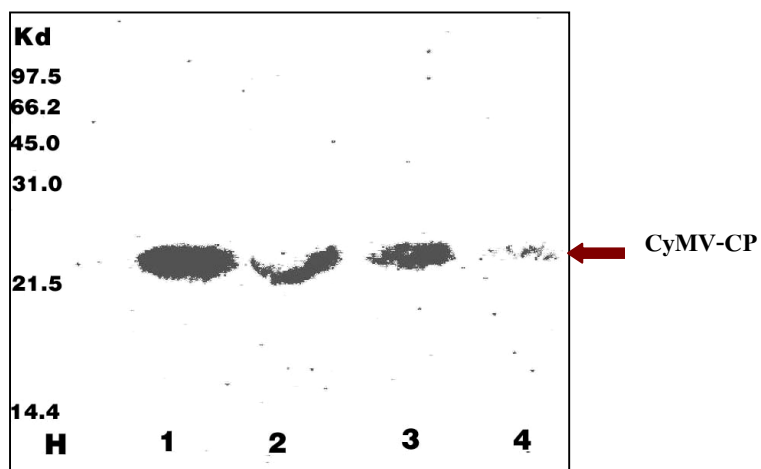
จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ที่ใช้เทคนิคทาง immunodetection เปรียบเทียบทุก ๆ วิธีมีความแม่นยำค่อนข้างสูงแต่ก็ยังมีข้อจำกัด เช่น วิธี Western blot analysis ซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูง แต่มีวิธีการในการตรวจสอบแต่ละขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก และใช้ตรวจสอบตัวอย่างพืชได้จำนวนน้อย วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ตรวจสอบโรคสำหรับการตรวจสอบที่มีจำนวนมาก (สุรภี กิริติยะอังกูร, 2536) สำหรับวิธี tissue printing และ dot blot analysis เป็นวิธีที่สามารถเก็บผลของปฏิกิริยาไว้ได้นาน และสามารถตรวจสอบตัวอย่างพืชได้ครั้งละจำนวนมาก เช่นเดียวกับวิธี ELISA (สุรภี กิริติยะอังกูร และคณะ, 2532) นอกจากนั้นวิธี tissue printing สามารถระบุว่าเนื้อเยื่อชนิดใดเกิดการติดเชื้อมากหรือน้อยเพียงคร่าว ๆ แต่เนื่องจากปฏิกิริยาที่ดูได้จากสีที่เกิดขึ้น ซึ่งในการตรวจสอบใช้น้ำคั้นของพืช พืชแต่ละตัวอย่างมีสีของน้ำคั้นแตกต่างกัน ดังนั้นในการที่จะวัดว่าตัวอย่างใดมีปริมาณของเชื้อมากกว่าโดยดูได้จากสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น จึงอาจจะเกิดการผิดพลาดในการตรวจสอบผลได้ ส่วนเทคนิค ELISA นั้น ถ้าตัวอย่างที่เป็นโรคมียากพอ การตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดโดยใช้เทคนิค ELISA ยังคงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดี (สุรภี กิริติยะอังกูร และคณะ, 2540) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดด้วยวิธีต่าง ๆ ต้องคำนึงถึงข้อจำกัด และความละเอียดของข้อมูลที่ต้องการ เพื่อให้ได้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ



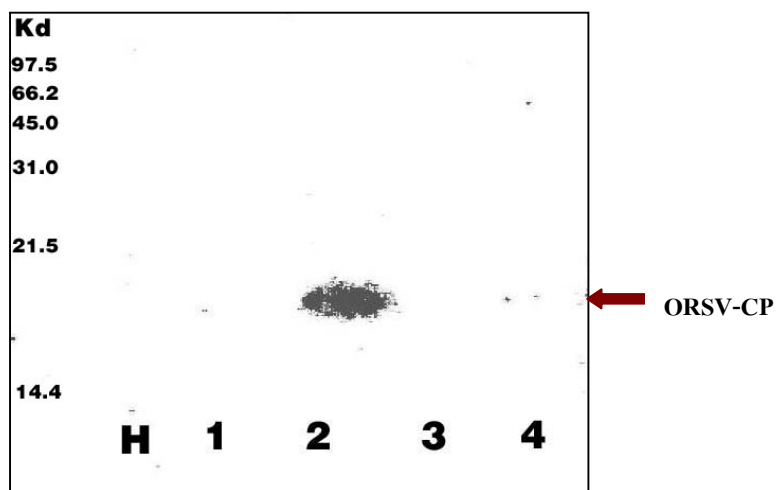
ภาพที่ 4.2.1 แสดงแถบโปรตีนจากกล้วยไม้เมื่อใช้ extraction buffer I (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8); lane 1-4 : โปรตีนที่ได้จากกล้วยไม้ที่เป็นโรค, H : กล้วยไม้ปกติ, M : MW standard



ภาพที่ 4.2.2 แสดงแถบโปรตีนจากกล้วยไม้เมื่อใช้ extraction buffer II (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM Na_2EDTA , 0.1% (v/v) Triton X-100); lane 1-4 : โปรตีนที่ได้จากกล้วยไม้ที่เป็นโรค, H : กล้วยไม้ปกติ, M : MW standard



ภาพที่ 4.2.3 แสดงผลการทำ western blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้โดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum ; lane 1-4 : ตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค, H : กล้วยไม้ปกติ



ภาพที่ 4.2.4 แสดงผลการทำ western blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้โดยใช้ antiserum ของ ORSV เป็น primary antiserum ; lane 1-4 : ตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค, H : กล้วยไม้ปกติ



ภาพที่ 4.2.5 แสดงผลการทำ tissue printing ของตัวอย่างกล้วยไม้ปกติ โดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum



ภาพที่ 4.2.6 แสดงผลการทำ tissue printing ของตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรคโดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum



ภาพที่ 4.2.7 แสดงผลการทำ dot blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้ โดยใช้ antiserum ของ CyMV เป็น primary antiserum ; lane 1-4 : ตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค, H : กล้วยไม้ปกติ



ภาพที่ 4.2.8 แสดงผลการทำ dot blot analysis ของตัวอย่างกล้วยไม้ โดยใช้ antiserum ของ OSRV เป็น primary antiserum ; lane 1-4 : ตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค, H : กล้วยไม้ปกติ

ตารางที่ 4.2.1 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรในกล้วยไม้ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

ตัวอย่าง	anti-CyMV ¹	anti-ORSV
1	1.070	0.050
2	0.720	0.640
3	0.420	0.090
4	1.160	0.080

หมายเหตุ

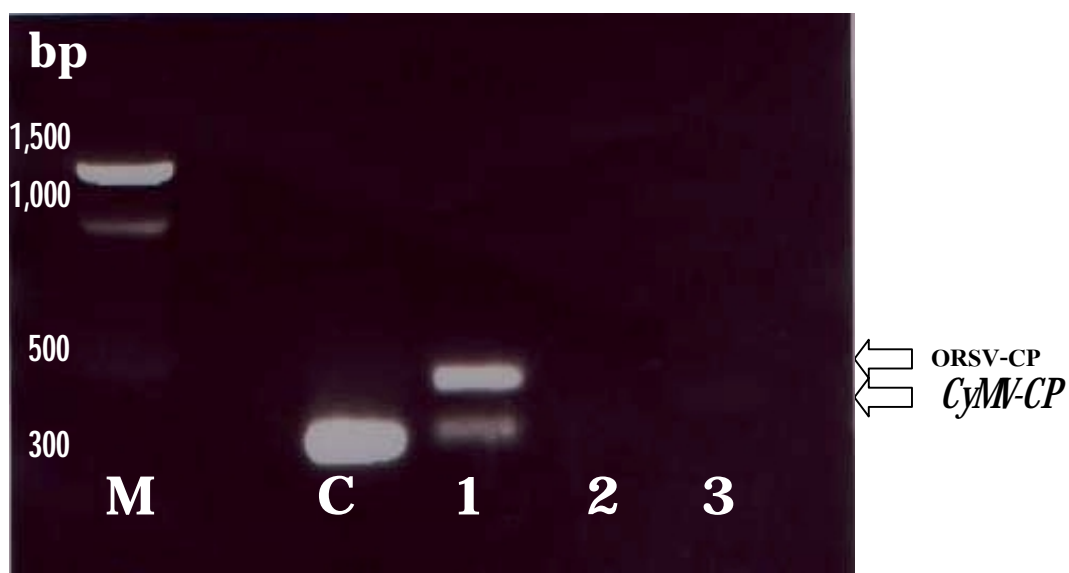
¹ คือค่าเฉลี่ยจาก 4 หลุมในแต่ละตัวอย่าง

ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของ negative control เท่ากับ 0.058 และ positive control เท่ากับ 1.213

4.3 ผลการทดลองที่ 3 การตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยวิธี RT-PCR

จากการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer ของ coat protein ของเชื้อ ORSV และ CyMV พบว่า กลั้วไม้ที่เป็นโรคมึแถบของ DNA เกิดขึ้น 2 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบ DNA ของ 100 bp DNA ladder และ positive control DNA ขนาด 323 bp พบว่าแถบล่างมีขนาดใกล้เคียงกับ แถบ DNA ของ positive control คือประมาณ 340 bp ซึ่งใกล้เคียงกับ cDNA ของ CyMV coat protein ซึ่งมีขนาด 339 bp (สุรภี กิริติยะอังกูร และคณะ, 2540) และแถบบนมีขนาดประมาณ 500 bp ซึ่งใกล้เคียงกับ cDNA ของ ORSV coat protein ซึ่งมีขนาด 538 bp (สุรภี กิริติยะอังกูร และคณะ, 2540) ส่วนกลั้วไม้ตัวอย่างอื่น ไม่มีแถบของ DNA เกิดขึ้น (ภาพที่ 4.3) จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าวิธี RT-PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจสอบโรค คือมีความไวสูง ถึงแม้จะใช้ตัวอย่างเพียง 20 มิลลิกรัม ก็สามารถตรวจสอบโรคได้ ในขณะที่วิธี ELISA ต้องใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 100 มิลลิกรัม นอกจากนี้ เทคนิค RT-PCR ยังสามารถตรวจสอบ CyMV และ ORSV ได้พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ในขณะที่เทคนิค immunodetection แต่ละวิธี ต้องใช้ antibody แต่ละชนิดในการตรวจสอบ ซึ่งต้องทำปฏิกิริยาในขั้นตอนของการจับยึดกับ antibody ที่เฉพาะเจาะจงกับ CyMV และ ORSV แยกกัน (สุรภี กิริติยะอังกูร และคณะ, 2540) อย่างไรก็ตามวิธี RT-PCR ยังมีข้อเสียตรงที่ค่าใช้จ่ายของสารเคมีมีราคาแพง และมีขั้นตอนในการตรวจสอบยุ่งยาก

จากผลการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค RT-PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในกรณีตัวอย่างที่เป็นโรคมึปริมาณน้อย หรือเนื้อเยื่อพืชมีไวรัสอยู่ปริมาณน้อย และสามารถตรวจสอบในระดับ RNA ได้ แม้ว่าอนุภาคไวรัสจะไม่มี coat protein แต่ก็ทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือทางชีวโมเลกุลพร้อม



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการทำ RT-PCR โดยใช้ primer coat protein RNA ของ CyMV และ ORSV ; lane 1-3 : ตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นโรค, C : positive control (323 bp), M : molecular marker (100 bp DNA ladder)

4.4 ผลการทดลองที่ 4 การทดสอบชนิดพืชอาศัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ

ORSV

จากการปลูกเชื้อ ORSV ในพืชอาศัยที่เป็น local lesion host คือ บานไม่รู้โรย, ถั่วเขียว และ *C. amaranticolor* และพืชอาศัยที่เป็น systemic host คือ ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun, งา และ มะเขือเทศ พบว่า ในพืชที่เป็น local lesion host พืชที่มีการติดเชื้อ ORSV ได้ดี คือ บานไม่รู้โรย และ *C. amaranticolor* โดยสังเกตจากลักษณะอาการและจำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นใน พืช ซึ่งจะเริ่มจากสังเกตเห็นจุดแผลได้ในวันที่ 5 หลังจากมีการปลูกเชื้อ เมื่อปลูกเชื้อได้ 7 วัน มีการแสดงอาการของจุดแผลอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.4.1 และ 4.4.2) เช่นเดียวกับที่ได้มีการรายงานไว้ (สุรภี กิริติยะอังกูร, 2536) และเมื่อนำพืชมาตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่า บานไม่รู้โรย และ *C. amaranticolor* ที่ได้รับการปลูกเชื้อมีสีเหลืองเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจง ระหว่าง antigen กับ antibody ของ ORSV และเมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ค่าดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อมีค่ามากกว่าตัวอย่างที่เป็น negative control และมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เป็น positive control ในบางตัวอย่าง ส่วนในถั่วเขียวไม่แสดงอาการของเชื้อ ORSV และไม่มีสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากผลของการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA (ตารางที่ 4.4.1) แสดงว่าบานไม่รู้โรย และ *C. amaranticolor* มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็น พืชทดสอบ แต่ในการปลูกบานไม่รู้โรย และ *C. amaranticolor* เพื่อนำไปทดสอบนั้น บานไม่รู้โรย ปลูกได้ง่ายและมีการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่า *C. amaranticolor* ดังนั้นบานไม่รู้โรยจึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นพืชในการทดสอบมากกว่า *C. amaranticolor* แต่ถั่วเขียวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น พืชทดสอบ เนื่องจากไม่มีการแสดงออกของอาการ และตรวจไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อด้วยวิธี ELISA

ในพืชที่เป็น systemic host คือ ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun, งา และ มะเขือเทศ หลังจากปลูก เชื้อได้ 14 วัน พบว่า พืชจะแสดงอาการแคะแกระน ใบซีดเหลือง โดยจะสังเกตเห็นอาการได้ชัดเจน ในยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun และมะเขือเทศ (ภาพที่ 4.4.3 และ ภาพที่ 4.4.4) ส่วนการแสดง ลักษณะอาการในงาสังเกตได้ยาก หลังจากนำมาตรวจสอบด้วยวิธี ELISA แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยในยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun และมะเขือเทศ ทำการเปรียบเทียบการติดเชื้อ ในใบที่ได้ทำการปลูกเชื้อ และใบยอดที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ จากผลความเข้มของสีที่วัดได้ พบว่า ในใบที่ทำการปลูกเชื้อมีค่าดูดกลืนแสงมากกว่าในใบที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ และค่าดูดกลืนแสง ของใบยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun ที่ได้รับการปลูกเชื้อมีค่ามากกว่า negative control เกิน 2 เท่า แต่ มีค่าน้อยกว่า positive control ก่อนข้างมากและในมะเขือเทศได้ผลการทดลองเหมือนกับในยาสูบ

ใบใหญ่ พันธุ์ Samsun (ตารางที่ 4.4.2) ส่วนในงาเกิดสีของปฏิกิริยาที่เป็น non-specific เกิดขึ้นเนื่องจากมีสีเหลืองเกิดขึ้นในทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ ซึ่งรวมทั้งตัวอย่างที่เป็น negative control จากค่าคุณคลื่นแสงที่ได้แสดงว่ายาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun และมะเขือเทศ ซึ่งเป็น systemic host มีข้อจำกัดในการเพิ่มปริมาณของเชื้อ ORSV ทำให้แพร่กระจายในพืชได้ในปริมาณน้อย ส่วนในงานนั้นไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบ หรือเพิ่มปริมาณของเชื้อ ORSV ซึ่งขัดแย้งกับรายงานว่ามีการใช้ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun เพื่อเป็นพืชในการเพิ่มปริมาณของเชื้อ ORSV (Paul, 1975)

ในยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun ที่แสดงอาการแคระแกร็น ได้นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) พบอนุภาคของ ORSV เพียงเล็กน้อย ซึ่งมีอนุภาคเป็นท่อนตรงขนาดประมาณ 300 x 18 นาโนเมตร และมีอนุภาคของ CyMV รวมอยู่ด้วยในปริมาณที่มากกว่า โดยอนุภาคเป็นท่อนคดประมาณ 480 x 13 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.4.5) ซึ่งตรงกับที่เคยมีรายงานการศึกษาไว้แล้ว (Paul, 1975 ; Francki, 1970) แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของ CyMV ในน้ำคั้นของตัวอย่างที่นำมาทำการปลูกเชื้อ ผลการทดลองนี้ยืนยันให้เห็นถึงความไม่เหมาะสมที่จะใช้ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun เป็นพืชเพิ่มปริมาณ ORSV เนื่องจากเป็นพืชที่ CyMV สามารถเข้าทำลายได้ ทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อน ดังนั้นหากต้องการเพิ่มปริมาณเฉพาะ ORSV ควรพิจารณาเลือกใช้บ้านไม่รู้โรย เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว

ตารางที่ 4.4.1 เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรในตัวอย่างบานไม่รู้โรย,
C. amaranticolor และถั่วเขียว หลังจากปลูกเชื้อ ORSV ได้ 7 วัน
เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

ชนิดพืช	จำนวนซ้ำ					เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	
บานไม่รู้โรย	0.285	0.508	0.400	0.377	0.373	0.385 ± 0.080
<i>C. amaranticolor</i>	0.104	0.210	0.299	0.224	0.180	0.223 ± 0.071
ถั่วเขียว	0.069	0.068	0.071	0.070	0.061	0.068 ± 0.004
หมายเหตุ	ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของ negative control เท่ากับ 0.058 และ positive control เท่ากับ 0.613					

ตารางที่ 4.4.2 เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรในตัวอย่างยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun
และมะเขือเทศ หลังจากปลูกเชื้อ ORSV ได้ 14 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

ชนิดพืช	จำนวนซ้ำ					เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	
ยาสูบใบใหญ่ (ใบที่ปลูกเชื้อ)	0.114	0.120	0.145	0.108	0.112	0.120 ± 0.015
ยาสูบใบใหญ่ (ใบยอด)	0.091	0.081	0.091	0.087	0.097	0.089 ± 0.006
มะเขือเทศ (ใบที่ปลูกเชื้อ)	0.108	0.102	0.114	0.106	0.092	0.103 ± 0.026
มะเขือเทศ (ใบยอด)	0.091	0.078	0.086	0.082	0.071	0.080 ± 0.008
หมายเหตุ	ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของ negative control เท่ากับ 0.042 และ positive control เท่ากับ 0.543					



ภาพที่ 4.4.1 แสดงลักษณะจุดแผลบนบานไม่รู้โรย หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 7 วัน



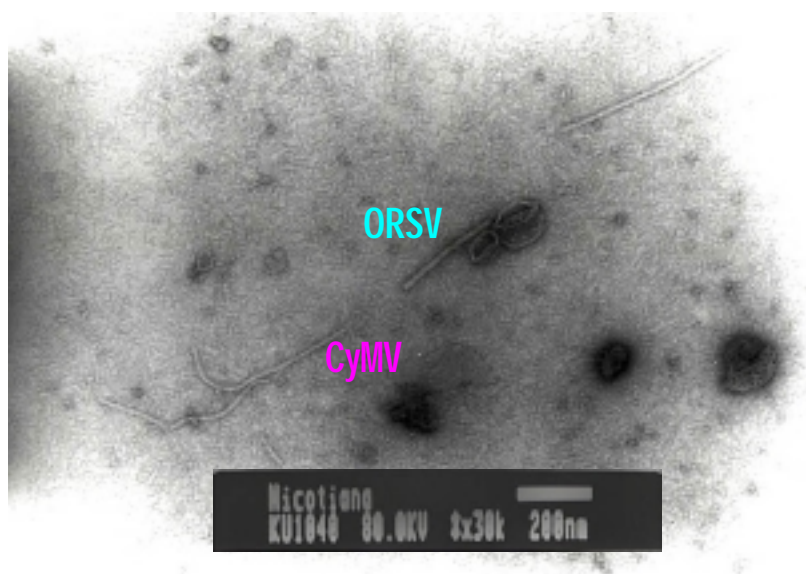
ภาพที่ 4.4.2 แสดงลักษณะจุดแผลบน *C. amaniicola* หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 7 วัน



ภาพที่ 4.4.3 แสดงลักษณะอาการของยาสูบใบใหญ่ หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 14 วัน



ภาพที่ 4.4.4 แสดงลักษณะอาการบนใบมะเขือเทศ หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ ORSV 14 วัน



ภาพที่ 4.4.5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของอนุภาค ORSV (ลักษณะเป็นท่อนตรง) และ CyMV (ลักษณะเป็นท่อนคดงอ) ในยาสูบใบใหญ่ หลังจากได้รับปลูกเชื้อ 14 วัน ย้อมสี uranyl acetate

4.5 ผลการทดลองที่ 5 การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

เมื่อทำการปลูกเชื้อลงบนบานไม่รู้โรยเป็นเวลา 7 วัน พืชจะแสดงอาการแผลจุดที่ใบอย่างชัดเจน จากการนำใบพืชที่ติดเชื้อ จำนวน 40 กรัม มาทำการแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ พบว่าในขั้นตอนสุดท้ายได้ตะกอนไวรัส มีลักษณะเป็นวุ้นใสสีเขียวอ่อน และเมื่อนำไวรัสที่แยกได้มาเจือจาง 100 เท่า แล้วทำการปลูกเชื้อลงบน *C. amaranticolor* พบว่าหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน พืชแสดงอาการจุดแผลอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.5) ซึ่งเมื่อนำมาทำการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่ามีสีเหลืองของปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.684 ขณะที่ค่า negative control เท่ากับ 0.045 และเมื่อนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ได้ค่าเท่ากับ 0.083 ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัสที่ได้ ซึ่งคำนวณจากค่า extinction coefficient ของเชื้อ ORSV เท่ากับ 3.0 (Paul, 1975) พบว่า ได้ ORSV บริสุทธิ์ปริมาณ 13.5 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมของใบบานไม่รู้โรย ส่วนในยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun จำนวน 400 กรัม เมื่อนำมาแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ และตรวจสอบตะกอนที่ได้ด้วยวิธี ELISA ไม่พบสีของปฏิกิริยาเกิดขึ้น จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าบานไม่รู้โรยเป็นพืชที่เหมาะสมมากกว่ายาสูบใบใหญ่ในการนำมาแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ของ ORSV โดยคู่ได้จากปริมาณของบานไม่รู้โรยที่นำมาแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์เพียง 40 กรัม สามารถแยกไวรัสได้ถึง 13.5 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมของใบบานไม่รู้โรย ในขณะที่ปริมาณยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun จำนวน 400 กรัม ซึ่งมากกว่าถึง 100 เท่า ไม่สามารถแยกไวรัสเลย ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเตรียมไวรัส ORSV บริสุทธิ์จากบานไม่รู้โรย แต่มีรายงานการเตรียมไวรัส ORSV บริสุทธิ์จากยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ Samsun โดยได้ปริมาณ ORSV บริสุทธิ์เท่ากับ 1 กรัม ต่อ 1 กิโลกรัมของใบยาสูบ (Paul, 1975) ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองที่ได้ เหตุผลที่เป็นเช่นนั้นอาจเป็นเพราะยาสูบที่ใช้อาจจะมีความแตกต่างจากที่ Paul (1975) ใช้ในการทดลอง ทั้ง ๆ ที่เป็นพันธุ์ Samsun เหมือนกันหรืออาจจะเป็นเพราะ ORSV ที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะจุดแผลบน *C. annuifolus* หลังจากได้รับการปลูก
เชื้อด้วยไวรัส ORSVบริสุทธิ์ 7 วัน

4.6 ผลการทดลองที่ 6 การทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin (infection inhibition)

จากการทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin ในบานไม่รู้โรย โดยใช้ความเข้มข้นของ melittin 5 ระดับ คือ 0, 5, 10, 20 และ 50 ไมโครโมล หลังจากทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แล้วนับจำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้น พบว่า จำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นโดยเฉลี่ยมีจำนวนใกล้เคียงกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของ melittin แต่ละระดับ คือ 7.3, 7.1, 7.0, 7.3 และ 7.2 แผลต่อใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6.1) และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.6.2) แสดงว่า melittin ไม่มีผลในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ ORSV

จากรายงานการศึกษาระดับความเหมือนของการเรียงลำดับกรดอะมิโนองค์ประกอบของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเปรียบเทียบระหว่าง ORSV และ TMV พบว่ามีความเหมือนกันเพียง 68.15% (นัญวรรณ รุ่งโรจน์, 2538) นอกจากนี้ melittin สามารถลดการติดเชื้อของ TMV ได้เพียง 10% เท่านั้น (Marcos *et al.*, 1995) จึงอาจจะเป็นสาเหตุให้ melittin ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ ORSV ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาถึง antiviral activity ของ subK7I (analog ของ melittin) ซึ่งขึ้นอยู่กับความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของ TMV-CP กับ subK7I โดยการใช้ไวรัส 4 ชนิดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่คล้ายกัน (CP) พบว่า antiviral activity ของ subK7I จะลดลงเมื่อลำดับกรดอะมิโนต่างจาก TMV-CP มากขึ้น (Marcos *et al.*, 1995) จากการเปรียบเทียบ CP ของ TMV และ ORSV พบว่ามีความแตกต่างกันที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 74 และ 75 (ภาพที่ 4.6) ซึ่งเป็น residue ที่ทำให้เกิดความคงตัวของอนุภาคโดยการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่าง protein subunit (intersubunit CP hydrophobic contacts) การเรียงลำดับของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ใน CP ของ TMV จะเหมือนกันกับของ melittin ทำให้เกิดการขัดขวางการเกาะตัวระหว่างกันของ TMV-CP ของเชื้อในช่วงการเข้าทำลายพืช ถ้ามี melittin ปนอยู่ในเซลล์พืช ซึ่งการที่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวใน ORSV ต่างจากของ TMV และ melittin ทำให้ melittin ไม่สามารถแสดงบทบาทการยับยั้งการเพิ่มปริมาณของ ORSV ได้

ORSV CP 71- RYDP I L D P L I T F L M G T F D T -- R N R I I -94

TMV CP 71- RYNA V L D P L V T A L L G A F D T -- R N R I I -94

Melittin G I G A V L K V L T T G L P A L I S W - - R K R Q Q

ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน coat protein ของเชื้อ ORSV และ TMV เปรียบเทียบกับสายเปปไทด์ melittin (ที่มา : Marcos *et al.*, 1995 ; นัญวรรณ รุ่งโรจน์, 2538)

อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้จำนวนซ้ำเพียง 10 ซ้ำเท่านั้น จำนวนซ้ำดังกล่าวอาจจะไม่เพียงพอในการทดสอบการยับยั้ง เมื่อคำนึงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งของ melittin ที่มีต่อ TMV ซึ่งมีเพียง 10% ดังนั้นในการทดสอบการยับยั้งของ melittin ควรจะเพิ่มจำนวนซ้ำในการทดสอบการยับยั้งให้มากขึ้น นอกจากนี้ควรมีการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของ melittin และ ORSV ต่าง ๆ กันหลายความเข้มข้น เพื่อที่จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ melittin และ ORSV ที่จะทำให้เกิดผลในการยับยั้งได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.6.1 แสดงจำนวนจุดแผลบนบานไม่รู้โรยที่เกิดจากการปลูกเชื้อ ORSV และ ORSV ร่วมกับ melittin ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ melittin (μM)	จำนวนซ้ำ										เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	7.0	8.0	9.0	6.0	7.0	5.0	9.0	8.0	8.0	6.0	7.3
5	6.0	7.0	8.0	7.0	9.0	7.0	8.0	7.0	6.0	6.0	7.1
10	8.0	6.0	7.0	8.0	8.0	5.0	7.0	9.0	7.0	5.0	7.0
20	5.0	8.0	7.0	8.0	8.0	5.0	7.0	9.0	7.0	5.0	7.3
50	6.0	5.0	6.0	9.0	8.0	9.0	8.0	7.0	9.0	5.0	7.2
F-test											ns
C.V.(%)											18.88

ตารางที่ 4.6.2 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.68	0.17	0.07ns
Error	45	82.5	1.84	
Total	49	83.18		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 4.6.1 แสดงจำนวนจุดแผลบนบานไม้รู้โรยที่เกิดจากการปลูกเชื้อ ORSV และ ORSV ร่วมกับ melittin ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ melittin (μM)	จำนวนซ้ำ										เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	7.0	8.0	9.0	6.0	7.0	5.0	9.0	8.0	8.0	6.0	7.3
5	6.0	7.0	8.0	7.0	9.0	7.0	8.0	7.0	6.0	6.0	7.1
10	8.0	6.0	7.0	8.0	8.0	5.0	7.0	9.0	7.0	5.0	7.0
20	5.0	8.0	7.0	8.0	8.0	5.0	7.0	9.0	7.0	5.0	7.3
50	6.0	5.0	6.0	9.0	8.0	9.0	8.0	7.0	9.0	5.0	7.2
F-test											ns
C.V.(%)											18.88

ตารางที่ 4.6.2 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.68	0.17	0.07ns
Error	45	82.5	1.84	
Total	49	83.18		

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการตรวจสอบไวรัสในกล้วยไม้จากแหล่งปลูก พบว่า สาเหตุหลักของโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัส เกิดจากการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อ CyMV และ ORSV และมีจำนวนน้อยที่มีการเข้าทำลายของเชื้อ ORSV

2. จากผลการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค immunodetection และการตรวจสอบเชื้อ CyMV และ ORSV ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA เป็นวิธีตรวจสอบที่มีความแม่นยำในระดับหนึ่ง ขั้นตอนในการตรวจสอบไม่ยุ่งยาก และวัสดุอุปกรณ์รวมถึงสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบราคาไม่แพงมาก ในกรณีที่มีปริมาณตัวอย่างที่เป็นโรคมักพอ การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการตรวจสอบที่มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพดี ส่วนเทคนิค RT-PCR เป็นวิธีที่ความแม่นยำมากที่สุด และใช้ปริมาณตัวอย่างในการตรวจสอบน้อย แต่ขั้นตอนในการตรวจสอบมาก และทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือทางชีวโมเลกุลพร้อม

3. จากผลการทดสอบชนิดพืชอาศัยที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ ORSV พบว่า บานไม่รู้โรย และ *C. amaranticolor* มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็น local lesion host เพื่อตรวจสอบเชื้อ ORSV ส่วนยาสูบใบใหญ่มีข้อจำกัดในการใช้เป็น systemic host

4. บานไม่รู้โรยสามารถใช้เป็นพืชเพื่อเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ได้ ซึ่งได้ปริมาณ ORSV บริสุทธิ์ค่อนข้างมาก ในขณะที่ยาสูบใบใหญ่ไม่สามารถเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ได้

5. จากผลการทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ด้วย melittin ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า มีจำนวนจุดแผลที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกันในทุกระดับความเข้มข้น และไม่ต่างจากจำนวนแผลที่ได้จากการปลูกเฉพาะเชื้อ ORSV โดยไม่ผสม melittin แสดงว่า melittin ไม่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ORSV ในบานไม่รู้โรยได้ ในการทดลองครั้งนี้

รายการอ้างอิง

- กลอยใจ สำเร็จพาณิชย์. (2534). ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) และการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร. (2534). การผลิต ELISA kit เพื่อใช้ในการตรวจสอบไวรัสมันฝรั่ง. ใน รายงาน การสัมมนาทางวิชาการ ความก้าวหน้าเทคโนโลยีชีวภาพ การถกเถียง และ สิ่งแวดล้อม (หน้า 290-297). กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.
- กุลฉวี ลีลพนัง และธีระ สูตะบุตร. (2520). การศึกษาขั้นต้นในการให้ความร้อนแห้งในการกำจัด *Cymbidium mosaic virus* ในหวายปอมปาดัวร์. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 10: 301-303.
- ครรชิต ธรรมศิริ. (2541). เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชซิง. กรุงเทพฯ. 230 หน้า
- จารุวรรณ จาติเสถียร, สุรภี กิริติยะอังกูร และศิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์. (2540). การกำจัดเชื้อไวรัสในกล้วยไม้สกุลออนซีเดียมโดยใช้ความร้อนและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตพันธุ์ปลอดโรค. ว.วิชาการเกษตร 5: 136-144.
- โชคพิสิษฐ์ เทพสิทธิ์า. (2528). การศึกษาและควบคุมเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ในหวายมาดามปอมปาดัวร์ โดยใช้ความร้อนและสารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนาคร จารุพัฒน์. (2526). บทปฏิบัติการวิสาวิทยาเบื้องต้นของพืช. ภาควิชาโรคพืช : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 206 หน้า.
- นงลักษณ์ ศรีนทุ และเอ็ม เอฟ คลาด. (2536). การวินิจฉัยความแตกต่างระหว่างเชื้อมายโคพลาสมาของโรคใบขาวอ้อยและหญ้าแพรงด้วยวิธี ELISA และ SDS-PAGE. ว.วิชาการเกษตร 11: 162-168.
- ณัฐวรรณ รุ่งโรจน์. (2538). การโคลนยีน การศึกษาการเรียงลำดับเบส และการตรวจสอบยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค *Cymbidium mosaic virus* และ *Odontoglossum ringspot virus*. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราณี สมุทสินธุ์ และธีระ สูตะบุตร. (2514). การทดสอบเนื้อเยื่อสกุลหวายที่เป็นโรคไวรัสในระยะเริ่มแรก. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 4: 297-300.
- พัฒนา ศรีฟ้า และ ณัฐวรรณ รุ่งโรจน์. (2537). การใช้ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Method เพื่อการตรวจสอบและโคลนยีนไวรัสกล้วยไม้. ใน การประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (หน้า 29). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ไพบุลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. (2521). **ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มเล่น**. กรุงเทพฯ : อักษรการพิมพ์. 432 หน้า.
- วัชรินทร์ ชูศิลป์. (2525). การเปรียบเทียบประสิทธิภาพทางเซรุ่มวิทยาในการตรวจสอบ Cymbidium mosaic virus และ Tobacco mosaic virus-orchid strain ของกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาวิตร โพธิ์แก้ว และธีระ สุตะบุตร. (2517). คุณสมบัติทางพันธุกรรมและกายภาพของ Tobacco mosaic virus-orchid strain ในประเทศไทย. **ว. เกษตรศาสตร์** 8: 28-32.
- สุมิตรา กันตรง. (2540). **คู่มือปฏิบัติการวิชาเทคโนโลยีศัตรูพืช II**. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 23 หน้า.
- สุรภี กิริติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. (2532). การตรวจสอบ Cymbidium mosaic virus ด้วยวิธี Dot-ELISA และ DAS-ELISA. **ว.วิชาการเกษตร** 7: 38-43.
- สุรภี กิริติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. (2534). เครื่องมือสนามสำหรับตรวจไวรัสกล้วยไม้. **กสิกร** 64: 367-371.
- สุรภี กิริติยะอังกูร. (2536). Cymbidium mosaic virus และ Odontoglossum ringspot virus ของกล้วยไม้. ใน **เอกสารเผยแพร่วิชาการ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ประจำปี 2536** (หน้า 88-106). กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- สุรภี กิริติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร และ ไมตรี พรหมมินทร์. (2540). การใช้ cocktail primers ที่เหมาะสมในการตรวจไวรัสบนกล้วยไม้ด้วยวิธี multiplex RT-PCR. **วารสารโรคพืช** 12 : 66-77.
- โสภณ วงศ์แก้ว. (2536). **โรคไวรัสของถั่วลิสงในประเทศไทย**. กลุ่มพืชน้ำมัน. กองส่งเสริมพืชไร่. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 10-11.
- Anonymous. (1986). Exports Classified by Commodity. Department of Business Economics.
- Chia, T.F., Y.S. Chan and N.H. Chua. (1992). Characterization of cymbidium mosaic virus coat protein gene and its expression in transgenic tobacco plants. **Plant Mol. Biol.** 18 : 1091-1099.
- Fonseca, M. E. N., L. S. Boiteux, A. C. de Avila, M. I. Lima and E. W. Kitajima. (1995). Detection of tomato spotted wilt tospovirus in lentil. **Plant Dis.** 79: 320.
- Gooding, G. V., Jr. and T. T. Helbert. (1967). A simple technique for Purification of tobacco mosaic virus in large quantities. **Phytopathology.** 57 : 1285.
- Helmet, B., P. Cribb and E. Launert. (1992). **The Manual of Cultivated Orchid species**. 3rd edition. Amer Orchid Soc. Florida: West Palm Beach.

- Hu, J. S., S. Ferreira, M. Wang and M. Q. Xu. (1993). Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted with virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. **Plant Dis.** 77 : 464-468.
- Intasotti, S. (1992). Virus detection and ultrastructural study on meristem of *Oncidium* doubly infected with cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses. Ph. D. Thesis. Kasetsart University.
- Isomerra, Y., Y. Matsumoto, A. Murayama, M. Chatani, N. Inouye and M. Ikegami. (1991). Molecular cloning sequencing and expression in *Escherichia coli* of the odontoglossum ringspot virus coat protein gene. **J.Gen. Virol.** 72 : 2247-2249.
- Jensen, D.D. (1951). Mosaic or black streak disease of *Cymbidium* orchids. **Phytopathology** 41 : 648-653.
- Jensen, D.D. and A.H. Gold. (1951). A virus ringspot of odontoglossum, transmission and electron microscopy. **Phytopathology.** 41: 648-653.
- Kruse, M., T. Koenig, A. Hoffmann, A. Kaufmann., U. Commandeur, A. G. Solovyev, I. Savenkov and W. Bruggermeister. (1994). Restriction fragment length polymorphism of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. **J. Gen. Virol.** 75: 1835-1842.
- Kuehnle, A. R. and N. sugii. (1992). Transformation of *Dendrodium* orchid using particle bombardment of protocorms. **Plant Cell Rep.** 11: 484-488.
- Lawson, R. H. (1990). Orchid viruses and their control. In **Handbook on Orchid Pests and Diseases** (pp. 68-98). Amer. Orchid Soc. Florida: West Palm Beach.
- Lawson, R.H. and M. Brannigan, (1986). Virus disease of orchids . In **Handbook on Orchid Pests and Disease** (pp. 2-49). Amer. Orchid Soc. Florida: West Palm Beach.
- Marcos. J. F., R. A. Houghten, S. E. Blondelle and E. P. Paya. (1995). Inhibit of a plant virus infection by analogs of melitin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92 : 12466-12469.
- Matthews, C. L. (1992). **Fundamentals of Plant Virology.** Florida: Academic Press.
- Morel, G. M. (1960). Producing virus free cymbidiums. **Amer. Orchid Soc. Bull. July.** 29: 495-497.

- Paul, H. L. (1975). *Odontoglossum ringspot virus* No. 155. Description of Plant viruses. **Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol.**, Kew, survey, England.
- Rowhani, A., C. Chay, D. A. Golino and B. W. Falk. (1993). Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. **Phytopathology** 83 :749-753.
- Ryu, K. H., W. M. Park, S. Y. Chung and K. E. Yoon. (1995). Occurance of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Korea. **Plant. Dis.** 79: 321.
- Takahashi, T., E. R. Tiongeo, P. Q. Cabauatan, H. Koganezawa, H. Hibino and T. Omura. (1993). Detection of rice tungro bacilliform virus by polymerase chain reaction for assessing mild infection of plants and viruliferous vector leafhoppers. **Phytopathology** 83: 655-659.
- Van Den Heuvel, J. F. J. M. and D. Peters. (1989). Improved detection of potato leafroll virus in plant material and in aphids. **Phytopathology** 79: 963-967.
- Verma, H.N., Versha and V.K. Baranwal. 1995. Endogenous virus inhibitors from plants, their physical and biological properties. In **Antiviral Protein in Higher Plants**. (pp. 1-21). CRC Press. London.
- Wachinger, M., R. Samtleben, C. Gerhauser, H. Wagner and V. Erfle. (1993). Bryodin, a single-chain ribosome-inactivating protein, selectively inhibits the growth of HIV-1-infected cells and reduces HIV-1 production. **Res. Exp. Med.** 193 : 1-7.
- Wachinger, M., A. Kleinsehmidt, D. Winder, N. von Pechmann, A. Ludvisen, M. Neumann, R. holle, B. Salmons, V. Erfle and R. Brack-Wernwe. (1998). Antimicrobial peptides melittin and cercopin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. **J. Gen. Virol.** 79 : 731-740.
- Zettler, F. W., N. J. Ko, G. C. Wister, M. S. Elliott and S. M. Wong. (1990). Viruses of orchids and their control. **Plant Dis.** 74: 621-626.

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี ELISA

1.1 0.02 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaN ₃	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 7.4		

1.2 Phosphate buffer saline-Tween (PBS-T)

0.02 M PBS, pH 7.4	1	ลิตร
tween-20	0.5	มิลลิลิตร

1.3 0.05 M Carbonate coating buffer, pH 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59	กรัม
NaHCO ₃	2.92	กรัม
NaN ₃	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 9.6		

1.4 Blocking Solution

0.05 M Carbonate coating buffer, pH 9.6	1	ลิตร
skim milk	1	กรัม

1.5 Conjugate buffer

Polyvinyl pyrrolidone 40T (PVP)	2	กรัม
Ovalbumin (egg albumin)	2	กรัม
PBS-T	1	ลิตร

1.6 substrate solution

Diethanolamine	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

1.7 Substrate

p-nitrophenyl phosphate	1	มิลลิกรัม
Substrate buffer	1	มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี SDS-PAGE

2.1 Polyacrylamide Solution 30%

Acrylamide	29.2	กรัม
Bis-acrylamide	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

กรองผ่านแผ่นกรอง แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา (ไม่ให้ถูกแสง) ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังเตรียม

2.2 Stacking gel buffer

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

2.3 Separation gel buffer

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

2.4 Sample buffer

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.2	มิลลิลิตร
10% (w/v) SDS	2.0	มิลลิลิตร
Glycerol	1.0	มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol blue (BPB)	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร

2.5 SDS reducing buffer

β -mercaptoethanol	0.5	มิลลิลิตร
Sample buffer	9.5	มิลลิลิตร
เตรียมก่อนใช้		

2.6 Electrode buffer (Running buffer)

Tris-base	3	กรัม
Glycine	14	กรัม
10% SDS	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2.7 Staining Solution

Comassie brillant blue R-250	1	กรัม
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
Methanol	400	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

2.8 Destaining Solution

Methanol	400	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

2.9 12% Separation gel

น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
10% SDS	0.10	มิลลิลิตร
Polyacrylamide solution	4.00	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (APS)	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

2.10 4% Stacking gel

น้ำกลั่น	6.10	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.50	มิลลิลิตร
10% SDS	0.10	มิลลิลิตร
Polyacrylamide solution	1.30	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (APS)	50	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

3. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี Western blot analysis**3.1 Transfer buffer, pH 8.3**

Tris-base	3.03	กรัม
Glycine	14.41	กรัม
Methanol	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

3.2 Tris Buffer Saline (TBS), pH 7.5

0.05 M Tris-base	6.06	กรัม
0.15 M NaCl	8.77	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

3.3 Washing Solution

TBS	1	ลิตร
Tween-20	5	มิลลิลิตร

3.4 Blocking Solution

TBS	100	มิลลิลิตร
Skim milk	5	มิลลิกรัม

4. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ใน agarose gel electrophoresis**4.1 Tris-acetate buffer (TAE buffer), pH 8.5 (50X stock solution)**

Tris-base	242.00	กรัม
Acetic acid	57.10	มิลลิลิตร
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	37.20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

4.2 Ethidium bromide (1000X stock solution)

Ethidium bromide	50	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4.3 Loading buffer (10X stock solution)

20% Ficoll 400	
0.1 M Na ₂ EDTA, pH 8.0	
1.0 % SDS	
0.25% Bromphenol blue	

5. การเตรียม Phosphate buffer

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.0

Stock solution A (0.2 M NaH₂PO₄)

NaH ₂ PO ₄	31.20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

Stock solution B (0.2 M Na₂HPO₄)

Na ₂ HPO ₄	28.39	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เติม stock A 39 มิลลิลิตร และ stock B 61 มิลลิลิตร

6. การเตรียม Inoculate buffer

0.05 M Phosphate buffer, pH 7.0

0.2% β-mercaptoethanol

1% celite

7. การสกัด ssRNA ของเชื้อ CyMV และ ORSV จากเนื้อเยื่อของกล้วยไม้

นำตัวอย่างกล้วยไม้มาทำการสกัดแยก ssRNA ของเชื้อทั้งสอง โดยนำใบกล้วยไม้เป็นโรค 50 มิลลิกรัม ใส่ใน microtube ปิดฝาแช่ลงในไนโตรเจนเหลว บดใบพืชละเอียดแล้วเติม TRIzol 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม chloroform 0.1 มิลลิลิตร เขย่า 15 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส คัดน้ำใสสีชมพูข้างบนใส่ใน microtube อันใหม่ เติม isopropyl alcohol 0.25 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอน RNA ด้วย ethanol 70% จำนวน 500 ไมโครลิตร โดย vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างเช่นนี้ 2 ครั้ง ผึ่งตะกอนใน dessicator 15 นาที ละลายตะกอนใน 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝ่าเชื้อ แล้วนำ ssRNA ไปใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

8. ลำดับเบสของ primers CyMV และ ORSV เพื่อใช้สังเคราะห์ cDNA

3' end CyMV-primers ATG CCA GGC TTA GTT CC

5' end CyMV-primers TCA GGG GTG GTG ATA TG

3' end ORSV-primers TGA CCA CTC CTT ACA CG

5' end ORSV-primers GTT CCT ACT YYG ACC AG

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจุฑามาศ เพี้ยชัย เกิดเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2518 ที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2540 ภายหลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีได้ เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2541 สถานที่ติดต่อได้สะดวก 323/165 หมู่ที่ 7 ต. สีคิ้ว อ. สีคิ้ว จ. นครราชสีมา 30140