

ผลของความร้อนในการกำจัดเชื้อไวรัส *Cymbidium mosaic virus* ในระยาะโปรโตคอร์มไลค์บอดีของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ชาวนาน Effect of Heat Treatment on Elimination of *Cymbidium Mosaic Virus* from Protocorm-Like Bodies *Dendrobium Khao Jiranand* 'Khao Sanan'

วงศ์กร เสือสืบพันธ์¹ ดวงพร บุญชัย² เณอมาลัย วงศ์ชาวจันท¹ และ พัชรียา บุญกอแก้ว^{1,*}
Wongsakorn Suasuebphan¹, Duangporn Boonchai², Shermarl Wongchaochant¹
and Patchareeya Boonkorkaew^{1,*}

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

² สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

² Rapee Sagarik Orchid Garden, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง: 12 กรกฎาคม 2566 Received: 12 July 2023

ปรับปรุงแก้ไข: 28 สิงหาคม 2566 Revised: 28 August 2023

รับตีพิมพ์: 5 กันยายน 2566 Accepted: 5 September 2023

* Corresponding author: agrpyb@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์: *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) คือเชื้อไวรัสที่เป็นปัญหาสำคัญในการปลูกและส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายของไทย ต้นที่ติดเชื้อมีการเจริญเติบโตและออกดอกลดลง การใช้ต้นพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัสเพื่อปลูกทดแทนจึงเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ชาวนานด้วยความร้อนบำบัด

วิธีดำเนินการวิจัย: คัดเลือก PLBs ขนาด 5 มิลลิเมตร ที่ได้จากหน่ออ่อนของต้นที่ติดเชื้อไวรัส CymMV ซึ่งเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร Vacin and Went ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลทราย 2 เปอร์เซ็นต์ แผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ 1) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 7 และ 10 วัน และ 2) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 20 และ 30 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านความร้อน (เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส) หลังได้รับความร้อนทั้ง 2 วิธี ย้าย PLBs ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ผลการวิจัย: PLBs ทนต่ออุณหภูมิที่ 37 ± 2 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 7 วัน มีการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนเฉลี่ย 16.40 ชิ้น และน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.00 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) ส่วนความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทนได้นาน 20 นาที มีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน PLBs เฉลี่ย 22.50 ชิ้น ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($P > 0.05$) แต่มีน้ำหนักสดเฉลี่ย (2.23 กรัม) น้อยกว่าชุดควบคุม (4.81 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ทั้ง 2 วิธี ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน PLBs ได้ หลังจากการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR

สรุป: การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน PLBs ได้ ต้องศึกษาเพิ่มเติมหรือใช้ร่วมกับวิธีอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: กล้วยไม้ตัดดอก, ความร้อนบำบัด, ปลอดเชื้อไวรัส, วิธีกำจัดเชื้อไวรัส, สภาพปลอดเชื้อ

ABSTRACT

Background and Objectives: *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) poses a significant threat to *Dendrobium* orchid cultivation and export in Thailand. Virus infection leads to a reduction in plant growth, flower quantity, and the overall quality of *Dendrobium* hybrids. Virus-free plant material is essential for ensuring sustainable production. Therefore, this research aims to investigate the elimination of CymMV from infected protocorm-like bodies (PLBs) of the *Dendrobium* hybrid *in vitro* using heat treatments.

Methodology: This study utilized PLBs measuring 5 mm, induced from CymMV-infected young shoots and cultured on a modified semi-solid Vacin and Went (VW) medium supplemented with 15% coconut water and 2% table sugar. The experiment was designed using a completely randomized approach and comprised two main experiments: 1) the PLBs were treated for 5, 7, and 10 days at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and 2) for 10, 20, and 30 min at 70°C , in comparison to $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Control). Subsequently, the PLBs were transferred to culture in a liquid VW medium for 6 weeks after the treatments.

Main Results: The PLBs showed resistance to the heat treatment at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 7 days. This treatment resulted in a 70% survival PLBs with the number of PLBs at 16.40 and 2.00 g fresh weight, which were not significantly different from the control ($P > 0.05$). The PLBs were able to withstand the heat treatment at 70°C for 20 min, resulting in 100% survival of PLBs and a total of 22.50 PLBs, which did not substantially differ from the control ($P > 0.05$). Although the fresh weight of the treated PLBs was 2.23 g compared to the control's 4.81 g, the difference was significant ($P < 0.01$). After virus detection in PLBs using reverse transcription-PCR amplification (RT-PCR) technique. Both heat treatments failed to remove CymMV from PLBs.

Conclusions: Heat treatment at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 70°C were ineffective in eradicating the CymMV virus in PLBs. To enhance the efficiency of virus elimination, additional improvements are necessary, such as combining heat treatment with antiviral agents, cryotherapy, or electrotherapy.

Keywords: Orchid cut flower, *in vitro* culture, thermotherapy, virus eradication, virus-free

บทนำ

กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม (*Dendrobium* hybrid) เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการส่งออกในรูปแบบไม้ตัดดอกและไม้กระถางไปยังหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากมีความหลากหลายของสี ขนาด และรูปทรงดอก ทำให้เป็นที่ต้องการของตลาด แต่ปัญหาที่สำคัญในการผลิต คือ ต้นพันธุ์กล้วยไม้ติดเชื้อไวรัส *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) โดยเฉพาะแปลงที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีตัดชำจากลำต้นเดิมที่มีอายุมาก (Saepaisal *et al.*, 2018) โดยต้นกล้วยไม้ที่ติดเชื้อไวรัส CymMV มักแสดงอาการใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน หรือด่างเหลือง ฟันใบไม่เรียบ ยอดมีอาการบิดเบี้ยว ส่งผลให้มีอัตราเมแทบอลิซึม และการเจริญเติบโตของต้นลดลง สภาพต้นทรุดโทรมจนต้องเปลี่ยนต้นใหม่ ในระยะเวลาอันสั้นกว่าปกติ ดอกแสดงอาการต่าง ขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ สีของดอกผิดปกติ และมีปริมาณลดลง (Chung *et al.*, 2010; Paradornuwat, 2010; Saepaisal *et al.*, 2022) ซึ่งเป็นปัญหาต่อการส่งออก เนื่องจากยังไม่มีสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดได้

เชื้อไวรัส CymMV จัดอยู่ในสกุล *Potexvirus* มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด (Flexuous rod) อนุภาคไวรัสมีขนาดประมาณ $(18-20) \times (450-550)$ นาโนเมตร ประกอบด้วยสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายบวก (Positive sense genomic RNA) เชื้อไวรัสมีความสามารถอยู่ในน้ำคั้น (Cell sap) ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 32 วัน และคงทนในความร้อนที่อุณหภูมิ 67-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ความเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นที่ทำให้พืชเกิดโรคได้อยู่ระหว่าง 1:10,000 ถึง 1:100,000 (Saepaisal and Kiratiyaangul, 2017; Saepaisal *et al.*, 2022) การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสผ่านทางน้ำคั้นจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นปกติ โดยติดไปกับเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการตัดแต่ง เช่น มีด และกรรไกร เป็นต้น โดยเชื้อไวรัสจะเข้าทาง

บาดแผล จากนั้น เพิ่มปริมาณอนุภาคของเชื้อภายในเซลล์พืช และมีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้น โดยผ่านระบบท่อลำเลียงน้ำและอาหาร แต่ยังไม่มีการรายงานการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดและแมลงพาหะ (Piasai, 2002; Saepaisal *et al.*, 2018) ด้วยเหตุนี้ การใช้ต้นพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ควบคุมการระบาดของโรคได้

การผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดเชื้อไวรัส นิยมใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญที่บริเวณปลายยอด (Shoot apical meristem) เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น (Explant) แต่ปัญหาที่พบ คือ ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญเติบโตได้ช้า มีอัตราการรอดต่ำ การตัดชิ้นส่วนต้องใช้ผู้มีความชำนาญ และมีประสบการณ์จึงจะประสบความสำเร็จได้ อย่างไรก็ตาม Kang *et al.* (2011) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพิษ เป็นเรื่องที่ยากมากในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เนื่องจากพบปัญหาการเจริญเติบโตช้า และเกิดสีน้ำตาลที่ปลายยอดสูง โดยเชื้อไวรัสมีแนวโน้มจะเคลื่อนที่ไปอยู่บริเวณปลายยอด ทำให้เกิดความยากลำบากในการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ Saepaisal *et al.* (2018) ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ตาข้างหรือปลายยอดจากหน่ออ่อนซึ่งต้นแม่พันธุ์ติดเชื้อไวรัส CymMV เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น จากนั้นชักนำให้เกิด protocorm-like bodies (PLBs) และใช้วิธีเพิ่มจำนวน PLBs ในอาหารเหลวอย่างรวดเร็ว สามารถพบต้นที่ปลอดจากเชื้อไวรัสได้ ดังนั้น การใช้ PLBs เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้ประสบความสำเร็จในการผลิตต้นพันธุ์ปลอดไวรัส และลดปัญหาต่าง ๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้

นอกจากนี้ ยังมีวิธีการอื่นที่นิยมนำมาใช้สำหรับผลิตพืชปลอดไวรัสร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย เช่น การใช้สารเคมี (Chemotherapy) การใช้ความเย็นเยือกแข็ง (Cryotherapy) และการใช้ความร้อนบำบัด (Heat treatment หรือ

thermotherapy) ทั้งนี้ มีรายงานความสำเร็จของการใช้ความร้อนบำบัดกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น บีโกเนีย (Verma *et al.*, 2005) แอปเปิ้ล (Hu *et al.*, 2018) แกลดิโอลัส (Kaur *et al.*, 2019) และองุ่น (Hu *et al.*, 2020) โดยนำต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 35–42 องศาเซลเซียส จากนั้น จึงตัดขึ้นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากการได้รับอุณหภูมิที่สูงขึ้นในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม จะมีผลไปยังการสังเคราะห์ mRNA ของเชื้อไวรัส และลดการเคลื่อนที่ของอนุภาคไวรัส ส่งผลให้อนุภาคไวรัสไม่สามารถแพร่กระจายไปยังบริเวณปลายยอดได้ ทำให้สามารถผลิตพืชปลอดไวรัสได้ (Valero *et al.*, 2003) แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ พืชมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งเกิดจากสภาวะเครียดจากอุณหภูมิสูง (Heat stress) เนื่องจากพืชได้รับความร้อนเป็นระยะเวลานาน อาจส่งผลเสียอย่างรุนแรงต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิต (Hu *et al.*, 2015)

ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ความร้อนในการกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ในระยะ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสม เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดเชื้อไวรัส ไปใช้ปลูกทดแทนต้นเดิมที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นการเพิ่มมาตรฐานของผลผลิตกล้วยไม้ในการส่งออก ลดข้อกีดกันทางการค้า และยกระดับคุณภาพของกล้วยไม้ในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

PLBs กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมพันธุ์ขาวสนาน (*Dendrobium* Khao Jiranand 'Khao Sanan') ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างและปลายยอดจากหน่ออ่อนของต้นที่ติดเชื้อไวรัส CymMV โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (1949) (VW) ที่ดัดแปลงโดยการเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

น้ำตาลทราย 2 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่าอัตโนมัติ (Automatic shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอด LEDs สีขาว (400–780 นาโนเมตร) ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยก่อนทำการทดลองสุ่ม PLBs ไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส CymMV ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) จากนั้น คัดเลือกกลุ่ม PLBs ขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร มาปรับสภาพบนอาหารกึ่งแข็ง สูตร VW ดัดแปลง โดยการเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลทราย 2 เปอร์เซ็นต์ และ gellan gum 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปทดลอง

การใช้ความร้อนในการกำจัดเชื้อไวรัส CymMV และการวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นำ PLBs ที่คัดเลือกไว้ปรับความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้ hot air oven (Wisd Digital Incubator WIG-32, Korea) ที่ระยะเวลาต่างกัน 3 ระดับ คือ 5 7 และ 10 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน (เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส) เมื่อครบระยะเวลา นำ PLBs มาปรับสภาพที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น ย้ายลงอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง โดยการเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลทราย 2 เปอร์เซ็นต์ ขวดละ 1 ชิ้น เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตโนมัติ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ได้รับแสงจากหลอด LEDs สีขาว (400–780 นาโนเมตร) ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งออกเป็น 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ขวด เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

นำ PLBs ที่คัดเลือกไว้ไปปรับความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้ hot air oven (Wisd Digital Incubator WIG-32, Korea) ที่ระยะเวลาต่างกัน 3 ระดับ คือ 10 20 และ 30 นาที เมื่อครบระยะเวลา นำ PLBs มาปรับสภาพที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น ย้ายไปเลี้ยงในสูตรอาหาร และสภาพแวดล้อม เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ขวดละ 1 ชิ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน (เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส) วางแผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ แบ่งออกเป็น 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ขวด เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ทำการทดลองระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2565 ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักงานวิจัยพัฒนาอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

หลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ PLBs ทุก 1 สัปดาห์ จนครบ 6 สัปดาห์ โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวน PLBs ที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวน PLBs เริ่มต้น}} \times 100$$

ลักษณะและการเจริญเติบโตของ PLBs

บันทึกลักษณะของ PLBs ที่เกิดขึ้นหลังได้รับความร้อน ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของสี และการตายของเซลล์ โดยถ่ายภาพ จากนั้น เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวครบ 6 สัปดาห์ ติดตามการเจริญเติบโตของ PLBs ได้แก่ จำนวน PLBs ทั้งหมด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ PLBs วัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของ PLBs

โดยใช้กระดาษกราฟ (Graph paper sheet) ขนาดช่อง 2 มิลลิเมตร และไม้บรรทัด แบ่งเป็น 3 ขนาด คือ 1) ขนาด S มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร 2) ขนาด M มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 3–5 มิลลิเมตร และ 3) ขนาด L มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร และน้ำหนักสดของ PLBs โดยการชั่งน้ำหนักสดรวมทั้งหมด

การตรวจสอบเชื้อไวรัส CymMV ด้วยวิธี RT-PCR

เมื่อครบ 6 สัปดาห์ หลังการให้ความร้อน นำ PLBs ไปตรวจสอบเชื้อไวรัส CymMV ด้วยวิธี RT-PCR โดยนำ PLBs ทรีตเมนต์ละ 30 ชิ้น ($n = 30$) มาสกัดอาร์เอ็นเอต้นแบบ (RNA template) ด้วยชุดสกัด FavorPrep™ Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen Biotech, Taiwan) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท จากนั้น ใส่อาร์เอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 ไมโครลิตร และ PCR master mix 18 ไมโครลิตร ที่ได้จากชุด One Step RT-PCR Kit (Biotechrabbit, Germany) ประกอบด้วย One Step Mix (Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), DNA polymerase และ PCR buffer) จำนวน 10 ไมโครลิตร RT-Rl blend 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร ร่วมกับไพรเมอร์ (Primer) CymMV2(F): ATG CCA GGC TTA GTT CC และ CymMV2(R): TCA GGG GTG GTG ATA TG (Kiratiyaangul *et al.*, 1997) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเครื่อง MiniAmp Plus Thermal Cycler จากนั้น นำผลผลิตที่ได้ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณ PCR products ด้วยเทคนิค electrophoresis บน 1.2 เปอร์เซ็นต์ agarose gels โดยใช้ PCR products จำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye จำนวน 2 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวม 7 ไมโครลิตร) ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปสังเกตและถ่ายภาพภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) โดยเปรียบเทียบกับ positive control ที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 339

คู่เบส จากนั้น วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อไวรัส (Elimination percentage) โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อไวรัส} = \frac{\text{จำนวน PLBs ที่ปลอดเชื้อไวรัส}}{\text{จำนวน PLBs ที่รอดชีวิต}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม R Studio

ผลการทดลองและวิจารณ์

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและลักษณะของ PLBs หลังได้รับความร้อน

การทดลองที่ 1 หลังการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 7 และ 10 วัน พบว่า PLBs มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) โดย PLBs ชุดควบคุม (Control) และที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด (100 เปอร์เซ็นต์) ส่วนที่ได้รับความร้อนนาน 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้รับความร้อนนาน 1 วัน หลังจากนั้นลดลงเหลือ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังได้รับความร้อนนาน 1 สัปดาห์ และเมื่อได้รับความร้อนนาน 10 วัน พบว่า PLBs ตายทั้งหมด (0 เปอร์เซ็นต์) (Figure 1A) ทั้งนี้เมื่อสังเกตลักษณะ PLBs หลังได้รับความร้อนนาน 5 วัน พบว่า PLBs เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียว (Figure 2B) และจะคืนสภาพเป็นสีเขียวปกติภายใน 2-3 สัปดาห์ (Figure 2A) ส่วนที่ได้รับความร้อนนาน 7 วัน พบว่า มี PLBs บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียว จะกลับมาเป็นสีเขียวปกติภายใน 2-3 สัปดาห์ แต่บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีขาวยืด และเกิดการตายในที่สุด

(Figure 2C) ในขณะที่เมื่อได้รับความร้อนนาน 10 วัน PLBs มีสีขาวซีด และตายทั้งหมด (Figure 2C)

การทดลองที่ 2 สำหรับ PLBs หลังการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 20 และ 30 นาที พบว่า หลังได้รับความร้อนนาน 10 และ 20 นาที บางส่วนของ PLBs เกิดความเสียหายจากความร้อนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 (Figure 2B) และจะกลับมาเป็นสีเขียวปกติภายใน 2-3 สัปดาห์ (Figure 2A) ซึ่งมีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่เมื่อได้รับความร้อนนาน 30 นาที พบว่า PLBs เปลี่ยนเป็นสีขาวซีด และตายทั้งหมด หลังจากการทดลองเพียง 1 วัน ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมและที่ได้รับความร้อน 10 และ 20 นาที อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (Figure 1B)

จากทั้งสองการทดลองจะเห็นได้ว่า ระยะเวลาที่ได้รับความร้อนส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนาน สอดคล้องกับรายงานของ Thongutai (1996) ที่พบว่า การใช้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กับ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ BOM 17 นาน 7 วัน ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 16.67 เปอร์เซ็นต์ และหากได้รับนาน 14 วัน ทำให้ PLBs ตายทั้งหมด และรายงานในพืชชนิดอื่น ๆ ในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน มีชิ้นส่วนที่รอดชีวิตเฉลี่ย 2.93 ชิ้น ในขณะที่เมื่อได้รับความร้อนนาน 14 วัน จะมีชิ้นส่วนที่รอดชีวิตเฉลี่ย 1.23 ชิ้น (Kazemi *et al.*, 2020) นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีผลให้ PLBs ของกล้วยไม้เกิดความผิดปกติด้วย สอดคล้องกับ Zhao *et al.* (2018) ซึ่งรายงานว่า หลังเลี้ยงยอดของแอปเปิ้ลพันธุ์กาลาในสภาพปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิในเวลากลางวัน 36 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในเวลากลางคืน 32 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ทำให้ใบมีสีค่อนข้างเหลือง (Yellowish) เมื่อเทียบกับชุด

ควบคุม และ Hu *et al.* (2020) รายงานว่า การเลี้ยง ตัณอ่อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน มีผล ทำให้ต้นเกิดอาการใบเหลือง (Yellowing) หรือเกิดสี น้ำตาล (Browning) และใบเหี่ยว (Wizened) หรือใบ ตาย (Necrotic) ทันทีหลังทำการทดลอง ทั้งนี้ น่าจะเกิดจากอุณหภูมิที่สูงเกินกว่าที่เซลล์พืชจะรับได้ ทำให้พืชเกิดความเครียดจากความร้อน (Heat stress)

ส่งผลให้ระบบการทำงานภายในเซลล์ผิดปกติ ผนังเซลล์ ถูกทำลาย และเกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ (Suwanwong, 2020) ซึ่งอาการจะรุนแรงขึ้นตาม อุณหภูมิและระยะเวลาในการรับความร้อนที่เพิ่มขึ้น จนทำให้เซลล์หรือชิ้นส่วนของพืชตายในที่สุด (Wahid *et al.*, 2007)

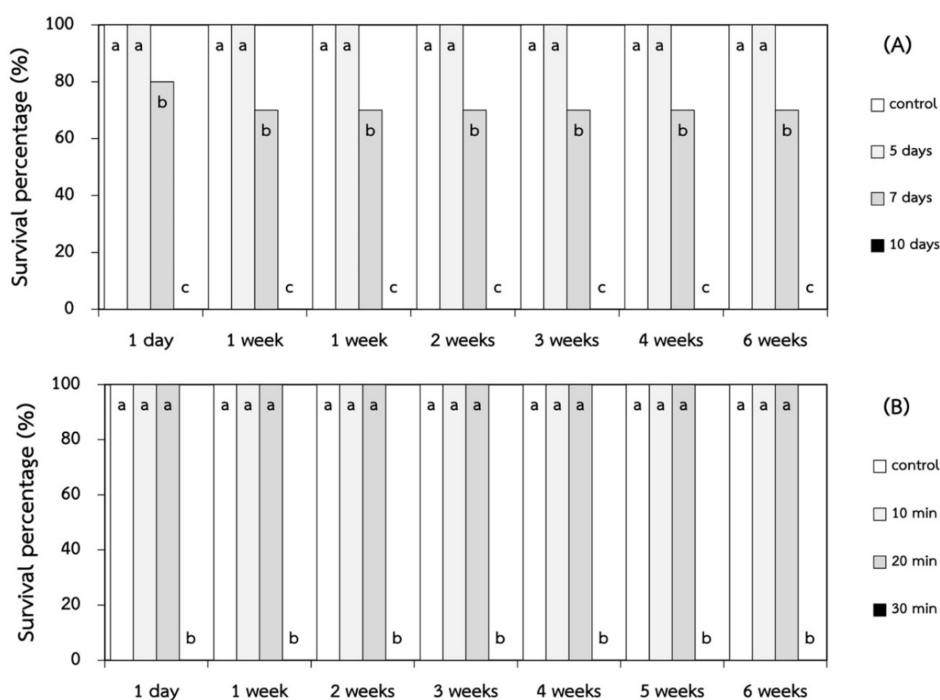


Figure 1 The percentage of protocorm-like bodies that survived each week after being treated at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (A) and 70°C (B). This means that each column followed by different letters is significantly different by Duncan's new multiple range test at $P < 0.01$.



Figure 2 Protocorm-like bodies of *Dendrobium* Khao Jiranand ‘Khao Sanan’ after treats various temperatures and durations: (A) normal PLBs, (B) yellowing, and (C) cell death.

การเจริญเติบโตของ PLBs หลังได้รับความร้อน

การทดลองที่ 1 การเจริญเติบโตของ PLBs หลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 6 สัปดาห์ (Table 1) พบว่า ทุกทรีตเมนต์ PLBs เพิ่มขึ้นได้มากขึ้น ยกเว้นหลังได้รับความร้อนนาน 10 วัน PLBs ตายทั้งหมด (Figure 3A) เมื่อนับจำนวนแยกขนาด และชั่งน้ำหนัก PLBs ซึ่งแสดงใน Table 1 จะเห็นได้ว่า มีจำนวนเฉลี่ยของ PLBs ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) มีค่าอยู่ระหว่าง 16.40–27.90 ชิ้น

ซึ่งเมื่อพิจารณาแยกตามขนาดของ PLBs พบว่า PLBs ขนาด S (น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร) และขนาด M (3–5 มิลลิเมตร) มีจำนวนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่ขนาด L (มากกว่า 5 มิลลิเมตร) มีจำนวนเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) โดยหลังได้รับความร้อนนาน 7 วัน พบว่ามีจำนวนน้อยที่สุดเฉลี่ย 4.40 ± 0.32 ชิ้น และส่งผลให้น้ำหนักสดมีค่าน้อยที่สุดด้วย (2.00 ± 0.18 กรัม) ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม และหลังได้รับความร้อนนาน 5 วัน ($P < 0.01$)

Table 1 The average number, size, and fresh weight of protocorm-like bodies (PLBs) at 6 weeks after thermotherapy ($37 \pm 2^\circ\text{C}$)

Duration (day)	Number of PLBs	Size of PLBs (mm)			Fresh weight (g)
		Size S (< 3)	Size M (3–5)	Size L (>5)	
0 (Control)	27.90 ± 2.52	6.00 ± 1.04	4.60 ± 0.69	17.30 ± 1.49^a	4.81 ± 0.24^a
5	23.40 ± 1.63	5.80 ± 0.55	5.10 ± 0.58	12.20 ± 0.98^a	4.36 ± 0.28^a
7	16.40 ± 1.83	9.60 ± 1.49	2.50 ± 0.23	4.40 ± 0.32^b	2.00 ± 0.18^b
10	nd	nd	nd	nd	nd
P-value	0.24	0.49	0.30	<0.001	0.001
CV (%)	52.05	77.30	66.55	46.56	32.00

This means that each column followed by different letters is significantly different by Duncan’s new multiple rang test. nd = no data, CV = coefficient of variation.

การทดลองที่ 2 สำหรับ PLBs หลังการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 20 และ 30 นาที หลังเลี้ยงในอาหารเหลว 6 สัปดาห์ (Table 2) พบว่า ชุดควบคุม และที่ได้รับความร้อนนาน 10 และ 20 นาที มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ส่วนที่ได้รับความร้อนนาน 30 นาที PLBs ตายทั้งหมด (Figure 3B) ทั้งนี้พบว่า จำนวน PLBs เฉลี่ย ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเฉลี่ย 22.00 ± 2.54 ชิ้น ($P > 0.05$) แต่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด (4.81 ± 0.22 กรัม) รองลงมาคือ เมื่อได้รับความร้อนนาน 10 นาที (3.43

± 0.34 กรัม) ส่วนที่ได้รับความร้อนนาน 20 นาที มีค่าน้อยที่สุด (2.23 ± 0.24 กรัม) ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาจากขนาดของ PLBs จะเห็นได้ว่า PLBs ขนาด S และ L มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อได้รับความร้อนนาน 20 นาที พบ PLBs ขนาด S มีค่าสูงที่สุด (14.50 ± 1.63 ชิ้น) ซึ่งมีจำนวนมากกว่าชุดควบคุมเกือบ 3 เท่า ในขณะที่ชุดควบคุมและที่ได้รับความร้อนนาน 10 นาที มี PLBs ขนาด L สูงที่สุด (13.50 ± 0.89 และ 10.80 ± 1.27 ชิ้น ตามลำดับ) ส่วน PLBs ที่ได้รับความร้อนนาน 20 นาที มีจำนวนน้อยที่สุด (5.80 ± 0.84 ชิ้น)

Table 2 The average number, size, and fresh weight of protocorm-like bodies (PLBs) at 6 weeks after thermotherapy (70°C)

Duration (min)	Number of PLBs	Size of PLBs (mm)			Fresh weight (g)
		Size S (< 3)	Size M (3–5)	Size L (>5)	
0 (Control)	22.30 ± 1.68	4.55 ± 0.62^b	4.20 ± 0.47	13.50 ± 0.89^a	4.81 ± 0.22^a
10	22.70 ± 3.79	5.20 ± 1.05^b	6.70 ± 1.53	10.80 ± 1.27^{ab}	3.43 ± 0.34^{ab}
20	22.50 ± 2.55	14.50 ± 1.63^a	2.20 ± 0.18	5.80 ± 0.84^b	2.23 ± 0.24^b
30	nd	nd	nd	nd	nd
P-value	0.100	0.035	0.340	0.041	0.038
CV (%)	62.40	73.02	106.70	50.75	39.81

This means that each column followed by different letters is significantly different by Duncan's new multiple rang test. nd = no data, CV = coefficient of variation.

จากผลการทดลองการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส PLBs สามารถเจริญเติบโตได้หลังได้รับความร้อนนานที่สุด 7 วัน หากได้รับนาน 10 วัน ทำให้ PLBs ตายทั้งหมด ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Kaur *et al.* (2019) ที่รายงานว่า การกำจัดเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในเมล็ดโกลัส 3 พันธุ์ ได้แก่ Aldebaran, Tiger Flame และ Vink's Glory โดยนำห่วยย่อย (Cormels) ในสภาพปลอดเชื้อไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน ส่งผลทำให้ค่า regeneration efficiency ของทั้ง 3 พันธุ์ มีค่าลดลง แต่ไม่ทำให้พืชตาย ทั้งนี้ น่าจะ

เนื่องมาจากชิ้นส่วนที่นำมาได้รับความร้อนนั้นแตกต่างกัน รวมทั้ง PLBs เป็นกลุ่มเซลล์ที่อ่อนกว่า จึงทนต่อความร้อนได้สั้นกว่า สำหรับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนั้น พบว่า PLBs สามารถเจริญเติบโตได้หลังได้รับความร้อนนานที่สุด 20 นาที โดย PLBs สามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่ส่งผลต่อขนาดของ PLBs โดยเมื่อได้รับความร้อนที่ระยะเวลา นาน จะทำให้ได้ PLBs มีขนาดค่อนข้างเล็ก ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจาก PLBs เป็นกลุ่มเซลล์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ ผนังเซลล์ (Cell wall) และโปรโตพลาสต์ (Protoplast) โดยผนังเซลล์ซึ่งอยู่ชั้นนอกนั้นประกอบ

ด้วยคาร์โบไฮเดรตจำนวนมาก ซึ่งยึดเกาะกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic bond เมื่อได้รับความร้อนจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น ส่งผลทำให้พันธะระหว่างเซลล์เสียหาย ความเสถียรของเยื่อหุ้ม (Membrane) ลดลง และทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ (Denaturation) (Suwanwong, 2020) ส่งผลให้ชิ้นส่วนของ PLBs ไม่เกาะตัวกันเป็นก้อน จึงมีชิ้นส่วนของ PLBs ขนาด S (น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร) มากขึ้น นอกจากนี้ ที่อุณหภูมิสูงยังส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง

(Udomprasert, 2015) สอดคล้องกับการรายงานของ Tan *et al.* (2010) พบว่า การเพิ่มจำนวนยอดของต้นสาธิตลดลงหลังได้รับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และ 42/34 องศาเซลเซียส (กลางวัน/กลางคืน) เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับความร้อน ทั้งนี้ หาก PLBs ได้รับความร้อนเป็นระยะเวลาที่นานเกินไป (อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หรืออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) จะส่งผลเสียอย่างรุนแรงต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของพืช (Hu *et al.*, 2015)

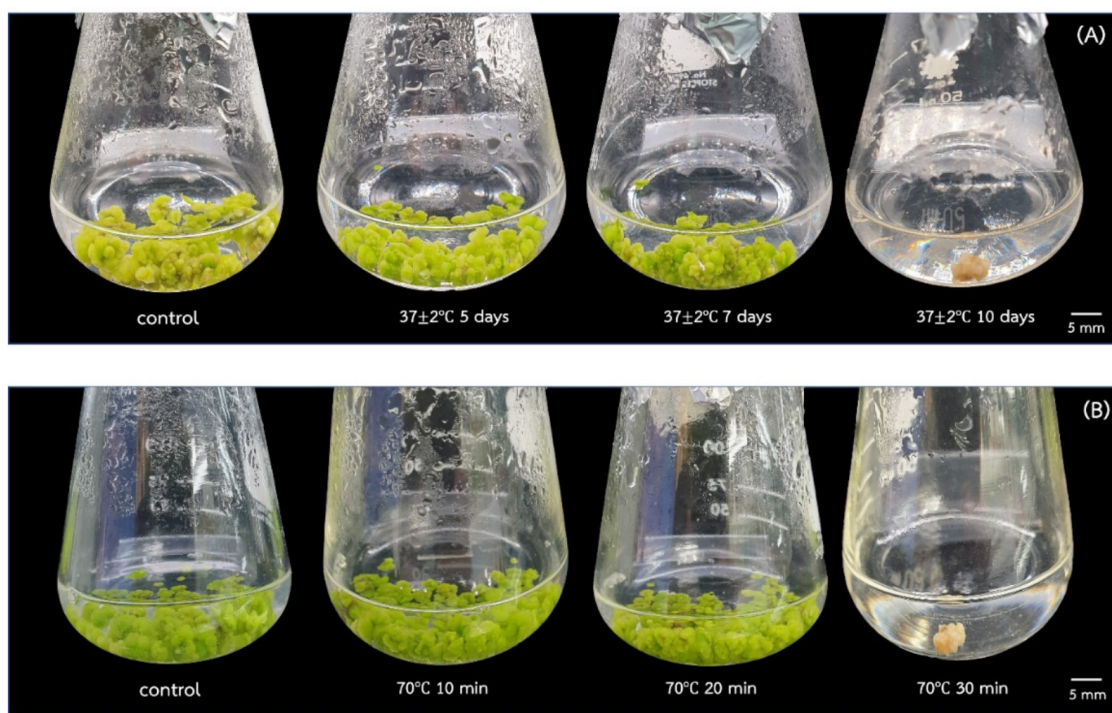


Figure 3 Growth of *in vitro* *Dendrobium* Khao Jiranand 'Khao Sanan' protocorm-like bodies after cultured for 6 weeks: (A) the thermotherapy at 37 ± 2 °C and (B) the thermotherapy at 70 °C.

การตรวจสอบเชื้อไวรัส CymMV

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส CymMV ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ตัวอย่าง PLBs ในทุกทริตเมนต์ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 339 คู่เบส ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัส CymMV (Figure 4) ดังนั้น การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา 5 7 และ 10 วัน และการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 20 และ 30 นาที ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนานได้ โดยพบการติดเชื้อไวรัส CymMV 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกทริตเมนต์

Wang *et al.* (2018) รายงานว่า อุณหภูมิสูงที่เพิ่มสูงขึ้นและได้รับความร้อนในระยะเวลาที่นานขึ้น ส่งผลให้มีโอกาสในการกำจัดไวรัสเพิ่มขึ้น โดยความร้อนจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Viral replication) (Chalak *et al.*, 2015) ทำให้สารพันธุกรรมของไวรัส (RNA) เสื่อมสภาพ และป้องกันการเคลื่อนที่ของไวรัสไปยังเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ (Tan *et al.*, 2010) ส่งผลให้ปริมาณเชื้อไวรัสบริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดลดลง (Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2018) ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ที่ 35–42 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20–60 วัน สำหรับในการทดลองนี้ การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 และ 7 วัน และ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 และ 20 วัน ยังไม่สามารถทำให้ PLBs ปลอดจากเชื้อไวรัส CymMV ได้ อาจเป็นเพราะชิ้นส่วนพืชทดลองเป็นเพียงกลุ่มเซลล์ ที่ประกอบด้วยน้ำ 80–95 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ไม่สามารถทนต่อความร้อนได้นาน ทำให้ระยะเวลาการได้รับความร้อนไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ได้ ซึ่งแตกต่างกับการกำจัดเชื้อไวรัสในพืชชนิดอื่นที่ใช้ต้นอ่อน หรือชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญในสภาพปลอดเชื้อ (Díaz-Barrita *et al.*, 2008) มาทำการบำบัดด้วยความร้อน ซึ่งสามารถทนต่อความร้อนได้นานกว่า ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดไวรัสดีกว่าด้วย ทั้งนี้ ความสำเร็จในการกำจัดเชื้อไวรัสยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ พืชอาศัย (Maliogka *et al.*, 2009; Panattoni *et al.*, 2013; Barba *et al.*, 2015) และ ขนาดชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ ยิ่งชิ้นส่วนพืชมีขนาดเล็ก จะทำให้โอกาสในการปลอดเชื้อไวรัสเพิ่มมากขึ้น (Vivek and Modgil, 2018) นอกจากนี้ การใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ได้ ทำได้เพียงลดปริมาณของเชื้อไวรัสลงในช่วงเวลาหนึ่งหลังได้รับความร้อน อาจจะต้องใช้ร่วมกับการ

กำจัดไวรัสวิธีอื่น ๆ จึงจะเห็นผลมากขึ้น ดังเช่นในการรายงานในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ต้นราสเบอร์รี่ โดยพบว่าการกำจัดเชื้อไวรัส *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) ในชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดด้วยความร้อนบำบัด (กลางวัน 39 องศาเซลเซียส/กลางคืน 24 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน) เพียงอย่างเดียวไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ แต่ถ้าใช้ร่วมกับวิธีการเคมีบำบัด (Chemotherapy) จะทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดไวรัสเพิ่มขึ้น 44.4 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้ร่วมกับการความเย็นเยือกแข็งบำบัด (Cryotherapy) จะทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดไวรัสเพิ่มขึ้น 48.6 เปอร์เซ็นต์ และถ้าใช้ร่วมกันทั้ง 3 วิธี จะทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดไวรัสเพิ่มขึ้นถึง 78.8 เปอร์เซ็นต์ (Mathew *et al.*, 2021) ดังนั้น หากต้องการกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยการใช้ความร้อนจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จนสามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ หรืออาจใช้ร่วมกับการกำจัดเชื้อไวรัสด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น การใช้ร่วมกับสารเคมีในกลุ่มต้านทานเชื้อไวรัส (Anti-viral) การใช้ความเย็นเยือกแข็งที่ -196 องศาเซลเซียส (Cryotherapy) หรือการใช้กระแสไฟฟ้า (Electrotherapy) อาจทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไวรัสใน PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายได้ดียิ่งขึ้น

ดังนั้น จากการศึกษาจนถึงแม้ว่าการใช้ความร้อนในการกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ในระยะ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมพันธุ์ขาวสนาน ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน PLBs ได้ แต่ได้ทราบถึงระยะเวลาความทนทานของ PLBs (กลุ่มเซลล์ที่มีความบอบบาง) ต่อความร้อน 2 ระดับ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษต่อไป

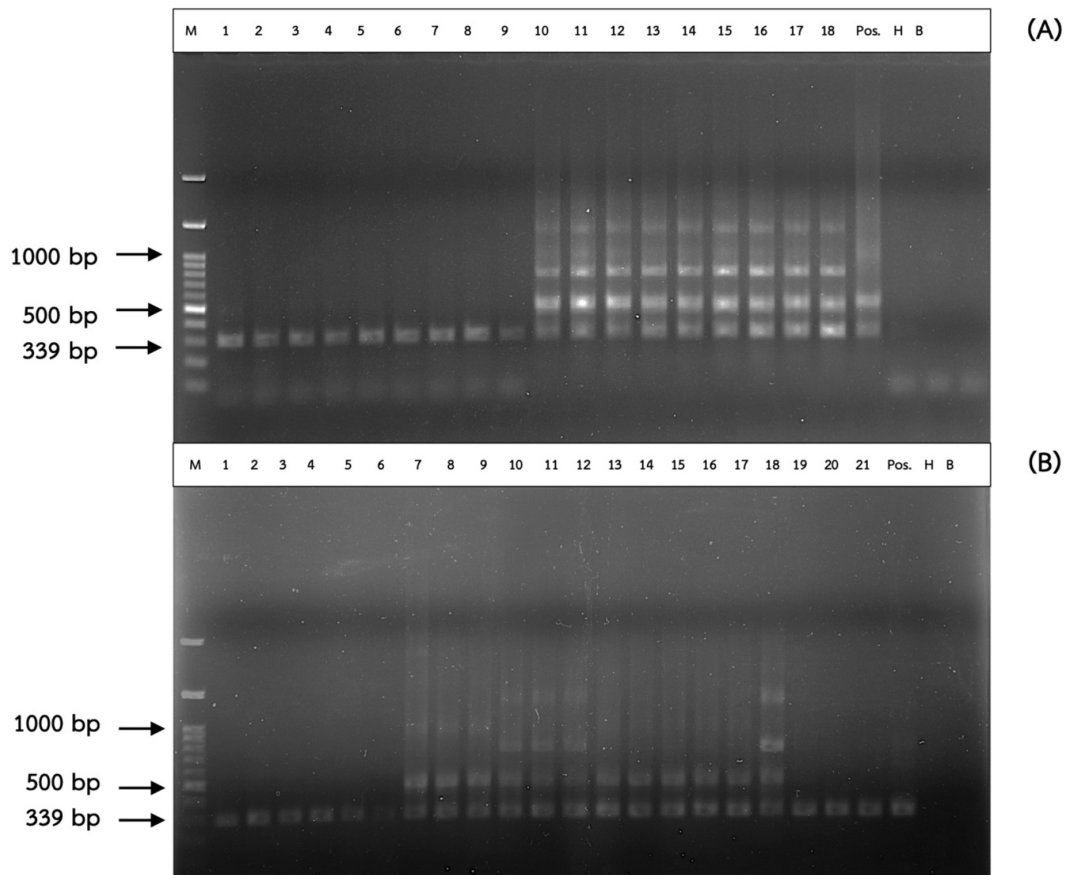


Figure 4 Representative electrophoretic analysis of reverse transcription-PCR (RT-PCR) products of *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) after thermotherapy at $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (A) and 70°C (B). Molecular marker (M); the infected PLBs that were tested (1–18, 1–21); positive control (Pos); negative control (H) and H_2O (B).

สรุป

การศึกษาการกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ด้วยความร้อนในระยะ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนาน พบว่า PLBs สามารถทนต่ออุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 7 วัน มีอัตราการรอดชีวิต

70 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน PLBs เฉลี่ย 16.40 ± 1.83 ชิ้น และน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.00 ± 0.18 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส PLBs สามารถทนได้นาน 20 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน PLBs เฉลี่ย (22.50 ± 2.55 ชิ้น) ซึ่งไม่แตกต่าง

จากชุดควบคุม แต่น้ำหนักสดเฉลี่ย (2.23 ± 0.24 กรัม) น้อยกว่าชุดควบคุม (4.81 ± 0.22 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ทั้งนี้ การใช้ความร้อนบำบัด (Heat treatment หรือ thermotherapy) ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน PLBs ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.สิทธิศักดิ์ แสไพศาล หัวหน้ากลุ่มงานไวรัสวิทยา และเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้การสนับสนุนด้านเทคนิค อุปกรณ์ และสถานที่ ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

เอกสารอ้างอิง

- Barba, M., V. Ilardi and G. Pasquini. 2015. Control of pome and stone fruit virus diseases, pp. 47–83. *In* G. Loebenstein and N.I. Katis, eds. *Advances in Virus Research*. Academic Press, Rome, Italy.
- Chalak, L., T. Elbeaino, M. Elbitar, T. Fattal and E. Choueir. 2015. Removal of viruses from Lebanese fig varieties using tissue culture and thermotherapy. *Phytopathol. Mediterr.* 54(3): 531–535. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16088.
- Chung, B.N., J.Y. Yoon and M.S. Kim. 2010. Viral infection of tissue cultured orchids and evaluation of damages. *Plant Pathol. J.* 26(2): 194–197.
- Díaz-Barrita, A.J., M. Norton, R.A. Martínez-Peniche, M. Uchanski, R. Mulwa and R.M. Skirvin. 2008. The use of thermotherapy and *in vitro* meristem culture to produce virus-free ‘chancellor’ grapevines. *Int. J. Fruit Sci.* 7(3): 15–25. https://doi.org/10.1300/J492v07n03_03.
- Hu, G.J., Y.F. Dong, Z.P. Zhang, X.D. Fan and F. Ren. 2020. Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3). *Sci. Hortic.* 271: 109462. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109462>.
- Hu, G.J., Y.F. Dong, Z.P. Zhang, X.D. Fan, F. Ren and Z.N. Li. 2018. Effect of pre-culture on virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy coupled with shoot tip culture. *J. Integr. Agric.* 17(9): 2015–2023. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61913-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61913-6).
- Hu, G.J., Z.P. Zhang, Y.F. Dong, X.D. Fan, F. Ren and H.J. Zhu. 2015. Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. *Australas. Plant Pathol.* 44: 167–173. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0334-3>.

- Kang, F., S. Hsu and R. Shen. 2011. Virus elimination through meristem culture and rapid clonal propagation by temporary immersion system in *Phalaenopsis*. J. Taiwan Soc. Hortic. Sci. 57(3): 207–218.
- Kaur, C., R. Raj, S. Kumar, D.K. Purshottam, L. Agrawal, P.S. Chauhan and S.K. Raj. 2019. Elimination of *Bean yellow mosaic virus* from infected cormels of three cultivars of gladiolus using thermo-, electro- and chemotherapy. 3 Biotech. 9: 154. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1684-x>.
- Kazemi, N., F.Z. Nahandi, A.A. Habashi and F. Masoomi-Aladizgeh. 2020. Comparing the efficiency of conventional and novel methods of virus elimination using molecular techniques. Eur. J. Plant Pathol. 157: 887–897. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02048-z>.
- Kiratiyaangul, S., K. Kiratiyaangul and M. Prommintara. 1997. Using of cocktail primers to detect the viruses in orchids with multiplex PCR. In Proc. the 35th Kasetsart University Annual Conference, February 3–5, 1997. p. 717. (in Thai)
- Maliogka, V.I., F.G. Skiada, E.P. Eleftheriou and N.I. Katis. 2009. Elimination of a new *ampelovirus* (GLRaV-Pr) and *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture. Sci. Hortic. 123(2): 280–282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.08.016>.
- Mathew, L., H. Tiffin, Z. Erridge, A. McLachlan, D. Hunter and R. Pathirana. 2021. Efficiency of eradication of *Raspberry bushy dwarf virus* from infected raspberry (*Rubus idaeus*) by *in vitro* chemotherapy, thermotherapy and cryotherapy and their combinations. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 144: 133–141. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01829-y>.
- Panattoni, A., A. Luvisi and E. Triolo. 2013. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. Span. J. Agric. Res. 11(1): 173–188. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2013111-3201>.
- Paradornuwat, A. 2010. The pathogen and pests associated with orchid, pp. 93–106. In P. Boonkorkaew, ed. Thai Orchid Database. Biodiversity-Based Economy Development Office (Public Organization), Bangkok, Thailand. (in Thai)
- Piasai, C. 2002. The Inhibition of *Odontoglossum Ringspot Tobamovirus* by Melittin. MS Thesis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. (in Thai)
- Saepaisal, S. and S. Kiratiyaangul. 2017. Virus diseases in orchid, pp. 64–71. In A. Punnachit, N. Supakamnerd, Y. Kasinkasamepog and C. Yonyai, eds. Orchid Production Technology. Karuntee, Nonthaburi, Thailand. (in Thai)

- Saepaisal, S., S. Kiratiyaangul, J. Meeyanyieam and D. Boonchai. 2018. Model of the Production of Virus Diseases Free Orchid Cut Flowers. Final Report. Department of Agriculture, Bangkok, Thailand. 79 pp. (in Thai)
- Saepaisal, S., S. Kiratiyaangul, J. Meeyanyieam and D. Boonchai. 2022. Comparison effect of *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) infected on growth, yields and quality of flower for *Dendrobium* orchid Easakul (BOM). Agricultural Sci. J. 53(3): 209–225. (in Thai)
- Suwanwong, S. 2020. Plant Response under Unfavorable Environment. Wanida Karnpim Part., Ltd., Nonthaburi, Thailand. (in Thai)
- Tan, R.R., L. Wang, N. Hong and G. Wang. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot–tip cultures of pear. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 101: 229–235. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9681-0>.
- Thongutai, C. 1996. Effects of High Temperature and Some Chemicals on the Survival and the Growth of *Dendrobium* Sonia ‘Bom 17’. BS Special Problem, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Udomprasert, N. 2015. Plant Stress Physiology. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. 256 pp. (in Thai)
- Vacin, E.F. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110(4): 605–613.
- Valero, M., A. Ibanez and A. Morte. 2003. Effects of high vineyard temperatures on the *Grapevine leafroll associated virus* elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. Sci. Hortic. 97(3–4): 289–296. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00212-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00212-1).
- Verma, N., R. Ram and A.A. Zaidi. 2005. *In vitro* production of *Prunus necrotic ringspot virus*-free begonias through chemo- and thermotherapy. Sci. Hortic. 103(2): 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.05.005>.
- Vivek, M. and M. Modgil. 2018. Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar ‘Oregon Spur-II’. Virusdisease. 29(1): 75–82. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0437-5>.
- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf and M.R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. Environ. Exp. Bot. 61(3): 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>.
- Wang, M.R., Z.H. Cui, J.W. Li, W.Y. Hao, L. Zhao and Q.C. Wang. 2018. *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. Plant Methods. 14: 87. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>.

- Wang, Q., W.J. Cuellar, M.L. Rajamaki, Y. Hirata and J.P.T. Valkonen. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol. Plant Pathol.* 9(2): 237–250. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>.
- Zhao, L., M.R. Wang, Z.H. Cui, L. Chen, G.M. Volk and Q.C. Wang. 2018. Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of *Apple stem grooving virus* (ASGV) from infected apple *in vitro* shoots. *Plant Dis.* 102(8): 1574–1580. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-17-1753-re>.