การกำจัดเชื้อวิสาในกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม โดยใช้ความร้อนและการเลี้ยงเพาะเนื้อเยื่อ เพื่อผลิตพันธุ์ปลอดโรค

Eradication of Orchid Virus by Thermotherapy and Meristem Culture for Disease-Free Oncidium

จารุวรรณ จาติเสถียร[1] สุรภี กีรติยะอังกูร[1] สิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์[1]
Jaruwan Chartisathian[1] Surapee Kiratiya-angul[1] Sirilux Losawas[1]

ABSTRACT

Widespread to viral disease caused by Cymbidium Mosaic Virus (CyMV) and Odontoglossum Ring Spot (ORSV) have been reported to reduce the products in orchid culture. The general method of disease-free plant production were thermotherapy and meristem culture. But the thermotherapy was not suitable for oncidium orchid because young bulbs changed to yellow and 17 from 20 meristem tips were dead after one week of hot air (40°C) treatment. The others 3 shoots were dead after culture.

When using only meristem culture to eradicated of CyMV and ORSV. It was found that the 8 explants of apical meristem and 2 explants of auxiliary bud meristem of total 107 explants of both (0.2-0.3 mm size) could survive and growth.

After ELIZA test for CyMV and ORSV, the 2 explants auxiliary bud meristem showed both positive test but only 2 in 8 explants of apical meristem showed negative CyMV and positive ORSV and only one of apical meristem both negative.

The only one that free from CyMV and ORSV could be proliferated in Vacin&Went media through the process of orchid mass propagation. The 10% of total number were ELIZA test and all sample showed both negative.

บทคัดย่อ

วิสาที่สำคัญในกล้วยไม้คือ เชื้อ CyMV (Cymbidium Mosaic Virus) ORSV (Odontoglossum Ring Spot Virus) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยง ตลอดจนการค้ากล้วยไม้ วิธีการแก้ปัญหาที่ดีที่สุดในด้านการขยายพันธุ์พืชให้ปราศจากเชื้อวิสา คือการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ แต่การใช้ความร้อนเช่นนี้ไม่เหมาะกับการกำจัดเชื้อวิสาในออนซิเดียม เพราะหน่ออ่อนไม่สามารถทนต่อความร้อน 40°C ได้นานเกิน 1 สัปดาห์ จากการทดลองอบหน่ออ่อน 20 หน่อที่ 40°C นาน 1 สัปดาห์ หน่ออ่อนจะเหลือง และบริเวณเนื้อเยื่อเจริญจะตายนึ่งถึง 17 หน่อ ส่วนที่เหลือ 3 หน่อ สามารถตัดเนื้อเยื่อเจริญได้แต่จะตายในเวลาต่อมา

เมื่อใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ เพียงอย่างเดียวในการกำจัดเชื้อ CyMV และ ORSV พบว่าเมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.2 x 0.3 มม. ทั้งเนื้อเยื่อ

(1) กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

เจริญปลายยอด (Apical meristem) และเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง (Auxiliary bud meristem) จำนวน 107 ชิ้น (explant) เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเพียง 8 ชิ้น และเนื้อเยื่อเจริญตาข้างเพียง 2 ชิ้น สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตต่อไปได้

เมื่อนำมาตรวจเชื้อ CyMV และ ORSV โดยวิธี ELIZA พบว่า เนื้อเยื่อเจริญตาข้าง 2 ยอดมีเชื้อ CyMV และ ORSV ส่วนเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด 2 ชิ้น ใน 8 ชิ้น ปราศจากเชื้อ CyMV เพียงอย่างเดียวและ 1 ชิ้นเท่านั้นที่ปราศจากเชื้อ CyMV และ ORSV

จากยอดที่ปราศจากเชื้อ CyMV และ ORSV นำไปขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณในอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin & Went ตามขบวนการขยายพันธุ์กล้วยไม้ทั่วๆ ไป จนได้ปริมาณตามความต้องการ ทำการสุ่มตัวอย่าง 10% ของจำนวนทั้งหมดมาตรวจเชื้อ CyMV และ ORSV โดยวิธี ELIZA พบว่าปราศจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดทุกตัวอย่าง

หลังจากนำออกปลูกในโรงเรือน โดยปลูก ณ สถานีทดลองพืชสวนบางกอกน้อย และสวนกล้วยไม้บริเวณวัดไร่ขิง 2 สวน เป็นเวลา 6 เดือน นำใบมาตรวจเชื้อโดยสุ่มตัวอย่าง 10% ของจำนวนทั้งหมดปรากฏว่าพบเชื้อทั้ง CyMV และ ORSV

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละไม่ต่ำกว่า 580 ล้านบาท จากสถิติของกระทรวงพาณิชย์ ปี พ.ศ. 2531-2535 (สุรภี 2536) นับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีอนาคตดีพืชหนึ่ง แต่อุปสรรค์ที่สำคัญของการปลูกกล้วยไม้คือ การเข้าทำลายด้วยโรคที่เกิดจากเชื้อวิสา ซึ่งมีรายงานว่ามีมากกว่า 25 ชนิด (Zeftler และคณะ 1990) วิสาที่ระบาดมากที่สุด จัดว่ามีความสำคัญต่อกล้วยไม้มีอยู่ 2 ชนิดคือ CyMV (Cymbidium Mosaic Virus และ ORSV (Odontoglossum Ring Spot Virus) สันนิษฐานว่า การแพร่กระจายของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้เกิดจากเครื่องมือในการตัดแยกต้นพันธุ์และไม่พบว่ามีแมลงพาหะในธรรมชาติ ในประเทศไทยมีรายงานพบวิสาบนกล้วยไม้เพียง 4 ชนิด คือ CyMV, ORSV, CMV และ Clostero Virus 2 ชนิดหลังพบน้อย จัดว่าไม่มีความสำคัญแต่ CyMV และ ORSV พบในอัตราสูง และมีการศึกษารายละเอียดไว้มาก (สุรภี 2536)

การป้องกันกำจัดโรคเหล่านี้ ประสบผลสำเร็จหลังจากมีการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อประยุกต์ใช้ในด้านโรคพืช โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิต กล้วยไม้สกุล Cymbidium ให้ปราศจากวิสาได้สำเร็จ (Morel 1960) ต่อมามีการศึกษาในกล้วยไม้หลายชนิด (Lindemann *et al.* 1970, Kunisaki *et al.* 1972) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาควบคู่ไปกับการใช้ความร้อน และสารเคมีในการควบคุมหรือลดปริมาณเชื้อก่อนนำไปเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (โชคพิศิษฏ์ 2538) ซึ่งทำการทดลองในกล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้สกุล Oncidium เป็นกล้วยไม้ที่นิยมปลูกเพื่อส่งออกในระยะต้นโตพร้อมออกดอก (Blooming size) มักมีปัญหาในการแสดงอาการของโรค ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศ ดังนั้น กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ได้ทำการศึกษาไม้สกุลนี้ เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัด และผลิตกล้วยไม้ปราศจากโรคโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม (Oncidium)
2. กล้องผ่าตัด
3. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น
4. ห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อ
5. อุปกรณ์การตรวจสอบเชื้อ

วิธีการทดลอง

การใช้ความร้อนเพื่อลดปริมาณเชื้อก่อนการตัดเนื้อเยื่อเจริญ

นำยอดอ่อนออนซิเดียมมาตัดใบแก่ออกเหลือยอดยาวประมาณ 1 นิ้วไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอ

รอกซ์ 10% 10 นาที ลอกเปลือกออก ฟอกด้วยคลอรอกซ์ 5% 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำยอดซึ่งฟอกฆ่าเชื้อ มาตัดเนื้อเยื่อเจริญใต้กล้องผ่าตัด ให้มีส่วนฐานกว้าง 0.3 มม. สูง 0.2 มม. และเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Vacin and Went (VW) เติมน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. ถ่ายอาหารทุก 2 เดือน จนต้นโตเห็นต้นและใบชัดเจน บันทึกผลการเจริญและเปลี่ยนแปลงจนสามารถตัดใบไปตรวจเชื้อได้โดยใช้เทคนิค ELIZA

การตรวจเชื้อโดยใช้เทคนิค ELIZA

หลังจากต้นออกซิเดียมที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเติบโตเป็นต้นชัดเจน ตัดส่วนของใบมาทำการตรวจเชื้อดังนี้

- เคลือบเพลทหลุมด้วย IgQ ของวิสาที่เจือจางเป็น 1:1000 ด้วย coating buffer ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วบ่มปฏิกิริยาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
- ล้างเพลทด้วยน้ำกลั่น ที่ผสมด้วย 0.05% Twin 20
- หยอดตัวอย่างพืชที่เตรียมด้วย extract buffer ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วบ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
- ล้างเพลททำเช่นเดียวกับข้อ 2
- หยอด IgQ ที่เชื่อมกับ enzyme เจือจางเป็น 1:1000 ด้วย conjugate buffer ที่ใส่น้ำกลั่น บ่มเพลทในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
- ล้างเพลททำเช่นเดียวกับข้อ 2
- หยอด P-nitrophenyl ซึ่งเป็นสารทำให้เกิดสี ใช้เพียง 5 mg ต่อ substrate buffer 20 ml

การขยายพันธุ์ออนซิเดียมที่ปราศจากโรค CyMV และ ORSV

หลังจากตรวจเชื้อโดยใช้เทคนิค ELIZA แล้ว ต้นที่เป็นโรคจะถูกกำจัดทิ้งไป ส่วนต้นที่ปราศจากโรคจะนำมาขยายพันธุ์ต่อ โดยย้ายลงในอาหารเหลวสูตรเดิม เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาทีตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน จนกระทั่งต้นเกิดเนื้อเยื่อใหม่เรียก **โปรโตคอม** ตัดเอาส่วนของโปรโตคอมมาเลี้ยงในอาหารเหลว หลังจากโปรโตคอมเพิ่มปริมาณตามความต้องการ จึงย้ายลงในอาหารแข็งสูตรเดิมเพื่อให้เกิดต้น หลังจากนั้นจึงย้ายต้นลงในอาหารสูตรเร่งการเจริญเติบโตโดยใช้สูตร VW เติมน้ำมะพร้าว 150 มล./ล. น้ำมัน ฝรั่งต้ม 100 กรัม/ล. กล้วยบด 100 กรัม/ล. ผงถ่าน 0.5 กรัม/ล. เมื่อต้นโตพอสมควรจึงตรวจโรคซ้ำอีกครั้ง โดยสุ่มตัวอย่างมา 10% ของจำนวนทั้งหมด

ผลการทดลอง

การใช้ความร้อนเพื่อลดปริมาณเชื้อก่อนตัดเนื้อเยื่อเจริญ

ยอดอ่อนออนซิเดียม 2 กลุ่ม (กลุ่มที่ 1 ยอดอ่อนมีราก กลุ่มที่ 2 ยอดอ่อนพร้อมลำมีราก) ซึ่งเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 40°C แสดงใน Fig. 1 พบว่า หลังจากเลี้ยงได้ 3 วัน ลำต้นยังเขียวอยู่และสามารถตัดเนื้อเยื่อเจริญได้ทั้ง 2 กลุ่ม ส่วนยอดที่เลี้ยงได้ 7 วัน ในกลุ่มที่ 1 ยอดอ่อนจะเหลืองและเหี่ยวมากจนไม่สามารถนำไปตัดเนื้อเยื่อเจริญได้ แต่กลุ่มที่ 2 อยู่ในสภาพดีกว่ากลุ่มที่ 1 ยอดอ่อนยังมีสีเขียวอยู่บ้าง เมื่อนำมาฟอกฆ่าเชื้อและตัดเนื้อเยื่อเจริญพบว่า บริเวณเนื้อเยื่อเจริญเกือบทั้งหมด จะมีลักษณะตายนึ่งไม่สามารถตัดได้ เช่นกัน มีเพียง 3 ใน 20 ยอดเท่านั้นที่พอจะตัดได้แต่เนื้อเยื่อเหล่านั้นก็ตายในที่สุด (Fig. 1, 2)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากผลการทดลองพบว่าปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญคือ การปนเปื้อนเชื้อรา และแบคทีเรียในระยะแรกของการทดลองมีการปนเปื้อนสูงถึง 99% แต่หลังจากดูแลต้นในเรือนเพาะชำโดยใช้การฉีด Actinomycin ในช่วงระยะเวลา 2 วันก่อนตัด และงดการให้น้ำ พบว่าสามารถลดการปนเปื้อนลงได้บ้าง แต่ไม่มากนัก นอกจากนี้การปนเปื้อนยังขึ้นอยู่กับฤดูกาล และสภาวะอากาศ การปนเปื้อนที่เกิดขึ้นดังกล่าวแสดงใน Table 1

Oncidium Orchid used in the experiment.

(A)

(B)

(C)

(D)

Fig. 1. Heat treatment of oncidium group I : young shoots oncidium with roots.

(A) Young shoots with roots in the supporting was to be heated in the 40°C in incubator chamber.

(B) Young shoots with roots before heat treatment.

(C) Young shoots with roots after 3 days heat treatment.

(D) Young shoots with roots after 7 days heat treatment.

(A) Young shoots with roots and bulb in the supporting were heated in 40°C incubator chamber.

(B) Young shoot with roots and bulb before heated.

(C) Young shoots with roots and bulb after 3 days heated.

(D) After 6 days heated.

Fig. 2. Heat treatment of oncidium Group II : young shoots with roots and bulb.

(A)

(B)

Fig. 3. (A) Apical meristem-tip of oncidium young shoot 50x.
(B) Meristem-tip of oncidium orchid, grown for 4 months on solid culture media. The small piece green explant was visible.

Fig. 4. Meristem-tip had grown to shoot and free form CYMV and ORSV.

Table 1. Number of the total plants, the contamination explants, living explants, CYMV and ORSV explant.

Meristem	No. of total explant	No. of contamination explant	No. of deen explant	No. of living explant	No. of CYMV explant	No. of ORSV explant
Apical meristem	70	39	31	8	3	1
Auxiliary meristem	37	18	19	2	-	-
Total Number	107	57	50	10	3	1

Table 2. Result of ELIZA check from ten meristem of clean cultures.

Meristem-tip	Order of meristem-tip	Number of explant	CYMV	ORSV
Apical	1	1	+	+
(meristem)	2	1	+	+
	3	6	+	+
	4	1	-	-
	5	4	-	+
	6	2	+	+
	7	5	+	+
	8	2	-	+
(Lateral bud)	9	1	+	+
	10	1	+	+

จาก Table 1 แสดงให้เห็นว่า การปนเปื้อนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูงถึง 57% แม้ว่าจะมีการจัดการด้านสวนโดยการฉีด Actinomycin ก่อนการตัดมาทำการทดลอง 3 วัน และงดการรดน้ำด้วย ส่วนการรอดชีวิตซึ่งมีเพียง 10% ของจำนวนทั้งหมด และ 20% ของจำนวนที่รอดชีวิต เนื้อเยื่อเจริญที่รอดชีวิตจะพัฒนาไปเป็นยอดซึ่งใช้ระยะเวลา 4-5 เดือน ยอด 1 ยอด จะเกิดยอดประมาณ 3-5 ยอด และมี 1 ยอดที่พัฒนาได้เพียงยอดเดียวเท่านั้นเมื่อเลี้ยงต่อไปประมาณ 8-10 เดือน ยอดจะเจริญเติบโตมีใบกางพอสมควรจึงนำมาตรวจเชื้อ

การตรวจเชื้อโดยใช้เทคนิค ELIZA

จากการนำส่วนของใบที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ 10 ยอด มาตรวจเชื้อซึ่งสามารถแสดงไว้ใน Table 2

จาก Table 2 เนื้อเยื่อเจริญที่รอดชีวิตจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ 10 ยอดนั้น พบว่า การเจริญเติบโตและการพัฒนาไปเป็นยอด หรือโปรโตคอมนั้นแตกต่างกัน บางยอดสามารถขยายจำนวนได้ถึง 6 ยอด ซึ่งนำมาตรวจทุกยอด แต่บางยอดไม่แตกยอดเลยคงเจริญขึ้นเป็นต้นเดี่ยวๆ ส่วนเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง 2 ยอด สามารถตรวจได้ แต่ตรวจพบเชื้อทั้ง CyMV และ ORSV ทั้ง 2 เชื้อ ส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลาย (Fig. 3) ยอดมี 8 ยอด บางยอดจะมีหลายตัวอย่าง บางยอดก็มีเพียง 1 ตัวอย่างขึ้นอยู่กับการพัฒนาการของยอดนั้นๆ ในจำนวน 8 ยอด มี 3 ยอด ตรวจไม่พบเชื้อ CyMV และใน 3 ยอดนั้นมีเพียง 1 ยอด เท่านั้นที่ตรวจไม่พบทั้ง CyMV และ ORSV คือยอดที่ 4 ใน Table 2 ซึ่งมีเพียง 1 ตัวอย่าง และยอดนี้จะพัฒนาเป็นยอดเดี่ยวๆ ขึ้นมาเพียงยอดเดียวไม่มีการแตกยอดด้านข้าง ยอดที่ตรวจไม่พบเชื้อทั้ง CyMV และ ORSV จะนำมาขยายพันธุ์ต่อไป

การขยายพันธุ์ออนซิเดียมที่ปราศจากโรค CyMV และ ORSV

นำยอดอ่อนเพียง 1 ยอดในขวดทดลอง ที่ตรวจไม่พบเชื้อทั้ง CyMV และ ORSV มาเลี้ยงในอาหาร VW จะเกิดยอดแตกออกมาประมาณ 3 ยอด นำมาตัดยอดออก และเลี้ยงต่อไปจะเกิดโปรโตคอม (Fig. 4) ทำการขยายโปรโตคอมให้มีปริมาณมากพอกับความต้องการ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวและถ่ายอาหารทุก 1-1.5 เดือน หลังจากนั้นถ่ายลงในอาหารแข็งสูตรเดียวกัน โปรโตคอมจะพัฒนาไปเป็นต้น เมื่อต้นโตพอสมควรจึงย้ายลงอาหาร VW ดัดแปลงโดยใส่กล้วย 100 กรัม/ลิตร น้ำมันต้ม 100 กรัม/ลิตร ผงถ่าน 0.5 กรัม/ลิตร จนเกิดรากและต้นโตพอสมควร สุ่มตัวอย่างจำนวน 10% ของขวด กล้วยไม้ที่มีอยู่ไปตรวจเชื้อ CyMV และ ORSV อีกครั้ง พบว่าไม่พบเชื้อดังกล่าว จึงนำต้นโตไปปลูกในโรงเรือนต่อไป

การออกปลูกในโรงเรือน

จากการจัดจำนวนต้นให้เพียงพอ จึงต้องเก็บต้นไว้ในขวดนานถึง 2 เดือนก่อนออกปลูก ทำให้บางต้นที่โตมากค่อนข้างชงักการเจริญเติบโต เมื่อนำไปเลี้ยงในสวนของเกษตรกร ต้นปราศจากเชื้อจะโตช้ากว่าต้นของชาวสวนในวัยใกล้เคียงกัน เมื่อเลี้ยงได้ 6 เดือน เก็บตัวอย่าง 20 ต้นต่อ 1 สวน มาตรวจเชื้อ พบว่าพบเชื้อทั้ง CyMV และ ORSV

วิจารณ์ผลการทดลอง

อุปสรรคของการปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญมากคือการเข้าทำลายของโรค โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราหรือแบคทีเรียสามารถควบคุมได้ด้วยการใช้สารเคมี แต่โรคที่มีสาเหตุจากวิสาไม่สามารถใช้สารเคมีควบคุมได้ซึ่งเชื้อวิสาที่มีความสำคัญต่อกล้วยไม้มี 2 ชนิดคือ CyMV และ ORSV (สุรภี 2536)

เมื่อการศึกษาด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้พัฒนามากขึ้นจนสามารถนำมาประยุกต์ในงานด้านโรคพืชได้สำเร็จสามารถผลิตกล้วยไม้สกุล Cymbidium ให้ปราศจากโรคได้เป็นสกุลแรกเมื่อปี ค.ศ. 1960 (Morel 1960) ต่อมามีการพัฒนาการมากขึ้นโดยการใช้ทั้งความร้อน และสารเคมีในการควบคุมหรือลดปริมาณวิสาในหวายมาดามปอมปาดัวร์ (โชคพิศิษฐ์ 2538) โดยเฉพาะการใช้ความร้อนแห้ง 35-40°C ในการเลี้ยงหวายนาน 1 เดือน พบว่าสามารถตัดเนื้อเยื่อจากส่วนปลายยอดขนาด 1 มม. ไปเลี้ยงและได้ต้นปราศจากเชื้อ 10% ซึ่งปกติแล้วในเนื้อเยื่อ 1 มม. มักจะตรวจพบเชื้อเสมอ ดังนั้นความร้อนมีส่วนช่วยในการลดปริมาณเชื้อ หรือชลอ การเจริญเติบโตของเชื้อลงไปได้เช่นกัน ส่วนการศึกษาในออนซิเดียมไม่สามารถนำทั้งกอไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 40°C ได้ จึงได้ตัดเฉพาะยอด หรือลำติดยอดแทนออนซิเดียมทั้งกอ นำส่วนดังกล่าวไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิได้เพียง 7 วันเท่านั้น ส่วนของยอดเพียงอย่างเดียวจะเหลืองตายหมด เนื้อเยื่อเจริญจะช้ำ และเป็นสีออกน้ำตาล ในส่วนของยอดที่มีลำแก่อยู่ด้วยนั้น ยังคงเห็นใบเป็นสีเขียวบ้าง หลังจากตัดเนื้อเยื่อเจริญจะมีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญช้ำ มีเปอร์เซ็นต์สูงถึง 85% ส่วนที่คิดว่ามีชีวิต และสามารถตัดออกมาได้โดยไม่เละจะเลี้ยงต่อไปแต่ไม่สามารถมีชีวิตได้เลย ดังนั้นการใช้ความร้อน 40°C เป็นเวลา 7 วันไม่เหมาะกับออนซิเดียม แต่เมื่อลดจำนวนวันลงเหลือ 3 วัน สามารถตัดเนื้อเยื่อเจริญได้ทั้งยอดและยอดติดลำต้นแก่ แต่การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สูง โดยเฉพาะเชื้อบักเตรี และสูงกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่ได้เลี้ยงในอุณหภูมิ 40°C (ตัวควบคุม) ซึ่งเป็นไปได้ว่ากล้วยไม้สกุลออนซิเดียม ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ จึงไม่สามารถอยู่ได้ถึง 7 วัน และการเรียงตัวของใบแตกต่างจากหวายมากในออน-ซิเดียมใบเรียงตัวค่อนข้างหลวมกว่าหวาย และด้วยเหตุนี้เองจุลินทรีย์ซึ่งเป็น Sapophyte จึงมักอาศัยอยู่ในบริเวณส่วนอ่อนๆ ของยอดได้ ทำให้ยากแก่การฟอกฆ่าเชื้อประกอบกับนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 40°C จึงเหมาะในการเจริญเติบโตของเชื้อบักเตรีเหล่านี้ ทำให้สามารถขยายปริมาณมากขึ้น จึงยากแก่การฟอกฆ่าเชื้อ ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนจะสูงกว่ายอดที่ไม่ได้เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 40°C

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถของเซลล์ในการทนต่อความร้อนที่ 40°C และเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน

จุลินทรีย์ที่สูงมากกว่ายอดที่ไม่ได้ใช้ความร้อนแล้ว (ไม่ได้แสดงข้อมูลรายละเอียดในที่นี้) การใช้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 40°C ไม่เหมาะกับกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม แต่อย่างไรก็ดีการทดลองเกี่ยวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญแต่ละครั้ง จะมีทั้งยอดที่ไม่ได้ใช้ความร้อน และยอดที่ใช้ความร้อน 40°C 3-4 วัน แต่เนื่องจากการมีชีวิตรอดน้อยมาก จึงไม่อาจแบ่งรายละเอียดของข้อมูลในส่วนนี้ออกมาให้เห็นความแตกต่างเมื่อใช้ความร้อนและไม่ได้ใช้ความร้อน แสดงเป็นข้อมูลรวมทั้งหมด

ยอดที่รอดชีวิตได้สามารถเพิ่มขนาด และมีสีเขียวให้เห็นเมื่อเลี้ยงได้ 3-4 เดือน (Fig. 3) และจะแตกยอดออกมามากกว่า 1 ยอด บางเนื้อเยื่อเจริญจะพัฒนาไปเป็นกระจุกของยอดซึ่งมี 3-5 ยอด บ้างก็เกิดแคลลัสหรือโปรโตคอมก่อน แล้วจึงพัฒนาไปเป็นยอดซึ่งจะมีจำนวนมาก มีเพียงเนื้อเยื่อเจริญที่พัฒนาไปเป็นยอดเพียงยอดเดียว และจากการตรวจสอบเชื้อ พบว่าปราศจากทั้ง CyMV และ ORSV เมื่อพิจารณาตามข้อมูลที่แสดงไว้พบว่า เนื้อเยื่อเจริญที่ตัดขนาดไม่เกิน 0.3x0.2 มม. นั้นมีโอกาสปราศจากเชื้อ CyMV และ ORSV จากการศึกษาการกระจายของเชื้อ CyMV และ ORSV ในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ พบว่า CyMV อย่างเดียวจะกระจายอยู่บริเวณเซลล์ที่อยู่ระดับต่ำกว่า ORSV (กลอยใจ 2534) จึงทำให้โอกาสปราศจากเชื้อ CyMV มีมากกว่า ORSV ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่แสดงไว้

การผลิตกล้วยไม้ออนซิเดียมปราศจากโรคโดยใช้เนื้อเยื่อเจริญนั้น มีเปอร์เซ็นต์การรอดน้อยมากเพียง 9-10% เท่านั้น จึงมีผู้พยายามใช้วิธีเลี้ยงยอดอ่อนธรรมดา และเมื่อได้โปรโตคอมแล้วจึงตรวจสอบเชื้อจากโปรโตคอมเหล่านั้น พบว่าโปรโตคอมสามารถปราศจากโรคได้ประมาณ 12% ของโปรโตคอมทั้งหมด ซึ่งทำการทดลองในกล้วยไม้สกุลหวาย (กลอยใจ, 2534) วิธีนี้จะสะดวกในการเลี้ยงมากกว่าการตัดจากเนื้อเยื่อเจริญ แต่การเลี้ยงโปรโตคอมแล้วตรวจสอบเชื้อ ไม่สามารถพบโปรโตคอมปลอดโรคที่ได้จากโปรโตคอมเป็นโรคเลย (กลอยใจ, 2534) อย่างไรก็ตามพบว่าการผลิตกล้วยไม้ในเชิงการค้า ไม่ได้ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพราะทำยากและต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง แต่อาจใช้วิธีทางอ้อมโดยเลี้ยงยอดอ่อนให้เกิดต้นจำนวนหนึ่งและใช้วิธีการตรวจเชื้อแบบ ELIZA หาต้นที่ปราศจากโรคมาขยายพันธุ์ต่อไปเป็นการง่ายในการผลิตต้นปราศจากโรคในปัจจุบัน แต่จะคุ้มทุนในการผลิตหรือไม่ไม่ได้มีการศึกษา

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตกล้วยไม้ปราศจากโรค ซึ่งสามารถประสบผลสำเร็จได้ตั้งแต่ปี 1960 และขณะเดียวกันการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ได้มีการพัฒนาทั้งเทคนิคและวิธีการตลอดมาจนถึงยุคโลกาภิวัฒน์แล้ว การใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพื่อผลิตต้นปราศจากโรค อาจดูยุ่งยากและล้าสมัยกว่าวิธีขยายพันธุ์ธรรมดา ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว จนสามารถหนีโรคได้ประกอบกับการพัฒนาในด้านการตรวจสอบเชื้อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นมีความแม่นยำ รวดเร็ว และไม่ยุ่งยาก จึงทำให้เกิดการพัฒนาการในด้านความสะดวกในการผลิต กล้วยไม้ปราศจากโรคมากกว่าในยุคเริ่มแรกแต่เมื่อนำออกปลูกในโรงเรือนได้เพียง 6 เดือน ก็เกิดการติดเชื้อเข้ามาใหม่ ซึ่งยากแก่การควบคุมโดยเฉพาะเครื่องมือในการทำสวนจึงเป็นการยากที่จะปลูกรวมกับต้นที่เป็นโรคในสวนเดียวกันแล้วให้ปราศจากโรคตลอด การจัดการที่ดีและเข้าใจถึงสาเหตุของการแพร่ระบาดเท่านั้น ที่จะสามารถยับยั้งหรือยืดระยะเวลาการติดเชื้อเข้ามาใหม่ได้ ดังนั้นการหาสถานที่ที่บริสุทธิ์หรือยังไม่เคยปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ และไม่มีพืชอาศัยของเชื้ออยู่ในบริเวณนั้น จึงจะเหมาะกับการเลี้ยงกล้วยไม้ปราศจากโรคมากที่สุด

สรุปผลการทดลอง

การใช้ความร้อน 40°C อบยอดอ่อนก่อนตัดเนื้อเยื่อเจริญเพื่อช่วยในการผลิตออนซิเดียมปราศจากโรคนั้นไม่ได้ผล ส่วนการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.2x0.3 นั้นเพียงอย่างเดียวสามารถผลิตออนซิเดียมปราศจากโรค CyMV และ ORSV ได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์น้อยมาก ไม่เหมาะจะนำมาใช้เชิงการ

ค้าในยุคโลกาภิวัฒน์ น่าจะใช้วิธีขยายพันธุ์ธรรมดาและใช้วิธีตรวจสอบเชื้อที่มีประสิทธิภาพ คอยตรวจสอบเสมอเมื่อพบเนื้อเยื่อที่ปราศจากเชื้อ แล้วจึงนำมาขยายพันธุ์ต่อไปในอนาคต วิธีน่าจะเหมาะกับการผลิตต้นปราศจากโรคในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กลอยใจ สำเร็จวาณิชย์. 2534. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ Cymbium mosaic virus (CyMV) และการพัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ สกุลหวาย วิทยานิพนธ์ เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จารุวรรณ จาติเสถียร, ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์, คนึงนิตย์ เหรียญวรากร, สุรภี กีรติยอังกูร. 2532. ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนตลอดจนการใช้ความร้อนเพื่อการผลิตออนซิเดียมปลอดโรครายงานผลการวิจัย พ.ศ. 2532 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

จารุวรรณ จาติเสถียร, สุรภี กีรติยอังกูร, ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์, ชำรงค์ศักดิ์ อาจหาร. 2533. การขยายพันธุ์ออนซิเดียมปลอดโรครายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2533 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

จารุวรรณ จาติเสถียร, สิริลักษณ์ โล่สวัสดิ์, สุรภี กีรติอังกูร. 2535. เปรียบเทียบการเกิดโรควิสาของออนซิเดียมปลอดโรคในสภาพโรงเรือน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2535 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา. 2538. การศึกษาการควบคุมเชื้อ Cymbidium mosaic virus ในหวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium pompadou*) โดยใช้ความร้อนและสารเคมีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิทยานิพนธ์ เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรภี กีรติยะอังกูร กิติศักดิ์ กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2532. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของกล้วยไม้หวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นรำรายงานประจำปี 2532 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สุรภี กีรติยะอังกูร กิติศักดิ์ กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Tobacco mosaic virus orchid strain ของกล้วยไม้หวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นรำ รายงานประจำปี 2532 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สุรภี กีรติยะอังกูร กิติศักดิ์ กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2536. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus และ Orontoglossum ringspot virus ของกล้วยไม้ เอกสารเผยแพร่วิชาการ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา 2536 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Bertsch, Walter 1967 A New Frontier: Orchid Propagation by Meristem Tissue Culture 1967. Amer. Orch. Socei. bull. Jan. p. 32-37

Kunisaki, John T., Kim, Kang-Kwun and Sagawa Yomeo. 1972. Shoot-Tip Culture of Vanda. Amer. Orch. Socei. Bull. May 1972 p 435-439.

Linderman, E.G.P., Gunckel, J.E., and Davindson, O.W. 1970. Meristem Culture of Catteya. Amer. Orch. Socei. Bull. May p 1002-1004.

Morel Georoges M., 1960 Producing Virus Free Cymbidiums. Amer. Orch. Socei. Bull. July p 495-497.

Somchai Intasotti 1992 Viruses Datection and Ultrastrutural Study on Meristems of Oncidium Doubly Infection with Cymbidium Mosaic and Odonto Glossum Ringsport Viruses. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requie Department of Plant Pathology, Kasetsart University

Zettler, F., W.N.J.Ko. G.C. Wisler, M.S. Eliottanc s. M. Wong. 1990. Viruses of Orchids and Thire Control. Plant Disease. Vol. 74(9)621-626