วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การกำจัดเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* จากโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้หวายชาวินไวท์พันธุ์ขาว 5N ด้วยความเย็นยิ่งยวด

Eradication of *Cymbidium mosaic virus* from protocorm–like bodies of *Dendrobium* Shavin White 'White 5N' using cryo-treatment

วงศกร เสือสืบพันธ์[1], ดวงพร บุญชัย[2], เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์[1] และ พัชรียา บุญกอแก้ว[1]*

Wongsakorn Suasuebphan[1], Duangporn Boonchai[2], Shermarl Wongchaochant[1] and Patchareeya Boonkorkaew[1]*

[1] *ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900*
[1] *Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900*
[2] *สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900*
[2] *Rapee Sagarik Orchid Garden, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900*

บทคัดย่อ: ปัญหาการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายในสภาพปลอดเชื้อ คือ ต้นแม่พันธุ์เกือบทั้งหมดติดเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) การผลิตต้นพันธุ์ให้ปลอดไวรัส โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอด พบปัญหา คือชิ้นส่วนเติบโตได้ช้า มีอัตราการตายสูง การใช้ protocorm–likes bodies (PLBs) ที่ได้จากหน่ออ่อนของต้นที่ติดเชื้อไวรัสน่าจะเป็นแนวทางในการผลิตต้นกล้วยไม้ให้ปลอดจากเชื้อไวรัสได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเชื้อ CymMV จาก PLBs ของกล้วยไม้หวายชาวินไวท์พันธุ์ขาว 5N โดยนำ PLBs ขนาด 3 มม. ได้จากหน่ออ่อนของต้นที่ติดเชื้อ CymMV ปรับสภาพในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (VW) ดัดแปลง เติมน้ำมะพร้าว 15% ร่วมกับน้ำตาลทรายเข้มข้น 0.15 0.175 และ 0.2 โมลาร์ แต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 1 วัน เมื่อครบ 3 วัน ทำให้เป็นเมล็ดเทียมด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ก่อนวางในตู้ laminar flow นาน 5 ชั่วโมง แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN) ที่เวลาต่างกัน 20 ระดับ คือ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 20 30 วินาที 1 3 5 10 30 60 หรือ 90 นาที เทียบกับเมล็ดเทียมที่ไม่ผ่านการแช่ใน LN วางแผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ หลังแช่ใน LN นำมาละลายน้ำแข็ง โดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 40°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง เติมน้ำมะพร้าว 15% และน้ำตาลทราย 2% หลังเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดเทียมที่ผ่านการแช่ใน LN ทุกระยะเวลา มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึง 4 ($P<0.01$) ส่วนที่แช่นานมากกว่า 10 วินาที เกิดการตายทั้งหมด ในขณะที่แช่นาน 8–10 วินาที รอดชีวิตเพียง 20% และที่แช่นาน 1–5 วินาที รอดชีวิต 55–70% เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโต พบว่า ที่เวลา 1–7 วินาที มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 62.50–88.89% ($P<0.01$) PLBs ที่รอดชีวิตสามารถเติบโตเป็นต้นได้ แต่ทุกทรีตเมนต์ไม่สามารถกำจัดเชื้อ CymMV ได้

คำสำคัญ: การรักษาด้วยความเย็นจัด; เมล็ดเทียม; การดึงน้ำออก; ไนโตรเจนเหลว

ABSTRACT: The main problem *in vitro* propagation of the *Dendrobium* hybrid was that almost mother plants were infected with the *Cymbidium mosaic virus* (CymMV). The critical problem in producing virus–free plantlets using meristems culture was the slow growth and high mortality rates. Using protocorm–like bodies (PLBs) derived from virus–infected young shoots to produce virus–free orchid plants might have good potential. This study aimed to eliminate infected–CymMV from PLBs of *Dendrobium* Shavin White 'White 5N'using the encapsulation–dehydration method with cryo-treatment. The 3 mm PLBs from CymMV–infected young shoots were pre–cultured in liquid

* Corresponding author: agrpyb@ku.ac.th

Received: date; October 4, 2023 Revised: date; April 30, 2024

Accepted: date; June 19, 2024 Published: date;

Vacin and Went (VW) medium supplemented with 15% coconut water and 0.15, 0.175, and 0.2 M sucrose, each concentration for 1 day sequentially. After 3 days, the mixture of sodium alginate solution with PLBs is dropped with a sterile pipette into $CaCl_2$ solution and maintained for 20 min to form beads and dehydrated in a laminar airflow for 5 h. The dehydrated beads were transferred to cryotube and immersed directly in liquid nitrogen (LN) for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 or 30 sec and 1, 3, 5, 10, 30, 60 or 90 min. The experiment was a completely randomized design. After LN immersion, cryotubes were immersed in a 40°C for 5 min, and the beads were transferred to culture in a modified semi–solid VW medium supplemented with 15% coconut water and 2% sucrose for 6 weeks. The cryo–treatment resulted in a significant decrease in the PLBs survival rate from 1–4 weeks ($P \leq 0.01$). All PLBs were dead after being immersed in LN for over 10 sec, and the survival rate after 1–5 sec immersion was 55–70%. The regrowth rate comparison found that the highest obtained from 1–7 sec immersion were 62.50–88.89% ($P<0.01$). The surviving PLBs can successfully grow into plantlets. However, CymMV was still found in the PLBs from all treatments.

Keywords: cryotherapy; artificial seed; dehydration; liquid nitrogen

บทนำ

ต้นกล้วยไม้ที่เป็นโรคไวรัสในประเทศไทย ส่วนมากเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) และ *Odontoglossom ringspot virus* (ORSV) ต้นที่เป็นโรคมักแสดงอาการใบด่าง ยอดบิดเบี้ยว ทำให้การเจริญเติบโตลดลง (29%) ปริมาณและคุณภาพของช่อดอกลดลง (9–18%) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปลอดเชื้อไวรัส (Wannakraroj, 2008) จากการสำรวจแปลงปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมสำหรับตัดดอก พบว่า มีการติดเชื้อ CymMV เกือบทั้งหมด เนื่องจากใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยการตัดชำจากลำต้นเดิมที่มีอายุมาก (สิทธิศักดิ์ และคณะ, 2561; สิริมา และคณะ, 2562) เชื้อ CymMV ที่อยู่ในน้ำคั้นจากต้นที่เป็นโรค จะติดไปกับอุปกรณ์ต่าง ๆ เช่น มีด กรรไกร ที่ใช้ในการตัดแต่งต้น จากนั้นจะเข้าสู่ต้นที่ไม่เป็นโรคผ่านทางบาดแผล มีการเพิ่มอนุภาคของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ และเกิดการแพร่กระจายไปทั่วทั้งต้น ผ่านระบบท่อลำเลียงน้ำและอาหารของต้นกล้วยไม้ (อภิชาต และคณะ, 2557; สิทธิศักดิ์ และ สุรภี, 2560) ปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ และเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย เนื่องจากไม่สามารถหาชิ้นส่วนเริ่มต้น (explant) ที่ปลอดเชื้อไวรัสมาใช้ได้

การผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดเชื้อไวรัสโดยส่วนใหญ่นิยมใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (shoot apical meristem) เนื่องจากเนื้อเยื่อบริเวณนี้มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว จึงมีโอกาสที่จะปราศจากเชื้อไวรัสหรือโรคพืชชนิดอื่น ๆ แต่ปัญหาสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด คือ ชิ้นพืชเจริญเติบโตได้ช้า และมีอัตราการตายสูง นอกจากนี้การตัดชิ้นส่วนยังต้องใช้ผู้มีความชำนาญสูง จึงจะประสบความสำเร็จได้ ทั้งนี้ สิทธิศักดิ์ และคณะ (2561) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข้างหรือปลายยอดจากหน่ออ่อนจากต้นแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสของกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม แล้วชักนำให้เกิด protocorm–like bodies (PLBs) สามารถพบต้นกล้วยไม้ที่ปลอดจากเชื้อไวรัสได้ 30–40% เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ PLBs ในอาหารเหลวอย่างรวดเร็ว (เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์) (พันทิพา, 2553) ดังนั้นหากใช้ PLBs เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น ก็น่าจะเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยให้ประสบความสำเร็จในการผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัสได้ และลดปัญหาต่าง ๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ เช่น ปริมาณชิ้นส่วนไม่เพียง หรือการตายของชิ้นส่วนเริ่มต้นเนื่องจากมีขนาดเล็กมาก นอกจากนี้มีรายงานการใช้ PLBs เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น สำหรับผลิตกล้วยไม้ปลอดเชื้อ CymMV โดยใช้ร่วมกับสารเคมีในกลุ่มยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส (antiviral agents) สามารถผลิต PLBs กล้วยไม้สกุลหวาย เช่น พันธุ์บอม 17 (สุรวิช และ สุวรรณา, 2544; ศิริพร, 2545) และสกุลม็อคคาร่า (อรอุสา, 2549) ให้ปลอดเชื้อ CymMV ได้ แต่พบว่ามี PLBs ที่ปลอดเชื้อไวรัสในปริมาณที่น้อย (3.7–25.0%) และเซลล์เกิดความเสียหายจากสารเคมี เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ส่วนใหญ่นอกจากจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA/RNA ของเชื้อไวรัสแล้ว ยังรบกวนการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในเซลล์พืชด้วย ทำให้ชิ้นส่วนพืชที่ได้รับสารเคมีเกิดการตายจากการที่เซลล์นั้นไม่สามารถสร้างสารที่จำเป็นต่อเซลล์ได้ (อรอุสา, 2549; พันทิพา, 2553) และอาจส่งผลต่อพันธุกรรมของพืช ทำให้ต้นเกิดการกลายพันธุ์ได้ (ไพศาล, 2535) ดังนั้น การหาวิธีการหรือเทคนิคอื่น ๆ ที่ไม่ทำให้ PLBs ตาย หรือเกิดการกลายพันธุ์ สำหรับใช้กำจัดเชื้อไวรัส น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไวรัสในกล้วยไม้ได้

การรักษาด้วยความเย็นจัด (cryotherapy) เป็นการนำความรู้ด้านการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (cryopreservation) มาประยุกต์ใช้เพื่อกำจัดเชื้อโรคในเนื้อเยื่อพืชที่ติดเชื้อ โดยเก็บรักษาตัวอย่างในที่อุณหภูมิต่ำมาก (–196°C) (Wang และ Valkonen,

2009a) หลักการคือ การแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196°C จะทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ หยุดชะงัก เซลล์ที่มีอายุมากหรือเซลล์ที่มีแวคิวโอล (vacuole) ขนาดใหญ่กว่า มีปริมาณน้ำที่มาก ซึ่งมักเป็นเซลล์ที่มีเชื้อไวรัส จะถูกทำลายโดยเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ส่วนเซลล์ขนาดเล็กหรือเซลล์ที่มีสัดส่วนขนาดของนิวเคลียสมากกว่าไซโทพลาสซึม (cytoplasm) จะรอดชีวิต และพัฒนาขึ้นเป็นต้นพืชปลอดไวรัสได้ (Wang และ Valkonen, 2009a; เฌอมาลย์, 2563b) ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถนำชิ้นส่วนที่ต้องการกำจัดไวรัสลงแช่ในไนโตรเจนเหลวพร้อมกันได้ทันทีในปริมาณมาก จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีโอกาสที่จะได้ต้นที่ปลอดโรคจำนวนมาก (Wang et al. 2003; Wang et al., 2006; Bhojwani and Dantu, 2013; Feng et al., 2013) ซึ่งมีรายงานการรักษาด้วยความเย็นจัดในการกำจัดเชื้อไวรัสซึ่งประสบความสำเร็จในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กล้วย (Helliot et al., 2002) องุ่น (Wang et al., 2003; Pathirana et al., 2016) มันฝรั่ง (Wang et al., 2006) และกระเทียม (Vieira et al., 2015) เป็นต้น แต่ยังคงมีข้อจำกัดในหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดพืช ความพร้อมด้านเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และข้อปฏิบัติของการทำให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation protocol) (Engelmann, 2004; Benson, 2008; Wang และ Valkonen, 2009b) เช่น ขั้นตอนการปรับสภาพชิ้นส่วนของพืช (pretreatment) ในอาหารที่เติมซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชทนต่อสภาวะขาดน้ำ ช่วยเพิ่มความสำเร็จในการเก็บรักษา (Feng et al., 2012) โดยส่วนใหญ่จะใช้ความเข้มข้น 0.3–1.0 โมลาร์ ระยะเวลาตั้งแต่ 1 ชั่วโมง จนถึง 7 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Wang et al., 2006; Yoon et al., 2006; Feng et al., 2012; Folgado et al., 2015; Bettoni et al., 2018) และระยะเวลาของการแช่ชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลว ที่ประสบความสำเร็จส่วนใหญ่ใช้ชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด แช่ในไนโตรเจนเหลว นาน 30–90 นาที (Cejas et al., 2012; Wang et al., 2018; Ita et al., 2020) แต่ยังไม่มีรายงานที่ประสบความสำเร็จใน PLBs ของกล้วยไม้

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรักษาด้วยความเย็นจัด ด้วยเทคนิค encapsulation–dehydration ในการกำจัดเชื้อ CymMV ซึ่งเป็นไวรัสชนิดที่สร้างความเสียหายต่อการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้มากที่สุด (สุรภี, 2554) จาก PLBs ของกล้วยไม้หวายชาวินไวท์พันธุ์ขาว 5N ที่นิยมปลูกเลี้ยงเพื่อการตัดดอกและส่งขายต้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดเชื้อไวรัสสำหรับใช้ปลูกทดแทนต้นเดิมที่ติดเชื้อ เป็นการเพิ่มมาตรฐานของผลผลิตกล้วยไม้ในการส่งออก และยกระดับคุณภาพของกล้วยไม้ในประเทศ อีกทั้งยังช่วยลดข้อกีดกันทางการค้าในการส่งออกต้นกล้วยไม้ ที่ต้องมีใบรับรองการปลอดเชื้อไวรัสในหลายประเทศ เช่น ออสเตรเลีย เยอรมัน ญี่ปุ่น ไต้หวัน และ เกาหลี อีกด้วย

วิธีการศึกษา

พืชทดลอง

PLBs ของกล้วยไม้หวายชาวินไวท์พันธุ์ขาว 5N (*Dendrobium* Shavin White ‘White 5N’) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาข้างและปลายยอดจากหน่ออ่อนของต้นที่ติดเชื้อ CymMV ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (1949) (VW) ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% น้ำตาลทราย 2% วางบนเครื่องเขย่า (orbital shaker) ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อุณหภูมิ 25±2°C ภายใต้แสงจากหลอด LEDs สีขาว (400–780 นาโนเมตร) ความเข้มแสง 40 µmol $m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน) ก่อนทำการทดลองสุ่ม PLBs ไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส CymMV ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT–PCR) (สุรภี และคณะ, 2540) จากนั้นคัดเลือก PLBs ขนาดประมาณ 1–3 มม. มาปรับสภาพบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% น้ำตาลทราย 2% gallan gum 0.3% เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปทดลอง (**Figure 1a**)

การปรับสภาพ PLBs (preculture) และการรักษาด้วยความเย็นจัด (cryotherapy)

คัดเลือก PLBs ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1–3 มม. เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง เติมน้ำมะพร้าว 15% และเติมน้ำตาลทรายให้มีความเข้มข้น 0.15 0.175 และ 0.2 โมลาร์ โดยเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลทรายแต่ละความเข้มข้นนาน 1 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมากขึ้นตามลำดับ วางบนเครื่องเขย่าอัตโนมัติ ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เมื่อครบ 3 วัน นำ PLBs ไปแช่ด้วยสารป้องกันความเย็น (สูตร PVS3: glycerol 50% ร่วมกับน้ำตาลทราย 50%) นาน 1 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพน้ำและออสโมติคของเซลล์ (cryoprotectant) (ดัดแปลงจาก เฌอมาลย์, 2563a)

นำ PLBs ที่ปรับสภาพแล้ว ใส่ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) ความเข้มข้น 3% โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ดูด PLBs ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต จากนั้นหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ $2H_2O$) ความเข้มข้น 100 mM แล้วแช่ไว้นาน 20 นาที (**Figure 1b**) นำเมล็ดเทียมที่ได้ (**Figure 1c**) ล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ วางให้ลมเป่าในตู้ horizontal laminar flow นาน 5 ชั่วโมง แล้วเก็บใส่หลอด cryotube ขนาด 1.8 มม. (**Figure 1d**) จากนั้นนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196°C) (**Figure 1e**) นาน 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 20 30 วินาที 1 3 5 10 30 60 หรือ 90 นาที วางแผนแบบการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) มี 5 ซ้ำ ใช้เมล็ดเทียมซ้ำละ 4 ชิ้น เมื่อครบกำหนดของแต่ละระยะเวลานำหลอด cryotube ที่ใส่เมล็ดเทียมมาแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40°C นาน 5 นาที (**Figure 1f**) แล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15% น้ำตาลทราย 2% gellan gum 0.3% **(Figure 1g)** วางภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อครบ 8 สัปดาห์ แบ่ง PLBs บางส่วนของแต่ละทรีตเมนต์ (**Figure 1h**) ไปตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT–PCR ส่วน PLBs ที่เหลือเลี้ยงต่อไปในอาหารสูตรเดิมจนครบ 12 สัปดาห์ จากนั้นนำไปชักนำให้เกิดยอดด้วยอาหารสูตร VW ดัดแปลงที่เติมน้ำมะพร้าว 15% กล้วยหอมปั่น 10% มันฝรั่งปั่น 5% น้ำตาลทราย 2% gellan gum 0.3% และผงถ่านกัมมันต์ 0.1% นาน 4 สัปดาห์ (**Figure 1i**)

บันทึกผลการทดลอง

1. เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (survival percentage) หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลาต่าง ๆ และเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง บันทึกผลทุกสัปดาห์ จนครบ 8 สัปดาห์ โดยคำนวณจาก

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

2. เปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโต (regrowth percentage) หลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่าง ๆ และเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง นาน 8 สัปดาห์ โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโต} = \frac{\text{จำนวน PLBs ที่เจริญเติบโต}}{\text{จำนวน PLBs ที่รอดชีวิต}} \times 100$$

3. ลักษณะการเจริญเติบโตของ PLBs ที่สังเกตพบระหว่างการทดลอง

4. การตรวจหาเชื้อ CymMV ด้วยวิธี RT–PCR

เมื่อครบ 8 สัปดาห์ หลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว นำ PLBs ไปตรวจหาเชื้อ CymMV ด้วยวิธี RT–PCR โดยนำ PLBs มาสกัดอาร์เอ็นเอต้นแบบ (RNA template) ด้วยชุดสกัด FavorPrep™ Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen Biotech, Taiwan) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท จากนั้นใส่ อาร์เอ็นเอต้นแบบในชุด One Step RT–PCR Kit (Biotechrabbit) ประกอบด้วย deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) DNA polymerase และ PCR buffer ทำปฏิกิริยา RT–PCR ด้วยเครื่อง MiniAmp Plus Thermal Cycler ด้วยไพรเมอร์ (Primer) CymMV2(F): ATG CCA GGC TTA GTT CC และ CymMV2(R): TCA GGG GTG GTG ATA TG (สุรภี และคณะ, 2540) เป็นจำนวน 35 รอบ โดยตั้งค่าการทำงานในแต่ละรอบ คือ ที่ 94°C 2 นาที 94°C 10 วินาที 58°C 10 วินาที 72°C 1 นาที และ 72°C 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณ PCR products ด้วยเทคนิค electrophoresis ด้วย 1.2% agarose gels (agarose gels 0.6 ก. ละลายใน 1X TBE (tris–borate, EDTA) 50 มล. เติมสีย้อม redshelf 2.5 ไมโครลิตร) โดยนำแผ่นเจลวางในเครื่อง agarose electrophoresis เติม 1X TBE ให้ท่วมแผ่นเจล ปรับกำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปสังเกตภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV–Transilluminator) และหาเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อไวรัส (elimination percentage) โดยคำนวณจาก

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

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

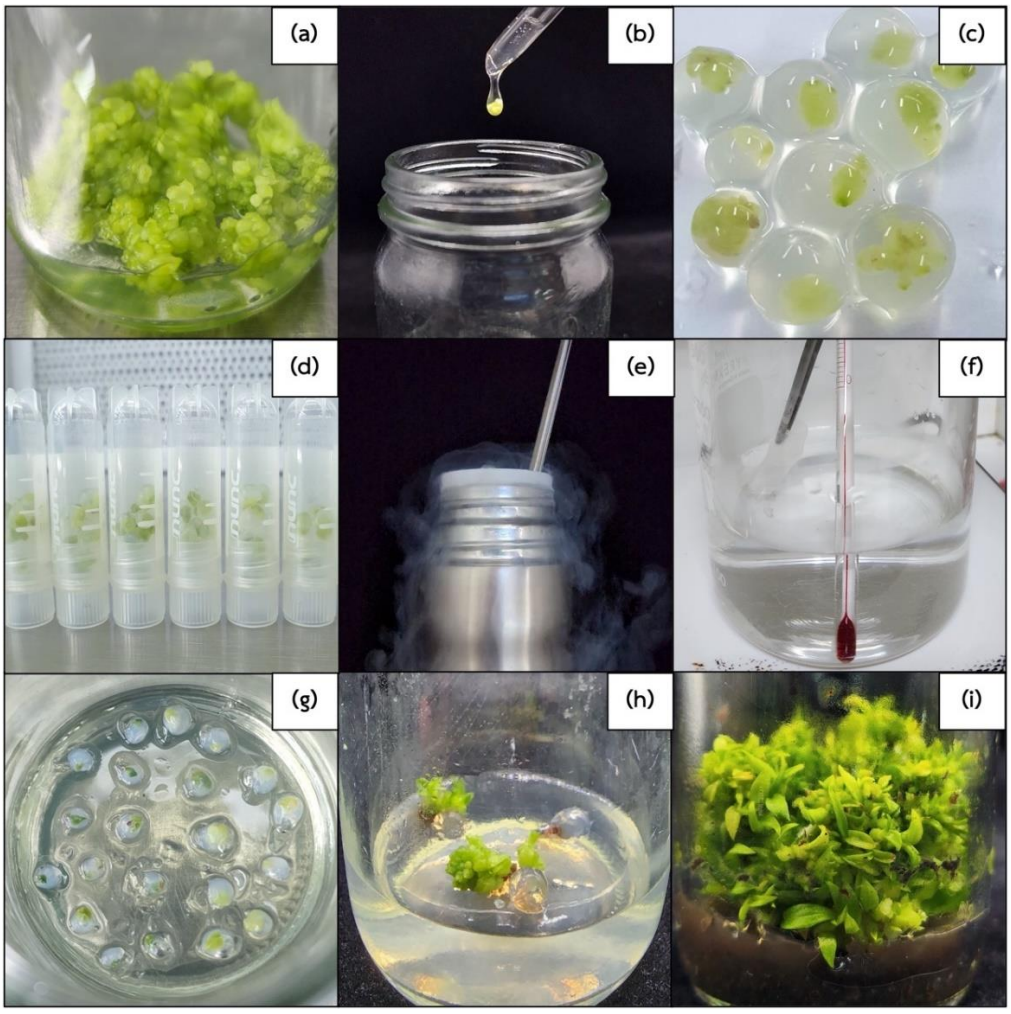

Figure 1 Production of artificial seed from PLBs for cryo–treatment procedures. PLBs of *Dendrobium* Shavin White 'White 5N' (a), PLBs individually collected of the sodium alginate solution and dropped in $CaCl_2$ solution (b), encapsulated PLBs (c), beads in cryotube (d), freezing in liquid nitrogen (e), warming in 40°C water bath for 3 min (f), cryo–treated PLBs were transferred on modified semi–solid Vacin and Went (VW) (g), recovered PLBs at 8 weeks after cryo–treatment (h) and 16 weeks (i) on modified semi–solid VW supplemented 15% coconut water 2% sucrose 10% homogenized banana 5% homogenized potato 0.1% activated charcoal and 0.3% gellan gum.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึง สัปดาห์ที่ 4 หลังจากการนำเมล็ดเทียมแช่ในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า PLBs มีการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาในการแช่ไนโตรเจนเหลวที่เพิ่มขึ้น (**Figure 2**) โดยเฉพาะที่เวลาตั้งแต่ 20 วินาทีขึ้นไป PLBs ตายทั้งหมด หลังทำการทดลองเพียง 1 วัน PLBs ที่ตายจะเปลี่ยนเป็นสีขาว (**Figure 4c**) ทั้งนี้สังเกตได้ว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแต่ละทรีตเมนต์จะค่อย ๆ ลดลง เมื่อเวลาการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งครบ 8 สัปดาห์ พบว่า มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยในชุดควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด (95%) รองลงมาคือ กลุ่มที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวนาน 1–7 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ย 40–70% กลุ่มที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวนาน 8–10 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 20% (**Figure 3a**) แสดงว่าการปรับสภาพ PLBs ก่อนทำให้อยู่ในสภาพเย็นจัดยังต้องได้รับการปรับปรุง ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อความมีชีวิตรอดหลังแช่ในไนโตรเจนเหลวนั้น ประกอบด้วย ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ (ชนิด ขนาด โครงสร้างและลักษณะทางกายภาพของชิ้นส่วน) เทคนิคหรือวิธีการในการเตรียมชิ้นส่วน ตลอดจนการละลายน้ำแข็ง และวิธีการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด (สุมนทิพย์ และคณะ, 2555) โดย Engelman (2004) ได้กล่าวว่า ขนาดของชิ้นส่วนมีความสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิต โดยชิ้นส่วนมีขนาดเล็กจนเกินไป อาจเกิดการสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชอาจแห้งตายได้ จากรายงานการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้เขาแพะโดยใช้โปรโตคอร์ม (protocorm) ขนาด 0.5–1 มิลลิเมตร ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 45 วัน ด้วยวิธีการแบบ encapsulation–dehydration ที่อุณหภูมิ –80°C นาน 7 วัน พบมีอัตราการรอดชีวิต 60% ขณะที่การใช้ PLBs และเก็บที่อุณหภูมิ –196°C สามารถทนได้เพียง 10 วินาที โดยเหลือการรอดชีวิตเพียง 20% โดยการตายของ PLBs ที่เกิดขึ้น น่าจะเกิดจากค่าความต่างศักย์ของน้ำในช่องว่างระหว่างเซลล์มีค่าสูงกว่าในไซโตพลาสซึม น้ำภายนอกเซลล์หรือช่องว่างระหว่างเซลล์จึงกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง และทำให้เซลล์พืชตายในที่สุด (Steponkus et al., 1992; Mikula et al., 2005)

เปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโต และลักษณะการเจริญเติบโตของ PLBs

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโตของ PLBs อายุ 8 สัปดาห์ หลังจากการนำเมล็ดเทียมแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลาต่าง ๆ พบว่า เปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโตแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยชุดควบคุม และกลุ่มที่แช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 1–7 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโตเฉลี่ยสูงที่สุด 62.50–88.89% และไม่ต่างจากชุดควบคุม รองลงมาคือกลุ่มที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 8 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโตเฉลี่ย 50.0% ส่วนกลุ่มที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 9–10 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโตของ PLBs น้อยที่สุดเพียง 25.0% (**Figure 3b**) ทั้งนี้ หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลาต่าง ๆ แล้วเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า PLBs มีการเปลี่ยนแปลง โดยแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ดังนี้ 1) PLBs ที่รอดชีวิต ภายในมีสีเขียว มีการเติบโต ขยายขนาด และดันทะลุผ่านวุ้นที่เคลือบออกมาภายนอก (**Figure 4b**) 2) PLBs ที่ตายมีสีขาวและไม่มีการเจริญเติบโต (**Figure 4c**) 3) PLBs ที่สามารถเติบโตได้หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว แต่ไม่สามารถดันทะลุผ่านวุ้นที่เคลือบออกมาได้ ส่งผลให้ PLBs เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในที่สุด (**Figure 4d**) ซึ่งพบได้ในกลุ่มที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว 0–10 วินาที โดยพบมากที่สุดในกลุ่มที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 8–10 วินาที

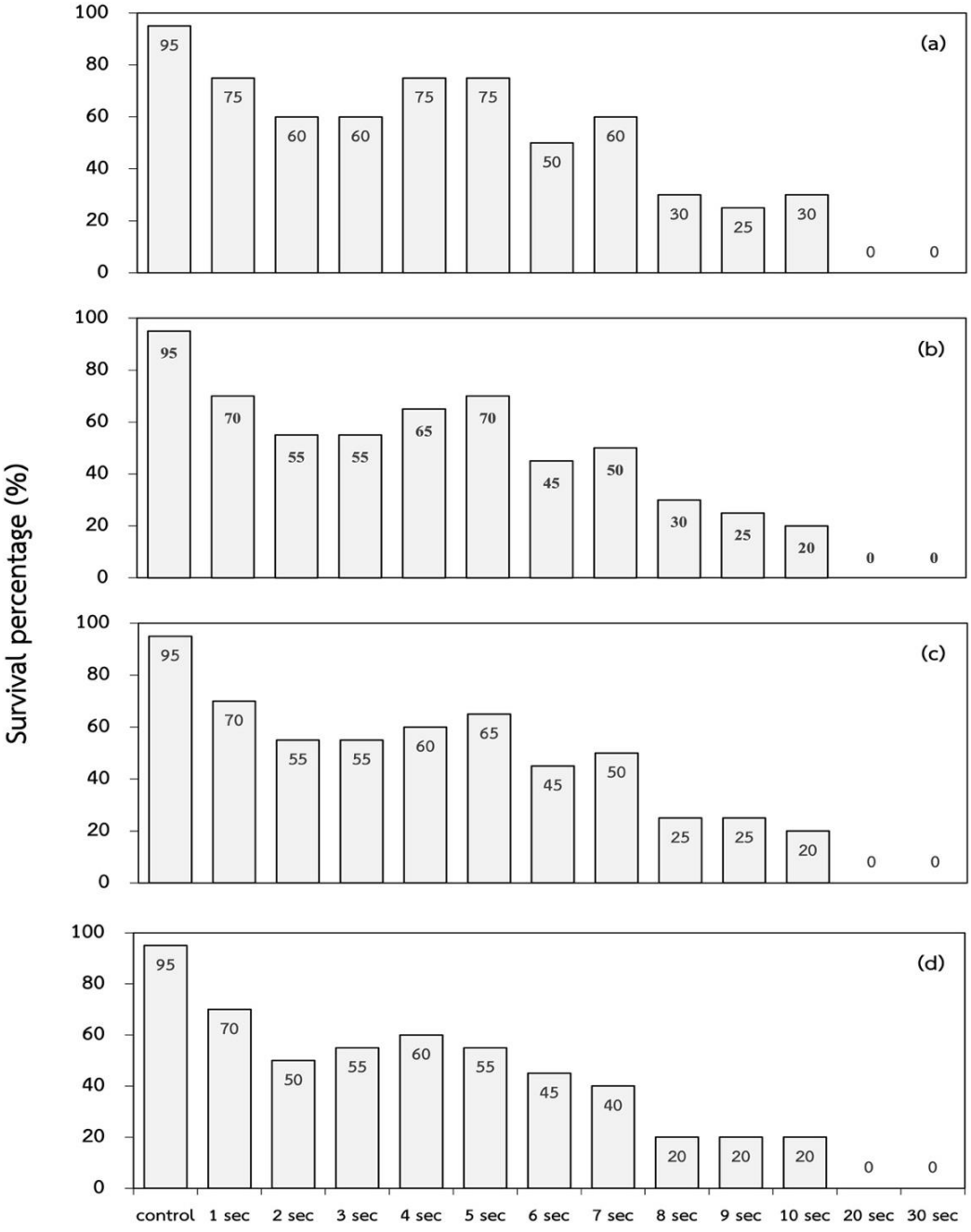

Figure 2 Survival percentage of dehydrated encapsulated PLBs *Dendrobium* Shavin White 'White 5N' at 1 week (a), 2 weeks (b), 3 weeks (c) and 4 weeks (d) after subjected to –196°C.

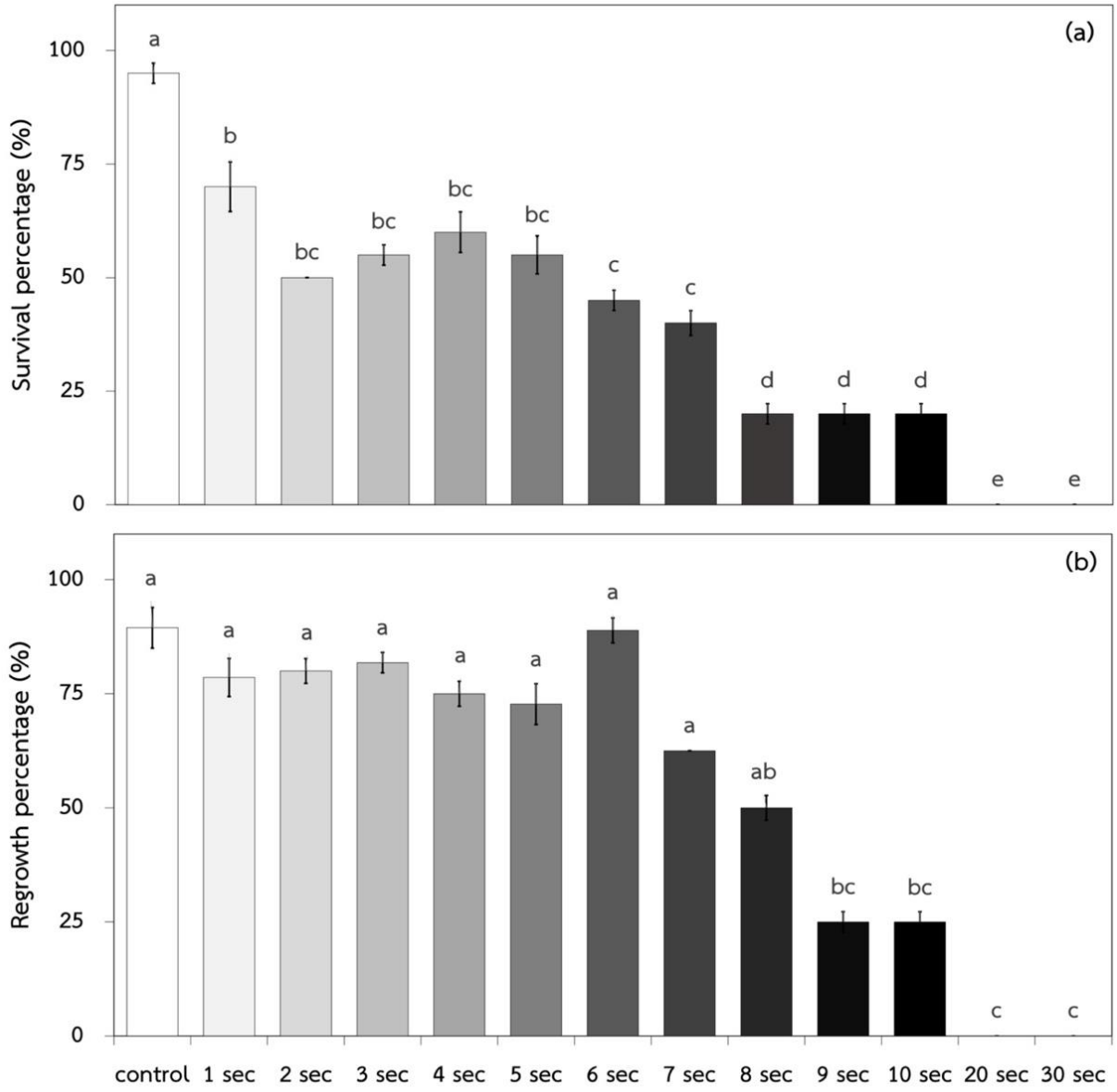

Figure 3 Survival percentage (a) and regrowth percentage (b) of dehydrated encapsulated PLBs *Dendrobium* Shavin White 'White 5N' at 8 weeks after subjected to –196°C. Vertical bars indicate confidence intervals; letters denote significant differences among results of each treatment at **α** = 0.01 (Duncan's new multiple rang test)

Figure 5 เมื่อพิจารณาการพัฒนาของ PLBs ในเมล็ดเทียม หลังผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวจนกระทั่งเกิดเป็นยอดอ่อน ใช้ระยะเวลาทั้งหมด 16 สัปดาห์ โดย PLBs ที่รอดชีวิตจะค่อย ๆ เจริญเติบโตและพัฒนาเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่เป็นก้อนกลมอยู่ภายในเมล็ดเทียมในช่วง 1–4 สัปดาห์แรก (**Figure 4a และ 4b**) จากนั้นเมื่อครบ 6 สัปดาห์ PLBs สามารถดันทะลุผ่านวุ้นที่หุ้มอยู่ออกมาภายนอกได้ (**Figure 4C**) และเกิดการเพิ่มจำนวนและพัฒนาเป็นยอดขนาดเล็กได้ ภายใน 8–12 สัปดาห์ (**Figure 4D, 4E**) ทั้งนี้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% มันฝรั่งปั่น 5% กล้วยหอมปั่น 10% น้ำตาลทราย 2% gellan gum 0.3% และผงถ่านกัมมันต์ 0.1% (สูตรอาหารสำหรับชักนำต้น และรากของกล้วยไม้) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ กลุ่มยอดสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ปกติ (**Figure 4F**)

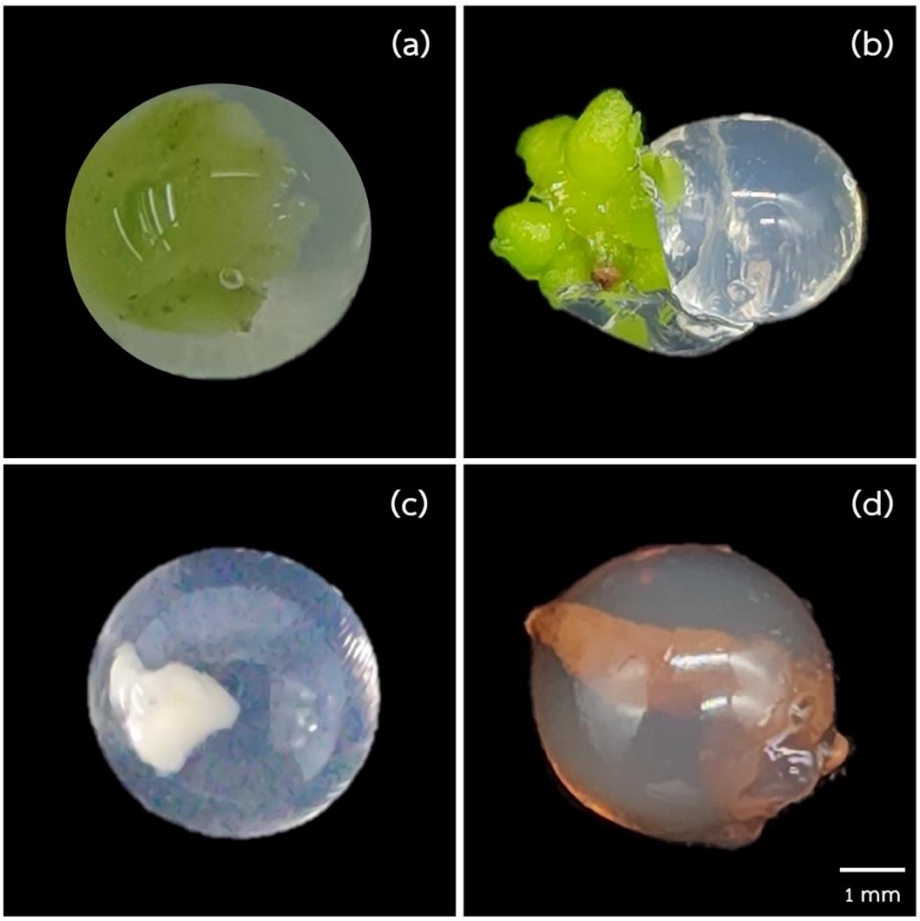

Figure 4 Normal PLBs in beads after dipped in liquid nitrogen (a), regrowth of *Dendrobium* Shavin White 'White 5N' PLBs at 8 weeks after subjected to –196°C (b), PLBsl death at 1 day after subjected to –196°C (c) and PLBs death at 8 weeks after subjected to –196°C and cultured on modified semi–solid VW medium.

จากทดลองเห็นได้ว่า PLBs ที่รอดชีวิตในทุกทรีตเมนต์เติบโตกลับขึ้นมาใหม่ได้ แต่มีค่า regrowth แตกต่างกัน เนื่องจาก มี PLBs ที่รอดชีวิตบางส่วนไม่สามารถเติบโตได้ แล้วเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลเข้ม และตายในที่สุด (**Figure 3D**) ซึ่งเกิดขึ้นได้ในทุกทรีตเมนต์ รวมทั้งชุดควบคุม และพบได้มากที่สุดเมื่อผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 8–10 วินาที ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ รัชนก และคณะ (2557) ที่พบว่า เมล็ดเทียมของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร ที่เก็บรักษาโดยวิธี encapsulation–dehydration หลังเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS สามารถมีชีวิตอยู่ได้ 1 สัปดาห์ โดยมีลักษณะสีเขียวอ่อน หลังจากนั้น 1 เดือน ปลายยอดในเมล็ดเทียมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ไม่สามารถเจริญเติบโต และตายในที่สุด นอกจากนี้ยังพบรายงานในพืชหลายชนิดอีกด้วย แอปเปิ้ล (Bettoni et al., 2018; Bettoni et al., 2019) มันฝรั่ง (Wang et al., 2006) และ White yam (*Dioscorea rotundata*) (Ita et al., 2020) ทั้งนี้อาจเนื่องจากขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียม ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืช มีน้ำภายในเซลล์น้อยเกินไป จึงจำเป็นต้องอาศัยเวลาในการดึงน้ำกลับเข้าสู่เซลล์ ทำให้ปฏิกิริยาทางเคมีภายในเซลล์เกิดขึ้นช้ากว่าปกติ (Saranga et al.,1992) ชิ้นส่วนพืชจึงมีการพัฒนาได้ช้าลง ทำให้บางส่วนเกิดการตายก่อนที่จะหลุดออกจากเมล็ดเทียม หรืออาจเกิดจากความแข็งของเมล็ดเทียม มีผลทำให้ชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของอัลจิเนต (alginate) ตลอดจนระยะเวลาในการทำเมล็ดเทียมด้วย (ลัดดาวัลย์, 2552)

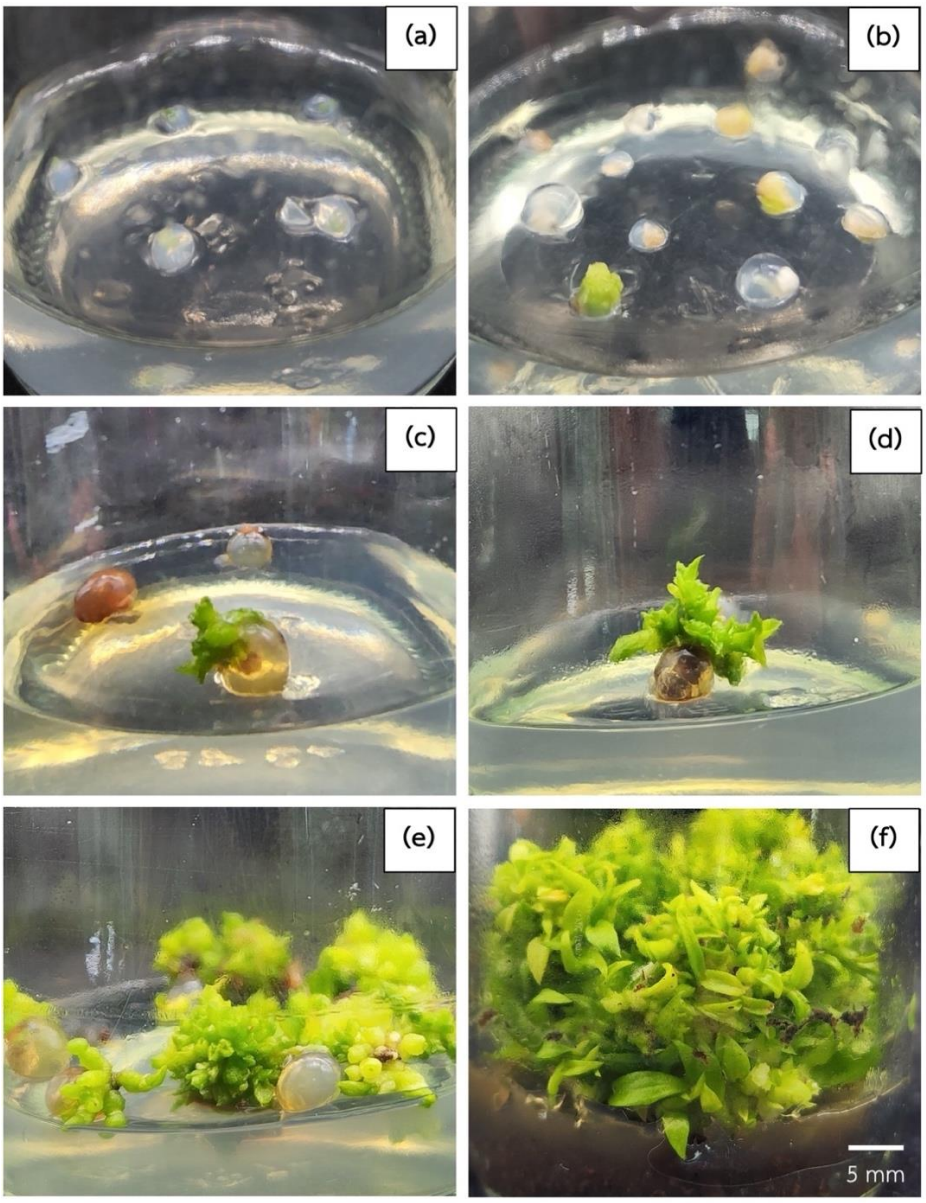

Figure 5 Surviving dehydrated encapsulated PLBs of *Dendrobium* Shavin White 'White 5N'. One day (a) and 4 weeks (b) after subjected to liquid nitrogen. Regrowth of PLBs at 6 weeks (c), 8 weeks (d) and 12 weeks (e) after survival assessment. *In vitro* plantlets at 14 weeks (f) after induced shoot on modified VW medium.

เปอร์เซ็นต์การกำจัดเชื้อไวรัส

ผลการตรวจหาเชื้อ CymMV ด้วยเทคนิค RT–PCR หลังการทำ cryotherapy ที่ระยะเวลาต่าง ๆ และเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร VW ดัดแปลง ครบ 8 สัปดาห์ พบว่า การแช่ในไนโตรเจนเหลวทุกระยะเวลา ไม่สามารถกำจัดเชื้อ CymMV ใน PLBs กล้วยไม้หวายชาวินไวท์พันธุ์ขาว 5N ได้ โดยพบการติดเชื้อ CymMV 100% ในทุกทรีตเมนต์ (**Figure 6**)

Cejas et al. (2012) รายงานว่า การกำจัดเชื้อไวรัสด้วยวิธี cryotherapy ชิ้นส่วนพืชจะถูกแช่ในไนโตรเจนออยู่ที่ประมาณ 60–90 นาที ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบก่อนการทดลอง (preliminary) พบว่า PLBs ที่แช่ในไนโตรเจนเหลวนานกว่า 60 นาที เกิดการตายทั้งหมด ดังนั้นจึงใช้เวลาน้อยกว่า 60 นาที ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า PLBs ที่ถูกแช่ในไนโตเจนเหลวเป็นระยะเวลาไม่เกิน 10 วินาที สามารถเติบโตได้ แต่เมื่อนำมาตรวจสอบเชื้อ CymMV ด้วยเทคนิค RT–PCR พบว่าไม่มีชิ้นส่วน PLBs ที่ปราศจากเชื้อไวรัสในทุกทรีตเมนต์ อาจเป็นเพราะระยะเวลาที่ PLBs แช่ในไนโตเจนเหลวสั้นเกินกว่าที่จะกำจัดเชื้อ CymMV ได้ ทั้งนี้ Ita et al. (2020) รายงานการกำจัดเชื้อ *Yam mosaic virus* จากตาข้างของต้น *Dioscorea rotundata* ด้วยวิธี encapsulation–dehydration หลังแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ 100% ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการกำจัดเชื้อ ASPV ในแอปเปิ้ล ที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ 100% หลังแช่เมล็ดเทียมในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง (Bettoni et al., 2019) อย่างไรก็ตาม Ackerman, 2015 ได้รายงานการกำจัดเชื้อ CymMV และ ORSV โดยใช้เทคนิคการรักษาด้วยความเย็นจัด ด้วยเทคนิค vitrification กับ PLBs กล้วยไม้สกุลหวาย 2 พันธุ์ โดยการทำ dehydration ด้วยการปรับสภาพชิ้นส่วนด้วยน้ำตาล 0.3 โมลาร์ และน้ำมะพร้าว 15% นาน 3 วัน และแช่ในสารละลาย PVS2 นาน 20 นาที จากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า ไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์ regeneration และเปอร์เซ็นต์การการปลอดเชื้อไวรัส เช่นกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เพิ่มเติม เช่น เทคนิคการห่อหุ้มชิ้นส่วน ชนิดและความเข้มข้นของวุ้นอัลจิเนต ระยะเวลาในการทำเมล็ดเทียม ชนิดและระยะเวลาในการแช่สารละลาย cryoprotectant เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการแช่ในไนโตรเจนเหลวให้นานขึ้น และทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วน PLBs เพิ่มสูงขึ้นด้วย

ดังนั้น จากการศึกษานี้ถึงแม้ว่าการรักษาด้วยความเย็นจัด แบบ encapsulation–dehydration เพื่อกำจัดเชื้อ CymMV ในระยะ PLBs ของกล้วยไม้หวายชาวินไวท์พันธุ์ขาว 5N ยังไม่ประสบความสำเร็จ แต่ได้ทราบถึงระยะเวลาความทนทานของ PLBs (กลุ่มเซลล์ที่มีความบอบบาง) ต่อไนโตรเจนเหลว ทำให้ PLBs สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาและพัฒนาเทคนิคและวิธีการต่อไป

สรุป

เมล็ดเทียมที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนทุกระยะเวลา มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเรื่อย ๆ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึง 4 การแช่ในไนโตรเจนเหลวนานมากกว่า 10 วินาที ทำให้ PLBs เกิดการตายทั้งหมด ส่วนการแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 8–10 วินาที มีการรอดชีวิตเพียง 20% และการแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 1–5 วินาที มีการรอดชีวิต 50–70% สำหรับเปอร์เซ็นต์การกลับมาเติบโต พบว่า การแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 1–7 วินาที มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 62.50–88.89% และไม่แตกต่างจากชุดควบคุม โดย PLBs ที่รอดชีวิตสามารถเติบโตเป็นต้นได้ แต่ทุกทรีตเมนต์ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัส CymMV ใน PLBs ได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร.สิทธิศักดิ์ แสไพศาล หัวหน้ากลุ่มงานไวรัสวิทยา และเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้การสนับสนุนด้านเทคนิค อุปกรณ์และสถานที่ ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT–PCR

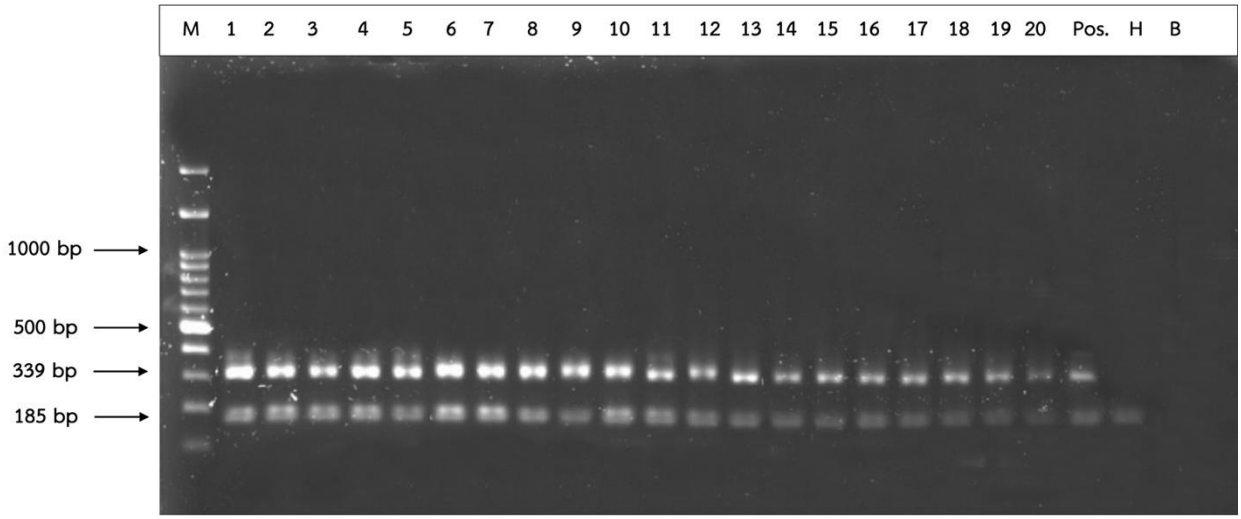

Figure 6 Representative electrophoretic analysis of reverse transcription PCR (RT–PCR) products of Cymbidium mosaic virus (CymMV) after cryotherapy. Molecular marker (M); the infected *Dendrobium* Shavin White 'White 5N' PLBs that were tested (1–20); positive control (Pos); negative control (H) and H_2O (B)

เอกสารอ้างอิง

เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์. 2563a. Tissue culture for conservation. เอกสารประกอบการสอน วิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทางการเกษตร รหัสวิชา 01007555. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์. 2563b. Virus free plant production. เอกสารประกอบการสอน วิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทางการเกษตร รหัสวิชา 01007555. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พันทิพา ลิ้มสงวน. 2553. การกำจัด *Cymbidium mosaic virus* ในกล้วยไม้สกุลหวาย โดยเคมีบำบัดและเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. พันธุศาสตร์. สำนักพิมพ์ ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

รัชนก ทองเวียง, ศิริลักษณ์ อินทะวงศ์, สุกัลยา ศิริฟองนุกูล และวรกิจ ห้องแซง. 2557. การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชวงศ์ขิง (ขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร) โดยใช้เทคนิค Cryopreservation. แหล่งข้อมูล: https://www.doa.go.th/plan/wp–content/uploads/2021/05/413–การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชวงศ์ขิง–ขมิ้นอ้อย–และว่านทิพยเนตร–โดยใช้เทคนิค–Cryopreservation.pdf. ค้นเมื่อ 25 พฤษภาคม 2566.

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ. 2552. เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 (*Vetiveria zizanniodes* Nash) ในไนโตรเจนเหลว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ศิริพร เชื้อจีน. 2545. การใช้สาร Ribavirin และDithiouracil ขจัดเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวายโซเนีย พันธุ์ BOM 17. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สิทธิศักดิ์ แสไพศาส และสุรภี กีระติอังกูร. 2560. โรคไวรัสของกล้วยไม้, น.64–71. ใน อัมพิกา ปุนนจิต, นันทรัตน์ ศุภกำเนิด, ยุพิน กสินเกษมพงษ์ และ ชลธิชา ยวงใย บรรณาธิการ. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. สำนักพิมพ์การันตี, กรุงเทพฯ.

สิทธิศักดิ์ แสไพศาส, สุรภี กีระติอังกูร, เจตน์ มีญาณเยี่ยม และดวงพร บุญชัย. 2565. เปรียบเทียบผลของการติดเชื้อไวรัส *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) ต่อการเจริญเติบโต ปริมาณและคุณภาพดอกของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล (BOM). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 53: 209–225.

สิทธิศักดิ์ แสไพศาส, สุรภี กีระติอังกูร, เจตน์ มีญาณเยี่ยม และดวงพร บุญชัย. 2561. รายงานการวิจัยการพัฒนาการเกษตรฉบับสมบูรณ์ โครงการต้นแบบผลิตกล้วยไม้ตัดดอกปลอดโรคไวรัส. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

สิริมา บำรุง, ดวงพร บุญชัย, อัณณ์ชญาณ์ มงคลชัยพฤกษ์ และพัชรียา บุญกอแก้ว. 2562. ผลของการติดเชื้อ CyMV ต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต และคุณภาพของกล้วยไม้สกุลหวายโซเนียพันธุ์เอียสกุล ในสภาพโรงเรือนที่แตกต่างกัน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 50: 309–322.

สุมนทิพย์ บุนนาค, ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, จตุพร หงส์ทองคำ และแสงเทียน แสงขาว. 2555. การเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เขาแพะ (*Cleisostoma arietinum* (Rchb.f.) Garay) ในพื้นที่โคกภูตากาด้วยวิธี encapsulation–dehydration. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย. 4: 73–82.

สุรภี กีรติยะอังกูร. 2554. โรคของกล้วยไม้จากเชื้อไวรัส และการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการเผยแพร่ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพ.

สุรภี กีระติอังกูร, กิตติศักดิ์ กีระติอังกูร และไมตรี พรหมมินทร์. 2540. การใช้ cocktail primer ที่เหมาะสมในการตรวจไวรัสบนกล้วยไม้ด้วยวิธี multiplex RT–PCR. วารสารโรคพืช. 12: 66–67.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์ และสุวรรณา กลัดพันธุ์. 2544. การขจัด *Cymbidium mosaic virus* ในกล้วยไม้หวายโซเนีย บอม 17 ด้วยสารเคมีในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 32(พิเศษ): 285–290.

อภิชาต ศรีสะอาด, ดนยา อัมภากรสิริ และขจรศักดิ์ แดงโชติ. 2557. 8 สกุลกล้วยไม้ยอดนิยมสร้างเงินล้าน. นาคา อินเตอร์มีเดีย, กรุงเทพฯ.

อรอุสา ลอยทะเล. 2549. วิธีเคมีบำบัดเพื่อการกำจัด *Cymbidium mosaic virus* ในกล้วยไม้พันธุ์การค้าบางพันธุ์. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Ackerman, A. 2015. Investigating cryotherapy as a novel approach to virus elimination in orchids. Thesis for the degree of Master of science in tropical plant and soil sciences. The University of Hawai`i.

Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. Plant Sciences. 27: 141–219.

Bettoni, J.C., J.A. Souza, G.M. Volk, M.D. Costa, F.N. Silva, and A.A. Kretzschmar. 2019. Eradication of latent viruses from apple cultivar 'Monalisa' shoot tips using droplet–vitrification cryotherapy. Scientia Horticulturae. 250: 12–18.

Bettoni, J.C., M.D. Costa, M., J.A. Souza, G.M. Volk, O.N. Nickel, F.N. Silva, and A.A. Kretzschmar. 2018. Cryotherapy by encapsulation–dehydration is effective for *in vitro* eradication of latent viruses from 'Marubakaido'apple rootstock. Journal of Biotechnology. 269: 1–7.

Bhojwani, S.S., and P.K. Dantu. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, India.

Cejas, I., K. Vives, T. Laudat, J. González–Olmedo, F. Engelmann, M.E. Martínez–Montero, and J.C. Lorenzo. 2012. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. Plant cell reports. 31: 2065–2073.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology–Plant. 40(5): 427–433.

Feng, C., R. Wang, J. Li, B. Wang, Z. Yin, Z. Cui, B. Li, W. Bi, Z. Zhang, M. Li, and Q. Wang. 2013. Production of pathogen–free horticultural crops by cryotherapy of *in vitro*–grown shoot tips. p. 463–482. In: M. Lambardi, E.A. Ozudogru, S.M. Jain. Methods in Molecular Biology. Humana Press, USA.

Feng, C., Z. Cui, B. Li, L. Chen, Y. Ma, Y. Zhao, and Q. Wang. 2012. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of *in vitro*-grown apple shoot–tips cryopreserved by encapsulation–dehydration. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 112(3): 369–378.

Folgado, R., B. Panis, K. Sergeant, J. Renaut, R. Swennen, and J. F. Hausman. 2015. Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics. Cryobiology. 71: 432–441.

Helliot, B., B. Panis, Y. Poumay, R. Swennen, P. Lepoivre, and E. Frison. 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). Plant Cell Reports. 20: 1117–1122.

Ita, E.E., E.A. Uyoh, I. Nakamura, and V.O. Ntui. 2020. Efficient elimination of *Yam mosaic virus* (YMV) from white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) by cryotherapy of axillary buds. South African Journal of Botany. 130: 123–129.

Mikuła, A., T. Tykarska, and M. Kuras. 2005. Ultrastructure of *Gentiana tibetica* proembryogenic cells before and after cooling treatments. CryoLetters. 26(6): 367–378.

Pathirana, R., A. McLachlan, D. Hedderley, B. Panis, and F. Carimi. 2016. Pre–treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. Acta Physiologiae Plantarum. 38: 1–11.

Saranga, Y., Y.–H. Kim, and J. Janick. 1992. Changes in tolerance to partial desiccation and in metabolite content of celery somatic embryos induced by reduced osmotic potential. Journal of the American Society for Horticultural Science. 117(2): 342–345.

Steponkus, P. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. Advances in low–temperature biology. 1: 1–61.

Vacin, E.F., and F. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette. 110: 605–613.

Vieira, R.L., A.L. da Silva, G.R. Zaffari, D.A. Steinmacher, H.P. de Freitas Fraga, and M.P. Guerra. 2015. Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. Acta Physiologiae Plantarum. 37: 1–11.

Wang, M., L. Chen, Z. Zhang, D.R. Blystad, and Q. Wang. 2018. Cryotherapy: A novel method for virus eradication in economically important plant species. Plant Cell Culture Protocols. 1815: 257–268.

Wang, Q., and J.P.T. Valkonen. 2009a. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Trends in Plant Science. 14: 119–122.

Wang, Q., and J.P.T. Valkonen. 2009b. Improved recovery of cryotherapy–treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*–grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.). CryoLetters. 30(3): 171–182.

Wang, Q., M. Mawassi, P. Li, R. Gafny, I. Sela, and E. Tanne. 2003. Elimination of *Grapevine virus* A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*–grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. Plant Sciences. 165: 321–327.

Wang, Q., Y. Liu, Y. Xie, and M. You. 2006. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leafroll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY). Potato Research. 49: 119–129.

Wannakrairoj, S. 2008. Impace of *Cymbidium mosaic virus* on growth and yield of *Dendrobium* Jaq–Hawaii cv. Uniwai Pearl. Acta Horticulturae. 788: 167–174.

Yoon, J., H. Kim, H. Ko, H. Hwang, E. Hong, E. Cho, and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: Effect of subculture of mother–plants and of preculture of shoot tips. Cryoletters. 27(4): 211–222.