



การแยก Cucumber Mosaic Virus ที่เป็นสาเหตุของโรคใบด่าง ของพริกในประเทศไทยออกจากไวรัสที่ปะปนอยู่

Isolation of Cucumber Mosaic Virus, the Causal Agent of Pepper Mosaic in Thailand, from the Virus Complex

โสภณ วงศ์แก้ว และ ชีระ สุตะบุตร

Sopon Wongkgew and Thira Sutabutra

ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Isolation of cucumber mosaic virus (CMV), the causal agent of pepper mosaic in Thailand was done by single lesion isolation from *Nicotiana tabacum* Linn. Hick's board leaves. This method was followed by the combination of partial purification method as described by H.A. Scott and density gradient centrifugation. The virus obtained was free from other viruses contamination and remained infectious.

การศึกษาค้นคว้าถึงคุณสมบัติของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ที่ทำให้เกิดโรคใบด่างของพริก มักจะประสบปัญหาในเรื่องการปะปนของไวรัสชนิดอื่น เช่น tobacco mosaic virus (TMV) และ potato virus Y (PVY) อยู่เสมอ ทั้งนี้ เนื่องจากไวรัสทั้งสามชนิดดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรคกับพริกได้ และบ่อยครั้งที่ตรวจพบไวรัสทั้งสามชนิดในพริกที่แสดงอาการเป็นโรค การสังเกตอาการจากภายนอกไม่อาจบอกได้ว่าเกิดจากเชื้อ CMV แต่เพียงอย่างเดียวหรือมีเชื้ออื่นปะปนอยู่ด้วย ดังนั้นการที่จะศึกษาค้นคว้าถึงคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อใดเชื้อหนึ่ง จำเป็นที่จะต้องแน่ใจเสียก่อนว่ามีเชื้อไวรัสเฉพาะชนิดนั้นๆ เพียงชนิดเดียว มิฉะนั้นคุณสมบัติที่ศึกษาได้ จะไม่ใช่คุณสมบัติที่แท้จริงของไวรัสแต่ละชนิด และเนื่องจากการตรวจเชื้อไวรัสโดยการทดสอบกับ antiserum พบว่าไวรัสส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคกับพริกในประเทศไทยเป็นเชื้อ CMV การศึกษาในระยะแรก จึงมุ่งถึงเชื้อชนิดนี้เป็นส่วนใหญ่ และขั้นแรกที่จะทำให้การศึกษาค้นคว้าถึงคุณสมบัติของเชื้อได้ผลถูกต้อง ก็คือการแยกเชื้อชนิดนี้ให้ปราศจากเชื้อชนิดอื่น

อุปกรณ์และวิธีการ

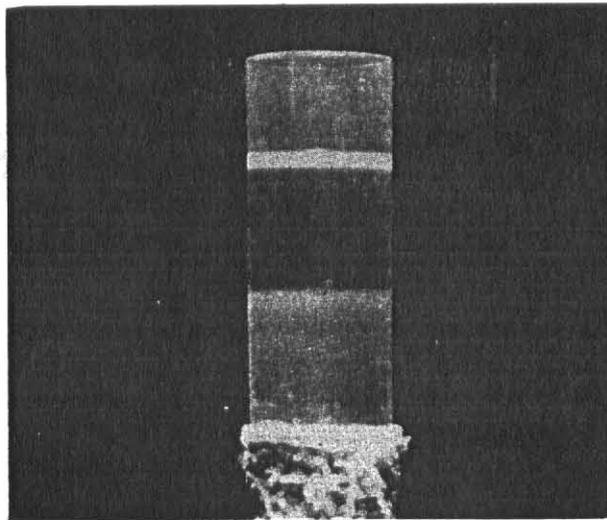
นำเอาใบพริกที่แสดงอาการของโรคใบด่าง ซึ่งได้ทดสอบด้วยวิธีทางเซรัมวิทยาแล้วว่ามีเชื้อ CMV เป็นสาเหตุอยู่ด้วย มาบดด้วยเครื่องที่อบความร้อนฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ phosphate buffer เข้มข้น 0.05M, pH 7.2 เป็น buffer ในอัตราใบพริก 1 กรัมต่อ buffer 3 มิลลิลิตร การรักษาคูณภูมิให้ต่ำกว่ากระทำโดยแช่ใน buffer และใบพริกในช่องเย็นจัดก่อนนำมาบดกรองน้ำคั้นที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง แชน้ำคั้นในน้ำแข็งตลอดเวลา นำน้ำคั้นไปปลูกเชื้อ (inoculate) ลงบนยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum* Linn. Kick's board leaves) โดยใช้วิธีที่ล้างสะอาดจุ่มลงในน้ำคั้นแล้วทาลงบนใบซึ่งโรยผง carborundum ขนาด 600 mesh ไว้แล้วล้างใบที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นหลังจากปลูกเชื้อ 2 นาที เก็บต้นยาสูบนั้นไว้ในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25 ซ. ให้แสงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ สีขาวนวล 40 วัตต์ 2 หลอด และสีชมพู 40 วัตต์ 1

หลอด ต่อ 1 ชุด ตั้งหลอดไฟห่างจากพื้นที่วางกระถาง ประมาณ 18 นิ้ว

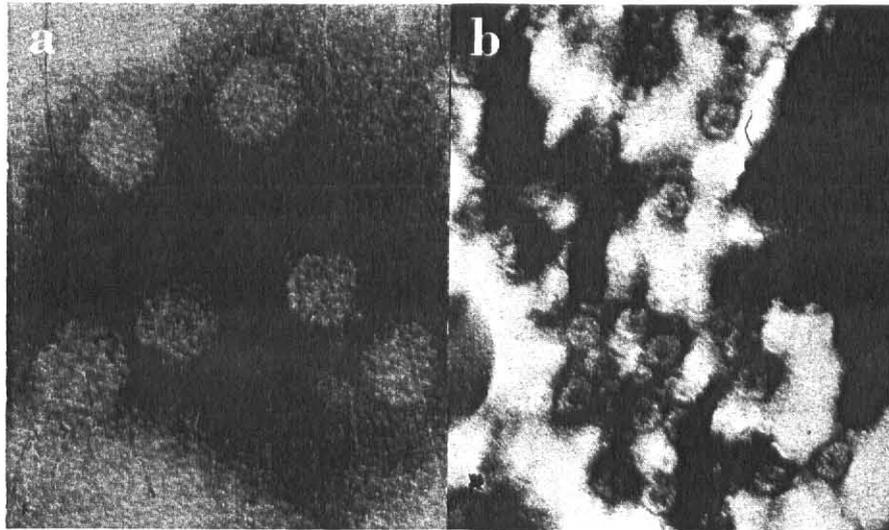
Single lesion isolation หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 5 วัน ใบที่ได้รับการปลูกเชื้อจะแสดงอาการเป็นจุดริ้วสีเหลืองอ่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 มม. ใช้ cork borer เจาะเอาเนื้อเยื่อบริเวณที่แสดงอาการดังกล่าวเพียงจุดเดียว มาบดด้วยโกร่ง และปลูกเชื้อลงบนยาสูบต้นใหม่ ตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้น หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ จึงใช้ยาสูบต้นนี้เป็นแหล่งเชื้อนำไปปลูกเชื้อลงบนยาสูบต้นอื่น ๆ จำนวนมากพอที่จะใช้ในการทำบริสุทธิ์ได้ (purification) เมื่อพืชนี้แสดงอาการชัดเจนแล้วนำมาเข้าขบวนการ differential centrifugation ตามวิธีการเตรียม CMV ค่อนข้างบริสุทธิ์ของ Scott (4) นำสารละลายไวรัส ค่อนข้างบริสุทธิ์ในชั้นสุดท้ายของวิธีการดังกล่าวไปเข้าขบวนการหมุนเหวี่ยงแบบ density gradient centrifugation

Density gradient centrifugation ใช้หลักการของ Brakke (1) และวิธีการที่ใช้ในการเตรียม PVY บริสุทธิ์ (2) โดยบรรจุสารละลายน้ำตาลทราย (sucrose AR grade) ความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำ

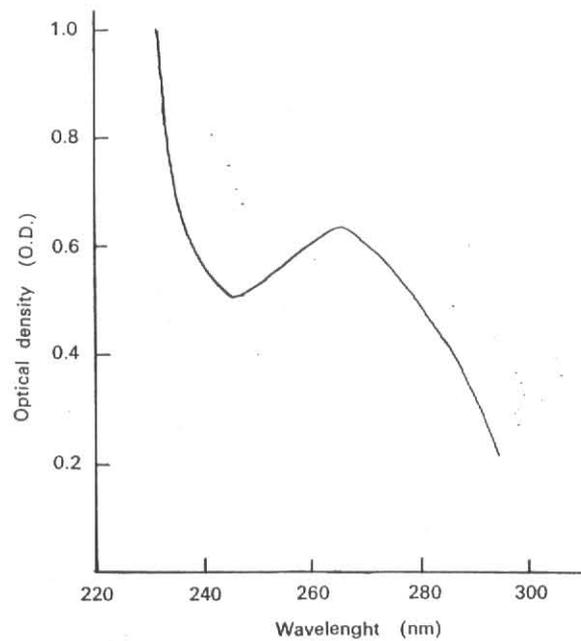
หนักต่อปริมาตร) โดยใช้ borate buffer เข้มข้น 0.005 M, pH 9.0 เป็นตัวทำละลาย ลงในหลอด cellulose nitrate ขนาด 1 x 3 นิ้ว ปริมาณ 4, 7, 7, และ 7 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 4 ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หยอดสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีของ Scott (4) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าของชั้นบนสุดของสารละลายน้ำตาล โดยบรรจุสารละลายไวรัสไว้ในหลอดฉีดที่ต่อกับเข็มฉีดยา ซึ่งงอตรงส่วนโคนในลักษณะที่ปลายเข็มตั้งฉากกับหลอดฉีดยา ขณะปล่อยสารละลายไวรัสปลายเข็มจะขนานไปกับส่วนผิวหน้าของสารละลายน้ำตาล นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Beckman model L ultracentrifuge, rotor type SW 25.1) หมุนด้วยความเร็ว 23,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที แยกชั้นที่มีไวรัสออกโดยดูดด้วยเข็มฉีดยาลักษณะที่กล่าวข้างต้น นำไป dialyse ใน borate buffer ที่ใช้ละลายน้ำตาล ใช้ buffer ประมาณ 40 เท่า ประมาณ 24 ชั่วโมง นำเอา dialysate ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 45,000 รอบต่อนาทีโดยใช้ rotor type 50 นาน 90 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน borate buffer นำไปตรวจดูความบริสุทธิ์



รูปที่ 1. หลอดซึ่งได้ผ่าน density gradient centrifugation 23,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที แถบสีขาวขุ่นอยู่ห่างจาก meniscus 2.2 ซม. เป็นแถบซึ่งมี Cucumber mosaic virus บริสุทธิ์



รูปที่ 2. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของ cucumber mosaic virus ที่แยกได้จากพริก ตัวอย่างที่ใช้เป็นไวรัส ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี density gradient centrifugation แล้ว a) ลักษณะอนุภาคเมื่อย้อมด้วยวิธี negative staining ด้วย phosphotungstic acid เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ pH 6.5 อนุภาคของไวรัสได้รับการ fix ด้วย glutaraldehyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการย้อมสี (X456,000) b) ลักษณะอนุภาคเมื่อย้อมด้วย uranyl acetate 3 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็น internal core (X195,600)



รูปที่ 3. Absorbancy curve ของเชื้อ CMV จากพริก ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี density gradient centrifugation แล้ว

การตรวจความบริสุทธิ์ที่กระทำโดย นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การทำ absorbancy curve โดยใช้ ultraviolet spectrophotometer (Beckman DB-G grating spectrophotometer) และการปลูกเชื้อลงบน assay host ซึ่งใช้ยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana glutinosa* Linn.) ตรวจดูการประปนของเชื้อ TMV

ผลการทดลอง

การทำ density gradient centrifugation ตามเวลาดังกล่าวจะให้ชั้นของไวรัสเป็นแถบสีขาวหนาประมาณ 3 มม. อยู่ห่างจากผิวหน้าของสารละลาย 2.2 ซม. (วัดตรง miniscus รูปที่ 1) การตรวจดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบแต่อนุภาคที่มีลักษณะกลมแต่เพียงอย่างเดียวซึ่งทดสอบได้ว่าเป็นอนุภาคของ CMV (รูปที่ 2) การทดสอบโดยใช้ยาสูบใบเล็กเป็น assay host ไม่พบว่ามี การประปนจากเชื้อ TMV และ absorbancy curve ดังในรูปที่ 3 ซึ่งคล้ายกับ curve ของ Q. CMV (3) ลักษณะของ curve เป็น nucleoprotein ชนิดเดียว และมีการประปนจากโปรตีนอย่างอื่นน้อยมาก

วิจารณ์

วิธีการที่ใช้แยก CMV ออกจาก PVY และ TMV ในรายงานนี้ ถึงแม้จะยุ่งยากแต่ก็เป็นวิธีที่แยกได้ผลดี และน่าจะเป็นวิธีที่ปรับใช้ได้กับไวรัสอื่นๆ ที่หา selective host ไม่ได้หรือสำหรับไวรัสที่เสื่อมสมบัติได้ง่าย (labile) และไม่สามารถแยกได้โดยอาศัยสมบัติทางกายภาพอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

1. BRAKKE, M.K. 1953. Zonal separation by density gradient centrifugation. Arch. Biochem. Biophys. 45:275-290.
2. DELGADO-SANCHEZ S. and R.G. GROGAN. 1966. Purification and properties of potato virus Y. Phytopathology 56: 1397-1404.
3. FRANCKI, R.I.B., J.W. RANGLES, T.C. CHAMBERS and S.B. WILSON. 1966. Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain). Virology 28:729-741.
4. SCOTT, H.A. 1963. Purification of cucumber mosaic virus. Virology 20:103-106.