

คุณสมบัติทางสัณฐานและกายภาพของ Tobacco Mosaic

Virus-Orchid Strain ในประเทศไทย

Morphological and Physical Properties of Tobacco Mosaic Virus-Orchid Strain in Thailand

สาวิต โพธิ์แก้ว และ ชีระ สุตะบุตร

Savit Pokaew and Thira Sutabutra

ภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Tobacco mosaic virus-orchid strain was isolated from orchid (*Cattleya* sp.) showing flower breaking symptom. This Thai isolate was found to be a stiff rod of 328 ± 40.60 nm in length. Its thermal inactivation point was between 80-90 C, dilution end point between 1:100,000-1:1,000,000 and longevity *in vitro* at 25 C between 30-40 days.

ในการตรวจเชื้อไวรัสในแคทลียาที่เป็นโรคดอกต่าง (flower breaking) มักจะพบเชื้อไวรัสอยู่ 2 ชนิด คือ *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) และ tobacco mosaic virus-orchid strain (TMV-O) เชื้อ TMV-O เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรค(2) ปกติโรคนี้พบได้เสมอในแหล่งกล้วยไม้ทั่วไป โรคนี้นอกจากจะทำให้สีของดอกผิดปกติแล้ว ยังทำให้ใบต่างจนถึงใบใหม่ รากมีอาการเน่าแห้ง แคทลียาที่เป็นโรคจะมีอาการเจริญเติบโตลดลงกว่าปกติ ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคสามารถแพร่กระจายไปได้ง่ายและรวดเร็ว โดยการแตะต้องหรือติดไปกับเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ เช่น มีด กรรไกร ที่ใช้ในการตัดดอกและการตัดแต่ง (5) การขยายพันธุ์โดยการตัดแยกหรือปักชำจากต้นที่เป็นโรค ทำให้โรคแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวาง ยากแก่การป้องกันและกำจัด การศึกษานี้เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานและคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อ TMV-O

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของ TMV-O

นำใบแคทลียาที่เป็นโรคมารวบรวมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Hitachi type Hu-110-1) เพื่อหาอนุภาคของไวรัส โดยวิธี Brandes' dip แล้วย้อมแบบ negative staining(1) โดยใช้ phosphotungstic acid 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับให้มี pH 6.7 ด้วย KOH หรือ shadow cast ด้วยโลหะผสมระหว่าง Platinum กับ Paradium (Pt 80%, Pa 20%) ซึ่งรายงานไว้โดย Carbett (2) บน grid ทองแดงขนาด 400 mesh ที่คลุมด้วย Colloidion membrane

วัดขนาดของไวรัสจำนวน 774 อนุภาคโดยใช้ Polystyrene latex ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 365 nm เป็นบรรทัดฐาน

คุณสมบัติทางกายภาพของ TMV-O

เนื่องจากในแคทลียาที่เป็นโรคมีเชื้อไวรัสอยู่ 2 ชนิด ซึ่งจำเป็นจะต้องแยก (isolate) ให้ได้เชื้อ TMV-O แต่เพียงอย่างเดียว โดยใช้ บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa* Linn.) เป็นพืชแยก นำใบแคทลียาซึ่งแสดงอาการของโรคมารดใน phosphate buffer เข้มข้น 0.05

M pH 7.2 ในอัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อ buffer 1 มิลลิลิตร กรองน้ำคั้นด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น น้ำกรองที่ได้นำไป inoculate *G. globosa* โดยใช้สาลี่ที่สะอาด พั่นปลายไม้ชุบน้ำกรองทาลงบนใบพืชซึ่งได้โรยผง carborundum ขนาด 600 mesh ทั้งไว้ประมาณ 5 นาที ใช้สาลี่ล้างออกแล้ว นำไปเก็บไว้ในเรือนกระจก ภายใน 5-7 วัน *G. globosa* จะแสดงอาการจุดสีน้ำตาลอ่อนขึ้น ตัดบริเวณจุดสีน้ำตาลอ่อนเพียงจุดเดียวไปบดใน phosphate buffer เช่นเดิม นำไป inoculate *G. globosa* ต้นใหม่ จะเกิดอาการจุดสีน้ำตาลเช่นเดิมบน *G. globosa* ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์โดยนำเชื้อจาก *G. globosa* inoculate *Cassia occidentalis* Linn. ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อ CyMV เท่านั้น

ใช้ *G. globosa* ที่มีใบประมาณ 2-3 คู่ เป็นพืชทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

Dilution end point

นำน้ำคั้นจากใบ *G. globosa* ซึ่ง inoculate TMV-O ไว้แล้ว 7-9 วัน มาทำ dilution series ด้วย phosphate buffer 0.5 M pH 7.2 ให้เจือจาง 1:10, 1:100 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 และ 1:1,000,000 แต่ละความเข้มข้น inoculate ลงบนใบ *G. globosa* จำนวน 8 ครั้งใบที่มีอายุเท่าๆกัน ส่วนอีก 8 ครั้งใบ (half leaf) ที่เหลือปลูกเชื้อด้วยน้ำกรองที่ไม่เจือจางเป็น control นับจำนวนแผลที่เกิดขึ้น Thermal inactivation point

Thermal inactivation point

นำน้ำกรองของ *G. globosa* ซึ่งเตรียมโดยวิธีเดียวกับที่ใช้ในการศึกษา dilution end point มาใส่หลอดแก้วผนังบางขนาด 7×70 มม. จำนวน 4 หลอด หลอดละ 1 มม. หลอดที่หนึ่งปลูกเชื้อบน *G. globosa* จำนวน 24 ครั้งใบเป็น control ส่วนอีก 3 หลอดแช่น้ำร้อนในเครื่อง hot water bath ซึ่งปรับอุณหภูมิต่างๆกันที่ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส แต่ละอุณหภูมิใช้เวลา 10 นาที แล้วแช่ลงในน้ำเย็นจัดทันที นำไป inoculate บนใบ *G. globosa* จำนวน 8 ครั้งใบต่ออุณหภูมิ

ภูมิ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการศึกษา dilution end point

Longevity in vitro

นำน้ำกรองของใบ *G. globosa* ซึ่งเตรียมได้มาใส่หลอดแก้วขนาด 7×70 มม. จำนวน 5 หลอด ละครึ่งหลอดที่หนึ่งปลูกเชื้อบนใบ *G. globosa* จำนวน 8 ใบทันที เพื่อเป็น control นำน้ำกรองที่เหลืออีก 4 หลอดเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 31-33 C.) เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 40 วัน แล้วจึงนำน้ำกรองแต่ละหลอดไป inoculate บนใบ *G. globosa* จำนวน 8 ใบต่อ treatment

ผลการทดลอง

ลักษณะทางสัณฐานของ TMV-O

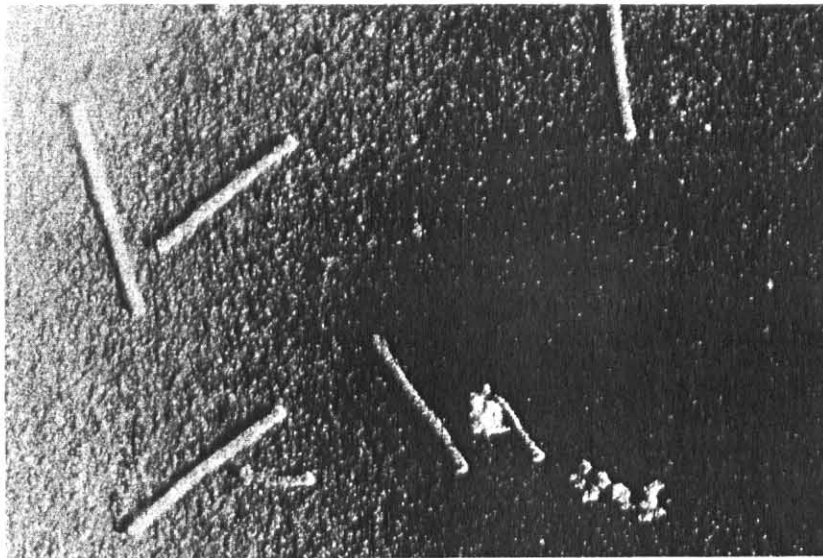
อนุภาคของเชื้อ TMV-O (รูปที่ 1,2) มีลักษณะเป็นท่อนตรงสั้น (stiff rod) และช่องว่างกลางตลอดท่อน จากการวัดขนาดของไวรัสจำนวน 774 อนุภาค พบว่าอนุภาคส่วนใหญ่มีความยาวในช่วง 310-330 nm (รูปที่ 3) โดยมีความยาว 328 ± 40.60 nm.

คุณสมบัติทางกายภาพของ TMV-O

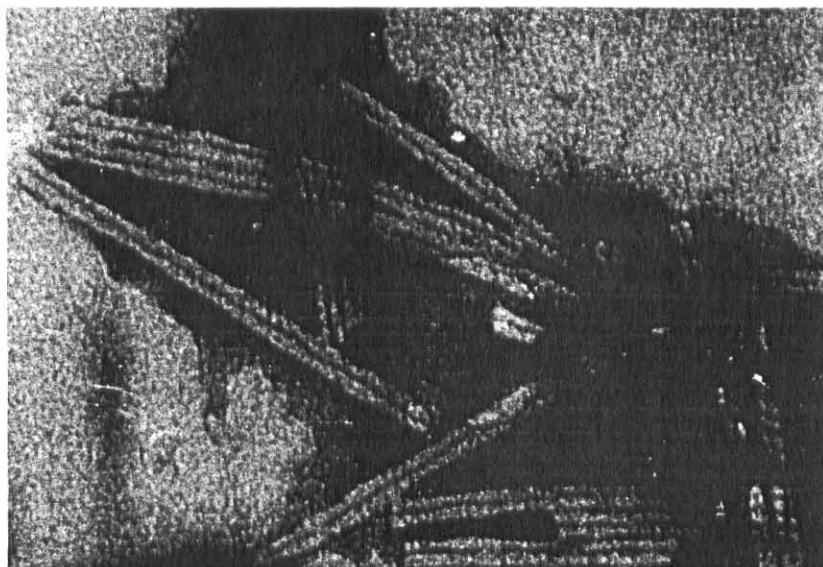
ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 dilution end point อยู่ระหว่าง 1:100,000 ถึง 1:1,000,000, thermal inactivation point อยู่ระหว่าง 80-90 C., longevity in vitro ระหว่าง 30-40 วัน

วิจารณ์

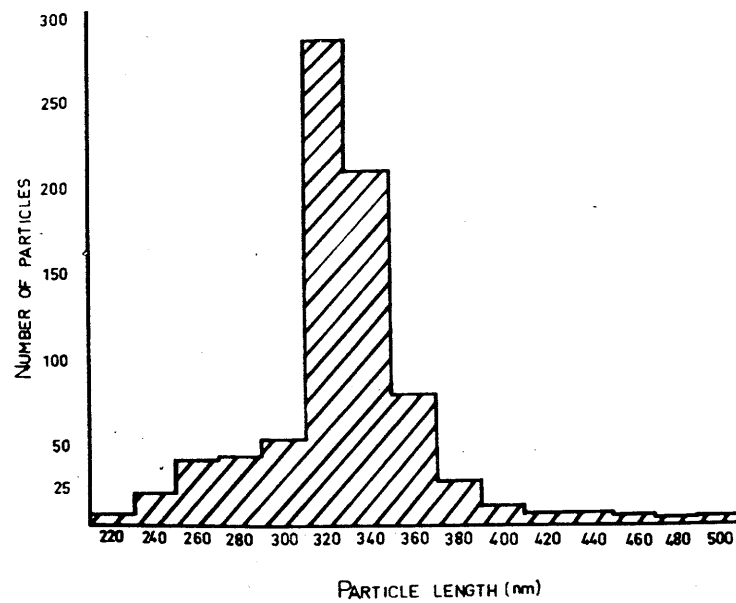
TMV-O ซึ่ง isolate จากแคทลียาในประเทศไทยมีลักษณะเป็นท่อนสั้นตรง (stiff rod) ส่วนใหญ่มีความยาวอยู่ในช่วง 310-330 nm โดยพบว่าอนุภาคจำนวน 19 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวต่ำกว่า 310 nm และ 18 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความยาวกว่า 350 nm จากการคิดค่าเฉลี่ยพบว่า TMV-O มีความยาว 328 ± 40.60 nm ซึ่งใกล้เคียงกับความยาวของ TMV-O ที่พบในแคทลียา



รูปที่ 1. อนุภาคของ TMV-O ซึ่งได้จากการเตรียมโดยวิธี Brandes' dip แล้ว shadow cast ด้วย platinum-paradium (X 78,000)



รูปที่ 2. อนุภาคของเชื้อ TMV-O ซึ่งได้จากการเตรียม specimen โดยวิธี negative staining ด้วย phosphotungstic acid แสดงให้เห็นว่าอนุภาคของไวรัสเป็นท่อนซึ่งมีช่องว่างกลางตลอดท่อน (X 200,000)



รูปที่ 3. กราฟแสดงความยาวของอนุภาค TMV-O ที่พบในแคทลียา ซึ่งแสดงอาการดอกด่างในประเทศไทย

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อ Tobacco mosaic virus-orchid strain (TMV-O)

Physical properties	Infectivity ¹	
	อัตราส่วนกลับของความเข้มข้น	
Dilution end point	0	18.6
	10	11.0
	100	5.9
	1,000	3.0
	10,000	1.4
	100,000	0.5
	1,000,000	-
	อุณหภูมิ (องศาเซนติเกรด)	
Thermal inactivation point	70	11.3
	80	5.5
	90	-
	ระยะเวลา (วัน)	
Longevity <i>in vitro</i>	10	7.2
	20	3.5
	30	1.2
	40	

¹ จำนวนแผลเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ๆ ละ 8 ครั้งใบ

ที่รายงานโดย Gold (3) Newton and Rosberg (7) Murakishi (6) และ Corbett (2) ประมาณ $18-25 \times 280-325$ nm

TMV-O ที่พบในประเทศไทยนี้มี dilution end point ระหว่าง $1:100,000-1:1,000,000$ thermal inactivation point ระหว่าง 80-90 องศาเซลเซียส และ longevity *in vitro* ไม่ถึง 40 วัน ซึ่งไม่แตกต่างกับ TMV-O ในแคตลียาที่รายงานโดย Murakishi (6) Kado (4)

เอกสารอ้างอิง

1. BRENNER, S., and R.W. HORNE. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy to viruses. *Biochem. Biophys. Acta* 34:103-110.
2. CORBETT, M.K. 1967. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of tobacco mosaic viruses. *phytopathology* 57:164-172.
3. GOLD, A.H. 1950. Particles, possibly virus, isolated from orchids. (Abstr.) *Phytopathology* 40:965.
4. KADO, C.I. 1970. Virus diseases of orchid. *Cal. Agr. Exp. Sta. Serv. Cir.* 552. Cal. 15 p.
5. LAWSON, R. 1970. Virus induced color-breaking in *Cattleya* orchid flowers. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 39:395-400.
6. MURAKISHI, H.H. 1958. Host range, Symptomatology, physical properties and cross-protection studies of orchid virus isolated. *phytopathology* 48:132-134.
7. NEWTON, N. and D.W. ROSBERG. 1952. Electron microscope studies of a new orchid virus complex. *Phytopathology* 42:79-82.