

ลักษณะทางสัณฐานและเซรุ่มวิทยาของ Cymbidium Mosaic Virus ในประเทศไทย

Morphology Serology of Cymbidium Mosaic Virus in Thailand

ปราณี ก่อประดิษฐ์สกุล และ ชีระ สุตะบุตร

Pranee Korpraditskul and Thira Sutabutra

ภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Cymbidium Mosaic virus (CyMV) was isolated from Dendrobium hybrides showing mosaic and spindle top symptoms in Thailand. The average length of the virus particles from leaves and flowers of Dendrobium Pompadour and Dendrobium Caesar were found to be 479.5 and 496.3 mμ. Those from leaves and flowers of Dendrobium Indonesia were 450.4 and 467.8 mμ respectively. Differential centrifugation method were used in virus purification. The CyMV antiserum prepared reacted specifically with the virus and in the same pattern as the antiserum from Florida.

กล้วยไม้ในสกุลหวายไทยเฉพาะหวายปอมปาด้วหรือที่เรียกกันว่าหวายมาดาม เป็นกล้วยไม้ที่ใช้เป็นไม้ตัดดอก ทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยปีละกว่า 20 ล้านบาท cymbidium mosaic virus (CyMV) ทำให้หวายลูกผสมต่างๆ เกิดอาการใบด่าง ยอดบิดและข้อสั้นมีขนาดดอกเล็กผิดปกติ CyMV เป็นไวรัสที่ระบาดกว้างขวางมากและทำความเสียหายกับกล้วยไม้แทบทุกชนิด (6) แต่ไวรัสชนิดนี้ยังไม่เคยมีรายงานว่า ทำให้เกิดโรคกับหวายลูกผสม 3 ชนิด มีปลูกมากในประเทศไทย ซึ่งได้แก่ Dendrobium Pompadour, Dendrobium Caesar และ Dendrobium Indonesia คุณสมบัติของไวรัสชนิดนี้ในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษานี้ เป็นการศึกษาคุณสมบัติบางประการของไวรัสชนิดนี้ เพื่อยืนยันชนิดของไวรัส และเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของไวรัส ชนิดเดียวกันกับของประเทศอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาสัณฐาน (Morphology) ของไวรัส นำใบและดอกของหวายปอมปาด้ว หวายชีซาร์ และหวายอินโดนีเซีย ที่แสดงอาการผิดปกติมาศึกษาสัณฐานของไวรัส โดยทำ leaf dip ด้วยวิธีของ Brandes ตามรายงานของ Corbett (1) แล้วย้อมสีโดยวิธี negative staining ด้วย potassium phosphotungstate เข้มข้น 2% pH 6.7 หรือ shadow cast ด้วยโลหะผสมระหว่าง platinum-paradium (Pt 80% Pa 20%) โดยใช้เครื่อง vacuum evaporator Hitachi HUS -3 และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Hitachi type HU - 11c - 1

ในการวัดขนาดของไวรัส ใช้นุภาคของ tobacco mosaic virus (TMV) ซึ่งมีขนาดมาตรฐาน 300 mμ เป็นบรรทัดฐาน

การเตรียมไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์ (Partial purification) เตรียมจากใบอ่อนของหวายซี่ซาร์ที่แสดงอาการต่างอย่างชัดเจน ตามวิธีของ Jensen และ Gold (5) บนใบพืชเป็นโรคใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ที่เย็นจัด ในอัตราส่วนพืช 1 กรัม : buffer 2 มล. ด้วยเครื่องบด (waring blender) กรองกากทั้งด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น น้ำกรองที่ได้นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง Kubota KR - 180 B ซึ่งมีเครื่องทำความเย็นในตัว ใช้ rotor เบอร์ RA-3 ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที น้ำกรองจะแยกออกเป็น 2 ส่วน คือตะกอน (pellet) สีเขียวที่ไม่ต้องการ และน้ำใส (supernatant) อยู่ส่วนบน แยกน้ำใสไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (ultra centrifuge) Beckman Model L ใช้ rotor เบอร์ 40 ความเร็ว 35,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที นำตะกอนที่ได้สีน้ำตาลปนเขียวไปละลายใน 0.01 M phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง virus suspension นำไปหมุนเหวี่ยงเช่นเดิมอีก 2 รอบ (cycles)

virus suspension ที่ได้บางส่วนนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดย inoculate *C. occidentalis* และตรวจจำนวนอนุภาคไวรัส โดยประมาณด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน บางส่วนนำไปวัด absorbancy ในช่วงคลื่นแสง 220 — 300 mμ โดยเครื่อง spectrophotometer Model DB

การศึกษาทางเซรุ่ม (Serological study) นำไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากหวายซี่ซาร์ที่เป็นโรค และ host protein ซึ่งเตรียมจากหวายซี่ซาร์ปกติ โดยวิธีเดียวกัน ฉีดกระด้ายอายุ 5-6 เดือน เข้าทางเส้นเลือดที่ใบหู (intravenous) 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน

หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายแล้ว 7 วัน เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูออกประมาณ 25 มล. แยก antiserum ไว้ใช้ในการทดสอบ

Antiserum ที่ได้นำไปทดสอบโดยวิธี agar double diffusion โดย agar plate เตรียมได้จาก 0.85% Ion agar

no.2, 0.85% NaCl และ 0.06% Sodium Azide ใน agar ที่เตรียมได้ลงใน plate พลาสติก plate ละ 12 มล. หลุม ซึ่งใช้หยอด antigen และ antiserum ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. และ 7 มม. ตามลำดับ หลุมระหว่าง antigen และ antiserum ห่างกัน 5 มม.

Virus preparation ที่นำมาทดสอบนั้น treat ตามวิธีของ Purcifull และ Shepherd โดยเติม 0.01 M ethanoline pH 10.5 ทั้งไว้ 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้ไวรัสแตกตัวเป็นท่อนสั้นและซึมผ่าน agar เข้าทำปฏิกิริยากับ antiserum ได้ง่ายขึ้น

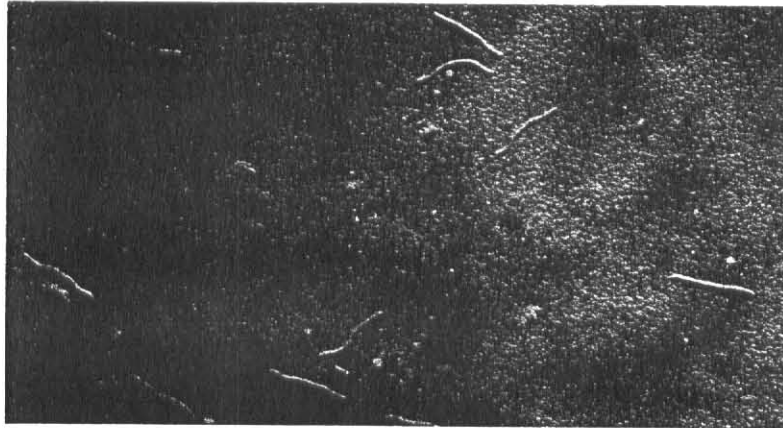
Virus antiserum ของ TMV ที่ใช้ร่วมในการทดลอง ได้มาจาก H.A. Scott, Dept. of Plant Pathology, Univ. of Arkansas ส่วน CyMV antiserum ได้รับจาก M.K. Corbett, Univ. of Florida

ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะ (Morphology) ของไวรัส อนุภาคของ CyMV ซึ่งพบในกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นท่อนยาวคด (flexuous rod) (รูปที่ 1, 2, 3) การวัดขนาดของไวรัสจากหวายปอมปาดัวร์ หวายซี่ซาร์ และหวายอินโดนีเซีย โดยใช้จำนวน 67, 43 และ 160 อนุภาค ตามลำดับ พบว่าอนุภาคส่วนใหญ่มีความยาวอยู่ในช่วง 450 — 500 mμ และมีค่าเฉลี่ยความยาวของอนุภาค ส่วนที่พบในหวายปอมปาดัวร์ 479.5 mμ หวายซี่ซาร์ 496.2 mμ ดอกหวายอินโดนีเซีย 467.8 mμ ใบหวายอินโดนีเซีย 450.4 mμ (รูปที่ 4, 5, 6 และ 7)

อนึ่ง จากการศึกษาโดยวิธี negative staining พบว่าอนุภาคของไวรัสมีลักษณะเป็นท่อนยาวกลวง (รูปที่ 2) เช่นเดียวกับไวรัสที่มีรูปร่างยาวอื่นๆ

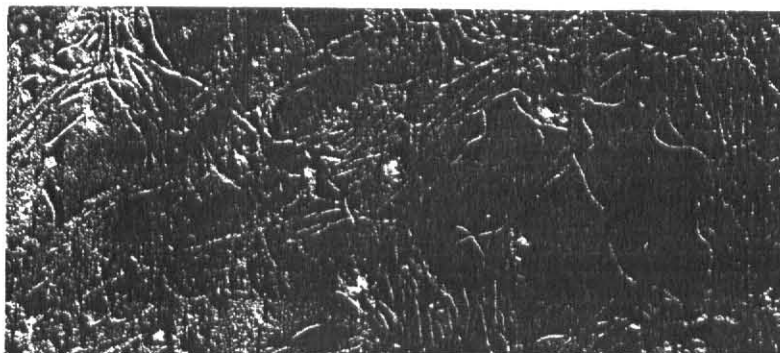
การเตรียมไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์ตามวิธีของ Jensen และ Gold (5) ได้ suspension ของไวรัส ซึ่งมีสีขาวนวล (opalescent) มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชได้ดี เมื่อทดลอง inoculate บนใบ *Cassia occidentalis* พืชแสดงอาการหลังจาก inoculate 2 วัน โดยเกิดจุดสี



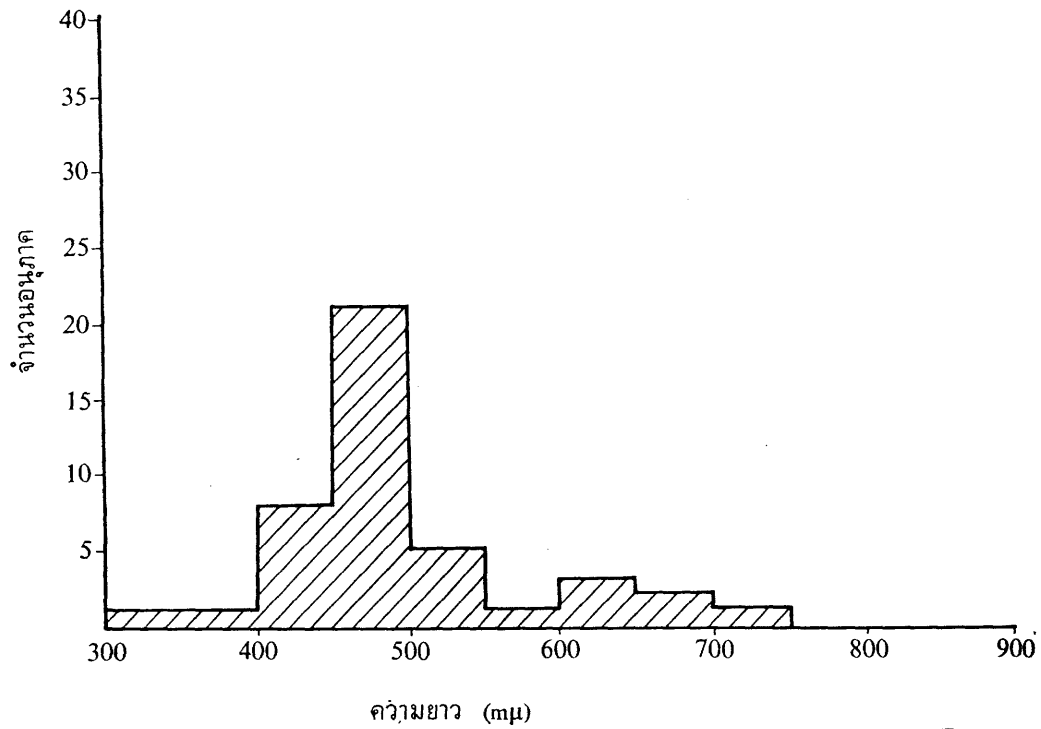
รูปที่ 1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงอนุภาคของไวรัสใบด่างของกล้วยไม้สกุลหวาย ไวรัsth่อนยาวคด (flexuous rod) ได้จากการเตรียม specimen โดยวิธี leaf dip แล้ว shadowcast ด้วยโลหะผสมระหว่าง platinum-paradium ($\times 22,000$)



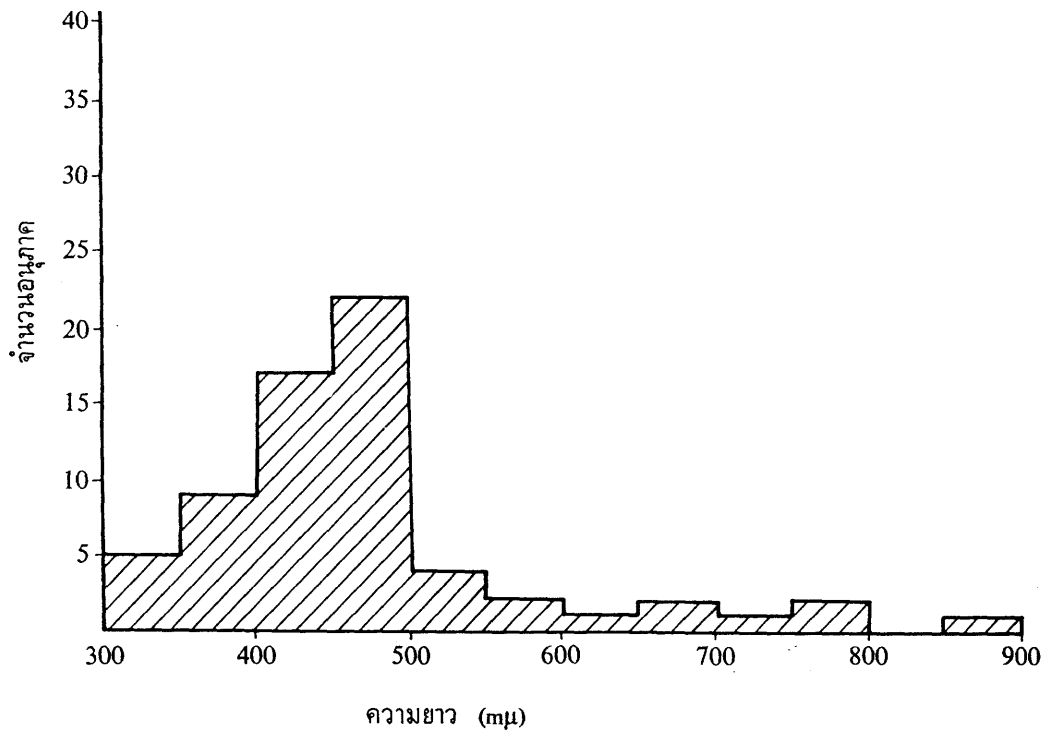
รูปที่ 2 อนุภาคของไวรัสชนิดเดียวกัน ได้จากการเตรียม specimen โดยวิธี negative staining ด้วย Potassium phosphotungstate แสดงให้เห็นว่าอนุภาคของไวรัสเป็นท่อนกลวง ($\times 79,540$)



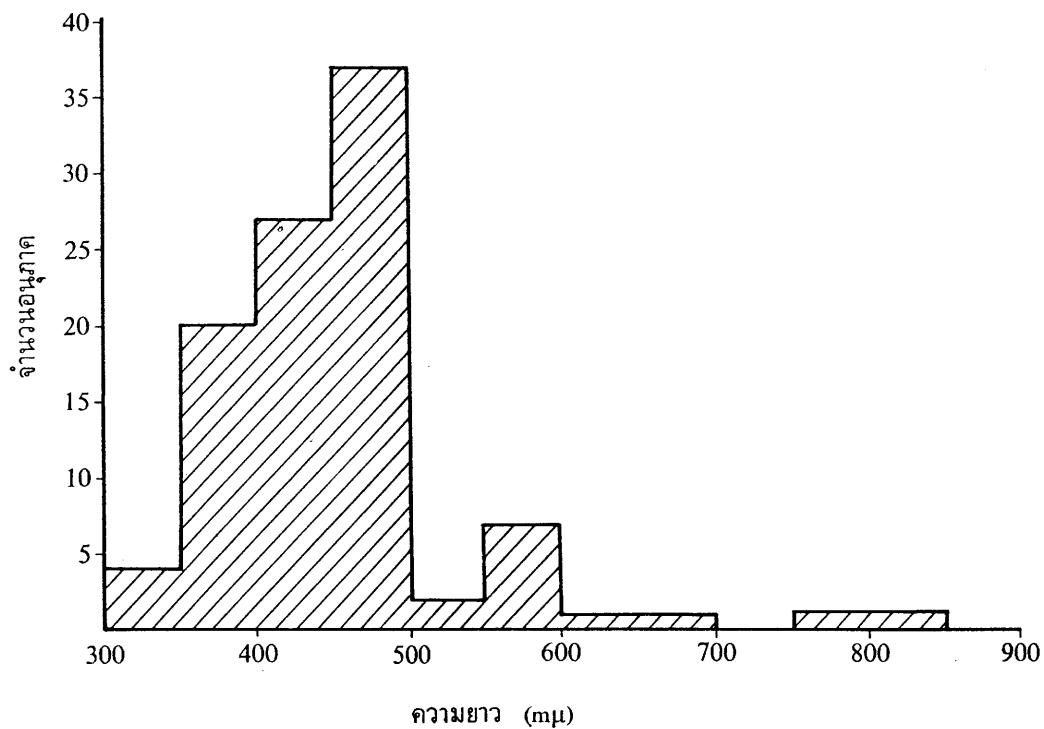
รูปที่ 3 ตัวอย่างจากไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ แสดงอนุภาคของไวรัสเกาะกลุ่มกันหนาแน่น เตรียมโดยวิธี shadow casting เช่นเดียวกับภาพบน ($\times 22,000$)



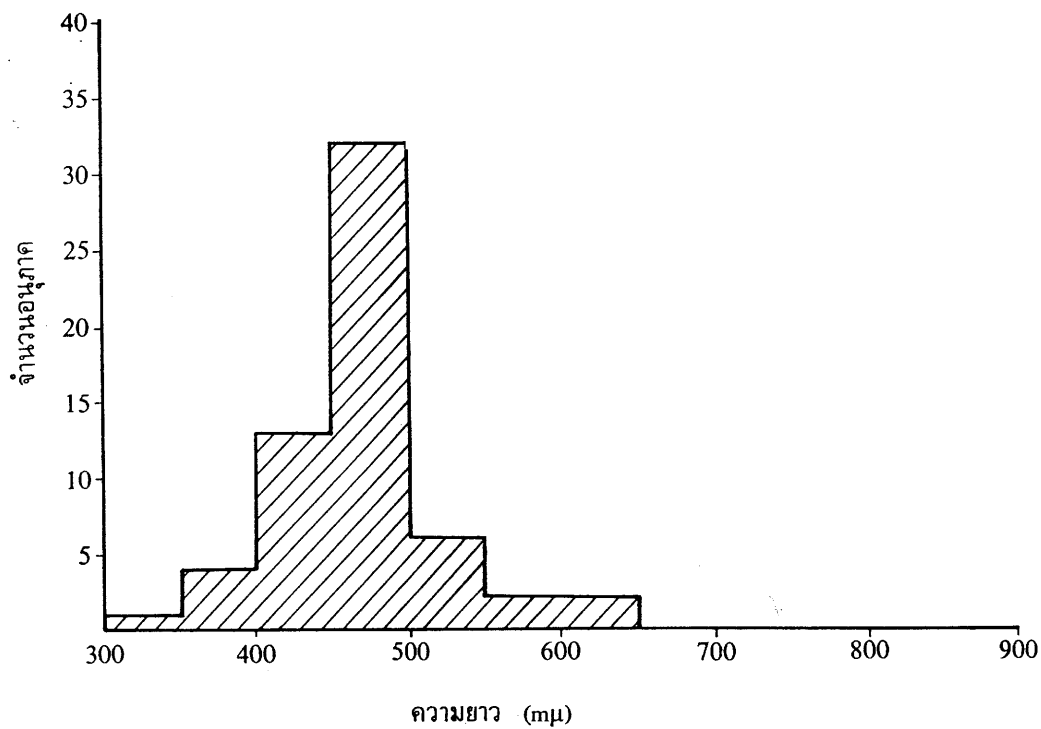
รูปที่ 4 แสดงความยาวของอนุภาค CyMV ที่พบในดอกหวายอินโดนีเซีย



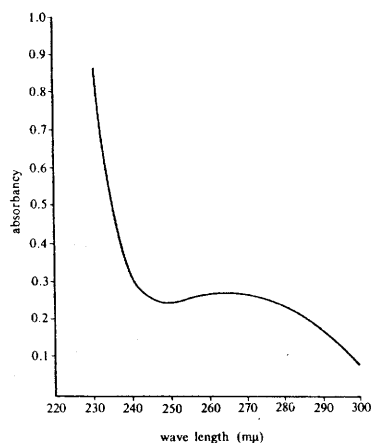
รูปที่ 5 แสดงความยาวของอนุภาค CyMV ที่พบในใบหวายอินโดนีเซีย



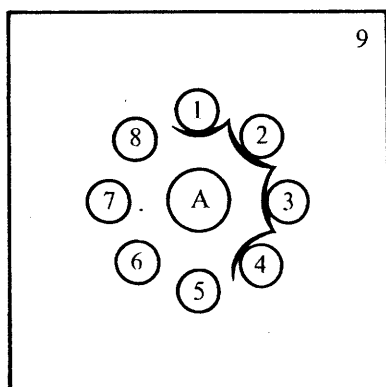
รูปที่ 6 แสดงความยาวของหน่อ CymMV ที่พบในใบหวายซี่ซาร์



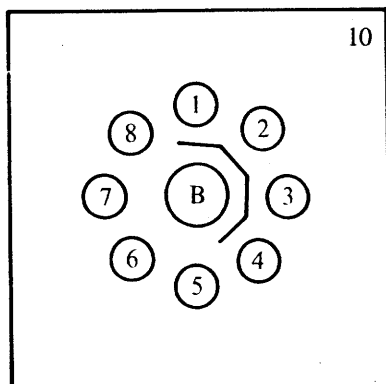
รูปที่ 7 แสดงความยาวของหน่อ CymMV ที่พบในใบหวายปอมปาดัวร์



รูปที่ 8 absorption spectrum ของไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์จากหวายซี่ชาร์



รูปที่ 9 แถบที่เกิดจาก virus antiserum ในหลุม A ทำปฏิกิริยา antigen ที่ไม่ได้ใส่ ethanolamine ในหลุม 1, 2, 3, 4 ส่วนหลุม 5, 6, 7 และ 8 ใส่ host protein ไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น



รูปที่ 10 หลุม B ใส่ virus antiserum หลุม 1, 2, 3, 4 ใส่ antigen ที่ผสม ethanolamine ส่วนในหลุม 5, 6, 7, 8 ใส่ host protein แถบที่เกิดขึ้นอยู่ระหว่างกลางของ virus antiserum และ antigen

น้ำตาลแดงเป็นจำนวนมาก ขยายติดกันเป็นแผ่นใหญ่ ทำให้ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและร่วง จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Hitachi type HU-110-1 โดยวิธี shadowcasting พบว่าไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่ได้มีอนุภาคของไวรัสท่อนยาวอยู่หนาแน่นมาก (รูปที่ 3) ผลของการวัด absorbancy (รูปที่ 8) แสดงให้เห็นว่าไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ มี absorption spectrum คล้ายคลึงกับไวรัสพิษซึ่งมีลักษณะเป็นท่อนยาวทั่วไป โดยมี absorbancy สูงสุดประมาณ 265 mμ และต่ำสุดประมาณ 245 mμ

การศึกษาทางเซรุ่ม (Serological study) ผลของการศึกษาทางเซรุ่ม โดยวิธี agar double diffusion พบว่า virus antiserum ที่เตรียมได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับไวรัสใบด่างของหวาย เกิดเป็นแถบสีขาวนวลอยู่ระหว่างหลุม virus antiserum และ antigen แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ host protein และ tobacco mosaic virus ส่วน antiserum ของ TMV ไม่ทำปฏิกิริยากับ CyMV ที่ใช้ในการทดลองนี้

จากการเปรียบเทียบการใช้ antigen โดยการใส่ 0.01 M ethanolamine pH 10.5 กับไม่ใส่ ผลปรากฏว่าแถบสีขาวที่เกิดจาก antigen ที่ไม่ได้ใส่จะเกิดติดอยู่บริเวณของหลุมของ antigen (รูปที่ 9) ส่วน antigen ที่ใส่ ethanolamine ไว้ 24-48 ชั่วโมง จะเกิดแถบตรงกลางระหว่างหลุมที่ใส่ virus antiserum และ antigen (รูปที่ 10)

Virus antiserum ที่เตรียมได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับไวรัสในการทดลองเช่นเดียวกับ CyMV antiserum จากฟลอริดา แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ TMV (tobacco mosaic virus) ในทำนองเดียวกัน TMV (tobacco mosaic virus) antiserum ไม่ทำปฏิกิริยากับ CyMV

วิจารณ์

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า ในดอกและใบหวายทั้ง 3 ชนิดมีอนุภาคท่อนยาวคด มีความยาวส่วนมากอยู่ในช่วง 450-500 mμ หวาย

ปอมปาดัวร์ 479.5 mμ หวายชีชาร์ 496.2 mμ ดอกหวายอินโดนีเซีย 467.8 mμ ใบหวายอินโดนีเซีย 450.5 mμ ซึ่งใกล้เคียงกับความยาวของ CyMV ที่พบในกล้วยไม้สกุลต่างๆ ที่รายงานโดย Corbett (1) 18 × 480 mμ Gold และ Jensen (4) 18 × 475 mμ Gold (3) 19 × 500 mμ Jensen และ Gold (5) ยาว 448-488 mμ แตกต่างจาก cymbidium ring spot มีทรงกลมและยาวกว่า TMV-O ซึ่งเป็นไวรัสที่ท่อนสั้นมีขนาดตามรายงานของ Corbett (2) 18 × 320 mμ Jensen และ Gold (5) 24 × 280 mμ หรืออยู่ในช่วง 18-25 × 280-325 mμ (2, 4, 5) ส่วนใน VMV มีขนาด 13 × 117 mμ (7,8)

การเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ โดยวิธีซึ่งใช้ได้ผลในการเตรียม CyMV (5) ได้ไวรัสซึ่งทำให้เกิดโรคได้ดี มีความเข้มข้นสูง

จากการทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มพบว่า antiserum ที่เตรียมได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับไวรัสในการทดลอง แต่ไม่ทำกับ TMV และในทางตรงกันข้าม antiserum ของ TMV ก็ไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสในการทดลองนี้ เช่นเดียวกับ CyMV ที่ได้กล่าวไว้ในรายงานของ Kado (6) และการใช้ CyMV antiserum ซึ่งได้รับมา M.K. Corbett เมื่อทดสอบกับ CyMV ในประเทศไทยปรากฏว่าทำปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกับ antiserum ในประเทศไทย CyMV ในประเทศไทย มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกับ isolate จากแหล่งอื่น และไม่มี ความแตกต่างกันทางเซรุ่มกับ CyMV ใน Florida แต่ยังไม่เป็นที่ยืนยันว่า CyMV ในประเทศไทยมี strain เดียวหรือมากกว่า ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าจะต้องศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. CORBETT, M.K. 1960. Purification by density-gradient centrifugation, electron microscopy, and properties of Cymbidium mosaic virus. *Phytopathology* 50:346-351.
2. CORBETT, M.K. 1967. Some distinguishing characteristics of the orchid strain of Tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 57:164-172.

3. GOLD, A.H. 1950. Particles, possibly virus, isolated from orchids. (Abstr.) *Phytopathology* 40 : 965.
4. GOLD, A.H., AND D.D. JENSEN. 1952. Some apparent virus relationships in several orchid genera, based on electron microscopy. *Phytopathology* 42:9.
5. JENSEN, D.D. AND A.H. GOLD. 1951. A virus ring spot of *Odontoglossum* orchid: symptoms, transmission, and electron microscopy. *Phytopathology* 41 : 648-653.
6. KADO, C.I. 1970. Viruses diseases of orchids: California Agricultural Experiment Station Service. Circular 552 California U. S.A. 15p.
7. MURAKISHI, H.H. 1952. A mosaic of vanda orchids. *Phytopathology* 42 : 178-182.
8. MURAKISHI, H.H. 1958. Host range, symptomatology, physical properties, and cross-protection studies of orchid virus isolates. *Phytopathology* 48 : 132-137.