



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ลักษณะทางโมเลกุลและการทดสอบทางชีววิทยาของเชื้อ *Sugarcane Mosaic Virus* และ *Brome Mosaic Virus* ที่เข้าทำลายข้าวฟ่างในประเทศไทย

Molecular Characterization and Biological Assay of *Sugarcane Mosaic Virus* and *Brome Mosaic Virus* Infecting Sorghum in Thailand

นามผู้วิจัย นายอังคาร ยีสารคุณ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์คณินิตย์ เจริญวรารากร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสุวรรณ เจริญสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ลักษณะทางโมเลกุลและการทดสอบทางชีววิทยาของเชื้อ
Sugarcane Mosaic Virus และ *Brome Mosaic Virus* ที่เข้าทำลายข้าวฟ่าง
ในประเทศไทย

Molecular Characterization and Biological Assay of *Sugarcane Mosaic Virus* and
Brome Mosaic Virus Infecting Sorghum in Thailand

โดย

นายอังการ ยิสารคุณ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2553

อังคาร ยิสารคุณ 2553: ลักษณะทางโมเลกุลและการทดสอบทางชีววิทยาของเชื้อ *Sugarcane Mosaic Virus* และ *Brome Mosaic Virus* ที่เข้าทำลายข้าวฟ่างในประเทศไทย ปรินญาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สาขาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณินนิตย์ เจริญวรารกร, Ph.D. 91 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะทางโมเลกุลและทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) และ *Brome mosaic virus* (BMV) ที่เข้าทำลายข้าวฟ่างในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างจากข้าวฟ่างที่เป็นโรคใบด่างในแปลง ตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค indirect-enzyme linked immunosorbent assay (Indirect-ELISA) พบเชื้อ SCMV ในจังหวัดลพบุรี (SCMV-Sr-LB), นครสวรรค์ (SCMV-Sr-NW), สุพรรณบุรี (SCMV-Sr-SP), กาญจนบุรี (SCMV-Sr-KB) และเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB1, PB2 และ PB3) และพบเชื้อ BMV ในจังหวัดสระบุรี (BMV-Sr-SB) นำข้าวฟ่างที่ตรวจพบเชื้อมาแยกเชื้อและปลูกเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ พบข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างจากเชื้อ SCMV และ BMV วิเคราะห์น้ำหนักริมเนื้อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และศึกษาลักษณะอนุภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบลักษณะอนุภาคของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลต เป็นแบบท่อนยาวคด มีน้ำหนักริมเนื้อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคขนาดประมาณ 39.37 กิโลดาลตัน ลักษณะอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB เป็นแบบทรงกลม มีน้ำหนักริมเนื้อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคขนาดประมาณ 21.98 กิโลดาลตัน โคลนยีนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่าเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 81-100 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยและข้าวโพดที่มีรายงานในประเทศไทยที่ระดับ 78-95 และ 81-99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเชื้อ BMV-Sr-SB มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยที่ระดับ 98 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ Phylogenetic tree พบว่าไอโซเลต SCMV-Sr-NW, KB, PB1, PB2 และ PB3 จัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายอ้อยและข้าวโพดในประเทศไทย แต่ไอโซเลต SCMV-Sr-LB และ SP จัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายอ้อยและข้าวโพดในต่างประเทศ และเชื้อ BMV-Sr-SB จัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ BMV ที่เข้าทำลายข้าวโพดในประเทศไทย

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ SCMV และ BMV ในพืชอาศัย 2 ชนิด คือ ข้าวฟ่าง และข้าวโพด พบว่าเชื้อ SCMV-Sr-LB มีความรุนแรงต่อข้าวฟ่างมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยสูงถึง 94.2 เปอร์เซ็นต์ และพบเชื้อ BMV-Sr-SB มีความรุนแรงมากต่อข้าวโพดหวาน โดยข้าวโพดหวานแสดงอาการใบไหม้หลังปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน และแสดงอาการต้นเตี้ยแคระร่วมด้วย

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Arngkhan Yisankhun 2010: Molecular Characterization and Biological Assay of *Sugarcane Mosaic Virus* and *Brome Mosaic Virus* Infecting Sorghum in Thailand. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Kanungnit Reanwarakorn, Ph.D. 91 pages.

This research was done molecular characterization and disease virulent test of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) and *Brome mosaic virus* (BMV) infecting sorghum in Thailand. Sorghum leaf samples showing mosaic symptoms were collected from sorghum fields. By indirect-enzyme linked immunosorbent assay (Indirect-ELISA) technique, the infected leaves were found SCMV in Lop Buri (SCMV-Sr-LB), Nakhon Sawan (SCMV-Sr-NW), Suphan Buri (SCMV-Sr-SP), Kanchana Buri (SCMV-Sr-KB), and Phetchabun (SCMV-Sr-PB1, PB2 and PB3) provinces and BMV in Sara Buri (BMV-Sr-SB) province. Detected leaf samples were isolated on indicator plants and multiplied on sorghum. All SCMV and BMV isolates inoculated sorghum plants expressed mosaic symptoms. By using transmission electron microscope and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), all 7 isolates of SCMV were flexuous rods particle and the coat protein subunits of them have molecular weight of approximately 39.37 kDa as well as BMV-Sr-SB was isometric particle and molecular weight of a coat protein was approximately 21.98 kDa. With cloning, sequencing, and amino acid sequence comparison analysis, all the SCMV isolates were displayed 81-100% identity with each others and 78-95 % as well as 81-99 % homology with previous reported amino acid sequences of sugarcane and maize in Thailand, respectively. For BMV-Sr-SB, was 98 % homology with maize isolated BMV in Thailand. By Phylogenetic tree analysis, SCMV-Sr-NW, KB, PB1, PB2 and PB3 isolates were the same group with SCMV infecting sugarcane and maize in Thailand, but SCMV-Sr-LB and SP isolates were the same group with SCMV infecting sugarcane and maize in foreign countries. The BMV-Sr-SB was the same group with BMV infecting maize in Thailand.

Virulent test of all the SCMV and BMV isolates were done on sorghum and maize, the SCMV-Sr-LB isolate was the most virulent isolate on sorghum shown 94.2 % disease incidence and the BMV-Sr-SB isolate caused severe symptoms on sweet corn which expressed leaf blight at 11 day post inoculation including stunting.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. คณิงนิตย์ เจริญวรากร ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์
จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุพัฒน์ อรรถธรรม ประธานการสอบ
และ ดร. วันเพ็ญ ศรีทองชัย ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไข
วิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร
กำแพงแสน และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนข้าพเจ้าประสบความสำเร็จ
ในการศึกษา

ขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้ออำนวยความสะดวกให้ความอนุเคราะห์
สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ พี่ๆ และ เพื่อนๆ ที่ให้คำแนะนำ
และช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อพล คุณแม่อุไร พี่อ้ออง และ พี่ตุ้ ที่ได้ให้การสนับสนุน
และให้กำลังใจในทุกเรื่องตลอดมา

อังคาร ยิสารคุณ
สิงหาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
สรุปผลการทดลอง	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	67
ภาคผนวก	72
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	หน้าที่ของโปรตีนในกลุ่ม <i>Potyvirus</i>	8
2	ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV และ BMV ในปฏิกิริยา reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)	16
3	แผนการทดสอบความรุนแรงของโรค	21
4	สรุปผลการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Indirect-ELISA การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE และการศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	29
5	ข้อมูลของเชื้อ SCMV ที่ใช้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับกรดอะมิโน และแสดงความสัมพันธ์ในรูป Phylogenetic tree	40
6	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (บนขวา) และลำดับกรดอะมิโน (ล่างซ้าย) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV	43
7	ข้อมูลของเชื้อ BMV ที่ใช้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับกรดอะมิโน และแสดงความสัมพันธ์ในรูป Phylogenetic tree	43
8	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบด่างของข้าวฟ่าง MDMV disease index และระดับความรุนแรงของโรคจากเชื้อ SCMV ไอโซเลทจังหวัดลพบุรี (SCMV-Sr-LB) นครสวรรค์ (SCMV-Sr-NW) สุพรรณบุรี (SCMV-Sr-SP) บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง	51
9	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบด่างของข้าวฟ่าง MDMV disease index และระดับความรุนแรงของโรคจากเชื้อ SCMV ไอโซเลทจังหวัดกาญจนบุรี (SCMV-Sr-KB) และเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB1 และ SCMV-Sr-PB2) บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง	52
10	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบด่างของข้าวฟ่าง MDMV disease index และระดับความรุนแรงของโรคจากเชื้อ SCMV ไอโซเลทจังหวัดเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB3) บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง	53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11	55
12	62
ตารางผนวกที่	
1	73
2	80
3	82

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างจีโนมของโพทิวไวรัส (single strand, positive-sense RNA) และส่วนของยีนที่กำหนดสร้างโปรตีนส่วนต่างๆ จากปลาย 5' → 3'	7
2	โครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส BMV (liner single strand, positive-sense RNAs, RNA-1, RNA-2, RNA-3 และ subgenomic RNA) และส่วนของยีนที่กำหนดสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ จากปลาย 5' → 3'	11
3	ภาพจำลองแสดงตำแหน่งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ <i>Sugarcane mosaic virus</i> (SCMV) รวมทั้งการแสดงตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมทั้งยีน โดยมีคู่ไพรเมอร์ SsCP-F3 กับ SsCP-R3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 782 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ SsCP2 กับ T24 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 685 คู่เบส (ตามตำแหน่งลูกศร)	16
4	ภาพจำลองแสดงตำแหน่งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ <i>Brome mosaic virus</i> (BMV) รวมทั้งการแสดงตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมทั้งยีน โดยมีคู่ไพรเมอร์ FCP กับ RCP2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส (ตามตำแหน่งลูกศร)	17
5	การวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยวิธี SDS-PAGE	26
6	การวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB และเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ด้วยวิธี SDS-PAGE	27
7	ลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัส SCMV-Sr-LB (A), SCMV-Sr-NW (B), SCMV-Sr-SP (C), SCMV-Sr-KB (D), SCMV-Sr-PB1 (E), SCMV-Sr-PB2 (F), SCMV-Sr-PB3 (G), BMV-Sr-SB (H) และไวรัสไอโซเลท Sr-PB (I)	28
8	ลักษณะอาการจุดเฉพาะแห่งของใบ <i>C. amaranticolor</i> หลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 4 วัน (A) เปรียบเทียบกับลักษณะของใบปกติ (B)	31
9	อาการใบด่างของข้าวโพดหวานหลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 6 วัน (A) เปรียบเทียบกับข้าวโพดหวานปกติ (B)	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SsCP-F3 และ SsCP-R3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 782 คู่เบส	34
11	ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SsCP2 และ T24 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 685 คู่เบส	35
12	ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FCP และ RCP2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส	36
13	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (บนขวา) และลำดับกรดอะมิโน (ล่างซ้าย) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV	39
14	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท กับเชื้อ SCMV ที่มีรายงานในประเทศไทย และในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และ MEGA 4 version 4.0.2	41
15	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย กับเชื้อ BMV ที่มีรายงานในประเทศไทย และในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และ MEGA 4 version 4.0.2	44
16	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)	48
17	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยข้าวฟ่างแสดงอาการใบยอดไหม้ (B) หลังปลูกเชื้อไปวัน 6 วัน	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB3 ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยข้าวฟ่างแสดงอาการใบยอดไหม้ (B) หลังปลูกเชื้อไวรัส 6 วัน	49
19	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยข้าวฟ่างแสดงอาการใบไหม้ (E) หลังปลูกเชื้อไวรัส 28 วัน	50
20	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)	50
21	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ KU 804 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)	56
22	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดฝักอ่อนสายพันธุ์ SG 17 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)	57
23	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดไร่สายพันธุ์ สุวรรณ 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)	58
24	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยที่ข้าวโพดหวานแสดงอาการใบไหม้ (C-E) หลังปลูกเชื้อไวรัส 11-28 วัน	59
25	ข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 แสดงอาการเหี่ยวแคะหลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 28 วัน (ซ้าย) เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ขวา)	59
26	ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 (A-E) หลังปลูกเชื้อไวรัสโอโซเลท Sr-PB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 กราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้นของ Protein Molecular Weight Marker ที่ ($R^2 = 0.9919$)	81
2 กราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้นของ Protein Molecular Weight Marker ที่ ($R^2 = 0.9923$)	83
3 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบทั้งยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย	84
4 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย	87
5 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบทั้งยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างไอโซเลทจังหวัดสระบุรี กับเชื้อ BMV-Mz-RB และ BMV-Mz-KB ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย และเชื้อ BMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (BMV-F, BMV-R และ BMV-T)	88
6 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างไอโซเลทจังหวัดสระบุรี กับเชื้อ BMV-Mz-RB และ BMV-Mz-KB ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย และเชื้อ BMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (BMV-F, BMV-R และ BMV-T)	90

ลักษณะทางโมเลกุลและการทดสอบทางชีววิทยาของเชื้อ
Sugarcane Mosaic Virus และ *Brome Mosaic Virus* ที่เข้าทำลายข้าวฟ่าง
ในประเทศไทย

**Molecular Characterization and Biological Assay of *Sugarcane Mosaic Virus* and
Brome Mosaic Virus Infecting Sorghum in Thailand**

คำนำ

ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอนาคของประเทศ
ไทย โดยเฉพาะข้าวฟ่างหวานเป็นพืชที่มีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอลซึ่ง
นำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน ข้าวฟ่างมีลักษณะเด่นคือทนแล้ง ให้ผลผลิตสูง ออกดอกเร็ว และอายุ
การเก็บเกี่ยวสั้น ส่วนใหญ่เกษตรกรจะปลูกตามหลังข้าวโพดในช่วงปลายฤดูฝน ประเทศไทยมี
พื้นที่ปลูกข้าวฟ่างที่สำคัญอยู่ในจังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์
เพชรบูรณ์ และชัยนาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

โรคใบด่างของข้าวฟ่างที่เกิดจากเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) และ *Brome mosaic virus* (BMV) จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญ ซึ่งทำให้ผลผลิตของข้าวฟ่างลดลง พบรายงานเชื้อ SCMV
เข้าทำลายข้าวฟ่างครั้งแรกในปี 1923 (Brandes and Klapaak, 1923) เมื่อเชื้อเข้าทำลายข้าวฟ่างแล้ว
ทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่าง จะทำให้ผลผลิตลดลงประมาณ 0-8 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าอาการของ
โรคที่รุนแรง ข้าวฟ่างจะแสดงอาการใบแดง และต้นเตี้ยแคระ ซึ่งทำให้ผลผลิตลดลง 33-75
เปอร์เซ็นต์ (Seifers and Hackerott, 1987) และพบรายงานเชื้อ BMV เข้าทำลายข้าวฟ่างในรัฐ
เท็กซัส ในปี 1975 (Ford *et al.*, 1970) เมื่อเชื้อเข้าทำลายข้าวฟ่างจะทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการ
ใบด่างเหลืองเป็นขีดๆ และต้นเตี้ยแคระแกร็น (Richard, 1986) นอกจากนี้เชื้อ SCMV และ BMV
ยังสามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่สำคัญ เช่น ข้าวโพด และอ้อย เป็นต้น

ปัจจุบันเชื้อ SCMV และ BMV มีการแพร่ระบาดในแหล่งเพาะปลูกอ้อย ข้าวโพด และข้าวฟ่าง ในประเทศไทย สำหรับการควบคุมเชื้อไวรัสโดยใช้พืชพันธุ์ต้านทานเป็นแนวทางหนึ่งที่น่ามาใช้ในการควบคุม และป้องกัน โรคให้มีประสิทธิภาพ แต่การปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อเชื้อไวรัสในประเทศไทย ยังมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ที่น้อยกว่าอ้อยและข้าวโพดซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV และ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย ศึกษาลักษณะอนุภาค น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และความรุนแรงของโรค เพื่อให้ทราบข้อมูลพื้นฐานความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และความรุนแรงของโรค เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อเชื้อไวรัสต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ
SCMV และ BMV ที่เข้าทำลายข้าวฟ่างในประเทศไทย ศึกษาลักษณะอนุภาค น้ำหนักโมเลกุล
โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส และศึกษาความรุนแรงของโรค



การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของข้าวฟ่าง

ข้าวฟ่าง (Sorghum) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sorghum bicolor* (Linn.) Moench. เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่ห้าของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด และข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่างน่าจะมียุติกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาโดยเฉพาะทางตะวันออกเฉียงเหนือของทวีปแอฟริกา (Doggett, 1970) สำหรับข้าวฟ่างพันธุ์เพาะปลูกนั้น สันนิษฐานว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเอธิโอเปีย (Vavilov, 1935)

ข้าวฟ่างมีระบบรากฝอย (fibrous root system) แผ่กระจายออกโดยรอบ ลำต้นข้าวฟ่างทั่วไปจะสูงประมาณ 1-2 เมตร มีข้อปล้อง ใบมีรูปร่างคล้ายหอก (lanceolate) เกิดตามข้อสลับกันไปบนลำต้น ช่อดอกข้าวฟ่างจะเกิดบนก้านช่อซึ่งเป็นปล้องที่ยาวที่สุดของลำต้น มีช่อดอกเป็นแบบ panicle แต่นิยมเรียกว่าช่อ (Head) ส่วนเมล็ดข้าวฟ่างอาจจะมีหลายสี เช่น ขาว แดง น้ำตาล เหลือง และครีม เป็นต้น

ข้าวฟ่างที่ปลูกกันโดยทั่วไปนั้น อาจแบ่งเป็นชนิดต่าง ๆ โดยอาศัยลักษณะการใช้ประโยชน์ได้เป็น 5 ชนิดดังนี้ คือ 1) ข้าวฟ่างเมล็ด (grain sorghum) เป็นข้าวฟ่างชนิดที่มีขนาดช่อและเมล็ดใหญ่ ต้นเตี้ย และผลิตเมล็ดได้มากกว่าข้าวฟ่างชนิดอื่น ๆ ข้าวฟ่างชนิดนี้จะนำเมล็ดมาแปรรูปเป็นอาหาร ทั้งอาหารมนุษย์ และสัตว์ ข้าวฟ่างที่ปลูกกันส่วนใหญ่คือข้าวฟ่างชนิดนี้ 2) ข้าวฟ่างหญ้า (grass sorghum) เป็นข้าวฟ่างที่ใช้ใบและลำต้นเลี้ยงสัตว์ อาจจะใช้ทำหญ้าหมัก หญ้าแห้ง หรือปลูกเป็นทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ 3) ข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) ข้าวฟ่างชนิดนี้มีลำต้นค่อนข้างสูง มักจะสูงกว่า 2 เมตร ในลำต้นจะมีน้ำหวานอยู่มาก จึงใช้ทำน้ำเชื่อมหรือน้ำตาลได้ นอกจากนี้ยังใช้ทำแอลกอฮอล์ หญ้าหมักหรือปลูกให้สัตว์กินสด ๆ 4) ข้าวฟ่างไม้กวาด (broom corn) ข้าวฟ่างชนิดนี้มีช่อที่มีแขนงยาว 12-36 นิ้ว มีใบและเมล็ดน้อย ลำต้นแข็ง ในยุโรปและอเมริกาจึงนิยมปลูกเพื่อนำช่อมาทำไม้กวาด 5) ข้าวฟ่างคั่ว (pop sorghum) เป็นข้าวฟ่างที่นำมาคั่วและจะแตกเช่นเดียวกับข้าวโพดคั่ว นิยมรับประทานในหลายประเทศ ในประเทศไทยมีปลูกกันมานานแล้วตามคันนา ต้นสูงประมาณ 3 เมตร ต้นสีน้ำตาล ช่อดอกหลวม เมล็ดเล็กสีเหลืองนวลใส มีคุณค่าทางอาหารสูง พันธุ์ที่รู้จักกันทั่วไปคือ ข้าวฟ่างหางช้าง ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวฟ่างที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และทนทานต่อการหักล้ม (ประสิทธิ์, 2529)

ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวฟ่างทั้งหมด 210,321 ไร่ โดยมีพื้นที่ปลูกในจังหวัดลพบุรี 90,381 ไร่ นครสวรรค์ 72,186 ไร่ เพชรบูรณ์ 37,949 ไร่ สระบุรี 6,322 ไร่ สุพรรณบุรี 1,117 ไร่ และ ชัยนาท 2,366 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) ข้าวฟ่างสายพันธุ์ที่นิยมปลูกส่วนใหญ่ในปัจจุบันเป็นข้าวฟ่างเมล็ดัด เช่น ข้าวฟ่างพันธุ์ลูกผสมสีแดง อุ้มทอง 1 สุพรรณบุรี 1 เฮกการ์หนัก และ เฮกการ์เบา เป็นต้น

2. เชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) สาเหตุโรคใบด่างของข้าวฟ่าง

2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อ SCMV

เชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) มีชื่อพ้อง (synonyms) อีกหลายชื่อ เช่น *Grass mosaic virus*, *Maize dwarf mosaic virus strain B* และ *Sorghum red stripe virus* มีรายงานพบเข้าทำลายข้าวฟ่างครั้งแรกในปี 1923 (Brandes and Klappaak, 1923) ประเทศไทยมีรายงานพบเข้าทำลายข้าวฟ่าง ในปี 2519 (ธีระ และคณะ, 2519) เชื้อ SCMV มีพืชอาศัยจำกัอยู่ในวงศ์ Gramineae และวงศ์ Leguminosae 7 ชนิด (ธีระ, 2532) เชื้อสามารถถ่ายทอดได้โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล เมล็ดัด และมีเพลี้ยอ่อน 7 ชนิด เป็นพาหะ เช่น Brown ambrosia aphid (*Dactynotus ambrosiae*), Rusty plum aphid (*Hysteroneura setariae*) และ Greenbug (*Schizaphis graminum*) เป็นต้น ซึ่งมีลักษณะการถ่ายทอดแบบ non-persistent (Richard, 1986) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจอื่นๆที่สำคัญ เช่น อ้อย และข้าวโพด ได้อีกด้วย

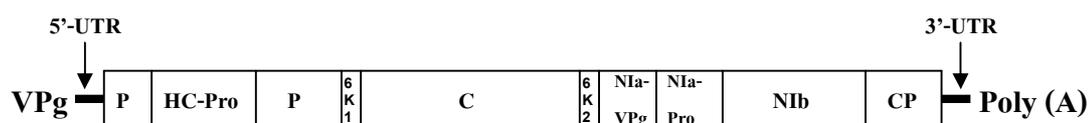
ลักษณะอาการของข้าวฟ่างจะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับชนิดของข้าวฟ่าง สายพันธุ์ของเชื้อ SCMV และสภาพแวดล้อม สำหรับความรุนแรงของโรคเมื่อเชื้อเข้าทำลายข้าวฟ่างแล้ว ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่าง จะทำให้ผลผลิตของข้าวฟ่างลดลงประมาณ 0-8 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าอาการของโรคที่รุนแรง ข้าวฟ่างจะแสดงอาการใบแดง และต้นเตี้ยแคระ ซึ่งทำให้ผลผลิตลดลงถึง 33-75 เปอร์เซ็นต์ (Seifers and Hackerott, 1987)

2.2 เชื้อ SCMV

SCMV จัดอยู่ในวงศ์ *Potyviridae* จีโนส *Potyvirus* อนุภาคเป็นท่อนยาวคด (flexuous rods) มีความยาวประมาณ 730-755 นาโนเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12-13 นาโนเมตร องค์ประกอบของอนุภาคของเชื้อ SCMV ประกอบด้วยเส้นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 5.5-6 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนห่อหุ้ม 94-95 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอนุภาค (Moghal and Francki, 1976; Shukla *et al.*, 1989; Bond and Pirone, 1971) จีโนมยาวประมาณ 9,500 นิวคลีโอไทด์ (Chen and Adams, 2002) และโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 37-38 กิโลดาลตัน (Mohammadi *et al.*, 2006) เชื้อ SCMV มี 6 สายพันธุ์ ได้แก่ SCMV-A, B, D, E, SC และ MDB (Mali, 2001)

2.3 โครงสร้างจีโนมของเชื้อ SCMV

เชื้อ SCMV มีจีโนมเป็นแบบ monopartite กรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single stranded, positive sense RNA) จีโนมยาวประมาณ 9,500 นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งปลาย 5' เชื่อมอยู่กับ VPg (Genome-linked protein) และตำแหน่ง 3' เป็น poly-A มี open reading frame (ORF) ยาว 1 ชุด ซึ่งมีลักษณะเป็น polycistronic คือหลังจากแปลรหัส (translate) เป็นโปรตีน จะได้โพลีโปรตีน (polyprotein) ขนาดใหญ่ 1 สาย และจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (proteinase) ได้โปรตีนขนาดเล็กๆ อีก 10 ชนิด เรียงลำดับจากตำแหน่ง N-terminal ถึง C-terminal ของจีโนม ได้แก่ P1 protein, HC-Pro, P3 protein, 6K1 protein, CI protein, 6K2 protein, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb และ Coat protein (ภาพที่ 1) ซึ่งคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสในกลุ่มโทที่ไวรัส แสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างจีโนมของโพลีโอไวรัส (single strand, positive-sense RNA) และส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนส่วนต่างๆ จากปลาย 5' → 3'

ที่มา: Zhong *et al.* (2005)

VPg	=	viral genome-linked protein
P1	=	first protein
HC-Pro	=	helper component protein
P3	=	third protein
6K1	=	6 kDa protein 1
CI	=	cylindrical inclusion protein
6K2	=	6 kDa protein 2
NIa-VPg	=	nuclear inclusion protein "a including the VPg"
NIa-Pro	=	nuclear inclusion protein "a" proteinase
Nib	=	nuclear inclusion protein "b"
CP	=	coat protein

ตารางที่ 1 หน้าที่ของโปรตีนในกลุ่ม *Potyvirus*

โปรตีน	หน้าที่
P1	<ul style="list-style-type: none"> - เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงระหว่างไวรัสกับพืชอาศัย เนื่องจากโพลีโปรตีนที่ไวรัสต่างชนิดกันจะมีลำดับกรดอะมิโนของ P1 ต่างกันมาก - เป็นเอ็นไซม์ proteinase เนื่องจากพบว่าทางด้าน C-terminal มีคุณสมบัติเป็น Trypsin-like serine proteinase ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีน P1 Helper component (HC-Pro) - เป็นโปรตีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell movement)
HC-Pro	<ul style="list-style-type: none"> - เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลี้ยอ่อน (Aphid transmission) - ทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ proteinase สำหรับ autolytic cleavage ที่ตำแหน่ง HC-Pro กับ P3 เนื่องจากพบว่ามีคุณสมบัติเป็น Papain-like cysteine proteinase - เป็นโปรตีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell movement) - เกี่ยวข้องกับการแสดงอาการของโรค (Symptomatology)
P3	<ul style="list-style-type: none"> - ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน (คาดว่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ replication)
6K1	<ul style="list-style-type: none"> - ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน แต่อาจเกี่ยวข้องกับ Membrane anchoring of replication machinery
CI	<ul style="list-style-type: none"> - เกี่ยวข้องกับ Genome replication (RNA helicase) - เกี่ยวข้องกับ Membrane attachment - Nucleic acid stimulated ATPase activity

ตารางที่ 1 (ต่อ)

โปรตีน	หน้าที่
6K2	<ul style="list-style-type: none"> - ทำหน้าที่เป็น viral replication complex - มีบทบาทในการเคลื่อนย้าย NIa ภายในเซลล์
NIa	<ul style="list-style-type: none"> - NIa-VPg ทำหน้าที่เป็นอาร์เอ็นเอตั้งต้น (primer) สำหรับสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของไวรัส - NIa-Pro เป็น major proteolytic cleavages ในการตัดสาย polyprotein แบบ <i>cis</i> และ <i>trans</i> ซึ่งมีโครงสร้างที่สัมพันธ์กับ Trypsin-linked serine proteinase
NIb	<ul style="list-style-type: none"> - เป็นเอนไซม์ RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของไวรัส (genome replication)
CP	<ul style="list-style-type: none"> - เกี่ยวกับการรวมตัวกันเป็นอนุภาคของไวรัส (RNA encapsidation) - เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลี้ยอ่อน (Aphid transmission) - เป็นโปรตีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell movement)

ที่มา: Riechmann *et al.* (1992); Verchot and Carrington (1995); Mahajan *et al.* (1996)

3. เชื้อไวรัส *Brome mosaic virus* (BMV) สาเหตุโรคใบด่างของข้าวฟ่าง

3.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อ BMV

เชื้อไวรัส *Brome mosaic virus* (BMV) มีชื่อพ้อง (synonyms) อีกหลายชื่อ เช่น *Ryegrass streak virus* เป็นต้น มีรายงานพบเชื้อเข้าทำลายข้าวฟ่างในรัฐเท็กซัสในปี 1975 (Ford *et al.*, 1970) มีรายงานพบว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคใบด่างของข้าวฟ่างในประเทศไทย ในปี 1998 (สุพัฒน์, 2552) แต่ยังไม่ทราบแน่นอนว่าพบเข้าทำลายข้าวฟ่างครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อใด เชื้อ BMV สามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่สำคัญ เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ และอ้อย ได้อีกด้วย นอกจากนี้เชื้อ BMV ยังมีรัศมีพีช และหญ้า เป็นพืชอาศัย เชื้อสามารถถ่ายทอดได้โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล ไม่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด มีด้วงปีกแข็งเป็นแมลงพาหะ เช่น *Diabrotica undecimpunctata* และ *D. virgitera* เป็นต้น (Walters, 1969)

เชื้อ BMV เมื่อเข้าทำลายข้าวฟ่างจะทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างเหลืองเป็นขีดๆ มีการเจริญเติบโตที่ช้าลง และต้นเตี้ยแคระแกร็น (Richard, 1986)

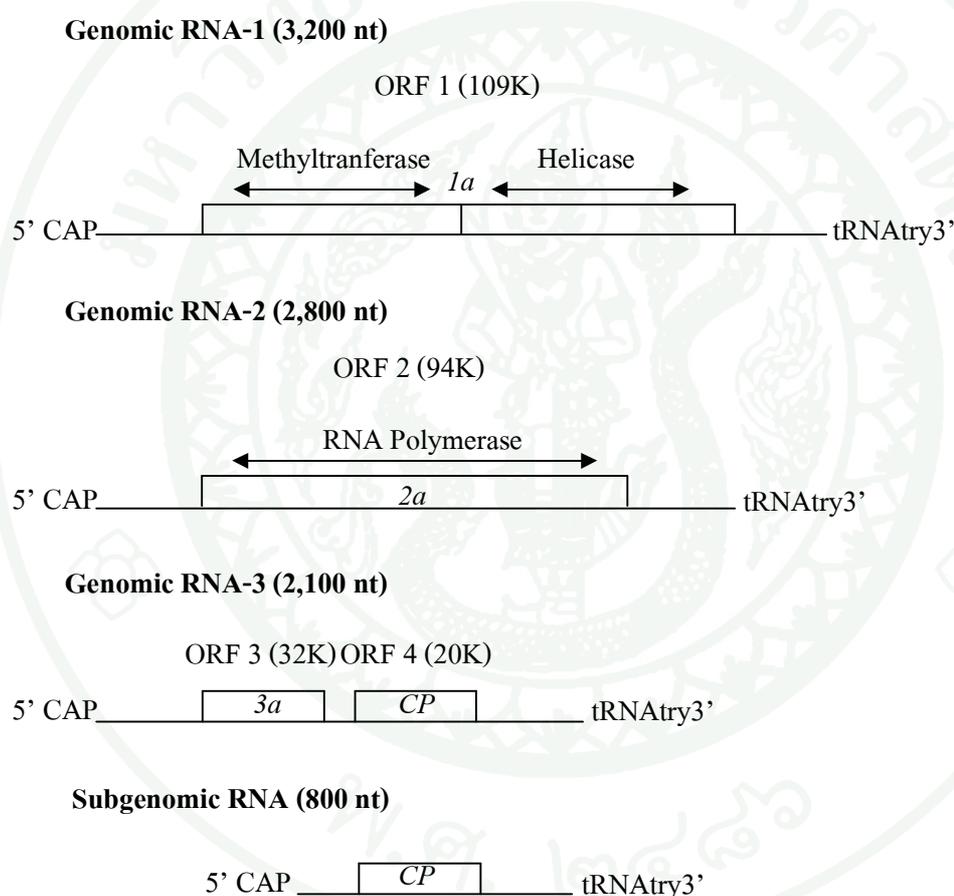
3.2 เชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV)

BMV จัดอยู่ในวงศ์ *Bromoviridae* จีโนม *Bromovirus* อนุภาคไวรัสเป็นแบบทรงกลม (isometric) ไม่มีเยื่อหุ้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดประมาณ 26 นาโนเมตร องค์ประกอบของอนุภาคประกอบด้วย RNA 3 เส้น จีโนมยาว 8,900 นิวคลีโอไทด์ (Ahlquist *et al.*, 1984; Dasgupta and Kaesberg, 1982) และโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 22 กิโลดาลตัน (Hull, 2002)

3.3 โครงสร้างจีโนมของเชื้อ BMV

เชื้อ BMV มีจีโนมเป็นแบบ multipartite กรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 3 เส้น (single stranded, positive sense RNAs) คือ RNA-1 (B), RNA-2 (M) และ RNA-3 (T) โดยทางด้านปลาย 5' ของอาร์เอ็นเอทั้ง 3 ชิ้น เชื่อมอยู่กับ m7G5'ppp5 (cap) ส่วนปลาย 3' จะมีโครงสร้าง tRNA-like structure RNA-1 จีโนมเป็นแบบ monocistronic มีความยาว 3,200 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีน 1a ขนาด 109 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย m7G5'ppp5 (cap) ทำหน้าที่เชื่อมปลาย 5' RNA ของไวรัส และเอนไซม์ helicase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัส

RNA-2 มีจีโนมเป็นแบบ monocistronic มีความยาว 2,800 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีน 2a ขนาด 94 กิโลดาลตัน ได้แก่เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของไวรัส และ RNA-3 จีโนมเป็นแบบ dicistronic มีความยาว 2,100 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีน 3a ได้แก่ cell-to-cell movement protein และ coat protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสในเซลล์พืช ส่วน coat protein จะไม่แปลรหัสจาก RNA-3 แต่จะสังเคราะห์ subgenomic mRNA หรือ RNA-4 ขึ้นมาใหม่ในการแปลรหัส (Amine and Ahlquist, 2003) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส BMV (linear single strand, positive-sense RNAs, RNA-1, RNA-2, RNA-3 และ subgenomic RNA) และส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆจากปลาย 5' → 3'

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* และ *Brome mosaic virus*

เก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างในแหล่งปลูกข้าวฟ่างที่สำคัญในประเทศไทย 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลพบุรี (LB) สระบุรี (SB) นครสวรรค์ (NW) สุพรรณบุรี (SP) กาญจนบุรี (KB) และเพชรบูรณ์ (PB) โดยเก็บตัวอย่างใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการด่างที่ใบอ่อนชัดเจน ใบแสดงอาการด่างเป็นจุดเล็กๆ สีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม และด่างเป็นขีดๆสีขาว กระจายไปทั่วทั้งใบ และอาการด่างแบบอื่นๆ นำตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างมาตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยา ปลูกเชื้อไวรัสลงบนข้าวฟ่างเพื่อเพิ่มปริมาณ วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แยกเชื้อ BMV ให้บริสุทธิ์ คัดเลือกเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่บริสุทธิ์ แยกสกัดอาร์เอ็นเอ และทดสอบความรุนแรงของโรค

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Indirect-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Indirect-ELISA)

นำตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างมาตรวจหาเชื้อไวรัสเบื้องต้นด้วยเทคนิค Indirect-ELISA ตามขั้นตอนวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อเชื้อ SCMV และ BMV ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช โดยบดตัวอย่างใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างใน extraction buffer (136 mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 9 mM NaH_2PO_4 และ 2.7 mM KCl, PBS ที่ผสม 0.05% Tween-20, PBST และ 1% polyvinylpyrrolidone, PVP) อัตราส่วน 1:1 (กรัมต่อมิลลิลิตร) เจือจางด้วย carbonate coating buffer pH 9.6 (34 mM NaHCO_3 และ 15 mM Na_2CO_3) อัตราส่วน 1:20 หยอดน้ำคั้นพืชที่ได้ลงในหลุมของ ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติม blocking solution (PBS ที่ผสม 1% bovine serum albumin, BSA) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม primary antibody (anti SCMV-corn, anti BMV-corn) ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:1,000 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม goat anti rabbit conjugate (GAR) ที่

เจือจางใน PBS อัตราส่วน 1:10,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติม substrate buffer ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 30-60 นาที หรือจนเห็นปฏิกิริยาสีเหลืองเกิดขึ้นชัดเจนแล้วหยุดปฏิกิริยา โดยเติม 3N NaOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate (Labsystem รุ่น Multiscan EX) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3. การเพิ่มปริมาณเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* และ *Brome mosaic virus*

นำตัวอย่างข้าวฟ่างที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี Indirect-ELISA เป็นบวก มาเพิ่มปริมาณโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลดลงบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT 429-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรค โดยบดใบข้าวฟ่างใน 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราใบพืช 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ในโถงที่นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) และแช่เย็นไว้แล้ว บดใบพืชจนละเอียด นำน้ำคั้นที่ได้ไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกล (mechanical inoculation) โดยโรยผงคาร์บอนดำลงในน้ำคั้นพืช จากนั้นใช้นิ้วมือแตะลงในน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรค แล้วทาลงบนใบข้าวฟ่างปกติให้ทั่วทั้งใบ ภายหลังข้าวฟ่างแสดงอาการของโรค ตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง เก็บใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบต่างมาใช้ในการทดลองต่อไป

4. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตัวอย่างข้าวฟ่างจากการเพิ่มปริมาณเชื้อ SCMV และ BMV มาตรวจหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส โดยดัดแปลงจากวิธีการเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์ของ Brunt และ Kenten (1971) บดตัวอย่างพืช 0.5 กรัม ใน Lysis buffer (50 mM Trisbase, 300 mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH 8.0) 1.2 มิลลิลิตร ย้ายใส่ในหลอดไมโครทิวป์ 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเศษพืชที่ 5,000 รอบต่อนาที ย้ายส่วนที่เป็นน้ำใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนโปรตีนด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ PEG 6,000 กวนให้เข้ากันที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำที่ละลายตะกอนด้วย 0.5x PBS buffer, pH 7.9 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร dialysis ด้วย 0.5x PBS buffer, pH 7.9 ซ้ำมคิน

ดูดตัวอย่างใส่หลอดไมโครทิวป์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 2x loading dye (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 16% glycerol และ 5% 2-mercaptoethanol) 10 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แช่ในน้ำแข็งทันที แยกขนาดของโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel โดยใช้ 6% stacking gel และ 12% separating gel ด้วยเครื่อง mini protein bio rad เติมตัวอย่าง 15 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยมี protein marker #431 เป็นตัวเปรียบเทียบ ย้อมสีเจลด้วย 0.2% coomassie brilliant blue R-250 ล้างเจลด้วย destaining solution จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่เจลในน้ำ (Sambrook and Russell, 2001)

5. การศึกษาอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างข้าวฟ่างจากการเพิ่มปริมาณเชื้อ SCMV และ BMV มาศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยหยด phosphate buffer ลงบนกริด ตัดตัวอย่างใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างเป็นสามเหลี่ยม ใช้ปลายสามเหลี่ยมจุ่มลงในหยดบัฟเฟอร์ที่อยู่บนกริด ประมาณ 5 ครั้ง ทิ้งไว้ 1 นาที ซับกริดด้วยกระดาษกรอง จากนั้นย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate นาน 1 นาที ซับกริดให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (JEOL JEM-1230)

6. การแยกเชื้อ SCMV และ BMV ให้บริสุทธิ์

ศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE จะทำให้ทราบว่าในข้าวฟ่าง 1 ตัวอย่าง มีเชื้อไวรัสชนิดเดียวหรือหลายชนิดเข้าทำลาย ถ้าพบเชื้อไวรัสเพียงชนิดเดียวก็สามารถนำไปทำการแยกสกัดอาร์เอ็นเอ และทดสอบความรุนแรงของโรคได้เลย แต่ถ้าพบว่ามีเชื้อไวรัสเข้าทำลายมากกว่า 1 ชนิด สามารถแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ได้โดยการปลูกเชื้อไวรัสลงบนพืชอาศัยที่ทำให้เกิดแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) แต่ถ้าไม่มีพืชอาศัยที่ทำให้เกิดแผลจุดเฉพาะแห่งให้คัดเลือกไอโซเลทของเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์มาทำการแยกสกัดอาร์เอ็นเอ และทดสอบความรุนแรงต่อไป

6.1 คัดเลือกเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่บริสุทธิ์

สำหรับเชื้อ SCMV ไม่พบพืชอาศัยที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีการคัดเลือกเชื้อไวรัสไอโซเลทที่มีความบริสุทธิ์ โดยศึกษาจากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสที่มีน้ำหนักแตกต่างกันในไวรัสแต่ละชนิด ด้วยวิธี SDS-PAGE

6.2 การแยกเชื้อ BMVบริสุทธิ์โดยปลูกเชื้อไวรัสบนพืชอาศัย

สามารถแยกเชื้อ BMV ให้บริสุทธิ์ได้โดยการปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลดบน *Chenopodium amaranticolor* หลังจากปลูกเชื้อไวรัส ใบของ *C. amaranticolor* จะแสดงอาการแผลจุด (ธีระ, 2532; Paulsen and Niblett, 1977) จากนั้นทำการแยกแต่ละจุดไปปลูกเชื้อลงบนข้าวโพดหวาน เนื่องจากข้าวโพดหวานอ่อนต่อเชื้อไวรัสมาก และนำมาปลูกเชื้อลงบนข้าวฟ่างเพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE

7. ไพรมเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค(CP gene) ของเชื้อ SCMV และ BMV

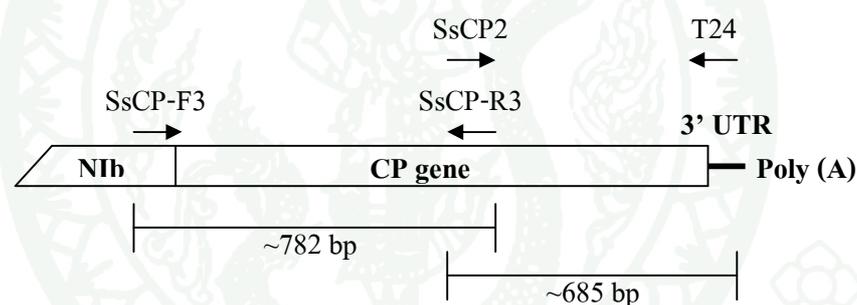
นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV จากฐานข้อมูล GenBank มาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างกัน ด้วยโปรแกรม Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) จากนั้นออกแบบไพรมเมอร์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งเบสและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม oligonucleotide properties ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV และ BMV แสดงดังในตารางที่ 2 และแสดงตำแหน่งของคู่ไพรมเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ดังในภาพที่ 3 และเชื้อ BMV ดังในภาพที่ 4

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV และ BMV ในปฏิกิริยา reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ไวรัส	ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับเบส (5' → 3')	หมายเหตุ
SCMV	SsCP-F3	sense	CGC GAA CCT GGC AAA GGA AGG C	ออกแบบ
	SsCP-R3	antisense	TGG TGA GCA ACC ATT TTC GA	ออกแบบ
	SsCP2	sense	TCG AAA ATG GTT GCT CAC CA	*1
	T24	antisense	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	*1
BMV	FCP	sense	ATG TCG ACT TCA GGA ACT GGT AAG ATG	*2
	RCP2	antisense	GTG TCC TAC CTG GAC AGG GTC	*2

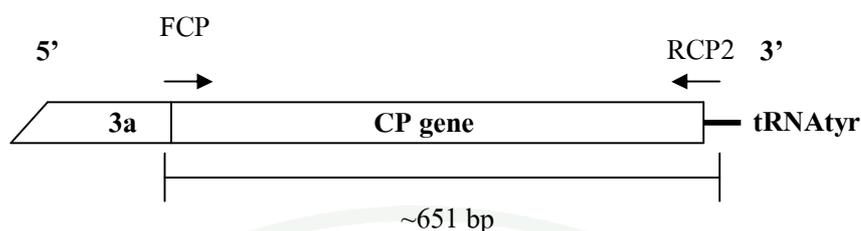
หมายเหตุ *1 วิริยาพร (2551)

*2 จันทร์เพ็ญ (2551)



ภาพที่ 3 ภาพจำลองแสดงตำแหน่งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) รวมทั้งการแสดงตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมทั้งยีน โดยมีคู่ไพรเมอร์ SsCP-F3 กับ SsCP-R3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 782 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ SsCP2 กับ T24 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 685 คู่เบส (ตามตำแหน่งลูกศร)

Genomic RNA-3



ภาพที่ 4 ภาพจำลองแสดงตำแหน่งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) รวมทั้งการแสดงตำแหน่งของคู่อพรเมอร์ที่ครอบคลุมทั้งยีน โดยมีคู่อพรเมอร์ FCP กับ RCP2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส (ตามตำแหน่งลูกศร)

8. การแยกสกัดอาร์เอ็นเอ

แยกสกัดอาร์เอ็นเอจากข้าวฟ่างที่ผ่านการปลูกเชื้อ SCMV และ BMV ไอโซเลทที่บริสุทธิ์ เพื่อเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chang *et al.* (1993) โดยชั่งใบข้าวฟ่างที่มีอาการด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส 0.1-0.2 กรัม นำมาบดในโกร่งให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วเติม 2% CTAB 1 มิลลิลิตร บดพืชให้ละเอียดแล้วนำมาใส่หลอดไมโครทิวป์ และบ่มเชื้อที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อให้เศษพืชตกตะกอน ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสประมาณ 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนและเศษพืชที่ยังเหลืออยู่ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ (ทำซ้ำอีก 1 รอบ) จากนั้นดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่แล้วเติม 4 M LiCl ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส พลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ 2-3 ครั้ง แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex จากนั้นเติม 5M NaCl 100 ไมโครลิตร และ Isopropanol เย็นจัด 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปกลับมา 2-3 ครั้งเบาๆ แล้วบ่มเชื้อที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย DEPC-dH₂O 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

9. การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

ทำการสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อ SCMV และ BMV ในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบข้าวฟ่างที่เป็นโรคม้าทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี reverse transcription (RT) โดยใช้ตัวอย่างที่สกัดได้จากข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส 2 ไมโครลิตร เติม Reverse primer (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ 9 ไมโครลิตร นำไปไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (DNA thermal cycler, MJ Research PTC-100) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติม 5x RT buffer 4 ไมโครลิตร และเติม 10 mM dNTPs 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เติมเอนไซม์ MMuLV 1 ไมโครลิตร ปฏิกริยารวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที และบ่มต่ออีกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Marie-Jeanne *et al.*, 2000)

10. การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

10.1 การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV

ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร 10 pM Forward primer (SsCP-F3 : CGC GAA CCT GGC AAA GGA AGG C) 0.5 ไมโครลิตร 10 pM Reverse primer (SsCP-R3 : TGG TGA GCA ACC ATT TTC GA) 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร และ dH₂O 5.45 ไมโครลิตร ปฏิกริยารวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (DNA thermal cycle) ของ Biometra โดยตั้งปฏิกิริยาที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 90 วินาที เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ให้เป็นสายเดี่ยว (denature) ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และทำ

การเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR เหมือนขั้นต้นแต่เปลี่ยน Forward primer เป็น SsCP2 (TCG AAA ATG GTT GCT CAC CA) Reverse primer เป็น T24 (TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT) และเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นที่ 2 เป็น 55 องศาเซลเซียส เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์ เก็บดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sambrook and Russell, 2001) ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1 % agarose gel

10.2 การเพิ่มปริมาณยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร 10 pM Forward primer (FCP: ATG TCG ACT TCA GGA ACT GGT AAG ATG) 0.5 ไมโครลิตร 10 pM Reverse primer (RCP2: GTG TCC TAC CTG GAC AGG GTC) 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร และ dH₂O 5.45 ไมโครลิตร ปฏิกิริยารวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (DNA thermal cycle) ของ Biometra โดยตั้งปฏิกิริยาที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 90 วินาที เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ให้เป็นสายเดี่ยว (denature) ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์ เก็บดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sambrook and Russell, 2001) ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1 % agarose gel

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer จากนั้นนำแผ่น agarose gel ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide (0.5 mg/ml) นาน 10 นาที และแช่ด้วยน้ำเปล่า 10 นาที แล้วนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation

11. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1 % agarose gel แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN[®]) และเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ (vector) pGEM[®]-T easy (Promega coporation) แล้วนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวซึ่งคาดว่ามีการผสมผสาน นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

แยกสกัดพลาสมิดตามวิธี Miniprep plasmid purification (QIAGEN[®]) ส่งพลาสมิดสายผสมไปวิเคราะห์ที่บริษัท Ward medic จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อไวรัสที่มีรายงานในประเทศไทย และที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และแสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสในรูปแบบ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4 version 4.0.2

12. การทดสอบความรุนแรงของโรค

เนื่องจากพื้นที่ปลูกข้าวฟ่างในประเทศไทยมีไม่มากนัก จึงกำหนดไอโซเลทจากแต่ละอำเภอที่ทำการสำรวจ ทำการทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ SCMV และ BMV แต่ละไอโซเลท เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสต่อไป

หลังจากได้เชื้อ SCMV และ BMV ที่บริสุทธิ์แล้ว นำมาปลูกเชื้อด้วยวิธีกลดลงบนข้าวฟ่างเมล็ด ซึ่งเป็นวัตถุดิบส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ UT 429-1, UT 1085 B, KU 804, KU 439, อินทรี 2 และ ลูกผสมสีแดง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอและต้านทานต่อเชื้อ SCMV (วิริยาพร, 2551; กาญจนา, 2547) และ ข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดหวาน (Hybrid 3) ข้าวโพดฝักอ่อน (SG 17) และ ข้าวโพดไร่ (สุวรรณ 3) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอและต้านทานต่อเชื้อ SCMV และ BMV (วิริยาพร, 2551; จันทร์เพ็ญ, 2551) (ตารางที่ 3) โดยบดใบข้าวฟ่างที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อไวรัสอายุประมาณ 2 สัปดาห์ หลังการปลูกเชื้อ ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราพืชสด 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ในโรงที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และแช่เย็น ใช้ในโตรเจนเหลวบดจนใบพืชละเอียด ผสมบัฟเฟอร์ และแช่ในน้ำแข็ง ผสมน้ำคั้นพืชกับผงคาร์บอนดำ ใช้

นิวมือจุ่มลงในน้ำคั้นแล้วทาบนใบพืชให้ทั่วทั้งใบ โดยพืชที่นำมาทดสอบมีอายุ 7 วัน ใช้พืชทดสอบ 20 ต้น ต่อเชื้อไวรัส 1 ไอโซเลท และพืชแต่ละสายพันธุ์จะมีต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไวรัส 5 ต้น ไว้ใช้ในการเปรียบเทียบ บันทึกลักษณะอาการของโรคอย่างละเอียด คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ SCMV ที่ 6, 11, 16 และ 28 วัน หลังการปลูกเชื้อ นำเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมาคำความสามารถในการต้านทานโรค ตามวิธีของ Khun และ Jellum (1970) และตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อเชื้อ SCMV เพื่อยืนยันผลการเกิดโรคบนพืชอาศัยในแต่ละช่วงเวลา

ตารางที่ 3 แผนการทดสอบความรุนแรงของโรค

พืชอาศัย	พันธุ์	เชื้อไวรัส	
		ปลูกเชื้อ (ต้น)	ไม่ปลูกเชื้อ (ต้น)
ข้าวฟ่าง	UT 429-1	20	5
	UT 1085 B	20	5
	KU 804	20	5
	KU 439	20	5
	อินทรี 2	20	5
	ลูกผสมสีแดง	20	5
ข้าวโพด	Hybrid 3 (ข้าวโพดหวาน)	20	5
	SG 17 (ข้าวโพดฝักอ่อน)	20	5
	สุวรรณ 3 (ข้าวโพดไร่)	20	5

การหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและระดับความต้านทาน โรคของข้าวฟ่างและข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ SCMV จากค่า MDMV disease index ตามวิธีของ Kuhn และ Jellum (1970) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

$$\text{MDMV disease index} = 4w+3x+2y+z$$

โดย	w	คือ	เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของข้าวฟ่างหลังปลูกเชื้อ 6 วัน
	x	คือ	เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของข้าวฟ่างหลังปลูกเชื้อ 11 วัน
	y	คือ	เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของข้าวฟ่างหลังปลูกเชื้อ 16 วัน
	z	คือ	เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของข้าวฟ่างหลังปลูกเชื้อ 28 วัน

เมื่อได้ค่า MDMV disease index นำมาจัดระดับความต้านทาน โรคดังนี้

0 – 100	จัดอยู่ในระดับต้านทานมาก (highly resistance)
101 – 300	จัดอยู่ในระดับต้านทาน (resistance)
301 – 700	จัดอยู่ในระดับต้านทานปานกลาง (moderate resistance)
701 – 900	จัดอยู่ในระดับอ่อนแอ (susceptibility)
901 – 1000	จัดอยู่ในระดับอ่อนแอมาก (highly susceptibility)

สำหรับเชื้อ BMV ศึกษาความรุนแรงของโรค โดยดูจากลักษณะอาการของโรค การพัฒนาอาการของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ 6, 11, 16 และ 28 วัน หลังการปลูกเชื้อ และตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อเชื้อ BMV เพื่อยืนยันผลการเกิดโรคบนพืชอาศัยในแต่ละช่วงเวลา โดยทำการทดสอบเชื้อ SCMV และ BMV ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองกันแมลง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคด้วยเทคนิค Indirect-ELISA

จากการเก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างในจังหวัดลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ มาตรวจหาเชื้อ SCMV และ BMV ด้วยเทคนิค Indirect-ELISA พบเชื้อ SCMV 7 ไอโซเลต คือ ไอโซเลตอำเภอโคกสำโรง จังหวัดลพบุรี (SCMV-Sr-LB), อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ (SCMV-Sr-NW), อำเภออุทุมพร จังหวัดสุพรรณบุรี (SCMV-Sr-SP), อำเภอเลาขวัญ จังหวัดกาญจนบุรี (SCMV-Sr-KB) และอำเภอบึงสามพัน (SCMV-Sr-PB1), อำเภอวิเชียรบุรี (SCMV-Sr-PB2) และอำเภอศรีเทพ (SCMV-Sr-PB3) ในจังหวัดเพชรบูรณ์ สำหรับเชื้อ BMV ตรวจพบในอำเภอบึงสามพัน จังหวัดสระบุรี (BMV-Sr-SB) (ตารางที่ 4)

2. การเพิ่มปริมาณเชื้อ SCMV และ BMV

เพิ่มปริมาณเชื้อ SCMV และ BMV จากตัวอย่างข้าวฟ่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Indirect-ELISA และข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างที่เก็บมาจากแหล่งปลูกข้าวฟ่างที่สำคัญ 6 จังหวัดของประเทศไทย โดยปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 อายุ 7 วัน (ตารางภาคผนวกที่ 1) พบว่าหลังปลูกเชื้อ SCMV 3-4 วัน ข้าวฟ่างเริ่มแสดงอาการด่างเป็นจุดสีซีด บริเวณโคนอ่อนของใบ ต่อมาอาการด่างจะพัฒนาเป็นจุดเล็กๆ สีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม ขนานไปตามความยาวของเส้นใบ และอาการด่างอย่างชัดเจนจะกระจายไปทั่วทั้งต้นหลังปลูกเชื้อ 11 วัน หลังปลูกเชื้อ BMV ลงบนข้าวฟ่าง 3-4 วัน ข้าวฟ่างเริ่มแสดงอาการด่างเป็นจุดสีซีด บริเวณโคนอ่อนของใบ ต่อมาอาการด่างจะพัฒนาเป็นจุดสีขาว และจะพบอาการด่างอย่างชัดเจนกระจายไปทั่วทั้งต้นหลังปลูกเชื้อ 11 วัน และหลังจากปลูกเชื้อไวรัสจากข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างทั้งหมด พบเชื้อไวรัสไอโซเลต Sr-PB โดยหลังจากปลูกเชื้อไวรัส 3-4 วัน ข้าวฟ่างเริ่มแสดงอาการด่างเป็นจุดสีซีด บริเวณโคนอ่อนของใบ ต่อมาอาการด่างจะพัฒนาเป็นจุดสีซีดกระจายทั่วทั้งต้น และจะพบอาการด่างอย่างชัดเจนกระจายไปทั่วทั้งต้นหลังปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน ซึ่งลักษณะอาการด่างของข้าวฟ่างที่เกิดจากเชื้อ SCMV, BMV และไวรัสไอโซเลต Sr-PB คล้ายกับอาการด่างที่แสดงบนใบข้าวฟ่างที่เก็บได้จากแหล่งปลูก

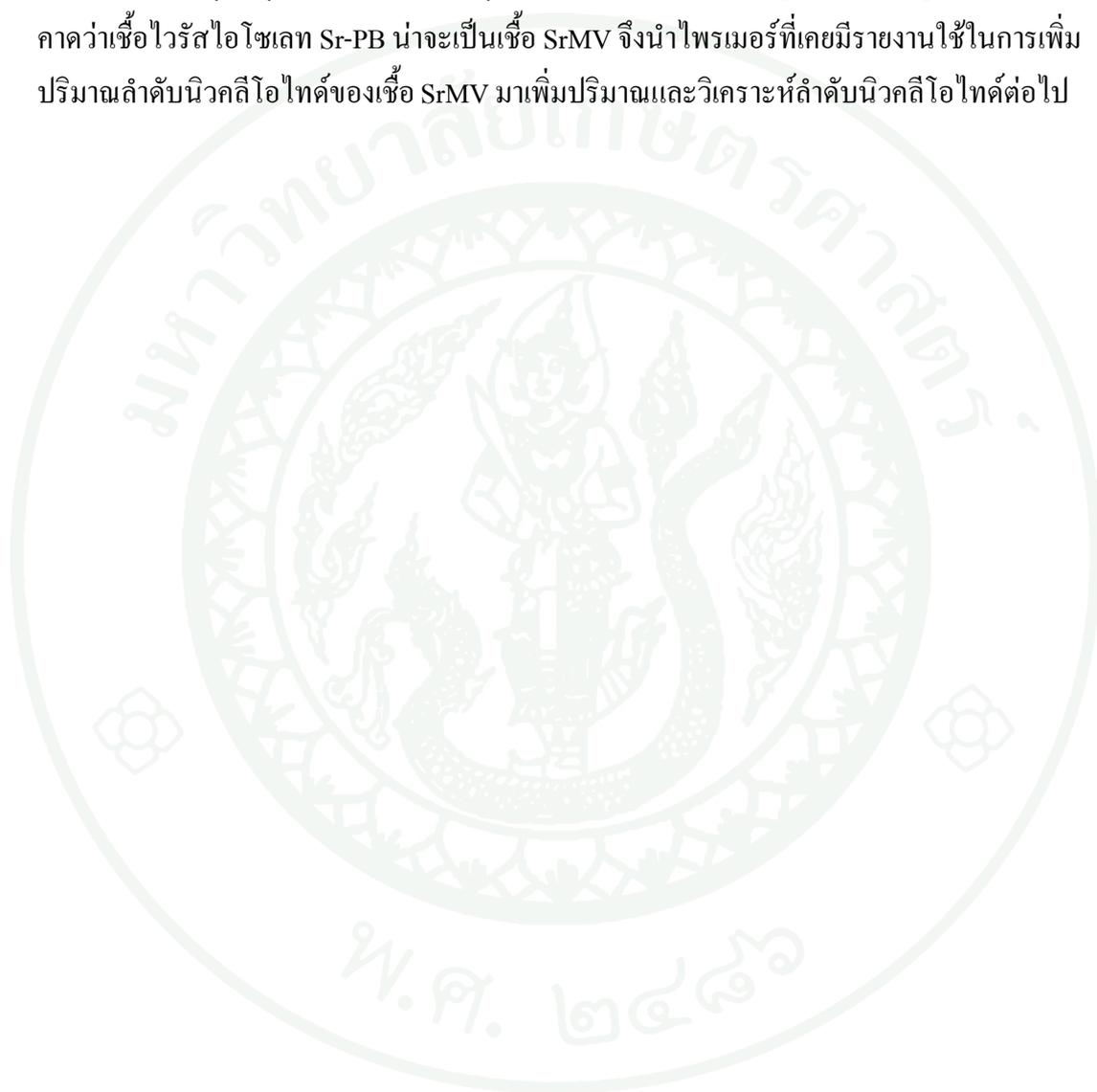
3. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE

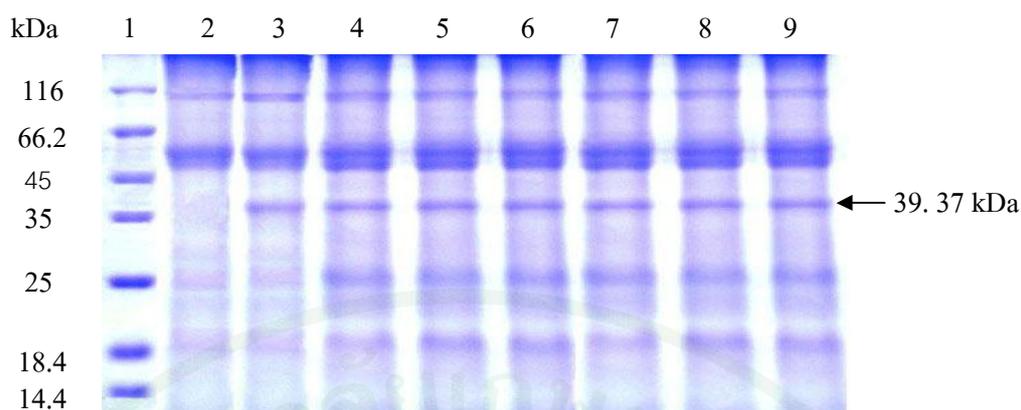
จากการทดลองพบแถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV-Sr-LB, NW, SP, KB, PB1, PB2 และ PB3 (ภาพที่ 5) มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคขนาดประมาณ 39.37 กิโลดาลตัน (ตารางที่ 4) เมื่อเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้น ที่ $R^2 = 0.9919$ (ภาพผนวกที่ 1) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่เคยมีรายงานไว้ คือ 37-38 กิโลดาลตัน (Mohammadi *et al.*, 2006) น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB มีขนาดประมาณ 21.98 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 6) และพบว่าน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB มีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 6) โดยเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้น ที่ $R^2 = 0.9923$ (ภาพผนวกที่ 2) เชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่มีขนาดใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย คือ 21.68 กิโลดาลตัน (จันทร์เพ็ญ, 2551)

4. การศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB, NW, SP, KB, PB1, PB2, PB3, BMV-Sr-SB และเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB มาศึกษาลักษณะของอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ตารางที่ 4) พบอนุภาคของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท มีลักษณะแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) โดยเชื้อ SCMV-Sr-LB กว้าง 15.3 นาโนเมตร ยาว 744.9 นาโนเมตร, SCMV-Sr-NW กว้าง 15.3 นาโนเมตร ยาว 748.8 นาโนเมตร, SCMV-Sr-SP กว้าง 13.5 นาโนเมตร ยาว 729.4 นาโนเมตร, SCMV-Sr-KB กว้าง 13.5 นาโนเมตร ยาว 705.8 นาโนเมตร, SCMV-Sr-PB1 กว้าง 15.3 นาโนเมตร ยาว 776.4 นาโนเมตร, SCMV-Sr-PB2 กว้าง 15.3 นาโนเมตร ยาว 771 นาโนเมตร และ SCMV-Sr-PB3 กว้าง 15.3 นาโนเมตร ยาว 747.1 นาโนเมตร ความยาวของอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่าง มีขนาดใกล้เคียงกับความยาวของอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่มีรายงานไว้ คือ 730-755 นาโนเมตร (Bond and Pirone, 1971) อนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB มีลักษณะแบบทรงกลม (isometric) เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 27 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย คือ 26 นาโนเมตร (จันทร์เพ็ญ, 2551) และเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB มีลักษณะอนุภาคแบบท่อนยาวคด กว้าง 15.3 นาโนเมตร ยาว 706 นาโนเมตร (ภาพที่ 7)

สำหรับเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB มีลักษณะอนุภาคแบบท่อนยาวคด ความยาวขนาดประมาณ 706 นาโนเมตร และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Sorghum mosaic virus* (SrMV) ที่เคยมีรายงานเข้าทำลายข้าวฟ่างในต่างประเทศ โดยอนุภาคมีความยาวขนาด 702-714 นาโนเมตร (Chen and Adams, 2001) และโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 36 กิโลดาลตัน (Lapierre and Signoret, 2004) จึงคาดว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB น่าจะเป็นเชื้อ SrMV จึงนำไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานใช้ในการเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SrMV มาเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป





ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่องเจลที่ 1 = โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)

ช่องเจลที่ 2 = ข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ช่องเจลที่ 3 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB

ช่องเจลที่ 4 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW

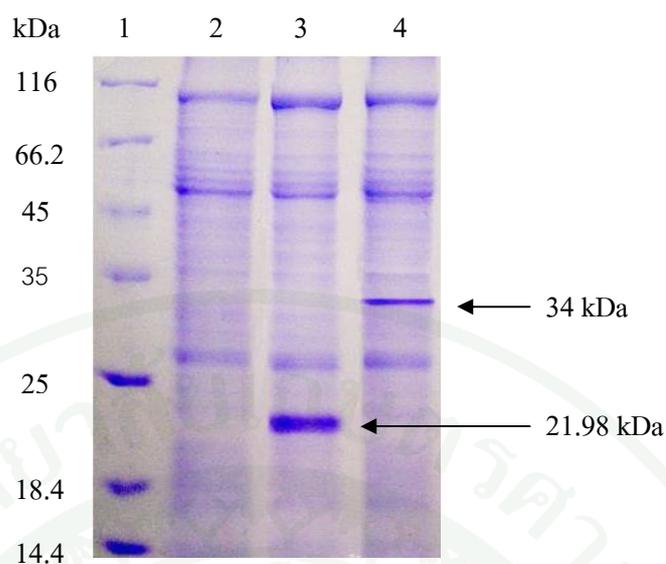
ช่องเจลที่ 5 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP

ช่องเจลที่ 6 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-KB

ช่องเจลที่ 7 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB1

ช่องเจลที่ 8 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB2

ช่องเจลที่ 9 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB3



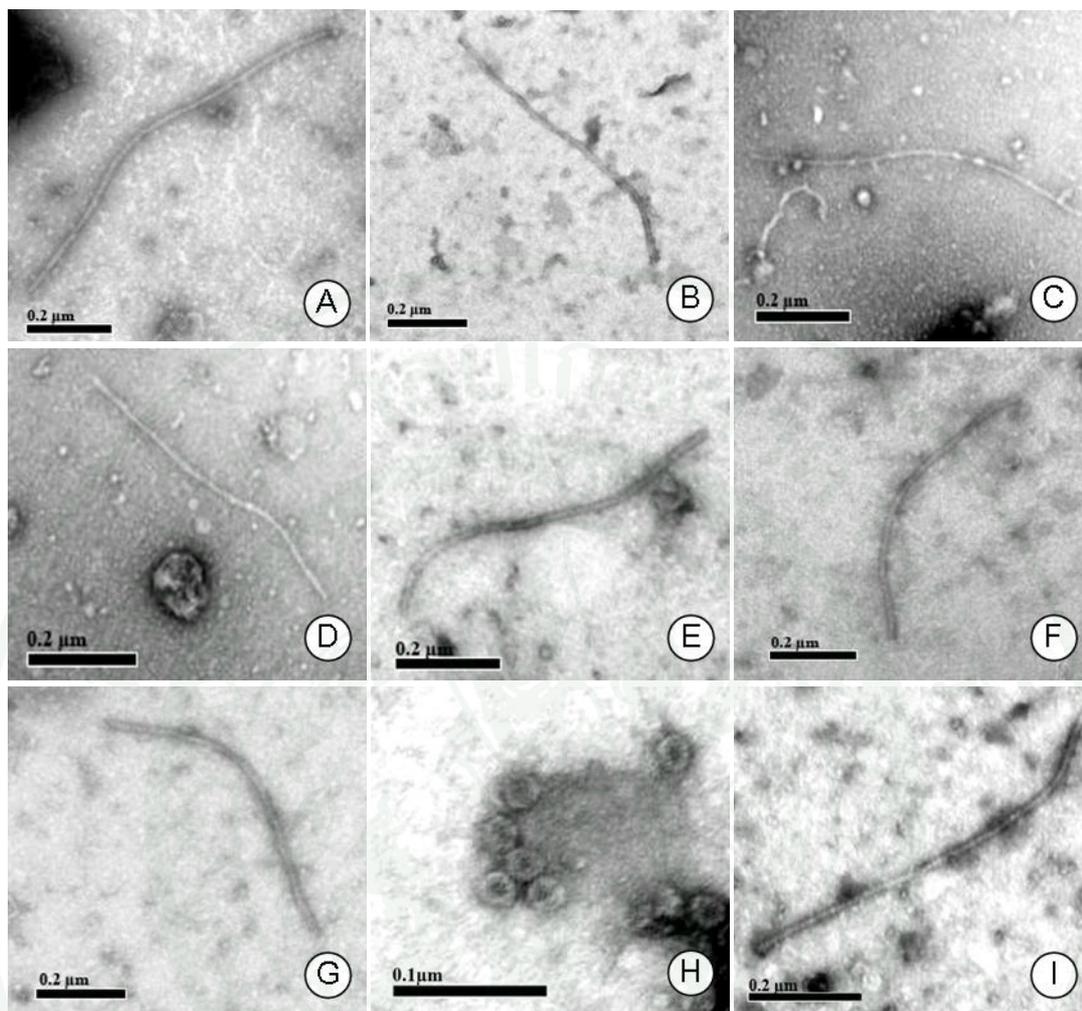
ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB และเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่องเจลที่ 1 = โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)

ช่องเจลที่ 2 = ข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ช่องเจลที่ 3 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB

ช่องเจลที่ 4 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB



ภาพที่ 7 ลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัส SCMV-Sr-LB (A), SCMV-Sr-NW (B), SCMV-Sr- SP (C), SCMV-Sr-KB (D), SCMV-Sr-PB1 (E), SCMV-Sr-PB2 (F), SCMV-Sr-PB3 (G), BMV-Sr-SB (H) และไวรัสไอโซเลท Sr-PB (I)

ตารางที่ 4 สรุปผลการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Indirect-ELISA การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนต่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE และการศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

สถานที่		Indirect ELISA		SDS-PAGE	ลักษณะอนุภาค	ชื่อเรียก
จังหวัด	อำเภอ	SCMV	BMV			
ลพบุรี	หนองม่วง	-	-			
	โคกสำโรง	+	-	39.37 kDa	ท่อนยาวคด	SCMV-Sr-LB
สระบุรี	พระพุทธบาท	-	+	21.98 kDa	ทรงกลม	BMV-Sr-SB
	วังม่วง	-	-			
	หนองโดน	-	-			
นครสวรรค์	ตากฟ้า	+	-	39.37 kDa	ท่อนยาวคด	SCMV-Sr-NW
	ตากถี	-	-			
สุพรรณบุรี	อู่ทอง	+	-	39.37 kDa	ท่อนยาวคด	SCMV-Sr-SP
กาญจนบุรี	เลาขวัญ	+	-	39.37 kDa	ท่อนยาวคด	SCMV-Sr-KB
เพชรบูรณ์	บึงสามพัน	+	-	39.37 kDa	ท่อนยาวคด	SCMV-Sr-PB1
		-	-	34 kDa	ท่อนยาวคด	ไวรัสไอโซเลท Sr-PB
	ศรีเทพ	+	-	39.37 kDa	ท่อนยาวคด	SCMV-Sr-PB2
	วิเชียรบุรี	+	-	39.37 kDa	ท่อนยาวคด	SCMV-Sr-PB3

หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส, - ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส

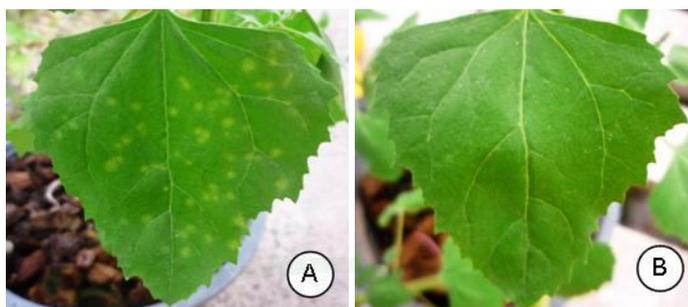
5. การแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ และการคัดเลือกไวรัสไอโซเลทที่บริสุทธิ์

5.1 การคัดเลือกเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่บริสุทธิ์

คัดเลือกเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่บริสุทธิ์ไม่มีเชื้อไวรัสอื่นปน โดยการวิเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 5) พบว่าเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างทั้ง 7 ไอโซเลท (SCMV-Sr-LB, NW, SP, KB, PB1, PB2 และ PB3) มีความบริสุทธิ์ทุกไอโซเลท โดยที่ทุกไอโซเลทมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคขนาด 39.37 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ว่าโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 37-38 กิโลดาลตัน (Mohammadi *et al.*, 2006) นำเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่บริสุทธิ์ไปแยกสกัดอาร์เอ็นเอ และทดสอบความรุนแรงของโรคต่อไป

5.2 การแยกเชื้อ BMV ให้บริสุทธิ์

นำเชื้อ BMV ไอโซเลทจังหวัดสระบุรี (BMV-Sr-SB) มาแยกเชื้อ โดยการปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลดบน *Chenopodium amaranticolor* หลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน ปรากฏอาการแผลจุดสีเหลืองเข้ม มีสีเหลืองอ่อนล้อมรอบ (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ว่า พืชจะแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) (ธีระ, 2532; Paulsen and Niblett, 1977) จากนั้นแยกแผลจุดแต่ละจุดมาปลูกเชื้อลงบนข้าวโพดหวานซึ่งอ่อนแอต่อเชื้อ (จันทร์เพ็ญ, 2551) หลังจากปลูกเชื้อ 6 วัน พบว่าข้าวโพดหวานจะแสดงอาการใบด่างเป็นแถบขาว (ภาพที่ 9) จะต้องรีบนำมาปลูกเชื้อบนข้าวฟ่างเพื่อเพิ่มปริมาณ เนื่องจากข้าวโพดหวานจะพัฒนาอาการต่างจนใบไหม้ทำให้ข้าวโพดหวานส่วนใหญ่ตาย



ภาพที่ 8 ลักษณะอาการจุดเฉพาะแห่งของใบ *C. amaranticolor* หลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 4 วัน (A) เปรียบเทียบกับลักษณะของใบปกติ (B)



ภาพที่ 9 อาการใบด่างของข้าวโพดหวานหลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 6 วัน (A) เปรียบเทียบกับข้าวโพดหวานปกติ (B)

6. การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส

6.1 การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV

นำอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากเชื้อ SCMV ไอโซเลทที่บริสุทธิ์ ในแต่ละจังหวัดมาสังเคราะห์ cDNA ในส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SsCP-F3 กับ SsCP-R3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 782 คู่เบส (ภาพที่ 10) และคู่ไพรเมอร์ SsCP2 กับ T24 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 685 คู่เบส (ภาพที่ 11) นำแถบดีเอ็นเอของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท ที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T easy (Promega coporation) จะได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมขนาดที่ต้องการคือ 782 และ 685 คู่เบส จากนั้นนำโคลนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำมาจัดเรียงต่อกันให้ครบทั้งยีน และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนต่อไป

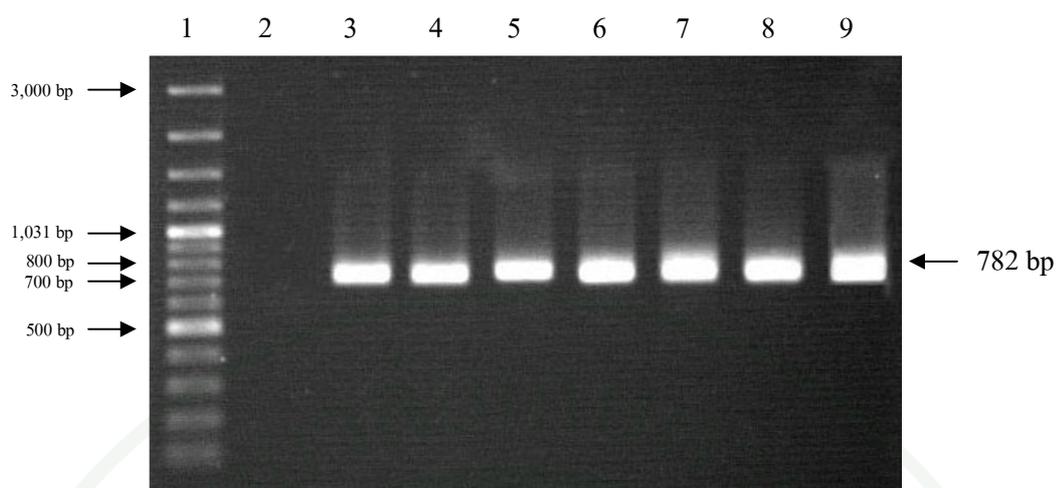
6.1 การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

นำอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากเชื้อ BMV ที่ผ่านการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ มาสังเคราะห์ cDNA ในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ FCP กับ RCP2 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส (ภาพที่ 12) นำแถบดีเอ็นเอของเชื้อ BMV มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T easy (Promega coporation) จะได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมขนาดที่ต้องการคือ 681 คู่เบส จากนั้นนำโคลนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนต่อไป

6.3 การสังเคราะห์ชิ้นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB

นำอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดจากเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ SrMV มาสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SrMV-F กับ SrMV-R (Yujia *et al.*, 2009) ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร 10 pM Forward primer (SrMV-F: ACA GCA GAW GCA ACR GCA CAA GC) 0.5 ไมโครลิตร 10 pM Reverse primer (SrMV-R: CTC WCC GAC ATT CCC ATC CAA GCC) 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร และ dH₂O 5.45 ไมโครลิตร ปฏิกิริยารวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (DNA thermal cycle) ของ Biometra โดยตั้งปฏิกิริยาที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 90 วินาที เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ให้เป็นสายเดี่ยว (denature) ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1 % agarose gel

จากผลการทดลองสามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ขนาด 360 คู่เบส แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไม่ตรงกับข้อมูลใดเลย จึงเปลี่ยนมาใช้คู่ไพรเมอร์ SrMV-F2 (AAG CAA CAG CAC AAG CAC) กับ SrMV-R2 (TGA -CTC TCA CCG ACA TTC C) (Maximiliano *et al.*, 2009) เปลี่ยนอุณหภูมิขั้นตอนที่ 2 ในปฏิกิริยา PCR เป็น 60 องศาเซลเซียส สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ขนาด 431 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไม่ตรงกับข้อมูลใดเลย จึงเปลี่ยนมาใช้คู่ไพรเมอร์ Unipotry-F (GTT TTC CCA GTC ACG AC) กับ Unipotry-R (GGN -AAY AAY AGY GGN CAR CC) (Chen *et al.*, 2001) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ NIB gene ของเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Potyvirus* พบว่าสามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ขนาด 665 คู่เบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวฟ่าง จึงคาดว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ไม่ใช่เชื้อ SrMV



ภาพที่ 10 ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณชิ้น โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SsCP-F3 และ SsCP-R3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 782 คู่เบส

ช่องเจลที่ 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus)

ช่องเจลที่ 2 = ข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ช่องเจลที่ 3 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB

ช่องเจลที่ 4 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW

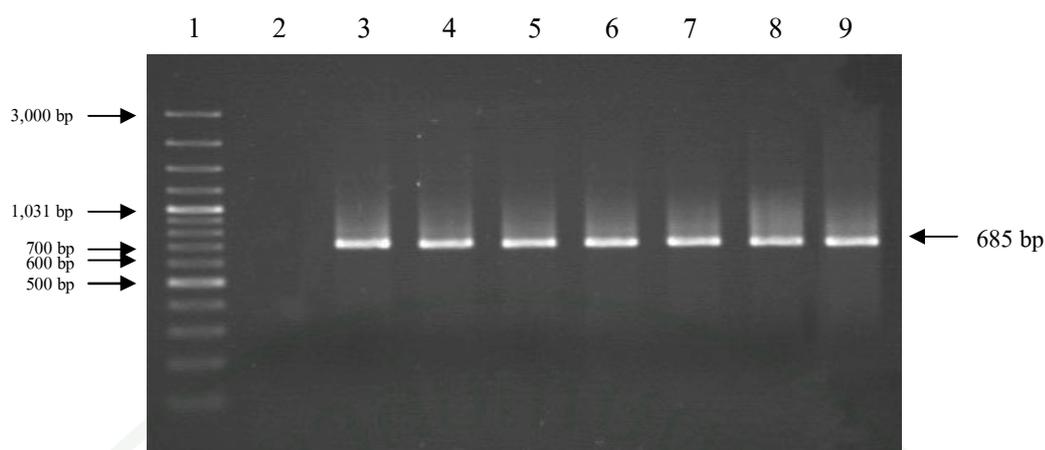
ช่องเจลที่ 5 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP

ช่องเจลที่ 6 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-KB

ช่องเจลที่ 7 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB1

ช่องเจลที่ 8 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB2

ช่องเจลที่ 9 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB3



ภาพที่ 11 ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณชิ้นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SsCP2 และ T24 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 685 คู่เบส

ช่องเจลที่ 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

ช่องเจลที่ 2 = ข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ช่องเจลที่ 3 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB

ช่องเจลที่ 4 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW

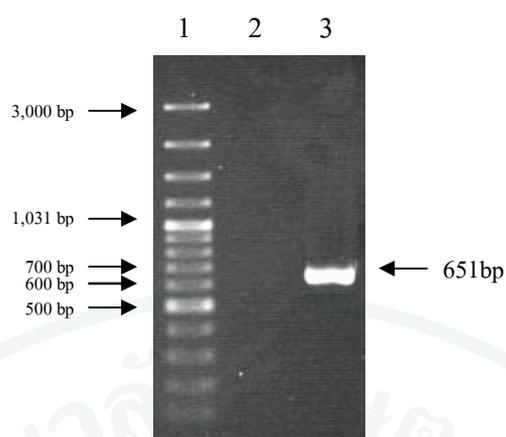
ช่องเจลที่ 5 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP

ช่องเจลที่ 6 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-KB

ช่องเจลที่ 7 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB1

ช่องเจลที่ 8 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB2

ช่องเจลที่ 9 = ข้าวฟ่างเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB3



ภาพที่ 12 ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณชิ้น โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FCP และ RCP2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส

ช่องเจลที่ 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

ช่องเจลที่ 2 = ข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ช่องเจลที่ 3 = ข้าวฟ่างเป็น โรคจากการปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

7.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV

จากการเพิ่มปริมาณยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ SsCP-F3 กับ SsCP-R3 และ SsCP2 กับ T24 พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ขนาด 921-966 คู่เบส (ภาพผนวกที่ 3) ซึ่งกำหนดสร้างโพลีเปปไทด์ขนาด 305-321 กรดอะมิโน (ภาพผนวกที่ 4) โดยเชื้อ SCMV ไอโซเลทจังหวัดลพบุรี (SCMV-Sr-LB) และสุพรรณบุรี (SCMV-Sr-SP) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 921 คู่เบส, นครสวรรค์ (SCMV-Sr-NW) และกาญจนบุรี (SCMV-Sr-KB) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 942 คู่เบส และไอโซเลทของจังหวัดเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB1, SCMV-Sr-PB2 และ SCMV-Sr-PB3) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 966 คู่เบส

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 72-99 และ 81-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 13) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จาก อ้อย และข้าวโพดในประเทศไทย และเชื้อ SCMV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 5) พบว่าเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างทั้ง 7 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศไทย (SCMV-Sc-KB, NW และ NP) ที่ระดับ 78-96 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เชื้อ SCMV-Sr- NW, KB, PB1, PB2 และ PB3 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อย ที่ระดับ 90-96 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ SCMV-Sr-LB และ SP มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อย ที่ระดับเพียง 78-82 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีการกำหนดความแตกต่างของชนิด (species) ไวรัสในกลุ่ม SCMV โดยในส่วนของลำดับกรดอะมิโนของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีความเหมือนกันน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะถูกจัดให้เป็นไวรัสต่างชนิดกัน (Van Regenmortel *et al.*, 2000) ดังนั้นเชื้อ SCMV-Sr-LB นำที่จะเป็นคนละชนิดกับเชื้อ SCMV-Sc-KB และเชื้อ SCMV-Sr-SP นำที่จะเป็นคนละชนิดกับเชื้อ SCMV-Sc-KB และ NP ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศไทย เชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (SCMV-Mz-NM, SB และ TK) ที่ระดับ 81-99 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV

ที่แยกได้จากอ้อย (SCMV-YH) และข้าวโพด (SCMV-HN) ในประเทศจีน ที่ระดับ 81-86 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศสหรัฐอเมริกา (SCMV-D และ E) ที่ระดับ 81-85 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศออสเตรเลีย (SCMV-Bris) ที่ระดับ 81-85 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศสเปน (SCMV-Sp) ที่ระดับ 84-85 เปอร์เซ็นต์ และมีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SrMV ที่มีรายงานในต่างประเทศ (SrMV-H, I และ M) ที่ระดับ 51-72 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท พบว่าเชื้อ SCMV-Sr-NW, KB, PB1, PB2 และ PB3 จัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยและข้าวโพดในประเทศไทย เชื้อ SCMV-Sr-LB และ SP จัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายอ้อยและข้าวโพดในต่างประเทศ (ภาพที่ 14) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย มีความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส อยู่มากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อย และข้าวโพดในประเทศไทย

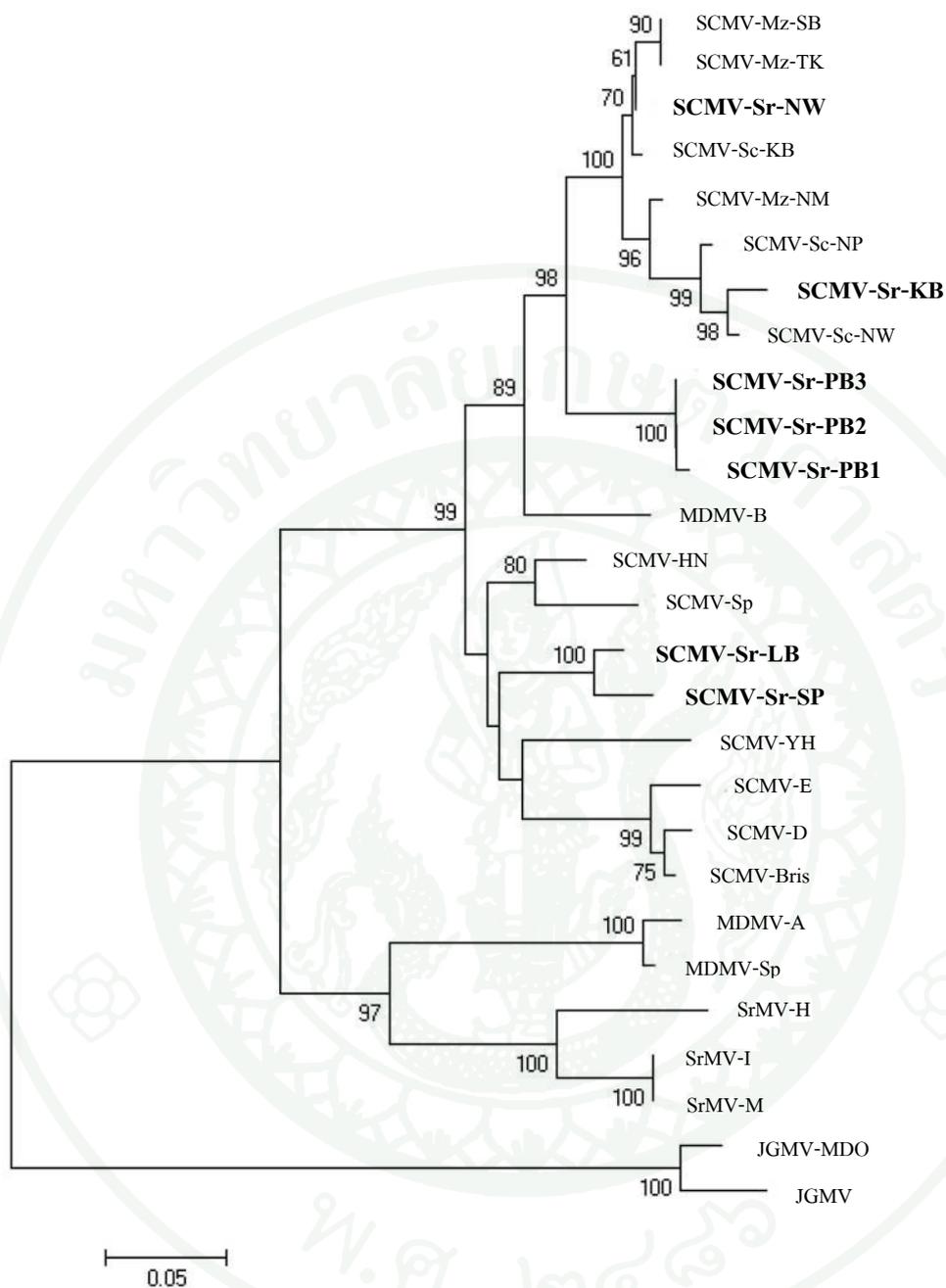
Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1. SCMV-Sr-LB		73	95	73	72	72	72	72	72	72	73	73	73	86	83	82	83	83	85	65	64	70	62	58	64	49	51
2. SCMV-Sr-NW	85		72	98	90	90	90	97	97	97	97	99	99	82	79	79	73	73	83	64	63	79	59	57	59	52	54
3. SCMV-Sr-SP	95	83		72	72	72	72	71	71	71	72	72	72	86	82	81	82	81	85	64	64	84	62	60	63	49	50
4. SCMV-Sr-KB	85	99	83		90	90	90	98	98	98	98	98	98	82	72	72	72	73	84	64	64	79	60	57	59	52	54
5. SCMV-Sr-PB1	82	93	81	93		99	99	89	89	89	89	90	90	83	73	70	68	67	74	66	66	83	59	58	59	48	52
6. SCMV-Sr-PB2	83	94	81	94	99		99	89	89	90	89	90	90	83	73	70	68	67	74	66	66	83	59	58	59	48	52
7. SCMV-Sr-PB3	83	94	81	94	99	100		89	89	89	89	90	90	83	73	70	68	67	74	66	66	83	59	58	59	48	52
8. SCMV-Sc-KB	79	95	78	95	90	91	91		99	98	98	97	97	82	71	68	68	72	83	64	63	79	60	57	59	52	54
9. SCMV-Sc-NW	80	95	80	96	90	91	91	98		98	98	97	97	80	71	68	68	72	83	64	66	79	60	57	59	52	54
10. SCMV-Sc-NP	82	96	79	96	91	92	92	97	97		99	97	97	82	71	68	68	68	83	64	63	79	59	57	59	52	53
11. SCMV-Mz-NM	81	97	80	97	92	92	92	96	96	96		97	97	82	71	69	68	72	83	64	63	79	59	57	59	52	54
12. SCMV-Mz-SB	85	99	83	99	93	93	93	94	95	95	96		100	82	79	72	68	73	83	64	63	79	59	57	59	52	54
13. SCMV-Mz-TK	85	99	83	99	93	93	93	94	95	95	96	100		82	79	72	68	73	83	64	63	79	59	57	59	52	54
14. SCMV-HN	85	86	85	86	85	85	85	83	83	84	85	86	86		84	82	81	82	93	65	65	84	63	66	62	54	54
15. SCMV-YH	86	81	84	81	83	84	84	79	79	80	80	81	81	89		83	82	82	83	67	67	82	62	59	61	50	50
16. SCMV-D	83	83	83	83	82	83	83	79	81	80	81	83	83	85	88		96	97	82	65	69	83	61	57	61	48	52
17. SCMV-E	85	81	83	81	81	82	82	78	79	79	80	81	81	83	83	96		97	82	66	67	69	60	57	60	48	51
18. SCMV-Bris	85	83	83	83	81	82	82	80	80	81	82	83	83	83	85	98	96		81	65	69	82	60	57	60	49	52
19. SCMV-Sp	85	85	85	85	84	84	84	81	82	83	84	85	85	95	87	84	81	85		65	65	80	61	58	61	54	54
20. MDMV-A	74	73	73	73	72	73	73	71	72	72	72	72	72	74	74	74	75	76	74		92	64	72	67	75	51	51
21. MDMV-Sp	75	74	73	74	74	75	75	72	73	73	73	73	73	74	73	76	77	77	74	96		67	72	67	75	50	50
22. MDMV-B	83	86	84	86	83	84	84	84	84	84	86	86	86	86	85	84	84	83	84	74	75		61	59	59	51	51
23. SrMV-H	71	68	70	68	65	66	66	66	67	68	67	70	70	70	70	74	73	72	70	78	79	67		97	97	54	50
24. SrMV-I	71	70	72	70	66	66	66	69	69	69	68	69	69	70	71	75	74	74	70	80	80	66	90		97	47	51
25. SrMV-M	55	53	54	53	51	51	51	52	52	52	53	52	52	52	55	57	56	58	53	59	59	52	79	88		54	52
26. JGMV-MDO	55	58	54	58	57	57	57	57	58	57	57	58	58	57	55	57	58	57	57	58	56	58	56	55	40		89
27. JGMV	55	58	53	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	56	58	58	58	58	58	57	58	55	56	41	93	

ภาพที่ 13 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (บนขวา) และลำดับกรดอะมิโน (ล่างซ้าย) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV

ตารางที่ 5 ข้อมูลของเชื้อ SCMV ที่ใช้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์
ลำดับกรดอะมิโน และความสัมพันธ์ในรูป Phylogenetic tree

ไวรัส	ประเทศ/พืชอาศัย	Accession number
1. SCMV-Sr-LB	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
2. SCMV-Sr-NW	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
3. SCMV-Sr-SP	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
4. SCMV-Sr-KB	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
5. SCMV-Sr-PB1	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
6. SCMV-Sr-PB2	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
7. SCMV-Sr-PB3	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
8. SCMV-Sc-KB	ไทย (อ้อย)	*1
9. SCMV-Sc-NW	ไทย (อ้อย)	*1
10. SCMV-Sc-NP	ไทย (อ้อย)	*1
11. SCMV-Mz-NM	ไทย (ข้าวโพด)	*2
12. SCMV-Mz-SB	ไทย (ข้าวโพด)	*2
13. SCMV-Mz-TK	ไทย (ข้าวโพด)	*2
14. SCMV-HN	จีน (ข้าวโพด)	AF494510
15. SCMV-YH	จีน (อ้อย)	AJ310104
16. SCMV-D	สหรัฐอเมริกา (อ้อย)	U57356
17. SCMV-E	สหรัฐอเมริกา (อ้อย)	AY836523
18. SCMV-Bris	ออสเตรเลีย (อ้อย)	AJ278405
19. SCMV-Sp	สเปน (ข้าวโพด)	AM110759
20. MDMV-A	สหรัฐอเมริกา	U07216
21. MDMV-Sp	สเปน (ข้าวโพด)	AM110758
22. MDMV-B	ออสเตรเลีย (ข้าวโพด)	D00949
23. SrMV-H	สหรัฐอเมริกา	U57358
24. SrMV-I	สหรัฐอเมริกา	U57359
25. SrMV-M	สหรัฐอเมริกา	U57360
26. JGMV-MDO	สหรัฐอเมริกา	U07217
27. JGMV	ออสเตรเลีย (หญ้าจอห์นสัน)	NC_003606

หมายเหตุ *1 วิริยาพร (2551), *2 วันวิสา (2551)



ภาพที่ 14 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท กับเชื้อ SCMV ที่มีรายงานในประเทศไทย และในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และ MEGA 4 version 4.0.2

7.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV

จากการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ไอโซเลทจังหวัดสระบุรี (BMV-Sr-SB) ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FCP และ RCP2 พบว่าสามารถสังเคราะห์ แอมพลิคอนได้ขนาด 573 คู่เบส (ภาพผนวกที่ 5) กำหนดสร้าง โพลีเปปไทด์ขนาด 305-321 กรดอะมิโน (ภาพผนวกที่ 6)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (BMV-Mz-RB และ BMV-Mz-KB) ที่ระดับ 98-99 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6) คาดว่าเชื้อ BMV ที่แยกได้จาก ข้าวฟ่าง และข้าวโพดในประเทศไทย น่าจะเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากลำดับ กรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงมาก นำลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จาก ข้าวฟ่างในประเทศไทยมาเปรียบเทียบกับเชื้อ BMV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 7) พบว่า มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ BMV-F, BMV-R และ BMV-T ที่ระดับ 76 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย พบว่าเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยจัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพด ในประเทศไทย (ภาพที่ 15) คาดว่าเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (BMV-Mz-RB และ BMV-Mz-KB) น่าจะเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ อนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดประมาณ 27 นาโนเมตร มีความใกล้เคียงกับอนุภาคของเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ซึ่งอนุภาคมีเส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาดประมาณ 26 นาโนเมตร และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีขนาด 21.98 กิโลดาลตัน มีความใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ซึ่งมีขนาด 21.68 กิโลดาลตัน (จันทร์เพ็ญ, 2551)

ตารางที่ 6 เปรอ์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (บนขวา) และลำดับกรดอะมิโน (ล่างซ้าย) ของยีน โพรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

Name	1	2	3	4	5	6
1. BMV-Sr-SB		99	98	74	73	73
2. BMV-Mz-KB	98		99	74	73	73
3. BMV-Mz-RB	98	100		74	73	73
4. BMV-F	76	77	77		98	99
5. BMV-R	76	76	76	98		98
6. BMV-T	76	77	77	98	98	

ตารางที่ 7 ข้อมูลของเชื้อ BMV ที่ใช้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และความสัมพันธ์ในรูป Phylogenetic tree

ไวรัส	ประเทศ/พืชอาศัย	Accession number
1. BMV-Sr-SB	ไทย (ข้าวฟ่าง)	การทดลองนี้
2. BMV-Mz-KB	ไทย (ข้าวโพด)	*1
3. BMV-Mz-RB	ไทย (ข้าวโพด)	*1
4. BMV-F	สหรัฐอเมริกา	DQ530425
5. BMV-R	รัสเซีย	J02042
6. BMV-T	ญี่ปุ่น	X58459

หมายเหตุ *1 จันทร์เพ็ญ (2551)



ภาพที่ 15 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย กับเชื้อ BMV ที่มีรายงานในประเทศไทย และในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และ MEGA 4 version 4.0.2

8. การทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ SCMV

8.1 ข้าวฟ่าง

นำเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท (SCMV-Sr-LB, NW, SP, KB, PB1, PB2 และ PB3) มาทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ UT 429-1, UT 1085B, KU 804, KU 439, อินทรี 2 และ ลูกผสมสีแดง พบว่าข้าวฟ่างเริ่มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อไวรัส 3-5 วัน โดยข้าวฟ่างจะแสดงอาการต่างเป็นจุดสีเขียวเล็ก ๆ ที่บริเวณโคนใบอ่อน ต่อมาจุดสีเขียวเหล่านั้นจะกระจายไปทั่วทั้งใบ หลังปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน และอาการพัฒนาเป็นจุดสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้มตามแนวยาวของเส้นใบ ลักษณะอาการมองเห็นได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ โดยที่ข้าวฟ่างสายพันธุ์อินทรี 2 แสดงอาการของโรคที่ชัดเจนหลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB (ภาพที่ 16) ซึ่งข้าวฟ่างส่วนใหญ่ในนั้นมีลักษณะอาการที่สอดคล้องกัน ยกเว้นข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 พบว่าข้าวฟ่างมีลักษณะอาการใบยอดใหม่ หลังจากปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB (ภาพที่ 17) และ SCMV-Sr-PB3 6 วัน (ภาพที่ 18) แต่ข้าวฟ่างสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้เมื่อแตกยอดใหม่ลักษณะอาการยอดใหม่หายไป ข้าวฟ่างเจริญเติบโตปกติ และข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 หลังจากปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP 28 วัน พบว่าข้าวฟ่างแสดงอาการใบใหม่ (ภาพที่ 19) บางต้นแสดงอาการใหม่อย่างรุนแรงจนต้นข้าวฟ่างตาย

การคำนวณหาระดับความรุนแรงของโรค จากสูตร MDMV disease index บนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการปลูกเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถจัดระดับความรุนแรงของโรคได้ 5 ระดับ (ตารางที่ 8-10) ดังนี้ 1) ระดับด้านทานมาก มีค่า MDMV disease index ในช่วง 0-100 ได้แก่ ข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW, SCMV-Sr-PB1 และ SCMV-Sr-PB2 2) ระดับด้านทาน มีค่า MDMV disease index ในช่วง 101-300 ได้แก่ ข้าวฟ่างสายพันธุ์ KU 804 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW ข้าวฟ่างสายพันธุ์ KU 439 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW และ SCMV-Sr-KB ข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP, SCMV-Sr-KB และ SCMV-Sr-PB3 3) ระดับด้านทานปานกลาง มีค่า MDMV disease index ในช่วง 301-700 ได้แก่ ข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW และ SCMV-Sr-KB ข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 1085B ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP, SCMV-Sr-KB, SCMV-Sr-PB2 และ SCMV-Sr-PB3 ข้าวฟ่างสายพันธุ์ KU 439 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW, SCMV-Sr-SP, SCMV-Sr-PB1, SCMV-Sr-PB2 และ SCMV-Sr-PB3 ข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB และ ข้าวฟ่างสายพันธุ์ ลูกผสมสีแดง ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-KB 4) ระดับอ่อนแอ มีค่า MDMV disease index ในช่วง 700-900 ได้แก่

ข้าวฟ่างสายพันธุ์ KU 439 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB และ ข้าวฟ่างสายพันธุ์ลูกผสมสีแดง ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-NW, SCMV-Sr-PB1 และ SCMV-Sr-PB3 5) ระดับอ่อนแอมาก มีค่า MDMV disease index ในช่วง 901-1000 ได้แก่ ข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB, SCMV-Sr-SP, SCMV-Sr-PB1, SCMV-Sr-PB2 และ SCMV-Sr-PB3 ข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 1085B ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB และ SCMV-Sr-PB1 ข้าวฟ่างสายพันธุ์ KU 804 ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB, SCMV-Sr-SP, SCMV-Sr-KB, SCMV-Sr-PB1, SCMV-Sr-PB2 และ SCMV-Sr-PB3 ข้าวฟ่างสายพันธุ์ ลูกผสมสีแดง ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB และ SCMV-Sr-PB2

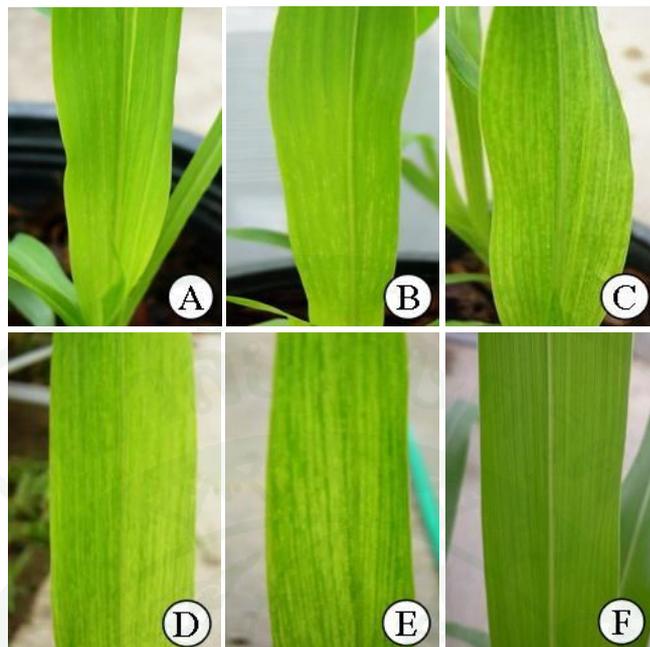
จากการทดสอบความรุนแรงของโรคบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ SCMV-Sr-LB เป็นเชื้อไวรัสไอโซเลทที่รุนแรงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การก่อให้เกิดโรคบนข้าวฟ่างทดสอบเฉลี่ยสูงถึง 94.2 เปอร์เซ็นต์ และข้าวฟ่างทดสอบมีค่า MDMV disease index เฉลี่ยที่ 847.5 ซึ่งจัดอยู่ในระดับอ่อนแอ เชื้อ SCMV-Sr-NW เป็นเชื้อไวรัสไอโซเลทที่รุนแรงน้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยที่ 55.8 เปอร์เซ็นต์ และข้าวฟ่างมีค่า MDMV disease index เฉลี่ยที่ 440.8 ซึ่งจัดอยู่ในระดับต้านทานปานกลาง และพบว่าเชื้อ SCMV-Sr-NW ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคกับข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 ดังนั้นเชื้อ SCMV-Sr-LB จึงเป็นเชื้อไวรัสที่เหมาะสมที่สุด สำหรับนำไปใช้ทดสอบเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อ SCMV ในอนาคตต่อไป

8.2 ข้าวโพด

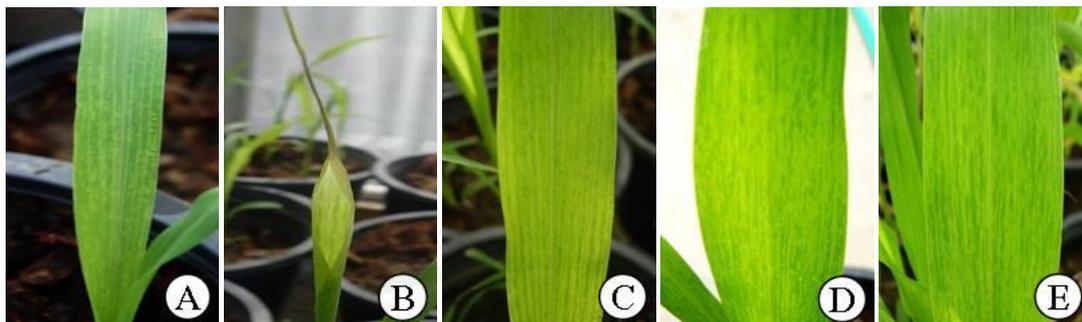
นำเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท (SCMV-Sr-LB, NW, SP, KB, PB1, PB2 และ PB3) มาปลูกเชื้อด้วยวิธีกลดบนข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดหวาน (Hybrid 3) ข้าวโพดฝักอ่อน (SG 17) และข้าวโพดไร่ (สุวรรณ 3) พบว่าข้าวโพดเริ่มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อไวรัส 3-4 วัน โดยข้าวโพดจะแสดงอาการต่างเป็นจุดสีซีดเล็กๆที่บริเวณโคนใบอ่อน ต่อมาจุดสีซีดเล็กๆนั้นจะกระจายไปทั่วทั้งใบ อาการพัฒนาเป็นขีดๆสีเขียวอ่อน สลับเขียวเข้มตามแนวยาวของเส้นใบ อาการจะเห็นชัดหลังจากปลูกเชื้อ 11-16 วัน หลังจากนั้นใบข้าวโพดจะแสดงอาการสีเขียวอ่อนชัดทั้งใบ จะเห็นขีดๆสีเขียวเข้มสลับบ้างเล็กน้อย ลักษณะอาการต่างของโรคมองเห็นได้ชัดเจนหลังปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ โดยที่ข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 แสดงอาการของโรคที่รุนแรงหลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB3 (ภาพที่ 20) ซึ่งลักษณะการพัฒนาอาการของโรคบนข้าวโพดทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความสอดคล้องกัน

การคำนวณหาระดับความรุนแรงของโรค จากสูตร MDMV disease index บนข้าวโพดทั้ง 3 สายพันธุ์ จากการปลูกเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถจัดระดับความรุนแรงของโรคได้ 4 ระดับ (ตารางที่ 8-10) ดังนี้ 1) ระดับด้านทานมาก มีค่า MDMV disease index ในช่วง 0-100 ได้แก่ข้าวโพดฝักอ่อน ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB, SCMV-Sr-NW, SCMV-Sr-SP และ SCMV-Sr-KB ข้าวโพดไร่ ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB และ SCMV-Sr-SP 2) ระดับด้านทาน มีค่า MDMV disease index ในช่วง 101-300 ได้แก่ ข้าวโพดหวาน ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB2 ข้าวโพดฝักอ่อน ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB2 และ SCMV-Sr-PB3 3) ระดับด้านทานปานกลาง มีค่า MDMV disease index ในช่วง 301-700 ได้แก่ ข้าวโพดหวานที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB, SCMV-Sr-NW, SCMV-Sr-SP, SCMV-Sr-KB, SCMV-Sr-PB1 และ ข้าวโพดฝักอ่อนที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB1 และ ข้าวโพดไร่ ที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB1 และ SCMV-Sr-PB3 4) ระดับอ่อนแอ มีค่า MDMV disease index ในช่วง 700-900 ได้แก่ ข้าวโพดหวานที่ปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB1 และ SCMV-Sr-PB

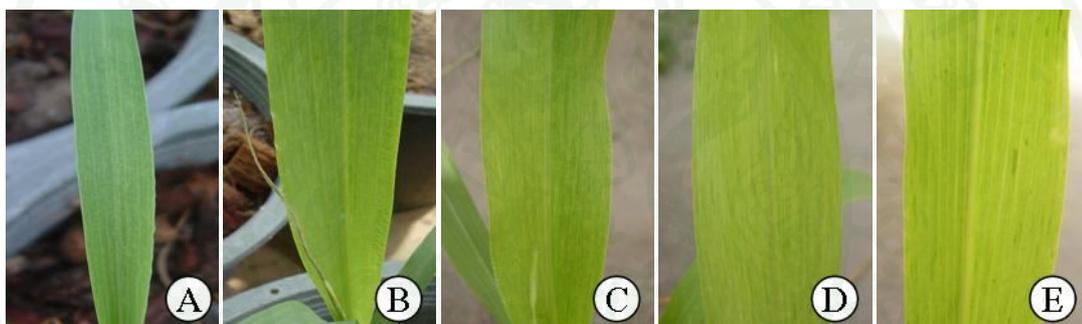
จากการทดสอบความรุนแรงของโรคบนข้าวโพดทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ SCMV-Sr-PB1 เป็นเชื้อไวรัสไอโซเลทที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงต่อข้าวโพดที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนข้าวโพดทดสอบเฉลี่ย 63.3 เปอร์เซ็นต์ และข้าวโพดทดสอบมีค่า MDMV disease index เฉลี่ยที่ 550 ซึ่งจัดอยู่ในระดับด้านทานปานกลาง เชื้อ SCMV-Sr-SP เป็นเชื้อไวรัสไอโซเลทที่รุนแรงน้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนข้าวโพดทดสอบเฉลี่ยที่ 26.7 เปอร์เซ็นต์ และข้าวโพดทดสอบมีค่า MDMV disease index เฉลี่ยที่ 173.3 ซึ่งจัดอยู่ในระดับด้านทาน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า เชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างสามารถก่อให้เกิดโรคบนข้าวโพดได้ต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวฟ่าง ทั้งนี้อาจเกิดจากการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดในประเทศไทยได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาโดยตลอดจึงทำให้ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้รับการปรับปรุงให้ดีขึ้น ทั้งนี้รวมถึงลักษณะพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ SCMV ด้วย แต่สำหรับข้าวฟ่างพบว่าการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ยังมีน้อยมากจึงทำให้พันธุกรรมของข้าวฟ่างส่วนใหญ่ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสได้ดีเท่าข้าวโพด



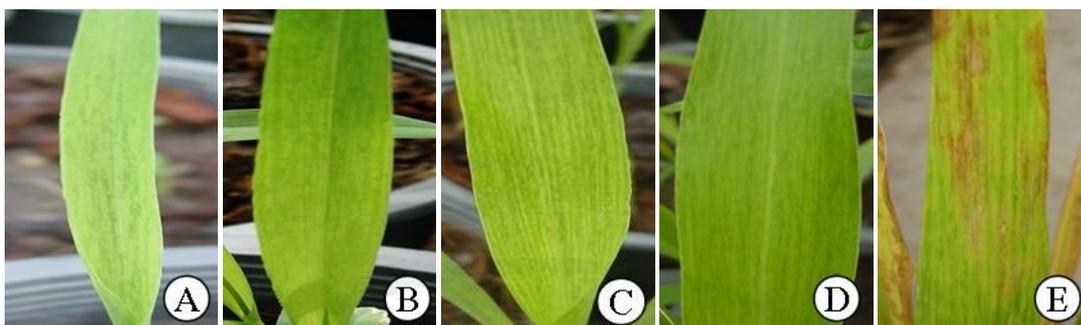
ภาพที่ 16 ลักษณะการพัฒนาอาการใบต่างของข้าวฟางสายพันธุ์ อินทรี 2 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวฟางที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)



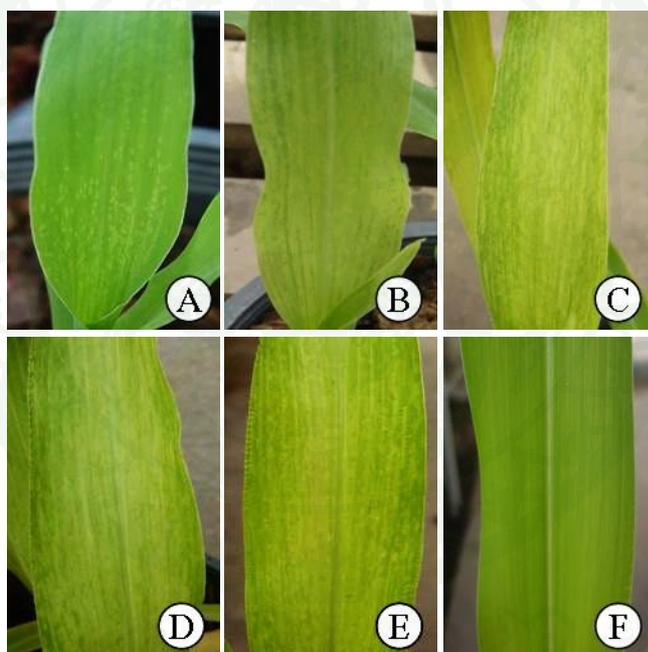
ภาพที่ 17 ลักษณะการพัฒนาอาการใบต่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยข้าวฟ่างแสดงอาการใบยอดไหม้ (B) หลังปลูกเชื้อไวรัส 6 วัน



ภาพที่ 18 ลักษณะการพัฒนาอาการใบต่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB3 ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยข้าวฟ่างแสดงอาการใบยอดไหม้ (B) หลังปลูกเชื้อไวรัส 6 วัน



ภาพที่ 19 ลักษณะการพัฒนาอาการใบค่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยข้าวฟ่างแสดงอาการใบไหม้ (E) หลังปลูกเชื้อไวรัส 28 วัน



ภาพที่ 20 ลักษณะการพัฒนาอาการใบค่างของข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ SCMV-Sr-PB3 ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบด่างของข้าวฟ่าง MDMV disease index และระดับความรุนแรงของโรคจากเชื้อ SCMV ไอโซเลทจังหวัดลพบุรี (SCMV-Sr-LB) นครสวรรค์ (SCMV-Sr-NW) สุพรรณบุรี (SCMV-Sr-SP) บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

พืชอาศัย	พันธุ์	SCMV-Sr-LB				MDMV	SCMV-Sr-NW				MDMV	SCMV-Sr-SP				MDMV
		เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				disease	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				disease	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				disease
		6วัน	11วัน	16วัน	28วัน	index	6วัน	11วัน	16วัน	28วัน	index	6วัน	11วัน	16วัน	28วัน	index
ข้าวฟ่าง	UT 429-1	95	95	95	95	950*	65	65	65	85	670***	90	95	95	95	930*
	UT 1085B	100	100	100	100	1000*	80	90	95	95	875**	40	45	50	50	445***
	KU 804	100	100	100	100	1000*	5	20	25	30	160****	95	100	100	100	980*
	KU 439	55	80	80	80	730**	15	25	30	30	225****	20	40	40	40	320***
	อินทรี 2	25	55	80	95	520***	0	0	0	0	0*****	15	30	40	40	300****
	ลูกผสมสีแดง	90	90	95	95	915*	50	80	90	95	715**	90	90	90	90	900**
	ค่าเฉลี่ย		77.5	86.7	91.7	94.2	847.5**	35.8	46.7	50.8	55.8	440.8****	43.3	66.7	69.2	69.2
ข้าวโพด	Hybrid 3	20	60	60	60	440***	40	40	45	45	415****	20	70	75	80	520***
	SG 17	5	5	5	5	50*****	5	5	5	5	50*****	0	0	0	0	0*****
	สุวรรณ 3	5	10	10	10	80*****	5	15	15	15	110****	0	0	0	0	0*****
	ค่าเฉลี่ย	10	25	25	25	190****	16.66	20	20	20	186.6****	6.7	23.3	25	26.7	173.3****

หมายเหตุ MDMV disease index ***** 0-100 ระดับต้านทานมาก, **** 101-300 ระดับ ระดับต้านทานปานกลาง, *** 301-700 ระดับต้านทานปานกลาง, ** 700-900 ระดับอ่อนแอ, * 901-100 ระดับอ่อนเอามาก

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบด่างของข้าวฟ่าง MDMV disease index และระดับความรุนแรงของโรคจากเชื้อ SCMV ไอโซเลทจังหวัดกาญจนบุรี (SCMV-Sr-KB) และเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB1 และ SCMV-Sr-PB2) บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่างๆกัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

พืชอาศัย	พันธุ์	SCMV-Sr-KB เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				MDMV disease	SCMV-Sr-PB1 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				MDMV disease	SCMV-Sr-PB2 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				MDMV disease
		6วัน	11วัน	16วัน	28วัน	index	6 วัน	11 วัน	16 วัน	28 วัน	index	6 วัน	11 วัน	16 วัน	28วัน	index
ข้าวฟ่าง	UT 429-1	65	65	80	80	695***	100	100	100	100	1000*	95	100	100	100	980*
	UT 1085B	25	95	95	95	670***	95	100	100	100	980*	0	50	65	65	345***
	KU 804	95	100	100	100	980*	85	100	100	100	940*	95	100	100	100	980*
	KU 439	5	20	20	20	140****	60	75	75	75	690***	30	55	60	70	475***
	อินทรี 2	5	10	20	20	110****	0	0	0	0	0*****	5	5	5	5	50*****
	ลูกผสมสีแดง	60	60	75	75	645***	75	75	75	75	800**	90	90	95	95	915*
	ค่าเฉลี่ย	42.5	58.4	65	65	540***	69.2	75	76.6	76.7	731.6**	52.5	66.7	70.8	72.5	624.1***
ข้าวโพด	Hybrid 3	30	30	35	40	320***	85	90	90	95	885**	30	35	35	35	267****
	SG 17	5	5	5	5	50*****	30	30	40	40	310***	20	20	20	20	210****
	สุวรรณ 3	20	20	20	20	200****	40	40	50	50	435***	5	15	15	15	110****
	ค่าเฉลี่ย	18.3	18.3	20	21.7	190****	51.7	53.3	60	63.3	550***	18.3	23.3	23.3	26.7	216.6****

หมายเหตุ MDMV disease index ***** 0-100 ระดับต้านทานมาก, **** 101-300 ระดับต้านทาน, *** 301-700 ระดับต้านทานปานกลาง, ** 700-900 ระดับอ่อนแอ, * 901-100 ระดับอ่อนแอมาก

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบด่างของข้าวฟ่าง MDMV disease index และระดับความรุนแรงของโรคจากเชื้อ SCMV ไอโซเลทจังหวัดเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB3) บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่างๆกัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

พืชอาศัย	พันธุ์	SCMV-Sr-PB3 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				MDMV disease index
		6 วัน	11 วัน	16 วัน	28 วัน	
ข้าวฟ่าง	UT 429-1	95	95	95	95	950*
	UT 1085B	45	75	80	80	645***
	KU 804	95	100	100	100	980*
	KU 439	0	60	85	85	435***
	อินทรี 2	10	20	20	20	160****
	ลูกผสมสีแดง	80	85	100	100	875**
	ค่าเฉลี่ย	54.2	72.5	80	80	674.1***
ข้าวโพด	Hybrid 3	65	75	90	95	760**
	SG 17	20	20	45	45	275****
	สุวรรณ 3	20	40	45	45	335****
	ค่าเฉลี่ย	33.3	45	60	61.7	450***

หมายเหตุ MDMV disease index ***** 0-100 ระดับต้านทานมาก, **** 101-300 ระดับต้านทาน, *** 301-700 ระดับต้านทานปานกลาง, ** 700-900 ระดับอ่อนแอ, * 901-1000 ระดับอ่อนแอมาก

9. การทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ BMV

9.1 ข้าวฟ่าง

นำเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย มาปลูกเชื้อด้วยวิธีกลดบนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ UT 429-1, UT 1085B, KU 804, KU 439, อินทรี 2 และ ลูกผสมสีแดง พบว่าข้าวฟ่างเริ่มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อไวรัส 3-4 วัน โดยข้าวฟ่างจะแสดงอาการต่างเป็นจุดสีเขียวเล็กๆที่บริเวณ โคนใบอ่อน หลังจากปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน จุดสีเขียวเล็กๆจะพัฒนาเป็นอาการต่างแถบขาวกระจายทั่วทั้งใบลักษณะอาการเห็นได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ โดยที่ข้าวฟ่างสายพันธุ์ KU 804 แสดงอาการของโรคที่รุนแรง (ภาพที่ 21) ซึ่งลักษณะอาการใบต่างแถบขาวบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ มีลักษณะอาการที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันดังกล่าวข้างต้น และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะอาการกับข้าวฟ่างที่ปลูกเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (จันทร์เพ็ญ, 2551) พบว่าลักษณะอาการต่างคล้ายคลึงกัน และพบว่าหลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ลงบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูกเชื้อไวรัสเพียง 11 วัน (ตารางที่ 11) จากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่สูง คาดว่าเชื้อ BMV น่าจะมีศักยภาพในการเข้าทำลายข้าวฟ่าง จึงสามารถใช้เชื้อ BMV-Sr-SB ในการทดสอบเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อ BMV ได้ในอนาคตต่อไป

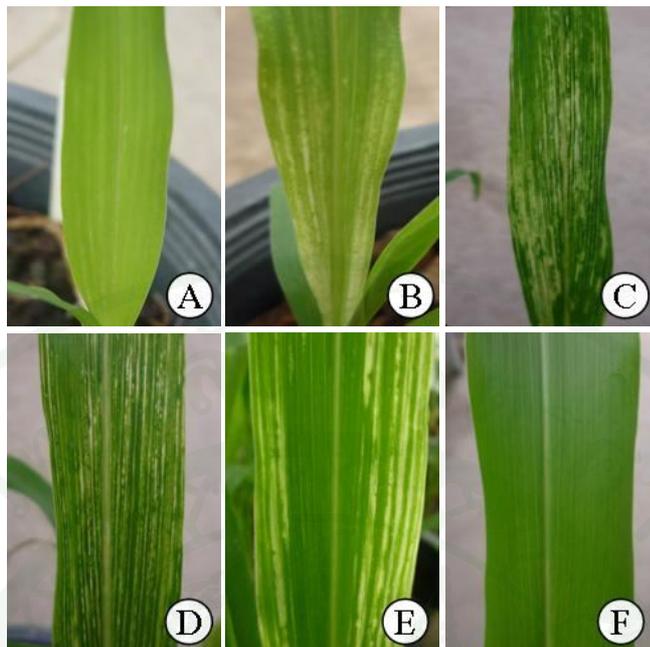
9.2 ข้าวโพด

นำเชื้อ BMV-Sr-SB ที่เข้าทำลายข้าวฟ่างในประเทศไทย มาปลูกเชื้อด้วยวิธีกลดบนข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดหวาน (Hybrid 3) ข้าวโพดฝักอ่อน (SG 17) และข้าวโพดไร่ (สุวรรณ 3) พบว่าข้าวโพดเริ่มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อไวรัส 3-4 วัน โดยข้าวโพดจะแสดงอาการต่างเป็นจุดสีเขียวเล็กๆที่บริเวณ โคนใบอ่อน หลังจากปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน จุดสีเขียวเล็กๆจะพัฒนาเป็นอาการต่างแถบขาวกระจายทั่วทั้งใบ ซึ่งลักษณะอาการใบต่างแถบขาวบนข้าวโพดฝักอ่อน (ภาพที่ 22) และข้าวโพดไร่ (ภาพที่ 23) มีลักษณะอาการที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน ลักษณะอาการต่างจะเห็นชัดเจนหลังปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ และพบว่าหลังจากปลูกเชื้อไวรัสบนข้าวโพดหวาน 11 วัน ข้าวโพดหวานแสดงอาการเนื้อใบซีดขาวและบางเป็นแถบๆ จนกระทั่งแสดงอาการใบไหม้อย่างรุนแรง ใบยอดของข้าวโพดหวานที่แตกใหม่จะแสดงอาการใบไหม้ไปเรื่อยๆ (ภาพที่ 24) จนทำให้ต้นข้าวโพดหวานแสดง

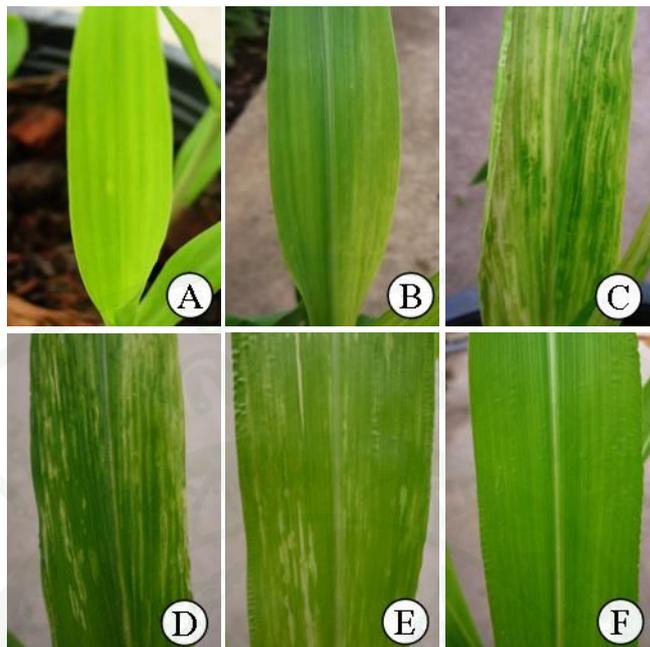
อาการต้นตี้ยแคระแกร็น (ภาพที่ 25) โดยลักษณะอาการใบไหม้และต้นตี้ยแคระบนข้าวโพดหวานที่ปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย มีลักษณะอาการคล้ายคลึงกับข้าวโพดหวานที่ผ่านการปลูกเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (จันทร์เพ็ญ, 2551) และหลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ลงบนข้าวโพด พบว่าข้าวโพดหวาน และข้าวโพดไร่ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังปลูกเชื้อ 11 และ 16 วัน ตามลำดับ ขณะที่ข้าวโพดฝักอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 65 เปอร์เซ็นต์ หลังปลูกเชื้อ 28 วัน (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของข้าวฟ่างและข้าวโพดหลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่างๆกัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

พืชอาศัย	พันธุ์	BMV-Sr-SB เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค			
		6 วัน	11 วัน	16 วัน	28 วัน
ข้าวฟ่าง	UT 429-1	80	100	100	100
	UT 1085B	60	100	100	100
	KU 804	55	100	100	100
	KU 439	65	100	100	100
	อินทรี 2	55	100	100	100
	ลูกผสมสีแดง	75	100	100	100
	ค่าเฉลี่ย	50	100	100	100
ข้าวโพด	Hybrid 3	90	100	100	100
	SG 17	20	55	55	65
	สุวรรณ 3	55	75	100	100
	ค่าเฉลี่ย	55	80	85	88.3



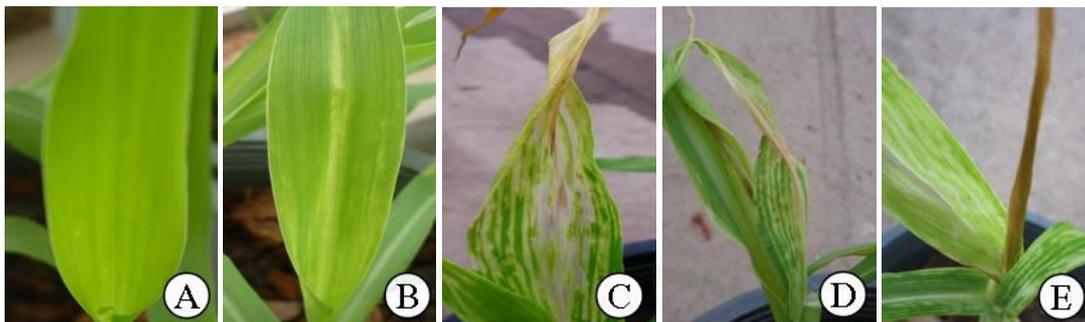
ภาพที่ 21 ลักษณะการพัฒนาอาการใบต่างของข้าวฟางสายพันธุ์ KU 804 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวฟางที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)



ภาพที่ 22 ลักษณะการพัฒนาอาการใบต่างของข้าวโพดฝักอ่อนสายพันธุ์ SG 17 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)



ภาพที่ 23 ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดไร่สายพันธุ์ สุวรรณ 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)



ภาพที่ 24 ลักษณะการพัฒนาอาการใบต่างของข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยที่ข้าวโพดหวานแสดงอาการใบไหม้ (C-E) หลังปลูกเชื้อไวรัส 11-28 วัน



ภาพที่ 25 ข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 แสดงอาการเตี้ยแคระหลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 28 วัน (ซ้าย) เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ขวา)

10. การทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB

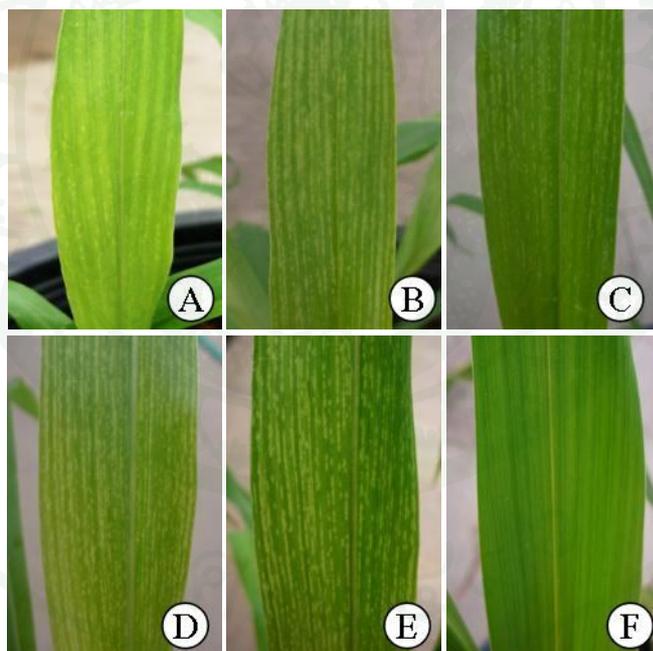
10.1 ข้าวฟ่าง

นำเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อไวรัสที่มีความบริสุทธิ์ โดยดูจากแถบแบนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคในการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส พบแถบแบนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีขนาด 34 กิโลดาลตัน และไม่มีแถบแบนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสชนิดอื่นปะปน (ภาพที่ 6) ทดสอบความรุนแรงของโรคโดยปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบบนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ UT 429-1, UT 1085B, KU 804, KU 439, อินทรี 2 และ ลูกผสมสีแดง พบว่าข้าวฟ่างเริ่มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อไวรัส 3-4 วัน โดยข้าวฟ่างจะแสดงอาการต่างเป็นจุดเล็ก ๆ สีซีดที่บริเวณโคนใบอ่อน หลังจากปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน จุดสีซีดเล็กๆจะกระจายไปทั่วทั้งใบ ซึ่งลักษณะอาการบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ มีลักษณะอาการที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่ข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 แสดงอาการของโรคที่รุนแรง ซึ่งลักษณะอาการของโรคจะเห็นชัดเจนหลังปลูกเชื้อไวรัส 16 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อไวรัส (ภาพที่ 26) และพบว่าหลังปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน พบว่าข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ เกิดโรคถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

10.2 ข้าวโพด

นำเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในจังหวัดเพชรบูรณ์ มาปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบบนข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดหวาน (Hybrid 3) ข้าวโพดฝักอ่อน (SG 17) และข้าวโพดไร่ (สุวรรณ 3) พบว่าหลังจากปลูกเชื้อไวรัส 28 วัน ข้าวโพดทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่เกิดโรค (ตารางที่ 12) ตรวจสอบว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้หรือไม่ โดยนำตัวอย่างข้าวโพดทั้งหมดไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบบนข้าวฟ่าง พบว่าข้าวฟ่างไม่แสดงอาการของโรค แสดงว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB น่าจะไม่ก่อโรคในข้าวโพด ขณะที่ก่อให้เกิดโรคอย่างรุนแรงบนข้าวฟ่าง

จากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูกเชื้อไวรัสลงบนข้าวฟ่างเพียง 11 วัน และลักษณะอาการต่างแบบเป็นจุดสีซีดกระจายทั่วทั้งใบอย่างชัดเจน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างทั้ง 7 ไอโซเลท พบว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคบนข้าวฟ่างมากกว่าเชื้อ SCMV โดยที่เชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ก่อให้เกิดโรคบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังปลูกเชื้อไวรัสเพียง 11 วัน แต่เชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท ไม่มีไอโซเลทใดเลยที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ บนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ คาดว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB น่าจะเป็นเชื้อไวรัสที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายข้าวฟ่างในอนาคต จึงควรนำลักษณะอนุภาคแบบท่อนยาวคด ที่มีความยาวขนาดประมาณ 706 นาโนเมตร น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่มีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน และการที่เชื้อไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนข้าวโพด ซึ่งลักษณะต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นควรนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสที่อยู่ในวงศ์ *Potyviridae* และ *Flexiviridae* เพื่อออกแบบไพรเมอร์และสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสในอนาคตต่อไป



ภาพที่ 26 ลักษณะการพัฒนาอาการใบต่างของข้าวฟ่างสายพันธุ์ อินทรี 2 (A-E) หลังปลูกเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวฟ่างที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (F)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของข้าวฟ่างและข้าวโพดหลังจากปลูกเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ในช่วงเวลาต่างๆกัน ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

พืชอาศัย	พันธุ์	ไวรัสไอโซเลท Sr-PB เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค			
		6 วัน	11 วัน	16 วัน	28 วัน
ข้าวฟ่าง	UT 429-1	65	100	100	100
	UT 1085B	60	100	100	100
	KU 804	50	100	100	100
	KU 439	70	100	100	100
	อินทรี 2	55	100	100	100
	ลูกผสมสีแดง	55	100	100	100
	ค่าเฉลี่ย	51	100	100	100
ข้าวโพด	Hybrid 3	0	0	0	0
	SG 17	0	0	0	0
	สุวรรณ 3	0	0	0	0
	ค่าเฉลี่ย	0	0	0	0

สรุปผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างในแหล่งปลูกข้าวฟ่างที่สำคัญในประเทศไทย คือ จังหวัดลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ ตรวจสอบเชื้อ SCMV และ BMV ด้วยเทคนิค Indirect-ELISA พบเชื้อ SCMV 7 ไอโซเลท ได้แก่ จังหวัดลพบุรี (SCMV-Sr-LB) นครสวรรค์ (SCMV-Sr-NW) สุพรรณบุรี (SCMV-Sr-SP) กาญจนบุรี (SCMV-Sr-KB) และเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB1, PB2 และ PB3) และพบเชื้อ BMV ไอโซเลทจังหวัดสระบุรี (BMV-Sr-SB)

ปลูกเชื้อไวรัสเพื่อเพิ่มปริมาณ พบว่าเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท เมื่อเข้าทำลายข้าวฟ่างจะทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างเป็นจุดๆ สีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้มกระจายทั่วทั้งใบ เชื้อ BMV จะทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างแถบขาวกระจายทั่วทั้งใบ และเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB จะทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างเป็นจุดสีขีดกระจายทั่วทั้งใบ ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล โปรตีน ห่อหุ้มอนุภาค และศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท มีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคขนาดประมาณ 39.37 กิโลดาลตัน และมีลักษณะอนุภาคเป็นแบบท่อนยาวคด เชื้อ BMV-Sr-SB มีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคขนาดประมาณ 21.98 กิโลดาลตัน มีลักษณะอนุภาคเป็นแบบทรงกลม และเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB มีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน และมีลักษณะอนุภาคเป็นแบบท่อนยาวคด

สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SsCP-F3 กับ SsCP-R3 และ SsCP2 กับ T24 ซึ่งครอบคลุมยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท (SCMV-Sr-LB, NW, SP, KB, PB1, PB2 และ PB3) พบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 72-99 และ 81-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท มาเปรียบเทียบกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จาก อ้อย และข้าวโพด ในประเทศไทย และเชื้อ SCMV ที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างทั้ง 7 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศไทย (SCMV-Sr-KB, NW และ NP) ที่ระดับ 78-96 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เชื้อ SCMV-Sr- NW, KB, PB1, PB2 และ PB3 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อย ที่ระดับ 90-96 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ SCMV-Sr-LB และ SP มีความ

คล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อย ที่ระดับเพียง 78-82 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการกำหนดความแตกต่างของชนิด (species) ไวรัสในกลุ่ม SCMV โดยในส่วนของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีความเหมือนกันน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นไวรัสต่างชนิดกัน (Van Regnmortel *et al.*, 2000) ดังนั้นแสดงว่าเชื้อ SCMV-Sr-LB เป็นคนละชนิดกับเชื้อ SCMV-Sc-KB เชื้อ SCMV-Sr-SP เป็นคนละชนิดกับเชื้อ SCMV-Sc-KB และ NP ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศไทย เชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (SCMV-Mz-NM, SB และ TK) ที่ระดับ 81-99 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อย (SCMV-YH) และข้าวโพด (SCMV-HN) ในประเทศจีน ที่ระดับ 81-86 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศสหรัฐอเมริกา (SCMV-D และ E) ที่ระดับ 81-85 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศออสเตรเลีย (SCMV-Bris) ที่ระดับ 81-85 เปอร์เซ็นต์ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศสเปน (SCMV-Sp) ที่ระดับ 84-85 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยทั้ง 7 ไอโซเลท พบว่าเชื้อ SCMV-Sr-NW, KB, PB1, PB2 และ PB3 จัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อย และ ข้าวโพด ในประเทศไทย เชื้อ SCMV-Sr-LB และ SP จัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายอ้อยและข้าวโพดในต่างประเทศ

สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FCP และ RCP2 ซึ่งครอบคลุมยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ BMV-Sr-SB กับเชื้อ BMV-Mz-RB และ BMV-Mz-KB ที่มีรายงานเข้าทำลายข้าวโพดในประเทศไทย พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 98-99 เปอร์เซ็นต์ และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 98 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อ BMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV-Sr-SB มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ BMV-F, BMV-R และ BMV-T ที่ระดับ 76 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ Phylogenetic tree พบว่าเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทยจัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย

ทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่การพัฒนาอาการของโรค และลักษณะอาการต่างบนข้าวฟ่างและข้าวโพดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ยกเว้นข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 หลังจากปลูกเชื้อ SCMV-Sr-LB และ SCMV-Sr-PB3 6 วัน พบว่าข้าวฟ่างมีลักษณะอาการใบยอดไหม้ แต่ข้าวฟ่างสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้เมื่อแตกยอดใหม่ลักษณะอาการยอดไหม้หายไป ข้าวฟ่างเจริญเติบโตปกติ และข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 429-1 หลังจากปลูกเชื้อ SCMV-Sr-SP 28 วัน พบว่าข้าวฟ่างแสดงอาการใบไหม้ บางต้นแสดงอาการไหม้อย่างรุนแรงจนต้นข้าวฟ่างตาย และพบว่าเชื้อ SCMV-Sr-LB เป็นเชื้อไวรัสไอโซเลทที่รุนแรงที่สุด เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อเชื้อ SCMV ในอนาคตต่อไป ในกรณีถ้ามีการกำหนดเขตพื้นที่ปลูกข้าวฟ่างในอนาคต เมื่อพิจารณาความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคบนข้าวฟ่างจากเชื้อ SCMV แต่ละไอโซเลท สามารถนำเชื้อ SCMV ไอโซเลทเฉพาะพื้นที่ปลูกในแต่ละถิ่น มาพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อเชื้อ SCMV ในเขตพื้นที่ปลูกนั้นๆ เช่นสามารถใช้เชื้อ SCMV-Sr-PB1 ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อเชื้อ SCMV เฉพาะเขตพื้นที่ปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์ ใช้เชื้อ SCMV-Sr-LB ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อเชื้อ SCMV เฉพาะเขตพื้นที่ปลูกในจังหวัดลพบุรี และนครสวรรค์ ซึ่งมีพื้นที่ปลูกติดต่อกัน และสามารถใช้เชื้อ SCMV-Sr-SP ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างให้ต้านทานต่อเชื้อ SCMV เฉพาะเขตพื้นที่ปลูกจังหวัดสุพรรณบุรี และกาญจนบุรี ซึ่งมีพื้นที่ปลูกติดต่อกัน เป็นต้น

ทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ BMV-Sr-SB บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ พบว่าการพัฒนาอาการของโรคและลักษณะอาการต่างบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ ข้าวโพดฝักอ่อน และ ข้าวโพดหวาน มีความสอดคล้องเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ยกเว้นข้าวโพดหวาน หลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 11 วัน พบว่าข้าวโพดหวานแสดงอาการเนื้อใบชืดขาว และบางเป็นแถบๆ จนกระทั่งแสดงอาการใบไหม้อย่างรุนแรง ใบยอดของข้าวโพดหวานที่แตกใหม่จะแสดงอาการใบไหม้ไปเรื่อยๆ จนทำให้ต้นข้าวโพดหวานแคระแกร็น และข้าวโพดหวานบางต้นแสดงอาการใบไหม้จนต้นตาย

ทดสอบความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-SB บนข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ พบว่าข้าวฟ่างเริ่มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อไวรัส 3-4 วัน โดยข้าวฟ่างจะแสดงอาการต่างเป็นจุดสีซีดเล็กๆที่บริเวณโคนใบอ่อน หลังจากปลูกเชื้อไวรัส 11 วัน จุดสีซีดเล็กๆจะกระจายไปทั่วทั้งใบ ซึ่งลักษณะอาการบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ มีลักษณะอาการที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน และพบว่าหลังจากปลูกเชื้อไวรัสลงบนข้าว 28 วัน โปดทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่เกิดโรค ตรวจสอบว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้หรือไม่ โดยนำตัวอย่างข้าวโพดทั้งหมดไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนข้าวฟ่าง พบว่าข้าวฟ่างไม่แสดงอาการของโรค แสดงว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB น่าจะไม่ก่อโรคในข้าวโพด ขณะที่ก่อให้เกิดโรคอย่างรุนแรงบนข้าวฟ่าง

คาดว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB น่าจะเป็นเชื้อไวรัสที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายข้าวฟ่าง ในอนาคต จากการศึกษาความรุนแรงของโรคพบว่าหลังจากปลูกเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ลงบนข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูกเชื้อไวรัสเพียง 11 วัน สำหรับแนวทางในการศึกษาต่อในอนาคต ควรนำลักษณะอนุภาคแบบท่อนยาวคดของเชื้อไวรัสที่มีความยาวขนาดประมาณ 706 นาโนเมตร และน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสที่มีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน ลักษณะอาการของโรค และการทดสอบปลูกเชื้อบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสในวงศ์ *Potyviridae* และ *Flexiviridae* เพื่อออกแบบไปรเมอร์และสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสในอนาคตต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนา วาระวิชนี. 2547. ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเรพลีเคสของเชื้อไวรัสใบด่างอ้อยในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทร์เพ็ญ ปุ๊กสูงเนิน. 2551. เทคนิคการวินิจฉัยโรคของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีระ สุธะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟีนนี่พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

ธีระ สุธะบุตร, ปราณี ก่อประดิษฐ์สกุลม, ปัจฉิมา กรกำแหง, นิพนธ์ ทวีชัย, สาวิตร โพธิแก้ว, โสภณ วงศ์แก้ว และ ธนากร จารุพัฒน์. 2519. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 9: 371-394.

ประสิทธิ์ ใจศีล. 2529. ข้าวฟ่าง. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วิยาพร ชัยวานิชสกุล. 2551. ความผันแปรทางพันธุกรรมของจีโนมเชื้อไวรัสใบด่างอ้อยในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันวิสา ศิริวรรณ. 2551. จีโนมเชื้อไวรัสใบด่างอ้อยสาเหตุโรคใบด่างแคะในข้าวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2552. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส. เพชรรุ่งการพิมพ์ จำกัด, นนทบุรี.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร/ข้าวฟ่าง. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

Ahlquist, P., R. Dasgupta and P. Kaseberg. 1984. Nucleotide sequence of the brome mosaic virus genome and its implications for viral replication. *J. Mol. Biol.* 172 (4): 369-383.

- Amine, O.N., and P. Ahlquist. 2003. Brome Mosaic Virus RNA Replication: Revealing the Role of Host in RNA Virus Replication. **Annu. Rev. Phytopathol.** 41: 77-98.
- Bond, W.P. and T.P. Pirone. 1971. Purification and Properties of Sugarcane mosaic virus strains. **Phytopathol.** 71: 56-65.
- Brandes, E.W., and P.J. Klapaak. 1923. Cultivated and wild hosts of sugarcane or grass mosaic. **J. Agric. Res.** 24: 247-262.
- Brunt, A.A., and R. H. Kenten. 1971. Pepper veinal mottle virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 104. Commonw. **Mycol. Inst. Kew.** England.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol. Biol. Rept.** 11: 113-116.
- Chen, J., J. Chen and M.J. Adams. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Arch Virol.** 146: 757-766
- _____ and M.J. Adams. 2002. Characterisation of potyviruses from sugarcane and maize in China. **Arch. Virol.** 147 (6): 1237-1246.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** 34: 475-483.
- Dasgupta, R. and P. Kaesberg. 1982. Complete nucleotide sequences of the coat protein messenger RNAs of brome mosaic virus and cowpea chlorotic mottle virus. **Nucleic Acids Res.** 10 (2): 703-713.

Doggett, H. 1970. **In Evolution of crop plant edited by N.W. Simmonds.** Longman, London.

Ford, R.E., H. Faqhenele and W.N. Stoner. 1970. New hosts and serology identity of Bromegrass mosaic virus from Sount Dakota. **Plant Dis. Rept.** 54: 191-195.

Hull, R. 2002. **Mathews Plant Virology;** 4th ed. Academic press, New York.

Kuhn, C.W. and M.D. Jellum. 1970. Evalution for resistance to corn stunt and maize dwarf mosaic disease in corn. University of Georia College of Agriculture Experiment Station. **Res. Bull.** 82: 1-37.

Lapierre, H. and P.A. Signoret. 2004. **Viruses and virus diseases of Poaceae(Gramineae).** APS Press, USA.

Mahajan, S.S., V.V. Dolja and J.C. Carrington. 1996. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirement for the translation Process and cis-active element. **J. Virol.** 70: 4370-4379.

Mali, V.R. 2001. Current status of sugarcane mosaic subgroup of potyviruses causing sorghum red stripe in India. **Sugarcane Pathol.** 2: 99-154.

Marie-Jeanne, V., R. Ioos, J. Peyre, B. Alliot and P. Signoret. 2000. Differentiation of Poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. **J. Phytopathol.** 148: 141-151.

Maximiliano, G., M.R. Alejandro and S. German. 2009. Rapid identification of viruses causing sugarcane mosaic by direct sequencing of RT-PCR products from crude extracts: A method for large scale virus surveys. **J. Virol. Methods.** 157: 188-194.

- Moghal, S.M. and R.I.B. Francki. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. **Viol.** 73: 350-362.
- Mohammadi, M.R., M. Koochi-Habibi, G. Mosahebi and B. Hajieghrari. 2006. Identification of prevalent potyvirus on maize and johnsongrass in corn fields of Tehran province of Iran and a study on some of its properties. **Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.** 71: 1311-1319.
- Paulsen, A.Q. and C.L. Niblett. 1977. Purification and properties of foxtail mosaic virus. **Phytopathol.** 67: 1346-1351.
- Richard, A.F. 1986. **Compendium of sorghum disease.** American Phytopathological Society, USA.
- Riechmann, J.L., S. Lain and A. Garcia. 1992. Highlights and prospecte of potyvirus molecular biology. **J. Gen. Virol.** 73: 1-16.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Sprind Harbor Laboratory Press, New York.
- Seifers, D.L. and H.L. Hackerott. 1987. Estimates of Yield Loss and Virus Titre in Sorghum Hybrids Infected with Maize Dwarf Mosaic Virus Strain B. **Agric. Ecosyst. Envir.** 19: 81-86.
- Shukla, D.D., J. Jllka, M. Tasic, and R.E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyvirus involving affinity purified polyclonol antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. **J. Gen. Virol.** 70: 13-23.

- Van Regenmortel, H.M.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstern, M.K. Ectes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner. 2000. Seventh Report of Internation Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus taxonomy**. Available source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV-8k>, September 17, 2004.
- Vavilov, N.I. 1935. **The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants**. Trans K.S. Chester. Cronica Botanic. 13, Penald Press Co., New York..
- Verchot, J. and J.C. Carrington. 1995. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 Proteinase-inactivating mutation and restoration by second stie modification. **J. Virol.** 69 (3): 1582-1590.
- Walters, H.J. 1969. Beetel transmission of plant virus. **Adv. Virus. Res.** 15: 339-363.
- Yujia, X., W. Mingqiang, X. Donglin, L. Ruhui and Z. Guohui. 2009. Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. **J. Virol. Methods.** 162: 64-68
- Zhong, Y., A. Guo, C. Li, B. Zhuang, M. Lai, C. Wei, J. Luo and Y. li. 2005. Identification of a Naturally Occurring Recombinant Isolate of Sugarcane Mosaic Virus Causing Maize Dwarf Mosaic Disease. **Virus Genes.** 30: 75-83.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Indirect-ELISA และผลการปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกล

สถานที่		ตัวอย่างที่	ลักษณะอาการ	Indirect-ELISA		ผลการปลูกเชื้อไวรัส ด้วยวิธีกล
จังหวัด	อำเภอ			SCMV	BMV	
ลพบุรี	หนองม่วง	1	ใบด่างเป็นแถบสีเหลืองกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		2	เส้นใบซีดเหลือง	-	-	-
		3	ใบด่างเป็นแถบสีเหลืองเส้นกลางใบเป็นสีแดง	-	-	-
	โคกสำโรง	1	ใบด่างเป็นจุดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		2	ใบด่างเป็นจุดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		3	ใบด่างเหลืองเป็นแถบ	-	-	-
		4	ใบด่างเป็นจุดสีเหลืองขนาดไม่แน่นอนกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		5	เนื้อใบขุ่นเส้นกลางใบเป็นแผลสีน้ำตาล	-	-	-
		6	ใบด่างเหลืองเป็นแถบ	-	-	-
		7	ใบมีสีซีด	-	-	-
		8	ใบด่างเหลืองเป็นแถบเส้นใบเป็นสีเหลือง	-	-	-
สระบุรี	พระพุทธบาท	1	ใบด่างเป็นจุดแถบขาวตามแนวยาวของเส้นใบ	-	+	+

หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส / สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

- ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส / ไม่สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สถานที่		ตัวอย่างที่	ลักษณะอาการ	Indirect-ELISA		ผลการปลูกเชื้อไวรัส ด้วยวิธีกล
จังหวัด	อำเภอ			SCMV	BMV	
สระบุรี	พระพุทธบาท	2	ใบด่างเป็นจุดเหลืองขนาดไม่แน่นอน	-	-	-
		3	ใบซีดเหลืองและเนื้อใบขุ่น	-	-	-
		4	เส้นใบด่างเหลือง	-	-	-
		5	เส้นใบและเนื้อใบด่างเหลือง	-	-	-
		6	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียด	-	-	-
		7	ใบด่างเป็นจุดสีเหลือง	-	-	-
		8	ใบด่างเป็นขีดแถบขาวตามแนวยาวของเส้นใบ	-	+	+
		9	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียด	-	-	-
		วังม่วง		1	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียด	-
2	ใบด่างเป็นจุดสีเหลือง			-	-	-
3	เส้นใบด่างเหลืองและเนื้อใบมีสีซีด			-	-	-
หนองโดน		1	ใบซีดเหลือง	-	-	-

หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส / สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

- ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส / ไม่สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สถานที่		ตัวอย่างที่	ลักษณะอาการ	Indirect-ELISA		ผลการปลูกเชื้อไวรัส ด้วยวิธีกล
จังหวัด	อำเภอ			SCMV	BMV	
สระบุรี	หนองโดน	2	ใบซีดเหลือง	-	-	-
นครสวรรค์	ตากฟ้า	1	ใบด่างเป็นจุดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		2	ใบด่างเป็นแถบเหลือง	-	-	-
		3	ใบซีดขาว	-	-	-
		4	ใบเป็นแผลจุดสีแดงถึงน้ำตาลกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		5	ใบยอดหงิกข่น	-	-	-
	ตากถี	1	ต้นเดี่ยวแตกยอดใบด่างและข่น	-	-	-
		2	ใบด่างและเป็นจุดแผลสีแดงปนสีน้ำตาล	-	-	-
		3	ใบยอดหงิก	-	-	-
		4	ใบมีสีซีด	-	-	-
		5	ใบซีดขาวและขอบใบข่น	-	-	-
		6	ใบด่างเป็นจุดๆละเอียดกระจายทั่วใบ	-	-	-

หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส / สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

- ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส / ไม่สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สถานที่		ตัวอย่างที่	ลักษณะอาการ	Indirect-ELISA		ผลการปลูกเชื้อไวรัส ด้วยวิธีกล
จังหวัด	อำเภอ			SCMV	BMV	
สุพรรณบุรี	อู่ทอง	1	ใบด่างเป็นขีดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		2	ใบด่างเป็นขีดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		3	ใบด่างขีดขาวเนื้อใบขุ่น	-	-	-
		4	ใบเป็นแถบสีขีด	-	-	-
		5	ใบด่างขีดขาวปลายใบขุ่น	-	-	-
		6	ใบมีสีขีด	-	-	-
		7	ใบมีจุดสีแดงกระจายทั่วทั้งใบและเส้นกลางใบเป็นสีแดง	-	-	-
		8	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		9	ใบเป็นจุดสีเหลืองกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		10	ใบขีดเหลือง	-	-	-
		11	ใบขีดเหลืองและด่างเป็นขีดเล็กน้อย	-	-	-
กาญจนบุรี	เลาขวัญ	1	ใบด่างเป็นขีดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+

หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส / สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

- ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส / ไม่สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สถานที่		ตัวอย่างที่	ลักษณะอาการ	Indirect-ELISA		ผลการปลูกเชื้อไวรัส ด้วยวิธีกล
จังหวัด	อำเภอ			SCMV	BMV	
กาญจนบุรี	เลาขวัญ	2	ใบด่างเป็นจุดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	-
		3	ใบซีดเหลืองตามแนวยาวของเส้นใบ	-	-	-
		4	ใบซีดเหลืองตามแนวยาวของเส้นใบ	-	-	-
		5	ใบด่างเป็นจุดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		6	ใบด่างเป็นจุดๆเหลืองกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		7	ใบด่างเป็นจุดๆเหลืองตามแนวยาวของเส้นใบ	-	-	-
		เพชรบูรณ์	บึงสามพัน	1	ใบด่างเป็นจุดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+
2	ใบด่างเป็นจุดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม			+	-	+
3	ใบด่างเป็นจุดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม			+	-	+
4	ใบด่างเป็นจุดๆซีดกระจายทั่วทั้งใบ			-	-	-
5	ใบด่างเป็นจุดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ			-	-	-

หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส / สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

- ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส / ไม่สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สถานที่		ตัวอย่างที่	ลักษณะอาการ	Indirect-ELISA		ผลการปลูกเชื้อไวรัส ด้วยวิธีกล
จังหวัด	อำเภอ			SCMV	BMV	
เพชรบูรณ์	บึงสามพัน	6	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและมีแผลสีน้ำตาล กระจายตามเส้นใบ	-	-	-
		7	ใบด่างเป็นจุดเหลืองกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		8	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		9	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		10	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและเส้นกลางใบ ขีดเหลือง	-	-	-
	วิเชียรบุรี	1	ใบด่างเป็นขีดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		2	ใบด่างเป็นขีดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		3	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
	ศรีเทพ	1	ใบด่างเป็นขีดๆสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม	+	-	+
		2	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-

หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส / สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

- ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส / ไม่สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สถานที่		ตัวอย่างที่	ลักษณะอาการ	Indirect-ELISA		ผลการปลูกเชื้อไวรัส ด้วยวิธีกล
จังหวัด	อำเภอ			SCMV	BMV	
เพชรบูรณ์	ศรีเทพ	3	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและใบมีสีซีด	-	-	-
		4	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและใบมีสีซีด	-	-	-
		5	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและใบด่างซีดขาวเป็นแถบ	-	-	-
		6	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		7	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและใบมีสีซีด	-	-	-
		8	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและใบมีสีซีด	-	-	-
		9	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		10	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบ	-	-	-
		11	ใบด่างเป็นแถบสีเหลืองด้านหนึ่งของใบ	-	-	-
		12	ใบด่างเป็นขีดๆละเอียดกระจายทั่วทั้งใบและเส้นใบมีสีซีด	-	-	-

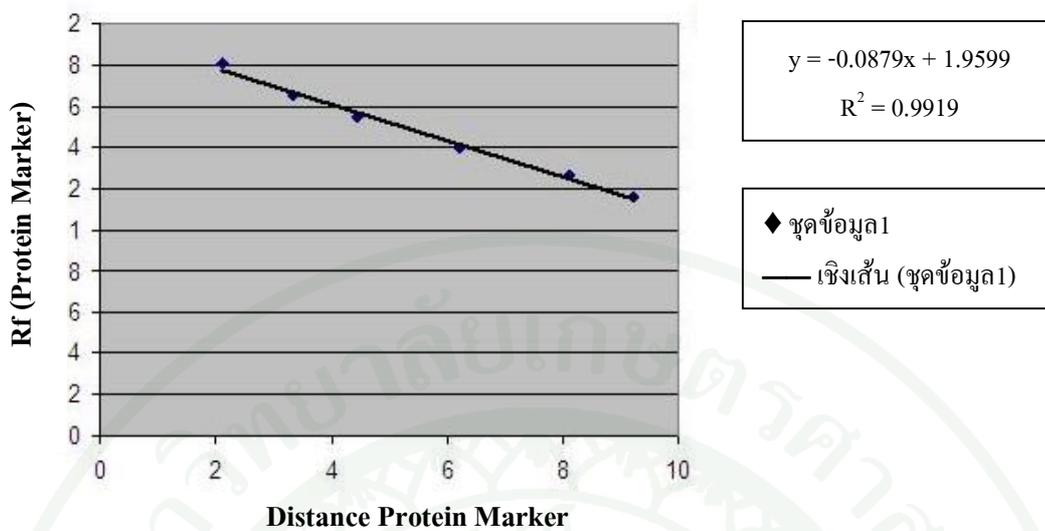
หมายเหตุ + ตรวจพบเชื้อไวรัส / สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

- ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส / ไม่สามารถปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลที่ใช้ในการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน (Protein Molecular Weight Marker) และนำมาใช้คำนวณขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ทั้ง 7 ไอโซเลท ที่ได้จากวิธี SDS-PAGE

Protein Molecular Weight Marker (kDa.)	Protein Molecular Weight Marker (log)	Distance Protein Marker (cm.)	Distance (cm.) Coat Protein SCMV
116	2.064	1	4.15
66.2	1.807	2.1	
45	1.653	3.35	
35	1.544	4.45	
25	1.397	6.2	
18.4	1.264	8.1	
14.4	1.158	9.2	

หมายเหตุ distance คือค่าที่ได้จากการวัดจากขอบบนสุดของเจลจนถึงกึ่งกลางแบนของโปรตีน ในการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานใช้ Protein Marker (log) กับ Distance Protein marker และแทนค่า Distance Coat protein SCMV ที่ตัวแปร X เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส

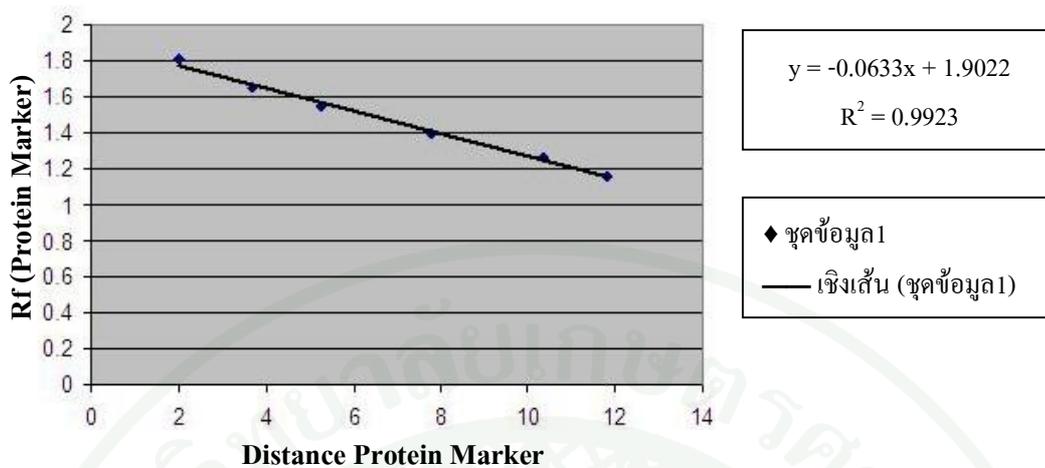


ภาพผนวกที่ 1 กราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้นของ Protein Molecular Weight Marker ที่ ($R^2 = 0.9919$)

ตารางผนวกที่ 3 ข้อมูลที่ใช้ในการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน (Protein Molecular Weight Marker) และนำมาใช้คำนวณขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB และเชื้อไวรัสไอโซเลท Sr-PB ที่ได้จากวิธี SDS-PAGE

Protein Molecular Weight Marker (kDa.)	Protein Molecular Weight Marker (log)	Distance Protein Marker (cm.)	Distance (cm.)	
			Coat Protein Virus	
			BMV-Sr-SB	ไวรัสไอโซเลท Sr-PB
116	2.064	0.7	8.85	5.85
66.2	1.807	2		
45	1.653	3.7		
35	1.544	5.25		
25	1.397	7.8		
18.4	1.264	13.5		
14.4	1.158	11.8		

หมายเหตุ distance คือค่าที่หาได้จากการวัดจากขอบบนสุดของเจลจนถึงกึ่งกลางแบนของโปรตีน ในการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานใช้ Protein Marker (log) กับ Distance Protein marker และแทนค่า Distance Coat protein SCMV ที่ตัวแปร X เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส



ภาพผนวกที่ 2 กราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้นของ Protein Molecular Weight Marker ที่ ($R^2 = 0.9923$)

SCMV-Sr-PB1	TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCCGTAGCGGCGGTCAAGG---AGGCACACCA	57
SCMV-Sr-PB3	TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCCGTAGCGGCGGTCAAGG---AGGCACACCA	57
SCMV-Sr-PB2	TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCCGTAGCGGCGGTCAAGG---AGGCACACCA	57
SCMV-Sr-NW	TCTGGTCAAGTTGACGCAGGGAGACAAGGCCGTAGCGGCGTCAAGG---AGGCACACCA	57
SCMV-Sr-KB	TCTGGTCAAGTTGACGCAGGGAGACAAGGGTGGTAGCGGCACTCAAGG---AGGCACACCA	57
SCMV-Sr-LB	TCTGGAAGTGTGATGCAGGGCACAAGGAGGGGGAAACAATAACAATTCAGGGACTACT	60
SCMV-Sr-SP	TCTGGAAGTGTGATGCAGGTGCACAAGGAGGGGGAAATAATAACAATCCAGGGACCCT	60

SCMV-Sr-PB1	CCTGCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGA	117
SCMV-Sr-PB3	CCTGCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGA	117
SCMV-Sr-PB2	CCTGCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGA	117
SCMV-Sr-NW	CCAGCAGGAAGTGGAGG-----CACTGGATCTGGC-----ACTCAAGGC	96
SCMV-Sr-KB	CCAGCAGGAAGTGGAGG-----CACTGGATCTGGC-----ACTCAAGGC	96
SCMV-Sr-LB	CCACAACAAGTGGAGG-----AGGCAGACCT-----ACCTCAGCT	96
SCMV-Sr-SP	CCACAATCAACTGGAGG-----AAGCAAACCT-----ACCTCAGCT	96
	** * ** ** *	** **
SCMV-Sr-PB1	AGTGGAGGCACTGGCTCTGGCACTCAAGGTAATGGGGGCCAGACGGGACCCCAAGGAAGT	177
SCMV-Sr-PB3	AGTGGAGGCACTGGCTCTGGCACTCAAGGTAATGGGGGCCAGACGGGACCCCAAGGAAGT	177
SCMV-Sr-PB2	AGTGGAGGCACTGGCTCTGGCACTCAAGGTAATGGGGGCCAGACGGGACCCCAAGGAAGT	177
SCMV-Sr-NW	AATGGGGG---TCAGACGGGATCCCAAGGAAGTGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGGGC	153
SCMV-Sr-KB	AATGGGGG---TCAGACGGGATCTCAAGGAAGTGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGGGC	153
SCMV-Sr-LB	GATA-----CAGGAAATCAAGGAAATACAG---GATCACAGACAGGAGGAACC	141
SCMV-Sr-SP	GGTG-----CAGGAAATCAAGGAAATACAG---AATCACAGACAGGAGGAACA	141
	* ** * * * *	* **
SCMV-Sr-PB1	GGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACA	237
SCMV-Sr-PB3	GGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACA	237
SCMV-Sr-PB2	GGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACA	237
SCMV-Sr-NW	ACTGGTCAGGGAGCAGCTGGAAACAACGGCGGAGGTCAGACAGGAGGCTCTAGTGGGACA	213
SCMV-Sr-KB	ACTGGTCAAGGAGCAGCTGGAAACAACGGCGGAGGTCAGACAGGAGGCTCTAGTGGGACA	213
SCMV-Sr-LB	AACACTCA-----GACTGGTGGTGGAACTGCAAACCAAGCAAATG---TAGGAAACAAT	192
SCMV-Sr-SP	AACAATCA-----GACTGGTGGTGGATCTGAAACCAAGCAAATG---CAGGAAACAAT	192
	*** * ** * * * *	* ** *
SCMV-Sr-PB1	GCTGGTCAAAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCGTCTGGAAAGATATCCGTACCAAAG	297
SCMV-Sr-PB3	GCTGGTCAAAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCGTCTGGAAAGATATCCGTACCAAAG	297
SCMV-Sr-PB2	GCTGGTCAAAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCGTCTGGAAAGATATCCGTACCAAAG	297
SCMV-Sr-NW	GCTGGTCAGAGAGATAAGGACGTTGATGCAGGCTCGGCTGGAAAGATATCCGTACCAAAG	273
SCMV-Sr-KB	CTGGTCAGAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCGGCTGGAAAGATATCCGTACCAAAG	273
SCMV-Sr-LB	AACAATCAGAGAGACAAGGACGTAGACGCAGGAACAACCTGGAAAGATATCAGTTCCAAAG	252
SCMV-Sr-SP	AACAATCAAAGAGACAAGGACGTAGACGCAGGAACAACCTGGAAAGATATCAGTCCCAAAG	252
	*** ***** * * ***** * ***** * * *****	
SCMV-Sr-PB1	CTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCGAAGGCAAAGAAAAGATGTCTTGCAT	357
SCMV-Sr-PB3	CTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCGAAGGCAAAGAAAAGATGTCTTGCAT	357
SCMV-Sr-PB2	CTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCGAAGGCAAAGAAAAGATGTCTTGCAT	357
SCMV-Sr-NW	CTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCAAAGAAAAGACGTCTTGCAT	333
SCMV-Sr-KB	CTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCAAAGAAAAGACGTCTTGCAT	333
SCMV-Sr-LB	TTAAAAGCAATGTCAAAGAAAATGCGCTTACC GAAGGCAAAGAAAAGATGTCTTGCAC	312
SCMV-Sr-SP	TTAAAAGCAATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCGAAGGCAAAGAAAAGATGTCTTGCAC	312
	* ***** ***** * * ***** * * ***** * * *****	

ภาพผนวกที่ 3 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบทั้งยีน โปรตีน
ห่อหุ้มอนุภาค ของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย

SCMV-Sr-PB1	TTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAACAAGACATATCGAACACAAGAGCAACC	417
SCMV-Sr-PB3	TTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAACAAGACATATCGAACACAAGAGCAACC	417
SCMV-Sr-PB2	TTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAACAAGACATATCGAACACAAGAGCAACC	417
SCMV-Sr-NW	TTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAGCAGGACATATCGAACACAAGAGCAACT	393
SCMV-Sr-KB	TTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAGCAGGACATATCGAACACAAGAGCAACT	393
SCMV-Sr-LB	TTGGACTTCTCTTAACATACAAACCACAACAACAAGACATATCAAACACACGAGCAACT	372
SCMV-Sr-SP	TTAGACTTCTCTTAACATACAAACCACAACAACAAGACATATCAAACACACGAGCAACT	372
	** ***** * ** ***** ***** ** ***** ***** *****	
SCMV-Sr-PB1	AAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGATGCCATAAAGAAGGAGTACGAGATCGATGATACA	477
SCMV-Sr-PB3	AAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGATGCCATAAAGAAGGAGTACGAGATCGATGATACA	477
SCMV-Sr-PB2	AAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGATGCCATAAAGAAGGAGTACGAGATCGATGATACA	477
SCMV-Sr-NW	AAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAGAAGGAGTACGAGATCGATGATACA	453
SCMV-Sr-KB	AAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAGAAGGAGTACGAGATCGATGACACA	453
SCMV-Sr-LB	AAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGATGCCATAAAGAAGGAGTACGAGATAGATGATACA	432
SCMV-Sr-SP	AAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGATGCCATAAAGAAGGAGTACGAAATAGATGATACA	432
	***** ***** ***** ** ***** **	
SCMV-Sr-PB1	CAAATGACAGTTATCATGAGTGGTCTGATGGTCTGGTGCATCGAAAATGGTTGCTCACCA	537
SCMV-Sr-PB3	CAAATGACAGTTATCATGAGTGGTCTGATGGTCTGGTGCATCGAAAATGGTTGCTCACCG	537
SCMV-Sr-PB2	CAAATGACAGTTATCATGAGTGGTCTGATGGTCTGGTGCATCGAAAATGGTTGCTCACCA	537
SCMV-Sr-NW	CAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGGTGCATCGAAAATGGTTGCTCACCA	513
SCMV-Sr-KB	CAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGGTGCATCGAAAATGGTTGCTCACCA	513
SCMV-Sr-LB	CAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTTATGGTATGGTGCATCGAAAATGGTTGCTCACCA	492
SCMV-Sr-SP	CAAATGACAGTTGTCATGAGTGGTCTTATGGTATGGTGCATCGAAAATGGTTGCTCACCA	492
	***** ***** ***** ***** *****	
SCMV-Sr-PB1	AATATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGAGAAGAACAACGAGTTTTTCCATTAAAA	597
SCMV-Sr-PB3	AATATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGAGAAGAACAACGAGTTTTTCCATTAAAA	597
SCMV-Sr-PB2	AATATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGAGAAGAACAACGAGTTTTTCCATTAAAA	597
SCMV-Sr-NW	AACATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAAAGAGTTTTCCCACTAAAA	573
SCMV-Sr-KB	AACATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAAAGAGTTTTCCCACTAAAA	573
SCMV-Sr-LB	AACATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGAGATGAACAAAGGTTTTCCCACTAAAA	552
SCMV-Sr-SP	AACATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGAGATGAACAAAGAGTTTTTCCCACTAAAA	552
	** ***** ***** ***** * ***** * ***** ** *****	
SCMV-Sr-PB1	CCAGTCATCGAAAACGCATCTCCAACTTCCGACAAATAATGCACCACCTTAGTGATGCA	657
SCMV-Sr-PB3	CCAGTCATCGAAAACGCATCTCCAACTTCCGACAAATAATGCACCACCTTAGTGATGCA	657
SCMV-Sr-PB2	CCAGTCATCGAAAACGCATCTCCAACTTCCGACAAATAATGCACCACCTTAGTGATGCA	657
SCMV-Sr-NW	CCAGTTATTGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAAGTTATGCATCATTTTCAGTGATGCA	633
SCMV-Sr-KB	CCAGTTATTGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAAGTTATGCATCATTTTCAGTGATGCA	633
SCMV-Sr-LB	CCAGTCATTGAAAACGCATCTCCAACTTCCGACAAATAATGCATCATTTTTCAGTGATGCA	612
SCMV-Sr-SP	CCAGTAATTGAAAACGCTTCTCCAACTTCTGACAAATTATGCATCATTTTTCAGTGATGCA	612
	***** * ***** ***** ***** * ***** * ***** ** *****	
SCMV-Sr-PB1	GCTGAAGCGTACATAGAGTATAGAACTCTACAGAGCGATATATGCCAAGATACGGACTT	717
SCMV-Sr-PB3	GCTGAAGCGTACATAGAGTATAGAACTCTACAGAGCGATATATGCCAAGATACGGACTT	717
SCMV-Sr-PB2	GCTGAAGCGTACATAGAGTATAGAACTCTACAGAGCGATATATGCCAAGATACGGACTT	717
SCMV-Sr-NW	GCTGAAGCATATATAGAATACAGAAATCTACTGAGCGATACATGCCAAGATATGGACTT	693
SCMV-Sr-KB	GCTGAAGCGTATATAGAATACAGAAATCTACTGAGCGATACATGCCAAGATACGGACTT	693
SCMV-Sr-LB	GCTGAAGCGTATATAGAATACCGAACTCTACAGAGCGATACATGCCAAGATACGGTCTT	672
SCMV-Sr-SP	GCTGAAGGGTATATAGAGTATGGAATCTACTGAGCGATACATGCCAAGATACGGTCTT	672
	***** ** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *****	

ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

SCMV-Sr-PB1 CAGCGAAATCTCCCCGACTATAGCCTAGCACGGTATGCATTTGATTTCTATGAAATGACC 777
 SCMV-Sr-PB3 CAGCGAAATCTCACCGACTATAGCCTAGCACGGTATGCATTTGATTTCTATGAAATGACC 777
 SCMV-Sr-PB2 CAGCGAAATCTCACCGACTATAGCCTAGCACGGTATGCATTTGATTTCTATGAAATGACC 777
 SCMV-Sr-NW CAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACT 753
 SCMV-Sr-KB CAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACT 753
 SCMV-Sr-LB CAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACT 732
 SCMV-Sr-SP CAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCCCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACT 732

SCMV-Sr-PB1 TCACGCACACCAGCCAGAGCTAAAGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTTCGT 837
 SCMV-Sr-PB3 TCACGCACACCAGCCAGAGCTAAAGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTTCGT 837
 SCMV-Sr-PB2 TCACGCACACCAGCCAGAGCTAAAGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTTCGT 837
 SCMV-Sr-NW TCACGCACCCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTTCGT 813
 SCMV-Sr-KB TCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTTCGT 813
 SCMV-Sr-LB TCACGCACCCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTTCGT 792
 SCMV-Sr-SP TCCCGCCACAGCTAGAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTTCGT 792
 ** * * * * *

SCMV-Sr-PB1 GGTTCAAATACACGACTGTTTCGGTCTGGACGGAAATGTCGGCGAGACTCAGGAGAATACA 897
 SCMV-Sr-PB3 GGTTCAAATACACGACTGTTTCGGTCTGGACGGAAATGTCGGCGAGACTCAGGAGAATACA 897
 SCMV-Sr-PB2 GGTTCAAATACACGACTGTTTCGGTCTGGACGGAAATGTCGGCGAGACTCAGGAGAATACA 897
 SCMV-Sr-NW GGTTCAAACACACGACTGTTTCGGTCTGGACGGAAATGTCGGCGAGACTCAGGAGAATACA 873
 SCMV-Sr-KB GGTTCAAACACACGACTGTTTCGGTCTGGACGGAAATGTCGGCGAGACTCAGGAGAATACA 873
 SCMV-Sr-LB GGTTCAAACACACGCTGTTTCGGTCTGGACGGAAATGTCGGCGAGACTCAGGAGAATACA 852
 SCMV-Sr-SP GGTTCAAACACGCTTCTGTTTCGGTCTGGACGGAAATGTCGGCGAGACTCAGGAGAATACA 852
 ***** * * * * *

SCMV-Sr-PB1 GAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATGCACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAG 957
 SCMV-Sr-PB3 GAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATGCACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAG 957
 SCMV-Sr-PB2 GAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATGCACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAG 957
 SCMV-Sr-NW GAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAATATGCACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAA 933
 SCMV-Sr-KB GAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAATATGCACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAA 933
 SCMV-Sr-LB GAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATGCACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAG 912
 SCMV-Sr-SP GAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATGCACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAG 912

SCMV-Sr-PB1 CACCACTAG 966
 SCMV-Sr-PB3 CACCACTAG 966
 SCMV-Sr-PB2 CACCACTAG 966
 SCMV-Sr-NW CACCACTAG 942
 SCMV-Sr-KB CACCACTAG 942
 SCMV-Sr-LB CACCACTAG 921
 SCMV-Sr-SP CACCACTAG 921

ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

SCMV-Sr-PB1	SGHVDAGRQGGSGGGTTPPAGNGGQQQSGGNGGGQTGGSGGTGSGTQGNNGGQTGPQGS	60
SCMV-Sr-PB3	SGHVDAGRQGGSGGGTTPPAGNGGQQQSGGNGGGQTGGSGGTGSGTQGNNGGQTGPQGS	60
SCMV-Sr-PB2	SGHVDAGRQGGSGGGTTPPAGNGGQQQSGGNGGGQTGGSGGTGSGTQGNNGGQTGPQGS	60
SCMV-Sr-NW	SGQVDAGRQGGSGAQQGTPPAG-----SGGTGSGTQGNNGGQTGS--QSGGGQQGSGGGT	52
SCMV-Sr-KB	SGQVDAGRQGGSGTQGGTTPPAG-----SGGTGSGTQGNNGGQTGS--QSGGGQQGSGGGT	52
SCMV-Sr-LB	SGTVDAGAQQGGNNN-----NSGTTTQTTGGGRPTSAD-TGNQGNQNTGSQTGG	46
SCMV-Sr-SP	SGTVDAGAQQGGNNN-----NPGTTPQSTGGSKPTSAG-AGNQGNQNTGSQTGG	46
	** **** **.. : . * . *.. *.: *.*: . .	
SCMV-Sr-PB1	GQQGSGGNGGGQTGGSGGTAGQRDKDVDAGSSGKISVPKPKAMSKMRLPKAKGKVDLHL	120
SCMV-Sr-PB3	GQQGSGGNGGGQTGGSGGTAGQRDKDVDAGSSGKISVPKPKAMSKMRLPKAKGKVDLHL	120
SCMV-Sr-PB2	GQQGSGGNGGGQTGGSGGTAGQRDKDVDAGSSGKISVPKPKAMSKMRLPKAKGKVDLHL	120
SCMV-Sr-NW	GQGAAGNNGGGQTGGSSGTAGQRDKDVDAGSAGKISVPKPKAMSKMRLPKAKGKVDLHL	112
SCMV-Sr-KB	GQGAAGNNGGGQTGGSSGTAGQRDKDVDAGSAGKISVPKPKAMSKMRLPKAKGKVDLHL	112
SCMV-Sr-LB	TNTQTGGGTANQAN-VGNNNQRDKDVDAGTTGKISVPKPKAMSKMRLPKAKGKVDLHL	105
SCMV-Sr-SP	TNNQTGGGSGNQAN-AGNNNNQRDKDVDAGTTGKISVPKPKAMSKMRLPKAKGKVDLHL	105
	: :*.. ..*:. . . .*****:***** *****	
SCMV-Sr-PB1	DFLLTYKPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVWCIENGCSPN	180
SCMV-Sr-PB3	DFLLTYKPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVWCIENGCSPN	180
SCMV-Sr-PB2	DFLLTYKPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVWCIENGCSPN	180
SCMV-Sr-NW	DFLLTYKPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVWCIENGCSPN	172
SCMV-Sr-KB	DFLLTYKPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVWCIENGCSPN	172
SCMV-Sr-LB	DFLLTYKPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVWCIENGCSPN	165
SCMV-Sr-SP	DFLLTYKPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVWCIENGCSPN	165
	*****:***** *****	
SCMV-Sr-PB1	INGNWTMDGEEQRFVPLKPVNIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQ	240
SCMV-Sr-PB3	INGNWTMDGEEQRFVPLKPVNIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQ	240
SCMV-Sr-PB2	INGNWTMDGEEQRFVPLKPVNIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQ	240
SCMV-Sr-NW	INGNWTMDGDEQRFVPLKPVNIENASPTFRQVMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQ	232
SCMV-Sr-KB	INGNWTMDGDEQRFVPLKPVNIENASPTFRQVMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQ	232
SCMV-Sr-LB	INGNWTMDGDEQRFVPLKPVNIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQ	225
SCMV-Sr-SP	INGNWTMDGDEQRFVPLKPVNIENASPTF-QIMHHFSDAAEGYIEYGNSTERYMPRYGLQ	224
	*****:***** *:***** .**** *****	
SCMV-Sr-PB1	RNLDPDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFGLDGNVGETQENTE	300
SCMV-Sr-PB3	RNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFGLDGNVGETQENTE	300
SCMV-Sr-PB2	RNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFGLDGNVGETQENTE	300
SCMV-Sr-NW	RNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFGLDGNVGETQENTE	292
SCMV-Sr-KB	RNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFGLDGNVGETQENTE	292
SCMV-Sr-LB	RNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFGLDGNVGETQENTE	285
SCMV-Sr-SP	RNLTDYSLARYAFDFYEMTSRPPARAKEAHMQKAAAVRGSNTLLFGLDGNVGETQENTE	284
	*** .***** .***** *****	
SCMV-Sr-PB1	RHTAGDVSRNMHSLLGQQHN	321
SCMV-Sr-PB3	RHTAGDVSRNMHSLLGQQHN	321
SCMV-Sr-PB2	RHTAGDVSRNMHSLLGQQHN	321
SCMV-Sr-NW	RHTAGDVSRNMHSLLGQQHN	313
SCMV-Sr-KB	RHTAGDVSRNMHSLLGQQHN	313
SCMV-Sr-LB	RHTAGDVSRNMHSLLGQQHN	306
SCMV-Sr-SP	RHTAGDVSRNMHSLLGQQHN	305
	***** *****:	

ภาพผนวกที่ 4 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนแบบครบทั้งยีนโปรตีน
ห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย

BMV-F TCAAGTAGCCTTGGCGGTTGCTGACTCCTCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCATGTATACGGA 416
 BMV-T TCAAGTAGCCTTGGCGGTTGCTGACTCCTCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCATGTATACGGA 416
 BMV-R TCAAGTAGCCTTGGCGGTTGCAGACTCCTCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCATGTATACGGA 416
 BMV-Mz-RB TCAAGTAGCTTTGGCTGTCGCCGATTCCCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCATGTACACAGA 419
 BMV-Mz-KB TCAAGTAGCTTTGGCTGTCGCCGATTCCCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCATGTACACAGA 419
 BMV-Sr-SB TCAGGTAGCTTTGGCTGTCGCCGATTCCCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCATGTACACAGA 419
 *** ***** ***** ** ** ** ***** ***** ***** ** **

BMV-F CGCCTTTCGAGGGGCGACTCTGGGGGATTTGCTTAA---TCTCCAGATTTATCTGTATGC 473
 BMV-T CGCCTTTCGAGGGGCGACTCTGGGGGATTTGCTTAA---TCTCCAGATTTATCTGTATGC 473
 BMV-R CGCCTTTCGAGGGGCGACTCTGGGGGATTTGCTTAA---TCTCCAGATTTATCTGTATGC 473
 BMV-Mz-RB CGCTTTCGAGGGGATCACCCCTTGAACAGCTGGCGAAGGACCTGCGCATCTATGTGTATGC 479
 BMV-Mz-KB CGCTTTCGAGGGGATCACCCCTTGAACAGCTGGCGAAGGACCTGCGCATCTATGTGTATGC 479
 BMV-Sr-SB CGCTTTCGAGGGGATCACCCCTTGAACAGCTGGCGAAGGACCTGCGCATCTATGTGTATGC 479
 *** ** ** ** ** ** ** *

BMV-F ATCTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTTCGTTGTACATCTAGAAGTTGAGCACGTAAGGCC 533
 BMV-T ATCTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTTCGTTGTACATCTAGAAGTTGAGCACGTAAGGCC 533
 BMV-R ATCTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTTCGTTGTACATCTAGAAGTTGAGCACGTAAGGCC 533
 BMV-Mz-RB ATCGGAGGCTGTGGCAGAGGGAGCGGTAGCAGTGCATTTGGAAGTCGAACACGTAAGGCC 539
 BMV-Mz-KB ATCGGAGGCTGTGGCAGAGGGAGCGGTAGCAGTGCATTTGGAAGTCGAACACGTAAGGCC 539
 BMV-Sr-SB ATCGGAGGCTGTGGCAGAGGGAGCGGTAGCAGTGCATTTGGAAGTCGAACACGTAAGGCC 539
 *** ** *

BMV-F TACGTTTCGATGACTTCTTCACCCCGGTTTATAGGTAG 570
 BMV-T TACGTTTCGATGACTTCTTCACCCCGGTTTATAGGTAG 570
 BMV-R TACGTTTCGATGACTTCTTCACCCCGGTTTATAGGTAG 570
 BMV-Mz-RB TACGTTGGACGACTTTTTCACCCCGGTACTAA--- 573
 BMV-Mz-KB TACGTTGGACGACTTTTTCACCCCGGTACTAA--- 573
 BMV-Sr-SB TACGTTGGACGACTTTTTCACCCCGGTACTAA--- 573
 ***** ** ***** ***** ***** **

ภาพผนวกที่ 5 (ต่อ)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายอังการ ยีสารคุณ
เกิดวันที่	7 สิงหาคม 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดตราด
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2550 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

