



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช

สาขา

โรคพืช

ภาควิชา

เรื่อง การสำรวจและการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* ในประเทศไทย

Survey and Diagnosis of Maize Mosaic Disease Caused by *Brome Mosaic Virus* in Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวจันทร์เพ็ญ ปุ๊กสูงเนิน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์คณินันต์ย์ เจริญวรารกร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์วิชัย โมสีตรัตน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสุวรรณ เจริญสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสำรวจและการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* ใน
ประเทศไทย

Survey and Diagnosis of Maize Mosaic Disease Caused by *Brome Mosaic Virus* in Thailand

โดย

นางสาวจันทร์เพ็ญ ปุ๊กสูงเนิน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2551

จันทร์เพ็ญ ปุ๊กสูงเนิน 2551: การสำรวจและการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* ในประเทศไทย. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ก้องนิตย์ เจริญวรารกร, Ph.D. 88 หน้า.

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสำรวจและตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) ซึ่งเป็นโรคไวรัสที่พบแพร่ระบาดไปทั่วโลก โดยทำการสำรวจ ในแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญของประเทศไทย ในการตรวจใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากใบข้าวโพดที่เป็นโรคจากจังหวัดราชบุรี (RB) และกาญจนบุรี (KB) สามารถทำให้ *Chenopodium amaranticolor* แสดงอาการผลจุดเฉพาะแห่ง และข้าวโพดหวาน แสดงอาการด่างทั่วต้น เมื่อนำเชื้อไวรัสทั้ง 2 ไอโซเลท มาเตรียมไวรัสให้บริสุทธิ์ พบว่าได้ไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่มีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.63 และ 1.60 จากไอโซเลท RB และ KB ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของไวรัสด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีน เพียงแถบเดียว มีขนาดประมาณ 21.68 กิโลดาลตัน จากการนำทั้ง 2 ไอโซเลท มาแยกสัคคอราร์เอ็นเอจากไวรัสบริสุทธิ์ ปรากฏแถบอาร์เอ็นเอ 3 ชิ้น เมื่อวิเคราะห์ฮินโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ พบว่ามีความยาวตลอดชิ้น 573 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีนขนาด 190 เรสซิดิวส์ ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะมิโน 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน กับเชื้อ BMV-F, BMV-R และ BMV-Type จากฐานข้อมูล GenBank ที่ระดับ 73 เปอร์เซ็นต์ และ 76-77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง Phylogenetic tree จากข้อมูลกรดอะมิโน พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทของประเทศไทยถูกจัดกลุ่มแยกออกจากทั้ง 3 สายพันธุ์ ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท บนข้าวโพด 5 สายพันธุ์ ในสภาพโรงเรือน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคและการพัฒนาอาการมีความรุนแรงไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อทดสอบปฏิกิริยาบนพืชทดสอบ และตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA พบว่าสามารถแบ่งอาการของพืชทดสอบได้เป็น 3 กลุ่ม คือ พืชทดสอบที่แสดงอาการและตรวจพบเชื้อ พืชทดสอบที่แสดงอาการและตรวจไม่พบเชื้อ และพืชทดสอบที่ไม่แสดงอาการและตรวจไม่พบเชื้อ

ไวรัสไอโซเลท BMV-RB ใช้เป็นแอนติเจน ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ BMV พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ BMV และไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ SCMV, MCMV, SCMV-MDB และ CMV ดังนั้นจากลักษณะและคุณสมบัติต่างๆของเชื้อ ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จึงเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ BMV เพื่อการป้องกันกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

Janpen Pooksungnurn 2008: Survey and Diagnosis of Maize Mosaic Disease Caused by *Brome Mosaic Virus* in Thailand. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Kanungnit Reanwarakorn, Ph.D. 88 pages.

This research was studied and diagnosed of *Brome mosaic virus* (BMV) which was found worldwide epidemics. By survey of maize mosaic disease caused by BMV in important maize growing areas in Thailand. Two isolates of BMV were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique in Kanchanaburi (KB) and Ratchaburi (RB) provinces. Both isolates caused local lesion on *Chenopodium amaranticolor* and systemic mosaic symptom on sweet corn. They were isolated, multiplied and purified. The purified viruses were shown with A_{260}/A_{280} absorbance ratio at 1.63 and 1.60 from KB and RB isolates, respectively. A single band protein was displayed with approximate at 21.68 kDa by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique. The two isolates were shown three RNA segments by extraction purified viruses. BMV-coat protein gene were composed of 573 nucleotides and encoded for 190 residue. They were displayed similarity of 99% nucleotide and 100% amino acid sequences with each other as well as 73% and 76-77% nucleotide and amino acid sequences, respectively, with GenBank database of BMV-F, BMV-R and BMV-type. Using Phylogenetic tree analysis with amino acid of CP-gene, both Thai isolates were separated groups from those GenBank isolates. By virulent assessment of the Thai isolates on 5 varieties of maize in greenhouse, percentage of maize disease and symptom development were shown the same level in both isolates. Using bioassay and confirming with ELISA technique, indicator plants were separated into three distinct groups, symptom with found BMV, symptom with negative tested BMV and symptomless with negative tested BMV.

Purified BMV-RB isolate was used as an antigen for polyclonal antibody (PAb) production. PAb reacted specifically with the BMV infected plants without cross reaction to SCMV, MCMV, SCMV-MDB and CMV. Base on this research, the characteristic and other properties of BMV have been useful for BMV diagnosis and efficacious disease control.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณินนิตย์ เจริญวรารากร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนี สงประยูร กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย โหมสินรัตน์ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่งตลอดมา และกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร วุฒิวิมลชัย ประธานการสอบ และ ดร.วันเพ็ญ ศรีทองชัย ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ ให้สมบูรณ์ และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อันทรงคุณค่าแก่ข้าพเจ้ากระทั่งประสบความสำเร็จในการศึกษา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน ที่อำนวยความสะดวกให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสนที่ให้ทุนสนับสนุน และอำนวยความสะดวกให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ห้อง A410 ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณพระครูพัฒนกิจสุนทร หลวงพ่อปิ่น (ยสินธโร) อุ่มน้อย บิดา มารดา พี่และน้อง ครอบครัวปู่กงเนน ที่ได้สนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ หลวงตา บิดา และมารดา

จันทร์เพ็ญ ปู่กงเนน

ตุลาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	28
สรุปและข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	73
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก	79
ภาคผนวก ข	83

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลการตรวจเชื้อ BMV ในข้าวโพดด้วยเทคนิค indirect ELISA ของตัวอย่างข้าวโพดจาก 20 จังหวัด	29
2 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบทั้งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank	36
3 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จาก จังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank	39
4 เปรียบเทียบการเกิดอาการโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท ในช่วงระยะเวลาต่างๆหลังจากการปลูกเชื้อบนข้าวโพด 5 สายพันธุ์	43
5 การตรวจหาเชื้อ BMV จากส่วนต่างๆ ของข้าวโพดที่ได้รับการปลูกเชื้อ BMV ทั้ง ไอโซเลท BMV-RB (ราชบุรี) และ BMV-KB (กาญจนบุรี) ด้วยวิธี indirect ELISA	52
6 ข้อมูลอาการและการตรวจหาเชื้อ BMV ไอโซเลท RB และ KB หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ของพืชทดสอบแต่ละชนิด ด้วยเทคนิค indirect ELISA เปรียบเทียบพืชอาศัยของเชื้อ BMV ในฐานข้อมูล CMI/ABB Description of Plant Virus	61
7 ค่าไคเอร์ของแอนติซีรัมเมื่อใช้สารแขวนลอยไวรัสความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA	65
8 ค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ของเชื้อ BMV ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB) ที่ค่าความเจือจางต่างๆ ด้วยเทคนิค indirect ELISA	67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
9 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB) กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค indirect ELISA	68
10 การทดสอบความไวของการเกิดปฏิกิริยาของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB) ด้วยเทคนิค indirect ELISA	69
ตารางผนวกที่	
1 ตารางข้อมูลที่ใช้ในการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน (Protein Molecular Weight Marker) และนำมาใช้คำนวณขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ที่ได้จากเทคนิค SDS-PAGE	80

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะอนุภาคของเชื้อ BMV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 26 นาโนเมตรภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	7
2 โครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส BMV (linear single strand, positive-sense RNAs, RNA-1, RNA-2 และ RNA-3 and subgenomic RNA) แสดงส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน ชนิด ต่างๆจากปลาย 5' → 3'	9
3 ภาพจำลองแสดงตำแหน่งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (CP gene) ของเชื้อ BMV รวมทั้งการแสดงตำแหน่งของคู่อิทธิพลเมอร์ครอบคลุมยีนโดยมีคู่อิทธิพลเมอร์ FCP กับ RCP2	17
4 ข้าวโพดฝักอ่อนแสดงอาการจุดสีขีด และมีอาการด่างทั่วใบร่วมด้วย ทำปฏิกิริยาให้ผลบวกกับแอนติบอดีต่อ BMV-SC จากการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA	28
5 <i>Chenopodium amaranticolor</i> แสดงอาการจุดสีเหลืองเข้มมีสีเหลืองอ่อนล้อมรอบ หลัง ปลูกลง 5 วัน จากเชื้อไอโซเลท BMV-RB (B) และ ไอโซเลท BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับใบปกติ (A)	30
6 ข้าวโพดหวานแสดงอาการด่างเป็นแถบสีขาว เชื่อมกันตามแนวเส้นใบหลังปลูกลง 7-14 วัน จากเชื้อ ไอโซเลท BMV-RB (B) และ ไอโซเลท BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับใบปกติ (A)	31
7 การวิเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ด้วยวิธี SDS-PAGE	32
8 แถบอาร์เอ็นเอจำนวน 3 ชั้น จากการแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากอนุภาคของเชื้อ BMV ตรวจสอบแถบอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1 % อะกาโรส เจล	33
9 แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส (ลูกศรชี้) จากการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FCP กับ RCP2 และตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1 % อะกาโรส เจล	33
10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV มีความยาว 573 นิวคลีโอไทด์ จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และกาญจนบุรี (BMV-KB) สัญลักษณ์ แสดงตำแหน่งเริ่มต้น และแสดงตำแหน่งหยุดแปลรหัสเป็นโปรตีน	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11 ลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ประกอบด้วย 190 กรดอะมิโน จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ กาญจนบุรี (BMV-KB)	35
12 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบทั้งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ขนาด 573 นิวคลีโอไทด์ ของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จากจังหวัดราชบุรี(BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank	37
13 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank	39
14 Phylogenetic tree ที่แสดงความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV- KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม Mega version 4.0	40
15 อาการของข้าวโพดที่เป็นโรคหลังการปลูกเชื้อไอโซเลท BMV-RB ด้วยวิธีการบนข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริด 3 (1) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์สำลีอีสาน (2) ข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 (3) ข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง (4) และข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์ SG 17 (5)	44
16 อาการของข้าวโพดที่เป็นโรคหลังการปลูกเชื้อไอโซเลท BMV-RB ด้วยวิธีการบนข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริด 3 (1) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์สำลีอีสาน (2) ข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 (3) ข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง (4) และข้าวโพดฝักอ่อน พันธุ์ SG 17 (5)	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	เนื้อหา	หน้า
17	ข้าวโพดที่เป็นโรคแสดงอาการใบด่างแถบขาว (white stripes) อย่างรุนแรงจากการปลูกเชื้อ BMV ไอโซเลต BMV-RB (ราชบุรี) บนข้าวโพดพันธุ์ ไฮบริดส์ 3 (1A) ลำลีอีสาน (2A) และไอโซเลต BMV-KB (กาญจนบุรี) บนข้าวโพดพันธุ์ ไฮบริดส์ 3 (1B) ลำลีอีสาน (2B) หลังปลูกเชื้อ 18-20 วัน	48
18	อาการช่อดอกเกสรตัวผู้ผิดปกติ หรือไม่สมบูรณ์ของข้าวโพดเป็นโรคหลังการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริดส์ 3 (1) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ ลำลีอีสาน (2) ข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 (3) ข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง (4) และข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์ SG 17 (5)	49
19	ฝักข้าวโพดไร่ พันธุ์สุวรรณ 5 ที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อไอโซเลต BMV-RB (B) และไอโซเลต BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ (A) และตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA	51
20	<i>Chenopodium amaranticolor</i> แสดงอาการแผลจุดเซลล์ตายภายหลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน จากไอโซเลต BMV-RB (B) และ ไอโซเลต BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับใบปกติ (A)	56
21	<i>Chenopodium quinoa</i> แสดงอาการใบด่างจุดขีดสีเหลือง ไอโซเลต BMV-RB (B) และไอโซเลต BMV-KB (C) หลังการปลูกเชื้อ 3 วัน (1) หลังปลูกเชื้อ 10 วัน (2) เปรียบเทียบกับใบปกติ (A)	56
22	ถั่วแขก (<i>Phaseolus vulgaris</i>) แสดงอาการจุดแผลสีน้ำตาลแดงภายหลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน จากไอโซเลต BMV-RB (B) และ ไอโซเลต BMV-KB (C) และเปรียบเทียบกับใบปกติ (A)	57
23	ข้าวฟ่าง (<i>Sorghum bicolor</i>) แสดงอาการใบด่างขีดขาวภายหลังการปลูกเชื้อ 7-14 วัน จากไอโซเลต BMV-RB (B) และ ไอโซเลต BMV-KB (C) บนข้าวฟ่างพันธุ์ UT 423B (1) และข้าวฟ่างพันธุ์ UT 325B (2) เปรียบเทียบกับข้าวฟ่างปกติ (A)	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	ข้าวสาลี (<i>Triticum aestivum</i>) แสดงอาการใบด่างขีดขาวภายหลังการปลูกเชื้อ 28-30 วัน จากไอโซเลท BMV-RB และไอโซเลท BMV-KB บนข้าวสาลี 4 สายพันธุ์ พันธุ์ อินทรี 1 (1) พันธุ์ อินทรี 2 (2) พันธุ์สุวรรณ 56 (3) และ พันธุ์ 171 (4) เทียบกับข้าวสาลีปกติ (A)	58
25	อาการช่อดอกเกสรตัวผู้ผิดปกติ หรือไม่สมบูรณ์ของข้าวโพดเป็นโรคหลังการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริด 3 (1) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ ลำลีอีสาน (2) ข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 (3) ข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง (4) และข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์ SG 17 (5)	59
26	ข้าวบาร์เลย์ (<i>Hordeum vulgare</i>) พันธุ์ SMG แสดงอาการแผลสีเหลืองถึงน้ำตาล ภายหลังปลูกเชื้อ 10 วัน (1) และอาการใบด่างขีดขาวหลังปลูกเชื้อ 30 วัน (2) จากการปลูกเชื้อ ไอโซเลท BMV-RB (B) และ ไอโซเลท BMV-RB (C) เปรียบเทียบกับข้าวบาร์เลย์ปกติ (A)	59
27	ข้าวโพดหวาน (<i>Zea mays</i>) พันธุ์ ไฮบริด 3 แสดงอาการใบด่างแถบขาวหลังปลูกเชื้อ 10 วัน จากถั่วแขกที่แสดงอาการแผลจุดน้ำตาลแดง (necrotic lesion) มาปลูกเชื้อด้วย วิธีกล จากถั่วแขกที่ปลูกเชื้อด้วย ไอโซเลท BMV-RB (B) และไอโซเลท BMV-KB (C) เปรียบกับข้าวโพดปกติ (A)	60
28	ลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสไอโซเลท BMV-RB ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 27 นาโนเมตร ในสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	63
29	ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ BMV-RB จากการเก็บเลือด 5 ครั้ง ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้ไวรัสบริสุทธิ์ BMV-RB ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | กราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้นของ Protein Molecular Weight Marker
($R^2 = 0.982$) | 81 |
| 2 | ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จากไอโซเลท BMV-RB (A) และไอโซเลท BMV-KB
(B) จากข้าวโพดของประเทศไทย | 82 |

การสำรวจและการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* ในประเทศไทย

Survey and Diagnosis of Maize Mosaic Disease Caused by *Brome Mosaic Virus* in Thailand

คำนำ

ข้าวโพดจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นธัญพืชที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง น้ำมัน น้ำตาล และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกข้าวโพดทั่วโลกประมาณ 826.9 ล้านไร่ มีผลผลิตรวม 575.62 ล้านตัน ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดของโลก รองลงมาได้แก่ จีน ประชาคมยุโรป บราซิล เม็กซิโก อาร์เจนตินา และประเทศไทย ในปี 2548 พื้นที่ปลูกข้าวโพดของประเทศไทยมีประมาณ 8.67 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 507 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็น ผลผลิตรวม 4.40 ล้านตัน (สำนักงานคอมพิวเตอร์และเครือข่ายมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2548) ในปี 2547 มีการส่งออกข้าวโพดฝักอ่อนและข้าวโพดหวานในรูปแบบต่างๆ เช่น บรรจุกระป๋องทั้งเมล็ดและฝัก ข้าวโพดครีม เป็นต้น มูลค่ารวม 4,722 ล้านบาท และปี 2548 มูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นเป็น 5,636 ล้านบาท (<http://www.sara-buri.info/admin/pdf/03.doc>) ปี พ.ศ. 2549 มีการนำเข้าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มูลค่าประมาณ 423 ล้านบาท และมีการส่งออกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มีมูลค่ากว่า 1,572 ล้านบาทหรือประมาณ 257,520 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) โดยปัจจุบันการปลูกข้าวโพดในประเทศมีทั้งข้าวโพดหวานบริโภคสด ข้าวโพดไร่สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ นิยมใช้สายพันธุ์ที่เป็นลูกผสม เนื่องจากให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพของผลผลิตสม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามความเสียหายจากเชื้อสาเหตุโรคในข้าวโพดยังคงเป็นปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการผลิตข้าวโพด สำหรับปัญหาการระบาดของโรคไวรัสในประเทศระยะหลังนี้มีการตรวจพบในแหล่งปลูกข้าวโพดหลายแหล่ง เช่น พิจิตร และคณะ (2549) ตรวจพบเชื้อไวรัส *Maize chlorotic mottle virus* และ *Sugarcane mosaic virus* ในข้าวโพดหวาน

เชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชอีกชนิดหนึ่ง มีรายงานพบครั้งแรกใน brome grass (*Bromus inermis*) ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Gramineae (McKinney *et al.*, 1942) เป็นไวรัสที่พบการแพร่ระบาดในทางตอนกลางของประเทศสหรัฐอเมริกา ทางตะวันออกของทวีป

ยุโรป ประเทศออสเตรเลีย และตอนใต้ของประเทศแอฟริกา (ICTVdB management, 2002) เชื้อชนิดนี้ถ่ายทอดได้ง่ายโดยวิธีการสัมผัสกันระหว่างพืช หรือวิธีกล (Lane, 1974) ถ่ายทอดทางไส้เดือนฝอย และด้วงเต่า (Walters, 1969; Bancroft, 1970) นอกจากนี้สามารถเข้าทำลายพืชในวงศ์ Gramineae กว้างกว่า 50 ชนิด ซึ่งมีหลายชนิดเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ เช่น อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ และ หญ้าชนิดต่างๆอีกมากมาย (ธีระ, 2532; Slykhuis, 1976; Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) มีรายงานว่าพบเชื้อ BMV ครั้งแรกในอ้อย ในจังหวัดนครปฐม และกาญจนบุรี ในปี พ.ศ. 2524 (ธีระ, 2532)

จากรายงานการค้นพบเชื้อไวรัส BMV ใน bromegrass ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1942 จนถึงปัจจุบัน และจากอ้อยในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2524 ยังไม่มีรายงานการตรวจพบโรคของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อไวรัส BMV ในประเทศไทย เนื่องจากเชื้อ BMV สามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้ จึงมีแนวโน้มว่าจะพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ในข้าวโพด ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ BMV จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการตรวจสอบ การผลิตพันธุ์พืชต้านทานโรค การกำหนดมาตรการป้องกัน และในการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

การตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไวรัส BMV สามารถวินิจฉัยได้โดยใช้เทคนิคเบื้องต้นที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไวรัส โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เทคนิค gel electrophoresis เทคนิค ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) และเทคนิค SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) เป็นต้น (พิศสุวรรณ, 2543)

การศึกษาวินิจฉัยในครั้งนี้เพื่อวินิจฉัยเชื้อ BMV ที่ทำให้เกิดโรคในข้าวโพดในประเทศไทย และนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคและการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดให้สามารถต้านทานต่อเชื้อ BMV ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจโรคของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) ในแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญของประเทศไทย
2. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV
3. ปฏิบัติการของโรคบนข้าวโพด และพืชทดสอบชนิดต่างๆ (bioassay)
4. ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยเชื้อ BMV ให้มีประสิทธิภาพต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของข้าวโพด

ข้าวโพดเป็นพืชวงศ์ Gramineae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* L. ข้าวโพดสามารถปลูกได้ผลดีที่สุดในเขตอบอุ่น (temperate zone) มีแดดจัด และมีความชื้นในดินเพียงพอตลอดฤดูปลูก สามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วน มีความอุดมสมบูรณ์ของดินสูง มีความเป็นกรดเป็นด่างของดิน (pH) เหมาะสมประมาณ 5.5- 6.8 (อุดม, 2537) นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่ปลูกได้ดีบนพื้นที่ลาดเอียง หรือสูงๆต่ำๆ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวโพด ข้าวโพดเป็นพืชล้มลุกที่มีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียแยกอยู่คนละส่วนบนต้นเดียวกัน ข้าวโพดเป็นพืชผสมข้ามพันธุ์กันตามธรรมชาติ เนื่องจากปกติข้าวโพดเป็นพืชที่ดอกตัวผู้สลับเรณูเกสรก่อนที่ดอกตัวเมียพร้อมที่จะทำการผสมเล็กน้อย จึงมีการผสมตัวเองเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (5%) ต้นข้าวโพดส่วนใหญ่มีลำต้นตรงสูงโดยเฉลี่ย 2.2 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 0.5-2.0 นิ้ว มีระบบรากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) ใบของข้าวโพดลักษณะคล้ายใบของพืชวงศ์หญ้าอื่นๆ ประกอบด้วย กาบใบ (leaf sheath) ที่หุ้มลำต้นและมีแผ่นใบ (leaf blade) ที่กางสลับบนส่วนของลำต้น ตัวแผ่นใบจะทำมุมกับลำต้นด้วยการยึดของเส้นกลางใบ (mid rib) เพื่อให้ใบได้รับแสงสำหรับใช้ในกระบวนการปรุงอาหาร โดยทั่วไปข้าวโพดมีการแตกหน่อไม่มากนัก หรือไม่มีการแตกหน่อเลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของดิน (ทรงเชาว์, 2531; ราเชนทร์, 2539)

2. การปลูกข้าวโพดในประเทศไทย

พื้นที่ปลูกข้าวโพดในเขตต่างๆ ของโลก รวมทั้งพื้นที่ปลูกของประเทศไทยเกือบทั้งหมดจะอยู่ในเขตเกษตรอาศัยน้ำฝน การเพาะปลูกส่วนใหญ่อาศัยน้ำฝนจากธรรมชาติ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าฤดูปลูกที่เหมาะสมสามารถแบ่งได้เป็น 2 ฤดูปลูก คือ การปลูกในฤดูต้นฝน การปลูกในฤดูฝน แต่จากที่กล่าวมาประเทศไทยสามารถทำการเพาะปลูกข้าวโพดได้ตลอดทั้งปี หรือปีละ 3 ครั้ง ถ้ามีน้ำเพียงพอ เช่น จัดให้มีระบบชลประทานที่ดี (ราเชนทร์, 2539) โดยการปลูกข้าวโพดในประเทศไทยมีทั้งข้าวโพดหวานบริโภคสด ข้าวโพดไร่สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ปัจจุบันนิยมใช้สายพันธุ์ที่เป็นลูกผสม เนื่องจากให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพของผลผลิตสม่ำเสมอ ซึ่งข้าวโพดบริโภคได้แก่ ข้าวโพดฝักอ่อน (baby corn) ข้าวโพดหวาน (sweet corn) ข้าวโพดเทียน ข้าวโพดข้าวเหนียว

(waxy corn) จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพสูง เพาะปลูกง่าย ใช้ระยะเวลาการผลิตสั้น มีความเสี่ยงต่ำ ใช้สารเคมีน้อย นอกจากนี้ยังเหมาะสมสำหรับเกษตรกรในชนบท โดยเฉพาะในเขตที่มีน้ำ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดฝักอ่อนจัดอยู่ในกลุ่มพืชเพื่อการส่งออก ในการส่งออกมีหลายรูปแบบ เช่น แปรรูปบรรจุกระป๋อง บรรจุทั้งเมล็ดและฝัก ข้าวโพดครีม บรรจุฝักในถุงพลาสติกสุญญากาศ แช่แข็งทั้งเมล็ดและทั้งฝัก ในบรรดาข้าวโพดฝักสดข้าวโพดหวานจัดเป็นพืชที่สำคัญที่สุด ในเขตเอเชียแปซิฟิก ข้าวโพดหวานมีความสำคัญอยู่ในประเทศ ญี่ปุ่น ไต้หวัน และไทย ในปี 2548 ประเทศไทยส่งออกข้าวโพดหวานในรูปแบบต่าง ๆ สูงเป็นอันดับ 4 ของโลก รองจากสหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส และฮังการี จากปริมาณการส่งออก มีมูลค่ารวมกว่า 3,200 ล้านบาท (<http://www.sara-buri.info/admin/pdf/03.doc>) สำหรับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เนื่องจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ขยายตัวเพิ่มขึ้น ทำให้มีความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นวัตถุดิบเพิ่มขึ้น ในช่วง 5 ปี (ปี2543-2547) ไทยมีการส่งออกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เฉลี่ยจำนวน 0.255 ล้านตัน/ปี คิดเป็นมูลค่า 1,735 ล้านบาท และมีการนำเข้าเฉลี่ยจำนวน 0.026 ล้านตัน/ปี คิดเป็นมูลค่า 362 ล้านบาท (<http://www.cdoae.doe.go.th/>) ปี พ.ศ. 2549 มีการนำเข้าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มูลค่าประมาณ 423 ล้านบาท และมีการส่งออกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มีมูลค่ากว่า 1,572 ล้านบาทหรือประมาณ 257,520 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549)

3. ประวัติและความสำคัญของเชื้อ *Brome mosaic virus*

เชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) มีชื่อพ้อง (synonyms) อีกหลายชื่อ เช่น Weidelgrasmosaikvirus, Ryegrass streak virus และ Trespengrasmosaikvirus มีรายงานการพบโรคครั้งแรกในพืชตระกูลหญ้า *Bromus inermis* เมื่อปี 1942 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย McKinney และคณะ พบการแพร่ระบาดไปทั่วโลกในพืชอาศัยต่างๆ และบนข้าวโพดที่ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื้อ BMV ถูกบันทึกว่าตรวจพบใน *Phleum bertolonii* DC. จากประเทศอัฟริกา ยุโรป อเมริกาเหนือ และ อังกฤษ (Lane, 1981) อัฟริกาใต้ เยอรมัน ฟินแลนด์ และ รัสเซีย (Slykhuis, 1976) เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดได้ง่ายโดยวิธีการสัมผัสกันระหว่างพืช หรือวิธีกล (Lane, 1974) สามารถถ่ายทอดผ่านทาง การติดตา แต่ไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (seed) และละอองเกสร (pollen) (ICTVdB management, 2002) และมีรายงานว่าสามารถถ่ายทอดทางไส้เดือนฝอย คือ *Xiphinema paraelongatum*, *X. coxi* (Bancroft, 1970) *X. diversicaudatum* และ *Longidorus macrosoma* นอกจากนี้ด้ว้งเต่า *Diabrotica undecimpunctata* และ *D. virgifera* สามารถถ่ายทอดได้ (Walters, 1969) และมีพืชอาศัยส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Gramineae ทำให้เกิดอาการแบบทั่วต้น(systemic) ซึ่งมีหลายชนิดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์

ข้าวโพดและหญ้าชนิดต่างๆ อีกมากมาย (Lane, 1977) ส่วนพืชอาศัยในวงศ์อื่นๆ เช่น Amaranthaceae, Chenopodiaceae และ Leguminosae ทำให้เกิดอาการจุดแผล (local lesion) (ธีระ, 2532; Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) นอกจากนี้ BMV บางสายพันธุ์ ทำให้ถั่วแสดงอาการแบบทั่วต้นได้ (De Jong and Ahlquist, 1995)

สำหรับประเทศไทย ปัจจุบันยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าไวรัส BMV แพร่ระบาดเข้ามาในประเทศไทยเมื่อใด แต่มีรายงานพบไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2524 ในอ้อยที่จังหวัดนครปฐม และกาญจนบุรี อ้อยที่เป็นโรคแสดงอาการใบด่างแถบขาวและแคระแกร็นอย่างรุนแรง (ธีระ, 2532)

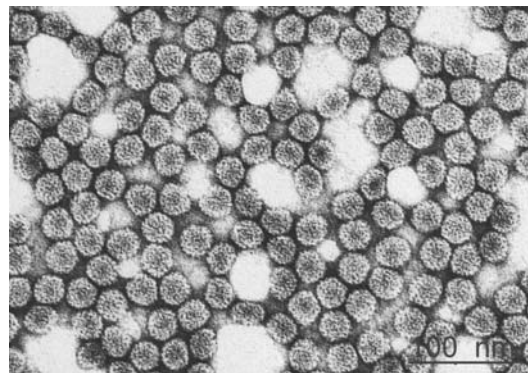
4. เชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV)

BMV จัดอยู่ในวงศ์ Bromoviridae จินัส Bromovirus ซึ่งลักษณะอนุภาคเป็นทรงกลม (isometric) เส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาคประมาณ 26 นาโนเมตร (ICTVdB management, 2002) (ภาพที่ 1) องค์ประกอบทางเคมีของอนุภาคเชื้อ BMV ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก 22 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอนุภาคและโปรตีนห่อหุ้ม 78 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอนุภาค จีโนมของไวรัสเป็น multipartite กรดนิวคลีอิกชนิดไรโบนิวคลีอิก (RNA) สายเดี่ยว 3 เส้น (single stranded RNAs) แบบ positive sense ขนาดประมาณ 8.9 กิโลเบส ทางด้านปลาย 5' ของสาย RNA จะพบโครงสร้าง m7G5'ppp5 (cap) ส่วนด้านปลาย 3' มีโครงสร้าง tRNA-like structure ในการแปลรหัสเป็นโปรตีน (translate) ของสาย RNA-1 และ RNA-2 สังเคราะห์โปรตีนในแบบ polyprotein สาย RNA-3 ของสาย แปลรหัสเป็นโปรตีนแบบ subgenomic (ICTVdB management, 2002) โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein) มีน้ำหนักโมเลกุล 20.0 กิโลดาลตัน (Hull, 2002) สามารถพบอนุภาคไวรัสสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อใบ บริเวณ mesophyll, cytoplasm, perinuclear space และ chloroplast (Pailwal, 1970) เซลล์ที่ถูกเชื้อ BMV เข้าทำลาย จะสร้างผลึกโปรตีน (crystals) ในส่วนของ cytoplasm (Burgess *et al.*, 1974) ทวีศักดิ์ (2528) รายงานโครงสร้างทางจุลภาคของอ้อยเป็นโรคใบด่างแถบขาวจากประเทศไทย พบอนุภาคของไวรัสกระจายทั่วไปใน cytoplasm และเกาะตัวกันเป็นผลึก

เชื้อ BMV บริสุทธิ์มีค่า sedimentation coefficient ที่ pH ต่างกัน ที่ pH 3-6 มีค่าเท่ากับ 87.3 S และที่ pH7 มีค่าเท่ากับ 78.7 S (Incardona and Kaesberg, 1964) ค่า buoyant density ใน cesium chloride (CsCl₂) เท่ากับ 1.35 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ค่า extinction coefficient ที่ 260 นาโนเมตร เท่ากับ 5.15 และค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสงที่ A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.75 (Lane, unpublished data) เชื้อ BMV ในน้ำคั้นสามารถทนต่อความร้อน (thermal inactivation point,

TIP) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความคงทนของอนุภาคไวรัสในสภาพอุณหภูมิห้อง (longevity in vitro, LIV) นาน 28 วัน และค่าเจือจางสูงสุดในการก่อโรค (dilution end point, DEP) อยู่ระหว่าง 10^{-4} ถึง 10^{-5} (ICTVdB management, 2002)

สายพันธุ์ (Strain) ของเชื้อ BMV มีหลายสายพันธุ์ โดยจำแนกจากคุณสมบัติการเกิดปฏิกิริยาบนพืชอาศัย Gibson และ Kenten (1978) ได้รายงานการตรวจพบเชื้อ BMV English strain (BMV-E) ใน *Phleum bertolonii* DC. จากประเทศอังกฤษ ก่อให้เกิดอาการด่างเหลือง (chlorotic mottling) หรือ จีด (streaking) บนรัญพืช และในข้าวโพด จะมีการพัฒนาอาการเป็นแผลเซลล์ตายทั่วทั้งต้น (lethal systemic necrosis) และใน *Chenopodium* spp. ก่อให้เกิดอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) จากนั้นแพร่กระจายทั่วทั้งต้น (systemic) ซึ่งประกอบด้วย *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* และ *C. murale* ซึ่งสอดคล้องกับ American strain (BMV-A) และ European strain ตามที่ Bancroft (1970) และ Lane (1974) ได้รายงานไว้ ยกเว้นใน *C. murale* สายพันธุ์ BMV-E ก่อให้เกิดจุดแผลเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 มิลลิเมตร ตรงข้ามกับ สายพันธุ์ BMV-A ในวันต่อมาจุดแผลขยายใหญ่ขึ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และเชื่อมรวมกันเป็นแผลไหม้ (necrosis) (Gibson and Kenten, 1978) สายพันธุ์ M1 (BMV-M1) หรือโคลนที่ได้จากจีโนมของ Russian strain (BMV-R) ก่อให้เกิดอาการแบบทั่วต้นบนข้าวบาร์เลย์ หญ้า แต่ไม่เกิดอาการบนถั่ว ต่างจากสายพันธุ์ M2 (BMV-M2) ได้จากรัฐ Arkansas ประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถก่อให้เกิดอาการแบบทั่วต้นได้ทั้งบนข้าวบาร์เลย์ หญ้า และถั่ว line TVu-612 (De Jong and Ahlquist, 1995)



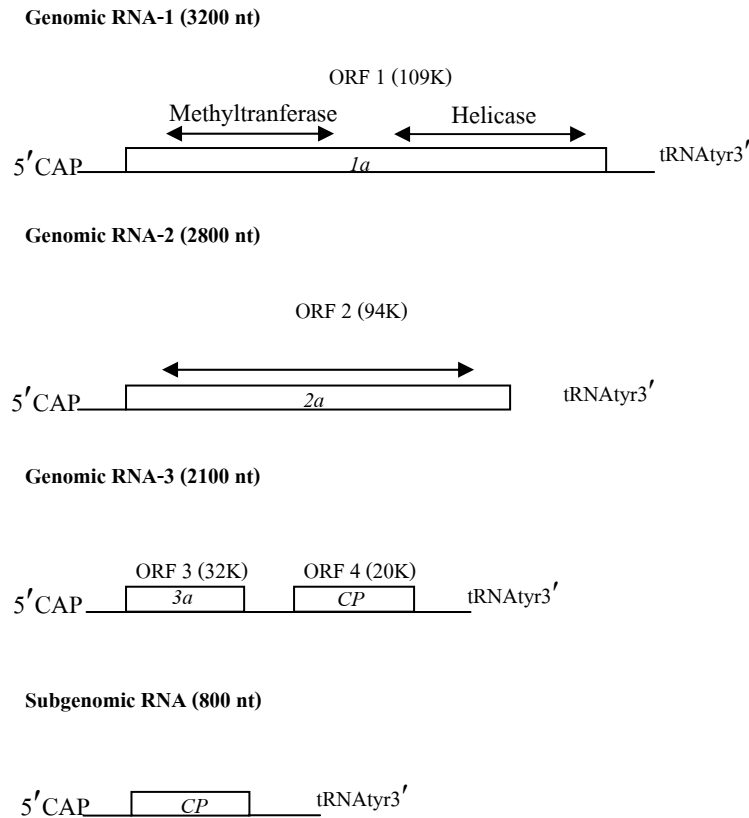
ภาพที่ 1 ลักษณะอนุภาคของเชื้อ BMV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 26 นาโนเมตรภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน. Bar represent 100 nm

ที่มา: ICTVdB management (2002)

5. โครงสร้างจีโนมของเชื้อ *Brome mosaic virus*

เชื้อ BMV จัดอยู่ในจีโนม Bromovirus จีโนมของไวรัสชนิดนี้เป็นแบบ multipartite กรดนิวคลีอิกชนิดไรโบนิวคลีอิก (RNA) สายเดี่ยว 3 เส้น (single stranded RNAs) แบบ positive sense โดยอาร์เอ็นเอแต่ละชนิดถูกบรรจุแยกอนุภาค ซึ่งประกอบด้วย อนุภาคของไวรัสบรรจุ RNA-1 (B), RNA-2 (M) และ RNA-3 (T) โดยอาร์เอ็นเอทั้ง 3 ขึ้นทางด้านปลาย 5' ของสาย RNA จะพบโครงสร้าง m⁷G5'ppp5 (cap) ส่วนด้านปลาย 3' มีโครงสร้าง tRNA-like structure (ภาพที่ 2)

RNA-1 มีจีโนมเป็นแบบ monocistronic มีขนาดความยาว 3,200 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีน 1a ขนาด 109 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย methyl transferase ทำหน้าที่เชื่อมต่อ (capping) บริเวณปลาย 5' RNA ของไวรัส และ เอนไซม์ helicase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัส สำหรับ RNA-2 มีจีโนมเป็นแบบ monocistronic มีขนาดความยาว 2,800 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีน 2a ขนาด 94 กิโลดาลตัน ได้แก่ เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerases ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของไวรัส และ RNA-3 มีจีโนมเป็นแบบ dicistronic มีขนาดความยาว 2,100 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีน 3a ได้แก่ cell-to-cell movement protein และ coat protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งในการเข้าทำลาย ส่วน coat protein จะไม่แปลรหัสจากจีโนม RNA-3 แต่จะสังเคราะห์ subgenomic mRNA หรือ RNA-4 ขึ้นมาใหม่ในการแปลรหัส (Amine and Ahlquist, 2003)



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

ที่มา: Amine และ Ahlquist (2003)

6. พืชอาศัยและลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus*

BMV มีพืชอาศัยส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Graminae ซึ่งมีหลายชนิดที่เป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น อ้อย (*Saccharum officinarum*) ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) และหญ้าอีกหลายชนิด ซึ่งการเข้าทำลายเป็นแบบแพร่กระจายทั่วต้น (systemic) ส่วนพืชอาศัยในวงศ์ Amaranthaceae (*Gomphrena globosa*), Chenopodiaceae (*Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*) ซึ่งการเข้าทำลายเป็นแบบเฉพาะแห่ง (local lesion) (ธีระ, 2532; Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) หรือแพร่กระจายทั่วต้น (Gibson and Kenten, 1978) และ Leguminosae ซึ่งการเข้าทำลายเป็นแบบเฉพาะแห่ง (ธีระ, 2532) หรือแบบแพร่กระจายทั่วทั้งต้น(systemic) (De Jong and Ahlquist, 1995)

บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa*) ปลุกเชื้อเมื่อพืชอายุได้ประมาณ 45 วัน ใบที่ปลุกเชื้อจะแสดงอาการแผลแห้งตาย รูปร่างแผลไม่แน่นอน (necrotic lesion) หลังจากปลุกเชื้อประมาณ 10-14 วัน จากนั้นใบอ่อนที่เจริญออกมา จะแสดงอาการแผลแห้งตายซึ่งแสดงถึงไวรัสแพร่กระจายไปทั่วลำต้นพืช (systemic infection) (ธีระ, 2532)

Chenopodium amaranticolor ใบที่ปลุกเชื้อแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) (Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) จากนั้นอาการจุดแผลจะแพร่กระจายไปทั่วทั้งต้น (Gibson and Kenten, 1978) และอาการจุดแผลเฉพาะแห่งสีน้ำตาล (necrotic local lesion) โดยเริ่มแสดงอาการเป็นจุดน้ำหลังจากปลุกเชื้อประมาณ 4-7 วัน ไม่ปรากฏอาการบนใบอ่อน หรือใบที่ไม่ปลุกเชื้อ (ธีระ, 2532)

C. murale ใบที่ปลุกเชื้อจะแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) (Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) จากนั้นอาการจุดแผลจะแพร่กระจายไปทั่วทั้งต้น (Gibson and Kenten, 1978) และแสดงอาการจุดแผลเฉพาะแห่งสีน้ำตาล (necrotic local lesion) ประมาณ 7-10 วัน หลังจากปลุกเชื้อโดยจะเริ่มเป็นจุดเหลืองซีด ใบอ่อนที่เจริญใหม่และไม่ได้ปลุกเชื้อแสดงอาการเป็นแผลไหม้สีน้ำตาล (systemic necrosis) (ธีระ, 2532)

C. quinoa ใบที่ปลุกเชื้อจะแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) (Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) จากนั้นอาการจุดแผลจะแพร่กระจายไปทั่วทั้งต้น (Gibson and Kenten, 1978) และอาการจุดแผลเฉพาะแห่งสีเหลือง (chlorotic) หลังปลุกเชื้อ 7-10 วัน (ธีระ, 2532)

ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus calcaratus*) ใบที่ปลุกเชื้อแสดงอาการจุดแผลเฉพาะแห่ง (local necrotic lesion) 7-10 วัน หลังปลุกเชื้อ (ธีระ, 2532)

ข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*) แสดงอาการใบด่าง (systemic mosaic) หลังปลุกเชื้อ 7-10 วัน (ธีระ, 2532)

ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) แสดงอาการใบด่างหลังปลุกเชื้อ 7-10 วัน (ธีระ, 2532)

ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) แสดงอาการใบด่างไม่รุนแรง (mild mosaic) หลังปลูกเชื้อ (Plant virus online, 1977) แสดงอาการใบด่าง (systemic mosaic) หลังปลูกเชื้อ 7-10 วัน (ธีระ, 2532)

ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ข้าวฟ่างเมล็ด (grain sorghum) และข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) แสดงอาการคล้ายกัน โดยเริ่มแรก 5-7 วันหลังปลูกเชื้อ ใบอ่อนที่แตกใหม่แสดงอาการเป็นจุดด่างเล็กๆ ในวันต่อมาจุดจะขยายใหญ่ขึ้น และจะขยายมาชนกัน ใบใหม่ที่เจริญตามมาแสดงอาการด่างรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณปลายใบจะขาวซีด ซึ่งมักจะแห้งตาย ใบอื่นๆที่เจริญตามมาภายหลังจะแสดงอาการด่างตลอดทั้งใบ อาการด่างจะรุนแรงมากขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวฟ่าง โดยข้าวฟ่างหวานจะรุนแรงมากที่สุด (ธีระ, 2532)

ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวโพดที่ได้รับการปลูกเชื้อ BMV เมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 7 วัน ปรากฏว่าข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) และ ข้าวโพดหวาน (sweet corn) เป็นโรคประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ โดยจะเริ่มแสดงอาการเป็นจุดสีขาวซีดหลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน จุดจะขยายใหญ่ขึ้น ใบต่อมาจะแสดงอาการด่างอย่างรุนแรงทั้งใบจะด่างเป็นสีขาว เหลือส่วนเขียวเพียงเล็กน้อย ข้าวโพดที่เป็นโรคมักจะตายเกือบทั้งหมด ส่วนข้าวโพดที่ไม่ตายจะแสดงอาการด่าง (mosaic) อย่างรุนแรง ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (flint corn) พันธุ์สุวรรณ 1 และสุวรรณ 2 พืชจะแสดงอาการช้ากว่าโดยจะเริ่มแสดง อาการประมาณ 9-10 วัน หลังปลูกเชื้อ เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคต่ำกว่าข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว โดยจะเป็นโรคประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ ดันที่เป็นโรคมักจะตายโดยแสดงอาการด่างเหมือนกับข้าวโพดข้าวเหนียว และข้าวโพดหวาน (ธีระ, 2532) มีรายงานในข้าวโพดหวานบางพันธุ์หลังปลูกเชื้อ 5 วัน แสดงอาการเป็นขีด (streaks) จากนั้นจะไหม้ (necrosis) และตายหลังปลูกเชื้อ 10 วัน (Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) และแสดงอาการเซลล์ตายแพร่กระจายทั่วทั้งต้น (lethal systemic necrosis) (Gibson and Kenten, 1978)

อ้อย (*Saccharum officinarum*) แสดงอาการใบด่างเป็นแถบสีเหลืองซีด หรือขาว ขนาดใหญ่ยาวไปตามความยาวของใบ (ธีระ, 2532)

หญ้าขนเล็ก (*Brachiaria* sp.) แสดงอาการใบด่าง (systemic mosaic) หลังจากปลูกเชื้อ 10-15 วัน เป็นพืชที่พบว่าเป็นโรคได้ทั่วไปในธรรมชาติ (ธีระ, 2532)

หญ้านกสีชมพู (*Echinochloa colonum*) แสดงอาการใบด่างเป็นแถบสีขาวขนาดใหญ่ หลังปลูกเชื้อประมาณ 7-10 วัน เป็นพืชที่พบโรคได้ในธรรมชาติ (ธีระ, 2532)

หญ้าไย่ง (*Rottboellia exaltata*) แสดงอาการใบด่าง (systemic mosaic) หลังปลูกเชื้อ 14-17 วัน (ธีระ, 2532)

หญ้าชูดาน (*Sorghum sudanense*) พืชจะแสดงอาการใบด่างคล้ายกับ *S. bicolor* แต่รุนแรงน้อยกว่า โดยเริ่มแสดงอาการหลังปลูกเชื้อ 7-10 วัน (ธีระ, 2532)

ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) เป็นพืชที่พบโรคในธรรมชาติ แสดงอาการใบด่างเป็นแถบสีขาวคล้ายอาการที่เกิดขึ้นกับอ้อย (ธีระ, 2532)

7. เทคนิคในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ BMV

การตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไวรัส BMV โดยใช้เทคนิคเบื้องต้นในการวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไวรัส การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะทรงกลม (isometric) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 26 นาโนเมตร (Anderegg *et al.*, 1963; ICTVdB management, 2002) และตรงกลางอนุภาคมีช่องว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นาโนเมตร (Anderegg *et al.*, 1963) และทวิศักดิ์ (2528) รายงานพบลักษณะอนุภาคไวรัสแบบทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 27 นาโนเมตร และอนุภาคมีช่องว่าง (hollow) ตรงกลาง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นาโนเมตร จากอ้อยที่เป็นโรคใบด่างแถบขาวในประเทศไทย นอกจากนี้มีรายงานพบเชื้อ BMV-E (English strain) แยกได้จาก *Phleum bertolonii* พบลักษณะอนุภาคไวรัสทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 นาโนเมตร (Gibson and Kenten, 1978) การปลูกเชื้อลงในพืชทดสอบ (bioassay) อาจทำได้โดยวิธีกล (mechanical inoculation) ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa*), ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus calcaratus*) *Chenopodium amaranticolor* และ *C. quinoa* เป็นพืชทดสอบแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) และ *C. murale* ใบอ่อนแสดงอาการแผลไหม้สีน้ำตาล (ธีระ, 2532) นอกจากนี้มีรายงานว่า *Chenopodium* spp. แสดงอาการแผลจุดจากนั้นจะแพร่กระจายไปทั่วต้น (Gibson and Kenten, 1978) และในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น อ้อย ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ และหญ้าอีกหลายชนิด ซึ่งการเข้าทำลายเป็นแบบแพร่กระจาย (systemic) (ธีระ, 2532; Gibson and Kenten, 1978; ICTVdB management, 2002; Plant virus online, 1977) เทคนิคทางชีววิทยาเป็นการใช้คุณสมบัติโปรตีน

ของไวรัส มีการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับ *Cowpea chlorotic mottle virus* (Scott and Slack, 1971) มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของ สายพันธุ์ BMV-E กับ BMV-A ด้วยวิธี gel diffusion (Gibson and Kenten, 1978) ตรวจพบเชื้อไวรัส BMV จากพืชอาศัยในธรรมชาติ ด้วยเทคนิค ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Edwards *et al.*, 1983) และเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในการศึกษา Ahlquist และคณะ (1981) รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของ RNA-3 ของเชื้อ BMV และมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ mRNAs ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ของเชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) และ *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) (Dasgupta and Kaesberg, 1981) นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อ BMV-ATCC66 strain จากประเทศญี่ปุ่น เกิดการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ AA เบสที่ 3 กับ 4 จากทางด้านหน้า ของตำแหน่ง start codon ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคซึ่งทำให้สายพันธุ์นี้มีโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค 2 ชนิด ตรงกันข้ามกับ สายพันธุ์ Russain strain (BMV-R) (Mise *et al.*, 1992)

นอกจากนี้มีการศึกษาโดยนำ RNA-1 และ RNA-2 ที่ได้จาก *Brome mosaic virus* และ RNA-3 ที่ได้จาก *Cowpea chlorotic mottle virus* ซึ่งเป็นลูกผสมที่สามารถอยู่รอดได้นั้น แต่มีการเพิ่มปริมาณอย่างช้าๆ และมีพืชอาศัยแคบลง (Bancroft, 1972) ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ ส่วนคุณสมบัติที่มีความคล้ายคลึงทางกายภาพ และองค์ประกอบอะมิโนแอซิดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค พบว่า *Brome mosaic virus* มีความสัมพันธ์กับ *Broad bean mottle viruses*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อ *Brome mosaic virus*

สำรวจและเก็บข้าวโพดที่มีลักษณะอาการใบด่างแบบต่างๆ จากแหล่งปลูกข้าวโพดจำนวน 20 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สระบุรี ลพบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ เชียงราย สุโขทัย พิษณุโลก เพชรบูรณ์ สระแก้ว ศรีสะเกษ ขอนแก่น หนองคาย เลย นครสวรรค์ ตาก และ สุพรรณบุรี โดยการสำรวจ ในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว

จากนั้นนำตัวอย่างที่แสดงอาการดังกล่าวมาตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาต่อเชื้อ BMV ด้วยวิธี Indirect ELISA ตามขั้นตอนวิธีการของ รัชนี (2545) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อเชื้อ BMV ที่ก่อให้เกิดโรคในอ้อย (BMV-SC) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ทำการบดตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการโรคด้วย carbonate coating buffer, pH 9.6 อัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หยคน้ำคั้นพืชที่ได้ลงใน หลุมของ ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (phosphate buffer saline ที่ผสม 0.05% tween 20, PBST) หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเติม blocking solution (PBS ที่ผสม 1% bovine serum albumin หรือ 2% skim milk) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม primary antibody ได้แก่ anti-BMV PAb ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:1,000 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม goat anti-rabbit conjugate (GAR) ที่เจือจางใน PBS อัตราส่วน 1:10,000 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 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 reader (LabSystem รุ่น Multiscan EX) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และนำตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกมาทำการแยกเชื้อต่อไป

2. การแยกเชื้อ และการเพิ่มปริมาณเชื้อ BMV

การแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นบวก มาปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลบนใบพืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor* ที่มีอายุ 1 เดือนหลังเพาะเมล็ด ซึ่งเป็นพืชอาศัยที่แสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง โดยบดใบข้าวโพดในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราส่วน 1: 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโกร่งที่นิ่งฆ่าเชื้อและแช่เย็น เติมน้ำคาร์บอนดำในน้ำคั้น ผสมให้เข้ากัน แล้วท้าน้ำคั้นที่ได้ลงบนใบพืชให้ทั่วทั้งใบทิ้งไว้ 5 นาที ล้างใบ เมื่อพืชแสดงอาการ แยกจุดแผลแต่ละจุดนำมาบดในบัฟเฟอร์แล้วนำกลับไปปลูกเชื้อบนข้าวโพดหวาน ที่มีใบจริง 3-4 ใบ หรือ อายุ 7-10 วัน หลังจากเพาะเมล็ด โดยพืชชนิดนี้จะแสดงอาการแพร่กระจาย (systemic) เมื่อพืชแสดงอาการหรือหลังทำการปลูกเชื้อ 7 วัน ตรวจยืนยันผลด้วยวิธี indirect ELISA อีกครั้ง และเก็บเชื้อไว้ในข้าวโพดในสภาพโรงเรือนกันแมลง เพื่อไว้ใช้ทดลองต่อไป

3. การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

3.1 วิธีการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

ปลูกเชื้อ BMV จากใบ *C. amaranticolor* ที่แสดงอาการแผลจุดลงบนข้าวโพดหวานด้วยวิธีกล หลังจากข้าวโพดหวานแสดงอาการใบด่างทั่วทั้งต้นประมาณ 2 สัปดาห์ จึงนำไปแยกไวรัสบริสุทธิ์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Plant virus online (1977) และ Bujarski (1998) นำใบข้าวโพดที่แสดงอาการด่าง มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง ตัดเป็นชิ้นขนาด 2 ตารางเซนติเมตร นำมาบดใน blender ที่แช่เย็นไว้แล้ว โดยใช้ 0.5 M Sodium acetate buffer pH 4.5 (ปรับ pH ด้วย acetic acid) ที่ผสม 0.2 % 2-mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1: 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บดให้ละเอียด แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางหนึ่งผืน 4 ชั้น วัดปริมาณน้ำคั้นที่ได้ แล้วเติม chloroform ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักพืช 1 กรัม นำมาทวนที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000X g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้ chloroform แยกชั้น นำส่วนน้ำใสด้านบนที่ได้มากรองผ่านกระดาษ miracloth 3 ชั้น วัดปริมาณน้ำใสที่ได้ แล้วเติม 6% polyethylene glycol M.Wt 6000 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาทวนที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000X g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน storage buffer pH 5.0 (50 mM sodium acetate, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM magnesium chloride, 0.1M acetic acid, pH 5.0) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักพืช 1 กรัม เติมน้ำ chloroform ปริมาตร 0.4

มิลลิลิตรของปริมาตรสารละลายไวรัสที่ได้ นำมาทอนที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000X g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำน้ำส่วนใสด้านบนที่ได้มาวัดปริมาตร แล้วเติม 6% polyethylene glycol M.Wt 6000 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ 5 M NaCl ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายไวรัสที่ได้ นำมาทอนที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000X g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน storage buffer pH 5.0 ปริมาตร 1/50 เท่าของปริมาตรน้ำคั้นเริ่มต้น จากนั้นนำสารละลายไวรัสที่ได้ไป dialysis ใน storage buffer pH 5.0 เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์จำนวน 3 ครั้ง นำสารแขวนลอยไวรัสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ กำหนดความเข้มข้นของไวรัสและความบริสุทธิ์ของเชื้อที่ได้จากค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสง ดังนี้

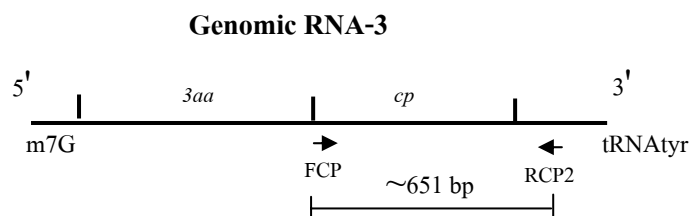
$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของไวรัส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} &= A_{260}/E_{260}^{0.1\%} \\ \text{[ค่า } E_{260}^{0.1\%} \text{ ของเชื้อ BMV มีค่าเท่ากับ 5.15 (Bockstahler and Kaesberg, 1962)]} \\ \text{ค่าสัดส่วนดูดกลืนแสง} &= A_{260}/A_{280} \\ \text{[ความบริสุทธิ์ของเชื้อ BMV มีค่าเท่ากับ 1.75 (Lane, unpublished data)]} \end{aligned}$$

3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ Purified BMV โดยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

โดยนำไวรัส บริสุทธิ์เจือจางด้วย PBS อัตราส่วน 1:10 ปริมาตร ผสมกับ 2x loading dye (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 16% glycerol และ 5% 2-mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 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 10 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยมี molecular weight marker ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ย้อมสีเจลด้วย 0.2% coomassie brilliant blue R-250 ล้างเจลด้วย destaining solution จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่เจลในน้ำ (Sambrooke and Russell, 2001)

4. ไพรมเมอร์ (primers)

ออกแบบไพรมเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ BMV จากฐานข้อมูล GenBank เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากโปรแกรม Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustal W>) จากนั้นทำการออกแบบไพรมเมอร์ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาลำดับเบสและตำแหน่งของ นิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Oligonucleotide properties ไพรมเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ได้แก่ FCP forward 5' ATG TCG ACT TCA GGA ACT GGT AAG ATG 3' และ RCP2 reverse 5' GTG TCC TAC CTG GAC AGG GTC 3' (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ภาพจำลองแสดงตำแหน่งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (CP gene) ของเชื้อ BMV รวมทั้งการแสดงตำแหน่งของคู่ไพรมเมอร์ครอบคลุมยีนโดยมีคู่ไพรมเมอร์ FCP กับ RCP2 ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 (ตามตำแหน่งลูกศร)

5. การแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากอนุภาคไวรัสและสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

แยกอาร์เอ็นเอจากอนุภาคไวรัส BMV ดัดแปลงตามวิธีการของ Bujarski (1998) โดยนำสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) ใส่หลอดไมโครทิวป์ เติม 10% SDS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วเติม 10X RNA extraction (0.5M glycine, 0.5M sodium chloride, 0.1M EDTA, pH 9.0) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติม phenol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ เติม phenol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติม chloroform ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ เติม chloroform ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่

แล้วเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย พลิกหลอดไปมา 5-6 ครั้ง บ่มบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอนและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและล้างตะกอนอีกครั้ง เทส่วนน้ำใสทิ้งและซับปากหลอดให้แห้ง ตากตะกอนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วย DEPC-treated water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ตรวจสอบขนาดของแถบอาร์เอ็นเอของไวรัสด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1% SDS (60 °C) ล้างแท่งค์ เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตรวจสอบขนาดของแถบอาร์เอ็นเอบน 1% อะกาโรส เจล ใน 0.5X TBE buffer (44.5 mM Tris base, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide solution (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจแถบอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene®) และบันทึกภาพ (Bujarski, 1998) แล้วเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR ในขั้นตอนต่อไป

สังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ของอนุภาคไวรัส ด้วยวิธี Reverse transcription (RT) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ อาร์เอ็นเอที่แยกได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ RCP2 (เข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เพื่อสังเคราะห์เส้นลบทางด้านปลาย 3' ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค แล้วเติม DEPC-treated water ปริมาตร 9.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler, MJ Research PTC-100) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 5X RT buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม เอนไซม์ reverse transcriptase (เข้มข้น 200 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที และ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV จาก cDNA จากปฏิกิริยา RT ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เป็นต้นแบบ (template) ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 25mM

MgCl₂ ปริมาตร 1.28 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ FCP และ RCP2 (เข้มข้น 100 พิโกโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตรละ 0.16 ไมโครลิตร 10mM dNTPs ปริมาตร 1 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร (เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) และ DEPC-treated water ปริมาตร 14.15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่ม ปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denaturing) ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) และขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension) จำนวน 35 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้น สมบูรณ์ นำมาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรส เจล ใน 0.5X TBE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide solution (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า ก่อนนำไปตรวจแถบอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene®) และบันทึกภาพ แล้วเก็บสารละลาย

6. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

6.1 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์สำหรับเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ

การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา RT-PCR มาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ตามวิธี Wizard® SV Gel (Promega) สำหรับเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ (vector) โดยแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรส เจล ใน 0.5 X TBE buffer ทำการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายออกจากเจล โดยตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม membrane binding solution ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายสมบูรณ์ จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอดลงในหลอด minicolumn assembly ซึ่งประกอบด้วย SV column วางบน collection tube แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสที่ไหลผ่าน minicolumn ซึ่งอยู่ใน collection tube ทิ้งไป และนำกลับมาประกอบกันอีกครั้ง เติม membrane wash solution ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน

minicolumn assembly จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสที่ไหลผ่าน minicolumn ซึ่งอยู่ใน collection tube ทิ้งไปและนำกลับมาประกอบกันอีกครั้ง เติม membrane wash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน minicolumn assembly จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นย้าย SV minicolumn มาวางบนหลอดไมโครทิวป์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เอทานอลที่หลงเหลืออยู่ระเหยหมด เติม DEPC-treated water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรส เจล แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ใน -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้งานต่อไป

ทำการเชื่อมต่อแถบดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เข้าสู่พาหะ pGEM[®]-T Easy (Promega corporation, Wisconsim, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตในคู่มือ ดังนี้ 2X T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร pGEM[®]-T easy vector (50 นาโนกรัม) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR (เข้มข้น 30 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (เข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นนิ่งมาเพื่อให้ครบปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันนำหลอดปฏิกิริยาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

6.2 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การบรรจุพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) นำสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอดไมโครทิวป์ ที่มีเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α (competent cell) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมาเบาๆ แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จุ่มน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำกลับมาแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ทิ้งอาหารเหลว แล้วเติมอาหาร LB ใหม่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำสารละลายมาเกลี่ยบนอาหาร LB agar ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แล้ว

เติมสารประกอบ X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosides) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน dimethylformamide ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (isopropyl thio- β -D-galactosides) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

6.3 การคัดเลือกโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

คัดเลือกโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม และโคโลนีสีฟ้าที่เป็นเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเพื่อใช้เปรียบเทียบขนาด โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมที่อบฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนี แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น master plate

6.4 การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

การแยกสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ *E. coli* ด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook and Russell, 2001) โดยการใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมฆ่าเชื้อแตะโคโลนีจาก master plate ใส่หลอดไมโครทิวป์ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย solution I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixture จากนั้นเติม solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นลง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย solution III (3M CH_3COOK , 0.2M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture แล้วแช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแยกเซลล์และดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่เสียสภาพออกจากสารละลายพลาสมิดด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนพลาสมิด ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ตก

ตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสมของ PCI mixture (Phenol :Chloroform :Isopropanol; 25:24:1) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixture แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เท 70% ethanolทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของพลาสมิดถูกผสมที่แยกได้ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรส เจล

6.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม ด้วยวิธีการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิด 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *EcoRI* 1 ไมโครลิตร 10X *EcoRI* 1 ไมโครลิตร เติมน้ำหนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์และทิศทางของ DNA insert ด้วยวิธี PCR โดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเป็นต้นแบบในปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.28 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ FCP และ RCP2 (เข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตรละ 0.16 ไมโครลิตร 10mM dNTPs ปริมาตร 1 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร (2 ยูนิตต่อไมโครลิตร) และ DEPC-treated water ปริมาตร 14.15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denaturing) ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) และขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension) จำนวน 35 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์ นำมาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรส เจล

7. การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

นำแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ต้องการมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำการแยกสกัดพลาสมิดสายผสมออก ตามวิธีการของ QIAGEN Miniprep plasmid purification และทำการตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรส เจล และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ด้วยวิธี dideoxy-chain termination และจัดการข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วย Computer analysis ได้แก่

- (1) ตัดขึ้นดีเอ็นเอพาหะออกจากดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยโปรแกรม Vec screen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- (2) ตรวจสอบตำแหน่งของข้อมูลดีเอ็นเอเป้าหมายกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อเปรียบเทียบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด ในการจัดจำแนกชนิดของไวรัส
- (3) วิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอของไวรัสโดยตรงด้วยโปรแกรม DNA star
- (4) แปลรหัสเป็นโปรตีนจากข้อมูลดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยโปรแกรม DNA star เลือกใช้ translate DNA
- (5) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม Sequence Analysis เลือกใช้ Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk>)
- (6) แสดงความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอของไวรัสที่มีรายงานมาก่อน ด้วยโปรแกรม Mega Version 4.0

8. ศึกษาความรุนแรงของเชื้อ BMV

ทดสอบความรุนแรงของเชื้อ BMV บนข้าวโพด 5 ชนิด ประกอบด้วย ข้าวโพดไร่ พันธุ์ สุวรรณ 5 ข้าวโพดหวาน พันธุ์ ไฮบริด 3 ข้าวโพดฝักอ่อน พันธุ์ SG 17 ข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์ ลำลืออีสาน และข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง โดยการปลูกเชื้อลงบนข้าวโพดด้วยวิธีกล

(1) ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคของข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์ต้นที่เป็นโรค ตรวจสอบต้นที่เป็นโรคหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกผลที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ สำหรับปลูกเชื้อไวรัส 1 ชุด และใช้เป็นพืชเปรียบเทียบ (control) อีก 1 ชุด จำนวน 100 ต้นต่อพันธุ์สำหรับปลูกเชื้อ และ 100 ต้นต่อพันธุ์เป็นพืชเปรียบเทียบที่ไม่ปลูกเชื้อ ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

(2) ศึกษาการพัฒนาอาการของข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ โดยตรวจดูอาการที่เกิดขึ้นหลังการปลูกเชื้อที่ปรากฏบนข้าวโพดแต่ละพันธุ์อย่างละเอียดทุกวันจนถึงระยะข้าวโพดติดฝักเปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ เพื่อให้ทราบถึงช่วงเวลาที่พืชเริ่มแสดงอาการโรค และการพัฒนาอาการของโรค ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง และทำการตรวจหาเชื้อ BMV ในส่วนต่างๆ ของข้าวโพด ประกอบด้วย ราก ใบ เปลือกหุ้มฝัก ไหม (silk) เมล็ดข้าวโพด และอับละอองเกสร เปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ ด้วยวิธี indirect ELISA

9. ศึกษาลักษณะอาการบนพืชทดสอบ (bioassay)

โดยศึกษาความสามารถของเชื้อ BMV ในการทำให้พืชทดสอบแสดงอาการโรค โดยปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกล ลงบนพืชทดสอบ 5 วงศ์ รวม 18 ชนิด ประกอบด้วย วงศ์ Chenopodiaceae ได้แก่ *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* วงศ์ Solanaceae ได้แก่ ยาสูบ *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana* วงศ์ Leguminosae ได้แก่ ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis*) ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* var. *unguiculata*) วงศ์ Cucurbitaceae ได้แก่ แตงกวา (*Cucumis sativus*) ฟักทอง (*Cucurbita maxima*) และวงศ์ Gramineae ได้แก่ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) 2 สายคือ พันธุ์ UT 423B, UT 325B ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ FN และพันธุ์ SMG และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ อินทรี 1 อินทรี 2 สุวรรณ 56 และ 171 ตรวจสอบที่อาการโรคหลังปลูกเชื้อทุกวันเพื่อให้ทราบถึงช่วงเวลาที่พืชเริ่มแสดงอาการโรค และการพัฒนาอาการของโรคบนพืชเป็นระยะเวลา 1

เดือน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ พืชทดสอบ 5 ต้นต่อชนิดสำหรับปลูกเชื้อ และ 5 ต้นใช้เป็นพืชเปรียบเทียบ (control) ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง นอกจากนี้ทำการตรวจหาเชื้อ BMV บนพืชทดสอบแต่ละชนิดหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ด้วยวิธี indirect ELISA เปรียบเทียบกับพืชปกติ

10. การผลิตและการตรวจสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ BMV

10.1 การตรวจหาอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

หยดเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ใช้ปากคีบจับกริดคว่ำด้านที่เคลือบฟอรั่มวและคาร์บอนทำลายประจุให้สัมผัสกับไวรัสบริสุทธิ์นาน 1-2 นาที คีบกริดขึ้นมาล้างด้วยหยดน้ำกลั่นที่สะอาดผ่านแผ่นกริด ใช้กระดาษกรองซับสารส่วนเกินออก จากนั้นย้อมด้วยสารย้อมสี 2% uranyl acetate (UA) นาน 1 นาที ใช้กระดาษกรองซับสีส่วนเกินออก หยดน้ำกลั่นที่สะอาดผ่านแผ่นกริด ซับให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (JEOL JEM-1230)

10.2 การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง และเก็บแอนติซีรัม

ผลิต polyclonal antibody ต่อเชื้อ BMV (PAb-BMV) (รัชนี, 2545) โดยนำสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ ฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างภูมิคุ้มกัน โดยใช้กระต่าย สายพันธุ์ New Zealand white อายุประมาณ 3 เดือน ก่อนการกระตุ้น เก็บ normal serum โดยเข็ดหลังไขหวัดด้วย 70% ethanol และ เจาะเลือดปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อใช้เปรียบเทียบปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป เตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยไวรัสบริสุทธิ์ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ใน Complete Freund's Adjuvant (CFA) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันจนเป็น emulsion ฉีดกระตุ้นด้วยวิธี subcutaneous injection (SC) บริเวณต้นคอด้านหลัง เว้นระยะห่างหนึ่งสัปดาห์จึงกระตุ้นภูมิซ้ำ เตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดครั้งที่ 2 ผสมไวรัสบริสุทธิ์ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ใน Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) จากนั้น 1 สัปดาห์ เจาะเลือดใส่บีกเกอร์ปลอดเชื้อเพื่อเก็บแอนติซีรัม ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ นาน 5 สัปดาห์ แต่ละครั้งจะแยกแอนติซีรัมจากเม็ดเลือดโดยวางเลือดในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติซีรัมซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนในขวดซีรัมโดยเติม NaN_3 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2% โดยปริมาตร เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เก็บแอนติซีรัมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.3 การตรวจสอบค่าไตเตอร์

ตรวจสอบค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ BMV ด้วยวิธี indirect ELISA เพื่อหาค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของค่า A_{405} ของพืชปกติ) โดยใช้แอนติซีรัมแต่ละครั้งที่เก็บได้ทำปฏิกิริยากับไวรัสบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน carbonate coating buffer, pH 9.6 เป็นแอนติเจนสำหรับหยดลงในหลุม ELISA plate โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมแต่ละครั้งที่เก็บได้แบบ 2-fold dilutions เริ่มจากความเข้มข้น 1:200 ถึง 1:819,200 เพื่อใช้เป็น primary antibody และ Goat anti rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase เป็น secondary antibody เปรียบเทียบกับ normal serum

10.4 การหาค่าเจือจางที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ BMV ในพืชเป็นโรค

เลือกแอนติซีรัมครั้งที่มีค่าไตเตอร์สูงสุดมาใช้ในการทดสอบโดยตรวจสอบค่าความเจือจางที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ BMV ในน้ำคั้นข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ (Positive control) เปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ (Negative control) ด้วยวิธี indirect ELISA นำมาคำนวณค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ของแต่ละความเจือจางและเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) เพื่อเลือกค่าการเจือจางของ PAb-BMV ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาซึ่งให้ค่า A_{405} ที่ดีที่สุด ค่า S/N ratio (Locarnini *et al.*, 1979) โดยคำนวณได้จาก

$$\text{ค่า S/N ratio} = A_{405} \text{ ของ Positive control} / \text{ค่า } A_{405} \text{ ของ Negative control}$$

10.5 ศึกษาความจำเพาะของแอนติซีรัมในการตรวจสอบเชื้อ BMV

ทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม ที่ค่าความเจือจางที่เหมาะสม (ข้อ 10.4) ด้วยวิธี indirect ELISA โดยพืชเป็นโรคที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ BMV ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV (*Sugarcane mosaic virus*) MCMV (*Maize chlorotic mottle virus*) และ SCMV-MDB (*Sugarcane mosaic virus*-MDB) อ้อยที่เป็นโรคในสภาพแปลงธรรมชาติจากเชื้อ BMV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และ ยาสูบ (*Nicotiana glutinosa*) ที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ CMV (*Cucumber mosaic virus*) ได้รับ

ความอนุเคราะห์จาก คุณภูวนารถ มณีโชติ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ตามลำดับ โดย
 เจือจางตัวอย่างใน carbonate coating buffer, pH 9.6 อัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

10.6 การศึกษาความไว (sensitivity) ของแอนติซีรัม ด้วยวิธี indirect ELISA

นำไวรัสบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 100 นาโนกรัม
 ต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางแบบ 10- fold dilution และเจือจางแบบ 2-fold dilution จาก 100 นาโนกรัม
 ต่อมิลลิลิตร ถึง 0.156 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่มีความเจือจาง
 เหมาะสม

ผลและวิจารณ์

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อ BMV

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างแบบต่างๆ จากแหล่งปลูกข้าวโพดจำนวน 20 จังหวัด พบว่าตัวอย่างข้าวโพดที่ทำปฏิกิริยาให้ผลบวกกับแอนติบอดี BMV-SC มีเพียง 2 จังหวัด คือ จังหวัดราชบุรี และ กาญจนบุรี ซึ่งตัวอย่างข้าวโพดทั้ง 2 จังหวัด ที่ตรวจพบเป็นข้าวโพดฝักอ่อนจะแสดงอาการจุดสีขีด และมีอาการด่างทั่วใบร่วมด้วย (ภาพที่ 4) คิดเป็น 0.98% ของตัวอย่างข้าวโพดทั้งหมดที่ทำการสุ่มมาตรวจสอบ (ตารางที่ 1) โดยแปลงข้าวโพดทั้ง 2 จังหวัดที่ตรวจพบเชื้ออยู่ติดกับไร่อ้อย อาจเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจมาจากอ้อย ซึ่งในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อชนิดนี้ครั้งแรกบนอ้อย ที่จังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม (ธีระ, 2532)



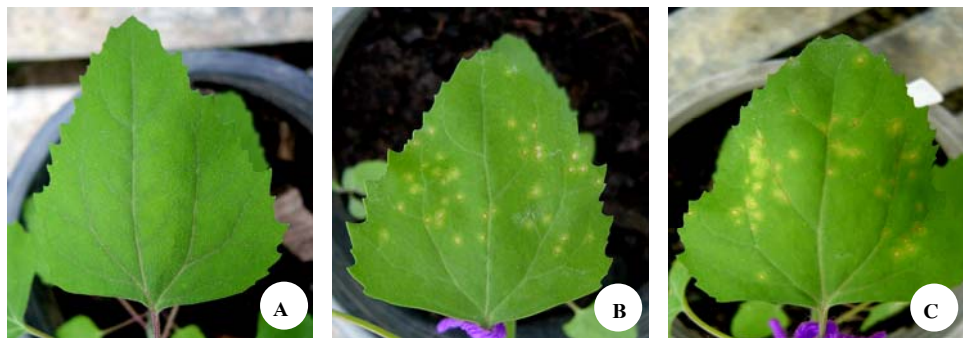
ภาพที่ 4 ข้าวโพดฝักอ่อนแสดงอาการจุดสีขีด และมีอาการด่างทั่วใบร่วมด้วย ทำปฏิกิริยาให้ผลบวกกับแอนติบอดี BMV-SC จากการตรวจด้วยวิธี indirect ELISA

ตารางที่ 1 ผลการตรวจเชื้อ BMV ในข้าวโพดด้วยเทคนิค indirect ELISA ของตัวอย่างข้าวโพด
จาก 20 จังหวัด

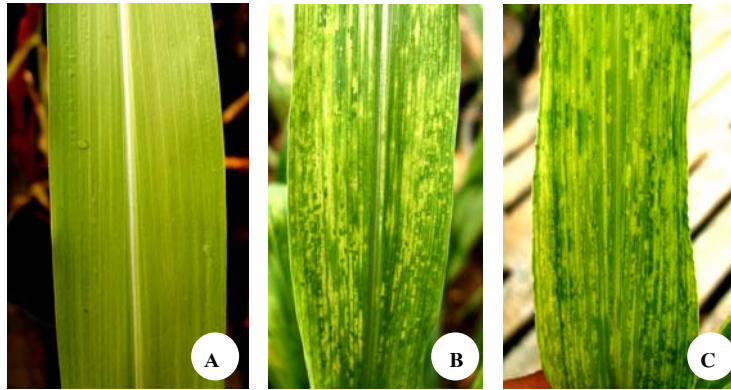
จังหวัด	ผลของปฏิกิริยาต่อแอนติซีรัม BMV-SC				
	ข้าวโพด ไร่	ข้าวโพด หวาน	ข้าวโพด ฝักอ่อน	ข้าวโพด ข้าวเหนียว	ใบที่ตรวจพบเชื้อ/ ใบที่ตรวจสอบ
นครราชสีมา (NM)	9	-	-	-	0/9
นครปฐม (NP)	-	5	6	-	0/11
กาญจนบุรี (KB)	-	-	5	-	2/5
ราชบุรี (RB)	-	-	13	-	1/13
สระบุรี (SB)	-	5	-	6	0/11
ลพบุรี (LB)	-	-	-	4	0/4
กำแพงเพชร (KP)	14	20	-	-	0/34
เชียงใหม่ (CM)	-	3	-	-	0/3
เชียงราย (CR)	-	6	-	-	0/6
สุโขทัย (ST)	9	10	-	-	0/19
พิษณุโลก (PL)	24	7	-	-	0/31
เพชรบูรณ์ (PB)	9	10	-	5	0/24
สระแก้ว (SK)	10	21	-	-	0/31
ศรีสะเกษ (SS)	5	-	-	-	0/5
ขอนแก่น (KK)	-	-	-	20	0/20
หนองคาย (NK)	-	-	-	9	0/9
เลย (LL)	-	-	-	11	0/11
นครสวรรค์ (NW)	21	-	-	-	0/21
ตาก (TK)	5	11	-	-	0/16
สุพรรณบุรี (SP)	3	21	-	-	0/24
Total	109	119	24	55	3/307
BMV infected sample					0.98%

2. การแยกเชื้อ และการเพิ่มปริมาณเชื้อ BMV

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง 2 ไอโซเลท คือ จังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) มาแยกเชื้อด้วยวิธีกลดบน *Chenopodium amaranticolor* ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 5 วัน ปรากฏอาการจุดสีเหลืองเข้มมีสีเหลืองอ่อนล้อมรอบ ไม่แสดงอาการที่ใบอ่อน (ภาพที่ 5) สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ว่า ใบที่ปลูกเชื้อแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) (ธีระ, 2532; Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) จากนั้นแยกแต่ละจุดมาปลูกเชื้อ หรือเพิ่มปริมาณไวรัสบนข้าวโพดหวาน พบว่าภายหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ทั้ง 2 ไอโซเลทแสดงอาการต่างเป็นแถบสีขาว (white stripes) เชื่อมกันตามแนวเส้นใบ และเหลือส่วนเขียวเล็กน้อย (ภาพที่ 6) สอดคล้องกับที่ ธีระ (2532) รายงานไว้ในข้าวโพดหวานที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการต่างอย่างรุนแรงทั้งใบจะด่างเป็นสีขาว เหลือส่วนเขียวเพียงเล็กน้อย หลังทำการปลูกเชื้อประมาณ 7 วัน ข้าวโพดที่เป็นโรคมักจะตายเกือบทั้งหมด ส่วนข้าวโพดที่ไม่ตายจะแสดงอาการต่างอย่างรุนแรง และมีรายงานไว้ในข้าวโพดหวานบางพันธุ์หลังการปลูกเชื้อ 5 วัน จะแสดงอาการด่างเป็นขีด (streak) จากนั้นจะพัฒนาเป็นแผลไหม้ (necrosis) และตายภายใน 10 วันหลังปลูกเชื้อ (Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) และเมื่อนำข้าวโพดเป็นโรคหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน มาตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าข้าวโพดทั้ง 2 ไอโซเลทให้ปฏิกิริยาเป็นผลบวกกับแอนติบอดีต่อ BMV-SC จากนั้นเก็บเชื้อไว้ในข้าวโพดในสภาพโรงเรือนกันแมลงเพื่อไว้ใช้งานต่อไป



ภาพที่ 5 *Chenopodium amaranticolor* แสดงอาการจุดสีเหลืองเข้มมีสีเหลืองอ่อนล้อมรอบหลังปลูกเชื้อ 5 วัน จากเชื้อไอโซเลท BMV-RB (B) และ ไอโซเลท BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับใบปกติ (A)

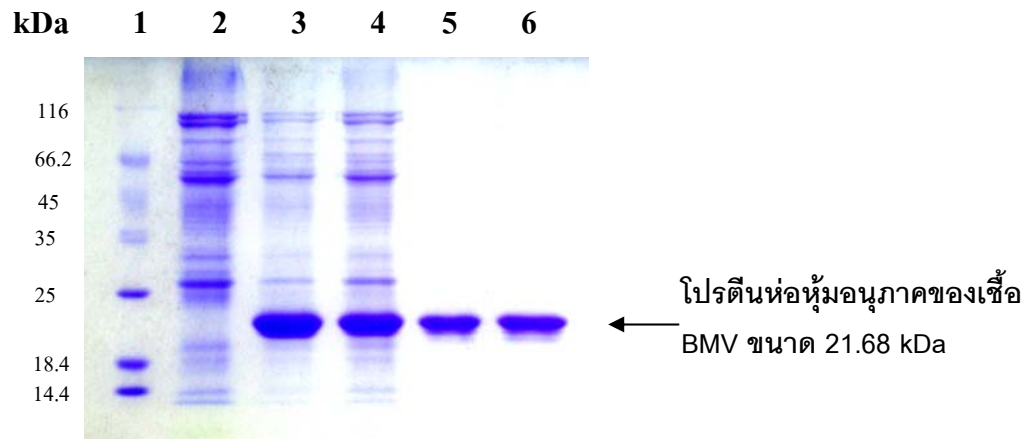


ภาพที่ 6 ข้าวโพดหวานแสดงอาการต่างเป็นแถบสีขาว เชื่อมกันตามแนวเส้นใบหลังปลูกเชื้อ 7-14 วัน จากเชื้อ ไอโซเลต BMV-RB (B) และไอโซเลต BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับ ใบปกติ (A)

3. การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

เมื่อนำข้าวโพดหวานทั้ง 2 ไอโซเลต ที่แสดงอาการของโรค และยืนยันผลด้วยเทคนิคทาง ชีววิทยา มาเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ พบว่าได้สารแขวนลอยไวรัส สีขาวขุ่น เมื่อวัดความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณ พบว่า ได้ไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์จากไอโซเลต BMV-RB และไอโซเลต BMV-KB ที่ความเข้มข้น 0.5725 และ 0.3584 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืช 1 กรัม และค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.63 และ 1.608 ตามลำดับ ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ที่ได้ใกล้เคียงกับ ไวรัส BMV บริสุทธิ์มาตรฐานที่ 1.75 (Lane, unpublished data) และเมื่อนำไวรัสบริสุทธิ์ทั้ง 2 ไอโซเลต กลับไปปลูกเชื้อลงในข้าวโพดหวาน พบว่าสามารถทำให้ข้าวโพดหวานเป็นโรคได้

เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ BMV จากสารแขวนลอยไวรัสทั้ง 2 ไอโซเลต ด้วย เทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนจากตัวอย่างน้ำคั้นพืช เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ BMV และไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวในน้ำคั้นพืชปกติ แสดงว่าเชื้อไวรัส ที่เตรียมได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง และ น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ที่ได้จากการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ โปรตีนของเชื้อไวรัส BMV ในเจล พบว่าแถบโปรตีนของเชื้อไวรัสมีขนาดประมาณ 21.68 กิโลดาลตัน โดยเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้น ($R^2 = 0.982$) (ภาพที่ 7)



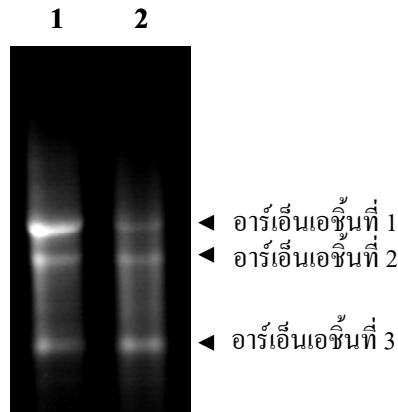
ภาพที่ 7 การวิเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ด้วยวิธี SDS-PAGE

ช่องที่ 1	โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas, SM0431)
ช่องที่ 2	ข้าวโพดปกติ
ช่องที่ 3	ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ BMV-RB
ช่องที่ 4	ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ BMV-KB
ช่องที่ 5	เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ไอโซเลท BMV-RB
ช่องที่ 6	เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ไอโซเลท BMV-KB

4. การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

นำไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ของเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท มาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบแถบอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าให้แถบอาร์เอ็นเอ 3 ชั้น สอดคล้องกับที่มีรายงานว่าจีโนมของเชื้อ BMV เป็นแบบ multipartite ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ 3 ชิ้น (RNA-1, RNA-2 และ RNA-3) (ICTVdB management, 2002; Amine and Ahlquist, 2003) (ภาพที่ 8)

นำอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากอนุภาคไวรัสของเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท มาสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ ได้แก่ FCP กับ RCP2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส (ภาพที่ 9) นำแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้ง 2 ไอโซเลท ที่สังเคราะห์ได้ มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM®-T Easy (Promega Corporation) จะได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมแล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมขนาดประมาณ 651 คู่เบส จากนั้นนำโคลนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

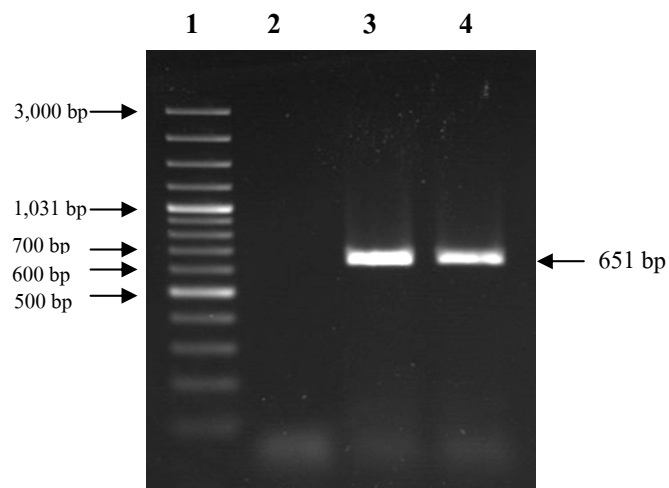


ภาพที่ 8 แถบอาร์เอ็นเอจำนวน 3 ชิ้น จากการแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากอนุภาคของเชื้อ BMV

ตรวจสอบแถบอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1 % อะกาโรส เจล

ช่องที่ 1 = เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ไอโซเลต BMV-RB

ช่องที่ 2 = เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ไอโซเลต BMV-KB



ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 651 คู่เบส (ลูกศรชี้) จากการสังเคราะห์อินโปรตีนห่อหุ้ม

อนุภาคของเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FCP กับ RCP2 และ

ตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1 % อะกาโรส เจล

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

ช่องที่ 2 = น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

ช่องที่ 3 = ไอโซเลต BMV-RB

ช่องที่ 4 = ไอโซเลต BMV-KB

5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ BMV

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของแถบดีเอ็นเอ ทั้ง 2 ไอโซเลท คือ BMV-RB และ BMV-KB พบว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 664 คู่เบส ซึ่งยาวกว่าช่วงลำดับเบสที่ออกแบบไว้ประมาณ 13 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ครอบคลุมยีนที่ต้องการ ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคแบบครบทั้งยีนมีความยาว 573 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 10) มีตำแหน่งอยู่บน RNA-3 ทางด้านปลาย 3' กำหนดการสร้างโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 190 เรสิดิวส์ (ภาพที่ 11) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20.53 กิโลดาลตัน จากการคำนวณด้วยโปรแกรม DNA star โดยมีรายงานขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BMV ไวที่ 20.0 กิโลดาลตัน (Hull, 2002) และ 20.3 กิโลดาลตัน (Plant virus online, 1977) มีรหัสเริ่มต้นในการแปลรหัสเป็นโปรตีน คือ AUG และรหัสหยุด คือ UAA ซึ่งพบว่ามีขนาดยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคต่างจากของเชื้อ BMV ที่เคยมีรายงานไว้ว่าความยาวทั้งยีนเท่ากับ 570 นิวคลีโอไทด์ อยู่บน subgenomic RNA หรือ RNA 4 ที่มีความยาวประมาณ 876 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แปลรหัส 9 นิวคลีโอไทด์ บริเวณด้านปลาย 5' และ 300 นิวคลีโอไทด์ ด้านปลาย 3' ซึ่งยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 188 เรสิดิวส์ รหัสเริ่มต้นในการแปลรหัส คือ AUG และรหัสหยุด คือ UAG (ไม่รวมกรดอะมิโน Met ซึ่งเป็นตำแหน่งเริ่มต้นการสร้างโปรตีน) (Dasgupta and Kaesberg, 1981) เช่นเดียวกับรายงานของ Ahlquist และคณะ (1981) และฐานข้อมูลใน GenBank รายงานว่า ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีความยาวทั้งยีน 570 นิวคลีโอไทด์ กำหนดการสร้างโปรตีนประกอบด้วย 189 กรดอะมิโน รหัสเริ่มต้น คือ AUG และรหัสหยุด คือ UAG (รวมกรดอะมิโน Met ตำแหน่งเริ่มต้นการสร้างโปรตีน)

จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท และจากฐานข้อมูล GenBank ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ Accession No. DQ530425.1 (Fescue strain, BMV-F), J02042.1 (Russian strain, BMV-R) และ X58459 (Type strain, BMV-Type) พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท คือ BMV-RB และ BMV-KB จากประเทศไทย มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทั้ง 2 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน กับเชื้อ BMV สายพันธุ์ BMV-F, BMV-R และ BMV-Type ที่ระดับ 73 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 12) และ 76-77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 13)

BMV - RB	ATGTCGACTTCAGGAAGTGGTAAGATGACCCGAGCACAGCGAAGAGCTGCGGCCCGGAGG	60
BMV - KB	ATGTCGACTTCAGGAAGTGGTAAGATGACCCGAGCACAGCGAAGAGCTGCGGCCCGGAGG	60

BMV - RB	GCTCGAAGGGTGGTTAAACCCATTGAGCAGGTTATTGTGCAACCAATCGCTTCCGGCCAA	120
BMV - KB	GCTCGAAGGGTGGTTAAACCCATTGAGCAGGTTATTGTGCAACCAATCGCTTCCGGCCAA	120

BMV - RB	GGCAAGGCCGTTAGAGCGTTTGGCGGATACAGTGTACCAAGTGGGAAGCCTCTTCGAAG	180
BMV - KB	GGCAAGGCCGTTAGAGCGTTTGGCGGATACAGTGTACCAAGTGGGAAGCCTCTTCGAAG	180

BMV - RB	GCAATCACTGCAAAGGCCACCAACCAGATGGACATCTCTTTACCCTCTGAGCTTTCGTCC	240
BMV - KB	GCAATCACTGCAAAGGCCACCAACCAGATGGACATCTCTTTACCCTCTGAGCTTTCGTCC	240

BMV - RB	GAAAGGAACAAGCAGCTCAAAGTTGGGAGAGTTCTACTTTGGCTGGGACTCCTGCCTAGT	300
BMV - KB	GAAAGGAACAAGCAGCTCAAAGTTGGGAGAGTTCTACTTTGGCTGGGACTCCTGCCTAGT	300

BMV - RB	ATCACTGGGCGGGTTAAGGCTTGATCGCTGAGACTCAGTCAACCCCCGAAGTGCTTTT	360
BMV - KB	ATCACTGGGCGGGTTAAGGCTTGATCGCTGAGACTCAGTCAACCCCCGAAGTGCTTTT	360

BMV - RB	CAAGTAGCTTTGGCTGTGCGCGATTCTCGAAAGAGGTGGTGGCGGCGATGTACACAGAC	420
BMV - KB	CAAGTAGCTTTGGCTGTGCGCGATTCTCGAAAGAGGTGGTGGCGGCGATGTACACAGAC	420

BMV - RB	GCTTTCAAGGGTATCACCTTGAACAGCTGGCGAAGGACCTGCGCATCTATGTGTATGCA	480
BMV - KB	GCTTTCAAGGGTATCACCTTGAACAGCTGGCGAAGGACCTGCGCATCTATGTGTATGCA	480

BMV - RB	TCGGAGGCTGTGGCAGAGGGAGCGGTAGCAGTGCATTTGGAAGTCGAACACGTAAGGCCT	540
BMV - KB	TCGGAGGCTGTGGCAGAGGGAGCGGTAGCAGTGCATTTGGAAGTCGAACACGTAAGGCCT	540

BMV - RB	ACGTTGGACGACTTTTTACCCCGGTGTACTAA	573
BMV - KB	ACGTTGGACGACTTTTTACCCCGGTGTACTAA	573

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV มีความยาว 573

นิวคลีโอไทด์ จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และกาญจนบุรี (BMV-KB) สัญลักษณ์
แสดงตำแหน่งเริ่มต้น และ แสดงตำแหน่งหยุดแปลรหัสเป็นโปรตีน

BMV - RB	MSTSGTGKMTAQRRAARRARRVVKPIQQVIVEPIASGQGKAVRAFGGYSVTKEASSK	60
BMV - KB	MSTSGTGKMTAQRRAARRARRVVKPIQQVIVEPIASGQGKAVRAFGGYSVTKEASSK	60

BMV - RB	AITAKATNQMDISLPSELSSERNKQLKVGRVLLWLGLLPSITGRVKACIAETQSTPEAAF	120
BMV - KB	AITAKATNQMDISLPSELSSERNKQLKVGRVLLWLGLLPSITGRVKACIAETQSTPEAAF	120

BMV - RB	QVALAVADSSKEVVAAMYDAFKGITLEQLAKDLRIYVYASEAVAEGAVAVHLEVEHVRP	180
BMV - KB	QVALAVADSSKEVVAAMYDAFKGITLEQLAKDLRIYVYASEAVAEGAVAVHLEVEHVRP	180

BMV - RB	TLDDFFTPVY	190
BMV - KB	TLDDFFTPVY	190

ภาพที่ 11 ลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ประกอบด้วย 190

กรดอะมิโน จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ กาญจนบุรี (BMV-KB).

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบทั้งยีนโปรตีนห่อหุ้ม
อนุภาคของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัด
กาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain
(BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank

Sequence	Name	Lenght (nt)	Sequence	Name	Lenght (nt)	Score
1	BMV-RB	573	2	BMV-KB	573	99
1	BMV-RB	573	3	BMV-F	570	73
1	BMV-RB	573	4	BMV-R	570	73
1	BMV-RB	573	5	BMV-Type	570	73
2	BMV-KB	573	3	BMV-F	570	73
2	BMV-KB	573	4	BMV-R	570	73
2	BMV-KB	573	5	BMV-Type	570	73
3	BMV-F	570	4	BMV-R	570	98
3	BMV-F	570	5	BMV-Type	570	99
4	BMV-R	570	5	BMV-Type	570	98

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบทั้งยีนโปรตีน
ห่อหุ้มอนุภาค ขนาด 573 นิวคลีโอไทด์ ของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท
จากจังหวัดราชบุรี(BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สาย
พันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่
มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank

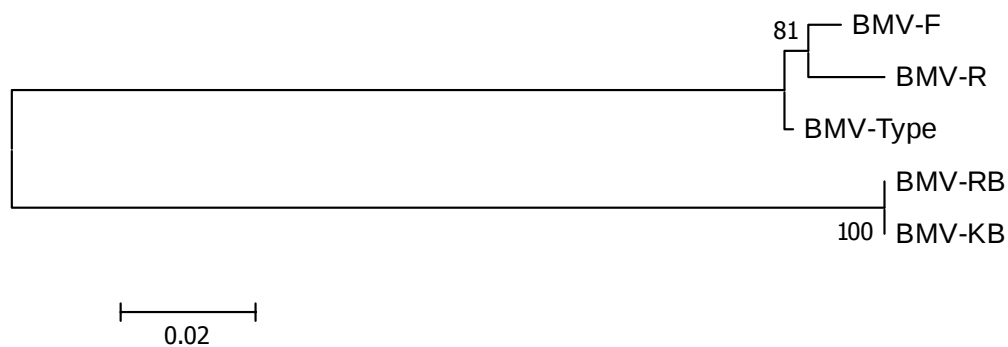
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จาก จังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank

Sequence	Name	Lenght (aa)	Sequence	Name	Lenght (aa)	Score
1	BMV-RB	190	2	BMV-KB	190	100
1	BMV-RB	190	3	BMV-F	189	77
1	BMV-RB	190	4	BMV-R	189	76
1	BMV-RB	190	5	BMV-Type	189	77
2	BMV-KB	190	3	BMV-F	189	77
2	BMV-KB	190	4	BMV-R	189	76
2	BMV-KB	190	5	BMV-Type	189	77
3	BMV-F	189	4	BMV-R	189	98
3	BMV-F	189	5	BMV-Type	189	98
4	BMV-R	189	5	BMV-Type	189	98

BMV-F	MSTSGTGKMT	RAQRRAAARR	NRRTAT-VQP	VIVEPFAAGQ	GKAIKAIAGY	[50]
BMV-R			..W..R-...	L....		[50]
BMV-Type			G-...	I....		[50]
BMV-RB			A..VVKPI.Q	I.S..	...VR.FG..	[50]
BMV-KB			A..VVKPI.Q	I.S..	...VR.FG..	[50]
BMV-F	SISKWEASSD	AITAKATNAM	SITLPHELSS	EKNKELKVGR	VLLWLGLLPS	[100]
BMV-R						[100]
BMV-Type						[100]
BMV-RB	.VT.....K	Q.	D.S..S....	.R..Q.....		[100]
BMV-KB	.VT.....K	Q.	D.S..S....	.R..Q.....		[100]
BMV-F	VAGRIKACVA	EKQAQAEAAF	QVALAVADSS	KEVVAAMYTD	AFRGATLGDL	[150]
BMV-R						[150]
BMV-Type						[150]
BMV-RB	IT..V...I.	.T.STP....			..K.I..EQ.	[150]
BMV-KB	IT..V...I.	.T.STP....			..K.I..EQ.	[150]
BMV-F	LN-LQIYLYA	SEAVPAKAVV	VHLEVEHVRP	TFDDFFTPVY	R	[191]
BMV-R					..	[191]
BMV-Type					..	[191]
BMV-RB	AKD.R..V..	AEG..A		.L.....	-	[191]
BMV-KB	AKD.R..V..	AEG..A		.L.....	-	[191]

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จากจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank

การศึกษาความสัมพันธ์ด้วย Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต และเชื้อ BMV สายพันธุ์ BMV-F, BMV-R และ BMV-Type จากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าเชื้อไวรัสทั้ง 2 ไอโซเลตถูกจัดแยกกลุ่มออกจากสายพันธุ์ BMV-F, BMV-R และ BMV-Type (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BMV ทั้ง 2 ไอโซเลต ของจังหวัดราชบุรี (BMV-RB) และ จังหวัดกาญจนบุรี (BMV-KB) และเชื้อ BMV สายพันธุ์ Fescue strain (BMV-F) Russian strain (BMV-R) และ Type strain (BMV-Type) ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม Mega version 4.0

6. ความรุนแรงของเชื้อ *Brome mosaic virus*

ความรุนแรงของเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลต จากจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัสลงบนข้าวโพด 5 สายพันธุ์ โดยศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

(1) เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลต ทำให้ข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริด 3 ข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ลำลือสาน และข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง เป็นโรค 91 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน และในข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์ SG 17 ที่มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคต่ำกว่า ซึ่งเป็นโรคเพียง 41 ถึง 51 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการปลูกเชื้อ 21 วันซึ่งสอดคล้องกับในสภาพแปลงปลูกขณะที่ทำการสำรวจจะพบว่าข้าวโพดฝักอ่อนในสภาพแปลงปลูกข้าวโพดไม่แสดงอาการต่างให้เห็นเด่นชัด (ตารางที่ 4) จากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ต้นที่เป็นโรคของข้าวโพดทั้ง 5 สายพันธุ์ต่อเชื้อไวรัส แสดงให้เห็นว่า เชื้อไวรัสจากทั้ง 2 ไอโซเลต มีความรุนแรงไป

ในทิศทางเดียวกัน สอดคล้องกับที่ ชีระ (2532) รายงานไว้ว่า ในข้าวโพดข้าวเหนียว และข้าวโพดหวาน เป็นโรคประมาณ 90 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังปลูกเชื้อประมาณ 7 วัน และในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์สุวรรณ 1 และ สุวรรณ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคต่ำกว่าข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว โดยจะเป็นโรคประมาณ 50 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่างจากผลการทดลองที่ได้ เนื่องจากในข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 ทั้ง 2 ไอโซเลท ก่อให้เกิดโรคประมาณ 91 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังปลูกเชื้อประมาณ 7 วัน ซึ่งอาจเป็นเพราะข้าวโพดไร่ที่นำมาทดสอบมีความอ่อนแอต่อเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท

(2) การพัฒนาอาการของโรค ศึกษาอาการของโรคจากการปลูกเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท จากไอโซเลท BMV-RB (ภาพที่ 15) ไอโซเลท BMV-KB (ภาพที่ 16) ด้วยวิธีกลบนข้าวโพดทั้ง 5 สายพันธุ์ ภายหลังการปลูกเชื้อ จนข้าวโพดออกฝัก พบว่าข้าวโพดส่วนใหญ่แสดงอาการและพัฒนาอาการของโรคใน 4 ลักษณะอาการ บนข้าวโพด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ไฮบริด 3 ลำลี อีสาน สุวรรณ 5 เทียนเหลือง และ SG 17 ดังนี้

- 1) อาการด่างจุดสีเขียว (chlorotic spots) บริเวณโคนใบอ่อนสุดของข้าวโพดที่ทำการปลูกเชื้อ ภายหลังการปลูกเชื้อ 3 -4 วัน
- 2) ต่อมาจุดสีเขียวจะลามมาจนกันเป็นด่างเหลือง (yellow mottle) จนเหลือเนื้อใบสีเขียวเล็กน้อยทั่วทั้งใบเมื่อใบอ่อนแผ่เต็มที่ภายหลังปลูกเชื้อ 5 - 7 วัน
- 3) ใบอ่อนที่ไม่ได้ปลูกเชื้อบริเวณปลายใบจะแสดงอาการด่างเหลืองจนเหลือเนื้อใบสีเขียวเล็กน้อยเช่นเดียวกับใบที่ปลูกเชื้อ และบริเวณถัดจากปลายใบลงมาจะแสดงอาการด่างเป็นแถบขาว (white stripes) ภายหลังปลูกเชื้อ 8 -10 วัน
- 4) ใบอ่อนที่เจริญต่อมาความรุนแรงจะลดลงโดยแสดงอาการด่างเป็นขีดสีขาว (white streaks) ภายหลังปลูกเชื้อ 10 -14 วัน ต่อมาขีดจะลามมาจนกันตามแนวเส้นใบ และเห็นชัดเจนมากขึ้นเมื่อใบแก่ เปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ และในข้าวโพดบางสายพันธุ์พบอาการมากกว่า 4 อาการ คือ ข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริด 3 และข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ลำลีอีสาน จากทั้ง 2 ไอโซเลท ใบต่อมาแสดงอาการด่างแถบขาวอย่างรุนแรงจนเนื้อใบสี หลังปลูกเชื้อ 18-20 วัน เห็นชัดเจนเมื่อใบแก่ขึ้น (ภาพที่ 17) ซึ่งในข้าวโพดหวานพบอาการต้นชะงักการเจริญเติบโตร่วมด้วย โดยอาการของข้าวโพดมีพัฒนาการสอดคล้องกับที่ ชีระ (2532) รายงานไว้ว่า ในข้าวโพดข้าวเหนียว และ

ข้าวโพดหวานเริ่มแสดงอาการเป็นจุดสีขาวซีด หลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน จากนั้นจุดจะขยายใหญ่ขึ้น ใบต่อมาจะแสดงอาการต่างอย่างรุนแรงทั้งใบจะด่างเป็นสีขาว เหลือส่วนเขียวเพียงเล็กน้อย ข้าวโพดที่เป็นโรคมักจะตายเกือบทั้งหมด ส่วนข้าวโพดที่ไม่ตายจะแสดงอาการด่าง (mosaic) รุนแรง ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์สุวรรณ 1 และสุวรรณ 2 พืชจะแสดงอาการช้ากว่า โดยจะเริ่มแสดงอาการประมาณ 9-10 วัน หลังปลูกเชื้อ ต้นที่เป็นโรคมักจะตายโดยแสดงอาการด่างเหมือนกับข้าวโพดข้าวเหนียว และข้าวโพดหวาน และ มีรายงานไว้ในข้าวโพดหวานบางพันธุ์หลังการปลูกเชื้อ 5 วัน จะแสดงอาการด่างเป็นขีด (streaks) จากนั้นจะพัฒนาเป็นแผลไหม้ (necrosis) และตายภายใน 10 วันหลังปลูกเชื้อ (Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) ส่วนอาการที่พบในช่อดอกเกสรตัวผู้ พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท ทำให้ข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริด 3 ไม่ให้ช่อดอกเกสรตัวผู้ เนื่องจากยอดแสดงอาการไหม้ และตายในที่สุด สำหรับข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์สำลีอีสาน ไอโซเลท BMV-RB ทำให้ช่อดอกเกสรตัวผู้ชะงักการเจริญอับละอองเกสรฝ่อ ส่วนไอโซเลท BMV-KB ทำให้อับละอองเกสรฝ่อ และเกิดการขาดหายไปบางส่วนเห็นก้านชูของอับละอองเกสรชัดเจน เช่นเดียวกับข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 และข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง ที่เกิดการเข้าทำลายทั้ง 2 ไอโซเลท และในข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์ SG 17 พบว่าช่อดอกเกสรตัวผู้ชะงักการเจริญอับละอองเกสรฝ่อ (ภาพที่ 18) ส่วนอาการที่พบของฝัก พบว่าข้าวโพดส่วนใหญ่ที่เป็นโรคจากทั้ง 2 ไอโซเลท ฝักที่ได้มีลักษณะไม่สมบูรณ์ คือมีขนาดเล็ก ดิคมลัดไม่สมบูรณ์ หรือเมล็ดฝ่อ รวมทั้งในข้าวโพดปกติซึ่งฝักที่ได้มีขนาดเล็กเช่นกัน และจากการตรวจหาเชื้อ BMV ในส่วนต่างๆของข้าวโพด โดยเลือกข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 ของแต่ละไอโซเลทมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยวิธี indirect ELISA เนื่องจากข้าวโพดส่วนใหญ่มีส่วนประกอบพร้อมนำมาใช้ในการตรวจ ซึ่งฝักที่นำมาตรวจพบว่าข้าวโพดที่ปลูกเชื้อด้วยไอโซเลท BMV-RB ฝักมีขนาดเล็ก เมล็ดฝ่อ ไอโซเลท BMV-KB ฝักมีขนาดเล็ก การดิคมลัดไม่สมบูรณ์ เช่นเดียวกับฝักของข้าวโพดปกติ (ภาพที่ 19) พบว่าข้าวโพดที่ปลูกเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท ตรวจพบเชื้อ BMV ในส่วนของราก ใบ เปลือกหุ้มฝัก ไหม และเมล็ด แต่ไม่พบเชื้อในอับละอองเกสร (ตารางที่ 5) ซึ่ง ICTVdB management (2002) รายงานไว้ว่าเชื้อ BMV ไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด และละอองเกสร อย่างไรก็ตามควรต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ BMV จากต้นข้าวโพดที่เป็นโรคต่อไป

จากข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค และการพัฒนาอาการของโรค บนข้าวโพดทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ของเชื้อ BMV พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท มีความสามารถในการก่อโรค และการพัฒนาอาการของโรคเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และสามารถตรวจพบเชื้อในส่วนของราก ใบ เปลือกหุ้มฝัก ไหม และเมล็ด ยกเว้นละอองเกสร

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิดอาการโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท ในช่วง
ระยะเวลาต่างๆหลังจากการปลูกเชืบบนข้าวโพด 5 สายพันธุ์

เชื้อ BMV (ไอโซเลท)	ข้าวโพด ทดสอบ	จำนวนต้นที่เป็นโรค/จำนวนต้นที่ไม่เป็นโรค ^{1/}				เปอร์เซ็นต์ โรคสูงสุด
		7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน	
BMV-RB	ไฮบริด 3	96/4	99/1	99/1	99/1	99
	ลำดู่สี	99/1	99/1	99/1	99/1	99
	สุวรรณ 5	91/9	98/2	98/2	98/2	98
	เทียนเหลือง	97/3	99/1	99/1	99/1	99
	SG 17	18/82	34/66	41/59	41/59	41
BMV-KB	ไฮบริด 3	99/1	99/1	99/1	99/1	99
	ลำดู่สี	98/2	98/2	98/2	98/2	98
	สุวรรณ 5	100/0	100/0	100/0	100/0	100
	เทียนเหลือง	99/1	100/0	100/0	100/0	100
	SG 17	37/63	49/51	51/49	51/49	51

หมายเหตุ ^{1/}จำนวนต้นที่ใช้ในการทดลอง 100 ต้นต่อพันธุ์

ภาพที่ 15 อาการของข้าวโพดที่เป็นโรคหลังการปลูกเชื้อไวรัส BMV-RB ด้วยวิธีกลบน
 ข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริด 3 (1) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ ลำลีอีสาน (2) ข้าวโพดไร่
 พันธุ์ สุวรรณ 5 (3) ข้าวโพดเทียนพันธุ์ เทียนเหลือง (4) และข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์
 SG 17 (5)

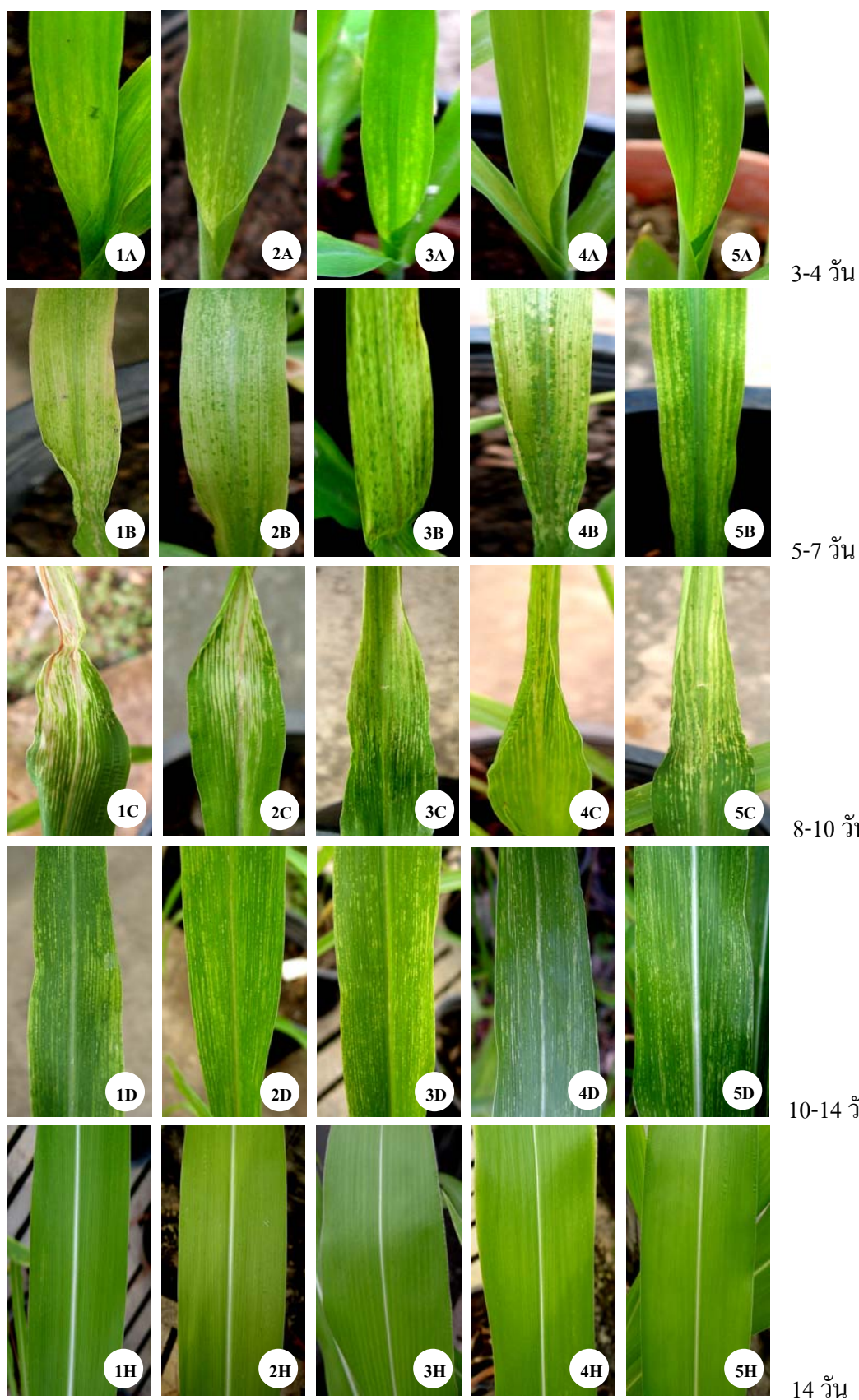
A = ใบเป็นโรค แสดงอาการด่างจุดสีซีด (chlorotic spots) หลังปลูกเชื้อ 3-4 วัน

B = ใบเป็นโรค แสดงอาการด่างเหลือง (yellow mottle) หลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน

C = ใบเป็นโรค แสดงอาการด่างเป็นแถบขาว (white stripes) หลังปลูกเชื้อ 8-10 วัน

D = ใบเป็นโรค แสดงอาการด่างเป็นขีดสีขาว (white streaks) หลังปลูกเชื้อ 10-14 วัน

H = ใบข้าวโพดปกติอายุ 14 วัน



ไสบริกซ์ 3

ลำดืออีสาน

สุวรรณ 5

เทียนเหลือง

SG 17

ภาพที่ 16 อาการของข้าวโพดที่เป็นโรคหลังการปลูกเชื้อไวรัส BMV-RB ด้วยวิธีกลบน
 ข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริดส์ 3 (1) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ ลำลืออีสาน (2) ข้าวโพดไร่
 พันธุ์ สุวรรณ 5 (3) ข้าวโพดเทียนพันธุ์ เทียนเหลือง (4) และข้าวโพดฝักอ่อน
 พันธุ์ SG 17 (5)

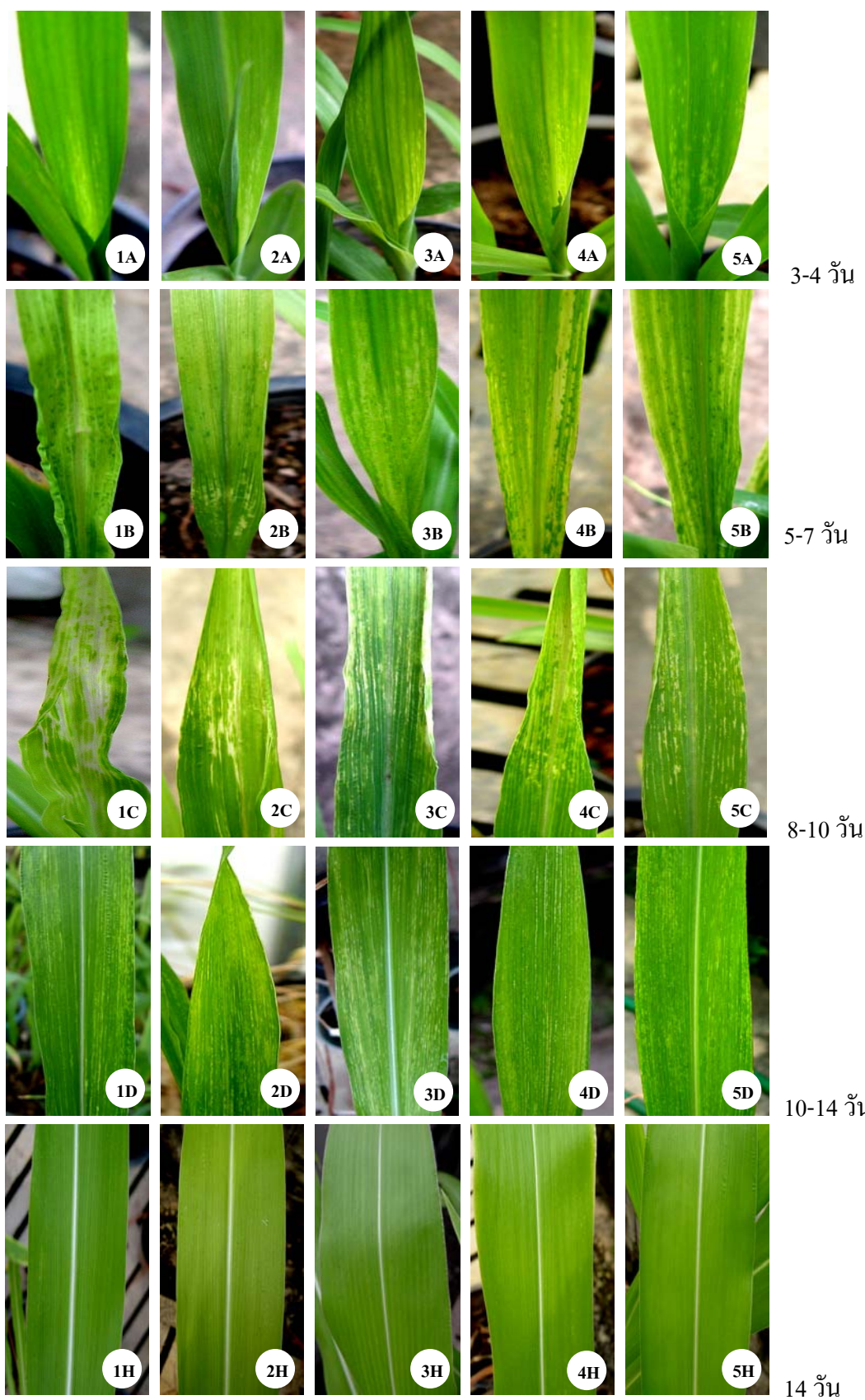
A = ใบเป็นโรค แสดงอาการด่างจุดสีซีด (chlorotic spots) หลังปลูกเชื้อ 3-4 วัน

B = ใบเป็นโรค แสดงอาการด่างเหลือง (yellow mottle) หลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน

C = ใบเป็นโรค แสดงอาการด่างเป็นแถบขาว (white stripes) หลังปลูกเชื้อ 8-10 วัน

D = ใบเป็นโรคแสดงอาการด่างเป็นขีดสีขาว (white streaks) หลังปลูกเชื้อ 10-14 วัน

H = ใบข้าวโพดปกติอายุ 14 วัน



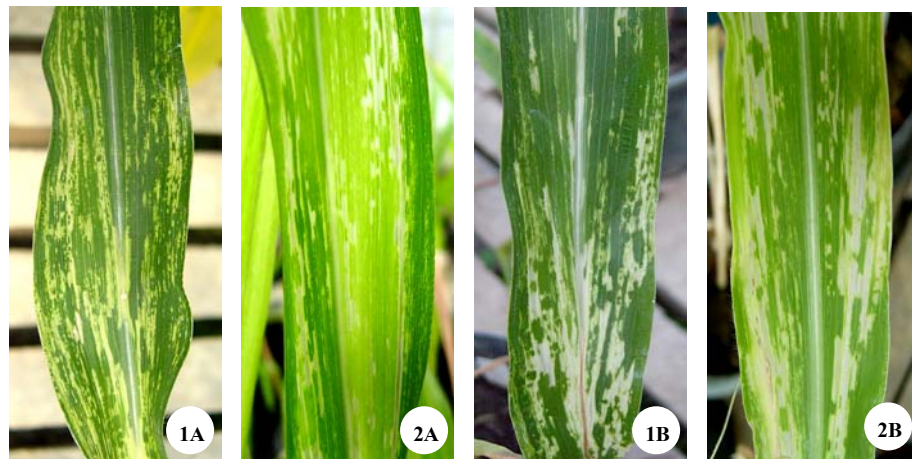
ไฮบริด 3

ลำไยสีสวน

สุวรรณ 5

เทียนเหลือง

SG 17



ภาพที่ 17 ข้าวโพดที่เป็นโรคแสดงอาการใบด่างแถบขาว (white stripes) อย่างรุนแรงจากการปลูกเชื้อ BMV ไอโซเลต BMV-RB (ราชบุรี) บนข้าวโพดพันธุ์ ไฮบริดส์ 3 (1A) ลำลีอีสาน (2A) และไอโซเลต BMV-KB (กาญจนบุรี) บนข้าวโพดพันธุ์ ไฮบริดส์ 3 (1B) ลำลีอีสาน (2B) หลังปลูกเชื้อ 18-20 วัน

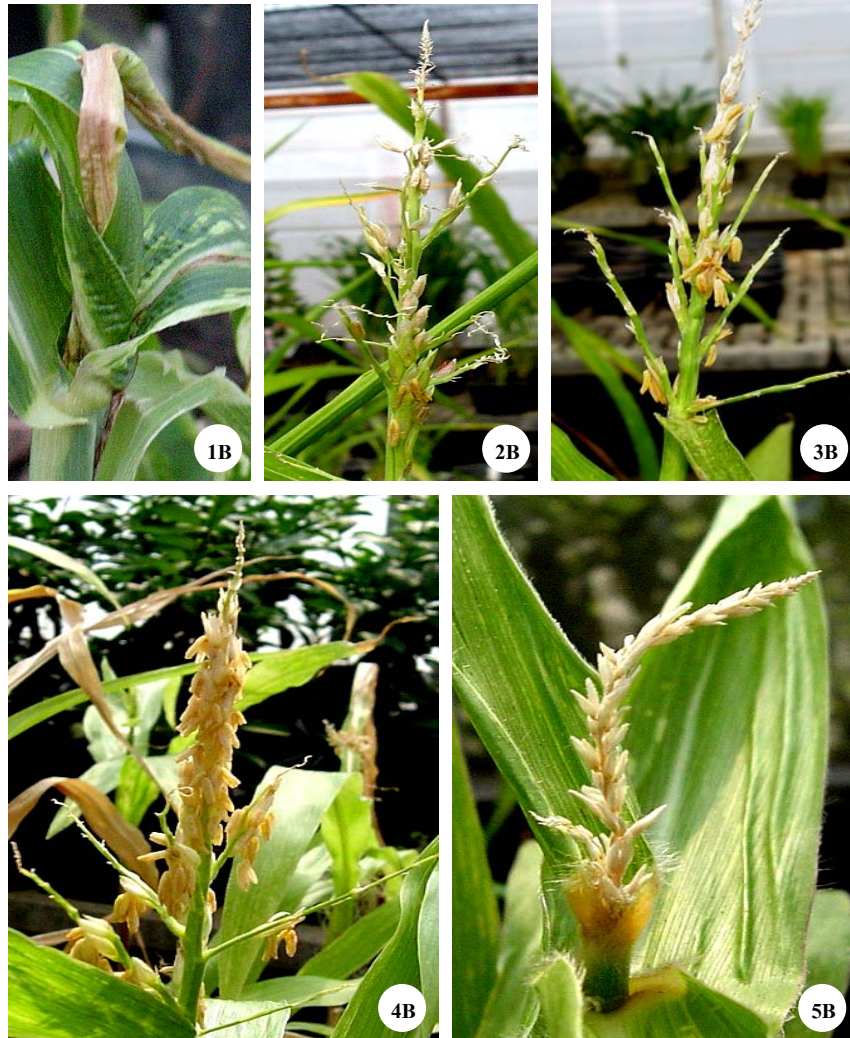


ภาพที่ 18 อาการช่อดอกเกสรตัวผู้ผิดปกติ หรือไม่สมบูรณ์ของข้าวโพดเป็นโรคหลังการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริดซ์ 3 (1) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์สำลีอีสาน (2) ข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 (3) ข้าวโพดเทียนพันธุ์เทียนเหลือง (4) และข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์ SG 17 (5)

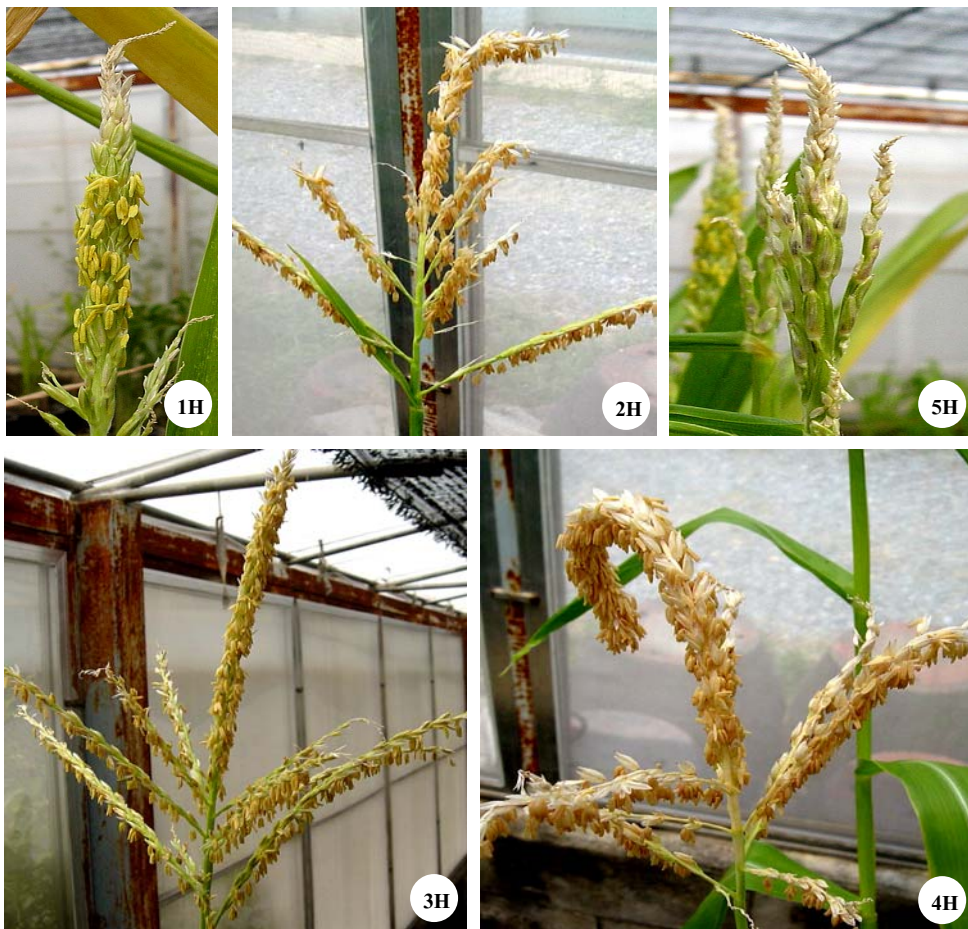
A = ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อไอโซเลต BMV-RB

B = ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อไอโซเลต BMV-KB

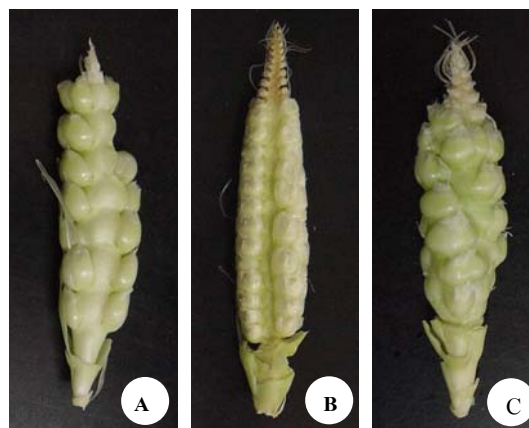
H = ข้าวโพดปกติ



ภาพที่ 18 (ต่อ)



ภาพที่ 18 (ต่อ)



ภาพที่ 19 ฝักข้าวโพดไร่ พันธุ์สุวรรณ 5 ที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อไอโซเลต BMV-RB (B) และ ไอโซเลต BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ (A) และตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ตารางที่ 5 การตรวจหาเชื้อ BMV จากส่วนต่างๆ ของข้าวโพดที่ได้รับการปลูกเชื้อ BMV ทั้ง
ไอโซเลท BMV-RB (ราชบุรี) และ BMV-KB (กาญจนบุรี) ด้วยวิธี indirect ELISA

ส่วนประกอบของข้าวโพด ^{1/}	ผลของปฏิกิริยาต่อแอนติซีรัม BMV-SC		
	BMV-detected samples/ samples		
	ข้าวโพดปกติ	ข้าวโพด BMV-RB	ข้าวโพด BMV-KB
ใบ	-2/2	+2/2	+2/2
ราก	-2/2	+2/2	+2/2
เปลือกหุ้มฝัก	-2/2	+2/2	+2/2
ไหม	-2/2	+2/2	+2/2
เมล็ด	-2/2	+2/2	+2/2
อับละอองเกสร	-2/2	-2/2	-2/2

หมายเหตุ ^{1/} คือ ส่วนต่างๆของข้าวโพดแต่ละส่วนที่นำมาตรวจจากข้าวโพด 2 ต้น/ไอโซเลท

7. การศึกษาลักษณะอาการบนพืชทดสอบ (bioassay)

อาการที่เกิดขึ้นบนพืชทดสอบสามารถจำแนกลักษณะอาการตามวงศ์พืชต่างๆ ได้ดังนี้

วงศ์ Chenopodiaceae

Chenopodium amaranticolor พบลักษณะอาการจุดสีเหลืองเข้มมีสีเหลืองอ่อนล้อมรอบกระจายทั่วใบ ภายหลังการปลูกเชื้อ 3 วัน จากนั้น 5-7 วัน เริ่มปรากฏขอบแผลสีน้ำตาล บริเวณตรงกลางแผลแห้งตาย (ภาพที่ 20) และ 8-10 วัน แผลเริ่มเชื่อมรวมกันเป็นแผลไหม้สีน้ำตาลบริเวณกว้าง ใบหลุดร่วงไป แต่ไม่พบอาการดังกล่าวบนใบที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ว่า ใบที่ปลูกเชื้อแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) (Plant virus online, 1977; ICTVdB management, 2002) และอาการเป็นจุดแผลเฉพาะแห่งสีน้ำตาล (necrotic local lesion) โดยเริ่มแสดงอาการเป็นจุดน้ำหลังจากปลูกเชื้อประมาณ 4-7 วัน ไม่ปรากฏอาการบนใบอ่อน หรือใบ

ที่ไม่ปลุกเชื้อ (ธีระ, 2532) และมีรายงานว่า *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลจุดบนใบที่ทำการปลุกเชื้อและจากนั้นจะแพร่กระจายไปทั่วต้น (Gibson and Kenten, 1978)

C. quinoa พบลักษณะอาการจุดสีเหลืองอ่อน ภายหลังการปลุกเชื้อ 3 วัน จากนั้น 4-7 วัน จุดสีชัดเจนมากขึ้นและเริ่มขยายรวมกันจนเนื้อใบกลายเป็นสีเหลืองทั้งใบ และหลุดร่วงไป ภายหลังการปลุกเชื้อ 10-14 วัน ใบอ่อนบริเวณยอดที่ไม่ได้ทำการปลุกเชื้อ แสดงอาการจุดสีเหลือง (ภาพที่ 21) สอดคล้องกับการรายงานของ Gibson และ Kenten (1978) ที่กล่าวว่า *C. quinoa* จะแสดงอาการแผลจุดบนใบที่ทำการปลุกเชื้อและจากนั้นจะแพร่กระจายไปทั่วต้น แต่ให้ผลต่างกับที่ธีระ (2532); Plant virus online (1977); ICTVdB management (2002) รายงานไว้ว่า ใบที่ปลุกเชื้อจะแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion)

วงศ์ Solanaceae

ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) ตรวจไม่พบอาการหลังปลุกเชื้อ 30 วัน

ยาสูบ (*N. glutinosa*) ตรวจไม่พบอาการหลังปลุกเชื้อ 30 วัน

ยาสูบ (*N. tabacum*) ตรวจไม่พบอาการหลังปลุกเชื้อ 30 วัน

วงศ์ Cucurbitaceae

แตงกวา (*Cucumis sativus*) ตรวจไม่พบอาการหลังปลุกเชื้อ 30 วัน

ฟักทอง (*Cucurbita maxima*) ตรวจไม่พบอาการหลังปลุกเชื้อ 30 วัน

วงศ์ Leguminosae

ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) แสดงอาการจุดแผลสีน้ำตาลภายหลังทำการปลุกเชื้อ 3 วัน จากนั้น 5-7 วัน จุดแผลจะขยายใหญ่ขึ้นและมีสีเข้มขึ้น (ภาพที่ 22) ไม่มีอาการดังกล่าวบนใบที่ไม่ได้รับการปลุกเชื้อ สอดคล้องกับที่ธีระ (2532) รายงานไว้ว่า ใบถั่วแดงหลวง (*Phaseolous*

calearatus) ที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local necrotic lesion) หลังปลูกเชื้อ 7-10 วัน

ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* var. *unguiculata*) ตรวจไม่พบอาการหลังปลูกเชื้อ 30 วัน

ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis*) ตรวจไม่พบอาการหลังปลูกเชื้อ 30 วัน

วงศ์ Gramineae

ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) สายพันธุ์ UT 423B และ UT 325B พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงอาการคล้ายกัน เริ่มแสดงอาการจุดสีขีดที่โคนใบอ่อนสุดที่ปลูกเชื้อ ภายหลังการปลูกเชื้อ 3 วัน จากนั้น 5-7 วัน เมื่อใบอ่อนแผ่เต็มที่ จุดขีดเชื่อมรวมกันและกระจายไปทั่วใบ ใบอ่อนที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการต่างเป็นแถบสีขาว (white stripe) ตามแนวเส้นใบ จากนั้นใบที่เจริญออกมาใหม่แสดงอาการต่างรุนแรงน้อยลงเป็นด่างขีดสีขาว (white streaks) ทั่วทั้งใบ เมื่อใบแก่จะเห็นอาการชัดเจน (ภาพที่ 23) สอดคล้องกับที่ ชีระ (2532) รายงานไว้ว่า ข้าวฟ่างพันธุ์ต่างๆ ทั้งข้าวฟ่างเมล็ด และข้าวฟ่างหวาน อาการจะคล้ายกัน โดยเริ่มแรก 5-7 วัน ใบอ่อนที่แตกใหม่แสดงอาการเป็นจุดด่างเล็กๆ ในวันต่อมาจุดจะขยายใหญ่ขึ้นและแต่ละจุดจะขยายมาชนกัน ใบใหม่ที่เจริญตามมาแสดงอาการต่างรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณปลายใบจะขาวขีด ซึ่งมักจะแห้งตาย ใบอื่นๆ ที่เจริญตามมาจากภายหลังจะแสดงอาการด่างตลอดทั้งใบ อาการด่างจะรุนแรงมากขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวฟ่าง โดยข้าวฟ่างหวานจะรุนแรงมากที่สุด

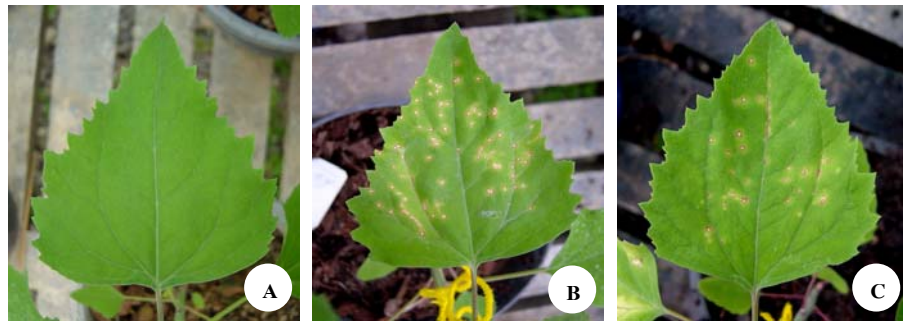
ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) สายพันธุ์ อินทรี 1 อินทรี 2 สุวรรณ 56 และ 171 พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ ข้าวสาลีทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงอาการด่างขีดสีขาวตามแนวเส้นใบทั่วทั้งต้น ภายหลังการปลูกเชื้อ 28-30 วัน และอาการชัดเจนมากขึ้นเมื่อใบแก่ (ภาพที่ 24) สอดคล้องกับที่ ชีระ (2532) รายงานไว้ว่าข้าวสาลีแสดงอาการใบด่างหลังปลูกเชื้อ 7-10 วัน

ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) สายพันธุ์ FN (ภาพที่ 25) และ SMG (ภาพที่ 26) แสดงอาการภายหลังการปลูกเชื้อ 30 วัน โดยข้าวบาร์เลย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ แสดงอาการแผลสีเหลืองถึงน้ำตาล ภายหลังการปลูกเชื้อ 7-10 วัน และใบอ่อนที่ไม่ได้ปลูกเชื้อแสดงอาการขีดสีขาวหลังจากอาการดังกล่าว 18-20 วัน แต่อาการไม่รุนแรงมากนัก สอดคล้องกับที่มีรายงานว่าข้าวบาร์เลย์แสดงอาการใบด่างไม่รุนแรง (mild mosaic) หลังปลูกเชื้อ (Plant virus online, 1977)

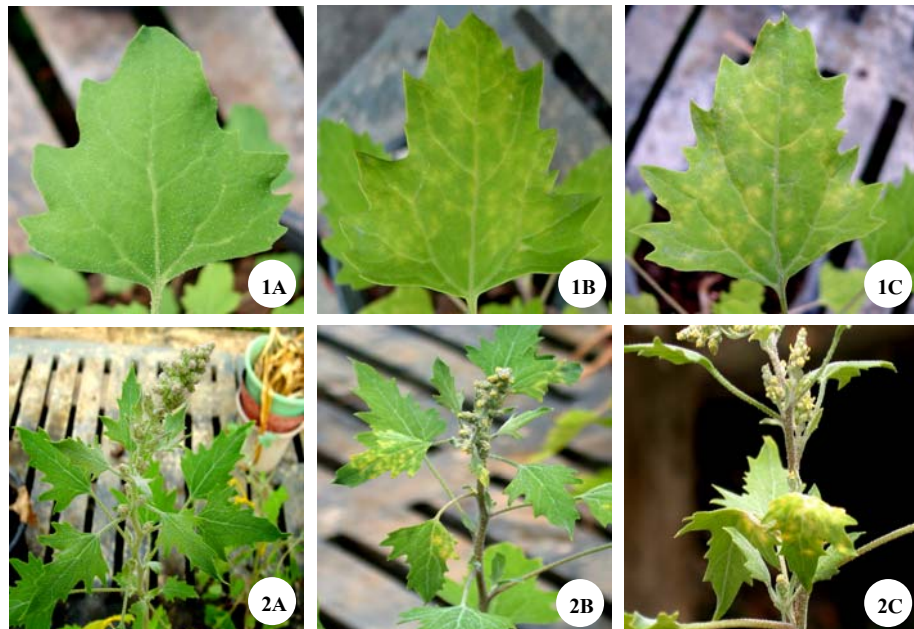
เมื่อนำใบพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อแต่ละชนิด ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน มาทำการตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าพืชทดสอบทำปฏิกิริยาให้ผลบวกในทั้ง 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย *C. amaranticolor*, *C. quinoa* ข้าวฟ่างสายพันธุ์ UT 423B และ UT 325B ข้าวสาลีสายพันธุ์ อินทรี 1 อินทรี 2 สุวรรณ 56 และ 171 และข้าวบาร์เลย์สายพันธุ์ FN และ SMG ส่วนในถั่วแขกที่แสดงอาการ และพืชทดสอบที่ไม่แสดงอาการนั้นทำปฏิกิริยาให้ผลเป็นลบ (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตามได้นำถั่วแขกที่แสดงอาการจากการปลูกเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท กลับไปปลูกเชื้อลงบนข้าวโพดหวานพันธุ์ ไฮบริด 3 พบว่าข้าวโพดหวานทั้ง 2 ไอโซเลท แสดงอาการใบด่างแถบขาว (white stripes) (ภาพที่ 27) โดยเริ่มแสดงอาการจุดสีขีดบนใบอ่อน หลังปลูกเชื้อ 10 วัน และมีการพัฒนาอาการเช่นเดียวกับที่รายงานไว้ข้างต้น และให้ปฏิกิริยาเป็นผลบวกจากการตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค indirect ELISA ซึ่งบอกได้ว่าเชื้อ BMV สามารถเข้าทำลายถั่วแขกได้ และก่อให้เกิดอาการแผลจุด ซึ่งไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ด้วยเทคนิค ELISA อาจเนื่องมาจากการเจือจางน้ำคั้นพืชในอัตราส่วน 1:10 อาจทำให้ปริมาณเชื้อที่อยู่ในน้ำคั้นน้อยจนไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้

จากความหลากหลายของอาการบนพืชทดสอบแต่ละชนิดที่ศึกษาและผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค indirect ELISA สามารถแบ่งอาการได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 พืชทดสอบที่แสดงอาการและตรวจพบเชื้อ จำนวน 10 ชนิด ประกอบด้วย ข้าวฟ่าง 2 สายพันธุ์ (UT 423B และ UT 325B) ข้าวสาลี 4 สายพันธุ์ (อินทรี 1 อินทรี 2 สุวรรณ 56 และ 171) ข้าวบาร์เลย์ 2 สายพันธุ์ (FN และ SMG) แสดงอาการด่างแบบทั่วต้น (systemic mosaic) *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) และ *C. quinoa* แสดงอาการแผลจุดสีขีด และพบอาการดังกล่าวบนใบที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ กลุ่มที่ 2 พืชทดสอบที่แสดงอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ คือ ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) แสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง สีน้ำตาลแดง (local lesion) และกลุ่มที่ 3 พืชทดสอบที่ไม่แสดงอาการและตรวจไม่พบเชื้อ จำนวน 7 ชนิด ประกอบด้วย ยาสูบ 3 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa* และ *N. tabacum* ถั่วพุ่ม ถั่วฝักยาว แตงกวา และฟักทอง

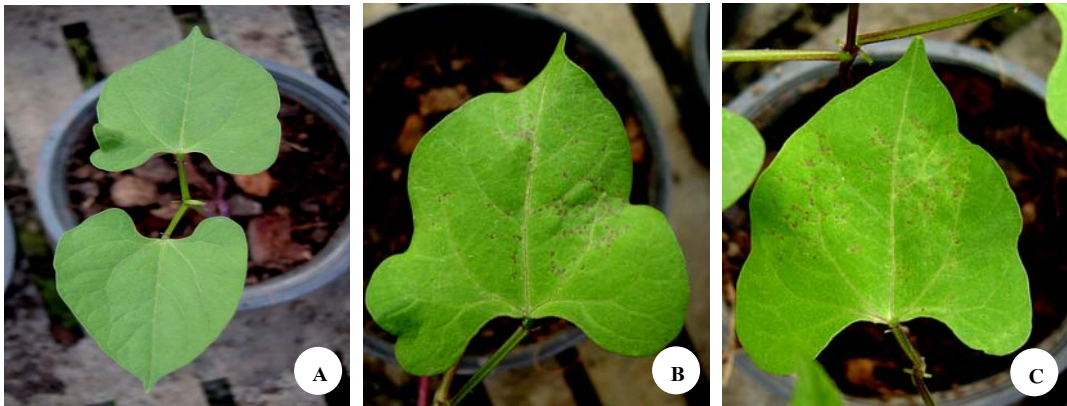
จะเห็นได้ว่าระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อ BMV ลงบนพืชทดสอบจนกระทั่งแสดงอาการนั้นมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชทดสอบ ที่มีผลต่อความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อ ซึ่งทำให้ระยะเวลาในการแสดงอาการและความรุนแรงบนพืชทดสอบมีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 20 *Chenopodium amaranticolor* แสดงอาการแผลจุดเซลล์ตายภายหลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน จากไวรัส BMV-RB (B) และ ไวรัส BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับใบปกติ (A)



ภาพที่ 21 *Chenopodium quinoa* แสดงอาการใบด่างจุดซีดสีเหลือง ไวรัส BMV-RB (B) และ ไวรัส BMV-KB (C) หลังการปลูกเชื้อ 3 วัน (1) หลังปลูกเชื้อ 10 วัน (2) เปรียบเทียบกับใบปกติ (A)



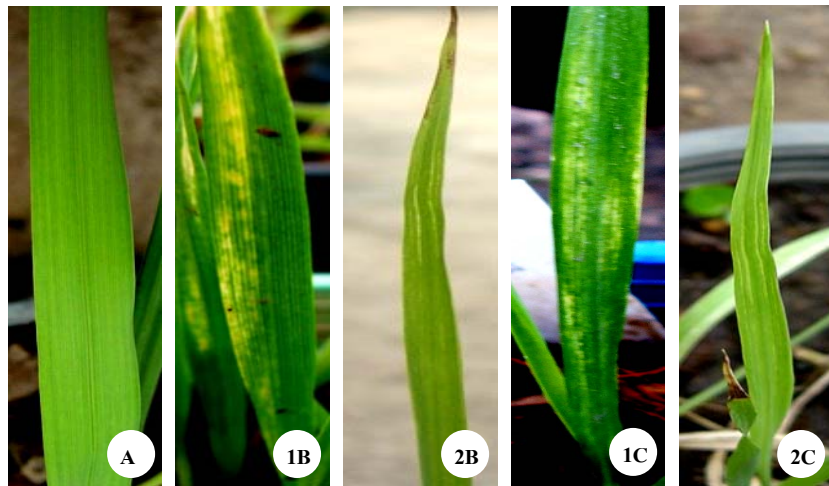
ภาพที่ 22 ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) แสดงอาการจุดแผลสีน้ำตาลแดงภายหลังปลูกเชื้อ 5-7 วัน จากไวรัส BMV-RB (B) และ ไวรัส BMV-KB (C) และเปรียบเทียบกับ ใบปกติ (A)



ภาพที่ 23 ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) แสดงอาการใบด่างขีดขาวภายหลังการปลูกเชื้อ 7-14 วัน จากไวรัส BMV-RB (B) และ ไวรัส BMV-KB (C) บนข้าวฟ่างพันธุ์ UT 423B (1) และข้าวฟ่างพันธุ์ UT 325B (2) เปรียบเทียบกับข้าวฟ่างปกติ (A)



ภาพที่ 24 ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) แสดงอาการใบต่างชนิดขาวภายหลังการปลูกเชื้อ 28-30 วัน จากไอโซเลท BMV-RB และไอโซเลท BMV-KB บนข้าวสาลี 4 สายพันธุ์ พันธุ์ อินทรี 1 (1) พันธุ์ อินทรี 2 (2) พันธุ์สุวรรณ 56 (3) และ พันธุ์ 171 (4) เปรียบเทียบกับข้าวสาลีปกติ (A)



ภาพที่ 25 ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) พันธุ์ FN แสดงอาการแผลสีเหลืองถึงน้ำตาล ภายหลังปลูกเชื้อ 10 วัน (1) และอาการใบด่างขีดขาวหลังปลูกเชื้อ 30 วัน (2) จาก การปลูกเชื้อ ไอโซเลต BMV-RB (B) และ ไอโซเลต BMV-RB (C) เปรียบเทียบกับข้าวบาร์เลย์ ปกติ (A)



ภาพที่ 26 ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) พันธุ์ SMG แสดงอาการแผลสีเหลืองถึงน้ำตาล ภายหลังปลูกเชื้อ 10 วัน (1) และอาการใบด่างขีดขาวหลังปลูกเชื้อ 30 วัน (2) จาก การปลูกเชื้อ ไอโซเลต BMV-RB (B) และ ไอโซเลต BMV-RB (C) เปรียบเทียบกับข้าวบาร์เลย์ปกติ (A)



ภาพที่ 27 ข้าวโพดหวาน (*Zea mays*) พันธุ์ไฮบริด 3 แสดงอาการใบด่างแถบขาวหลังปลูกเชื้อ 10 วัน จากถั่วแขกที่แสดงอาการแผลจุดน้ำตาลแดง (necrotic lesion) มาปลูกเชื้อด้วยวิธีการ จากถั่วแขกที่ปลูกเชื้อด้วย ไวโซเลท BMV-RB (B) และไวโซเลท BMV-KB (C) เปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ (A)

ตารางที่ 6 ข้อมูลอาการและการตรวจหาเชื้อ BMV ไอโซเลท RB และ KB หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน
ของพืชทดสอบแต่ละชนิด ด้วยเทคนิค indirect ELISA เปรียบเทียบกับพืชอาศัยของเชื้อ
BMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล CMI/ABB Description of Plant Virus

ชนิดพืชทดสอบ	ปฏิกิริยาต่อแอนติซีรัม BMV-SC/ อาการที่แสดงบนพืชทดสอบ		อาการบนพืชอาศัยจาก ฐานข้อมูล CMI/ABB
	BMV-RB	BMV-KB	BMV
วงศ์ Chenopodiaceae			
<i>C. amaranticolor</i>	+/LL	+/LL	H
<i>C. quinoa</i>	+/SL	+/SL	H
วงศ์ Solanaceae			
ยาสูบ (<i>N. benthamiana</i>)	-/NS	-/NS	NA
ยาสูบ (<i>N. glutinosa</i>)	-/NS	-/NS	N-H
ยาสูบ (<i>N. tabacum</i>)	-/NS	-/NS	H
วงศ์ Leguminosae			
ถั่วแขก (<i>P. vulgaris</i>)	-/LL	-/LL	NA
ถั่วพุ่ม (<i>V. unguiculata</i> var. <i>unguiculata</i>)	-/NS	-/NS	NA
ถั่วฝักยาว (<i>V. unguiculata</i> var. <i>sesquipedalis</i>)	-/NS	-/NS	NA

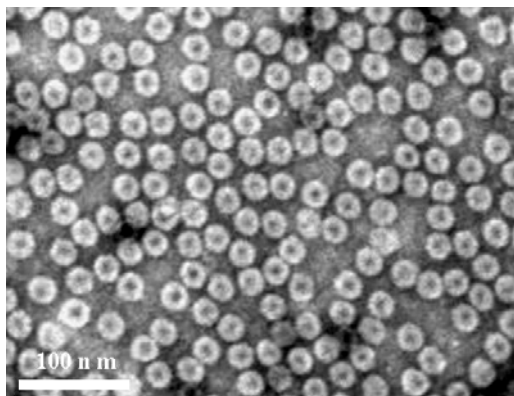
หมายเหตุ + คือ ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัม BMV-SC
 - คือ ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัม BMV-SC
 SM คือ systemic mosaic
 SL คือ systemic local lesion
 LL คือ local lesion
 NS คือ no symptom
 NA คือ ไม่มีข้อมูล
 H คือ พืชอาศัย
 N-H คือ ไม่เป็นพืชอาศัย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชนิดพืชทดสอบ	ปฏิกิริยาต่อแอนติซีรัม BMV-SC/ อาการที่แสดงบนพืชทดสอบ		อาการบนพืชอาศัยจาก ฐานข้อมูล CMI/ABB
	BMV-RB	BMV-KB	BMV
วงศ์ Cucurbitaceae			
แตงกวา (<i>C. sativus</i>)	-/NS	-/NS	H
ฟักทอง (<i>C. maxima</i>)	-/NS	-/NS	NA
วงศ์ Gramineae			
ข้าวฟ่าง UT 423B (<i>S. bicolor</i>)	+ / SM	+ / SM	H
ข้าวฟ่าง UT 325B (<i>S. bicolor</i>)	+ / SM	+ / SM	H
ข้าวสาลี อินทรี 1 (<i>T. aestivum</i>)	+ / SM	+ / SM	H
ข้าวสาลี อินทรี 2 (<i>T. aestivum</i>)	+ / SM	+ / SM	H
ข้าวสาลี สุวรรณ 56 (<i>T. aestivum</i>)	+ / SM	+ / SM	H
ข้าวสาลี 171 (<i>T. aestivum</i>)	+ / SM	+ / SM	H
ข้าวบาร์เลย์ FN (<i>H. vulgare</i>)	+ / SM	+ / SM	H
ข้าวบาร์เลย์ SMG (<i>H. vulgare</i>)	+ / SM	+ / SM	H

8. การผลิตและการตรวจสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ BMV

เมื่อนำไวรัสบริสุทธิ์ไอโซเลท BMV-RB มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะทรงกลม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 27 นาโนเมตร (ภาพที่ 28) สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ว่าพบลักษณะอนุภาคไวรัสเชื้อ BMV แบบทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 27 นาโนเมตร (ทวิศักดิ์, 2528; Hull, 2002) มีรายงานไว้ว่าอนุภาคไวรัสเชื้อ BMV มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 26 นาโนเมตร (Anderegg *et al.*, 1963; ICTV management, 2002) และ 25 นาโนเมตร (Gibson and Kenten, 1978) และพบลักษณะอนุภาคของเชื้อ BMV มีช่องว่าง (hollow) ตรงกลาง ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 8 นาโนเมตร (ทวิศักดิ์, 2528; Anderegg *et al.*, 1963)



ภาพที่ 28 ลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสไอโซเลต BMV-RB ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 27 นาโนเมตร ในสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.
Bar represent 100 nm.

8.1 ไตเตอร์ของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ BMV

จากการผลิตแอนติบอดีโดยฉีดเชื้อ BMV บริสุทธิ์ ไอโซเลต ราชบุรี (PAb BMV-RB) ในกระต่าย แล้วเก็บแอนติซีรั่มทั้ง 5 ครั้ง มาตรวจหาค่าไตเตอร์ พบว่า แอนติซีรั่มที่ได้ให้ค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยา กับเชื้อ BMV บริสุทธิ์ในช่วง 1:6,400 ถึง 1:12,800 และได้เลือกแอนติซีรั่มจากการเจาะเลือดครั้งที่ 1 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสง ($A_{405\text{ nm}}$) ที่ได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรั่มที่เก็บได้ในแต่ละสัปดาห์ (ตารางที่ 7, ภาพที่ 29)

8.2 ค่าเจือจางที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ BMV ในพืชเป็นโรค

การหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ BMV จากการเจาะเลือดครั้งที่ 1 หลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 1 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าที่ความเจือจาง 1:500 ให้ค่า $A_{405\text{ nm}}$ ของการทำปฏิกิริยาสูงที่สุด คือ 2.873 รองลงมา คือ 1:1,000, 1:1,500, 1: 2,000 และ 1: 2,500 ให้ค่า $A_{405\text{ nm}}$ ของการทำปฏิกิริยา 2.859, 2.850, 2.692 และ 2.511 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบค่า S/N ratio พบว่าความเจือจางที่ใช้ให้ค่า $A_{405\text{ nm}}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ความเจือจาง 1:1,500 1:2,000 และ 1: 2,500 มีค่า S/N ratio สูงกว่าทุกความเจือจาง และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติทำให้สามารถใช้ความเข้มข้นใดก็ได้ (ตารางที่ 8) ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นที่ 1: 2,000 สำหรับใช้ทดลองต่อไป

8.3 ความจำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อ BMV

การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ BMV ที่ผลิตได้ พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับน้ำคั้นใบข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ BMV ไอโซเลท RB และ KB และอ้อยที่เป็นโรคจากเชื้อ BMV ในสภาพแปลงปลูกธรรมชาติ และไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) และ *Sugarcane mosaic virus* -MDB (SCMV-MDB) จากน้ำคั้นใบข้าวโพด และเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) จากน้ำคั้นยาสูบ (*N. glutinosa*) และน้ำคั้นพืชปกติ (ตารางที่ 9) จากความสามารถในการตรวจสอบ และการเกิดปฏิกิริยาในระดับสูงเมื่อวินิจฉัยด้วยแอนติซีรั่มที่ผลิตได้ แสดงว่าแอนติซีรั่มมีความจำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อ BMV จากพืชติดเชื้อที่ใช้ทดสอบ

8.4 ความไว (sensitivity) ของแอนติซีรั่ม

การทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ BMV ที่ผลิตได้ โดยเจือจางไวรัส BMV บริสุทธิ์ไอโซเลท RB ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 0.156 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อแอนติซีรั่มที่ความเข้มข้น 1:2,000 พบว่ามีความไวในการทำปฏิกิริยา โดยสามารถตรวจสอบไวรัสบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นได้ในระดับ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 10) จากผลจะเห็นได้ว่าความไวในการตรวจสอบของแอนติซีรั่มต้องมีความเข้มข้นของไวรัสสูง อาจเนื่องมาจากแอนติซีรั่มที่ใช้ในการตรวจเจอสูงถึง 1:2,000 ซึ่งมีผลต่อความไวในการทำปฏิกิริยา

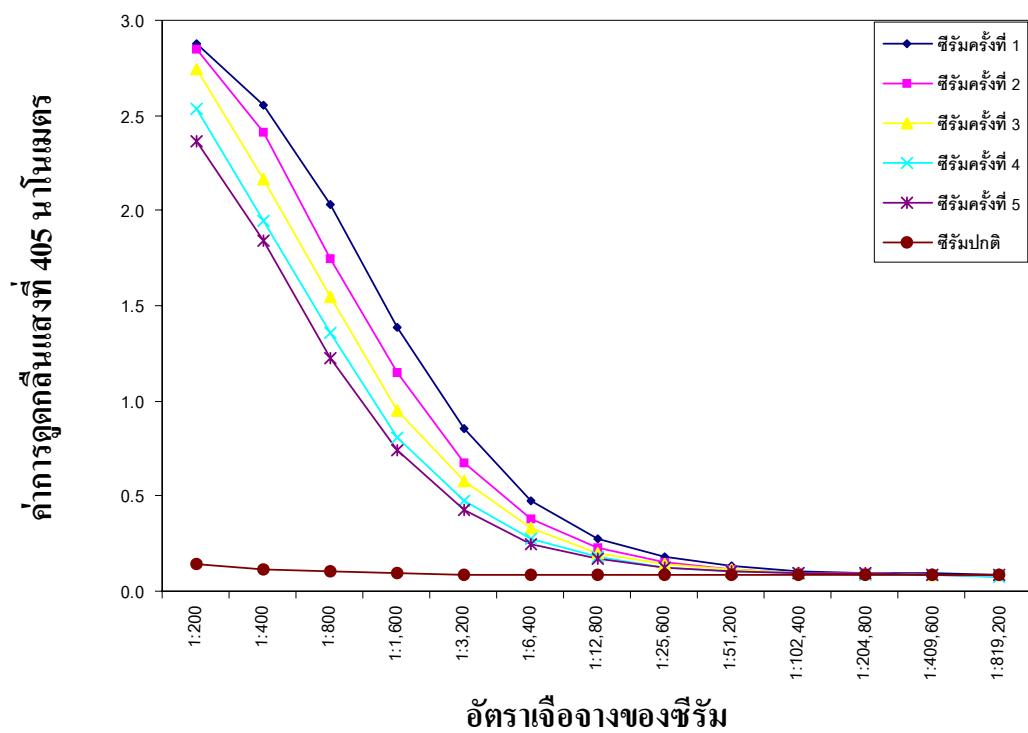
อย่างไรก็ตามจากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการนำเชื้อไวรัส BMV ไอโซเลท RB ถัดกระดุนภูมิคุ้มกันในกระต่ายสามารถใช้เป็น แอนติซีรั่มที่มีประสิทธิภาพ และใช้ในการตรวจหาเชื้อ BMV ที่เข้าทำลายพืช เนื่องจากมีความจำเพาะและไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ และเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 7 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมเมื่อใช้สารแขวนลอยไวรัสความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

ค่าความเจือจางของแอนติซีรัม	ครั้งที่เจาะเลือด/ค่าการดูดกลืนแสง A_{405nm} ^{1/}					
	1	2	3	4	5	Ns ^{2/}
1:200	2.875	2.8485	2.747	2.5365	2.364	0.1385
1:400	2.55	2.4115	2.1665	1.9475	1.84	0.114
1:800	2.034	1.747	1.549	1.3605	1.2255	0.104
1:1,600	1.389	1.1475	0.9485	0.808	0.743	0.0975
1:3,200	0.856	0.678	0.577	0.4735	0.428	0.0865
1:6,400	0.4765	0.3825	0.3285	0.272	0.249	0.0825
1:12,800	0.2775	0.232	0.1975	0.176	0.1665	0.0815
1:25,600	0.1785	0.1535	0.01415	0.1265	0.124	0.0815
1:51,200	0.1305	0.1175	0.111	0.1025	0.1025	0.0825
1:102,400	0.1055	0.097	0.0965	0.093	0.0915	0.0815
1:204,800	0.095	0.0905	0.091	0.088	0.0905	0.084
1:409,600	0.093	0.0855	0.0885	0.085	0.0895	0.082
1:819,200	0.085	0.0805	0.083	0.0805	0.0865	0.081
Coating buffer	0.103	0.098	0.1025	0.099	0.105	0.126

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 60 นาที หลังจากเติมสับสเตรท

^{2/} Normal serum



ภาพที่ 29 ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ BMV-RB จากการเก็บเลือด 5 ครั้ง ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้ไวรัสบริสุทธิ์ BMV-RB ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน

ตารางที่ 8 ค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ของเชื้อ BMV ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB) ที่ค่าความเจือจางต่างๆ ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ความเจือจางของแอนติซีรัมต่อเชื้อ BMV	ค่า S/N ratio ^{2/}
1: 500	10.8850d ^{1/}
1:1,000	16.5750c
1:1,500	19.7200a
1:2,000	19.9400a
1:2,500	19.6200a
1:3,000	17.8150b
1:3,500	18.2500b
1:4,000	15.5600c
1:4,500	15.5000c

หมายเหตุ ^{1/} ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

^{2/} ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ ของค่า signal-to-noise ratio เทากับค่า A_{405} ของเชื้อ BMV ต่อ A_{405} ของพืชปกติ

ตารางที่ 9 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB) กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ตัวอย่างพืชนำมาทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสง A_{405nm} ^{1/}
ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ BMV-RB	1.989
อ้อยเป็นโรคจากเชื้อ BMV ในสภาพธรรมชาติ	1.868
ยาสูบเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ CMV	0.112
ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV	0.123
ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ MCMV	0.123
ข้าวโพดเป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV-MDB	0.143
ข้าวโพดปกติ	0.119
อ้อยปกติ	0.137
ยาสูบปกติ (<i>N. glutinosa</i>)	0.160
Coating buffer	0.089

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ จากการอ่านค่าการดูดกลืนที่เวลา 60 นาที หลังจากเติมสับสเตรท โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ BMV ที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB) ความเข้มข้น 1:2,000

ตารางที่ 10 การทดสอบความไวของการเกิดปฏิกิริยาของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB)
ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ความเข้มข้นของ ไวรัสบริสุทธิ์ ไอโซเลต BMV-RB (ng)	ค่าการดูดกลืนแสง A_{405nm} ^{1/}
5000	2.02
1000	0.661
100	0.1668
50	0.1442
25	0.109
10	0.102
5	0.0896
2.5	0.0862
1.25	0.0846
0.625	0.0908
0.312	0.0866
0.156	0.0994
พืชปกติ	0.1004
Coating buffer	0.091
พืชเป็นโรค	2.5884

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ย 2 ซ้ำ จากการอ่านค่าการดูดกลืนที่เวลา 60 นาที หลังจากเติมสับเซตรท
โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ BMV ที่ผลิตได้ (PAb BMV-RB) ที่ความเข้มข้น 1:2,000

สรุปและข้อเสนอแนะ

การสำรวจแปลงปลูกข้าวโพดและเก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการต่างจาก 20 จังหวัด พบว่าข้าวโพดที่ให้ปฏิกิริยาเป็นผลบวกต่อเชื้อ BMV เป็นข้าวโพดปลูกก่อนจาก 2 จังหวัด คือ กาญจนบุรี และราชบุรี ข้าวโพดที่ติดเชื้อ BMV แสดงอาการจุดสีขีด และมีอาการต่างทั่วไปร่วมด้วย จากการแยกเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทราชบุรี (BMV-RB) และไอโซเลทกาญจนบุรี (BMV-KB) บนพืชทดสอบ *C. amaranticolor* พบว่าแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) เมื่อนำแต่ละจุดมาเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสบนข้าวโพดหวาน พบว่าแสดงอาการใบด่างแถบขาวทั่วทั้งต้น (white stripe systemic) และให้ปฏิกิริยาเป็นผลบวกเมื่อตรวจยืนยันด้วยเทคนิค indirect ELISA อีกครั้ง

แยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ทั้ง 2 ไอโซเลท จากข้าวโพดหวาน ได้ไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ มีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.63 และ 1.608 และที่ความเข้มข้น 0.5725 และ 0.3584 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืช 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า บริสุทธิ์มาตรฐานที่ 1.75 (Lane, unpublished data) เมื่อนำมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวมีขนาดประมาณ 21.68 กิโลดาลตัน และเมื่อนำไวรัสบริสุทธิ์ที่ได้ กลับไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบบนข้าวโพดหวาน พบว่าไวรัสบริสุทธิ์ที่ได้สามารถทำให้ข้าวโพดเป็นโรคได้

การแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากอนุภาคไวรัส ตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบอาร์เอ็นเอ 3 แถบ สอดคล้องกับที่มีรายงานว่าจีโนมของเชื้อ BMV ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ 3 ชิ้น (RNA-1, RNA-2 และ RNA-3) (ICTVdB management, 2002; Amine and Ahlquist, 2003) การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมทั้งส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 664 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ครอบคลุมยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสมีความยาว 573 นิวคลีโอไทด์ จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกันสูงที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน กับเชื้อไวรัส BMV สายพันธุ์ BMV-F, BMV-R และ BMV-Type ที่ระดับ 73 เปอร์เซ็นต์ และ 76-77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาความสัมพันธ์ในรูป Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท และจากฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าไอโซเลท BMV-RB และ BMV-KB ของประเทศไทย ถูกจัดกลุ่มแยกออกมาจากกลุ่มของเชื้อไวรัส BMV สายพันธุ์ BMV-F, BMV-R และ BMV-Type ที่มีรายงานในต่างประเทศ

การศึกษาความรุนแรงของเชื้อ BMV ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลลงบน ข้าวโพด 5 สายพันธุ์ พบว่าไวรัสทั้ง 2 ไอโซเลท มีความรุนแรงไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค ที่พบในข้าวโพดหวาน ข้าวโพดข้าวเหนียว ข้าวโพดไร่ และข้าวโพดเทียน เป็นโรค 91 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และในข้าวโพดฝักอ่อน เป็นโรคเพียง 41 ถึง 51 เปอร์เซ็นต์ และมีการพัฒนาอาการในข้าวโพดทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยแสดงอาการต่างจุดสีซีด (chlorotic spots) ต่างเหลือง (yellow mottle) ต่างเป็นแถบขาว (white stripes) และต่างขีดขาว (white streaks) และต่างแถบขาวอย่างรุนแรงในข้าวโพดบางสายพันธุ์ และข้าวโพดส่วนใหญ่ที่เป็นโรค พบว่าช่อเกสรตัวผู้ไม่สมบูรณ์ และฝักมีขนาดเล็ก ดิคมเมล็ดไม่สมบูรณ์ และตรวจพบเชื้อ BMV ในส่วนของ ใบ ราก เปลือกหุ้มฝัก ใหม่ (silks) และเมล็ด ยกเว้นอับละอองเกสร การศึกษาลักษณะอาการบนพืชทดสอบ 18 ชนิด และตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าการตอบสนองของพืชทดสอบต่อไวรัสทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถแบ่ง ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มที่แสดงอาการและตรวจพบเชื้อ ได้แก่ ข้าวฟ่างพันธุ์ UT 423B และ UT 325B ข้าวสาลีพันธุ์ อินทรี 1 อินทรี 2 สุวรรณ 56 และ 171 ข้าวบาร์เลย์พันธุ์ FN และ SMG *C. amaranticolor* และ *C. quinoa* (2) กลุ่มที่แสดงอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ ได้แก่ ถั่วแขก และ (3) กลุ่มที่ไม่แสดงอาการและตรวจไม่พบเชื้อ ได้แก่ ยาสูบ 3 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa* และ *N. tabacum* ถั่วพุ่ม ถั่วฝักยาว แตงกวา และ ฟักทอง

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ BMV เมื่อนำไวรัสบริสุทธิ์ไอโซเลท BMV-RB มีลักษณะอนุภาคทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 27 นาโนเมตร เป็นแอนติเจน พบว่าสามารถผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อ BMV มีค่าเจือจางสูงสุดที่ยังเห็นปฏิกิริยา คือ 1: 12,000 ค่าความเจือจางที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ BMV ในน้ำคั้นใบข้าวโพด คือ 1:2,000 มีความไวในการทำปฏิกิริยากับไวรัสบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ BMV เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับพืชที่มีเชื้อ BMV โดยไม่ทำปฏิกิริยากับพืชปกติ และพืชที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ

จากลักษณะและคุณสมบัติของสัณฐานวิทยา ลักษณะอาการบนพืชอาศัย และการทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มต่อเชื้อ BMV-SC ของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในข้าวโพดจากจังหวัด กาญจนบุรี และราชบุรีมีความใกล้เคียงกับเชื้อ BMV ที่จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ Bromovirus มากที่สุด หรืออาจจะเป็นสายพันธุ์หนึ่งของเชื้อ BMV อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดทางเมล็ดซึ่งน่าจะทำการศึกษาต่อในอนาคต เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายกับข้าวโพดอย่างรุนแรง และพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิดจากข้อมูลการศึกษาข้างต้น และยังคงต้องมีการศึกษาคุณสมบัติอื่นๆของเชื้อต่อไป เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ทรงเชาว์ อินสมพันธ์. 2531. **พืชไร่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เล่ม 1.** ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 281 น.

ทวีศักดิ์ กลิ่นคง. 2528. **การศึกษาโรคไวรัสใบด่างแถบขาวของอ้อยในประเทศไทย.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 71น.

ธีระ สุตะบุตร. 2532. **โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย.** หจก. ฟันนี้พับบลิชซิ่ง. กรุงเทพฯ. 130 น.

พิสวรณ์ เจียมสมบัติ. 2543. **เอกสารประกอบคำบรรยาย เรื่องไวรัสสาเหตุโรคพืช.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 45 น.

พิสวรณ์ เจียมสมบัติ อมรรรัตน์ หล้าพรหม วิมล สีเทาและสุจินต์ ภัทรภูวศล. 2549.

การตรวจพบ *Maize chlorotic mottle virus* ข้าวโพดหวานร่วมกับ *Sugarcane mosaic virus*. ประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติครั้งที่ 2 วันที่ 9-11 มีนาคม 2549 ณ สีดาร์สอร์ท อ. เมือง จ. นครนายก (โปสเตอร์).

ราชนนท์ ถิรพร. 2539. **ข้าวโพด (Maize) การใช้ประโยชน์ การวิเคราะห์ปัญหา และการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกร.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 274 น.

รัชณี องประยูร. 2545. **บทปฏิบัติการเรียนรู้วิทยาทางด้านโรคพืช.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 87 น.

สำนักงานคอมพิวเตอร์และเครือข่าย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2548. ระบบสารสนเทศความหลากหลายทางชีวภาพ; ข้าวโพด. แหล่งที่มา:

<http://www.202.28.50.45/~neebio/biodiversity/> 14 ตุลาคม 2550.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. สถิติการเกษตร. แหล่งที่มา:

<http://www.doae.go.th/plant/corn/> 15 พฤษภาคม 2550.

อุดม โกสสัยสุก. 2537. การปลูกพืชไร่. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 46 น.

Ahlquist, P., V. Luckow and P. Kaesberg. 1981. Complete nucleotide sequence of brome mosaic virus RNA-3. **J. Mol. Biol.** 153: 23-38.

Amine, O. N., and P. Ahlquist. 2003. Brome mosaic virus RNA replication:revealing the role of the host in RNA virus replication. **Annu. Rev. Phytopathol.** 41:77-98.

Anderegg, W. A., M. Wright and P. Kaesberg. 1963. An x-ray scattering study of bromegrass mosaic virus. **Biophysic J.** 3: 175-182.

Bancroft, J. B. 1970. Brome mosaic virus. CMI/AAB description of Plant Virus. No. 3 Commonw. **Mycol. Inst. Kew.** England.

Bancroft, J. B. 1972. A virus made from parts of the genome of brome mosaic and cowpea chlorotic mottle viruses. **J. Gen. Virol.** 14: 223-228.

Bockstahler, E. L. and P. Kaesberg. 1962. The Molecular Weight and Other Biophysical Properties of Bromegrass mosaic virus. **Biophysic J.** 2: 1-9.

Bujarski, J. J. 1998. Bromovirus isolation and RNA extraction, p. 183-188. *In* G. D. Foster and S. C. Taylor. (ed.), Molecular in Molecular Biology: Plant Virology Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance. Vol. 81. **Humana Press Inc.**, Totowa, NJ.

Burgess, J., F. Motoyoshi and E.N. Fleming. 1974. Structural Changes Accompanying Infection of Tobacco Protoplasts with Two Spherical Viruses. **Planta (Berl.)**. 117: 133-144.

- Dasgupta, R. and P. Kaesberg. 1981. Complete nucleotide sequences of coat protein messenger RNAs of brome mosaic virus and cowpea chlorotic mottle virus. **Nucleic Acids Res.** 10: 703-713.
- De Jong, W. and P. Ahlquist. 1995. Host-specific alterations in viral RNA accumulation and infection spread in a brome mosaic virus isolate with an expanded host range. **J. virol.** 69: 1485-1492.
- Edwards, L. M., J. I. Cooper and P. R. Massalski. 1983. Some natural hosts of brome mosaic virus in the United Kingdom. **Pl. Path.** 32: 91-94.
- Gibson, W. R. and R. H. Kenten. 1978. The occurrence of brome mosaic virus in Britain. **Pl. Path.** 27: 66-67.
- Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology forth edition. **Academic Press.** 1001 P.
- ICTVdB Management, 2002. 10.0.3.0.003. ***Brome mosaic virus.*** In *ICTVdB-The universal Virus Database.*
Cited this site as: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
- Incardona, N. O. and P. Kaesberg. 1964. A pH-induced structural change in bromegrass mosaic virus. **Biophys. J.** 4: 11-21.
- Lane, unpublished data. Available source: Plant Viruses Online: Descriptions of Plant viruses.
 Version: 3th September 1977.
Cited this site as: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
- Lane, L. C. 1974. The bromoviruses: In K.M. Smith and M. A. Lauffer (ed.), **Adv. Virus Res.** 19: 151-220.

- Lane, L. C. 1977. Brome mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Virus. No. 180 (No. 3 received). **Commonw. Mycol. Inst. Kew.** England.
- Lane, L. C. 1981. Bromoviruses. In: *Handbook of Plant Virus Infection: Comparative Diagnosis*, (Ed. By E. Kurstak). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 333-376 pp.
- Locarnini, A. S., A. G. Coulepis, A. M. Stratton, J. Kaldor and I. D. Gust. 1979. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A-specific immunoglobulin M. **Journal of Clinical Microbiology** 9: 459-465.
- McKinney, H. H., H. Fellows and C. O. Johnston. 1942. Mosaic of *Bromus inermis*. **Phytopathology** 32: 331 P.
- Mise, K., S. Tsuge., K. Nagao., T. Okuno and I. Furusawa. 1992. Nucleotide sequence responsible for the synthesis of a truncated coat protein of brome mosaic virus strain ATCC66. **J. Gen. Virol.** 73: 2543-2551.
- Paliwal, Y. C. 1970. Electron microscopy of bromegrass mosaic virus in infected leaves. **J. Ultrastruct. Res.** 30: 491-502.
- Plant Viruses Online: Descriptions of Plant viruses. Version: 3th September 1977.
http://phene.cpmc.columbia.edu/ICTVdB/DPV/180_files/showadpv.htm
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor. New York.
- Schmidt, H.B., R. Fritzscie and W. Lehmann. 1963. Die ifbertragung des Weidelgrasmosaik-Virus durch Nematoden. **Naturwissenschaften** 50: 1-2.

- Scott, H.A. and A. S. Slack. 1971. Serological relationship of brome mosaic and cowpea chlorotic mottle viruses. **Virology** 46: 490-492.
- Slykhuis, J. T. 1976. Virus and virus-like diseases of cereal crops. **Ann. Rev. Phytopathology** 14: 189-210.
- Walters, H. J. 1969. Beetle transmission of plant viruses. **Adv. Virus Res.** 15: 339-363.
- Walters, H. J. and P. Surin. 1973. Transmission and host range of broad bean mottle virus. **Plant Disease Reporter** 57: 833–836.

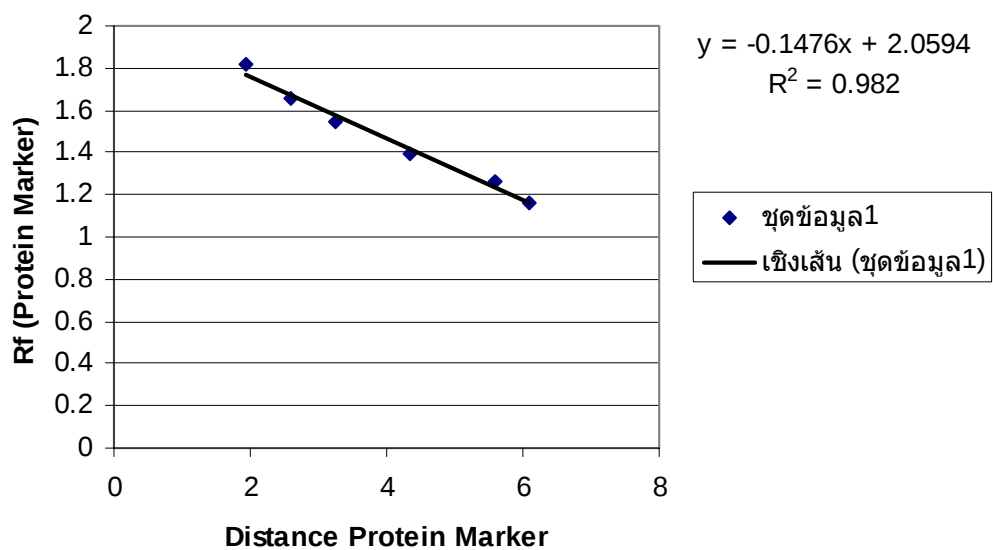
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ 1 ตารางข้อมูลที่ใช้ในการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน (Protein Molecular Weight Marker) และนำมาใช้คำนวณขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ที่ได้จากเทคนิค SDS-PAGE

Protein Molecular Weight Marker (kDa)	Protein Molecular Weight Marker (log)	Distance Protein Marker (cm)	Distance (cm)	
			Coat protein BMV	
			BMV-RB	BMV-KB
116	2.064	1.0	4.9	4.9
66.2	1.807	1.95		
45	1.653	2.6		
35	1.544	3.25		
25	1.397	4.35		
18.4	1.264	5.6		
14.4	1.158	6.1		

หมายเหตุ distance คือค่าหาได้จาก ค่าที่วัดจากขอบด้านบนของเจล จนถึงกึ่งกลางแบนของโปรตีนในการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานใช้ Protein Marker (log) กับค่า distance Protein Marker และแทนค่า distance coat protein ของ ไอโซเลท BMV-RB และ BMV-KB ที่ตัวแปร X เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส



ภาพผนวกที่ 1 กราฟโปรตีนมาตรฐานแบบเชิงเส้นของ Protein Molecular Weight Marker ที่ ($R^2 = 0.982$)

BMV-RB ATGTCGACTTCAGGAAGTGGTAAGATGACCCGAGCACAGCGAAGAGCTGCGGCCCGGAGG 60
 BMV-RB GCTCGAAGGGTGGTTAAACCCATTTCAGCAGGTTATTGTCGAACCAATCGCTTCCGGCCAA 120
 BMV-RB GGCAAGGCCGTTAGAGCGTTTGGCGGATACAGTGTACCAAGTGGGAAGCCTCTTCGAAG 180
 BMV-RB GCAATCACTGCAAAGGCCACCAACCAGATGGACATCTCTTTACCCTCTGAGCTTTCGTCC 240
 BMV-RB GAAAGGAACAAGCAGCTCAAAGTTGGGAGAGTTCTACTTTGGCTGGGACTCCTGCCTAGT 300
 BMV-RB ATCACTGGGCGGGTTAAGGCTTGATCGCTGAGACTCAGTCAACCCCCGAAGCTGCTTTT 360
 BMV-RB CAAGTAGCTTTGGCTGTGCGCGATTCTCGAAAGAGGTGGTGGCGGCGATGTACACAGAC 420
 BMV-RB GCTTTCAAGGGTATCACCTTGAACAGCTGGCGAAGGACCTGCGCATCTATGTGTATGCA 480
 BMV-RB TCGGAGGCTGTGGCAGAGGGAGCGGTAGCAGTGCATTTGGAAGTCGAACACGTAAGGCCT 540
 BMV-RB ACGTTGGACGACTTTTTACCCCGGTGTACTAAATATGCCCGTAGCTCGCGTTGAGCCCC 600
 BMV-RB TAGAACAGGGTTATGTTCAAGGCCCCCATGACTTGGGTTAAAGGACCCTGTCCAGGTAGG 660
 BMV-RB ACAC 664

(A)

BMV-KB ATGTCGACTTCAGGAAGTGGTAAGATGACCCGAGCACAGCGAAGAGCTGCGGCCCGGAGG 60
 BMV-KB GCTCGAAGGGTGGTTAAACCCATTTCAGCAGGTTATTGTCGAACCAATCGCTTCCGGCCAA 120
 BMV-KB GGCAAGGCCGTTAGAGCGTTTGGCGGATACAGTGTACCAAGTGGGAAGCCTCTTCGAAG 180
 BMV-KB GCAATCACTGCAAAGGCCACCAACCAGATGGACATCTCTTTACCCTCTGAGCTTTCGTCC 240
 BMV-KB GAAAGGAACAAGCAGCTCAAAGTTGGGAGAGTTCTACTTTGGCTGGGACTCCTGCCTAGT 300
 BMV-KB ATCACTGGGCGGGTTAAGGCTTGATCGCTGAGACTCAGTCAACCCCCGAAGCTGCTTTT 360
 BMV-KB CAAGTAGCTTTGGCTGTGCGCGATTCTCGAAAGAGGTGGTGGCGGCGATGTACACAGAC 420
 BMV-KB GCTTTCAAGGGTATCACCTTGAACAGCTGGCGAAGGACCTGCGTATCTATGTGTATGCA 480
 BMV-KB TCGGAGGCTGTGGCAGAGGGAGCGGTAGCAGTGCATTTGGAAGTCGAACACGTAAGGCCT 540
 BMV-KB ACGTTGGACGACTTTTTACCCCGGTGTACTAAATATGCCCGTAGCTCGCGTTGAGCCCC 600
 BMV-KB TAGAACAGGGTTATGTTCAAGGCCCCCATGACTTGGGTTAAAGGACCCTGTCCAGGTAGG 660
 BMV-KB ACAC 664

(B)

ภาพผนวกที่ 2 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จากไอโซเลท BMV-RB (A) และไอโซเลท
 BMV-KB (B) จากข้าวโพดของประเทศไทย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารสำหรับการทดสอบ ELISA

1. Carbonate coating buffer (CB), pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	กรัม
NaHCO_3	2.93	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.00	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.90	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
KCl	0.20	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หากเตรียม washing buffer (PBST) ให้เติม, 0.05% Tween-20

3. Substrate buffer, pH 9.8

Diethanolamine	97.00	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.20	กรัม
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

1. Separating buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris-base	45.50	กรัม
-----------	-------	------

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร

2. Stacking buffer (1.0 M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris-base	30.30	กรัม
-----------	-------	------

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร

3. 12% Separating gel

30% Polyacrylamide	4.00	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.30	มิลลิลิตร
10% SDS-PAGE	0.10	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.10	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

4. 6% stacking gel

30 % Polyacrylamide	0.83	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.65	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.4	มิลลิลิตร
10% SDS	0.05	มิลลิลิตร

10% ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร

ตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 4 มิลลิลิตร

5. Loading buffer 2 เท่า

2-mercaptoethanol	0.20	มิลลิลิตร
Glycerol	2.00	มิลลิลิตร
2% SDS	2.00	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.25	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M Tris-HCl ให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด

6. Running buffer 10 เท่า pH 8.3

Tris-base	30.00	กรัม
Glycine	144.00	กรัม
10% SDS	100.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

7. Staining solution

0.2% Commisssie brilliant blue-R250	2	กรัม
45% Methanol	450	มิลลิลิตร
10% acetic acid	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

8. Destaining solution

25% methanol	250	มิลลิลิตร
7% acetic acid	70	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ

1. 10X RNA extraction, pH 9.0

0.5 M glycine	3.75	กรัม
0.5 M NaCl	2.92	กรัม
0.1 M EDTA	3.75	กรัม

ปรับ pH ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2. storage buffer pH 5.0

50 mM sodium acetate	4.1	กรัม
1 mM Na ₂ EDTA	0.372	กรัม
1 mM Mg ₂ Cl	0.203	กรัม
0.1 M acetic acid	1.156	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจันทร์เพ็ญ ปุ๊กสูงเนิน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	28 กันยายน 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2544 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนหินกองวิทยาคม จังหวัดสระบุรี พ.ศ. 2548 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม พ.ศ. 2551 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	พ.ศ. 2550 ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับ บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์