การศึกษาระดับโมเลกุลของเชื้อ *Brome mosaic virus* สาเหตุโรคด่างของข้าวฟ่างในประเทศไทย

Molecular Study of *Brome mosaic virus* Causing Sorghum Mosaic Disease in Thailand

อังคาร ยิสารคุณ[1] และ คนึงนิตย์ เหรียญวรากร[1]
Arngkhan Yisankhun[1] and Kanungnit Reanwarakorn[1]

Abstract

Sorghum leaf samples showing mosaic symptoms were collected from Lop Buri, Sara Buri, Suphan Buri, Kanchana Buri, Nakhon Sawan and Phetchabun provinces. *Brome mosaic virus* (BMV) was found in the samples collected from Sara Buri (BMV-Sr-SB) province by indirect-enzyme linked immunosorbent assay. The virus was multiplied on sorghum and RNA extraction as well as reverse transcription-polymerase chain reaction were carried out to amplify BMV CP gene by specific primers. The product displayed 664 nucleotide sequence. By comparison with previously reported BMV infecting maize in Thailand, the BMV-Sr-SB showed 98-99 % and 98 % similarity of nucleotide and amino acid sequences, respectively. BMV-Sr-SB was isolated by mechanical inoculation on *Chenopodium amaranticolor* showing local lesion symptom and multiplied on sorghum. Study on percentage of disease incidence and disease severity were investigated by inoculating BMV-Sr-SB on 5 varieties of sorghums (UT 429-1, UT 1085B, KU 804, KU 439 and Insee 2) and 3 corn types (sweet corn, baby corn and field corn). All sorghum varieties and sweet corn showed 100 % disease incidence at 11 days post inoculation. Typical symptoms on sorghums and corns were white stripe except on sweet corn which expressed severity of leaf blight including stunting.

Keywords: *Brome mosaic virus*, sorghum, white stripe, sequence homology, symptom

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, E-mail address of corresponding author: agrknr@ku.ac.th
รับเรื่อง: ตุลาคม 2553
* Corresponding author: agrknr@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การเก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างในจังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ และตรวจสอบเชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) ด้วยเทคนิค indirect-enzyme linked immunosorbent assay พบเชื้อ BMV ในข้าวฟ่างที่เก็บจากจังหวัดสระบุรี (BMV-Sr-SB) นำมาเพิ่มปริมาณเชื้อบนข้าวฟ่าง สกัดอาร์เอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาด 664 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV-Sr-SB กับเชื้อ BMV ที่เข้าทำลายข้าวโพดในประเทศไทย พบมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 98-99 เปอร์เซ็นต์ และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แยกเชื้อ BMV-Sr-SB โดยปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor* ซึ่งแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง และเพิ่มปริมาณเชื้อ BMV-Sr-SB บนข้าวฟ่าง ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรค โดยปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB บนข้าวฟ่าง 5 สายพันธุ์ (UT 429- 1, UT 1085B, KU 804, KU 439, และ อินทรี 2) และข้าวโพด 3 ชนิด (ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดฝักอ่อน และ ข้าวโพดไร่) พบว่าข้าวฟ่างทั้ง 5 สายพันธุ์ และข้าวโพดหวาน เกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูกเชื้อ 11 วัน ลักษณะอาการโดยทั่วไปของโรคบนข้าวฟ่างและข้าวโพด มีลักษณะอาการด่างแถบขาวคล้ายๆกัน ยกเว้นในข้าวโพดหวานจะพบอาการใบไหม้อย่างรุนแรง และแสดงอาการต้นเตี้ยแคระแกร็นร่วมด้วย

คำนำ

เชื้อ *Brome mosaic virus* (BMV) จัดอยู่ในจีนัส *Bromovirus* ลักษณะอนุภาคเป็นทรงกลม (isometric) เส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาคขนาดประมาณ 26 นาโนเมตร องค์ประกอบของอนุภาคประกอบด้วย RNA สายเดี่ยว 3 เส้น จีโนมยาว 8,900 นิวคลีโอไทด์ (Ahlquist *et al*., 1984: Dasgupta and Kaesberg, 1982) และโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีขนาดประมาณ 22 กิโลดาลตัน (Hull, 2002) เชื้อสามารถถ่ายทอดได้โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล แต่ไม่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด มีด้วงปีกแข็งเป็นแมลงพาหะ เช่น *Diabrotica undecimpunctata* และ *D. virgitera* (Walters, 1969)

มีรายงานการพบเชื้อ BMV เป็นครั้งแรกเข้าทำลายข้าวฟ่างในรัฐเทกซัส ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1975 เมื่อเชื้อ BMV เข้าทำลายข้าวฟ่างจะทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างเป็นขีดๆ แถบขาว และต้นเตี้ยแคระแกร็น (Frederiksen, 1986) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ เช่น ข้าวโพด และอ้อยได้อีกด้วย

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาระดับโมเลกุลของเชื้อ BMV ที่เข้าทำลายข้าวฟ่างในประเทศไทย และเปรียบเทียบลักษณะอาการของโรคบนข้าวฟ่างและข้าวโพดสายพันธุ์ต่างๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการด่างแถบขาวเป็นขีดๆในพื้นที่จังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์

2. การตรวจหาเชื้อ การแยกเชื้อ และการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค indirect-enzyme linked immunosorbent assay (Indirect-ELISA) ตามขั้นตอนวิธีของ Clark and Adams (1977) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อเชื้อ BMV ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และทำการแยกเชื้อ ด้วยวิธีกลลงบนพืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor* อายุ 1 เดือน ซึ่งเชื้อ BMV จะก่อให้เกิดอาการแผลจุดเฉพาะแห่ง จากนั้นนำแผลจุด

มาเพิ่มปริมาณเชื้อ BMV ลงบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT 429-1 อายุ 7 วัน (Pooksungnurn, 2551)

3. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

แยกสกัดอาร์เอ็นเอจากใบข้าวฟ่าง ด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chang *et al.* (1993) ตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 1% agarose gel นำอาร์เอ็นเอของไวรัสใบด่างข้าวฟ่างมาสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี Reverse transcription (RT) โดยใช้ไพรเมอร์ RCP2 (GTG- TCC TAC CTG GAC AGG GTC) และเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 0.8 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร 10 pM Forward primer (FCP) (ATG TCG ACT TCA GGA ACT GGT AAG ATG) 0.5 ไมโครลิตร10 pM Reverse primer (RCP2) (GTG TCC TAC CTG GAC AGG GTC) (จันทร์เพ็ญ, 2551) 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร และ dH_2O 5.45 ไมโครลิตร ปฏิกิริยารวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (DNA thermal cycler) โดยตั้งปฏิกิริยาที่ 94 °ซ 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 94 °ซ 1 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 57 °ซ 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 72 °ซ 90 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 °ซ 10 นาที ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส บน 1 % agarose gel

4. การวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ BMV ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และที่มีรายงานในประเทศไทย ด้วยโปรแกรม ClustalW

5. ทดสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและศึกษาความรุนแรงของโรค

ปลูกเชื้อ BMV ลงบนข้าวฟ่าง 5 สายพันธุ์ อายุ 7 วัน ได้แก่ UT 429-1, UT 1085B, KU 804, KU 439 และอินทรี 2) และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดหวาน (Hybrid 3) ข้าวโพดฝักอ่อน (SG 17) และข้าวโพดไร่ (สุวรรณ 3) โดยปลูกเชื้อ BMV ลงบนข้าวฟ่าง และข้าวโพด ที่มีอายุ 7 วัน สายพันธุ์ละ 20 ต้น และมีข้าวฟ่างและข้าวโพดปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อเป็นพืชควบคุมอีกสายพันธุ์ละ 5 ต้น คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และศึกษาความรุนแรงของโรคเป็นเวลา 28 วัน

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างข้าวฟ่าง และการตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค Indirect ELISA

จากการเก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างในจังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ และตรวจหาเชื้อ BMV ด้วยเทคนิค Indirect-ELISA พบเชื้อ BMV จากตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่าง ในจังหวัดสระบุรีเท่านั้น โดยพบต้นข้าวฟ่างเป็นโรค 2 ต้น จากข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่าง 7 ต้น ซึ่งข้าวฟ่างที่เป็นโรคแสดงอาการใบด่างเป็นขีดๆ สีเหลืองตามแนวยาวของเส้นใบ

2.การแยกเชื้อ BMV บนพืชทดสอบ และการเพิ่มปริมาณเชื้อ

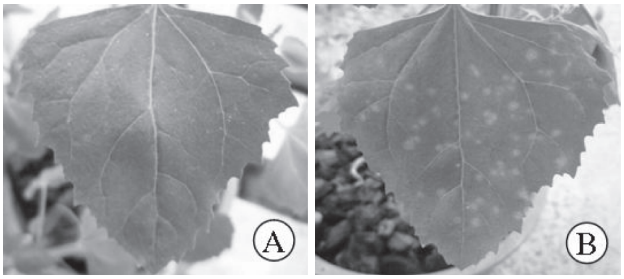
หลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ลงบน *C. amaranticolor* 4 วัน ใบจะแสดงอาการจุดสีซีดขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1) ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยปลูกเชื้อลงบนข้าวฟ่างซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อ BMV โดยตัดเพียง 1 จุด ปลูกเชื้อบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT 429 -1 อายุ 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ 3 วันข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างสามารถนำไปใช้ปลูกเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

เพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่าง โดยใช้ไพรเมอร์ FCP และ RCP2 พบว่าสามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ขนาดประมาณ 664 คู่เบสตรงตามที่ออกแบบไพรเมอร์ไว้

4. การวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในจังหวัดสระบุรี พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในจังหวัดราชบุรี (BMV-Mz-RB) และกาญจนบุรี (BMV-Mz-KB) ซึ่ง Pooksungnurn (2551) รายงานไว้ ที่ระดับ 98-99 เปอร์เซ็นต์ และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ BMV-F (Ding *et al*., 2006), BMV-R (Ahlquist *et al*., 1984) และ BMV-T (Mise *et al*., 1994) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ที่ระดับ 76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะปกติของใบ *C. amaranticolor* (A) และลักษณะจุดสีซีดหลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB 4 วัน (B)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (บนขวา) และกรดอะมิโน (ล่างซ้าย) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV

เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

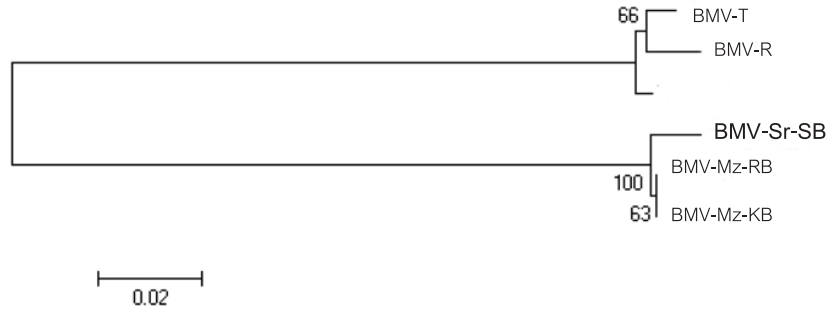
เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน

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

BMV-Sr-SB = เชื้อได้จากข้าวฟ่างในจังหวัดสระบุรี

BMV-Mz-KB และ BMV-Mz-RB = เชื้อได้จากข้าวโพดในจังหวัดกาญจนบุรี และราชบุรี ตามลำดับ

BMV-F, BMV-R และ BMV-T = BMV ที่มีรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกา รัสเซีย และญี่ปุ่น ตามลำดับ



ภาพที่ 2 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย (BMV-Sr-SB) เชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (BMV-Mz-RB และ BMV-Mz-KB) และเชื้อ BMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (BMV-F, BMV-R และ BMV-T) ด้วย โปรแกรม MEGA 4 version 4.0.1

5. การแสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคในรูป Phylogenetic tree

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย มาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับเชื้อ BMV ที่เข้าทำลายข้าวโพดในประเทศไทย (BMV-Mz-RB และ BMV-Mz-KB) และที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (BMV-F, BMV-R และ BMV-T) พบว่าเชื้อ BMV-Sr-SB ที่แยกได้จากข้าวฟ่างจัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยแต่คนละกลุ่มกับทุกไอโซเลทที่มีรายงานในต่างประเทศ (ภาพที่ 2)

6. การหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และการศึกษาความรุนแรงของโรค

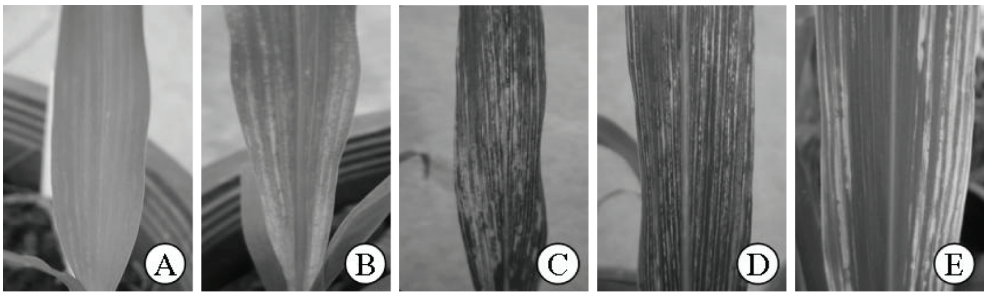
หลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ลงบนข้าวฟ่างและข้าวโพด พบว่าข้าวฟ่างทั้ง 5 สายพันธุ์ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดไร่ เกิดโรค 100% ข้าวโพดฝักอ่อนเกิดโรค 65% หลังการปลูกเชื้อ 28 วัน (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่าง มีความรุนแรงในการก่อโรคบนข้าวฟ่างอย่างสูง เห็นได้จากในตารางที่ 2 ข้าวฟ่างทุกพันธุ์ที่นำมาทดสอบเป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ 11 วัน หลังการปลูกเชื้อ นอกจากนี้ข้าวโพดที่นำมาทำการทดสอบแสดงให้เห็นว่ามีความอ่อนแอต่อเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่าง โดยเฉพาะในข้าวโพดหวานเป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่11 วันหลังการปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตามสำหรับข้าวโพดที่นำมาทดสอบพบว่ามีข้าวโพดฝักอ่อนที่แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าข้าวโพดหวาน ข้าวโพดไร่ และข้าวฟ่างทั้ง 5 สายพันธุ์ที่นำมาทำการทดสอบในครั้งนี้ โดยพบการเป็นโรคเพียง 65 เปอร์เซ็นต์หลังการปลูกเชื้อ 28 วัน

การศึกษาความรุนแรงของโรคหลังจากปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ลงบนข้าวฟ่าง 5 สายพันธุ์ และข้าวโพด 3 สายพันธุ์ พบว่าลักษณะอาการของโรคแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ อาการกลุ่มที่ 1 พบอาการบนข้าวฟ่างทั้ง 5 สายพันธุ์ (ภาพที่ 3) ข้าวโพดฝักอ่อน (ภาพที่ 4) และ ข้าวโพดไร่ (ภาพที่ 5) โดยหลังปลูกเชื้อ 3 วัน พืชแสดงอาการใบด่างเป็นจุดสีซีดขนาดเล็กบริเวณโคนใบอ่อน เมื่อเข้าสู่วันที่ 6-11 หลังการปลูกเชื้อ จากจุดเล็กๆ อาการจะพัฒนาเชื่อมต่อกันเป็นอาการด่างแถบขาว (white stripe) อาการกลุ่มที่ 2 พบบนข้าวโพดหวาน (ภาพที่ 6) หลังจากปลูกเชื้อ 3 วัน ข้าวโพดหวานจะแสดงอาการใบด่างเป็นจุดสีซีดบริเวณโคนใบอ่อน เมื่อเข้าสู่วันที่ 6-11 วัน หลังการปลูกเชื้อ ข้าวโพดหวานจะแสดงอาการใบยอดงอพับไม่แข็งแรง อาการจะพัฒนาไปอย่างรุนแรงทำให้ใบซีดขาวเกือบทั้งใบและพัฒนาเป็นอาการใบไหม้ หลังจากวันที่ 11 ของการปลูกเชื้อเป็นต้นไป นอกจากนั้นพบว่าโดยทั่วไปใบอ่อนของข้าวโพดหวานที่แตกยอดมาใหม่จะแสดงอาการใบไหม้ บางต้นแสดงอาการใบไหม้จนตาย ส่วนข้าวโพดหวานต้นที่ไม่ตายการเจริญเติบโตจะช้าลงและต้นเตี้ยแคระแกร็น

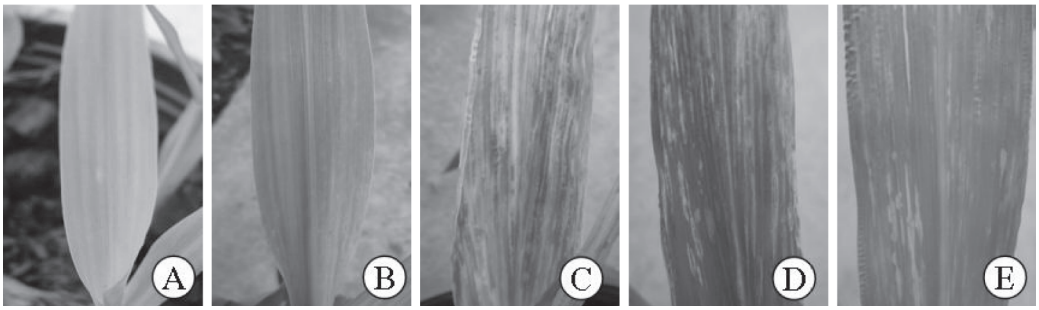
จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างมีความรุนแรง สามารถก่อโรคอย่างรุนแรงทั้งบนข้าวโพด และข้าวฟ่าง ที่ทำการทดลอง แม้ว่าข้าวโพดฝักอ่อนจะแสดงถึงความต้านทานมากกว่า ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดไร่และข้าวฟ่างทุกพันธุ์ ที่นำมาทดสอบ แต่ข้าวโพดฝักอ่อนก็ยังเป็นโรคถึง 65 เปอร์เซ็นต์ หลังปลูกเชื้อเพียง 28 วัน แสดงให้เห็นว่า เชื้อ BMV จากข้าวฟ่างมีความรุนแรงทั้งบนข้าวฟ่าง และข้าวโพด ฉะนั้นในอนาคตควรได้มีการทดสอบความรุนแรงของเชื้อบนพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เช่น อ้อย หรือวัชพืชชนิดต่างๆ ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกัน เพราะอาจเป็นพืชอาศัยในการอยู่ข้ามฤดูของเชื้อได้ เป็นต้น

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ลงบนข้าวฟ่างและข้าวโพด ที่ 6, 11, 16 และ 28 วัน

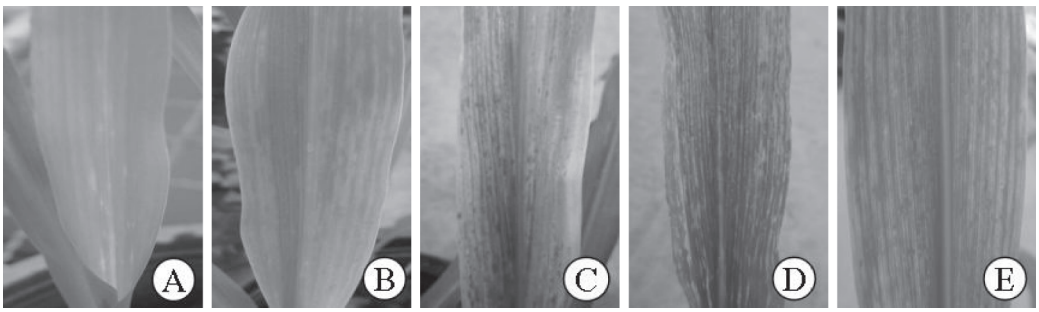
พืชอาศัย	พันธุ์	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค			
		6 วัน	11 วัน	16 วัน	28 วัน
ข้าวฟ่าง	UT 429-1	80	100	100	100
	UT 1085B	60	100	100	100
	KU 804	55	100	100	100
	KU 439	65	100	100	100
	ซินที 2	55	100	100	100
ข้าวโพด	Hybrid 3	90	100	100	100
	SG 17	20	55	55	65
	สุวรรณ 3	55	75	100	100



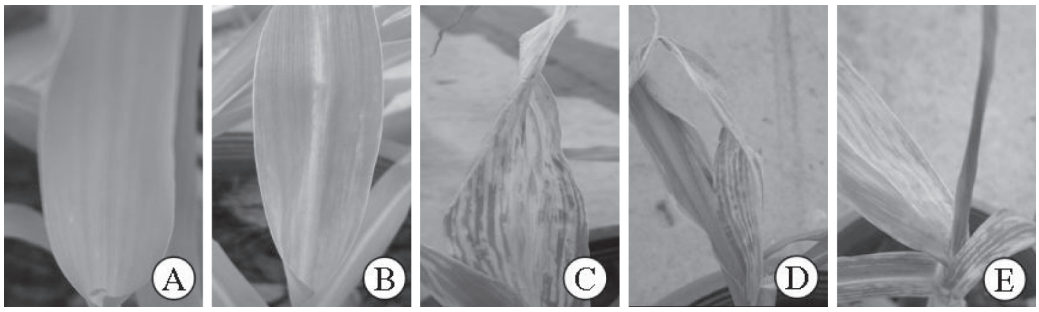
ภาพที่ 3 ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวฟ่าง (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ



ภาพที่ 4 ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดฝักอ่อนสายพันธุ์ SG 17 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ



ภาพที่ 5 ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดไร่สายพันธุ์ สุวรรณ 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ



ภาพที่ 6 ลักษณะการพัฒนาอาการใบด่างของข้าวโพดหวานสายพันธุ์ Hybrid 3 (A-E) หลังปลูกเชื้อ BMV-Sr-SB ที่ 3, 6, 11, 16 และ 28 วัน ตามลำดับ โดยข้าวโพดหวานแสดงอาการใบไหม้ (C-E) หลังปลูกเชื้อไวรัสที่ 11-28 วัน

สรุปผล

จากการเก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างในจังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ ตรวจสอบเชื้อ BMV เบื้องต้นด้วยเทคนิค Indirect-ELISA พบเชื้อ BMV ในจังหวัดสระบุรีเท่านั้น การสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 664 คู่เบส วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ BMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทยที่มีรายงานเมื่อปี 2551 ที่ระดับ 98 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคพบว่าข้าวฟ่างและข้าวโพดหวานพันธุ์ Hybrid 3 เกิดโรค 100% ลักษณะอาการด่างของข้าวฟ่างและข้าวโพดส่วนใหญ่มีลักษณะอาการด่างเป็นแถบสีขาว (white stripe) แต่พบอาการที่รุนแรงในข้าวโพดหวานซึ่งแสดงอาการใบไหม้ ทำให้ข้าวโพดหวานตาย 15 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าข้าวโพดหวานส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตช้าลง ต้นเตี้ยแคระแกร็น

เอกสารอ้างอิง

Pooksungnurn, J. 2551. Survey and Diagnosis of Maize Mosaic Disease Caused by *Brome mosaic virus* in Thailand. Master's Thesis, Kasetsart University, Nakhon Pathom. 88 pp (in Thai).

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

Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for Isolating RNA from pine trees. **Plant Mol. Biol. Rept.** 11:113-116.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** 34: 475-483.

Dasgupta, R. and P. Kaesberg. 1982. Complete nucleotide sequences of the coat protein messenger RNAs of *Brome mosaic virus* and *Cowpea chlorotic mottle virus*. **Nucleic Acids Res.** 10: 703-713.

Ding, X. S., W. L. Schneider, S. R. Chaluvadi, M. A. Mian and R. S. Nelson.2006. Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. **Mol. Plant Microbe Interact.** 19: 1229-1239.

Hull, R. 2002. **Mathews Plant Virology**; 4th ed. Academic press, San Diego. 1001 pp.

Mise, K., M. Mori, H. Nakayashiki, T. Koyama, T. Okuno and I. Furusawa. 1994. Nucleotide sequence of a set of cDNA clones derived from the *Brome mosaic virus* ATCC66 strain and comparison with the Russian strain genome. **Nippon Shokubutsu Byori Gakkaiho.** 60: 454-462.

Frederiksen, R. A.. 1986. **Compendium of Sorghum Diseases.** American Phytopathological Society, USA.

Walters, H. J. 1969. Beatel transmission of plant virus. **Adv. Virus. Res.** 15: 339-363.