การวิเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* สาเหตุโรคใบด่างของข้าวฟ่างในประเทศไทย

Coat Protein Gene Analysis of *Sugarcane mosaic virus* Causing Mosaic Disease on Sorghum in Thailand

อังคาร ยิสารคุณ[1] และคนึงนิตย์ เหรียญวรากร[1]

Arngkhan Yisankhun[1] and Kanungnit Reanwarakorn[1]

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างในจังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ จากการตรวจสอบเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) ด้วยเทคนิค indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (indirect ELISA) พบเชื้อ SCMV ไอโซเลทในจังหวัดกาญจนบุรี (KB) นครสวรรค์ (NW) และเพชรบูรณ์ (PB) เพิ่มปริมาณเชื้อบนข้าวฟ่าง สกัดอาร์เอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีนในส่วนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ด้วยเทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV พบว่าเชื้อ SCMV ทั้ง 3 ไอโซเลท มีความยาวของ CP gene ขนาด 942-966 คู่เบส ซึ่งกำหนดการสร้างโพลีเปปไทด์ขนาด 314-322 กรดอะมิโน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกันที่ระดับ 90-98 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนกันที่ระดับ 93-99 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับเชื้อ SCMV ที่เคยมีรายงานมาแล้ว พบว่าเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างมีความเหมือนกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพด และอ้อย ในประเทศไทย ที่ระดับ 90-99 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : ไวรัสใบด่างอ้อย ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ข้าวฟ่าง

ABSTRACT

Sorghum leaf samples showing mosaic symptom were collected from Lop Buri, Sara Buri, Suphan Buri, Kanchana Buri, Nakhon Sawan and Phetchabun provinces. *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) were found in Kanchana Buri (KB), Nakhon Sawan (NW) and Phetchabun (PB) isolates by indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (indirect ELISA) detection. These three isolates were multiplied on sorghum, RNA extraction and RT-PCR with CP-gene specific primers. The CP gene of these isolates contain 942-966 nucleotides encoded for 314-322 amino acids, they shown 90-98% and 93-99% similar identity of nucleotides and amino acid sequences, respectively. By comparing with previous reports and GenBank databases, those sorghum isolates were displayed similarity of 90-99% amino acid sequences with SCMV causing disease on maize and sugarcane in Thailand.

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

Keywords : *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), CP gene, *Sorghum bicolor*

E-mail : g5061123@ku.ac.th, arngkhan_s@hotmail.com

คำนำ

โรคใบด่างข้าวฟ่างที่เกิดจากเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) จัดเป็นอีกโรคหนึ่งที่มีความสำคัญในข้าวฟ่าง เมื่อเชื้อเข้าทำลายข้าวฟ่างจะทำให้ข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่าง ต้นเตี้ยแคระ และมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง (Richard, 1986) ที่อุณหภูมิของสภาพอากาศต่ำกว่า 21 °ซ หรือข้าวฟ่างที่อ่อนแอต่อโรค อาการของโรคจะพัฒนาเป็นใบสีแดง สำหรับความรุนแรงของโรคเมื่อเชื้อเข้าทำลายข้าวฟ่างแล้วข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่าง จะทำให้ผลผลิตของข้าวฟ่างลดลงประมาณ 0-8 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าอาการของโรคที่รุนแรง ข้าวฟ่างจะแสดงอาการใบแดงและต้นเตี้ยแคระ ซึ่งทำให้ผลผลิตลดลงถึง 33-75 เปอร์เซ็นต์ (Seifers and Hackerott, 1987) นอกจากนี้เชื้อ SCMV ยังสามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอื่นๆ เช่น ข้าวโพด และอ้อย

SCMV จัดอยู่ในจีนัส *Potyvirus* ลักษณะของอนุภาคเป็นแบบท่อนยาวคด มีแมลงพาหะที่สำคัญคือเพลี้ยอ่อน โดยมีการถ่ายทอดไวรัสในแบบ non-persistent นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกล (mechanical-transmission) และสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (seed transmission) ได้อีกด้วย (Tsai and Falk, 1999)

สำหรับในประเทศไทยมีแหล่งปลูกข้าวฟ่างที่สำคัญอยู่ในจังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาจญจนบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ แต่ยังไม่มีการศึกษาเชื้อ SCMV ที่ก่อให้เกิดโรคกับข้าวฟ่างในระดับโมเลกุล ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายข้าวฟ่าง และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลาย ข้าวฟ่าง ข้าวโพด และอ้อยในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการด่างในพื้นที่จังหวัดลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี เพชรบูรณ์ และนครสวรรค์ ในปี พ.ศ. 2551-2552

2. การตรวจหาและการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Indirect-ELISA ตามขั้นตอนวิธีของ Clark and Adams (1977) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อเชื้อ SCMV ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT-325B โดยบดใบข้าวฟ่างที่มีอาการด่างใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จากนั้นนำน้ำคั้นพืชไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลลงบนข้าวฟ่างที่มีอายุ 7 วัน เมื่อข้าวฟ่างแสดงอาการด่างชัดเจนจึงนำมาทำการทดลองต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

แยกสกัดอาร์เอ็นเอจากใบข้าวฟ่าง ด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chang *et al.* (1993) ตรวจสอบอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 1% agarose gel นำอาร์เอ็นเอของไวรัสใบ

ด่างข้าวฟ่างมาสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี Reverse- transcription (RT) โดยใช้ไพรเมอร์ Oligo dT24 (TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT) 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 (SsCP2) (TCG AAA ATG GTT GCT CAC CA) 0.5 ไมโครลิตร10 pM Reverse primer (dT24) 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA Polymerase 0.25 ไมโครลิตร และ dH_2O 5.45 ไมโครลิตร ปฏิกิริยารวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (DNA thermal cycle) โดยตั้งปฏิกิริยาที่ 94 °ซ 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 94 °ซ 90 วินาที เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ให้เป็นสายเดี่ยว (denature) ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 55 °ซ 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 72 °ซ 90 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 °ซ 10 นาที และทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR เหมือนในปฏิกิริยา PCR ขั้นต้นแต่เปลี่ยน Forward primer เป็น SsCPF3 (CGC GAA CCT GGC AAA GGA AGG C) Reverse primer เป็น SsCPR3 (TGG TGA GCA ACC ATT TTC GA) และเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นที่ 2 เป็น 57 °ซ ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส บน 1 % agarose gel

4. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสใบด่างข้าวฟ่าง

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี RT-PCR มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส บน 1 % agarose gel แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) และเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ (vector) pGEM®-T easy (Promega coporation) แล้วนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวซึ่งคาดว่ามีพลาสมิดสายผสม นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

แยกสกัดพลาสมิดตามวิธี Miniprep plasmid purification (QIAGEN®) นำพลาสมิดสายผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค dideoxy-chain termination (Sanger *et al*., 1977) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อไวรัส SCMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และแสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสในรูป Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4 version 4.0.2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจหาเชื้อ SCMV ด้วยเทคนิค Indirect-ELISA

จากการเก็บตัวอย่างใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการด่างใน 6 จังหวัด พบข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างแถบสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน นำมาตรวจหาเชื้อ SCMV ด้วยเทคนิค Indirect-ELISA พบเชื้อ SCMV ในจังหวัดกาญจนบุรี 2 ตัวอย่าง นครสวรรค์ 1 ตัวอย่าง และเพชรบูรณ์ 9 ตัวอย่าง

2. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

เลือกตัวแทนจังหวัดละ 1 ตัวอย่าง มาทำการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) จากอาร์เอ็นเอของเชื้อ SCMV ทั้ง 3 จังหวัด ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ SsCP2 กับ T24 และ SsCPF3 กับ SsCPR3 พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในส่วน CP gene ได้ โดยไอโซเลทของจังหวัดนครสวรรค์ (SCMV-Sr-NW) และ กาญจนบุรี (SCMV-Sr-KB) มีขนาด 942 คู่เบส และไอโซเลทของจังหวัดเพชรบูรณ์ (SCMV-Sr-PB) มีขนาด 966 คู่เบส

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกันที่ระดับ 90-98 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะมิโนมีความเหมือนกันที่ระดับ 93-99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ที่มีรายงานเข้าทำลายข้าวโพด และอ้อยในประเทศไทย และ ในต่างประเทศ พบว่าเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างมีความเหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพดของประเทศไทย (SCMV-Mz-NM, SB และ TK) ที่ระดับ 92-99 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมือนกันกับเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยของประเทศไทย (SCMV-KB, UD, NW, UT, NM, PJ, BR, KK และ NP) ที่ระดับ 90-96 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมือนกันกับ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศจีน (SCMV-HN, SD, SX, GD และ BJ) ที่ระดับ 84-86 เปอร์เซ็นต์ และอ้อย (SCMV-LP, Xgs และ YH) ที่ระดับ 79-83 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมือนกันกับ SCMV ที่แยกได้จากอ้อยในประเทศสหรัฐอเมริกา (SCMV-D และ E) ที่ระดับ 81-83 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมือนกันกับ SCMV ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศสเปน (SCMV-S) ที่ระดับ 84-85 เปอร์เซ็นต์ และมีความเหมือนกันกับ MDMV-B (SCMV-MDB) ที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศออสเตรเลียที่ระดับ 83-86 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ดังนั้นเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายข้าวฟ่าง ข้าวโพด และอ้อยในประเทศไทยเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีความเหมือนกันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Shukla and Ward, 1988)

4. การแสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคในรูป Phylogenetic tree

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ที่แยกได้จากข้าวฟ่างในประเทศไทย มาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลาย ข้าวโพด และอ้อย ในประเทศไทย และที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 2) เมื่อนำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* (ภาพที่ 1) พบว่าเชื้อ SCMV-Sr-KB, SCMV- Sr-NW และ SCMV-Sr-PB จัดอยู่ในกลุ่ม SCMV ซึ่งประกอบด้วยไวรัสหลายชนิด เช่น *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV) และ *Johnson grass mosaic virus* (JGMV) เป็นต้น โดยที่เชื้อ SCMV ที่แยกได้จากทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายข้าวโพดในประเทศไทย

Table 1 Percentage similarity of amino acid and nucleotide sequences of SCMV coat protein gene.

Percentage similarity of nucleotide sequences

Percentage similarity of amino acid sequences

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
1. SCMV-Sr-KB		98	90	98	98	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	72	72	82	68	81	84	82	69	72	94	81	73	70	64	64	63	79	64	52	54	61	60	60	57	59	61	61	54
2. SCMV-Sr-NW	99		90	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	79	72	82	67	82	83	8	78	79	94	82	73	70	64	64	64	79	64	52	54	61	60	59	57	59	61	61	54
3. SCMV-Sr-PB	93	93		89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	90	90	70	68	83	71	73	74	73	72	72	89	73	67	71	66	65	67	83	66	48	52	60	60	60	58	59	60	61	53
4. SCMV-KB	95	95	90		99	99	99	99	98	99	98	98	98	97	97	68	68	82	67	81	83	82	68	71	94	82	72	71	64	63	63	79	64	52	54	61	60	60	57	59	61	61	53
5. SCMV-UD	95	95	90	99		99	99	99	98	99	98	99	99	97	97	68	68	82	67	81	83	82	68	71	94	82	72	71	64	63	63	79	64	52	54	61	60	60	57	59	61	62	53
6. SCMV-NW	95	95	90	98	98		99	99	99	99	98	98	98	97	97	68	68	80	68	79	83	79	69	71	94	79	72	71	64	66	63	79	64	52	54	61	61	60	57	59	61	62	54
7. SCMV-UT	95	96	90	98	99	99		99	98	99	98	99	99	97	97	68	68	82	78	81	83	82	68	71	94	82	72	71	64	63	63	79	64	52	54	61	61	60	57	59	61	62	54
8. SCMV-NM	96	96	91	98	98	98	98		99	99	98	99	99	97	97	68	68	80	67	79	83	80	68	71	94	80	72	71	64	63	63	79	64	52	54	61	60	59	57	59	61	62	53
9. SCMV-PJ	95	96	90	97	97	97	97	98		99	98	99	99	97	97	68	68	80	67	79	83	80	68	71	94	80	71	70	64	63	63	79	64	52	54	61	60	60	57	60	61	62	53
10. SCMV-BR	96	96	91	98	98	98	99	99	98		98	99	99	97	97	68	68	80	67	80	83	80	68	71	94	80	72	71	64	63	63	79	64	52	54	61	60	59	57	59	61	61	53
11. SCMV-KK	95	95	90	98	98	97	97	97	97	98		99	98	97	97	68	68	82	67	81	84	82	68	71	94	82	68	71	64	63	63	79	64	51	53	61	60	59	57	59	61	61	53
12. SCMV-NP	96	96	91	97	97	97	98	98	97	98	98		99	97	97	68	68	82	67	81	83	82	68	71	94	82	68	71	64	63	63	79	64	52	53	61	60	59	57	59	61	61	54
13. SCMV-Mz-NM	97	97	92	96	96	96	96	97	96	97	96	96		97	97	69	68	82	68	81	83	82	68	71	94	82	72	71	64	63	63	79	64	52	54	61	61	59	57	59	61	62	54
14. SCMV-Mz-SB	99	99	92	94	95	95	95	95	95	96	95	95	96		100	72	68	82	78	82	83	82	78	79	94	82	73	71	64	63	63	79	64	52	54	61	60	59	57	59	61	61	53
15. SCMV-Mz-TK	99	99	92	94	95	95	95	95	95	96	95	95	96	100		72	68	82	78	82	83	82	78	79	94	82	73	71	64	63	63	79	64	52	54	61	60	59	57	59	61	61	53
16. SCMV-D	83	83	82	79	80	81	80	81	81	79	79	80	81	83	83		96	82	82	82	82	83	83	83	72	82	97	95	65	69	65	83	65	48	52	63	65	61	57	61	63	62	55
17. SCMV-E	81	81	81	78	79	79	79	79	78	79	78	79	80	81	81	96		81	81	81	82	82	82	82	71	82	97	96	66	67	66	69	66	48	51	65	65	60	57	60	65	62	56
18. SCMV-HN	86	86	84	83	83	83	83	84	83	84	83	84	85	86	86	85	83		84	98	93	98	85	84	82	99	82	82	65	65	63	84	65	54	54	62	61	63	60	62	62	62	55
19. SCMV-LP	79	79	80	77	77	77	77	77	77	77	77	77	78	79	79	85	81	86		83	82	84	98	95	68	84	81	82	66	68	65	81	66	51	50	61	61	62	60	60	61	61	54
20. SCMV-SD	85	85	84	82	82	82	83	83	83	83	82	83	84	85	85	86	83	98	86		93	98	84	84	83	98	82	82	65	65	64	84	65	59	49	64	61	63	60	62	64	64	55
21. SCMV-SP	85	85	84	81	82	82	82	82	82	83	82	83	84	85	85	84	81	95	85	95		93	83	83	75	93	81	78	65	65	64	80	65	54	54	61	61	61	58	61	61	62	54
22. SCMV-SX	86	86	84	82	83	83	83	83	83	84	83	84	84	86	86	87	83	99	87	99	95		85	84	82	99	82	83	65	65	64	84	65	49	49	64	61	63	60	62	64	64	54
23. SCMV-XgS	81	81	82	78	79	79	79	79	79	79	78	79	80	81	81	87	82	89	97	89	87	89		96	79	85	82	79	67	68	65	82	67	50	50	62	61	62	59	60	62	61	54
24. SCMV-YH	81	81	83	79	79	79	80	80	79	80	79	80	80	81	81	88	83	89	95	89	87	90	97		80	84	82	82	67	67	65	82	67	50	50	62	61	62	59	61	61	61	54
25. SCMV-GD	86	86	85	82	83	83	83	84	83	84	83	84	84	85	85	86	83	94	89	94	93	94	91	91		82	81	70	64	63	64	83	64	52	54	61	60	60	57	60	61	61	53
26. SCMV-BJ	86	86	84	82	83	83	83	83	83	84	83	84	84	86	86	86	83	99	87	98	95	99	89	90	94		82	83	65	65	63	84	65	54	54	62	61	63	60	63	62	62	55
27. SCMV-Bris	83	83	81	80	81	80	81	81	81	81	80	81	82	83	83	98	96	83	83	83	85	84	84	85	84	83		97	65	69	65	82	65	49	52	65	64	60	57	60	65	62	56
28. SCMV-A1	84	84	83	81	82	81	82	82	82	82	81	82	83	83	83	97	97	85	83	85	86	85	84	85	85	85	99		66	66	65	71	66	52	53	65	63	63	57	61	65	63	55
29. MDMV-A	73	73	72	71	71	72	72	71	71	71	71	72	72	72	72	74	75	74	69	74	74	74	71	74	73	74	76	75		92	88	64	100	51	51	76	76	72	67	75	76	77	69
30. MDMV-SP	74	74	74	72	72	73	73	72	72	72	72	73	73	73	73	76	77	74	70	74	74	74	72	73	74	74	77	77	96		88	67	92	50	50	76	76	72	67	75	77	77	69
31. MDMV-BG	73	73	73	72	72	72	72	72	72	72	71	72	73	73	73	75	77	74	72	74	73	74	74	74	74	74	76	76	94	93		64	88	50	50	76	78	76	69	75	77	78	70
32. MDMV-B	86	86	83	84	84	84	84	84	84	85	84	84	86	86	86	84	84	86	83	86	84	86	85	85	87	86	83	85	74	75	74		64	51	51	61	60	61	59	59	61	61	54
33. MDMV-A1	73	73	72	71	71	72	72	71	71	71	71	72	72	72	72	74	75	74	69	74	74	74	71	74	73	74	76	75	100	96	94	74		51	51	76	76	72	67	75	76	77	69
34. JGMV-MDO	58	58	57	57	57	58	57	57	57	57	57	57	57	58	58	57	58	57	55	57	57	57	56	55	56	58	57	56	58	56	56	58	58		89	52	52	54	47	54	52	52	47
35. JGMV	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	55	58	58	58	56	56	57	58	58	57	58	57	58	58	58	93		59	50	50	51	52	59	58	56
36. SrMV-Yuhang	70	70	69	69	69	70	70	69	69	69	69	69	68	70	70	76	75	71	69	70	70	71	71	71	71	71	74	77	79	80	80	66	79	55	56		96	80	78	81	100	96	95
37. SrMV-Xiaoshan	69	70	66	66	67	67	67	67	66	67	66	67	68	69	69	74	74	69	69	69	70	69	70	70	71	69	73	76	79	80	80	66	79	55	56	95		80	77	80	96	95	95
38. SrMV-H	68	68	65	66	67	67	67	67	67	67	66	68	67	70	70	74	73	70	68	69	70	70	70	70	71	70	72	74	78	79	79	67	79	56	55	90	90		97	97	81	78	68
39. SrMV-I	70	70	66	69	69	69	69	69	69	69	69	69	68	69	69	75	74	70	69	69	70	70	71	71	71	70	74	76	80	80	80	66	80	55	56	96	97	90		97	78	78	79
40. SrMV-M	53	53	51	52	52	52	53	52	52	52	52	52	53	52	52	57	56	52	53	52	53	52	55	55	54	52	58	57	59	59	58	52	59	40	41	84	85	79	88		81	81	81
41. SrMV	68	68	64	66	66	67	67	66	66	66	66	68	67	70	70	74	73	70	68	68	69	70	70	70	71	70	71	74	78	79	78	67	78	55	54	90	90	98	90	78		96	95
42. SrMV-VN/SC5	70	68	64	66	66	67	67	66	66	66	66	66	67	70	70	74	73	70	68	69	70	70	70	70	71	70	71	73	78	79	78	67	78	55	54	90	90	98	90	79	98		96
43. SrMV-YN1	70	70	69	69	69	70	70	69	69	69	69	69	68	70	70	76	75	71	69	70	70	71	71	71	71	71	74	77	79	80	80	66	79	55	56	100	95	90	96	84	90	90	

Table 2 SCMV CP gene sequences used for comparison and phylogenetic analysis.

Virus	Sources	Accession number
1. SCMV-Sr-KB	Thailand (Sorghum, Kanchana Buri)	This study
2. SCMV-Sr-NW	Thailand (Sorghum, Nakhon Sawan)	This study
3. SCMV-Sr-PB	Thailand (Sorghum, Phetchabun)	This study
4. SCMV –KB	Thailand (Sugarcane, Kanchana Buri)	*1
5. SCMV-UD	Thailand (Sugarcane, Udon Thani)	*1
6. SCMV-NW	Thailand (Sugarcane, Nakhon Sawan)	*1
7. SCMV-UT	Thailand (Sugarcane, Suphan Buri)	*1
8. SCMV-NM	Thailand (Sugarcane, Nakhon Ratchasima)	*1
9. SCMV-PJ	Thailand (Sugarcane, Prachuap Khiri Khan)	*1
10. SCMV-BR	Thailand (Sugarcane, Buri Ram)	*1
11. SCMV-KK	Thailand (Sugarcane, Khon Kaen)	*1
12. SCMV-NP	Thailand (Sugarcane, Nakhon Pathom)	*1
13. SCMV-Mz-NM	Thailand (Maize, Nakhon Sawan)	*2
14. SCMV-Mz-SB	Thailand (Maize, Sara Buri)	*2
15. SCMV-Mz-TK	Thailand (Maize, Tak)	*2
16. SCMV-D	Sugarcane (USA)	U57356
17. SCMV-E	Sugarcane (USA)	AY836523
18. SCMV-HN	Maize (China)	AF494510
19. SCMV-LP	Sugarcane (China)	AJ310102
20. SCMV-SD	Maize (China)	AY149118
21. SCMV-Sp	Maize (Spain)	AM110759
22. SCMV-SX	Maize (China)	AY569692
23. SCMV-XgS	Sugarcane (China)	AJ310103
24. SCMV-YH	Sugarcane (China)	AJ310104
25. SCMV-GD	Maize (China)	AJ310105
26. SCMV-BJ	Maize (China)	AY042184
27. SCMV-Bris	Sugarcane (Australia)	AJ278405
28. SCMV-A1	Sugarcane (Australia)	AJ278405
29. MDMV-A	USA	U07216
30. MDMV-SP	Maize (Spain)	AM110758
31. MDMV-BG	Maize (Bulgaria)	AJ001691
32. MDMV-B	Maize (Australia)	D00949
33. MDMV-A1	Maize (USA)	U07216
34. JGMV-MDO	USA	U07217
35. JGMV	Johnson grass (Australia)	NC_003606
36. SrMV-Yuhang	Sugarcane (China)	AJ310198
37. SrMV-Xiaoshan	Sugarcane (China)	NC_004035
38. SrMV-H	Sorghum	U57358
39. SrMV-I	-	U57359
40. SrMV-M	-	U57360
41. SrMV	sugarcane and maize(China)	AJ310198
42. SrMV-VN/SC5	Vietnam	DQ925433
43. SrMV-YN1	Sugarcane (China)	EF507715

*1 = วิริยาพร และคณะ, 2550

*2 = วันวิสา และคณะ, 2550

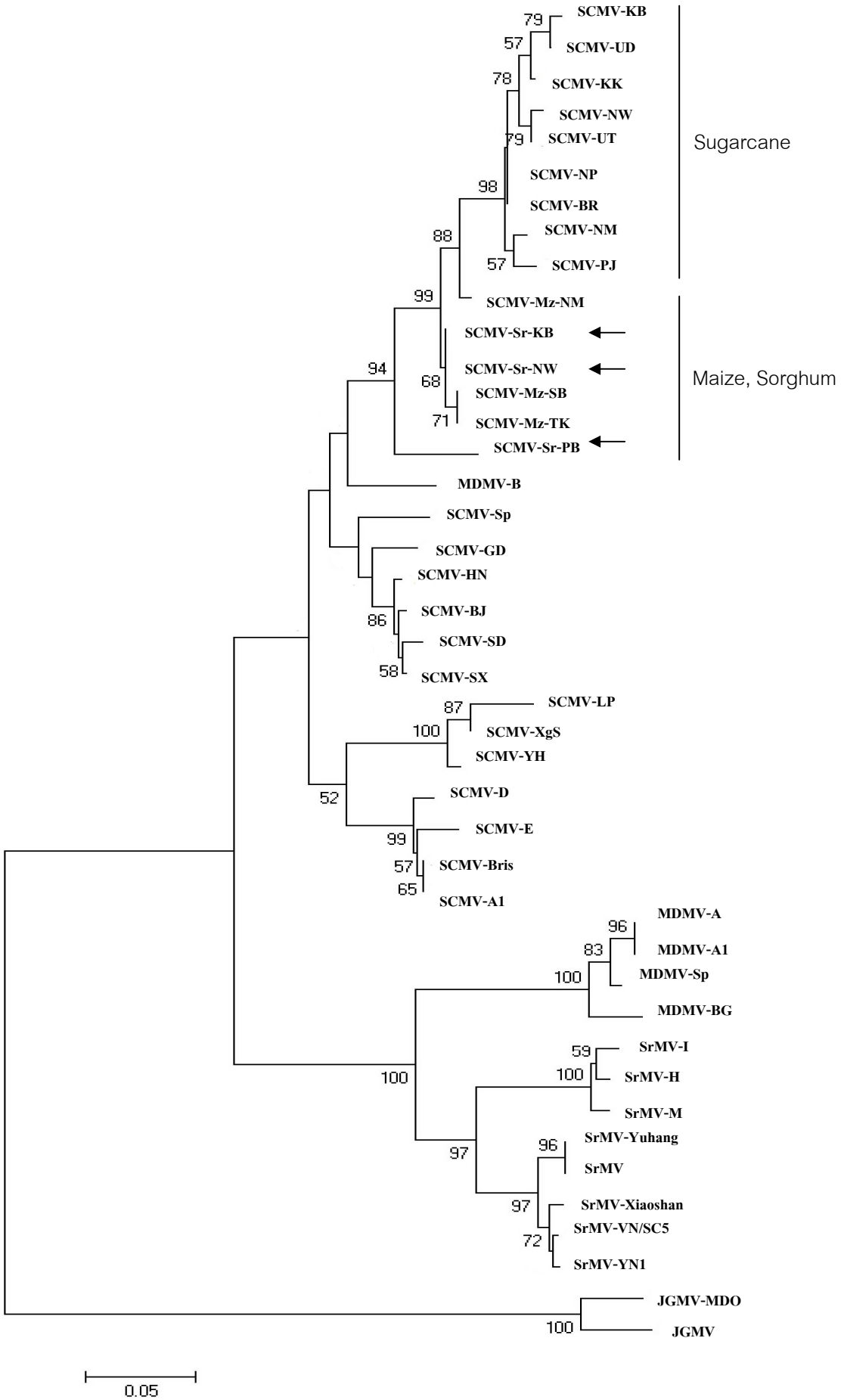

Figure 1 Phylogenetic tree of coat protein amino acid sequences of SCMV using MEGA 4 version 4.0.2 with Neighbor-joining method, 1,000 bootstrap replicates.

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างข้าวฟ่างที่แสดงอาการใบด่างใน 6 จังหวัด ตรวจสอบเชื้อ SCMV เบื้องต้นด้วยเทคนิค Indirect-ELISA พบเชื้อ SCMV ในจังหวัดกาญจนบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ สกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR ได้ CP gene ขนาด 942-966 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 ไอโซเลท มีความเหมือนกันที่ระดับ 90-98 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนกันที่ระดับ 93-99 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายข้าวโพดและอ้อยในประเทศไทย พบว่ามีความเหมือนกันที่ระดับ 90-99 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเชื้อ SCMV ที่เข้าทำลายข้าวฟ่าง ข้าวโพด และอ้อยในประเทศไทย เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

วิริยาพร ชัยวาณิชสกุล คนึงนิตย์ เหรียญวรากร เรวัต เลิศฤทัยโยธิน และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2550. การวิเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบด่างอ้อยที่ก่อให้เกิดโรคในอ้อยของประเทศไทย. วารสารโรคพืช 21: 1-12.

วันวิสา ศิริวรรณ์ คนึงนิตย์ เหรียญวรากร และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2550. การศึกษาอาการบนข้าวโพดหวานและข้าวโพดไร่ที่เกิดจากไวรัสใบด่างแคระข้าวโพด (SCMV-MDB). วารสารโรคพืช 21: 13-22.

Chang, S., J. Puryear and J. Caimey. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine tree. *Plant Mol. Biol. Reptr*. 11: 113-116.

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

Richard, A.F. 1986. Compendium of sorghum disease. American Phytopathological Society. USA.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Couison. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Oroc.Natl. Acad Sci*. 74: 5463-5467.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3 ed. Cold Sprind Harbor Laboratory Press, New York.

Seifers, D.L. and H.L. Hackerott, 1987. Estimates of yield loss and virus titre in sorghum hybrids infected with maize dwarf mosaic virus strain B. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 19: 81-86.

Shukla, D.D. and C.W. Ward. 1988. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* 69: 2703-2710.

Tsai, J.M. and B.W. Falk. 1999. Insect vector and their pathogens of maize in the tropics. University of Minnesota. Available Sorce: http://www.ejb.org/feedblack/proceedings/01/abstracts.html, May 20, 2006.