

การศึกษาจีโนมของไวรัสบันชีทอปกล้วยที่พบในกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้าในประเทศไทย Genome Characterization of Banana Bunchy Top Virus in Musa AAA cv. Kluai 'Hom' and Musa ABB cv. Kluai 'Namwa' in Thailand

เยาวภา ตันติวานิช¹, รัชนี หงษ์ประยูร¹ และพิศสุวรรณ เขียมสมบัติ¹
Yaowapa Tantiwanich¹, Ratchanee Hongprayoon¹ and Pissawan Chiemsombat¹

บทคัดย่อ

ไวรัสบันชีทอปกล้วย (*Banana bunchy top virus*, BBTV) ทำให้กล้วยแสดงอาการยอดอื่น แคระแกร็นและไม่ให้ผลผลิต โรคนี้แพร่ระบาดได้ง่ายผ่านหน่อกล้วยทำให้ควบคุมโรคได้ยาก BBTV เป็นไวรัสในสกุล *Babuvirus* วงศ์ *Nanoviridae* มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบวงปิดจำนวน 6 โมเลกุล จึงมักจะพบการสลับสายดีเอ็นเอของไอโซเลตต่างกันได้ ในสภาพธรรมชาติทำให้เชื้อมีความหลากหลาย การวิจัยนี้ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างจีโนมของ BBTV ที่พบในกล้วยหอมทองและกล้วยน้ำว้า 4 ไอโซเลต ผลการศึกษาพบว่าจีโนมของไวรัสบันชีทอปกล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้าส้มและกล้วยน้ำว้า มีขนาดแตกต่างกัน แต่ละสายมีโครงสร้างตามแบบฉบับจีโนมของไวรัสบันชีทอปกล้วย โดยพบรหัสพันธุกรรมของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนที่จำเพาะ 5 ชนิดบนดีเอ็นเอ R, S, M, C, N ได้แก่ replication initiator protein (Rep), coat protein (CP), cell-to-cell movement protein (MP), cell-cycle link protein (Clink) และ nuclear shuttle protein (NSP) ตามลำดับ ส่วนดีเอ็นเอ U3 ไม่พบรหัสที่สังเคราะห์โปรตีน ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า BBTV ทั้ง 4 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 97.8-99.3% และจัดอยู่ในกลุ่ม South-East Asian (SEA) ดีเอ็นเอสาย R, S, M, C และ N คล้ายคลึงกับ BBTV ไอโซเลต Q529-CN จากมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีนที่ระดับ 93.5-94.9% ส่วนดีเอ็นเอ U3 ของทั้ง 4 ไอโซเลตมีลักษณะเฉพาะตัวมีความใกล้เคียงกับไอโซเลต DanZhou-CN จากมณฑลไหหนาน สาธารณรัฐประชาชนจีนที่ระดับ 89.47% จากการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป RPD ในการวิเคราะห์ลำดับเบสพบความเป็นไปได้ที่ DNA-U3 เกิดการสลับสายและแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์กัน

คำสำคัญ: ไวรัสบันชีทอปกล้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ การสลับสายดีเอ็นเอ กล้วยหอมทอง กล้วยน้ำว้า

Abstract

Banana bunchy top virus (BBTV) causes a serious disease of banana plants (*Musa* spp.) in many regions of the world. Banana plants infected by BBTV produce stunt of new shoots with a “bunchy top” appearance, and do not produce fruit. BBTV genome comprises six components of circular single stranded DNA with the frequent reassortment evidences that cause genetic diversity. This study investigated the nucleotide sequence and genome structure of four BBTV isolates detected in Kluai ‘Hom’ and Kluai ‘Namwa’. The results showed that their components exhibited typical structure of BBTV genome organization but were different in sizes. The components DNA-R, U3, S, M, C and N, each contained a typical open reading frame coded for replication initiator protein (Rep), coat protein (CP), cell-to-cell movement protein (MP), cell-cycle link protein (Clink), and nuclear shuttle protein (NSP), respectively, with the exception of DNA-U3 which has not been assigned for any gene product. Pairwise comparison of full genome nucleotide sequences revealed that four isolates of the studied BBTV were 97.8-99.3% similarity

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

and phylogenetically placed in the South-East Asian group (SEA). The five components, except DNA-U3, shared 93.5-94.9% similarity to BBTV isolate Q529 from Yunnan, Republic of China. The nucleotide sequence of DNA-U3 of all Thai isolates is distinct from other previously recorded and shared only 89.47% similarity with DanZhou isolate from Hainan, Republic of China. By using RDP program, the reassortment and recombination events of DNA-U3 were detected.

Keywords: BBTV, nucleotide sequence, reassortment, *Musa* spp. Kluai 'Hom thong', Kluai 'Namwa'

คำนำ

โรคต้นช้ำโทปกกล้วย Banana bunchy top disease (BBTD) จัดเป็นโรคร้ายแรงที่ทำความเสียหายให้กับกล้วย มีสาเหตุจาก *Banana bunchy top virus* (BBTV) กล้วยที่เป็นโรค ต้นจะเตี้ยแคระ ใบที่แตกใหม่ขอบใบจะเหลือง ใบแคบเล็กลง และไม่ให้ผลผลิต ไวรัสนี้ชนิดนี้แพร่กระจายได้จากการแยกหน่อกล้วยจากกอที่เป็นโรคไปปลูกต่อ และมีเพลี้ยอ่อนกล้วย (*Pentalonia nigronervosa*) เป็นพาหะนำโรค โรคนี้พบครั้งแรกที่เกาะฟิจิ ในปี ค.ศ. 1889 ต่อมาพบแพร่ระบาดใน ศรีลังกา ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ อียิปต์ ออสเตรเลีย หมู่เกาะแปซิฟิกใต้ อินเดีย แอฟริกา และมลรัฐฮาวาย (Lockhart, 2002; Singh *et al*, 2011) ทำให้ผลผลิตกล้วยได้รับความเสียหายถึง 80% สำหรับในประเทศไทย พัฒน์พงศ์ และคณะ (2536) ได้ตรวจพบ BBTV ในกล้วยที่แสดงอาการยอดอื่น (bunchy top) จากจังหวัดกาญจนบุรี จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี นนทบุรี และกรุงเทพมหานคร โดยใช้วิธี ELISA รวมทั้งตรวจพบในเพลี้ยอ่อนกล้วยด้วย BBTV เป็นไวรัสในสกุล Babuvirus วงศ์ *Nanoviridae* อนุภาคของ BBTV มีรูปร่างแบบ icosahedral ขนาด 18-20 นาโนเมตร ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวแบบวงปิด จำนวน 6 วง (สาย) คือ DNA-R DNA-U3 DNA-S DNA-M DNA-C และ DNA-N แต่ละวงมีขนาดประมาณ 1,000-1,100 นิวคลีโอไทด์ จีโนมรวมมีขนาดประมาณ 6,800 นิวคลีโอไทด์ บนดีเอ็นเอสาย R, S, M, C, N มีรหัสพันธุกรรมของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนได้สายละ 1 ชนิด ได้แก่ replication initiator protein (Rep), coat protein (CP), cell-to-cell movement protein (MP), cell-cycle link protein (Clink) และ nuclear shuttle protein (NSP) ตามลำดับ ส่วนดีเอ็นเอ U3 มีรายงานการตรวจพบรหัสสังเคราะห์โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ การจำแนกสายพันธุ์ของ BBTV โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมมาเปรียบเทียบกันและวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า แบ่งออกได้เป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรก คือ South Pacific group (SPG) และมีการแบ่งกลุ่มย่อย PIO group (Pacific Indian Ocean group) กลุ่มที่สองคือ Asian group (AG) และแบ่งกลุ่มย่อย SEA group (South East Asia group) ทั้งนี้หากเชื้อไวรัสเข้าทำลายร่วมกันหลายสายพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ อาจจะทำให้ BBTV เกิดการสลับสายดีเอ็นเอกัน (reassortment) และทำให้มีสายดีเอ็นเอจาก BBTV ต่างสายพันธุ์กันมาบรรจุอยู่เป็นอนุภาค นอกจากนี้ดีเอ็นเอทั้ง 6 สายของ BBTV สามารถแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอบางส่วนกันได้ (recombination) ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ BBTV มากขึ้น การวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างกล้วยจากแหล่งปลูกที่สำคัญมาแยกเชื้อ BBTV รวมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างจีโนมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมทั้ง 6 ไมเลกุล เพื่อจัดจำแนกเชื้อ และสืบหาความสัมพันธ์กับจีโนมของ BBTV ที่พบในต่างประเทศ รวมทั้งตรวจสอบโอกาสเกิดการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่าง BBTV ต่างสายพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างกล้วยที่เป็นโรค

สำรวจและเก็บใบกล้วยจากต้นที่แสดงอาการคล้ายโรคบันชีทอป ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 ในแปลงของศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร จังหวัดพิจิตร ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตสุโขทัย จังหวัดสุโขทัย สวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ กรุงเทพฯ สถานีวิจัยปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา รวมทั้งแหล่งปลูกกล้วยที่สำคัญของประเทศไทย เช่น กำแพงเพชร ตาก นครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก จันทบุรี ชลบุรี ระยอง สระบุรี เพชรบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา อุบลราชธานี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษหนองคาย เลย ชัยภูมิ เก็บตัวอย่างกล้วยที่มีอาการใบเป็นขีดสีเขียวเข้ม ใบด่างเหลือง ใบมีขนาดเล็กลง แคบสั้น สีเหลือง ต้นแคระแกร็น ใบขึ้นรวมกันเป็นกระจุก ขอบใบ เหลือง ใส่งูพลาสดักเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัส และขุดหน่อจากต้นที่มีอาการ นำมาปลูกและเก็บรักษาไว้ในโรงเรือน

2. การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณจีโนมของไวรัส

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกล้วยโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) และวิธีการตามคำแนะนำของบริษัท นำดีเอ็นเอที่ได้มาเป็นต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสทั้ง 6 สาย ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสายดีเอ็นเอตามที่มีรายงานมาก่อน (Table 1) แยกขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ใน 1% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1/2X TBE จากนั้นย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide อัตรา 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator

Table 1 Primers used for amplification of six different components of *Banana bunchy top virus* (BBTV) by polymerase chain reaction (PCR).

Component	Primer name	Primer sequence (5' – 3')	References
DNA-R	1C-F	GATGTTCAACATCAACAATC	Yu <i>et al.</i> , 2012
	1C-R	CATCCAGCATACCATATC	
	BBTV-DNA1-F	GGAAGAAGCCTCTCATCTGCTTCAGAGAGC	Wickramarachchi <i>et al.</i> 2016
	BBTV-DNA1-R	CAGGCGCACACCTTGAGAAACGAAAGGGAA	
DNA-U3	BBTV-DNA2-F	GGACGGACCGAAATACT	
	BBTV-DNA2-R	ACGTGTCCTACGAATTAA	
DNA-S	3C-F	ACTTGAAGCAGGAGTCGCAAC	Yu <i>et al.</i> , 2012
	3C-R	TTGACCATACGTCACCCTTGA	
DNA-M	4C-F	TTACGAATGCACGTGACTGATAT	
	4C-R	TGTAGTGCACGTTGAATGCTTA	
DNA-C	DNA-CF	TGGAAGAAAGTCGCTCGCAAGG	Isalam <i>et al.</i> , 2010
	DNA-CR	TAGCAGACCATTCACGAACTCC	
DNA-N	BBTV-DNA6-F	GTATTAGTAACAGCAACAAC	Wickramarachchi <i>et al.</i> 2016
	BBTV-DNA6-R	TAACCTCCATGTCTCTGCTCC	

3 การโคลนนิ่งและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

โคลนนิ่งดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้พลาสมิดพาหะ pGEM-Teasy (Promega) เริ่มจากแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากจากเจลโดยใช้ QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany) จากนั้นเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดพาหะ และทำการถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกอยู่ ตามวิธี blue-white colony selection ร่วมกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอแต่ละสาย ทั้ง 6 สาย จากนั้นสกัดพลาสมิดสายผสมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (The GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบชนิดของยีนด้วยโปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) แล้วเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งสายดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Seqman (DNASTAR Lasergene software, DNASTAR Inc., USA)

4. การศึกษาโครงสร้างจีโนมและ Phylogenetic tree

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาครบทั้งสายแล้ว นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีน โดยใช้โปรแกรม ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนและศึกษาความสัมพันธ์กันและสร้าง Phylogenetic tree ของจีโนมด้วยโปรแกรม Megalign (DNASTAR Lasergene software, DNASTAR Inc., USA) และ MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013)

5. การวิเคราะห์การสลับสายดีเอ็นเอ (reassortment) และการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ (recombination)

วิเคราะห์จากจีโนมรวม (concatenate) โดยใช้โปรแกรม RDP 4.96 (Martin *et al.*, 2015) และตรวจหาด้วยวิธี RDP (Martin and Rybicki, 2000), GENECONV (Padidam, Sayer, and Fauquet, 1999), Bootscan (Martin *et al.*, 2005), Maxchi (Smith, 1992), Chimera (Posada and Crandall, 2001), SiScan (Gibbs, Armstrong, and Gibbs, 2000), และ 3 Seq (Boni, Posada and Feldman, 2007) ทั้งนี้เหตุการณ์ของการสลับสายและแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอที่ผ่านเกณฑ์จะต้องตรวจพบด้วยวิธีการไม่น้อยกว่า 5 วิธี ใน 7 วิธีที่ใช้ตรวจหา มีค่า p-value อย่างน้อย >0.005 ในวิธีดังกล่าว รวมทั้งมีผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่สนับสนุนเหตุการณ์นั้น (Stainton *et al.*, 2015)

ผลการทดลองและวิจารณ์

อาการของโรค การตรวจหาเชื้อ BBTV ด้วยวิธี PCR และการโคลนดีเอ็นเอ

ตัวอย่างกล้วยที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นกล้วยหอมทอง [Musa (AAA group)] และกล้วยน้ำว้า [Musa (ABB group)] ที่แสดงอาการต้นเตี้ยแคระ ใบขึ้นรวมกันเป็นกระจุก ใบที่แตกใหม่ขอบใบจะเหลือง ใบส่วนใหญ่มีสีเหลืองขนาดเล็กลง แคบสั้น ปลายใบม้วน (Figure 1) ผลการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบเชื้อ BBTV ในตัวอย่างกล้วย 13 ตัวอย่าง จาก 6 จังหวัด คือ อุบลราชธานี เลย ชัยภูมิ หนองคาย นครราชสีมา และชลบุรี (Table 2) เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสายดีเอ็นเอทั้ง 8 คู่ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณจีโนมของไวรัสทั้ง 6 สาย ให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงตามความคาดหมายทุกคู่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 6 สายเพื่อโคลนดีเอ็นเอของจีโนมรวมจากตัวอย่างกล้วย 4 ไอโซเลท ได้แก่ กล้วยน้ำว้าจากจังหวัดหนองคาย (ไอโซเลท Nongkhai, NK-TH) และนครราชสีมา (ไอโซเลท Nakhon Ratchasima, NM-TH) กล้วยน้ำว้าส้มจากจังหวัดชัยภูมิ (ไอโซเลท Chaiyaphum, CP-TH) และกล้วยหอมทองจากจังหวัดชลบุรี (ไอโซเลท Chonburi, CB-TH)

Table 2 Symptomatic banana plants collected from fields in different locations and the incidence of *Banana bunchy top virus* as diagnosed by PCR using each six component specific primers.

Banana cultivar	Location (Province)	Symptom	No. collected	No. infected
Kluai 'Hom Thong'	Loei	Dwarf bush, leaf edge yellowing	20	5
Kluai 'Namwa Nuan Jun'	Sukhothai	Mosaic leaves	5	0
Kluai 'Hom'	Ubon Ratchathani	Dwarf bush, leaf edge yellowing	1	1
Kluai 'Namwa'	Buri Ram	Mosaic leaves	2	0
Kluai 'Hom'	Si Sa Ket	Dwarf bush,	2	0
Kluai 'Namwa'	Tak	Dwarf bush, mosaic leaves	8	0
Kluai 'Namwa'	Chanthaburi	Mosaic leaves	5	0
Kluai 'Namwa Som'	Chaiyaphum	Dwarf bush, leaf edge yellowing	1	1
Kluai 'Namwa'	Nong Khai	Dwarf bush, leaf edge yellowing	2	2
Kluai 'Namwa'	Nakhon Ratchasima	Dwarf bush, leaf edge yellowing	2	2
Kluai 'Hom Thong'	Chonburi	Dwarf bush, leaf edge yellowing	17	2
Kluai 'Namwa'	Bangkok	Mosaic leaves	15	0

จากผลการสำรวจเก็บตัวอย่างกล้วยที่แสดงอาการคล้ายโรคบันชีทอปและนำมาตรวจด้วยเทคนิค PCR พบว่าอาการของกล้วยน้ำว้าที่อายุน้อยอาจไม่ชัดเจน และการแพร่ระบาดของโรคในแต่ละพื้นที่ของการสำรวจครั้งนี้ ยังไม่กระจายมากนัก อัตราพบโรคจึงไม่สูง ก่อนหน้านั้น พัฒนพงศ์ และคณะ (2536) และ ไมตรีและคณะ (2537) ใช้เทคนิค ELISA และโมโนโคลนอลแอนติบอดี ตรวจหาเชื้อ BBTV ในกล้วยหอม กล้วยน้ำว้า และกล้วยป่า รวมทั้งใน เพลี่ยอ่อน *Pentalonia nigronervosa* โดยเห็นว่ามีความจำเป็นต้องตรวจสอบต้นกล้วยที่นำเข้ามารวมทั้งต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพันธุ์กล้วยเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อป้องกันการระบาดของโรคที่อาจจะติดมากับพันธุ์กล้วย แต่ในผลการทดลองไม่ได้ระบุความถี่ของการตรวจพบ รวมทั้งพบว่ากล้วยหอมทองแสดงอาการของโรคค่อนข้างรุนแรงกว่ากล้วยน้ำว้า ดังรายงานในหลายภูมิภาคที่พบว่าอาการของโรคบันชีทอปของกล้วยมักจะปรากฏอยู่ในกลุ่มของ Cavendish หรือกล้วยหอม ที่มีจีโนมเป็น AAA ซึ่งอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ (Harding *et al.*, 1993; Lockhart, 2002) และยังไม่มีพันธุ์ใดที่ต้านทานต่อโรค ซึ่งความอ่อนแอของกล้วยในกลุ่ม AAA ต่อ BBTV นั้นพบได้มากในพื้นที่ปลูกกล้วยในประเทศแถบ New World เช่น ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น แต่จะมีความต้านทานเกิดขึ้นบ้างในกล้วยที่เป็นพันธุ์ผสมของ A และ B (A x B hybrid)

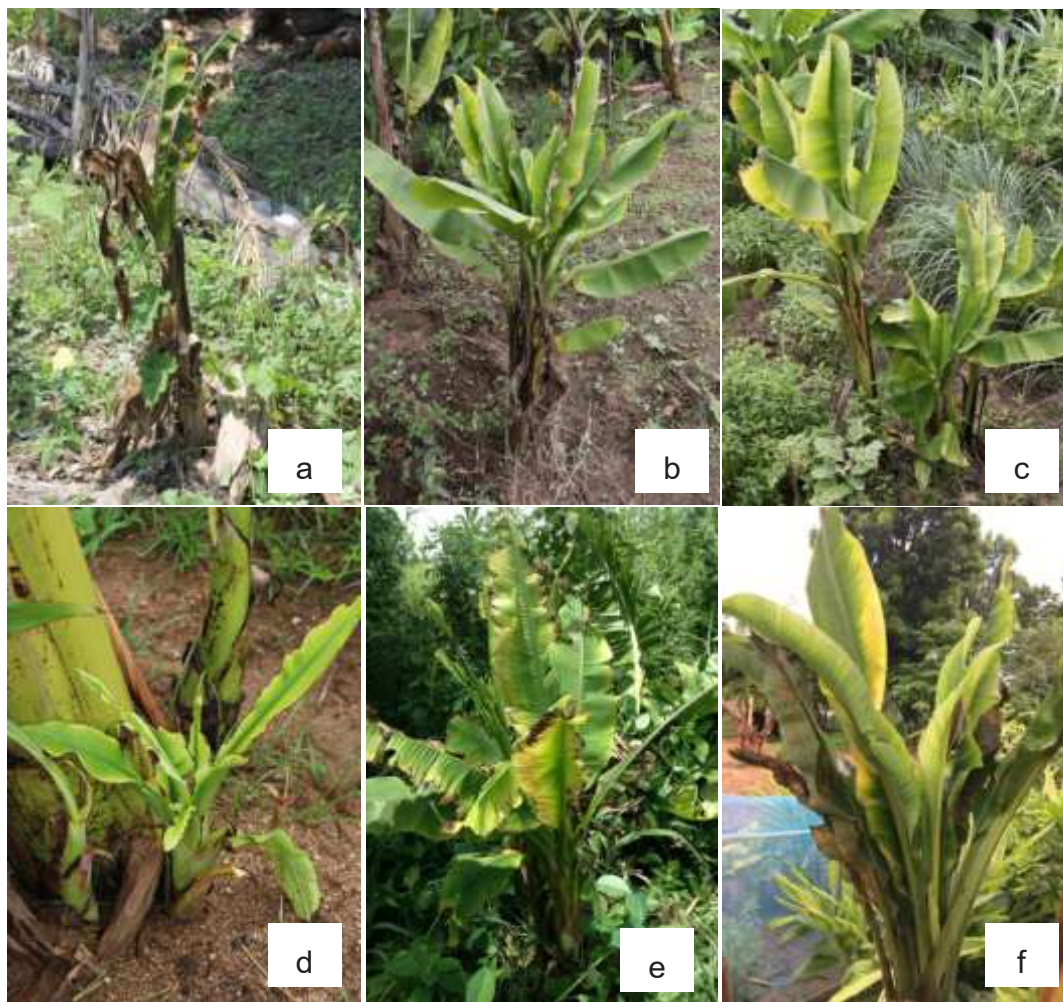


Figure 1 Symptoms of BBTB banana plant under the survey during March 2012 to September 2016 and *Banana bunchy top virus* was detected by polymerase chain reaction in these plants.

- | | | |
|---------------------|--------------|----------------------|
| a. Ubon Ratchathani | b. Loei | c. Chaiyaphum |
| d. Chonburi | e. Nong Khai | f. Nakhon Ratchasima |

โครงสร้างจีโนมของเชื้อ BBTB

จีโนมของไวรัสบันชีทอปกล้วยหอมทอง 2 ไอโซเลท กลัวย่น้ำว่าส้ม 1 ไอโซเลท และกลัวย่น้ำว่า 1 ไอโซเลท มีขนาดแตกต่างกัน แต่แต่ละสายมีโครงสร้างตามแบบฉบับจีโนมของไวรัสบันชีทอปกล้วย ดีเอ็นเอทุกสายประกอบด้วย stem-loop common region (CR-SL) บริเวณ loop เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่มีลำดับเบสจำนวน 9 นิวคลีโอไทด์ (nonanucleotide) คือ 'TATT ATTAC' เป็นตำแหน่งเริ่มต้นของการจำลองสายดีเอ็นเอ (origin of replication) บริเวณอนุรักษ์อีกแห่งหนึ่งเรียกว่า major common region (CR-M) มีจำนวน 82-106 นิวคลีโอไทด์ รวมทั้งพบรหัสนิวคลีโอไทด์ที่เป็น TATA box และ polyadenylate (poly A) อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันของทุกสาย (Figure 2) รหัสพันธุกรรมของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนบนดีเอ็นเอ R, S, M, C, N แปลรหัสให้โปรตีนสายละ 1 ชนิดได้แก่ replication initiator protein (Rep), coat protein (CP), cell-to-cell movement protein (MP), cell-cycle link protein (Clink) และ nuclear

shuttle protein (NSP) ตามลำดับ ส่วนดีเอ็นเอ U3 ทั้ง 4 ไอโซเลท พบรหัสพันธุกรรมสำหรับโปรตีนขนาดเล็กที่ไม่ทราบหน้าที่ (Hyder *et al.*, 2011) โดยเมื่อนำเอาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ U3 ที่ศึกษาในครั้งนี้ (Table3) ไปตรวจสอบ พบว่าดีเอ็นเอ U3 ทุกไอโซเลทของไทยมีการสร้างโปรตีนขนาดเล็กสองส่วนที่ไม่ต่อเนื่องกัน (truncated ORF) กล่าวคือส่วนปลาย N-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 35 เรสิดิวส์ และส่วนปลาย C-terminal มีกรดอะมิโน 42 เรสิดิวส์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสไม่ต่อเนื่องจำนวน 24 นิวคลีโอไทด์คั่นกลาง (ไม่ได้แสดงไว้ในภาพ) ซึ่งเมื่อใช้โปรแกรม blastp หาชนิดของโปรตีนสองส่วนนี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ putative protein สายยาวประมาณ 89 เรสิดิวส์ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ของดีเอ็นเอ U3 จากอินเดีย (KY559330) จีโนมของ BBTv จากกล้วยของประเทศไทยที่ศึกษาทั้งหมดนี้มีความสอดคล้องกับโครงสร้างดีเอ็นเอของ BBTv ไอโซเลทอื่นๆ ในกลุ่ม SEA (AG) (พิกุลแก้ว และศรีเมฆ, 2556, Stainton *et al.*, 2015; Wickramaarachchi *et al.*, 2016)

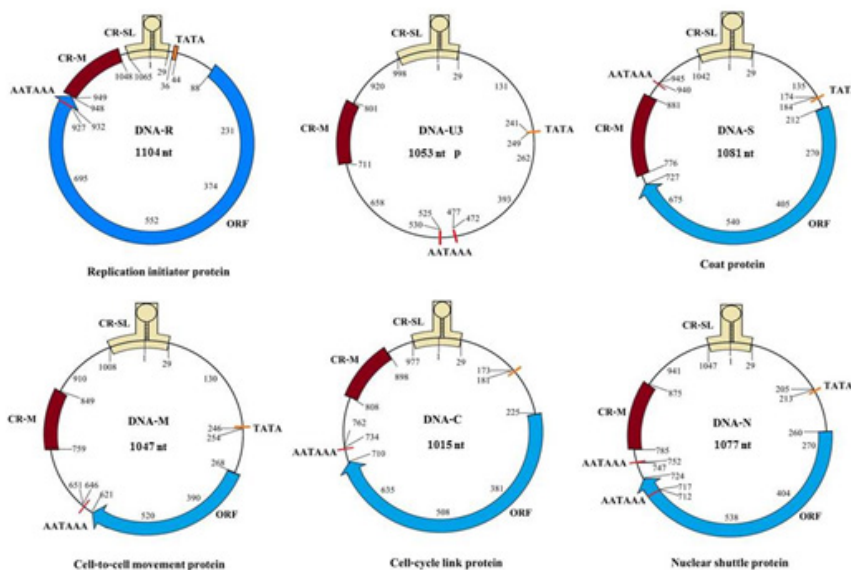


Figure 2 Organization of the genomic components of the Banana bunchy top virus (BBTV) isolate Nakhon Ratchasima-TH. Each circle represented each components of DNA-R, DNA-U3, DNA-S, DNA-M, DNA-C, DNA-N, indicating length of DNA strand (nts), positions of the encoding protein and the essential motifs, including, the major common region (CR-M), stem-loop common region (CR-SL), the consensus TATA box and the polyadenylation signal sequences (AATAAA).

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการจัดเรียงดีเอ็นเอ 6 สายให้เป็นจีโนมรวม (concatenate) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tool/>) พบว่าจีโนมของ BBTv ทั้ง 4 ไอโซเลทของไทย มีค่า % identity เท่ากับ 97.8-99.3% ซึ่งจัดเป็นจีโนมของไวรัสชนิดเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบจีโนมรวม 6 สายกับจีโนมรวมของ BBTv ไอโซเลทจากต่างประเทศที่มีข้อมูลบันทึกอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Table 3) พบว่าไอโซเลทจากประเทศไทยมีค่า % identity สูงสุดที่ระดับ 93.5-94.9% กับ BBTv ไอโซเลท Q529-CN จากมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน และ 84.1-94.9% กับไอโซเลทอื่นๆ จากประเทศในทวีปเอเชียในกลุ่มย่อย SEA (South East Asia) ของกลุ่ม AG (Asian Group) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทในกลุ่ม SPG มีค่า identity 83.8-90.5% (Table 4)

เมื่อเปรียบเทียบดีเอ็นเอแยกสายในระหว่างไอโซเลทของไทยด้วยกัน DNA-S มีความหลากหลายมากที่สุด ส่วน DNA-R และ DNA-N มีความอนุรักษ์สูง เปรียบเทียบไอโซเลทของไทยกับที่อื่น พบว่า DNA-R มีค่า identity สูงที่สุด 98.6% และ DNA-U3 มีค่า identity ต่ำที่สุด 75.0% สำหรับ DNA-U3 ไอโซเลทของไทย เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA-U3 ของไอโซเลทอื่นที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ครบทั้ง 6 สายที่นำมาเปรียบเทียบจีโนมรวม พบค่า identity สูงสุด 84.7% กับไอโซเลท Q624-TW ในกลุ่มย่อย SEA ของกลุ่ม AG แต่ไม่ถึง 90% จึงได้นำข้อมูลของ DNA-U3 จาก ไอโซเลทอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (ไม่ครบทั้ง 6 สาย) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กัน และพบว่า DNA-U3 ทั้ง 4 ไอโซเลทของไทย กับไอโซเลท DanZhou และ LeDong จากมณฑลไหหนาน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนมีค่า identity สูงสุดเท่ากับ 89.6 และ 85.7% ตามลำดับ

Table 3 Details of concatamers and the GenBank accession numbers of all selected sequences used in the analyses.

Isolate ID	Country	Group	GenBank accession number					
			DNA-R	DNA-U3	DNA-S	DNA-M	DNA-C	DNA-N
Nongkhai-TH	Thailand	SEA	KY427063	KY427065	KY427064	KY427061	KY427060	KY427062
Chonburi-TH	Thailand	SEA	MF039867	MF039869	MF039868	MF039865	MF039864	MF039866
Chaiyaphum-TH	Thailand	SEA	MF039873	MF039875	MF039874	MF039871	MF039870	MF039872
Nakhon Ratchasima-TH	Thailand	SEA	MF039879	MF039881	MF039880	MF039877	MF039876	MF039878
Haikou-CN	China	SEA	HQ378190	HM231314	HQ378191	HQ378192	HQ378193	HQ378194
Q529-CN	China	SEA	KM607678	KM607807	KM607535	KM607239	KM607099	KM607387
Q624-TW	Taiwan	SEA	KM607685	KM607814	KM607541	KM607246	KM607105	KM607393
Taiwan	Taiwan	SEA	DQ826390	DQ826391	DQ826393	DQ826394	DQ826395	DQ826396
MS18-PH	Philippines	SEA	KM607665	KM607794	KM607521	KM607228	KM607086	KM607373
Kandy-SL	Sri Lanka	SPG	JN250593	JN250594	JN250595	JN250596	JN250597	JN250598
Lucknow-IN	India	SPG	DQ256267	EU402601	EF687856	EU516323	EU051379	EU391633
Australia	Australia	SPG	S56276	L41576	L41574	L41575	L41578	L41577
TJ3-PK	Pakistan	SPG	JX170762	JX170764	JX170763	JX170760	JX170759	JX170761
TOS90-TO	Tonga	SPG	KM607719	KM607857	KM607581	KM607291	KM607145	KM607436
Mvz-80-CG	Congo	SPG	KU687084	KU759872	KU759889	KU759890	KU759891	KU759892
8_150510-EG	Egypt	SPG	KM607612	KM607747	KM607470	KM607176	KM607033	KM607324
KP9-HI-US	USA	SPG	KM607660	KM607787	KM607514	KM607222	KM607080	KM607367
Malawi 73	Malawi	SPG	JQ820453	JQ820454	JQ820455	JQ820456	JQ820457	JQ820458
Rwanda 138	Rwanda	SPG	JQ820459	JQ820460	JQ820461	JQ820462	JQ820463	JQ820464
Q281_WS-AS	Samoa	SPG	KM607673	KM607802	KM607529	KM607094	KM607236	KM607382
TW3	Taiwan	SEA	EU366169	EU366170	EU366171	EU366172	EU366173	-
Fiji	Fiji	SPG	AF416466	-	AF148944	-	-	-
IG33-ID	Indonesia	SEA	AB186924	-	AB186927	-	-	-
JY7-Okinawa-JP	Japan	SEA	AB108458	-	AB108451	-	-	-
MY03	Myanmar	SPG	AB252641	-	AB252644	-	-	-
V6-VN	Vietnam	SEA	AB113659	-	AB113661	-	-	-
LeDong-CN	China	SEA	-	GU559703	-	-	-	-
DanZhou-CN	China	SEA	-	GU559705	-	-	-	-
ABTV-MY	Malaysia	Outgroup	NC010319	NC010315	NC010316	NC010317	NC010318	NC010314

SEA=South East Asian group, SPG=South Pacific group, ABTV= *Abaca bunchy top virus*

Table 4 Percentage nucleotide sequence identity of *Banana bunchy top virus* (BBTV) isolate Chaipayum-TH with other isolates of different geographic region belonging to South East Asian (SEA-AG) and Pacific-Indian Ocean (PIO-SPG) groups and an outgroup, *Abaca bunchy top virus* (ABTV).

Isolate Chaipayum-TH	Percentage nucleotide sequence identity			
	Thai isolates	SEA- AG group	PIO-SPG group	ABTV-Outgroup
Concatenate	97.9-99.3	84.1-94.9	83.8-90.5	63.0-63.8
DNA-R	99.2-99.7	93.9-98.6	90.4-95.7	75.4-75.7
DNA-U3	98.8-99.2	75.0-89.6	78.1-83.1	52.2-52.5
DNA-S	90.6-99.5	86.0-98.1	81.0-94.2	62.7-66.3
DNA-M	98.4-99.4	86.3-94.6	81.8-94.6	55.2-55.8
DNA-C	98.7-99.7	88.5-97.2	85.0-90.0	61.2-61.5
DNA-N	99.1-99.6	89.1-98.0	85.2-89.7	63.6-64.0

พิกุลแก้ว และคณะ (2556) ศึกษาจีโนมของเชื้อ BBTV ที่พบในกล้วยหอมจากสถานีวิจัยปากช่อง จ. นครราชสีมา ที่มีลักษณะอาการ ต้นเตี้ยแคระ ยอดเป็นกระจุกหรือยอดอื่น ขอบใบเหลือง ใบและก้านรวมถึงลำต้น มีเส้นสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน แผ่นใบมีเส้นสีเขียวเข้มคล้ายตะขอ และได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอทั้ง 6 สาย รวมถึงได้เปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอรวมละ 1 สาย พบว่า DNA-R, DNA-S มีความใกล้เคียง 96-99% กับไอโซเลทจากประเทศเวียดนาม DNA-U3 ใกล้เคียง 94% กับไอโซเลทจากประเทศจีน ส่วน DNA-C DNA-M และ DNA-N มีความคล้ายคลึงกันกับ ไอโซเลทจากประเทศจีนที่ระดับ 83, 86 และ 94% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้บันทึกข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank จึงไม่มีข้อมูลที่สามารถนำมาเปรียบเทียบกัน แต่ในการวิจัยครั้งนี้ได้จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของสายดีเอ็นเอทั้ง 6 สายเป็นจีโนมรวม (concatenate) เพื่อให้เปรียบเทียบได้ทั้งจีโนมตามวิธีการที่เสนอโดย Muhire *et al.* (2014) โดยใช้เกณฑ์จำแนกชนิดที่ระดับ <94% ทำให้สามารถระบุสายพันธุ์ของ BBTV ไอโซเลทของไทยแยกออกจากไอโซเลทอื่นที่มีบันทึกใน GenBank ได้อย่างชัดเจน

DNA-U3 ไอโซเลท Chaipayum (CP-TH) Nakhon Ratchasima (NM-TH) และ Nongkhai (NK-TH) จากกล้วยน้ำว้า (ABB) มีขนาด 1053 นิวคลีโอไทด์ ส่วนไอโซเลท Chonburi (CB-TH) จากกล้วยหอมทอง (AAA) มีขนาด 1055 นิวคลีโอไทด์ แต่เนื่องจากค่าความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ U3 ทั้ง 4 ไอโซเลทของไทยกับไอโซเลทที่มีบันทึกในฐานข้อมูล GenBank ต่ำกว่า 90% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DNA-U3 ไอโซเลทของไทยเป็นชนิดที่แตกต่างจากไอโซเลทอื่นในทั้งสองกลุ่มดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า DNA-U3 ไอโซเลทของไทยมีนิวคลีโอไทด์ (เบส) ผสมผสานระหว่างกลุ่ม AG และ SPG ส่วนปลาย 5' มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1-330 คล้ายคลึงกับไอโซเลทต่างๆ ในกลุ่ม AG แต่ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 330-700 คล้ายคลึงกับทั้งกลุ่ม AG และ SPG และตำแหน่งที่ 990-1055 ด้านปลาย 3' มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบเฉพาะในไอโซเลทของไทย และแตกต่างจากไอโซเลทอื่นในกลุ่ม AG และ SPG

ความสัมพันธ์ของเชื้อ BBTV จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree

ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของจีโนมรวมด้วยวิธี neighbor-joining พบว่าไอโซเลทของกลุ่ม AG และ SPG แยกคลัสเตอร์กัน (Figure 3a) เชื้อ BBTV ทั้ง 4 ไอโซเลทของไทยอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันกับไอโซเลท Q529 ในกลุ่ม SEA -AG ซึ่งรวมทั้งไอโซเลทจากจีน ไต้หวัน และฟิลิปปินส์ ส่วนการวิเคราะห์ neighbor-joining

phylogenetic tree ของ DNA-U3 (Figure 3b) พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทของไทยอยู่ในคลัด (clade) เดียวกัน และอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันกับไอโซเลท DanZhou-CN จากมณฑลไหหนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยแยกจากคลัสเตอร์ของไอโซเลทจากไต้หวัน (TW) และฟิลิปปินส์ (PH) สำหรับไอโซเลท Q529 ซึ่งจีโนมรวมมีความใกล้เคียงมากที่สุดกับไอโซเลทของไทย แต่มี DNA-U3 อยู่ต่างคลัสเตอร์กับไอโซเลทของไทย โดยมีค่า % identity กับไอโซเลททั้ง 4 ของไทย เพียง 83%

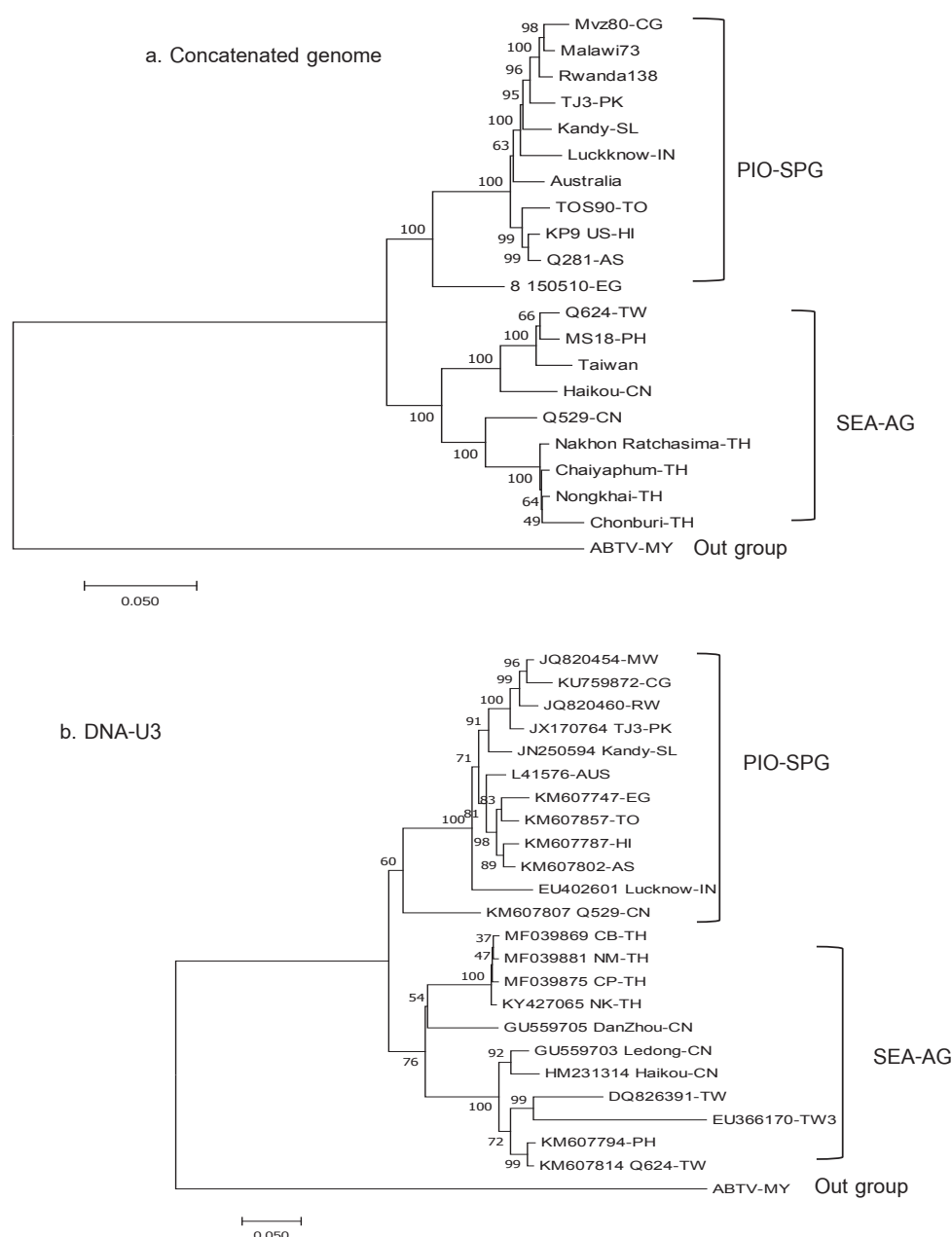


Figure 3 Phylogenetic tree showing genetic relationship of *Banana bunchy top virus* (BBTV) isolates from Thailand (TH) to other isolates of BBTV and an outgroup, *Abaca bunchy top virus* (ABTV) based on (a) concatenated and (b) DNA-U3 sequences of the six components. Neighbour-joining tree were reconstructed by using MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) with 1000

replications bootstrapping. See Table 3 for the name and abbreviation of all isolates and the belonging groups.

จีโนมที่มีการสลับสาย (reassortment) หรือแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ (recombination)

ตรวจพบเหตุการณ์การเกิดสลับสายดีเอ็นเอหรือแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์รวมทั้งสิ้น 37 เหตุการณ์ซึ่งในจำนวนนี้มี 13 เหตุการณ์ที่ผ่านเกณฑ์กำหนดของโอกาสที่จะเป็นไปได้ คือพบได้ใน 5 วิธีการตรวจสอบเป็นอย่างดีและมีค่า $p\text{-value} > 0.005$ ในจำนวนนี้มีเหตุการณ์ที่เกี่ยวข้องกับไอโซเลทของไทย 2 เหตุการณ์ ซึ่งตำแหน่งที่มีจุดเริ่มต้นการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์อยู่ในบริเวณเริ่มต้นของสายดีเอ็นเอวงใดวงหนึ่งใน 6 วงและมีความยาวครอบคลุมไปจนถึงบริเวณสิ้นสุดดีเอ็นเอวงนั้นเป็นการสลับสายดีเอ็นเอ (reassortment) พบในเหตุการณ์ที่ 7 (event 7, Figure 4) เกิดกับไอโซเลท Q529-CN โดยมีไอโซเลท Chaiyaphum-TH เป็น major parent และ unknown เป็น minor parent มีจุดเริ่มต้นการสลับสายตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1153 สิ้นสุดที่ 2155 รวมความยาว 1002 นิวคลีโอไทด์ ครอบคลุมเกือบทั้งสายของ DNA-U3 ของไอโซเลท Q529-CN การศึกษาโดย Stainton *et al.* (2015) พบว่าการสลับสาย (reassortment) และการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ (recombination) พบบ่อยที่สุดใน DNA-U3 โดยทุกวงของดีเอ็นเอมีการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ CR-SL แต่สำหรับ DNA-U3 และ DNA-N ยังพบที่ CR-M อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบการสลับสายดีเอ็นเอระหว่างกลุ่ม AG กับ SPG เช่นไอโซเลทที่พบในประเทศอียิปต์จีน อินเดีย ปากีสถาน และได้เห็นเหตุการณ์การแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์แบบ recombination ของจีโนมรวม ได้แก่เหตุการณ์ที่ 10 (event 10) เกิดกับไอโซเลท Haikou-CN ตรงบริเวณอนุรักษ CR-SL เริ่มจากตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2157 สิ้นสุดที่ตำแหน่ง 2274 มีความยาว 117 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งตรงกับบริเวณอนุรักษ CR-SL โดยมีไอโซเลท Nongkhai-TH เป็น major parent และ unknown เป็น minor parent

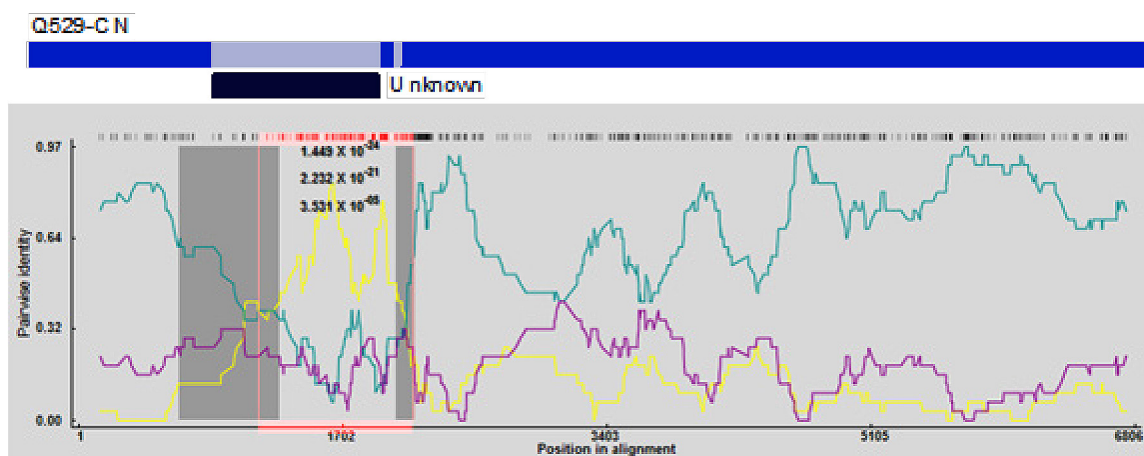


Figure 4 Recombination detection scan test of concatenated *Banana bunchy top virus* genome showing possible reassortment of Q529-CN recombinant isolate (blue strip) as detected by RDP method with isolate Chaiyaphum-TH as a major parent. The solid gray zone with p-value indicated above was the region of the reassortant DNA-U3 (black box) between nucleotide positions 1171-2233 covering 1062 nucleotides.

เมื่อนำเฉพาะ DNA-U3 มาวิเคราะห์หาโอกาสของการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ (recombination) พบว่ามี การแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ DNA-U3 บริเวณดีเอ็นเอส่วน CR-SL ของไอโซเลท Nakhon Ratchasima-TH ตรง ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1-13 และ 981-1114 ขนาด 133 นิวคลีโอไทด์ โดยมีไอโซเลท Danzhou-CN เป็น major parent และไอโซเลท Australia-AU เป็น minor parent ดังรายงานของ Stainton *et al.* (2015) ที่พบว่าบริเวณ CR-SL ของดีเอ็นเอแต่ละสายเกิดการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์มากกว่าบริเวณอื่น การแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์มักจะ เกิดจากการมีไวรัสหลายไอโซเลทเข้าทำลายพืชอาศัยร่วมกัน มีแมลงพาหะหรือมีถิ่นการระบาดของโรคในภูมิภาคใกล้เคียงกัน (Hyder *et al.*, 2011; Stainton *et al.*, 2012) ที่สำคัญคือการนำหน่อกล้วยเข้า-ออกประเทศ เป็นช่องทางที่ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของเชื้อ BBTV ไปได้เป็นระยะทางไกล และส่งผลให้เกิดไอโซเลทของไวรัสที่เป็นลูกผสมระหว่าง กลุ่ม SEA, PIO, AG และ SPG เพิ่มมากขึ้นอย่างหลากหลายและรวดเร็ว นอกจากนี้มีการตรวจพบเชื้อ BBTV ไอโซเลทหลายสายพันธุ์ในพืชเฮลิโคเนีย (*Heliconia* spp.) (Hamim *et al.*, 2017) รวมทั้งมีการทดลองถ่ายทอดเชื้อ BBTV ไอโซเลทจากญี่ปุ่นและฟิลิปปินส์ด้วยเพลี้ยอ่อนสองชนิด (Pinili *et al.*, 2013) ไปยังพืชอื่นซึ่งผลปรากฏว่าพบการถ่ายทอดเชื้อ BBTV ไปยังพืชอาศัยอื่นนอกจากกล้วย เช่น ป่านมนิลา (*abaca*; *Musa textilis*) พุทธรักษา (*canna*; *Canna indica*) ชำคม (shell ginger; *Alpinia zerumbet*) และเผือก (*satoimo*; *Colocasia esculenta*) พืชเหล่านี้จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นแหล่งสะสมเชื้อหรือเป็นพืชอาศัยของเพลี้ยอ่อนให้อยู่ในแปลงได้นานมากขึ้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีความหลากหลายของ BBTV เพิ่มมากขึ้นอีกจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อใช้วิเคราะห์ด้านระบาดวิทยาของโรคบนพืชกล้วยในประเทศไทยต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่างกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้า ที่ตรวจพบเชื้อ BBTV ด้วยเทคนิค PCR มีอาการต้นเตี้ยแคระ และขอบใบเหลืองซึ่งสามารถโคลนจีโนมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้ 4 ไอโซเลท คือ Chaiyaphum-TH, Chonburi-TH, Nakhon Ratchasima-TH และ Nongkhai-TH ทั้ง 4 ไอโซเลท มีโครงสร้างดีเอ็นเอแต่ละสายตามแบบฉบับของเชื้อ BBTV โดยพบรหัสพันธุกรรมที่ใช้สังเคราะห์โปรตีน (ORF) บนดีเอ็นเอ 5 สาย ได้แก่ DNA-R, DNA-S, DNA-M, DNA-C และ DNA-N ยกเว้น DNA-U3 ที่พบรหัสสังเคราะห์โปรตีนสายสั้นสองส่วนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (truncate ORF) สำหรับจีโนมของเชื้อ BBTV ไอโซเลทของไทย มีค่า % identity สูงสุดกับไอโซเลท Q529-CN แต่ DNA-U3 มีความใกล้เคียงกับไอโซเลท Dan Zhou-CN และ LeDong-CN จากสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยพบการสลับสายดีเอ็นเอ U3 ของ Q529 กับ ไอโซเลท Chaiyaphum-TH รวมทั้งพบการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บริเวณ CR-SL บน DNA-U3 ของไอโซเลท Q529-CN กับ Nongkhai-TH จำนวน 117 นิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ BBTV ของไทยและจีน อาจอาศัยการเคลื่อนย้ายหน่อกล้วยหรือต้นกล้าไป-มาระหว่างประเทศหรือระหว่างภูมิภาค และความหลากหลายของเชื้อเกิดขึ้นได้โดยกระบวนการสลับสายดีเอ็นเอหรือแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ภูวนารถ มณีโชติ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือเกี่ยวกับเทคนิค Rolling circle amplification (RCA) และ PCR ขอขอบคุณ ดร.ปาริชาติ เบรินส์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับโครงสร้างจีโนมและการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม RDP และขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน สำหรับห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิเคราะห์ด้านชีวสารสนเทศ

-เอกสารอ้างอิง

- พัฒนพงศ์ ภัทรโกศล เกียรติ ลีละเศรษฐกุล และประวัติ ต้นบุญเอก. 2536. การถ่ายทอดและพืชอาศัยของเชื้อไวรัส Bunchy top ของกล้วยในประเทศไทย, น. 551-554 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. กรุงเทพฯ.
- พิกุลแก้ว วงศ์สุวรรณ และ ศรีเมฆ ชาวโพพาง. 2556. รหัสพันธุกรรมและส่วนประกอบจีโนมของเชื้อไวรัส บานานาบันช์ท็อปในประเทศไทย. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51. กรุงเทพฯ.
- ไมตรี พรหมมินทร์ ดวงใจ ชูปัญญา และนวลจันทร์ ดีมา. 2537. โรคบันช์ท็อปในประเทศไทย, น. 554-560 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32. กรุงเทพฯ
- Boni M.F., D. Posada and M.W. Feldman. 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176: 1035-1047.
- Duay J.A.M., R.H. Miller., G.C. Wall., K.S. Pike and R.G. Fottit. 2014. *Pentalonia nigronervosa* Coquerel and *Pentalonia caladii* van der Goot (Hemiptera: Aphididae) and their relationship to banana bunchy top virus in Micronesia. *Pacific Science* 68: 359-364.
- Gibbs, M. J., J. S. Armstrong and A.J. Gibbs. 2000. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573-582.
- Hamim, I., J. C. Green, W. B. Borth, M. J. Melzer, Y. N. Wang, and J. S. Hu. 2017. First Report of *Banana bunchy top virus* in *Heliconia* spp. on Hawaii. *Plant Disease* 101: 2153.
- Harding, R. M., T. M. Burns, G. J. Hafner, R. Dietzgen and J.L. Dale. 1993. Nucleotide sequence of one segment of the banana bunchy top genome contains a putative replicase gene. *Journal of General Virology* 74, 323-328.
- Hyder M.Z., S.H. Shah, S. Hameed and S.M.S. Naqvi. 2011. Evidence of recombination in the *Banana bunchy top virus* genome. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1239-1300.
- Islam, M. N., A.R. Naqvi, A. T. Jan. and Q. M. R. Haq. 2010. Genetic diversity and possible evidence of recombination among *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV) isolates. *International Research Journal of Microbiology* 1: 001-12.
- Lockhart, B.E.L. 2002. Management of viral diseases of banana. p. 217-221. In: Acrobat. *Memorias XV reunion*. Columbia 27 October 2002.
- Martin, D.B. and E. Rybicki. 2000. RDP: Detection of recombinant amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16: 562-3.
- Martin, D., B. Murrell, M. Golden, A. Khoosal and B. Muhire. 2015. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1, vev003.
- Martin, D. P., D. Posada, K. A. Crandall and C. Williamson. 2005. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses* 21: 98-102.
- Muhire B.M., A. Varsani and D.P. Martin. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation . *PLoS One* 9: e108277.
- Padidam, M., S. Sawyer and C.M. Fauquet. 1999. Possible emergence of new Geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218-225.
- Pinili, M. S., Nagashima, I., Dizon, T. O. and Natsuaki, K. T. 2013. Cross-transmission and new alternate hosts of *Banana bunchy top virus*. *Tropical Agriculture and Development*, 57: 1-7.
- Posada, D. and K.A. Crandall. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings for the National Academic of Science* 98: 13757-13762.
- Sambrook F.E., F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.
- Singh, H.P., S. Uma, R. Selvarajan and J.L. Karihaloo. 2011. Micropropagation for Production of Quality Banana Planting Material in AsiaPacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB), New Delhi, India.
- Smith, J.M. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* 34: 126-129.

- Stainton D., S. Krabberger, M. Walters, E.J. Wiltshire, K. Rosario, M. Halafihi, S. Lolohea, I. Katoa, T.H.Faitua, W. Aholelei, L. Taufa, J.E. Thomas, D.A. Collings, D.P. Martin and A. Varsani. 2012. Evidence of inter-component recombination, intra-component recombination and reassortment in *Banana bunchy top virus*. Journal of General Virology 93: 1103-1119.
- Stainton D., D.P. Martin, B.M. Muhire, S. Lolohea, M. Halafihi, P. Lepoint, G. Blomme, K.S. Crew, M. Sharman, S. Krabberger, A. Dayaram, M. Walters, D.A. Collings, B. Mabvakure, P. Lemey, G.W. Harkins, J.E. Thomas and A. Varsani. 2015. The global distribution of *Banana bunchy top virus* revealed little evidence for frequent recent, human-mediated long distance dispersal events. Virus Evolution 1: vev009. 15 pp.
- Tamura, K., G. S. D. Peterson and A. F. S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- Wickramaarachchi, W. A. R. T., K. S. Shankarappa, K. T. Rangaswamy, M. N. Maruthi, R. G. A. S. Rajapakse and S. Ghosh. 2016. Molecular characterization of *Banana bunchy top virus* isolate from Sri Lanka and its genetic relationship with other isolates. VirusDisease 27: 154-160.
- Yu N.T., Y.L. Zhang, T.C. Feng, J.H. Wang, M. Kulye, W.J. Yang, Z.S. Lin, Z. Xiong and Z.X. Liu. 2012. Cloning and sequence analysis of two *Banana bunchy top virus* genomes in Hainan. Virus Genes 44: 488-494.