กายวิภาคในการก่อโรคข้าวใบหงิกและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Rice ragged stunt virus*

HISTOPATHOGENESIS OF *RICE RAGGED STUNT VIRUS* AND VIRAL EVOLUTION IMPLICATION

อุทัย รุ่งเรืองศรี นลินี รุ่งเรืองศรี แสงทอง พงษ์เจริญกิต

U-TAI ROONGRUANGSREE**, NALINEE ROONGRUANGSREE* AND SAENGTONG PONGJAROENKIT*

**ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร *ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การทดสอบโรคใบหงิกของข้าว ที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Rice ragged stunt virus* (RRSV)โดยใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stal.)) สายพันธุ์จากอำเภอค่ายบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรีสามารถทำให้เกิดอาการโรคใบหงิกกับข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 อย่างชัดเจนหลังการดูดกินเพื่อถ่ายทอดเชื้อนาน 20-30วัน การตรวจวินิจฉัยข้าวและแมลงพาหะที่ติดเชื้อ RRSV สามารถทำได้โดยการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ของ RRSV โดยใช้ไพรเมอร์จากจีโนมของไวรัสส่วนที่ 8 (S5U617 กับ S5L1539 และ S8U617 กับ S8L1385) ทำให้ทราบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อโรคใบหงิกสามารถถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นข้าวโดยการดูดกินนาน 48 ชั่วโมง จากตัวอย่างต้นข้าวที่เก็บมาจากการออกสำรวจ 25 แห่งในนาลุ่มภาคกลาง 9 จังหวัดนั้นเมื่อตรวจสอบโดยวิธี RT-PCRพบว่ามีตัวอย่างที่ติดเชื้อจาก 10 แห่ง เมื่อโคลน PCR products จากตัวอย่างด้วย pCR-4 TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) พบว่าได้ insert DNA ขนาดประมาณ 700 คู่เบสเหมือน PCR product เดิม จากการหาลำดับเบสที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สามารถนำมาวิเคราะห์และใช้สร้าง phylogram ขึ้นได้ จากข้อมูลจากข้าว 5 แหล่งใน 3 จังหวัดที่ใช้พบว่า RRSV แสดงความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิด แต่กลับแสดงความแตกต่างไปจาก RRSV L46682 สายพันธุ์ไทย และ AF 486811สายพันธุ์จากฟิลิปปินส์ ซึ่งเป็นข้อมูลของ Genbank databaseจาก www.ncbi.nih.gov ที่ใช้เปรียบเทียบ

การศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่านนั้นสามารถตรวจพบอนุภาค RRSV ได้เฉพาะในตัวอย่างข้าวและแมลงที่ติดเชื้อ ในตัวอย่างน้ำคั้นจากใบ,กาบใบข้าว จะมีขนาด 30 – 75 นาโนเมตร และตัวอย่าง ultrathin sections บาง80 นาโนเมตร (นม.)จากต้นข้าวพบอนุภาคขนาด 60 – 75 นม.ส่วนตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อนั้นจะพบอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าคือ 30 -75 นม. อนุภาคส่วนใหญ่จะอยู่เป็นกลุ่มแน่นอยู่ในเซลล์ แต่อาจพบทั้งอยู่กระจาย หรือรวมกันใน viroplasm

ABTRACT

Bioassays of *rice ragged stunt virus* (*RRSV*) transmitted by brown plant hopper (BPH)(*Nilaparvata lugens* (Stahl)) obtained from Amphur Kaibangrajan, Singhaburi Province, and infected in rice seedlings cv. Taichung Native1 showed obvious symptoms of the disease, and henceforth maintained. RRSV detection in infected samples was performed by cDNA synthesis and amplification via RT-PCR methodology using various primers; particularly effective for both rice and BPH was the available pair of primers for segment 8 of the viral genome. Rice samples were collected from 25 locations from nine provinces in the central plains. RT-PCR results revealed *RRSV* from ten out of 25 locations surveyed. Cloning the obtained ca. 700 bp amplicons into vector pCR-4 TOPO for sequencing led to phylogenetic analysis. Within the limited available data, multiple sequence alignments and constructed unrooted tree (phylogram) showed samples from five locations, from three nearby provinces, to be closely related but separated from the two previously reported sequences from Thailand and the Phillippines in the Genbank database. Studies from transmission electronmicrography showed presence of the virus only in infected samples. Particles of approximately 60-75 nm were found in ultrathin sections (80 nm) of infected rice leaves and shoots and in sap samples as well. However, in thin sections of viruliferous BPH, most *RRSV* particles appeared smaller—30-75 nm, generally scattered within cells while some were included in viroplasms.