



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง กายวิภาคในการก่อโรคข้าวใบหงิกและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Rice ragged stunt virus*

HISTOPATHOGENESIS OF RICE RAGGED STUNT VIRUS AND VIRAL
EVOLUTION IMPLICATION

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2548 - 49

จำนวน 812,900 บาท

หัวหน้าโครงการ นายอุทัย รุ่งเรืองศรี

ผู้ร่วมโครงการ นางนลินี รุ่งเรืองศรี นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ตุลาคม 2551

คำนิยม (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2548- 49 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้พิจารณาให้การสนับสนุนงานวิจัยและเล็งเห็นความสำคัญของการศึกษาโรคของข้าวที่ทำให้ผลผลิตข้าวของประเทศไทยเสียหายเป็นอย่างมาก ขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัยของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ หัวหน้าฝ่ายวิจัยและเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัย สำนักวิจัยและส่งเสริมการเกษตรของมหาวิทยาลัย ที่คอยให้การสนับสนุน บริการและให้กำลังใจตลอดมา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนิยม	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	ฐ
Abstract	ท
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	9
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลของการวิจัย	25
วิจารณ์ผล	76
เอกสารอ้างอิง	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 การเกิดโรคของข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) 30 วันหลังปล่อยเชื้อไวรัส RRSV ด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์อำเภอค่ายบางระจันเข้าดูดกิน จำนวน 5 ตัวต่อต้น ให้ดูดกินนาน 24 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 2 ความสูงของต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) 30 วัน หลังการปล่อยเชื้อ RRSV ด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์อำเภอค่ายบางระจัน จำนวน 5 ตัวต่อต้น นาน 24 ชั่วโมง	31
ตารางที่ 3 แสดงการเกิดโรคใบหงิกของข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 หลังการปล่อยแมลงพาหะที่ติดเชื้อในระยะเวลาต่างกัน วัดผลหลังการปล่อยเชื้อ 30 วัน	33
ตารางที่ 4 ระยะเวลาการเข้าดูดกินเพื่อรับเชื้อ RRSV ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแมลงพาหะที่สามารถจะทำให้ต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 เกิดโรคใบหงิก เมื่อทำการปล่อยเชื้อนาน 24 ชั่วโมง	34
ตารางที่ 5 สรุปผลการวิเคราะห์โรคใบบิดจากตัวอย่างข้าวที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในพื้นที่ภาคกลางเมื่อเดือนตุลาคม 2548	42
ตารางที่ 6 จำนวนโคโลนี (transformants) จากแต่ละแหล่ง PCR product ได้จากต้นข้าว 1 กอ	43

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงผลผลิตข้าวในประเทศที่เป็นแหล่งสำคัญของ การปลูกข้าวในเอเชียในช่วงปี ค.ศ. 1950 – 2000 โดย Otsuka, (2005)	1
ภาพที่ 2 เส้นทางเก็บสำรวจตัวอย่างต้นข้าวจากนาในภาคกลาง 25 แหล่ง เมื่อปีพ.ศ.2548	17
ภาพที่ 3 ซีนดีเอ็นเอที่จะเชื่อมต่อกับ TOPO vector ต้องมีปลาย 3' A overhang	19
ภาพที่ 4 พลาสมิด pCR [®] 4-TOPO [®] และ cloning site	20
ภาพที่ 5 เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (<i>Nilaparvata lugens</i> Stål) จากนาข้าวของ เกษตรกรตำบลบ้านกล้วย อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรีต่างระยะ เจริญได้แก่ กลุ่มไข่ กลุ่มเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เจริญบนต้นข้าว และ ตัวแก่ พร้อมกับการเพาะเลี้ยงด้วยต้นกล้าข้าว	26
ภาพที่ 6 ต้นข้าวแสดงอาการโรคใบหงิกเมื่อติดเชื้อโรคขณะต้นข้าวเติบโตเมื่อ อายุต่างกัน A, เป็นต้นข้าวปกติ B, และ C เป็นต้นข้าวติดเชื้อที่ได้จาก การสำรวจโรค D-F อาการของโรคที่เกิดกับข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) ที่ปลูกในกระถางและถ่ายทอดเชื้อโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สายพันธุ์บ้านกล้วยที่ได้รับเชื้อจากต้นที่เป็นโรคมานี้แล้ว 30 วัน โดย D เป็น ต้นข้าวที่ปล่อยแมลงติดเชื้อหลังระยะอย่างปล้อง E และ F ต้นข้าวเป็นโรค เมื่อปล่อยแมลงติดเชื้อเข้าคูดกินในระยะแตกกอ และระยะงอกกล้า นาน 3 วันก่อนกำจัดแมลง ต้นข้าวที่ปล่อยแมลงที่ไม่มีเชื้อโรคจะไม่แสดง อาการโรค (ไม่แสดงในภาพ)	27
ภาพที่ 7 ภาพเปรียบเทียบให้เห็นการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ TN 1 ขณะ มีอายุเท่ากัน ข้ามมือเป็นกอปกติ ขวามือเป็นกอที่มีการติดเชื้อ หลังระยะแตกกอ ต้นข้าวที่ติดเชื้อมีการเจริญเติบโตและการตก รวงที่ช้ากว่า	28

- ภาพที่ 8 อาการทั่วไปของต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกได้แก่ปลายใบบิดม้วนงอไม่มี
การคลี่ของใบ ขยายขอบใบด้านใดด้านหนึ่งมีแถบสีขาว ด้านในของแถบ
มีสีเขียวอ่อนและจะเข้มขึ้นเมื่อใกล้เส้นกลางใบ มีรอยขาดตามขวางที่
ขยายขอบใบทำให้ใบเป็นรอยหยักคล้ายฟันเลื่อย ผิวใบไม่เรียบเส้นใบ
โป่ง ใบจะบิดม้วนงอ ปลายใบบิดม้วนงอเป็นเกลียว 29
- ภาพที่ 9 ลักษณะของรวงข้าวและเมล็ดข้าวของต้นข้าวพันธุ์ TN 1 ที่เป็นโรค
A ปลายใบบิด ใบหงบิด ม้วนเป็นเกลียวแน่น, B เมล็ดข้าวลีบและ
ต่าง และ C รวงข้าวไม่สมบูรณ์เมล็ดเสียหาย D เปรียบเทียบระหว่าง
เมล็ดและรวงข้าวที่สมบูรณ์(ซ้าย) กับเมล็ดและรวงข้าวจากต้น
เป็นโรค(ขวา) 29
- ภาพที่ 10 แสดงความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวแต่ละกลุ่มการทดลองหลังการปล่อย
เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ตาลที่มีเชื้อ RRSV เข้าดูตักินนาน 24 ชั่วโมง จำนวน
แมลงพาหะ 5 ตัวต่อต้น สังเกตอาการหลังการปล่อยเชื้อ 30 วัน 32
- ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบหงิก
กับระยะเวลาในการดูตักินเพื่อปล่อยเชื้อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาล 33
- ภาพที่ 12 ระยะเวลาการเข้าดูตักินเพื่อรับเชื้อ RRSV ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาล
แมลงพาหะที่สามารถทำให้ต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 เกิดโรค
โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 34
- ภาพที่ 13 ปริมาณอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) สกัดจากตัวอย่างข้าวที่ถูก
ดูตักินนาน 24 ชั่วโมง โดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาลต่างกลุ่ม คือ
H แมลงพาหะดูตักินน้ำเลี้ยงจากข้าวไม่เป็นโรคนาน 24 ชั่วโมง ก่อน
นำไปดูตักินข้าวทดลอง : เลขที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นผลได้จาก
ตัวอย่างข้าวที่ดูตักินด้วยแมลงที่มีประวัติการดูตักินต้นข้าวเป็นโรค
ใบหงิกนาน 1, 3, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาปล่อยเชื้อ 35
- ภาพที่ 14 ปริมาณอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ที่สกัดจากเพลี้ย
กระโดดสีน้ำตาลตาลที่ดูตักินต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกเพื่อรับเชื้อ RRSV
ในระยะเวลาต่างกัน : H แมลงไม่ได้รับเชื้อโรคไวรัส เลขที่ 1, 2,
3, 4 และ 5 เป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จาก
แมลงพาหะที่ดูตักินเพื่อรับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 15, 30, 45, 90 นาที 36

และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

ภาพที่ 15 ผลของการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากตัวอย่างข้าว เมื่อใช้ RNA template ต่างความเข้มข้น และไพรเมอร์ S5, S6 และ S8 ได้แก่ไพรเมอร์คู่ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ 37

ภาพที่ 16 การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรัส RRSV โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5) และคู่ที่ 3 (S8) กับอาร์เอ็นเอจากต้นข้าวถูกแมลงพาหะที่ติดเชื้อเข้าดูดกินเพื่อปล่อยเชื้อโรคนาน 48 ชั่วโมง: M, marker , เลขที่ 1 ; ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5) กับแม่แบบเจือจาง 1/500 จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ และเลขที่ 2 ; ไพรเมอร์คู่ที่ 3 (S8) กับแม่แบบเจือจาง 1/500 จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 38

ภาพที่ 17_ การสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม จากตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยที่แม่แบบมีความเข้มข้นต่างกัน : S5, S6 และ S8 คือ ไพรเมอร์คู่ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ 39

ภาพที่ 19_ การตรวจพบเชื้อ RRSV จากตัวอย่างข้าวที่เก็บจากนาในเขตภาคกลาง. เห็นได้จากแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR. 40

1 marker 100 bp; 2 negative control; 3 ข้าวปกติ; 4 positive control; 5 หนอนจอก1; 6 หนอนจอก2; 7 ทำไข่1; 8 ทำไข่2; 9 บานน้ำเปรี้ยว1; 10 บานน้ำเปรี้ยว2; 11 บานน้ำเปรี้ยว3; 12 บานน้ำเปรี้ยว4; 13 หน้าศูนย์ศัลป์บางไทร1; 14 หน้าศูนย์ศัลป์บางไทร2; 15 รั้วใหญ่1; 16 รั้วใหญ่2; 17 เนินพระปรางค์1; 18 เนินพระปรางค์2; 19 สามโคก1; 20 สามโคก2; 21 ลาดบัวหลวง1; 22 ลาดบัวหลวง2; 23 ลาดบัวหลวง3; 24 ลาดบัวหลวง4; 25 ลาดหลุมแก้ว1; 26 ลาดหลุมแก้ว2; 27 บางปะอิน1; 28 บางปะอิน2; 29 เมืองอ่างทอง1; 30 เมืองอ่างทอง2

ภาพที่ 20 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิด: M- High DNA Mass Ladder 1-10 kb (Invitrogen), 1-2 ตัวอย่างจากศูนย์ศัลป์ อ.บางไทร อัญญา: 3-4 อ. บางปะอิน อัญญา, 5-6 อ. เมือง อ่างทอง, 7-8 ต.รั้วใหญ่ อ.เมืองสุพรรณบุรี, 9-10 อ. สองพี่น้อง สุพรรณบุรี 44

ภาพที่ 21 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิด: M- High DNA Mass Ladder 44

1-10 kb (Invitrogen), 1-2 อ. สามโคก ปทุมธานี, 3-4 อ. ลาดบัว
หลวง (1) ออยุธยา, 5- 6 อ. ลาดบัวหลวง (2) ออยุธยา, 7-8 ต.เนินพระปรางค์
อ.สองพี่น้อง สุพรรณบุรี, 9-10 ต. ดอนก่ำ อ. สรรคบุรี ชัยนาท, 11 อ. สามโคก
ปทุมธานี 7-8 ต.เนินพระปรางค์ อ.สองพี่น้อง สุพรรณบุรี, 9-10 ต. ดอนก่ำ
อ. สรรคบุรี ชัยนาท, 11 อ. สามโคก ปทุมธานี

ภาพที่ 22 Eco RI digestion กับดีเอ็นเอของพลาสมิด: M- marker 45

100 bp, 1-2 จาก อ. สามโคก ปทุมธานี, 3-4 จาก อ. ลาดบัวหลวง ออยุธยา,
5-6 จาก อ. อ. ลาดบัวหลวง ออยุธยา

ภาพที่ 23 EcoRI digestion พลาสมิด M-marker 100 bp; ตัวอย่าง 1,2,7,8 45

จากศูนย์ศิลปาชีพ อ. บางไทร ออยุธยา; 3,4, 9,10 จากวัดบ่อทอง

อ.บางปะอิน ออยุธยา; 5,6,11,12 จากอ.เมือง อ่างทอง 45

ภาพที่ 24 EcoRI digestion กับพลาสมิด M1- marker 100bp, M2- marker

1 kb, 1-2 ตัวอย่างจากอ.สามโคก ปทุมธานี; 3-4 จากอ.ลาดบัวหลวง1
อยุธยา; 5-6 จาก อ.ลาดบัวหลวง 2อยุธยา; 7 ดีเอ็นเออื่น; 8 พลาสมิด
ที่มี insert 700 bp เป็น control

ภาพที่ 25 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insertประมาณ 700 bpจาก 46

อ.ลาดบัวหลวง จ. ออยุธยา เลน 1และ13 เป็น marker 100 bp;
2 positive control ที่ใช้specific primersของสายที่8 ของ RRSV;
3 negative control ที่ใช้ M13Fwd + M13Rev primers แต่ไม่ใส่
DNA; 4 negative control ที่ใช้ specific primers แต่ไม่ใส่
DNA; 5 เป็นผลของ M13Fwd +specific sense strand
primer; 6 เป็นผลของ M13Rev + specific sense strand
primer; 7 เป็นผลของ T₃ primer + specific sense strand
primer; 8 เป็นผลของ T₇ primer + specific sense strand
primer; 9 เป็นผลของ M13Fwd +specific antisense
strand primer; 10 ผลของ M13Rev +specific antisense
strand primer; 11เป็นผลของ T₃ primer +specific antisense
strand primer; 12 ผลของ T₇+specific antisense strand primer

ภาพที่ 26 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มีinsertประมาณ700 bp

จากศูนย์ศิลปาชีพ อ. บางไทร จ. ออยุธยา คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24	
ภาพที่ 27 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insert ประมาณ 700 bp จาก ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24	47
ภาพที่ 28 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insert ประมาณ 70 bp จาก อ.สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24	47
ภาพที่ 29 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insert ประมาณ 700 bp จาก ต. ดอนก่า อ. สรรคบุรี จ.ชัยนาท คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24	48
ภาพที่ 30 ตำแหน่งการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอหรือ insert ในพลาสมิด R คือตำแหน่งของ reverse primer และ F เป็นตำแหน่งของ forward primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	48
ภาพที่ 31 Distance tree ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ แสดงค่าความยาวของ branch และ bootstrap values ตัวอย่างคือส่วนหนึ่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของ RRSV เส้นที่ 8 จากลาดบัวหลวง จ.อยุธยา(8), บางไทร จ.อยุธยา (10), รั้วใหญ่ จ.สุพรรณบุรี (13), สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี (15) และ ดอนก่า อ. สรรคบุรี จ.ชัยนาท (21) เปรียบเทียบกับลำดับ NC และ AF จาก database ของ NCBI	53
ภาพที่ 32 จีโนมเส้นที่ 8 ของ RRSV และช่วงรหัสพันธุกรรมที่ใช้จัดเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	54
ภาพที่ 33 เนื้อเยื่อส่วนยอดของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อม methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า	55
ภาพที่ 34 เนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า	55
ภาพที่ 35 เนื้อเยื่อส่วนยอดของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า	56

ภาพที่ 36 เนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวติดเชื้อ ตัวอย่างตัดหนา 15 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า	56
ภาพที่ 37 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า	57
ภาพที่ 38 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า	57
ภาพที่ 39 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า	58
ภาพที่ 40 เนื้อเยื่อเปลือกกระดองสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า	58
ภาพที่ 41 เนื้อเยื่อเปลือกกระดองสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า	59
ภาพที่ 42 เนื้อเยื่อเปลือกกระดองสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า	59
ภาพที่ 43 เนื้อเยื่อเปลือกกระดองสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า	60
ภาพที่ 44 เนื้อเยื่อเปลือกกระดองสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิกตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า	60
ภาพที่ 45 อนุภาคต่างขนาดที่บีบอิเล็กตรอนขนาดประมาณ 30 - 75 นาโนเมตร ที่พบในน้ำคั้นของใบและกาบใบข้าวที่แสดงอาการโรคใบหงิกหลังจาก ตรึงด้วย Karnovsky's fixative ย้อมด้วย 2% phosphotungstic acid ขยาย 60,000 เท่าที่ accelerating voltage 100KV	62
ภาพที่ 46 อนุภาคที่บีบอิเล็กตรอนต่างขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 - 75 นาโนเมตร ในน้ำคั้นจากใบและกาบใบข้าวที่มีอาการโรค ใบหงิกหลังจากตรึงด้วย Karnovsky's fixative แล้วย้อมด้วย 2% phosphotungstic acid A ขยาย 60,000 เท่า B ขยาย 40,000 เท่า ด้วยกำลัง acceleration voltage 100 KV	62
ภาพที่ 47 กลุ่มอนุภาคที่บีบอิเล็กตรอนพบในน้ำคั้นจากใบและกาบใบข้าวที่แสดง อาการโรคใบหงิก หลังจากตรึงด้วย Karnovsky's fixative ย้อมด้วย 2% phosphotungstic acid A อนุภาคอยู่รวมกันหนาแน่นเหมือนอยู่ในถุง	63

- B โครงร่างคล้ายถุงมีเส้นใยขนาดเล็กพันประสานและโยงยึดกับเซลล์ข้าว
ภาพขยาย 40,000 เท่าที่ accelerating voltage 100 KV
- ภาพที่ 48 เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบด้านล่างใบข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ส่วนที่พอง 63
เนื่องจากการเป็นโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 80 นาโนเมตร ย้อมด้วย
uranyl acetate และ lead citrate ส่องด้วยกำลัง 100KV ขยาย15000 เท่า
ลูกศรชี้แสดงกลุ่มอนุภาคไวรัสเป็นกลุ่มก้อนในเยื่อหุ้ม
- ภาพที่ 49 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 75 นาโนเมตรเรียงต่อกัน 64
ในเซลล์ใบของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เมื่อตัดบาง 80 นาโนเมตร ย้อมด้วย
ยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องขยาย 50,000 เท่า ด้วยกำลัง
accelerating voltage 100 KV
- ภาพที่ 50 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร 64
พบอยู่กระจายทั่วไปในเซลล์ของข้าวพันธุ์ TN-1 เมื่อตัดบาง 80 นาโนเมตร
ย้อมด้วยยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องด้วยกำลัง accelerating
voltage 100 KV ขยาย 40,000 เท่า
- ภาพที่ 51 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร 65
พบอยู่กระจายทั่วไปในเซลล์ของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เมื่อตัดบาง
80 นาโนเมตร ย้อมด้วยยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ขยาย 80,000 เท่า
ด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV
- ภาพที่ 52 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร
พบอยู่เป็นกลุ่มในเซลล์ของข้าวพันธุ์ TN-1 เมื่อตัดตัวอย่างบาง 80 นาโนเมตร 65
ย้อมด้วยยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องขยาย 80,000 เท่า ด้วยกำลัง
accelerating voltage 100 KV
- ภาพที่ 53 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 60 - 70 นาโนเมตร 66
แต่ละอนุภาคที่บีบอิเล็กตรอนได้ไม่เท่ากัน พบเป็นกลุ่มหนาแน่นอยู่เป็นบาง
จุดในไซโตพลาสซึมโดยเฉพาะส่วนใกล้ผนังเซลล์ ขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง
accelerating voltage 100 KV
- ภาพที่ 54 กลุ่มอนุภาค RRSV ที่บีบอิเล็กตรอนไม่เท่ากันขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 66
ราว 60 - 75 นาโนเมตร อยู่เป็นกลุ่มอัดแน่นใกล้ผนังเซลล์ กำลังขยาย
80,000 เท่า
- ภาพที่ 55 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80 นาโนเมตร 67

ในไฮโดรพลาสซึมของเซลล์ข้าว ภาพขยาย 40,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV

ภาพที่ 56 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75 นาโนเมตร อยู่อัดแน่น ในไฮโดรพลาสซึมของเซลล์ข้าว ด้านข้างมีไมโครไฟเบอร์เหมือนยึดประสานกับผนังเซลล์ ภาพขยาย 40,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV 67

ภาพที่ 57 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75 นาโนเมตร ในเซลล์ข้าว อนุภาคบางกลุ่มอยู่ต่อกันเป็นสายคล้ายลูกบิด (ลูกศรชี้) ภาพขยาย 50,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV 68

ภาพที่ 58 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 65 นาโนเมตร ในเซลล์ข้าว ที่บิเล็คตรอนเข้มตรงส่วนกลาง มีขอบ คล้ายไข่ดาว ภาพขยาย 80,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV 68

ภาพที่ 59 แสดงอนุภาคของ RRSV ขนาดต่างกันเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45– 75 นาโนเมตร พบในเนื้อเยื่อของเพลี่ยกระโดดสีน้ำตาล ทั้งแบบแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อและอยู่เป็นกลุ่มที่มีเนื้อเยื่อล้อมรอบ ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV 69

ภาพที่ 60 อนุภาคขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร มีทั้งอยู่ทั่วไปและอยู่เป็นกลุ่มอัดแน่นในเซลล์ของเพลี่ยกระโดดสีน้ำตาล (ลูกศรชี้) 69

ภาพที่ 61 แสดงอนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 – 50 นาโนเมตร กระจายอยู่ในเซลล์ของเพลี่ยกระโดดสีน้ำตาล ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 100,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV 70

ภาพที่ 62 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 50 นาโนเมตร กระจายอยู่ในเซลล์ของเพลี่ยกระโดดสีน้ำตาล ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV 70

ภาพที่ 63 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45 นาโนเมตร กระจายหนาแน่นอยู่ในเซลล์ของเพลี่ยกระโดดสีน้ำตาล 71

ภาพที่ 64 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 50 นาโนเมตร กระจายอยู่ในเซลล์ของเพลี่ยกระโดดสีน้ำตาล ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV 71

กายวิภาคในการก่อโรคข้าวใบหงิกและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
ของ *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.)) สายพันธุ์จากอำเภอด่านช้างบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรีสามารถทำให้เกิดอาการโรคใบหงิกกับข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 อย่างชัดเจนหลังการดูดกินเพื่อถ่ายทอดเชื้อนาน 20-30 วัน การตรวจวินิจฉัยข้าวและแมลงพาหะที่ติดเชื้อ RRSV สามารถทำได้โดยการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ของ RRSV โดยใช้ไพรเมอร์จากจีโนมของไวรัสส่วนที่ 8 (S5U617 กับ S5L1539 และ S8U617 กับ S8L1385) ทำให้ทราบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อโรคใบหงิกสามารถถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นข้าวโดยการดูดกินนาน 48 ชั่วโมง จากตัวอย่างต้นข้าวที่เก็บมาจากการออกสำรวจ 25 แห่งในนาสุ่มภาคกลาง 9 จังหวัดนั้นเมื่อตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR พบว่ามีตัวอย่างที่ติดเชื้อจาก 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 486811 สายพันธุ์จากฟิลิปปินส์ ซึ่งเป็นข้อมูลของ Genbank database จาก www.ncbi.nih.gov ที่ใช้เปรียบเทียบ

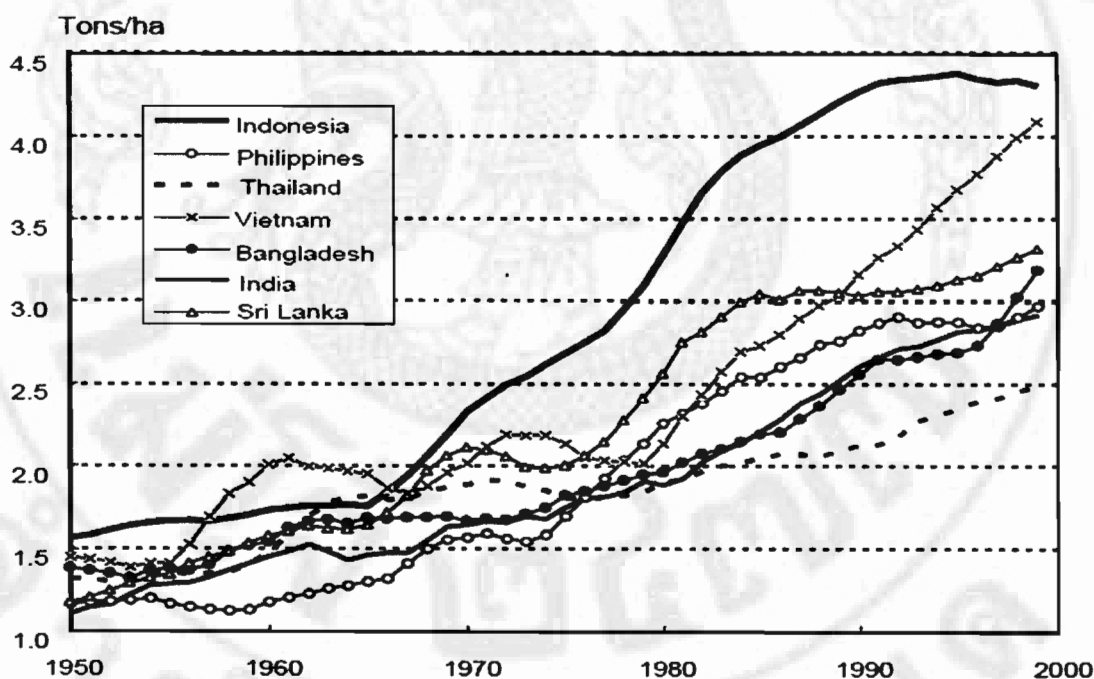
การศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้นสามารถตรวจพบอนุภาค RRSV ได้เฉพาะในตัวอย่างข้าวและแมลงที่ติดเชื้อ ในตัวอย่างน้ำคั้นจากใบ, กาบใบข้าว จะมีขนาด 30 – 75 นาโนเมตร และตัวอย่าง ultrathin sections บาง 80 นาโนเมตร (nm.) จากต้นข้าวพบอนุภาคขนาด 60 – 75 nm. ส่วนตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อมันจะพบอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าคือ 30 - 75 nm. อนุภาคส่วนใหญ่จะอยู่เป็นกลุ่มแน่นอยู่ในเซลล์ แต่อาจพบทั้งอยู่กระจาย หรือรวมกันใน viroplasm

ABSTRACT

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 Philippines 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.

คำนำ (Introduction)

ข้าวเป็นทั้งพืชเศรษฐกิจและอาหารหลักของชาวไทย จึงมีการทำนาเพื่อผลิตข้าวเพื่อบริโภคและใช้ที่เหลือส่งออกจำหน่าย พื้นที่ปลูกข้าวของไทยจึงมีมากถึงราว 68.7 ล้านไร่ ซึ่งเป็นราว 40เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เพาะปลูกพืชทั้งหมดของประเทศ ในฤดูการผลิตปี 2540 / 2541 นั้นสามารถผลิตข้าวเปลือกมากถึงกว่า 23.5 ล้านตัน จากจำนวนนี้มีการใช้ข้าวเปลือกจำนวน 8-9 ล้านตันเป็นข้าวสารราว 5.5 ล้านตันสำหรับส่งจำหน่ายต่างประเทศ สำหรับประสิทธิภาพทางการผลิตนั้นผลผลิตข้าวของไทยแทบจะต่ำที่สุด คือ เฉลี่ยเพียง 360 กิโลกรัมต่อไร่ เนื่องจากปัจจัยการผลิตบางอย่างยังควบคุมไม่ได้ เช่น กว่า80เปอร์เซ็นต์เป็นนาข้าวที่พึ่งน้ำฝน ข้าวปลูกยังเสียหายจากแมลง ศัตรูและโรค(Kupkanchanakul, 2003) จนจัดว่ามีผลผลิตต่ำที่สุดใน 7 ประเทศหลักที่ผลิตข้าวในเอเชียดังรายงานของ Otsuka (2005)ใน ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงผลผลิตข้าวในประเทศที่เป็นแหล่งสำคัญของการปลูกข้าวในเอเชียในช่วงปี ค.ศ. 1950 – 2000 โดย Otsuka, (2005)

โรคข้าวที่สำคัญและก่อความเสียหายร้ายแรงที่พบในประเทศไทยมีหลายโรค หนึ่งในโรคเหล่านั้นเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส คือ โรคข้าวใบหงิก หรือโรคข้าวใบบิดซึ่งชื่อนานาในภาคกลางมักเรียกว่าโรคจู๋ (rice ragged stunt) มีสาเหตุมาจาก *Rice ragged stunt virus (RRSV)*, genus *Oryzavirus*, family *Reoviridae* (Mayo and Brunt, (2005) สามารถแพร่ระบาดในนาข้าวไปได้รวดเร็วโดยแมลงพาหะ คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown plant hopper: *Nilaparvata lugens* (Stål)) ความเสียหายจากโรคข้าวใบหงิกในประเทศไทยมีรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปีพ.ศ. 2520 (Chetanachit และคณะ 1978: Weerapat และ Pongpasert 1978) ที่อำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทราทำให้ข้าว กข 7 (C4-63/แก้รวง88/Sigadis, สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร) เสียหายเป็นพื้นที่ราว 200 ไร่ ความเสียหายเพิ่มขึ้นจากเดิม คือปี พ.ศ.2521 ข้าวที่ปลูกในเขตภาคกลางโดยเฉพาะอำเภอลาดบัวหลวง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เสียหายเป็นพื้นที่ติดต่อกันถึงกว่าหนึ่งหมื่นไร่ และเมื่อปี 2523 นาข้าวในพื้นที่ภาคกลางเสียหายจากโรคข้าวใบหงิกมากกว่าสองแสนไร่ (ไพบุลย์, 2546) การระบาดทำความเสียหายของโรคนี้ควบคู่ไปกับการแพร่ระบาดของเพลี้ยจักจั่น (brown plant hopper: *N. lugens*) ซึ่งเป็นแมลงพาหะนำเชื้อโรค rice ragged stunt virus (RRSV) สาเหตุของโรคนี้ ดังจะเห็นว่าทำให้โรคนี้ทำความเสียหายแก่ข้าวพันธุ์ กข 7 และสุพรรณบุรี 60 (เหลืองทอง/C4-63/IR48, สถาบัน วิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร) ถูกทำลายมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (กรมวิชาการเกษตร, 2546) ความเสียหายจากโรคข้าวชนิดนี้มีต่อเนื่องตลอดมา แต่มักไม่เห็นอาการโรคอย่างชัดเจนและรุนแรง ทำให้ไม่มีการเตือนภัยหากปริมาณแมลงพาหะของโรคไม่ถึงกับเกิดการระบาด ทำให้ไม่มีการควบคุมจึงทำให้โรคสามารถแพร่ได้ง่าย

ในส่วนของทวีปเอเชียมีรายงานว่าโรคนี้ทำความเสียหายแก่ข้าวในพื้นที่ปลูกข้าวเอเชีย ตั้งแต่เอเชียใต้ไปจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศ บังคลาเทศ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไต้หวัน ก่อความเสียหายได้ต่างกันตั้งแต่ 10-20% ไปจนถึง 100% (Ling และคณะ, 1978) โรคใบหงิกนอกจากจะสามารถก่อความเสียหายกับข้าวปลูก (*Oryza sativa*) ทั้งชนิด Japonica และ Indica พันธุ์ต่างๆ ทวีต (2544) รายงานว่าโรคนี้ยังทำความเสียหายได้กับข้าวไร่และข้าวป่าต่างๆ ได้

การป้องกันกำจัดเชื้อไวรัสทำได้ยาก เพราะไม่มีสารเคมีใดได้ผลในการกำจัดไวรัสได้โดยตรง จึงได้แต่ใช้พันธุ์ต้านทานโรค ใช้สารเคมีควบคุมแมลงพาหะของโรคและการลดแหล่งสะสมโรคบริเวณแปลงปลูกข้าว ในปัจจุบันยังไม่มีข้าวพันธุ์ใดที่สามารถต้านทานต่อโรคนี้ได้ อย่างแท้จริงแต่พบว่าข้าวบางพันธุ์ เช่น กข 23 มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแมลงพาหะแต่ให้ผลผลิตในระดับต่ำ (สุวัฒน์, 2533)

การศึกษา RRSV นี้มีรายงานขึ้นเมื่อปีค.ศ. 1977 โดย Hibino และคณะ 1977; Ling 1977 และ Shikata และคณะ 1977 (Brunt และคณะ 1996) เคยเรียกชื่อเป็น rice infectious gall virus โดย Bergonia ในปี 1977 เช่นเดียวกับ De La Cruz ในปี 1977 (Milne และคณะ 1982) การศึกษาโดย Milne และคณะ (2003) พบว่าอนุภาคไวรัสรูปค้อนข้างกลมแต่ไม่เรียบเหมือนมีตุ่มโดยรอบและคล้ายจะมีเยื่อหุ้มอีกชั้นหนึ่ง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนในประมาณ 50 นาโนเมตร ทำให้เมื่อวัดรวมส่วนนอกที่นูนขึ้นได้เส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร รหัสพันธุกรรมของไวรัสนี้เป็นแบบ double-stranded RNA(dsRNA) สามารถติดเชื้ออยู่ได้ในสิ่งมีชีวิตต่างอาณาจักร (Kingdom) ได้คือพืชตระกูลหญ้า (Graminae) และในสัตว์ คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown plant hopper: *Nilaparvata lugen* Stål) ซึ่งอยู่ในแฟมิลี Delphacidae ไวรัสนี้เป็นสาเหตุของโรคข้าวที่มีความร้ายแรงและก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจในแหล่งผลิตข้าวทั่วไป

ลักษณะอาการโรค

ข้าวที่เป็นโรคใบหงิกหรือโรคจู๋จากการติดเชื้อ *Rice ragged stunt virus* (RRSV) นั้นจะไม่ถึงตายแต่ก่อความเสียหายทางความเจริญและผลผลิต ต้นข้าวเตี้ยแคระแกร็นทั้งกอ จะแตกกออ่อนหรือไม่แตกกอ ต้นแคระแกร็น ใบสั้น หนา สีเขียวเข้มกว่าปกติ ใบใหม่จะแตกช้า ส่วนปลายใบ หรือทั้งใบบิดเป็นเกลียว ซึ่งเป็นลักษณะโดดเด่นทำให้เรียกว่าข้าวเป็นโรคใบบิด หรือใบหงิก ขอบใบขาดตามขวางเข้าใบลึกราวหนึ่งในสี่ของใบ ทำให้ขอบใบหักคล้ายฟันเลื่อย ตามแนวขาดที่ขอบใบตามขอบแผลมีแนวเนื้อเป็นสีขาวแคบๆ ยาวตลอดในบริเวณแผล บริเวณนี้มักมีรอยขาดแหว่งตามขวางทำให้ขอบใบเป็นรอยหัก คล้ายฟันเลื่อยใบ เส้นใบบวม ส่วนปลายใบข้าวที่เป็นโรคมักบิดม้วน ใบธงสั้นและใบธงทั้งใบอาจบิดม้วนเป็นเกลียวจนแน่น ทำให้รวงข้าวไม่สามารถโผล่ออกมาตามปกติจนทำให้เรียกว่าโรคจู๋ เมล็ดข้าวในรวงที่โผล่ในส่วนใหญ่ลีบ เมล็ดมักเนาหรือต่างเป็นส่วนใหญ่ การเกิดช่อดอกและการออกรวงช้า หากติดเชื้อในระยะต้นอ่อนถึงระยะตั้งท้องจะทำให้ข้าวแสดงอาการโรครุนแรงและไม่สร้างหน่อ ข้าวไม่แตกกอ ต้นข้าวที่ติดเชื้อหลังอายุเกิน 60 วันไปแล้วจะมีอาการไม่รุนแรง โรคนี้จึงสามารถทำให้ผลผลิตข้าวเสียหายในระดับที่ต่างกันซึ่งอาการของโรคจะรุนแรงถ้าข้าวได้รับเชื้อในระยะต้นกล้าถึงระยะตั้งท้อง ส่วนต้นข้าวที่อายุเกิน 60 วันไปแล้ว แม้จะได้รับเชื้อแต่อาการจะไม่รุนแรง (Disthaporn และคณะ, 1985) ข้าวที่เป็นโรคใบหงิก หรือโรคจู๋นี้การตรวจมักช้ากว่าปกติจนทำให้ผลผลิตเสียหาย การตรวจสอบการเป็นโรคนี้อาจทำได้โดยใช้แมลงพาหะดูดกินข้าวที่สงสัยก่อนนำไปดูดกินข้าวพันธุ์ Taichung Native-1 (TN-1) เพื่อดูอาการโรคเนื่องจากข้าวพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ (Ling และคณะ 1978)

สายพันธุ์ต่างๆของข้าวทั้งชนิด japonica และ indicaโดยทั่วไปจะติดเชื้อไวรัส RRSV และเกิดโรคใบหงิกได้ต่างกัน ความเสียหายทางผลผลิตจากโรคจะประเมินได้ยากเนื่องจากความเสียหายจะเกิดร่วมกับความผิดปกติจากการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะ ด้านผลผลิตที่เป็นเมล็ดข้าว ในประเทศไทยนั้นมีรายงานการระบาดของโรคใบหงิกหรือโรคจู๋ ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2520 ที่อำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยพบเป็นอย่างรุนแรงกับข้าวพันธุ์ กข 7 ก่อนความเสียหายในเนื้อที่ประมาณ 200 ไร่ก่อน ในปีต่อมาโรคนี้ได้รุกรามสู่พื้นที่ปลูกข้าวหลายจังหวัดในภาคกลาง เช่นที่อำเภอลาดบัวหลวง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เป็นเนื้อที่เสียหายติดต่อกันถึง 1 หมื่นไร่เศษ นอกจากนี้ยังพบระบาดเสียหายมากในจังหวัดนครปฐม อ่างทอง สุพรรณบุรี ปทุมธานี อุทัยธานี ชัยนาท สิงห์บุรี นนทบุรี และกรุงเทพฯ จากการสำรวจอย่างหยาบ ๆ ในปี พ.ศ. 2523 โรคจู๋ได้แพร่ระบาดในเขตภาคกลางกว่า 2 แสนไร่ การระบาดของโรคจู๋ในปี พ.ศ. 2533 ข้าวพันธุ์ กข 7 และสุพรรณบุรี 60 ถูกทำลายมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เจริญ (2538) รายงานว่าผลผลิตของข้าวที่เป็นโรคใบหงิกจะลดจากปกติ 1/3 หรือ 2/3 แต่ถ้ามีโรคอื่นร่วมทำลายก็จะทำให้ผลผลิตเสียหายได้ถึง 100% นอกจากนี้โรคจู๋ที่เข้าทำลายต้นข้าวที่อายุน้อยจะทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงกว่าเมื่อติดโรคเมื่อข้าวอายุแก่กว่า Hibino (1979) อธิบายไว้ว่าการประเมินความเสียหายเป็นผลผลิตจากโรคนี้ทำได้ยากเพราะข้าวจะเสียหายไปจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไปพร้อมกันซึ่งความเสียหายจากโรคและแมลงพาหะจะแยกจากกันได้ยาก นอกจากนี้ความเสียหายจากโรคใบหงิกยังคล้ายกับที่เสียหายจาก rice grassy stunt ได้อีก

Palmer และคณะ (1978) รายงานว่าในอินโดนีเซียมีการทดลองกับข้าวหลายพันธุ์ในแปลงนาพบว่าข้าวที่พบว่าเป็นโรคใบหงิกนี้ 34–76เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ผลผลิตเพียง 17–47 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับข้าวปกติ ส่วนในอินเดียนั้น Velusamy และคณะ (1979) อ้างว่าความเสียหายจะเป็นไปได้สูงถึง 80–100เปอร์เซ็นต์ ความเสียหายของข้าวจากโรคนี้มีทั่วไปในประเทศแถบเอเชีย

การควบคุมโรคใบหงิกของข้าวในประเทศไทยของกรมวิชาการเกษตรนั้นมักเป็นการแนะนำให้ใช้พันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เช่น พันธุ์สุพรรณบุรี 1 , พันธุ์สุพรรณบุรี 2 , พันธุ์สุพรรณบุรี 90 , พันธุ์ชัยนาท 1 , พันธุ์ กข.23

อย่างไรก็ตาม Upadhy และคณะ (1998) ทดลองใช้แนวทาง pathogen derived resistance (PDR) สำหรับสร้างข้าวพันธุ์ต้านทาน RRSV โดยทำ PDR gene constructs จากการใช้ลำดับเบสใน coding region ของจีโนมส่วนที่ 7 และ 10 ที่เป็น nonstructural genes และ ส่วนที่ 5, 8, และ 9 ที่เป็น structural genes ใส่เข้าไปตามทิศทางของ sense และ antisense ต่อจาก plant expression promoters CaMV35S, RoIC, UbiI, ActI, และ RBTV เพื่อ transform ข้าวพันธุ์ Taipei

309 และ Chinsurah Boro II โดยวิธี ballistic และ/หรือ *Agrobacterium* เป็นพาหะ เมื่อทำการทดลอง ข้าวที่โตขึ้นจากแคลไธในประเทศจีนนั้นพบว่า transgenic lines ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากวิธี ballistics ที่ใช้ RRSV segment 5 antisense PDR gene แสดงความต้านทาน RRSV ขึ้นมาได้

พืชอานวย

Kawano และ คณะ (1981) ใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ถ่ายทอดเชื้อ RRSV เข้าสู่พืชตระกูลหญ้า 9 สปีชีส์คือ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และคอมมอนมิลเล็ท พบว่าสามารถติดเชื้อและแสดงอาการโรคใบหงิกได้เหมือนข้าว ได้แก่ใบบิดม้วน ต้นแคระแกร็น ส่วนข้าวโอตสีนั้นติดเชื้อเพียง 1 จาก 10 ต้น ข้าวมิลเล็ทญี่ปุ่นนั้นติดเชื้อเพียง 2 จาก 15 ต้น แต่แสดงอาการขอบใบหยักเพียงเล็กน้อยหลังการใส่เชื้อนานหนึ่งเดือน แต่กับข้าวฟ่างและ *Coix lachryma-jobi* var. *frumentacea* นั้นไม่พบว่าเกิดการติดเชื้อ

ในสภาพธรรมชาตินั้นมีเฉพาะข้าว *Oryza latifolia*, *O. nivala* และ *O. sativa* เท่านั้นที่สามารถติดเชื้อ RRSV ส่วนการทดลองนั้นพบว่าข้าวโพด บาร์เลย์ และไรย์สามารถติดเชื้อไวรัสนี้ได้ (Ling และคณะ, 1978; Hibino, 1979) ในการทดสอบการติดเชื้อโรคใบหงิกโดยทั่วไปนั้นมักใช้ข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคเพื่อการถ่ายทอดเชื้อและสังเกตอาการดังที่ Ling และคณะ (1978) และ Hibino, (1979) ใช้ข้าวไมไ่วางพันธุ์ Taichung Native 1 (TN1) สำหรับทดสอบอาการโรคข้าวใบหงิก

ในประเทศไทยนั้น RRSV อยู่เป็นฤดูได้ในข้าวที่โตจากตอซัง หญ้าบางชนิด และในตัวของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เนื่องจากพื้นที่ในเขตที่ลุ่มภาคกลางนั้นเหมาะแก่การเจริญเติบโตของทั้งข้าวและแมลงพาหะของโรคนี้ได้ดี มีอากาศค่อนข้างร้อนและชื้น จึงพบว่ามีโรคนี้เกิดกับข้าวอยู่เสมอ โดยเฉพาะในนาหว่านที่มีจำนวนต้นข้าวต่อหน่วยพื้นที่สูง ภายในกลุ่มต้นข้าวมีสภาพอับลม เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนั้นแม้ไม่นำเชื้อไวรัสโรคใบบิดแล้วยังทำลายข้าวโดยดูดน้ำเลี้ยงทำให้ต้นข้าวเหี่ยวตายโดยตรง สามารถเจริญเติบโตจนครบชีพจักรตามบริเวณส่วนโคนของต้นข้าวใกล้ผิวน้ำได้ดี แมลงชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในแต่ละฤดูปลูกข้าว เนื่องจากการปลูกข้าวในเขตที่ลุ่มภาคกลางนั้นเป็นการปลูกข้างที่เลื่อมฤดูจึงทำให้ทั้งโรคใบบิดและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแมลงพาหะเคยระบาดทำความเสียหายอย่างรุนแรงเป็นที่รู้จักมาแล้วดังรายงานของกรมวิชาการเกษตรในปี 2520 และ 2523 โดยเฉพาะปี 2532/2533 ในปัจจุบันนี้แม้เกษตรกรทำการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยสารเคมีอยู่เสมอ ทำให้ไม่พบการระบาดรุนแรง แต่โรคใบหงิกนี้ยังมีปรากฏและทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตข้าวในนาแถบภาคกลางได้เสมอ

แมลงพาหะ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown plant hopper: *Nalaparvata lugens* (Stål)) เป็นแมลงเพียงชนิดเดียวที่ทราบว่าเป็นพาหะนำเชื้อโรค RRSV ไปแพร่ระบาด (Hibino et al 1977; Ling และคณะ 1978) แมลงพาหะใช้เวลาดูดน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรคอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เชื้อที่ได้จะใช้ระยะเวลาฟักตัวราว 9 วัน (2-33 วัน) ก่อนที่จะสามารถถ่ายทอดไปได้ โดยแมลงพาหะต้องเข้าดูดกินน้ำเลี้ยงต้นข้าวปกติอย่างน้อย 1 ชั่วโมงจึงจะสามารถติดเชื้อและนำไปถ่ายทอดสู่ข้าวต้นอื่นได้ แมลงพาหะจะติดเชื้อแบบคงนานโดยที่หลังจากแมลงรับเชื้อได้แล้วแต่ละครั้งจะสามารถถ่ายทอดเชื้อไปได้นาน 1-4 สัปดาห์หรือตลอดชีวิต ไวรัสนี้สามารถขยายปริมาณได้ในแมลงพาหะ (Hibino และคณะ, 1977; Ling และคณะ 1977, Chetanachit และคณะ, 1978) Ling (1978) ทดสอบเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 4 ไซโตไทป์พบว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัส RRSV ได้คล้ายกัน ไวรัสนี้สามารถขยายปริมาณได้ในตัวของแมลงพาหะ

Milne และคณะ (1982) อธิบายการถ่ายทอดเชื้อ RRSV ไว้ว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*N. lugens*) เป็นแมลงเพียงชนิดเดียวที่เป็นพาหะของไวรัสนี้ เมื่อเข้าดูดกินน้ำเลี้ยงต้นข้าวที่มีเชื้อโรค RRSV นานราว 3 ชั่วโมงก็สามารถรับเชื้อไวรัสได้และจะทำให้ไวรัสจำลองพันธุ์และเพิ่มจำนวนขึ้นได้ในร่างกาย แมลงตัวอ่อนจะมีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อมากกว่าตัวแก่ แต่แมลงทุกระยะเจริญก็สามารถเป็นพาหะของเชื้อ RRSV ได้ แมลงที่มีเชื้อโรคเมื่อเข้าดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวปกติจะใช้เวลานานราว 1 ชั่วโมงเพื่อการถ่ายทอดเชื้อโรคสู่ต้นใหม่ แต่แมลงที่มีเชื้ออยู่ในตัวอาจไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อโรคได้ทุกครั้งที่เข้าดูดกินต้นข้าวเสมอไป ไวรัสเชื้อโรคใบหงิกสามารถคงอยู่ผ่านการลอกคราบอยู่แบบคงนานในตัวของแมลงพาหะ แต่ไวรัสนี้จะไม่สามารถส่งถ่ายจากแม่ผ่านไข่สู่ลูกได้ เชื้อโรคจะใช้ระยะฟักตัว (latent period) นานราว 9 วัน ต้นข้าวจึงจะเริ่มมีความผิดปกติ

การวินิจฉัยโรค RRSV

เนื่องจากการใช้ข้าวพันธุ์ Taichung Native (TN-1) สำหรับทดสอบ เพื่อดูอาการสำหรับการเป็นารวินิจฉัยโรคต้องใช้เวลานาน 20-30 วัน ต้นข้าวจึงจะแสดงอาการให้เห็นชัดเจน ทำให้เริ่มมีการตรวจหาเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา เช่น วิธี enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) ที่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในต้นข้าว หรือในแมลงพาหะได้ ก่อนที่ต้นข้าวจะแสดงอาการ (ดารา และคณะ, 2533) ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือจะต้องมี

แอนติบอดีที่มีคุณภาพ จึงได้เริ่มการผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัสโรคใบหงิกมีขั้นตอนการเตรียมที่ค่อนข้างยาก ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสของพืชให้ได้ผลรวดเร็ว มีความจำเพาะสูงและถูกต้อง โดยอาจใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ในปฏิกิริยาไฮบริดเซชัน เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสโรคใบหงิกของข้าว (อาภรณ์พรรณ, 2538) แต่ยังเป็นวิธีที่ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงต้องใช้เวลาในการปฏิบัติงาน เนื่องจากมีปฏิกิริยาหลายขั้นตอนพร้อมมีของเสียจากการทำปฏิกิริยา วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสได้ดี แต่สำหรับไวรัสที่มีจีโนมเป็นแบบอาร์เอ็นเอเส้นคู่ (double-stranded RNA) ปฏิกิริยา reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ก่อนที่จะเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส ให้สามารถตรวจสอบได้ (ทวัช, 2544)

ในเขตภูมิประเทศเดียวกันนี้มีไวรัสโรคข้าวที่คล้ายกันคือ rice dwarf virus (Iida และคณะ, 1972) Rice black streaked dwarf (Shikata, 1974) และ Rice gall dwarf (Omura และคณะ, 1980) ซึ่ง rice dwarf และ rice gall dwarf นั้นจัดเป็น phytoeoviruses ที่ถ่ายทอดโดยแมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่น (*Nephotettix* spp.) แต่ไม่ถ่ายทอดไปโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สำหรับ rice black streak virus จัดเป็น fijivirus อย่างหนึ่งที่ถ่ายทอดเชื้อโรคไปได้โดยเพลี้ยกระโดด 2 ชนิด คือ *Laodelphax striatellus* และ *Unkanodes* spp. แต่เพลี้ยกระโดดสองชนิดนี้จะไม่ถ่ายทอด RRSV อาการของโรค rice dwarf virus นั้นจะแตกต่างจากอาการของโรคอื่นที่ไม่ทำให้เส้นตามใบและกาบใบนูนเป็นสัน (enations) แต่จะทำให้เกิดอาการใบด่าง (Iida และคณะ 1972) ทั้ง rice black streak virus (Shikata 1974) และ rice gall dwarf (Omura และคณะ 1980) จะคล้ายกันกับ RRSV ที่ก่อให้เกิดเส้นใบพอง (enations หรือ galls) ได้ แต่การพิจารณาความแตกต่างจากอาการเช่นนี้อาจผิดพลาดได้เนื่องจากอิทธิพลจากอายุข้าว ระยะเวลาในการติดเชื้อโรคและสภาพแวดล้อม ดังนั้นการวินิจฉัยโรคจากการดูอาการเพียงอย่างเดียวจึงทำได้ยากและผิดพลาดได้ง่าย โดยเฉพาะหากมีการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อโรคเกินกว่าหนึ่งชนิด

RRSV จะเหมือนไวรัสพวก *Oryzavirus* ทั่วไปที่จะจำลองพันธุ์ภายในมวล์ที่ก่อตัวขึ้นภายในเซลล์ของตัวอณวยเรียกว่าไวโรพลาสมา (viroplasma) ลักษณะคล้ายเส้นหรือหลอดที่มักพบภายในไซโตพลาสซึมของท่ออาหาร หรือ ในเซลล์ประกอบกับท่ออาหารของพืช (Milne และคณะ 1982) เซลล์ท่ออาหารของต้นข้าวที่เป็นโรคมักพบว่ามีอาการบวมเป็นเส้นพองยาวไปตามใบ ในแมลงพาหะนั้นมักพบอนุภาคไวรัสในเซลล์ต่อมน้ำลาย ส่วนไขมัน ลำไส้ และเซลล์สมอง

จีโนมของไวรัส RRSV

อนุภาคของไวรัส RRSV นั้นประกอบจากกรดนิวคลีอิกและโปรตีน เปลือกโปรตีนมีพื้นฐานเป็นทรงยี่สิบหน้า 12 มุม ที่แต่ละหน้าเป็นรูปสามเหลี่ยมด้านเท่า (icosahedron) ซึ่งภาพโดยทั่วไปจะคล้ายเป็นทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางราว 50 นาโนเมตร แต่จะมีตุ่มหรือหนามที่สั้นๆ "B"-type spikes 12 อันต่อออกไปจากแต่ละมุมของเปลือก คลุมโดยรอบอนุภาค ทำให้เส้นผ่าศูนย์กลางโดยรวมเป็นราว 65 นาโนเมตร (ICTVdB Management (2006)) เนื่องจากไม่พบชั้นหุ้มอนุภาคด้านนอกจึงจัดไว้ในจีนัส *Oryzavirus*

ด้านจีโนมของ RRSV นั้น Boccado และ Milne, (1980) สกัด genomic nucleic acid จากข้าวติดเชื้อและพบว่าทนทานต่อ DNase ไม่ละลายใน 2 M LiCl สลายตัวรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนที่จุดวิกฤติ โดยมีจุดสลายตัวที่ 83 °C เมื่อละลายใน 0.15 M NaCl - 0.015 M Na citrate buffer, pH 7.0, จึงสรุปว่าเป็นชนิด double-stranded RNA แต่เมื่อทำการแยกใน 5% PAGE gels กลับพบว่าการแยกตัวออกเป็น 8 ส่วน (segments) แต่ภายหลัง Upadhyaya และคณะ (1995) และ Mertens และคณะ (2003) รายงานว่า RRSV นั้นแบ่งจีโนมออกเป็น 10 ส่วน เมื่อทำการแยก RNA ของจีโนมไวรัสด้วยกระแสไฟฟ้าใน 7.5% polyacrylamide gels จึงเรียกชื่อเป็น segment 1 ถึง segment 10 (S1 ถึง S10)

Milne และคณะ (2003) อธิบายว่า RRSV มีส่วนคล้าย fijivirus กับ phytoeovirus ในด้านที่มีขนาดอนุภาค (particle) ขนาด 50-60 nm. มีจีโนมเป็น dsRNA มีขอบเขตพืชอาศัย (host range) และก่ออาการโรคคล้ายกัน แต่ RRSV จะต่างไปจากสองกลุ่มนี้ที่มี dsRNA แบ่งออกเป็นเพียง 8 ส่วน (segments) ขณะที่ dsRNA ของ phytoeovirus แบ่งเป็น 12 ส่วน นอกจากนี้ *N. lugens* ที่เป็นพาหะของ RRSV นั้นไม่พบว่าสามารถถ่ายทอด fijivirus และ phytoeovirus ทำนองเดียวกันแมลงพาหะของไวรัสทั้งสองอย่างนั้นก็ไม่สามารถถ่ายทอด RRSV

จากการพบว่าลำดับเบสของไวรัส rice tungro bacilliform virus ในต้นข้าวที่ปลูกต่อเนื่องไว้ในสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติในฟิลิปปินส์ ที่เปลี่ยนแปลงกลายเป็น variants ขึ้นใหม่ที่มีขนาดของจีโนมต่างไปได้เพราะการเกิด substitution และ insertion/deletion ของนิวคลีโอไทด์โดย Cabauatan และคณะ (1999) ดังนั้นการหาลำดับเบสภายในจีโนมของ RRSV ที่พบในประเทศไทยอาจช่วยให้เห็นความแตกต่างระหว่างเชื้อโรคที่เก็บจากต่างสถานที่ซึ่งปลูกข้าวต่างชนิดกัน อาจพบเป็นสายพันธุ์ หรือช่วยให้ทราบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) กับไวรัสอื่นได้ หากใช้วิธีการที่เหมาะสม โดยเฉพาะเมื่อใช้ลำดับเบสจากส่วนในจีโนมของไวรัสที่แสดงอาการโรคแตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย คือ การศึกษาเกี่ยวกับไวรัส RRSV ในด้านกายภาควิทยาของการเข้าทำลายข้าวบางพันธุ์ ในด้านคุณสมบัติทางชีวโมเลกุลและความสามารถในการก่อโรคข้าวใบหงิกของ RRSV และในแง่ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ RRSV จากแหล่งต่างๆ ในภาคกลางของประเทศ โดยแบ่งการศึกษาเป็น 5 ข้อ ดังนี้

1. ทำการจัดเก็บตัวอย่างเชื้อโรค RRSV และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากแหล่งต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงรักษาเชื้อโรคไว้ในเรือนเพาะปลูกโดยใช้ข้าวพันธุ์อ่อนแอ เช่น ไทจง เนทีฟ เบอร์ 1 (Taichung Native 1), ข้าวดอกมะลิ หรือ กข 7
2. ทำการตรวจสอบ RRSV ที่ติดเชื้อมับต้นข้าวและแมลงพาหะโดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จากไพรเมอร์จำเพาะพร้อมทดสอบให้ได้วิธีที่ง่ายและได้ผลดี
3. ศึกษาลักษณะการติดเชื้อ RRSV ในเซลล์และเนื้อเยื่อของข้าว โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
4. เลือกยีนของ RRSV ที่เหมาะสมแล้ววิเคราะห์หาลำดับเบส ทำกับ RRSV ต่างที่มา
5. วิเคราะห์ลำดับเบสโดย BLAST เปรียบเทียบลำดับเบสจาก GenBank ทำการจัดเรียงให้เหมาะสม แล้วใช้โปรแกรมวิเคราะห์ศึกษาความเป็นไปของยีน ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจาก phylogeny tree ที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสเดียวกันแต่ต่างแหล่งที่มา

อุปกรณ์และวิธีการ

ในช่วงการเริ่มต้นงานวิจัย ระหว่างปีพ.ศ. 2546-2548 ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ข้าวที่เป็นโรคใบหงิกและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืช เมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร เป็นเชื้อโรค และ แมลงพาหะ ในช่วงหลังของการศึกษาได้ใช้เชื้อโรคจากข้าวที่เป็นโรคใบหงิกจากแปลงเกษตรกร และใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากนาข้าวของเกษตรกร สายพันธุ์จากอำเภอบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรี เป็นแมลงพาหะ

1. การเตรียมต้นกล้าข้าวเพื่อทำเป็นพืชอานวยของเชื้อไวรัส และเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

แม่เมล็ดข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) หรือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในน้ำ 2 คืบ แล้วนำเมล็ดข้าวมาห่อผ้าห่มไว้ 2 คืบ ก่อนนำไปเพาะในดินที่หว่านบางๆ ในถาดพลาสติกทรงก้นกระดาง เมื่อกล้าข้าวอายุประมาณ 7 วัน จึงย้ายไปเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หรือย้ายต้นกล้าไปปลูกในกระดาง กระดางละ 1 ต้น หลังจากมีอายุ 15-20 วัน จึงใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสโรคใบหงิกของข้าว

2. การเพาะเลี้ยงแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวเต็มวัยสู่กล่องต้นกล้าข้าว กล่องละ 20-30 ตัว ให้มีตัวผู้ตัวเมียคละกัน คลุมกล่องด้วยผ้ามุ้ง หรือปิดด้วยฝากล่องที่กรุด้วยมุ้งลวดไม่ให้แมลงหนี แมลงตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นกล้าข้าว นาน 4-5 วันก็จะวางไข่ ทั้งตัวผู้และตัวเมียจะตายไป จากนั้น 2-3 วันจะเริ่มเห็นตัวอ่อนวัย 1 เมื่อเลี้ยงถึงตัวเต็มวัย นำส่วนหนึ่งไปเพาะเลี้ยงด้วยต้นกล้าข้าวที่เพาะขึ้นใหม่อีก เพาะกล้าข้าวทุกอาทิตย์ ใช้ต้นกล้าข้าวอายุ 7 วันเลี้ยงแมลงนาน 1 อาทิตย์ เปลี่ยนต้นกล้าข้าว 4 ครั้ง แมลงจะเจริญครบวัฏจักรชีวิต 1 รอบ คอยระวังไม่ให้จำนวนแมลงมีมากเกินไปจะทำให้กล้าข้าวโทรมเร็ว หากต้นกล้าเริ่มเหลืองจะดูดแมลงออกคราวหนึ่งไปเลี้ยงในกล่องใหม่ หากเพลี้ยวัย 2 และวัย 3 มีอาการตัวเหลือง (ไม่ใช่สีครีม) และมีบางส่วนตายไป แสดงว่าต้นกล้าข้าวที่ให้เป็นอาหารไม่พอ ต้องดูดแมลงไปเลี้ยงด้วยต้นข้าวในกล่องใหม่ การเจริญของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแบ่งเป็น 5 ระยะเจริญ คือ

1. ระยะไข่ ใช้เวลาฟักเป็นตัวนาน 2-3 วัน ไข่อาจอยู่เป็นแพ หรืออยู่กระจายบนกาบข้าว บริเวณส่วนโคน ไข่แต่ละฟองสีขาวครีม เป็นท่อนสั้นกลมหัวท้ายมน เมื่อแก่ก่อนฟักตัวนั้นที่ปลายด้านหนึ่งมีจุดตาสีออกแดง 2 จุด

2. ตัวอ่อนวัย 1 มีอายุ 5-7 วัน ตัวขาวปนเทาขนาด 0.5 - 1.0 มม.
3. ตัวอ่อนวัย 2 มีอายุ 5-7 วัน ตัวสีครีมขนาดราว 1 มม. ตาแดง ด้านหลังตรงข้ามส่วนอกมีแถบ 2 แถบ ขวางลำตัว เห็นชัดเจนเนื่องจากไม่มีปีกหุ้ม
4. ตัวอ่อนวัย 3 มีอายุ 5-7 วัน ตัวสีครีมตัวโตกว่าแมลงวัย 2 อย่างเห็นได้ชัด ตาไม่แดง ตัวผู้ตัวเมียแยกจากกันได้ง่ายเพราะขนาดลำตัวไม่ต่างกัน
5. ตัวเต็มวัย มีอายุ 5 - 7 วัน ตัวสีครีม หรือดำขนาดราว 1 มม. ปีกอาจเป็นแบบกุดยาวเกือบครึ่ง หรือยาวครึ่งลำตัว ตัวเมียโตกว่าตัวผู้ ตัวผู้ชนิดปีกยาวมักมีปีกยาวเลยกัน ส่วนตัวเมียชนิดปีกยาวมักมีปีกยาวเสมอกัน

3. การขยายเชื้อ RRSV

นำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เลี้ยงในกรงกันแมลงด้วยกล้าข้าวปลอดเชื้อโรคไปดูดกินบนต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ดูดกินน้ำเลี้ยงและรับเชื้อโรคแล้วใช้ที่ดูดจับแมลงนำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากต้นข้าวเป็นโรคที่ปล่อยไว้ไปปล่อยในต้นข้าวที่ไม่มีเชื้อโรคเป็นเวลา 1 วัน ทำเป็นชุดๆ ละ 10 ต้น เพื่อให้มีแหล่งเชื้อ RRSV เพียงพอและมีพร้อมเสมอที่จะใช้เพื่อการศึกษา ตรวจสอบลักษณะอาการของโรคหลังจากการถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นข้าว Taichung Native 1 หรือข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไปแล้ว 20 - 30 วัน

4. การศึกษาระยะเวลารับเชื้อ RRSV ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

แบ่งเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ไม่มีเชื้อไวรัสเป็นกลุ่มๆ ละ 50 ตัว ก่อนนำไปดูดกินบนต้นข้าวที่เป็นโรคนาน 1, 3, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงดูดจับแมลงนำไปปล่อยให้ดูดกินบนต้นกล้าข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 ที่เพาะขึ้นจนอายุ 15 วัน ปล่อยแมลงจำนวน 5 ตัวต่อต้นให้ดูดกินนาน 24 ชั่วโมง สำหรับแมลงกลุ่มที่ใช้เปรียบเทียบ (control) นั้นใช้แมลงที่ดูดกินต้นข้าวปกติ 24 ชั่วโมงก่อนนำไปดูดกินบนต้นกล้าข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 ที่มีอายุ 15 วัน ปล่อยแมลงดูดกินนาน 24 ชั่วโมง โดยใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 5 ตัวต่อต้น แล้วนำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลออกหรือกำจัดด้วยสารเคมี ตรวจสอบลักษณะอาการของโรคหลังจากถ่ายทอดเชื้อ 30 วัน

5. การศึกษาระยะเวลาการดูดกินเพื่อปล่อยเชื้อ RRSV ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

นำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไปดูดกินบนต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกนาน 24 ชั่วโมงเพื่อรับเชื้อโรคก่อนนำไปปล่อยให้ดูดกินบนต้นกล้าข้าวพันธุ์ TN-1 นาน 1, 3, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยปล่อยแมลง 5 ตัวต่อต้น เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้จะทำการพ่นสารเคมีหรือดูดแมลงออกจากต้นข้าวที่ทำการทดลอง สำหรับกลุ่มที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) นั้นทำได้โดยนำเพลี้ยกระโดดสี

เติมไนโตรเจนเหลวขณะบดตัวอย่างในโกร่งจนละเอียดก่อนย้ายไปใส่หลอดไมโครเซ็น
 ติรฟิวซ์ขนาด 1.5 ml เติม Tissue and Cell Lysis Solution ผสม Proteinase K (ความเข้มข้น 50
 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ โดยใช้ 1 μl ละลายใน Tissue and Cell Lysis Solution 300 μl ต่อแต่ละตัวอย่าง) 300 μl
 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ก่อนอุ่นที่ 65 °C นาน 15 นาที ขณะอุ่นนี้เขย่าด้วย vortex mixer
 ทุกๆ 5 นาที นำหลอดตัวอย่างที่อุ่นเสร็จแล้วไปแช่ในน้ำแข็งนาน 3-5 นาที ก่อนเติม MPC Protein
 Precipitation Reagent 150 μl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer อย่างแรงนาน 10 วินาที จากนั้น
 นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 $\times g$ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C หากมีแต่น้ำใส ตะกอนน้อย
 หรือไม่จับตะกอนแน่นให้เติม MPC Protein Precipitation Reagent อีก 25 μl ผสมให้เข้ากันแล้ว
 หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว เวลา และอุณหภูมิเท่าเดิม เมื่อเกิดตะกอนขึ้นจึงย้ายส่วนน้ำใสจาก
 ส่วนบนของหลอดไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml อันใหม่ ทั้งส่วนที่เป็นตะกอน เติม isopropanol
 ปริมาณ 500 μl กรอกหลอดไปมาประมาณ 30-40 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว เวลา และ
 อุณหภูมิเดิม ค่อยๆ เท isopropanol ออก ระวังอย่าให้ตะกอน RNA หลุด ละลายตะกอนกรดนิว
 คลีอิกใน DNase I solution (เตรียม DNase I solution 200 μl สำหรับแต่ละตัวอย่างโดยใช้
 RNase-free DNase I ปริมาณ 5 μl ต่อ 1 $\times$ DNase Buffer 200 μl หรือน้อยกว่า) ปริมาณ 200 μl
 แล้วนำไปอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 10 ถึง 30 นาที เพื่อกำจัด DNA ออกให้หมด จากนั้นเติม 2 $\times$ T และ
 C Lysis Solution ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation
 Reagent ปริมาณ 200 μl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่านาน 10 นาที วางหลอดตัวอย่างใน
 น้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที
 ดูดส่วนน้ำใสที่มี RNA ลงในหลอดขนาด 1.5 ml อันใหม่ ทั้งส่วนที่เป็นตะกอน เติม isopropanol
 500 μl ผสมให้เข้ากันด้วยการกรอกหลอดไปมาประมาณ 30-40 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว
 เวลา และอุณหภูมิเดิม จากนั้นค่อยๆ ดูด isopropanol ทั้ง ระวังอย่าให้ตะกอนหลุด ล้างด้วย 70%
 ethanol 500 μl 2 ครั้ง ระวังอย่าให้ตะกอนหลุด หากตะกอนหลุดให้หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่า
 เดิมแต่ระยะเวลาสั้นๆ แล้วใช้ TE Buffer 10-35 μl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ตรวจสอบ RNA ที่ได้ด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยผสม ethidium
 bromide ลงในอะกาโรสเจล ปล่อยให้แยกด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น
 นำไปส่องดูแถบของ RNA บนเจลบน UV-transilluminator

6.3. ไพรมเมอร์ (primers) สำหรับปฏิกิริยา One-Step RT-PCR

นำ RNA มวลรวมไปสังเคราะห์เป็น cDNA โดยการใส่ชุดสำเร็จ Super Script™ III
 One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) โดยใช้ไพ
 รมเมอร์จำเพาะ 3 คู่ ดังนี้

น้ำตาลดูดกินบนต้นข้าวปกตินาน 24 ชั่วโมงก่อนที่จะนำไปดูดกินบนต้นข้าวปกติอีก 24 ชั่วโมง แต่ลดต้นปล่อยแมลง 5 ตัว เมื่อครบกำหนดเวลา นำแมลงพาหะออก ตรวจสอบลักษณะอาการของโรคหลังจากถ่ายทอดเชื้อ 30 วัน

6. การวินิจฉัยโรคใบหงิกของข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

ในการวินิจฉัยโรคโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลนั้น เป็นการสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากตัวอย่างเนื้อเยื่อข้าวและตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ใช้เป็นแมลงพาหะโดยวิธีต่างกันเพื่อใช้เป็นแม่แบบ (template) ในการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 3 คู่ ซึ่ง 2 คู่ เป็นลำดับเบสบางส่วนจากจีโนมของ RRSV ในส่วน (segment) ที่ 5 และ 8 ที่แนะนำโดย ดร.บุญญานารถ นาถวงษ์ (ติดต่อส่วนบุคคล, 2547) กับคู่ที่ 2 อ้างโดย Shao (2004) สำหรับเป็นแนวทางในการศึกษาโรคนี้ต่อไป

6.1. ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้สกัด RNA รวม (total RNA)

ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากส่วนโคนกาบใบของต้นข้าวที่ผ่านการดูดกินของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ต่างกันคือจากต้นข้าวที่ผ่านการดูดกินโดยแมลงพาหะที่เลี้ยงไว้ในต้นข้าวที่ไม่ติดเชื้อไวรัส RRSV กับต้นข้าวที่ใช้แมลงจากต้นข้าวติดเชื้อโรคมาดูดกินในเวลาต่างกัน

เนื้อเยื่อจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแบ่งเป็นแมลงจากต้นกล้าข้าวไม่ติดเชื้อ และแมลงจากต้นข้าวที่ติดเชื้อที่ปล่อยให้ดูดรับเชื้อนานต่างกัน คือ 15, 30, 45, 60, 90 นาที ใช้ ตัวอย่างละ 50 ตัว

เนื้อเยื่อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากต้นข้าวไม่ติดเชื้อ และที่ดูดน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวเป็นโรคนาน 24 ชั่วโมงก่อนการสุ่มดูดจับแมลงทั้งสองกลุ่ม แต่ละกลุ่มใช้แมลงจำนวน 10 ตัว สำหรับศึกษาความสามารถรับเชื้อ RRSV

6.2. การสกัด RNA รวม (total RNA)

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างเนื้อเยื่อข้าวและแมลงพาหะทุกตัวอย่างทันที หรือนำไปเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อรอการสกัด

ใช้ชุดสกัดสำเร็จ Master Pure™ Complete DNA & RNA Purification Kit (EPICENTRE) กับตัวอย่างข้าว ตัวอย่างละ 50 มิลลิกรัม เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอย่างละ 10 มิลลิกรัม หรือตัวเดียวหากเป็นการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ บดแต่ละตัวอย่างแยกกันในโกรงที่ผ่านการแช่ 0.5 M NaOH ข้ามคืน ก่อนล้างและนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 25 นาที

คู่ที่หนึ่ง เป็นบางลำดับเบสจากส่วน(segment) ที่ 5 ของจีโนม คือ

S5U617sense 5' CGTTTGATAGGGTGAGAATTGG 3' กับ

S5L1539 antisense 5' GACAATCCCGCCAAGAGTATCATG 3'

คู่ที่ 2 จากบางลำดับเบสของจีโนมส่วนที่8 คือ

S8U722 sense 5'GCTGGAGTGAACGTCGA TTACATT 3' กับ

S8L1385 antisense 5' CGGCGGGCCACTCAAACC 3'

คู่ที่ 3 จากบางลำดับเบสในจีโนมส่วนที่ 6 คือ

Pns6 sense 5' GGGAATTCCATAT-GCAGCTCTTCATAGTCAAAC3'

กับ

Ndel antisense 5' CCGG-AATTCATCAAGCTCCTTA-CATTCAG 3'

ไพรเมอร์คู่ที่หนึ่งและ 3 สังเคราะห์จากบริษัท Operon สหรัฐอเมริกา ส่วนคู่ที่ 2 สังเคราะห์จากบริษัท Bioneer ประเทศเกาหลี

6.4. การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA โดยวิธี One-Step RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ในคราวเดียวกันด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยเตรียมมาสเตอร์มิกซ์(master mix)แล้วแบ่งใส่ใน 0.2 ml nuclease-free thin-walled PCR tube ที่วางไว้ในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง ให้แต่ละหลอดปฏิกิริยามีส่วนผสมดังต่อไปนี้

2x Reaction Mix 25 µl

แม่แบบ (template RNA) 5 µl

Sense primer 1µl

Anti-sense primer 1 µl

SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix 2 µl

เติมน้ำ RNase-free ที่หนึ่งแล้วให้ครบ 50 µl

สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้เปรียบเทียบ (control) เพื่อแสดงว่าไม่มี genomic DNA ใน RNA มวลรวมที่ทดลองนั้นใช้การเติมน้ำแทน SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix ในปริมาณเท่ากัน

นอกจากนี้ยังได้ใช้ชุดสำเร็จ QIAGEN OneStep RT-PCR สำหรับการสังเคราะห์ cDNA โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีส่วนผสมดังนี้

5X QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 10 µl

10mM dNTP Mix 2 μ l

Sense primer 1 μ l

Anti-sense primer 1 μ l

QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 2 μ l

RNA Template < 2.5 μ l

เติมน้ำ RNase-free ให้ถึง 50 μ l

สำหรับหลอดปฏิกิริยาที่ใช้เปรียบเทียบกับ (control) เพื่อแสดงว่าไม่มี genomic DNA ใน RNA มวลรวมนั้น ใช้การเติมน้ำแทน Enzyme Mix ในปริมาณเท่ากัน

ปั่นแต่ละหลอดเหวี่ยงเหวี่ยงรอบสั้นให้ส่วนผสมรวมกันที่กันหลอดก่อนนำไปใส่เครื่อง PCR ใน DNA Engine, MJ Research PIC-200, Peltier Thermal Cycler ตามสภาพต่อไปนี้

Pre-denaturation 1 รอบที่ 55 °C นาน 30 นาที

94 °C นาน 2 นาที

ต่อด้วย PCR เพิ่มจำนวน DNA ซ้ำ 40 รอบ

ที่ 94 °C นาน 15 วินาที 1 รอบ เพื่อ denature

65 °C 30 วินาที เพื่อ anneal

70 °C นาน 1 นาที

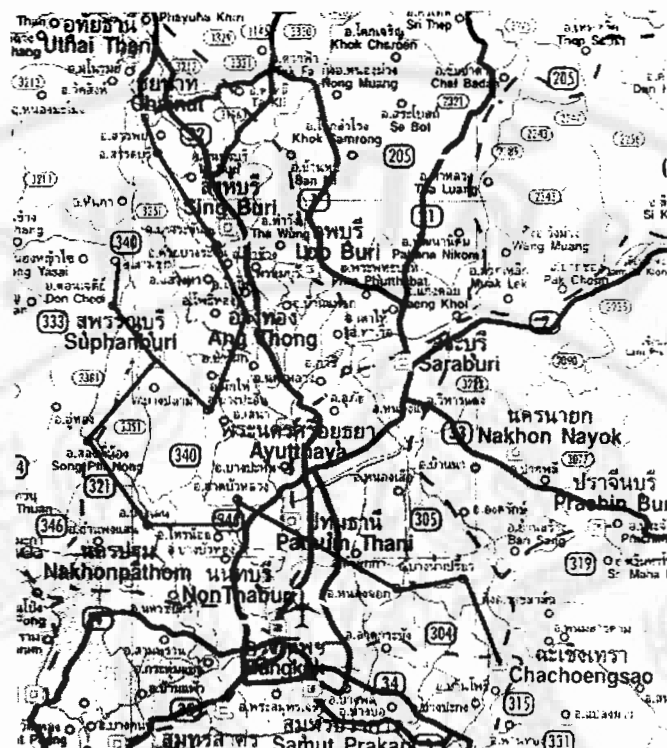
ตามด้วย final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้วนำ cDNA ที่ได้ไปแยกดูใน 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยผสม ethidium bromide (EtBr) ลงในอะกาโรสเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 45 นาที ตรวจสอบแถบของ RNA ในเจลบน UV-transilluminator เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder

7. การสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าว

ในเดือนตุลาคมปีพ.ศ. 2548 แม้ไม่มีรายงานการพบโรคใบไหม้(โรคจุ่ม)และการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของข้าวจากจังหวัดใดในภาคกลาง แต่ก็ได้ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นข้าวจากนาจำนวน 25 แหล่งจากจังหวัดต่างๆ คือ กรุงเทพมหานคร ฉะเชิงเทรา ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา อ่างทอง สุพรรณบุรี สิงห์บุรี และ ชัยนาท โดยสุ่มเก็บอย่างน้อยแหล่งละ 2 กอ เพื่อนำมาปลูกศึกษาในเรือนปลูกพืชทดลองกันแมลงในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ เพื่อการตรวจและวินิจฉัยการปรากฏของโรคใบไหม้โดยการสังเกตโรค และการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ตามที่กล่าวแล้ว แหล่งเก็บตัวอย่างตามแผนที่ในภาพที่ 2 จำนวน 25 แหล่งมีดังนี้

1. เขตหนองจอก อ.มีนบุรี กรุงเทพมหานคร
2. ต.ท่าไคร้ อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา
3. ต.บางน้ำเปรี้ยว อ.บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา
4. อ. บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา
5. อ. บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา
6. อ.สามโคก จ.ปทุมธานี
7. อ. ลาดบัวหลวง จ. พระนครศรีอยุธยา
8. อ. ลาดบัวหลวง จ. พระนครศรีอยุธยา
9. อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี
10. ศูนย์ศิลปาชีพ อ.บางไทร จ. พระนครศรีอยุธยา
11. วัดบ่อทอง อ.บางปะอิน จ. พระนครศรีอยุธยา
12. อ. เมือง จ.อ่างทอง
13. ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี
14. ต.เนินพระปรางค์ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี
15. อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี
16. อ.บางเลน จ.นครปฐม
17. อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี
18. ไนไร่้อย อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี
19. ไนไร่้อย อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี
20. ต.บ้านกล้วย อ.ค่ายบางระจัน จ.สิงห์บุรี
21. ต.ดอนกำ อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท
22. บ.เขาท่าพระ อ.เมือง จ.ชัยนาท
23. หน้าวัด บ.เขาท่าพระ อ.เมือง จ.ชัยนาท
24. ต.ท่าชัย อ.เมือง จ.ชัยนาท
25. บ.ไร่เตียน อ.ท่าชัย จ.ชัยนาท



ภาพที่ 2 เส้นทางเก็บสำรวจตัวอย่างต้นข้าวจากนาในภาคกลาง 25 แหล่งเมื่อปีพ.ศ.2548

8. การตรวจหาเชื้อ RRSV จากตัวอย่างใบข้าวจากการสำรวจ

ทำการตรวจหาการติดเชื้อ RRSV ด้วย เทคนิค one-step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นลำดับเบสของบางช่วงในจีโนมส่วนที่ 8 ของ RRSV (S8U722 sense 5'GCTGGAGTGAACGTCGA-TTACATT 3' กับ S8L1385 antisense 5'CGGCGGGCCACTCAAACC 3' ของบริษัท Bioneer, เกาหลี) ซึ่งให้ผลในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ cDNA ได้ ใช้วิธีเดียวกับ 6.2 สำหรับการสกัด total RNA และวิธีการดังข้อ 6.4 ในการตรวจหา PCR products โดยใช้ ผลิตภัณฑ์ QIAGEN OneStep RT-PCR ตามด้วย gel electrophoresis

9. การโคลนดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าวที่แสดงผลบวกใน RT- PCR

การตรวจหาเชื้อ RRSV จากตัวอย่างกอข้าวที่ได้มาจากการสำรวจ 25 แหล่งเมื่อเดือนตุลาคม 2548 โดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากสายที่ 8 ของ RRSV เข้าจับ cDNA ที่เพิ่มปริมาณได้ ปรากฏว่าได้ PCR products ขนาด 700 คู่เบสเท่ากันเมื่อใช้ตัวอย่างจาก 10 แหล่ง จึงใช้ PCR product ที่ได้มาทำ cloning เพื่อนำไปหาลำดับเบส โดยใช้ TOPO TA Cloning kit

(Invitrogen) โดยการ insert ดีเอ็นเอเข้าไปใน plasmid คัดเลือกเซลล์ *E.coli* (สายพันธุ์ Mach 1-T1^R) ที่มี insert ด้วย marker gene *ccdB* ที่เป็นยีนมรณะเชื่อมกับ LacZ α หากมี PCR product เข้าไปแทรกจะทำลายลำดับเบสของยีน *ccdB* ที่เชื่อมกับ LacZ α ทำให้ยีนมรณะไม่สามารถออกฤทธิ์ transformed cells จึงเจริญได้เป็นกลุ่มเจริญ (colony) แบบที่เรีย *E.coli* (สายพันธุ์ Mach 1-T1^R) ที่มีส่วนของดีเอ็นเอจากจีโนมไวรัสเชื้อโรคใบหงิกจากตัวอย่างต่างท้องที่จึงเพิ่มจำนวนได้ในอาหาร LB ที่เพาะเลี้ยง

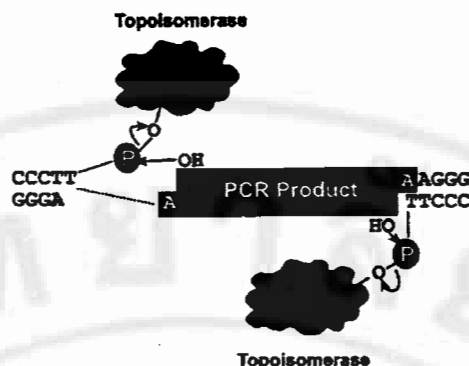
แผนการศึกษามีดังนี้

1. การเตรียม DNA เป้าหมาย จาก PCR products
2. ทำ cloning reaction โดยใช้ plasmid pCR[®] 4-TOPO[®]
3. ทำ transformation เข้าไปในเซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ Mach 1-T1 R
4. เลือกและวิเคราะห์โคโลนี
5. สกัด plasmid DNA วิเคราะห์ และหาลำดับเบส

9.1 การเตรียมชิ้น DNA ตัวอย่าง PCR product ของแต่ละตัวอย่างที่ได้ผลบวก นำมาสกัดเอาเจลออกโดยใช้ชุดสำเร็จ QIAquick[®] Gel Extraction Kit ของ QIAGEN (cat.No. 28704) ตัดแถบดีเอ็นเอจากเจล ใส่ในไมโครทิวบ์ เติม QG buffer 3 เท่าปริมาตร บ่มที่ 50 °C 10 นาที Vortex ทุกๆ 2-3 นาทีเพื่อให้เจลละลาย หากมีสีส้มหรือม่วงเติม 10 μ l 3M Na acetate เขย่าผสม จนมีสีเหลือง ถ้าเติม isopropanol 1 ปริมาตร เขย่าผสม ย้ายตัวอย่างใส่บนชุด column (spin column + collection tube) บั่นเหวี่ยง 1 นาที เททิ้งน้ำจาก collection tube เติม QG buffer 0.5 ml บั่นเหวี่ยง 1 นาที เติม Buffer PE 0.75 ml วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที บั่นเหวี่ยง 1 นาที เทน้ำทิ้ง บั่นเหวี่ยงอีก 1 นาที ย้าย spin column ไปไว้บนไมโครทิวบ์ใหม่ เติม 50 μ l Buffer EB ลงตรงกลางเมมเบรน (elution) บั่นเหวี่ยง 1 นาที จะได้ตัวอย่าง DNA ละลายใน บัฟเฟอร์

9.2 ทำ cloning reaction: การเชื่อมต่อ ชิ้น PCR product เข้ากับพาหะ

เนื่องจากชุดสำเร็จ TOPO TA cloning[®] ใช้พลาสมิดพาหะที่สามารถเชื่อมจับกับชิ้น PCR product ที่ถูก Taq polymerase-amplified มาแล้วโดยเอนไซม์นี้จะเติม deoxy-adenosine(A) ให้ที่ปลาย 3' ส่วนพลาสมิดมี deoxythymidine (T) ที่ปลาย 3' overhang พร้อมกับเอนไซม์ topoisomerase I จะช่วยเชื่อมสาย DNA ให้ต่อกัน โดยไม่ต้องใช้ primers หรือเอนไซม์ DNA ligase ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ขั้นตอนเอ็นเอที่จะเชื่อมต่อกับ TOPO vector ต้องมีปลาย 3' A overhang

เติมปลาย 3' A overhang แก่ PCR product โดยวางหลอดตัวอย่าง DNA ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วในน้ำแข็ง เติมเอนไซม์ *Taq pol* 1 unit เขย่าผสมเบาๆ บ่มหลอดที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที เก็บไว้ในน้ำแข็ง ทำ cloning reaction โดยเร็ว แต่ละ cloning reaction ประกอบด้วย

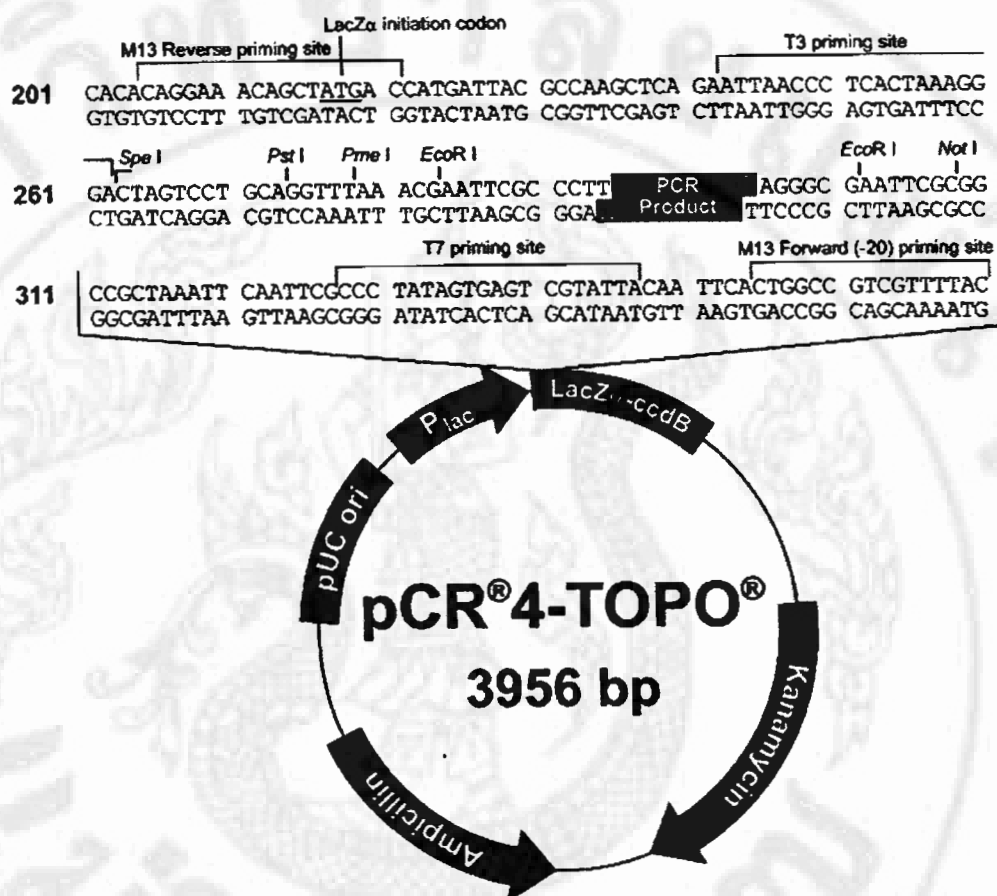
PCR product	2 µl
Salt solution	1 µl
TOPO vector	1 µl
Sterile water	2 µl

เขย่าผสมหลอดเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (22-23 °C) 5 นาที แช่หลอดในน้ำแข็ง แล้วเริ่ม transformation

9.3 Transformation นำ DNA เป้าหมายที่เชื่อมกับพาหะพลาสมิดแล้วเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น DNA

แบคทีเรียที่ใช้คือ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot[®] Mach 1[™]-T1^R cells (resistant ต่อ T1 phage) และในอาหาร LB ที่ใช้เพาะเลี้ยงมี kanamycin เป็น selective agent ตำแหน่งของ cloning site ในพลาสมิดของ *E.coli* มีแสดงไว้ในภาพที่ 4 ขั้นตอนการทำ transformation มีดังนี้ ดูด 4 µl จากหลอด cloning reaction ใส่หลอด *E.coli* เขย่าเบาๆ วางไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที ย้ายไปใส่ใน heating block 42 °C 30 วินาที ย้ายกลับไปในน้ำแข็งทันที เติม S.O.C medium 250 µl ปิดฝาให้แน่น เขย่าที่ 37 °C ในแนวนอน 200 rpm นาน 1 ชม. Spread 50 µl จากหลอดบน LB plate ที่อุ่นไว้แล้ว อาหยด S.O.C medium 20 µl, 100 µl บนเพลทเพื่อให้ได้โคโลนีที่กระจาย บ่ม 37 °C ข้ามคืน นับโคโลนีที่ได้จากตัวอย่างละ 2 เพลท เลือกเก็บโคโลนีเดียว ไป

เพาะเลี้ยงในหลอดอาหาร LB 1.2 ml ที่ผสม kanamycin 50 ug/ml บ่มและเขย่า ที่ 37 °C
ข้ามคืน พร้อมทั้ง streak บนเพลท LB + kanamycin เพื่อเก็บไว้



ภาพที่ 4 พลาสมิด pCR[®]4-TOPO[®] และ cloning site

9.4 การสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมิดและตรวจดู insert

เลี้ยงโคโลนีข้ามคืนในอาหาร LB ที่มี kanamycin 50 µg/ml เพื่อการแยกสกัด plasmid DNA แล้วตรวจดูว่า plasmid มี insert โดยย่อยด้วย restriction enzyme และ run gel electrophoresis

วิธีสกัด plasmid DNA ทำโดย 2 วิธี ดังนี้

1. ใช้ชุดสำเร็จ GFX Micro plasmid prep kit ของ Pharmacia Biotech(27-9601-02) สำหรับการสลายเซลล์ (Cell lysis) นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน 1.2 ml ย้ายใส่หลอดไมโครฟิวจ์ บันเหียงที่ 10,000 - 13,000 RPM 30 วินาที ให้เซลล์ตกตะกอน ดูดน้ำไลทิ้ง เติมน้ำ solution I 150 µl เขย่าด้วยวอร์เท็กซ์อย่างแรง แล้วเติมน้ำ solution II 150 µl กรอกหลอดไปมาเบาๆ 10 – 15 ครั้งไม่เกิน 2-3 นาที ของเหลวมีลักษณะใส เติมน้ำ solution III 300 µl กรอกหลอดไปมาเบาๆจนมี

ของขุ่นจับตัวกันเป็นก้อน กรอกหลอดต่อจนกระจายตัวประมาณ 20-30 ครั้ง แต่อย่าแรง เพราะ genomic DNA จะขาดเป็นท่อนๆ เข้าปนกับ plasmid DNA จนแยกจากกันยาก บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องให้เศษเซลล์ตกตะกอน เตรียม GFX column จัดใส่ collection tube

ทำ DNA ให้บริสุทธิ์ (DNA Purification) โดยดูดน้ำไลลงใน column ไม่ให้มีเศษเซลล์ปน ปลอ่ยไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 30 วินาที ทิ้งของเหลวใน collection tube เติม wash buffer 400 μ l ใน column บั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็วสูงสุดนาน 60 วินาที เพื่อขับ buffer ออก และทำให้ column แห้ง นำ column ใส่บนไมโครทิวบ์ใหม่ เติม TE buffer 100 μ l ลงบน column พักที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 1 นาที เพื่อให้ได้ DNA ออกมาจากคอลัมน์

2. ใช้ชุด Qiaprep Spin Plasmid Kit ของ QIAGEN (27106)

นำเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน 1.2 ml ย้ายใส่หลอดไมโครพิวจ์ บั่นเหวี่ยง 30 วินาที ให้เซลล์ตกตะกอน ดูดน้ำไลทิ้ง เติม buffer P1 250 μ l ผสมให้เข้ากับ cell pellet แล้วดูดใส่ไมโครทิวบ์ เติม buffer P2 250 μ l กรอกหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 5 นาที เติม buffer P3 350 μ l กรอกหลอดเบาๆ ต่อกันมีลักษณะขุ่นเหนียว บั่นเหวี่ยง 10 นาที เตรียม column ใส่บน collection tube ดูดน้ำไลลงใน column บั่นเหวี่ยง 30-60 วินาที เททิ้งของเหลวที่ออกมา เติม buffer PE 750 μ l บน column บั่นเหวี่ยง 30 -60 วินาที เทส่วนของเหลวทิ้ง บั่นเหวี่ยงต่อ 60 วินาที นำ column วางบนไมโครทิวบ์ใหม่ เติม TE buffer 50 μ l วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วบั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที

9.5 การวิเคราะห์ insert DNA

วิเคราะห์ insert โดยใช้ restriction enzyme *Eco* RI (BioLabs) เนื่องจาก cloning site ของ พลาสมิด pCR[®]4-TOPO[®] มีจุดตัดของ *Eco* RI โดยผสมตัวอย่าง DNA ที่สกัด plasmid ออกแล้วแล้ว 18 μ l, เข้ากับ NE buffer 2 μ l, *Eco* RI (BioLabs) 2 μ l, บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน

วิเคราะห์ insert โดยปฏิกิริยา PCR ด้วย specific primers ของ RRSV และ universal primers ที่ขนาบ cloning site ของพลาสมิด pCR[®]4-TOPO[®] แต่ละตัวอย่าง plasmid DNA ที่สกัดได้จะ set up ปฏิกิริยา PCR รวม 11 หลอด ดังนี้

หลอดที่	primer	primer	Plasmid DNA
1	S8U722	S8L1385	+ control
2	S8U722	S8L1385	_ control
3	M13 fwd	M13 rev	_ control
4	M13 fwd	S8U722	+
5	M13 rev	S8U722	+
6	T ₃	S8U722	+
7	T ₇	S8U722	+
8	M13 fwd	S8L1385	+
9	M13 rev	S8L1385	+
10	T ₃	S8L1385	+
11	T ₇	S8L1385	+

แต่ละปฏิกิริยาในหลอดมีส่วนผสมดังนี้ Master mix 22 μ l, primer อย่างละ 0.5 μ l, plasmid DNA 2 μ l ในการตรวจหา PCR products ทำวิธีการเหมือน 6.4 ตามด้วย gel electrophoresis

10. การเลือกโคโลนีที่เป็น transformants

วิเคราะห์ผลของ PCR กับ primers ต่างๆ เพื่อดูผลการแทรกตัวของ insert DNA โดยจัดส่ง stab culture ในอาหาร LB ที่แน่ใจว่า transformant colony ไม่มีการปน ไปหาลำดับเบสที่ Biomolecular Analysis Service Unit ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

11. อิเล็กตรอนจุลทรรศน์และการศึกษาด้วยจุลทรรศน์แสง

11.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างใบและหน่อต้นข้าวจากต้นปกติ และที่ปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีเชื้อโรค rice ragged stunt virus เข้าดูกินมาแล้ว 30 วันมาตัดเป็นชิ้นความยาวราว 1 มิลลิเมตร สำหรับตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ใช้ตัวอ่อนระยะที่สองที่เลี้ยงโดยให้ดูกินข้าวที่ปลอดเชื้อโรคใบขีด กับ พวกที่ดูกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่มีอาการของโรคใบขีดนำมาตัดส่วนหัวและส่วนปลายกันออกในน้ำยาตรึง

ของ Karnovsky (1967) ได้แก่ 2.5% (v/v) glutaraldehyde และ 2% (w/v) paraformaldehyde ผสมอยู่ใน 0.1M cacodylate – 0.1 M sucrose buffer pH 7.4 ใส่ตัวอย่างแต่ละอย่างที่ได้ตัดแล้วลงตรึงในน้ำยาตรึงอย่างเดียวกัมนาน 2 ชั่วโมงในอุณหภูมิห้อง หรือเก็บข้ามคืนในตู้เย็นที่ 4 °C หลังการตรึงนำมาล้าง 3 ครั้งในบัฟเฟอร์ 0.1M cacodylate – 0.1 M sucrose ครั้งละ 20 นาที ตรึงซ้ำด้วย 1% osmium tetroxide ที่ละลายใน 0.1 M cacodylate– 0.1 M sucrose buffer ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้งๆละ 20 นาทีก่อนนำไปแช่ย้อมในสารละลายยูเรเนียมอะซิเตทละลายน้ำเข้มข้น 2 % ในที่ไม่ถูกแสง นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือ ปลอยข้ามคืน ที่ 4 °C ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดโดยเปลี่ยนน้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที ขจัดน้ำในชิ้นตัวอย่างโดยแช่ในอะซิโตนผสมน้ำต่างความเข้มข้นคือ 30 %, 50%, 70%, 90% และ 100% แช่ในอะซิโตน 100% อีก 2 ครั้ง ขึ้นตอนละ 30 นาที นำชิ้นตัวอย่างมาแทรกเรซินอย่างใดอย่างหนึ่งคือ

1. Spurr's low-viscosity embedding resin (Spurr, 1969) ได้แก่ส่วนผสมของ
ERL 4206 10 กรัม, DER 736 (flexibilizer) 6 กรัม, NSA (hardener) 26 กรัม
และDMAE (S1, accelerator) 0.4 กรัม
2. Epon-araldite (Molloenhauer, 1964)ที่เป็นส่วนผสมของ
Embed 812 จำนวน 25 มิลลิลิตร (มล.), Araldite 502 15 มล., DDSA 55 มล.,และ
DMP-30 ปริมาณ 2.0% ของส่วนผสม

การแทนที่เรซินในเนื้อเยื่อทำในขวดแก้วขนาดเล็กดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างลงแช่ใน Spurr กับ 100% acetone อัตราส่วน 1:1 นาน 30 นาที ดูดด้วยปั๊มสุญญากาศราว 5 นาทีจนเห็นว่าการซึมเข้าได้ดี
2. เทส่วนของเหลวเดิมออก เติม Spurr กับ 100% acetone อัตราส่วน 2:1 นาน 30 นาที
3. เทส่วนผสมเดิมออก เติมส่วนผสม Spurr 100% นาน 30 นาที หรือข้ามคืน
4. เทส่วนผสมเดิมออก แช่ซ้ำใน Spurr 100% อีก 3 ครั้งๆละ 30 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

ในกรณีการใช้เรซินที่เป็นส่วนผสมของ epon-araldite นั้นเนื่องจากเป็นเรซินที่ไม่เข้ากันกับอะซิโตน การแทนที่เรซินในชิ้นเนื้อเยื่อต้องอาศัย propylene oxide เป็นตัวกลางแล้วค่อยเพิ่มปริมาณเรซิน ทำได้โดย ย้ายชิ้นตัวอย่างแช่ใน 100% propylene oxide นาน 30 นาที เปลี่ยนแช่ใน propylene oxide/resin 1:1 1 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนเป็น 100% resin ดูดด้วยปั๊มสุญญากาศเร่งให้เรซินซึมเข้าในชิ้นเนื้อเยื่อ ปลอยทิ้งข้ามคืน ย้ายลงใส่ใน 100% resin และแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำลงเข้าพลาสติก

11.2 การอบตัวอย่างในเรซิน

เติมเรซินลงราวหนึ่งในสามของเบ้าพลาสติก Beem capsule ขนาด 0.8 มล. ใส่ชิ้นตัวอย่าง เบ้าละชิ้น จัดตำแหน่งให้เหมาะสม เขียนป้ายลงกระดาษชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในเบ้าเรซินก่อนเติมเรซินจนเต็ม นำเบ้าไปอบที่ 70 °C นานข้ามคืนให้เรซินแข็งตัวเป็นแท่งในเบ้า

11.3 การผ่านบาง และการย้อมกิริตตัวอย่าง (ultrathin sectioning and grid staining)

นำแท่งเรซินที่ฝังชิ้นตัวอย่างออกจากเบ้าพลาสติกมาผ่านหนาขนาด 5 หรือ 15 ไมโครเมตร เพื่อการศึกษาด้วยจุลทรรศน์แสง สำหรับตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยอิเล็กตรอนจุลทรรศน์นั้นตัดผ่าน ให้บาง 80 นาโนเมตรด้วยมีดแก้วที่ยึดกับอัลตราไมโครโทม MT- 7000 ชิ้นตัวอย่างที่ตัดและลอยใน น้ำด้วยกิริตขนาด 400 เมชที่บุฟิล์มฟอร์มวาร์ 0.3 % และเพิ่มความแข็งแรงด้วยไฮคาร์บอนกราไฟต์ ย้อมตัวอย่างด้วย ยูเรนิล อะซิเตท 2 % นาน 20 นาทีแล้วย้อมทับด้วย เลด ซิเตรท (lead citrate 0.4 กรัม ในน้ำ 10 มล. เติม 10 N sodium hydroxide 0.1 มล.) นาน 15 นาที

สำหรับตัวอย่างศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงจะผ่านบาง 5 และ 15 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสี methylene blue 0.2% บันทึกภาพด้วย Moticam 2000

11.4 ตัวอย่างน้ำคั้นจากใบ และกาบใบข้าว (crude sap)

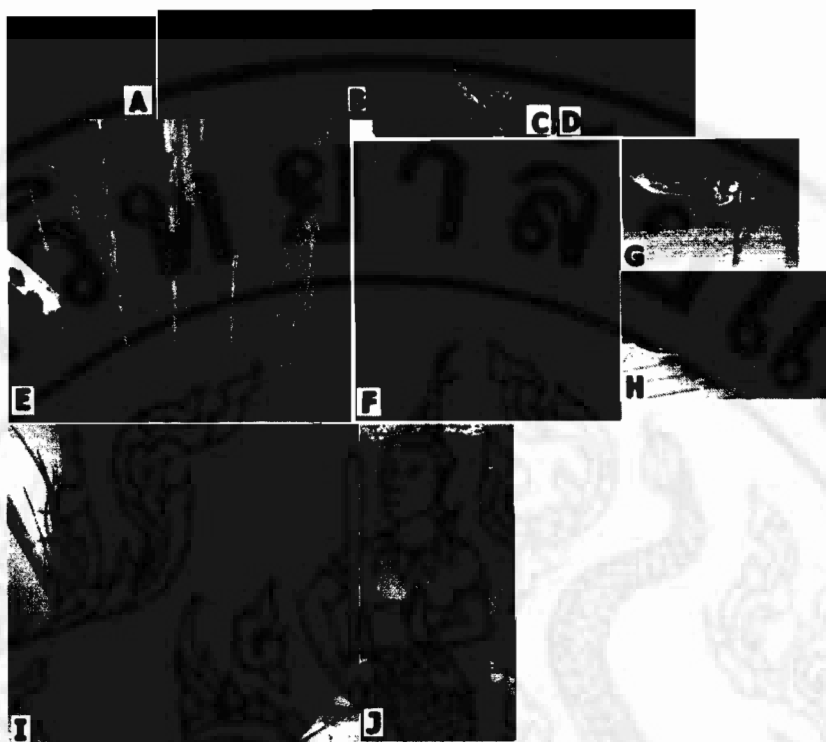
ตัวอย่างน้ำคั้นจากข้าว (crude sap) เตรียมได้จากการนำกาบใบและใบข้าวที่แสดงอาการโรค ใบหงิกมาล้างให้สะอาด ตัดให้เป็นท่อนยาวราว 0.5 ซม. นำไปแช่ในน้ำยาตรึง Karnovsky และดูด ด้วยปั๊มสุญญากาศราว 5 นาทีให้น้ำยาตรึงเข้าสู่ภายในเนื้อเยื่อข้าว ปลอຍแช่ในน้ำยาตรึงต่อไป อุณหภูมิ ห้องนาน 2 – 3 ชั่วโมง นำไปบดใน 0.1 M cacodylate – 0.1 M sucrose buffer นำส่วน น้ำไลหยดลงบนกิริตขนาด 200 - 400 เมช ที่บุเยื่อฟอร์มวาร์ และฉาบคาร์บอนแล้ว ย้อมกิริตแบบ negative staining ด้วย 2% phosphotungstic acid pH 7.4 เช็ดด้านข้างด้วยกระดาษซับ ปลอຍให้แห้ง

นำกิริตตัวอย่างแต่ละอันส่องศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JEOL JEM-2010 ด้วย กำลัง accelerating voltage 100 KV วัดขนาดภาพที่ได้และอนุภาคที่พบโดยการเปรียบเทียบกับ อนุภาคของ Tobacco mosaic virus (ยาว 300 นาโนเมตร)

ผลของการวิจัย

1. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและข้าวใบหงิก

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์จากอำเภอค่ายบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรีที่เพาะเลี้ยงด้วยต้นกล้าข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 หรือ Taichung number 1 (TN-1) สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว หากไม่ทำการเปลี่ยนต้นกล้าข้าวทุกอาทิตย์แล้วแมลงที่มีจำนวนมากสามารถดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวจนต้นไหม้ตายได้ง่าย การทดลองถ่ายทอดเชื้อ RRSV สู่วัวทั้งสองพันธุ์นี้สามารถทำได้ผลดี ภาพที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตบางระยะ (5 A – 5 H) แมลงวางไข่ลักษณะกลมยาวสีครีม ปลายด้านหนึ่งมีจุดสีชมพูแดงเห็นได้ด้วยกำลังขยาย 30-40 เท่า มักมีแมลงแบดชาลำตัวใสสีใสขนาดเล็กเข้ากิน เมื่อยังเป็นตัวอ่อนปีกยังไม่หุ้มทั้งตัวจะพบว่ามีขีดสีขาวจางๆ 2 ขีดขวางอยู่กลางลำตัว ด้านหลังเห็นได้ง่ายดังภาพที่ 5 C และ 5 D กอข้าวที่มีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเจริญเป็นกลุ่มใหญ่มักมีมดเข้าตอมและรบกวนตัวอ่อนบ่อยๆ ต้นกล้าข้าวที่มีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดูดกินน้ำเลี้ยงมากเข้าจะเหี่ยวเฉาถึงตายได้ (ภาพที่ 5 I) ภาพที่ 5 J แสดงกรงพลาสติกใสกรุผ้ามุ้งโปร่งสำหรับการปล่อยแมลงเพื่อให้ดูดกินรับเชื้อโรค และ ให้ดูดกินต้นข้าวเพื่อปล่อยเชื้อ RRSV



ภาพที่ 5 เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล(*Nilaparvata lugens* Stål) จากนาข้าวของเกษตรกรตำบลบ้านกล้วย อำเภอลำปาง จังหวัดลำปาง ต่างระยะเจริญได้แก่ กลุ่มไข่ กลุ่มเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เจริญบนต้นข้าว และ ตัวแก่ พร้อมกับการเพาะเลี้ยงด้วยต้นกล้าข้าว

2.อาการโรคใบหงิก

การใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์จากอำเภอลำปาง จังหวัดลำปาง ที่ติดเชื้อ RRSV ไปปล่อยเชื้อโดยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นกล้าข้าว TN-1 หรือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เป็นโรคใบหงิกเพื่อให้แมลงพาหะรับเชื้อโรคจากนั้นนำมาปล่อยให้ดูดกินต้นข้าวพันธุ์เดียวกันต่างระยะเจริญในกรงกันแมลงพลาสติกนาน 3 วันให้ดูดกินน้ำเลี้ยงเพื่อปล่อยเชื้อโรคสู่ต้นข้าวก่อนกำจัดแมลงที่นำมาปล่อย ต้นข้าวติดเชื้อและแสดงอาการโรคใบหงิกขึ้นจนเห็นชัดเจนหลังการรับเชื้อ 20-30 วัน

ภาพที่ 6 - 8 แสดงอาการโรคใบหงิกจากการปล่อยเชื้อผ่านแมลงพาหะในการทดลองนี้ การเป็นโรคจะไม่ทำให้ต้นข้าวตายแต่จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตข้าวโดยรวม อาการโรคใบหงิกที่ทดลองจะเห็นชัดเจนเมื่อต้นข้าวอายุมากขึ้น ข้าวที่ติดเชื้อจากระยะกล้าจะแตกกออ่อนหรือไม่แตกกอเลย ต้นข้าวที่ติดเชื้อ RRSV หลังจากพ้นระยะแตกกอไปแล้วต้นข้าวเป็นโรคยังแสดงอาการโรคได้ชัดเจน ภาพที่ 6 แสดงอาการโดยทั่วไปที่เกิดกับต้นข้าวเปรียบเทียบกับระหว่าง ต้นข้าวในนาที่สำรวจพบ(6 A – 6 C) กับต้นข้าวที่ทดลองทำให้เกิดโรคที่ใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่นำมาจากตำบลบ้านกล้วย อำเภอลำปาง จังหวัดลำปางเป็นพาหะ (6 D – 6 F) ข้าวที่เป็นโรคหลังระยะที่แตกกอไปแล้วจำนวนต้นต่อ

กอลจะลดลงบ้างแต่จะพบอาการผิดปกติที่ใบ และจะมีผลต่อการออกรวงและคุณภาพเมล็ดได้ ต้นข้าวเป็นโรคตั้งแต่ระยะกล้าจะแคะแกรนไม่สมบูรณ์หากปล่อยไว้จะมีอาการเหมือนที่พบในนา



ภาพที่ 6 ต้นข้าวแสดงอาการโรคใบหงิกเมื่อติดเชื้อโรคขณะต้นข้าวเติบโตเมื่ออายุต่างกัน A, เป็นต้นข้าวปกติ B, และ C เป็นต้นข้าวติดเชื้อที่ได้จากการสำรวจโรค D-F อาการของโรคที่เกิดกับข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) ที่ปลูกในกระถางและถ่ายทอดเชื้อโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สายพันธุ์บ้านกลับที่ได้รับเชื้อจากต้นที่เป็นโรคมานี้แล้ว 30 วัน โดย D เป็นต้นข้าวที่ปล่อยแมลงติดเชื้อหลังระยะย้ายปล่อง E และ F ต้นข้าวเป็นโรคเมื่อปล่อยแมลงติดเชื้อเข้าดูดกินในระยะแตกกอ และระยะกล้า นาน 3 วันก่อนกำจัดแมลง ต้นข้าวที่ปล่อยแมลงที่ไม่มีเชื้อโรคจะไม่แสดงอาการโรค (ไม่แสดงในภาพ)

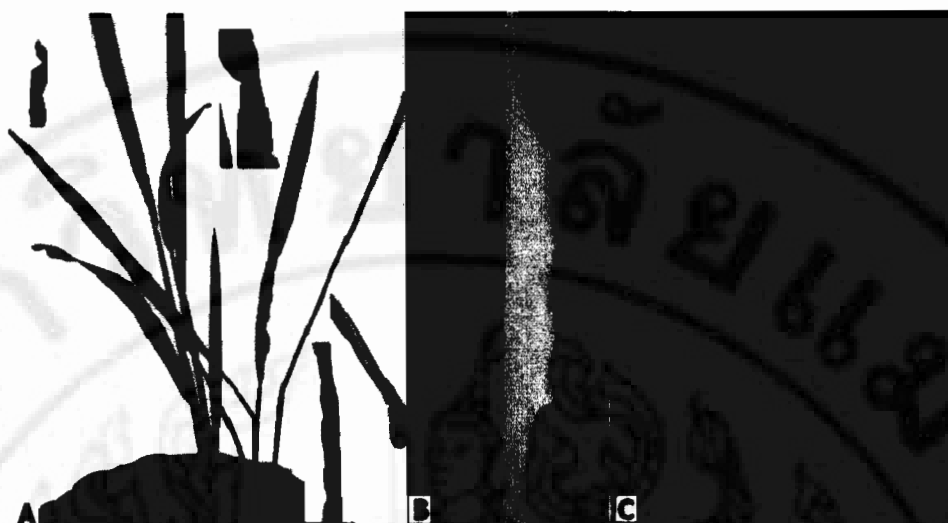
ข้าวพันธุ์เดียวกัน อายุเท่ากันนั้นต้นที่ติดเชื้อไวรัสโรคใบหงิกจะเติบโตช้ากว่า ต้นจะไม่สมบูรณ์เท่าต้นที่ปลอดเชื้อ แม้เป็นการติดเชื้อหลังระยะแตกกอ ภาพที่ 7 เป็นการเปรียบเทียบให้เห็นการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ TN 1 ระหว่างต้นปกติกับต้นที่เป็นโรคใบหงิกเมื่อมีอายุเท่ากัน แต่ขอขวามือมีการติดเชื้อหลังระยะแตกกอ ข้าวที่มีการติดเชื้อจะมีการเจริญและการตกรวงที่ช้ากว่า



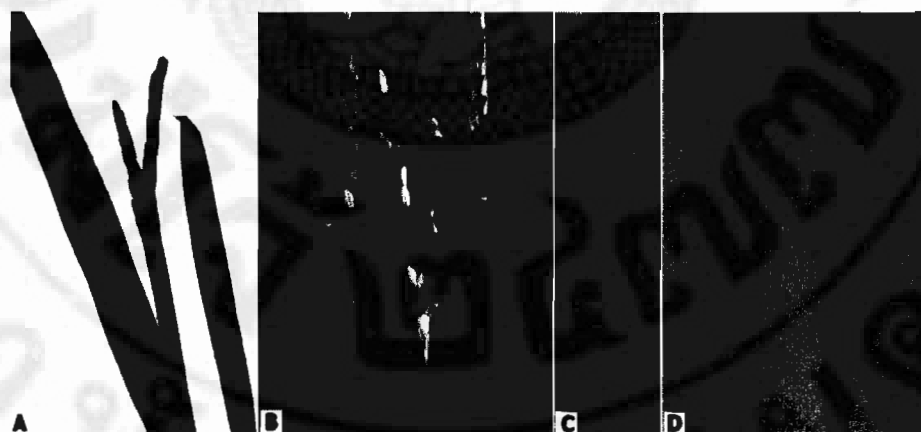
ภาพที่ 7 ภาพเปรียบเทียบให้เห็นการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ TN 1 ขณะมีอายุเท่ากัน ข้าวมือเป็นกอปกติ ข้าวมือเป็นกอที่มีการติดเชื้อหลังระยะแตกกอ ต้นข้าวที่ติดเชื้อมีการเจริญเติบโตและการทรงตัวที่ช้ากว่า

อาการที่ใบของข้าวที่เป็นโรคจะมีอาการดังภาพที่ 8 A-8 C ต้นและใบมีสีเขียวเข้ม ใบจะหนาและสั้นกว่าปกติ ปลายใบบิดเป็นเกลียว ต้นที่เป็นโรคเมื่อโตแล้วหน่อใหม่จะโตช้า ใบสั้น เริ่มแรกใบจะมีสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 8 C) แต่ต่อไปจะมี สีเขียวเข้ม ใบบางใบมีขอบใบแห้งขาดตามขวางของขอบแผลทำให้ขาดเป็นรอยหยักคล้ายฟันเลื่อย (ภาพที่ 8 B) ใบข้าวบางใบจะมีเส้นใบด้านใต้ใบบวมพอง เป็นแนวยาวทั้งที่ใบและกาบใบ ใบธงสั้น รวงออกไม่สมบูรณ์ไหล่ข้าวเมล็ดข้าวไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 8 B) ใบธงมักบิดม้วนจนแน่น

ภาพที่ 9 แสดงภาพรวงข้าวที่เป็นโรคใบหงิก ใบธงของต้นที่เป็นโรคมักจะบิดม้วนจนแน่น (9 A) บางกรณีการบิดม้วนอาจทำให้รวงข้าวไม่สามารถไหล่ขึ้นมาเจริญได้ตามปกติ เมล็ดข้าวในบางรวงอาจเป็นเมล็ดต่าง เมล็ดข้าวจะลีบ หรือไม่สมบูรณ์ โดยอาจเป็นเพียงบางเมล็ดดังภาพที่ 9 B และ 9 D หรือเมล็ดเสียทั้งรวงดังภาพที่ 9 C



ภาพที่ 8 อาการทั่วไปของต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกได้แก่ปลายใบบิดม้วนงอไม่มีการคดลีของใบ ขายขอบใบด้านใดด้านหนึ่งมีแถบสีขาว ด้านในของแถบมีสีเขียวอ่อนและจะเข้มขึ้นเมื่อใกล้เส้น กลางใบ มีรอยขาดตามขวางที่ขายขอบใบทำให้ใบเป็นรอยหยักคล้ายฟันเลื่อย ผิวใบไม่เรียบเส้น ใบโป่ง ใบจะบิดม้วนงอ ปลายใบบิดม้วนงอเป็นเกลียว



ภาพที่ 9 ลักษณะของรวงข้าวและเมล็ดข้าวของต้นข้าวพันธุ์ TN 1 ที่เป็นโรค A ปลายใบบิด ใบหงิกบิด ม้วนเป็นเกลียวแน่น, B เมล็ดข้าวลีบและดำ และ C รวงข้าวไม่สมบูรณ์เมล็ด เสียหาย D เปรียบเทียบระหว่างเมล็ดและรวงข้าวที่สมบูรณ์(ซ้าย) กับเมล็ดและรวงข้าวจาก ต้นเป็นโรค(ขวา)

3. การถ่ายทอดเชื้อ RRSV โดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

3.1. ผลต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวหลังการดูดกินโดยเพลี้ยกระโดด

การเกิดโรคใบหงิกโดยการถ่ายทอดเชื้อด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จากการทดลองนำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์ค่ายบางระจัน ที่มีเชื้อไวรัส RRSV ปล่อยให้ดูดกินต้นกล้าข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) อายุ 15-20 วัน โดยใช้แมลง 5 ตัวต่อต้น ปล่อยให้ดูดกินต้นข้าวนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำแมลงออกหรือกำจัดแมลงด้วยสารเคมี ในช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายน 2546 เมื่อสังเกตการเป็นโรคหลังการปล่อยเชื้อ ดังตารางที่ 1 พบว่า ในช่วงอากาศร้อนและแห้งแล้งของเดือนเมษายน จะทำให้การติดโรคใบหงิกน้อยกว่าการปล่อยเชื้อในช่วงเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน ซึ่งระยะเวลาที่อากาศเย็นลงและมีความชื้นสัมพัทธ์สูงขึ้น (10 – 14.5% ในเดือนเมษายน และ 25 – 30% ในเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน)

ตารางที่ 1 การเกิดโรคของข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) 30 วันหลังปล่อยเชื้อไวรัส RRSV ด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์ค่ายบางระจันเข้าดูดกิน จำนวน 5 ตัวต่อต้น ให้ดูดกินนาน 24 ชั่วโมง

วัน/เดือน/ปีที่ปล่อยเชื้อ	จำนวนต้นข้าวที่เกิดโรคต่อ จำนวนต้นข้าวที่ปล่อยเชื้อ	%การเกิดโรค
2 เมษายน 2546	1/7	14.5
7 เมษายน 2546	1/8	12.5
17 เมษายน 2546	1/7	14.5
21 เมษายน 2546	1/8	10
25 เมษายน 2546	1/10	10
23 พฤษภาคม 2546	2/8	25
4 มิถุนายน 2546	3/10	30
9 มิถุนายน 2546	2/8	25
14 มิถุนายน 2546	2/8	25

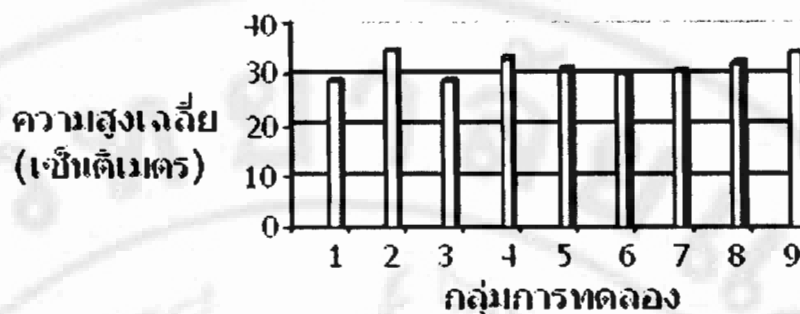
ในการทดลองเดียวกันนี้แม้ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นข้าวไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 10) แต่เมื่อพิจารณารายต้นระหว่างพวกที่เป็นโรคและไม่เกิดโรคแล้วต้นที่เป็นโรคจะเตี้ยกว่าต้นปกติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความสูงของต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) 30 วัน หลังการปล่อยเชื้อ RRSV ด้วย เพี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์ค่ายบางระจัน จำนวน 5 ตัวต่อต้น นาน 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่	ความสูงต้นข้าว (ซม.)										รวม	เฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	31	27	23*	34	30	26	46	-	-	-	217	31.0
2	48	19*	35	39	32	37	40	25	-	-	275	34.4
3	30	27*	35	36	29	18	25	-	-	-	200	28.6
4	42	31	38	36	43	34	22*	31	27	25	319	31.9
5	24	29	30	32	27*	35	30	38	36	25	306	30.6
6	27*	41	30	25*	32	19	35	29	-	-	238	29.8
7	19*	35	37	40	29	32	37	19*	34	22*	304	30.4
8	33	36	27	35	29*	33	25*	38	-	-	305	33.9
9	20*	32	48	35	18*	40	35	45	-	-	273	34.1

หมายเหตุ * ต้นข้าวแสดงอาการโรคใบหงิก

ต้นข้าวที่มีอาการของโรคจะมีความสูงอยู่ระหว่าง 18 – 29 เซนติเมตร ส่วนข้าวที่เติบโตเป็นปกติจะมีความสูงระหว่าง 19 – 48 เซนติเมตร เนื่องจากความแตกต่างทางความสูงของข้าวต้นปกติมีมาก และการเป็นโรคของข้าวมีน้อย จึงทำให้ค่าเฉลี่ยโดยรวมไม่แสดงความแตกต่างกัน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 แสดงความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวแต่ละกลุ่มการทดลองหลังการปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีเชื้อ RRSV เข้าดูดกินนาน 24 ชั่วโมง จำนวนแมลงพาหะ 5 ตัวต่อต้น สังเกตอาการหลังการปล่อยเชื้อ 30 วัน

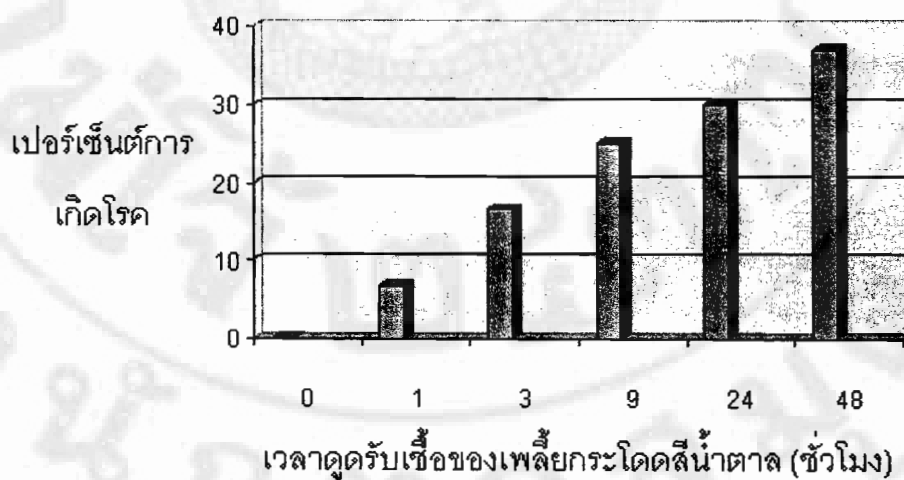
3.2 ระยะเวลาการรับเชื้อ RRSV จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

จากการนำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกนาน 24 ชั่วโมงให้รับเชื้อ RRSV นำไปทดสอบระยะเวลาในการปล่อยเชื้อ RRSV สู่ต้นกล้าข้าวโดยให้ดูดกินเพื่อปล่อยเชื้อ (inoculation feeding) ในระยะเวลาต่างกันคือ 1, 3, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้แมลงพาหะ 5 ตัวต่อต้น แล้วนำแมลงออกหรือกำจัดแมลงด้วยสารเคมี แล้วสังเกตการเกิดโรคใบหงิกของต้นข้าวที่ใช้ทดสอบหลังการปล่อยเชื้อนาน 30 วัน

จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อแมลงพาหะรับเชื้อมาแล้ว 24 ชั่วโมง แล้วการปล่อยเชื้อเข้าสู่ต้นข้าวได้ดีมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับจำนวนเวลา (ชั่วโมง) ที่เข้าดูดกินโดยจะพบว่า การปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีเชื้อ RRSV ให้ดูดกินต้นกล้าข้าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะทำให้ต้นกล้าข้าวที่ใช้ในการทดลองเป็นโรคได้มากที่สุด คือ 37 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจำนวนชั่วโมงของการเข้าดูดกินเพื่อปล่อยเชื้อที่น้อยลงมา 24, 9, 3 และ 1 ชั่วโมง นั้นมีการเกิดโรคน้อยลงตามลำดับคือ 30, 25, 16.6 และ 6.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 3 แสดงการเกิดโรคใบหงิกของข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 หลังการปล่อยแมลงพาหะที่ติดเชื้อในระยะเวลาต่างกัน วัดผลหลังการปล่อยเชื้อ 30 วัน

ระยะเวลาที่ต้นข้าวได้รับเชื้อจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ชั่วโมง)	จำนวนต้นข้าวที่เกิดโรคต่อจำนวนต้นข้าวที่ปล่อยเชื้อทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
0	0/10	0
1	1/15	6.6
3	2/12	16.6
9	2/8	25
24	3/10	30
48	3/8	37



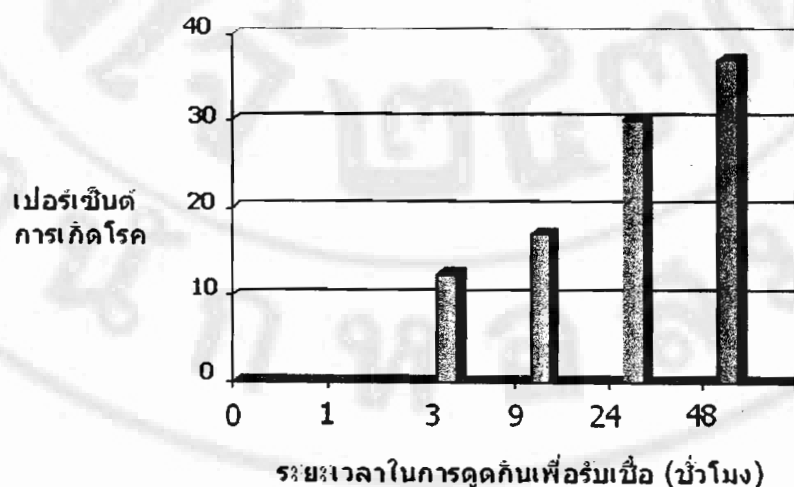
ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบหงิกกับระยะเวลาในการดูกินเพื่อปล่อยเชื้อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

3.3 ระยะเวลารับเชื้อ RRSV ของเพื่อยกระโดดสีน้ำตาล

การนำเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพที่ปลอดเชื้อเข้าดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกในระยะเวลาต่างกันคือ 0, 1, 3, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเป็นการดูรับเชื้อ (acquisition feeding) ก่อนที่จะนำไปปล่อยให้ดูดกินต้นกล้าข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตการเกิดโรคหลังการปล่อยเชื่อนาน 30 วัน ผลการตรวจนับจำนวนต้นข้าวเป็นโรคต่อจำนวนต้นข้าวที่ไม่เกิดโรค โดยอาการโรคแสดงไว้ในตารางที่ 4 ภาพที่ 12

ตารางที่ 4 ระยะเวลาการเข้าดูดกินเพื่อรับเชื้อ RRSV ของเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลแมลงพาหะที่สามารถจะทำให้ต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 เกิดโรคใบหงิก เมื่อทำการปล่อยเชื่อนาน 24 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการดูดกินเพื่อรับเชื้อ (ชั่วโมง)	ต้นข้าวที่เป็นโรค/ ต้นข้าวที่ใช้ในการทดลอง	%การเกิดโรค
0	0/10	0
1	0/10	0
3	1/8	12.5
9	2/12	17
24	3/10	30
48	3/8	37



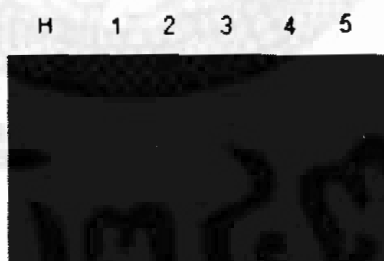
ภาพที่ 12 ระยะเวลาการเข้าดูดกินเพื่อรับเชื้อ RRSV ของเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลแมลงพาหะที่สามารถทำให้ต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 เกิดโรค โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

จากตารางที่ 4 พบว่าระยะเวลาที่แมลงพาหะดูดกินเพื่อรับเชื้อ RRSV จะมีผลโดยตรงต่อการเกิดโรคใบหงิกของต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 ระยะเวลาที่แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงต้นข้าวที่เป็นโรคนานที่สุดในการทดลองนี้คือ 48 ชั่วโมงจะทำให้ต้นกล้าข้าวทดลองเกิดโรคได้สูงที่สุดคือ 37 เปอร์เซ็นต์ การดูดกินเพื่อรับเชื้อสั้นลงมาจะทำให้การเกิดโรคน้อยลง ดังจะเห็นว่าการดูดรับเชื้อ 24, 9 และ 3 ชั่วโมง จะทำให้การเกิดโรคน้อยลงตามลำดับคือ 30, 25, 16.6 และ 6.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองนี้การปล่อยแมลงที่มีเชื้อ RRSV เข้าดูดกินต้นข้าวทดลองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะไม่ทำให้ต้นข้าวเป็นโรคใบหงิก ซึ่งจะให้ผลเช่นเดียวกันกับต้นข้าวที่ถูกดูดกินโดยแมลงพาหะไม่มีเชื้อไวรัส

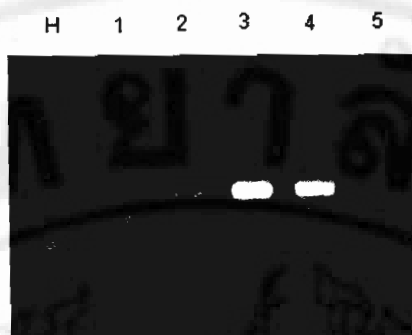
4. การวินิจฉัยโรคใบหงิกของข้าวโดยใช้เทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล

4.1 สกัด RNA มวลรวม (total RNA) จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ผลจากการสกัดอาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) จากตัวอย่างแต่ละตัวอย่างด้วยชุดสกัด Master Pure™ Complete DNA & RNA Purification Kit จากข้าวตัวอย่างละ 50 มิลลิกรัม และเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลตัวอย่างละ 10 มิลลิกรัม ทุกตัวอย่างในการทดลองนี้สามารถทำการตรวจพบได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที การแยกอาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) จากต้นข้าวแสดงใน ภาพที่ 13 และเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลในภาพที่ 14



ภาพที่ 13 ปริมาณอาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) สกัดจากตัวอย่างข้าวที่ถูกดูดกินนาน 24 ชั่วโมง โดยเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลต่างกลุ่ม คือ H แมลงพาหะดูดน้ำเลี้ยงจากข้าวไม่เป็นโรคนาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปดูดกินข้าวทดลอง : เลนที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นผลได้จากตัวอย่างข้าวที่ถูกดูดกินด้วยแมลงที่มีประวัติการดูดกินต้นข้าวเป็นโรคใบหงิกนาน 1, 3, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาปล่อยเชื้อ

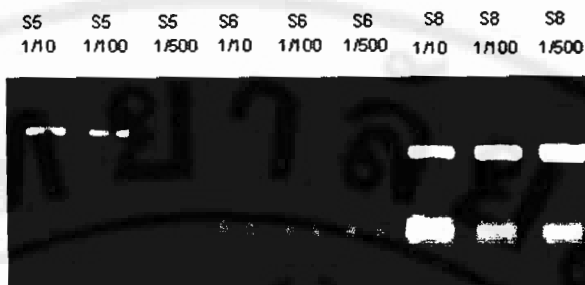


ภาพที่ 14 ปริมาณอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ที่สกัดจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ดูดกินต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกเพื่อรับเชื้อ RRSV ในระยะเวลาต่างกัน : H แมลงไม่ได้รับเชื้อโรคไวรัส เลนที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากแมลงพาหะที่ดูดกินเพื่อรับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 15, 30, 45, 90 นาที และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

4.2 การสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรัส RRSV ด้วยวิธี One-Step RT-PCR

เมื่อนำ RNA รวม (total RNA) ไปสังเคราะห์เป็น cDNA โดยการใช้ชุดสำเร็จ Super Script[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 3 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 จากจีโนมของ RRSV ส่วน (segment) ที่ 5 คือ S5U617 กับ S5L1539, คู่ที่ 2 จากจีโนมส่วน (segment) ที่ 6 คือ Pns6 กับ Ndel และ คู่ที่ 3 จากส่วน (segment) ที่ 8 คือ S8U722 กับ S8L1385 คู่ พบว่าไพรเมอร์ที่ต่างกันให้ผลในการสังเคราะห์ cDNA แตกต่างกัน แม้ว่าจะทดลองใช้อาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ต่างความเข้มข้นเป็นแม่แบบ

ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5U617 กับ S5L1539) และ คู่ที่ 3 (S8U722 กับ S8L1385) เท่านั้นที่สามารถให้ผลในการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากตัวอย่างข้าว ทั้งนี้ในการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จะเกิดขึ้นได้เฉพาะตัวอย่างจากต้นข้าวที่มีการติดเชื้อไวรัส RRSV แล้วเท่านั้น สำหรับไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Pns6 กับ Ndel) ไม่สามารถให้ผลในการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัส RRSV ได้ (ภาพที่ 14)

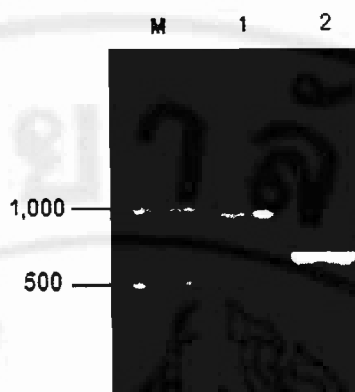


ภาพที่ 15 ผลของการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ มวลรวม (total RNA) จากตัวอย่างข้าว เมื่อใช้ RNA template ด้วความเข้มข้น และไพรเมอร์ S5, S6 และ S8 ได้แก่ไพรเมอร์คู่ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

จากภาพที่ 15 ไพรเมอร์คู่ที่ 3 (S8) จะทำให้การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณเป็น cDNA ดีกว่าคู่ที่ 1 (S5) ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 2 (S6) นั้นไม่สามารถทำให้มีการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณเป็น cDNA ได้ ส่วนความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอแม่แบบที่ใช้ นั้น มีผลอย่างยิ่งในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยไพรเมอร์ต่างกัน ดังจะเห็นจากการใช้อาร์เอ็นเอที่เจือจาง 1/10 และ 1/100 ของความเข้มข้นดั้งเดิมหากใช้กับไพรเมอร์คู่ที่ 1 แต่กับไพรเมอร์คู่ที่ 3 นั้น พบว่าถ้าลดความเข้มข้นเป็น 1/500 ของความเข้มข้นเดิม จะให้ cDNA ได้มากกว่าที่ 1/100 และ 1/10 ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้าว

เมื่อใช้อาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) สกัดจากตัวอย่างข้าวที่ถูกดูดกินโดยแมลงพาหะติดเชื้อ RRSV ระยะเวลานานต่างกับเป็นแม่แบบพบว่า ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5) และ 3 (S8) สามารถใช้ในการตรวจพบเชื้อไวรัส RRSV หลังจากต้นข้าวถูกแมลงพาหะที่ติดเชื้อดูดกินเพื่อการปล่อยเชื้อนาน 48 ชั่วโมง โดยเจือจางเป็น 1/500 ของความเข้มข้นอาร์เอ็นเอที่แยกได้

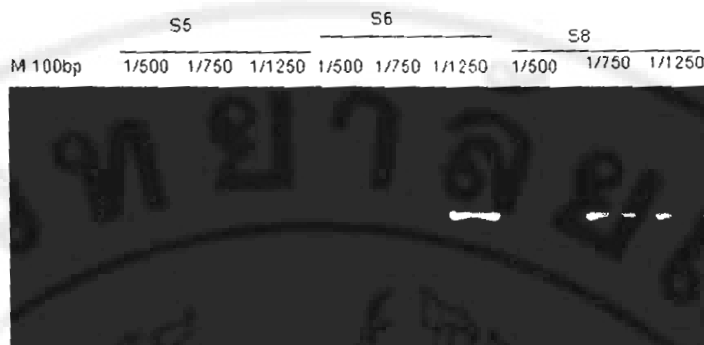
ภาพที่ 16 แสดง cDNA ที่สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณโดย RT-PCR ใน 1% อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 45 นาที เปรียบเทียบกับ 100bp DNA Ladder ตำแหน่งที่พบ cDNA ซึ่งได้จากไพรเมอร์ทั้งสองจะแตกต่างกันโดยไพรเมอร์คู่ที่ 1 อยู่ตรงตำแหน่งระหว่าง 900 – 1,000 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 3 จะให้แถบ cDNA บริเวณตำแหน่งที่ 600 – 700 คู่เบส



ภาพที่ 16 การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรัส RRSV โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5) และ คู่ที่ 3 (S8) กับอาร์เอ็นเอจากต้นข้าวที่ถูกแมลงพาหะที่ติดเชื้อเข้าดูดกินเพื่อปล่อยเชื้อโรคนาน 48 ชั่วโมง : M, marker , เลนที่ 1 ; ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5) กับแม่แบบเจือจาง 1/500 จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ และเลนที่ 2 ; ไพรเมอร์คู่ที่ 3 (S8) กับแม่แบบเจือจาง 1/500 จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

ในการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อ RRSV โดยใช้อาร์เอ็นเอมวลรวมจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแม่แบบนั้นพบว่าทำได้โดยวิธีเดียวกันแต่ต้องใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 และ คู่ที่ 3 และพบว่า ไพรเมอร์คู่ที่ 2 (S6) และ 3 (S8) สามารถใช้ในการตรวจพบเชื้อไวรัส RRSV หลังจากที่ถูกแมลงพาหะได้ดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นข้าวที่เป็นโรคนาน 90 นาที และ 24 ชั่วโมงเมื่อใช้แม่แบบเจือจางเป็น 1/1250 และ 1/750 ของความเข้มข้นอาร์เอ็นเอเดิมตามลำดับ (ภาพที่ 16)

ไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Pns6 กับ Ndel) ให้ผลในการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณเป็น cDNA พบแถบในตำแหน่งระหว่าง 600 – 700 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 3 (S8U722 กับ S8L1385) จะแสดงแถบ cDNA ที่ประมาณ 700 คู่เบส ไพรเมอร์ทั้งสองคู่นี้เท่านั้นที่สามารถให้ผลในการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอมวลรวมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับเชื้อ RRSV สำหรับไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5U617 กับ S5L1539) ไม่สามารถให้ผลในการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัส RRSV ได้ (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 การสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม จากตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยที่แม่แบบมีความเข้มข้นต่างกัน : S5, S6 และ S8 คือ ไพร์เมอร์คู่ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอรวมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่รับเชื้อไวรัสในระยะเวลาต่างๆ เป็นแม่แบบ ระยะเวลาที่สามารถทำการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณได้ในการทดลองครั้งนี้คือ 90 นาทีและที่ 24 ชั่วโมง สำหรับไพร์เมอร์ที่สามารถตรวจพบคือคู่ที่ 2 (S6) และคู่ที่ 3 (S8) โดยใช้ที่ความเข้มข้น 1/1250 และที่ 1/750 ตามลำดับ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ของ RRSV โดยใช้ไพร์เมอร์คู่ที่ 2 (S6) และคู่ที่ 3 (S8) โดยใช้อาร์เอ็นเอแม่แบบจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับเชื้อไวรัสในระยะเวลาต่างๆ เป็นแม่แบบ : M - marker , เลนที่ 1, 2 ; ไพร์เมอร์คู่ที่ 2 (S6) กับแม่แบบจากแมลงที่รับเชื้อไวรัสนาน 90 นาที และ 24 ชั่วโมงที่ความเจือจาง 1/1250 ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ , เลนที่ 3,4 ; ไพร์เมอร์คู่ที่ 3 (S8)กับอาร์เอ็นเอจากแมลงที่รับเชื้อไวรัสนาน 90 นาที และ 24 ชั่วโมงที่ความเจือจาง 1/750 จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

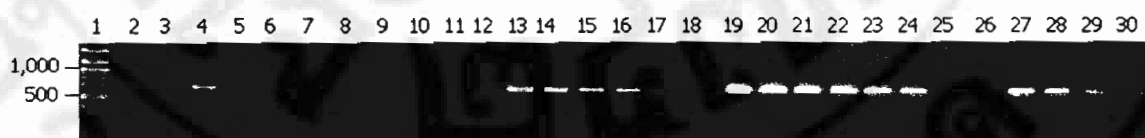
5.การตรวจสอบตัวอย่างข้าวจากแปลงนาจังหวัดต่างๆในเขตภาคกลาง

ในการสำรวจโรคนี้พบว่าชาวนานิยมปลูกข้าวนาหว่านที่มีต้นข้าวขึ้นแน่น เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีสำหรับควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเนื่องจากเคยได้รับความเสียหายจากการทำลายของทั้งเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยตรงที่ทำให้เกิดอาการต้นข้าวไหม้ และโรคใบบดที่แมลงชนิดนี้เป็นตัวนำการแพร่ระบาดของโรค ในบริเวณที่เข้าสำรวจโดยทั่วไปจะไม่ค่อยพบการระบาดของแมลงชนิดนี้ แต่ก็พบว่ามีการพบข้าวที่เป็นโรคใบบดปรากฏอยู่หลายแห่ง

5.1 ผลการวินิจฉัยโรคด้วยวิธี one-step RT-PCR

การวินิจฉัยและตรวจหาเชื้อ RRSV จากกอข้าวที่ได้เก็บสำรวจ 25 แหล่งเมื่อเดือนตุลาคม 2548 ด้วยวิธี one-step RT-PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์จากจีโนมส่วนที่ 8 ของ RRSV จากนั้นตรวจผลที่ได้โดย agarose gel electrophoresis นั้นปฏิกิริยาของตัวอย่างจากต้นข้าวที่ติดเชื้อ RRSV จะมีการสังเคราะห์ cDNA amplicons ที่เป็น PCR products ขนาดประมาณ 700 คู่เบส และปรากฏเป็นแถบในเจล ส่วนข้าวที่ไม่ติดเชื้อจะไม่ปรากฏแถบนี้

ตัวอย่างข้าวที่เก็บมาปลูกศึกษาที่ไม่พบการสังเคราะห์ cDNA ของไพรเมอร์ ได้แก่ ตัวอย่างจาก หนองจอก มีนบุรี, ท่าไข่ ฉะเชิงเทรา, บางน้ำเปรี้ยว ฉะเชิงเทรา, เนินพระปรางค์ สุพรรณบุรี, และจาก ลาดหลุมแก้ว ปทุมธานี ส่วนตัวอย่างที่พบว่าติดเชื้อโรคใบบดได้แก่ตัวอย่างข้าวที่เก็บมาจาก หน้าศูนย์ศิลปาชีพบางไทร อโยธยา, ไร่ใหญ่ สุพรรณบุรี, สามโคก ปทุมธานี, ลาดบัวหลวง อโยธยา, บางปะอิน อโยธยา, และ จากอำเภอเมืองจังหวัดอ่างทอง(ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 การตรวจพบเชื้อ RRSV จากตัวอย่างข้าวที่เก็บจากนาในเขตภาคกลาง. เห็นได้จากแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR. 1 marker 100 bp; 2 negative control; 3 ข้าวปกติ; 4 positive control; 5 หนองจอก1; 6 หนองจอก2; 7 ท่าไข่1; 8 ท่าไข่2; 9 บางน้ำเปรี้ยว1; 10 บางน้ำเปรี้ยว2; 11 บางน้ำเปรี้ยว3; 12 บางน้ำเปรี้ยว4; 13 หน้าศูนย์ศิลปาชีพบางไทร1; 14 หน้าศูนย์ศิลปาชีพบางไทร2; 15 ไร่ใหญ่1; 16 ไร่ใหญ่2; 17 เนินพระปรางค์1; 18 เนินพระปรางค์2; 19 สามโคก1; 20 สามโคก2; 21 ลาดบัวหลวง1; 22 ลาดบัวหลวง2; 23 ลาดบัวหลวง3; 24 ลาดบัวหลวง4; 25 ลาดหลุมแก้ว1; 26 ลาดหลุมแก้ว2; 27 บางปะอิน1; 28 บางปะอิน2; 29 เมืองอ่างทอง1; 30 เมืองอ่างทอง2

ผลการวินิจฉัยโรคโดยวิธี RT-PCR ตัวอย่างต้นข้าวที่เก็บมาจาก 25 แห่งของภาคกลาง ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างนี้ได้นำภาพที่ได้มาแสดงทั้งหมด แต่พบว่ามีตัวอย่างที่ติดเชื้อจาก 10 แห่งคือจากข้าวบางต้นที่เก็บมาจาก 1. หน้าศูนย์ศิลปาชีพบางไทรอยุธยา, 2. หน้าวัดบ่อทองบางปะอิน อยุธยา, 3. ตำบลรั้วใหญ่เมืองสุพรรณบุรี 4. ต.เนินพระปรางค์ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี 5. อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี, 6. อำเภอสามโคกปทุมธานี, 7-8. อำเภอลาดบัวหลวง อยุธยา 2 แห่ง, 9. ดอนกำ สรรคนบุรี ชัยนาท, 10. อ. เมือง จ.อ่างทอง ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อได้แก่ตัวอย่างต้นข้าวที่เก็บ มาจาก 1. เขตหนองจอก จ.มีนบุรี, 2. ต.ท่าไข่ อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา , 3-5. อ.บางน้ำเปรี้ยว จ. ฉะเชิงเทรา 3 แห่ง, 6. อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี, 7. อ.บางเลน จ.นครปฐม, 8. อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี, 9-10. อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี 2 แห่ง, 11. ต.บ้านกล้วย อ.ค่ายบางระจัน จ.สิงห์บุรี, 12- 13. บ.เขาท่าพระ อ.เมือง จ.ชัยนาท 2 แห่ง, 14. ต.ท่าชัย อ.เมือง จ.ชัยนาท, 15. บ.ไร่เตียน ต.ท่าชัย อ. เมือง จ.ชัยนาท จากการสอบถามนั้นการเกิดโรคที่แห่งหนึ่งแห่งใดอาจไม่พบทุกปี เช่นในท้องที่เดียวกัน ของ ต.บ้านกล้วย อ.ค่ายบางระจัน จ.สิงห์บุรี นั้นมีพบโรคใบหงิกเกิดกับข้าวในปี 2547 แต่กลับไม่พบ โรคในปี 2548 เป็นต้น

ผลการวิเคราะห์สรุปไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปผลการวิเคราะห์โรคใบบิดจากตัวอย่างข้าวที่เก็บจากจังหวัดต่างๆในพื้นที่ภาคกลางเมื่อเดือนตุลาคม 2548

ตัวอย่าง	แหล่งเก็บ	ผลตรวจ 1	ผลตรวจ 2
1	เขตหนองจอก มีนบุรี กรุงเทพฯ	--	--
2	ต.ท่าไข่ อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา	--	--
3	ต.บางน้ำเปรี้ยว อ.บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา	--	--
4	อ. บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา	--	--
5	อ. บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา	--	--
6	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	++	++
7	อ. ลาดบัวหลวง จ.อยุธยา	++	++
8	อ. ลาดบัวหลวง จ. อยุธยา	++	++
9	อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี	--	--
10	ศูนย์ศิลปาชีพ อ.บางไทร จ.อยุธยา	++	++
11	วัดบ่อทอง อ.บางปะอิน จ.อยุธยา	++	++
12	อ. เมือง จ.อ่างทอง	+	+
13	ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี	++	++
14	ต.เนินพระปรางค์ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	+	+
15	อ. สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี	++	++
16	อ.บางเลน จ.นครปฐม	--	--
17	อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	--	--
18	ในไร่อ้อย อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี	--	--
19	ในไร่อ้อย อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี	--	--
20	ต.บ้านกล้วย อ.ค่ายบางระจัน จ.สิงห์บุรี	--	--
21	ต.ดอนก่า อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท	++	++
22	บ.เขาท่าพระ อ.เมือง จ.ชัยนาท	-	-
23	หน้าวัด บ.เขาท่าพระ อ.เมือง จ.ชัยนาท	-	-
24	ต.ท่าชัย อ.เมือง จ.ชัยนาท	-	-
25	บ.ไร่เตียน อ.ท่าชัย จ.ชัยนาท	-	-

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการควบคุมโรคใบหงิกโดยใช้สารเคมีเข้าควบคุมแมลงพาหะของเกษตรกรแม้จะทำโดยประสบการณ์ ความชำนาญและความรู้ที่มีแล้วก็ยังไม่สามารถทำการควบคุมโรคได้เต็มที่ โรคRRSDยังสามารถตรวจพบได้ในนาข้าวของภาคกลางและยังคงเป็นปัจจัยหนึ่งที่คอยจำกัดผลผลิตข้าวให้ต่ำอยู่ได้ ในปัจจุบันยังไม่พบข้าวพันธุ์ใดที่มีความต้านทานต่อโรคนี้ได้อย่างแท้จริง จึงต้องมีการหาวิธีควบคุมโรคนี้ที่ได้ผลดีและอาจนำมาใช้ประกอบกับวิธีการที่ใช้อยู่ให้การผลิข้าวในที่ลุ่มภาคกลางของประเทศไทยได้ผลอย่างเต็มที่

6. การโคลน PCR products ในพลาสมิดpCR[®]4-TOPO[®] เพื่อหาลำดับเบส

6.1 ผลจากการทำ cloning reaction

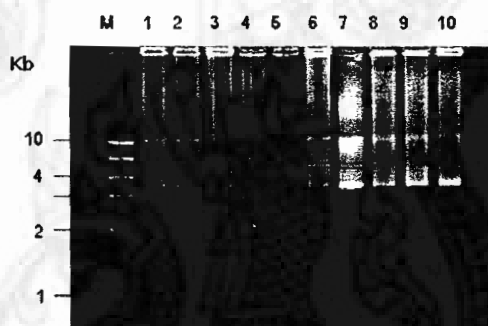
เมื่อนำPCR product ที่ได้จากตัวอย่างข้าว 10 แหล่งมาทำ cloning เพื่อนำไปหาลำดับเบส โดยใช้ TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) ซึ่งเป็นการ insert ดีเอ็นเอเข้าไปใน plasmid การคัดเลือกเซลล์ *E.coli* (สายพันธุ์ Mach 1-T1^R) ที่มี insert นั้นอาศัย marker gene *ccdB* ที่เป็นยีนมรณะเชื่อมกับ *LacZ α* ถ้า PCR product เข้าไปแทรกจะทำลายลำดับเบสของยีน *ccdB* ที่เชื่อมกับ *LacZ α* ยีนมรณะไม่สามารถออกฤทธิ์ ทำให้ transformed cells เจริญต่อได้เป็นกลุ่มเจริญ (colony) แบคทีเรีย *E.coli* ที่มีส่วนของดีเอ็นเอจากจีโนมไวรัส RRSV จากนั้นจึงนำแต่ละ transformant ไปเลี้ยงต่อในอาหารเพาะเลี้ยง LB ตารางที่ 6 แสดงจำนวนโคโลนีจากแต่ละตัวอย่าง ซึ่งประสิทธิภาพของทรานสฟอร์มเมชันแตกต่างกัน

ตารางที่ 6 จำนวนโคโลนี (transformants) จากแต่ละแหล่ง PCR product ได้จากต้นข้าว 1 กอ

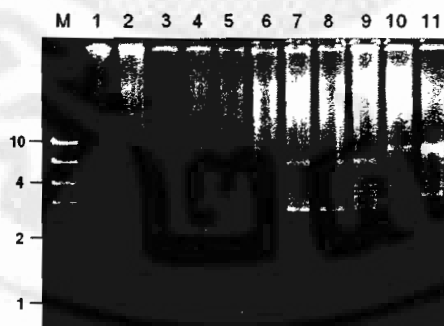
ตัวอย่างที่	แหล่งตัวอย่าง	เพลท 1	เพลท 2	รวม
6	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	8	99	107
7	อ.ลาดบัวหลวง จ.อยุธยา	1	15	16
8	อ.ลาดบัวหลวง จ.อยุธยา	4	129	133
10	ศูนย์ศิลปาชีพ อ. บางไทร จ.อยุธยา	0	5	5
11	อ. บางปะอิน จ.อยุธยา	1	13	14
12	อ.เมือง จ. อ่างทอง	1	1	2
13	ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี	52	67	119
14	ต.เนินพระปรารค์ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	50	8	58
15	อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	3	2	5
21	ต.ดอนก่า อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท	2	6	8

6.2 การตรวจสอบการสกัด plasmid DNA

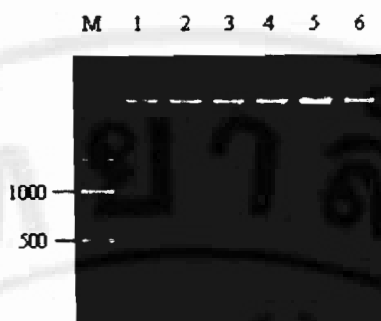
นำโคลนที่เจริญในอาหาร LB ที่มี kanamycin 50 ug/ml ไปวิเคราะห์ transformants โดยแยกสกัด plasmid DNA ด้วยชุดสำเร็จของ Pharmacia และ QIAGEN ได้ทำการตรวจสอบผลโดยแยกในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ DNA marker : high mass ladder (Invitrogen) ดังภาพที่ 20 และภาพที่ 21 ซึ่งได้ผลเป็นป็นยาว แล้วจึงตัดด้วย restriction enzyme *EcoRI* เพื่อแยก insert ออกจากพลาสมิด pCR[®]4-TOPO[®] ซึ่งมี *EcoRI* sites ขนาบ cloning site แล้วจึงตรวจสอบด้วย gel electrophoresis ปรากฏว่าได้ขึ้น DNA ประมาณ 200 และ 500 คู่เบสจากทุกตัวอย่าง ซึ่งขึ้น insert เดิมนั้นขนาดประมาณ 700 คู่เบส จึงสันนิษฐานว่าใน insert มีลำดับเบสที่เป็นจุดตัดของ *EcoRI* อยู่ (ภาพที่ 22, 23, 24)



ภาพที่ 20 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิด: M- High DNA Mass Ladder 1-10 kb (Invitrogen), 1-2 ตัวอย่างจากศูนย์ศิลปาชีพ อ.บางไทร ออยุธยา: 3-4 อ. บางปะอิน ออยุธยา, 5-6 อ. เมือง อ่างทอง, 7-8 ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง สุพรรณบุรี, 9-10 อ. สองพี่น้อง สุพรรณบุรี



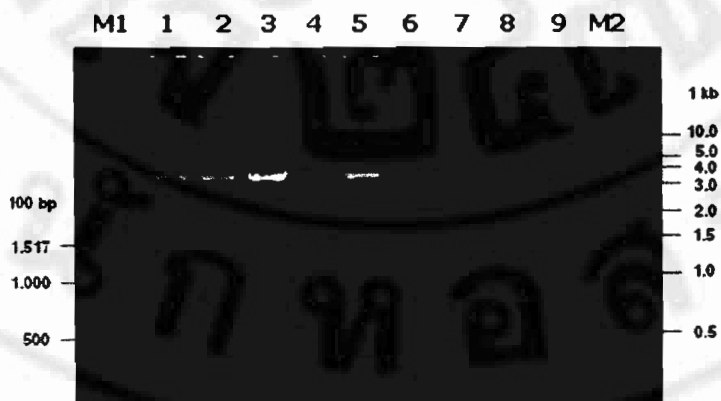
ภาพที่ 21 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิด: M- High DNA Mass Ladder 1-10 kb (Invitrogen), 1-2 อ. สามโคก ปทุมธานี, 3-4 อ. ลาดบัวหลวง (1) ออยุธยา, 5- 6 อ. ลาดบัวหลวง (2) ออยุธยา, 7-8 ต.เนินพระปรางค์ อ.สองพี่น้อง สุพรรณบุรี, 9-10 ต. ดอนก่ำ อ. สรรคบุรี ชัยนาท, 11 อ. สามโคก ปทุมธานี



ภาพที่ 22 *Eco* RI digestion กับดีเอ็นเอของพลาสมิด: M- marker 100 bp, 1-2 จาก อ. สามโคก ปทุมธานี, 3-4 จาก อ. ลาดบัวหลวง ออยุธยา, 5-6 จาก อ. อ. ลาดบัวหลวง ออยุธยา



ภาพที่ 23 *Eco*RI digestion พลาสมิด M-marker 100 bp; ตัวอย่าง 1,2,7,8 จากศูนย์ศิลปาชีพ อ. บางไทร ออยุธยา; 3,4, 9,10 จากวัดบ่อทอง อ.บางปะอิน ออยุธยา; 5,6,11,12 จากอ.เมืองอ่างทอง

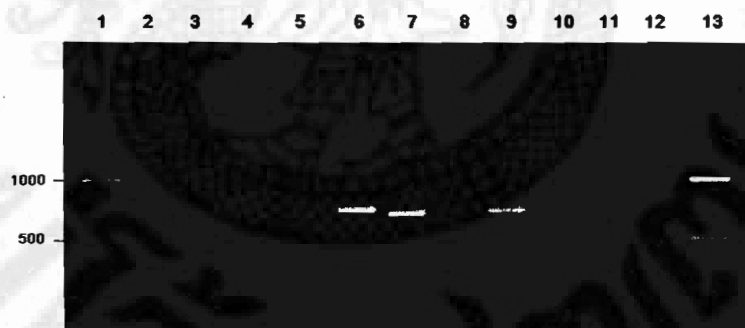


ภาพที่ 24 *Eco*RI digestion กับพลาสมิด M1- marker 100bp, M2- marker 1 kb, 1-2 ตัวอย่างจากอ.สามโคก ปทุมธานี; 3-4 จากอ.ลาดบัวหลวง 1 ออยุธยา; 5-6 จาก อ.ลาดบัวหลวง 2อยุธยา; 7 ดีเอ็นเออื่น; 8 พลาสมิดที่มี insert 700 bp เป็น control

6.3 การวิเคราะห์ insert โดย PCR

จากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ primers จากลำดับเบสในจีโนมส่วนที่ 8 ของ RRSV (sense S8U722 และ antisense S8L1385) และ universal primers ที่ขนาบ cloning site ของพลาสมิดได้แก่ M13 forward, M13 reverse, T₃, T₇ ดังแสดงในภาพที่ 30 ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 25 - 29 ซึ่งพอสรุปได้ว่าทุกโคลนที่เลือกมี insert DNA ขนาดประมาณ 700 คู่เบสดังเช่นขนาดของ PCR product เดิมที่ได้จากการทำ RT-PCR จึงได้เลือกตัวอย่างที่เห็นแถบชัดเจน และไม่มีข้อสงสัยว่ามีปนกับโคลนอื่น รวม 5 ตัวอย่างเพื่อส่งไปหาลำดับเบสที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ดังนี้

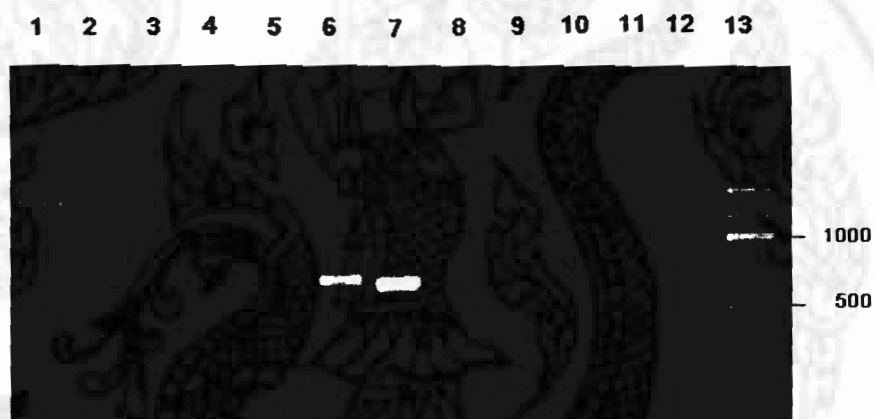
1. อ.ลาดบัวหลวง จ. อยุธยา (ตัวอย่างที่ 8.1.10)
2. ศูนย์ศิลปาชีพ อ.บางไทร จ. อยุธยา (ตัวอย่างที่ 10.1.1)
3. ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี (ตัวอย่างที่ 13.2.3)
4. อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี (ตัวอย่างที่ 15.2.2)
5. ต.ดอนก่า อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท (ตัวอย่างที่ 21.2.4)



ภาพที่ 25 ผลจาก PCR กับพลาสมิดที่มี insert ประมาณ 700 bp จาก อ.ลาดบัวหลวง จ. อยุธยา เลน 1 และ 13 เป็น marker 100 bp; 2 positive control ที่ใช้ specific primers ของสายที่ 8 ของ RRSV; 3 negative control ที่ใช้ M13Fwd + M13Rev primers แต่ไม่ใส่ DNA; 4 negative control ที่ใช้ specific primers แต่ไม่ใส่ DNA; 5 เป็นผลของ M13Fwd + specific sense strand primer; 6 เป็นผลของ M13Rev + specific sense strand primer; 7 เป็นผลของ T₃ primer + specific sense strand primer; 8 เป็นผลของ T₇ primer + specific sense strand primer; 9 เป็นผลของ M13Fwd + specific antisense strand primer; 10 ผลของ M13Rev + specific antisense strand primer; 11 เป็นผลของ T₃ primer + specific antisense strand primer; 12 ผลของ T₇ + specific antisense strand primer



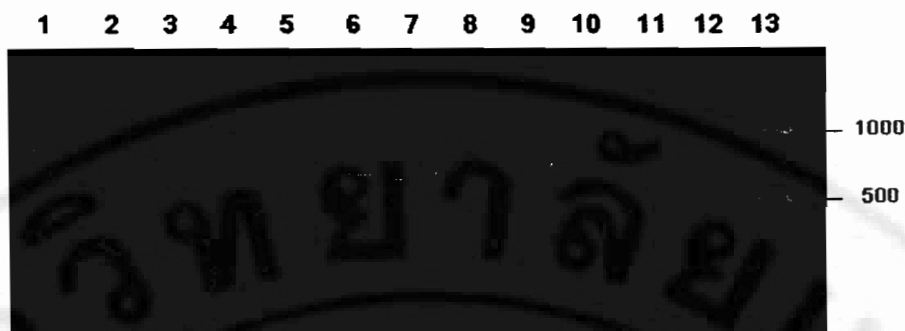
ภาพที่ 26 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insertประมาณ 700 bp จากศูนย์ศิลปาชีพ อ. บางไทร จ. ออยุธยา คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24



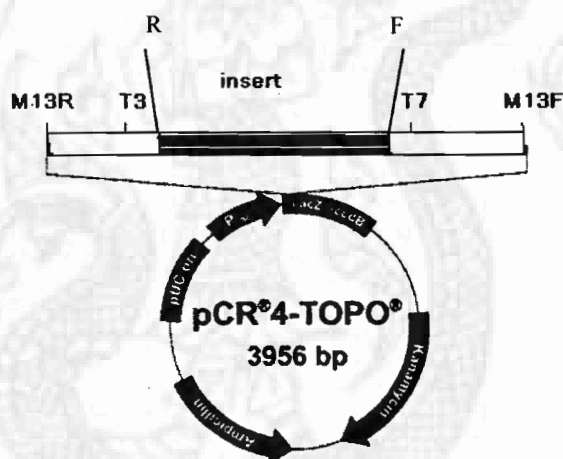
ภาพที่ 27 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insertประมาณ 700 bpจาก ต.ไร่ใหญ่ อ.เมือง จ. สุพรรณบุรี คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24



ภาพที่ 28 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insert ประมาณ 700 bpจากอ.สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24



ภาพที่ 29 ผลปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดที่มี insert ประมาณ 700 bp จาก ต. ดอนก้า อ. สรรคนบุรี จ. ชัยนาท คำอธิบายภาพเช่นเดียวกับภาพที่ 24



ภาพที่ 30 ตำแหน่งการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอหรือ insert ในพลาสมิด R คือตำแหน่งของ reverse primer และ F เป็นตำแหน่งของ forward primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

6.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสมีนี

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการ BLAST เข้ากับลำดับเบสของ *Rice ragged stunt virus* (RRSV) – *Oryzavirus* ส่วนที่ 8 คือ

6.4.1. ตัวอย่างจาก อ.ลาดบัวหลวง (8.1.10) จ.อยุธยา พบว่ามีความยาวของลำดับเบส 818 bp เมื่อทำการ Blast กับโปรแกรมใน www.ncbi.nih.gov โดยใช้ blastn ให้ผลเหมือนกับตัวอย่าง 2 ตัวอย่างคือ

1. L46682 *Rice ragged stunt virus* autocatalytic protease precursor gene complete cds. มีค่า Identities 99% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 71 – 729 bp

ของตัวอย่างลาดบัวหลวง ตรงกับตำแหน่งที่ 1385-729 bp ของตัวอย่าง L46682 (accession number)

2. AF486811 *Rice ragged stunt virus* from Philippines structural protein P8 (S8) gene complete cds. มีค่า Identities 99% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 71 – 728 bp ของตัวอย่างลาดบัวหลวง ตรงกับตำแหน่งที่ 1363 - 708 bp ของตัวอย่าง AF486811 (accession number)

6.4.2. ตัวอย่าง จากศูนย์ศิลปาชีพ อ.บางไทร (10.1.1) จ.อยุธยา พบว่ามีความยาวของลำดับเบส 796 bp เมื่อทำการ Blast กับโปรแกรมใน www.ncbi.nih.gov โดยใช้ blast n ให้ผลเหมือนกับตัวอย่าง 2 ตัวอย่างคือ

1. L46682 *Rice ragged stunt virus* autocatalytic protease precursor gene complete cds. มีค่า Identities 99% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 71 – 733 bp ของตัวอย่างบางไทร ตรงกับตำแหน่งที่ 1385-722 bp ของตัวอย่าง L46682 (accession number)

2. AF486811 *Rice ragged stunt virus* from Philippines structural protein P8 (S8) gene complete cds. มีค่า Identities 98% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 71 – 733 bp ของตัวอย่างบางไทร ตรงกับตำแหน่งที่ 1363 - 700 bp ของตัวอย่าง AF486811 (accession number)

6.4.3. ตัวอย่างจากต. ร้วใหญ่ อ.เมือง(13.2.3) จ. สุพรรณบุรี พบว่ามีความยาวของลำดับเบส 795 bp เมื่อทำการ Blast กับโปรแกรมใน www.ncbi.nih.gov โดยใช้ blast n ให้ผลเหมือนกับตัวอย่าง 2 ตัวอย่างคือ

1. L46682 *Rice ragged stunt virus* autocatalytic protease precursor gene complete cds. มีค่า Identities 97% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 60 – 732 bp ของตัวอย่างร้วใหญ่ ตรงกับตำแหน่งที่ 1385-722 bp ของตัวอย่าง L46682 (accession number)

2. AF486811 *Rice ragged stunt virus* from Philippines structural protein P8 (S8) gene complete cds. มีค่า Identities 97% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 60 – 732 bp ของตัวอย่างร้วใหญ่ ตรงกับตำแหน่งที่ 1363 - 700 bp ของตัวอย่าง AF486811 (accession number)

6.4.4 ตัวอย่างจากอ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี (15.2.2) พบว่ามีความยาวของลำดับเบส 862 bp เมื่อทำการ Blast กับโปรแกรมใน www.ncbi.nih.gov โดยใช้ blast n ให้ผลเหมือนกับตัวอย่าง 2 ตัวอย่างคือ

1. L46682 Rice ragged stunt virus autocatalytic protease precursor gene complete cds. มีค่า Identities 99% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 73 – 737 bp ของตัวอย่างสองพี่น้อง ตรงกับตำแหน่งที่ 1385-722 bp ของตัวอย่าง L46682 (accession number)

2. AF486811 Rice ragged stunt virus from Philippines structural protein P8 (S8) gene complete cds. มีค่า Identities 99% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 73 – 737 bp ของตัวอย่างสองพี่น้อง ตรงกับตำแหน่งที่ 1363 – 700 bp ของตัวอย่าง AF486811 (accession number)

6.4.5. ตัวอย่างจากต.ดอนก่า อ. สรรคบุรี (21.2.4) จ.ชัยนาท พบว่ามีความยาวของ ลำดับเบส 830 bp เมื่อทำการ Blast กับโปรแกรมใน www.ncbi.nih.gov โดยใช้ blast n ให้ผล เหมือนกับตัวอย่าง 2 ตัวอย่างคือ

1. L46682 Rice ragged stunt virus autocatalytic protease precursor gene complete cds. มีค่า Identities 99% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 74 – 738 bp ของตัวอย่างสรรคบุรี ตรงกับตำแหน่งที่ 1385-722 bp ของตัวอย่าง L46682 (accession number)

2. AF486811 Rice ragged stunt virus from Philippines structural protein P8 (S8) gene complete cds. มีค่า Identities 99% โดยเริ่มมีความเหมือนในตำแหน่งที่ 74 – 738 bp ของตัวอย่างสรรคบุรี ตรงกับตำแหน่งที่ 1363 - 700 bp ของตัวอย่าง AF486811 (accession number)

เมื่อใช้ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของทั้ง 5 ตัวอย่างด้วยโปรแกรม DNASTAR™ แล้วนำไปทำการจัดเทียบหรือ multiple alignments กับลำดับอื่น รวม 7 ลำดับโดยโปรแกรม CLUSTAL W (1.83) ได้ผลดังต่อไปนี้

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

10      10      -----CAAAAAATAGACAGATACGCC--AGCTCAGA--TAACCCTC 37
21      21      -----GTGCAGATACGCC--AAGTCAGAATTAACCCTC 32
8        8      -----CGATGTACGCCAAAGCTCAGAA--TAACCCTC 30
15      15      -----GTGTGACAGGATTACGCC--AAGTCAGA--TAACC-TC 33
13      13      -----TTTTGAT--GATGCAAAAATGACA--G 23
NC      NC      --AAAGACGCTTAAAGCAGCGTGGTTGAGGAAGAACGTGTTGAACCTCGTCCAAAA--C 56
AF      AF      GAAAAGACGCTTAAAGCAGCGTGGTTGAGGAAGAACGTGTTGAACCTCGTCCAAAA--C 58
                                *      *      *

10      10      ATAAAGG---ATAGTC--GCAG---TAACGAATT-CGCCCTTCGGCGGGGCACTCAAACC 88
21      21      ATTAAGGGAATAGTCCGGCAGGTTTAAACGAAT-CGCCCTTCGGCGGGGCACTCAAACC 91
8        8      ATAAAGGG-CTAGTTCTGCAGGTTTAAACGAAT-CGCCCTTCGGCGGGGCACTCAAACC 88
15      15      ATAAAGGG--ATAGTCC-GCAGTTTAAACGAATTCGCCCTTCGGCGGGGCACTCAAACC 90
13      13      ATTACC-----CAGTCA-GATGGTTTAAACGAATTCGCCCTTCGGCGGGGCACTCAAACC 77
NC      NC      GTAGAGAGATAACGCTTGGAGGACAGAGGCCTTTGCAGACTAGGGATGTGCGTTCGGATT 116
AF      AF      GTAGAGAGATAACGCTTGGAGGACAGAGGCCTTTGCAGACTAGGGATGTGCGTTCGGATT 118
                        *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

10      10      ATCGACACCTGATCTTCTTGGTATCTAAGCCACCATAGCATATTCCCATCAGA---AGAC 145
21      21      ATCGACACCTGATCTTCTTGGTATCTAAGCCACCATAGCATATTCCCATCAGA---AGAC 148
8        8      ATCGACACCTGATCTTCTTGGTATCTAAGCCACCATAGCATATTCCCATCAGA---AGAC 145
15      15      ATCGACACCTGATCTTCTTGGTATCTAAGCCACCATAGCATATTCCCATCAGA---AGAC 147
13      13      ATCGACACCTGATCTTCTTGGTATCTAAGCCACCATAGCATATTCCCATCAGA---AGAC 134
NC      NC      CTGATTTGATTGTTTTGAGCAAACCTTGAGGCGTATGATGATGTTGTTGAAAGACCAAGGC 176
AF      AF      CTGATTTGATTGTTTTGAGCAAACCTTGAGGCGTATGATGATGTTGTTGAAAGACCAAGGC 178
                        *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

10      10      AAAACA-CTTGACTAATATGAGTCGCTTCCATCCTCTCTCTGTAATGAATGACACTACCA 204
21      21      AAAACA-CTTGACTAATATGAGTCGCTTCCATCCTCTCTCTGTAATGAATGACACTACCA 207
8        8      AAAACA-CTTGACTAATATGAGTCGCTTCCATCCTCTCTCTGTAATGAATGACACTACCA 204
15      15      AAAACA-CTTGACTAATATGAGTCGCTTCCATCCTCTCTCTGTAATGAATGACACTACCA 206
13      13      AAAACA-CTTGACTAATATGAGTCGCTTCCATCCTCTCTCTGTAATGAATGACACTACCA 193
NC      NC      AGAATAACACCGACATTATCATCCATCGACTTGGTTAGCCAAGATGAATCCTGCGAGTA 236
AF      AF      AGAATAACACCGACATTATCATCCATCGACTTGGTTAGCCAAGATGAATCCTGCGAGTA 238
                        *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

10      10      CAATAGTGACGCAGACTAA----TCATAA--CCTCTTTGA-----TGACAGCTGGGT 250
21      21      CAATAGTGACGCAGACTAA----TCATAA--CCTCTTTGA-----TGACAGCTGGGT 253
8        8      CAATAGTGACGCAGACTAA----TCATAA--CCTCTTTGA-----TGACAGCTGGGT 250
15      15      CAATAGTGACGCAGACTAA----TCATAA--CCTCTTTGA-----TGACAGCTGGGT 252
13      13      CAATAGTGACGCAGACTAA----TCATAA--CCTCTTTGA-----TGACAGCTGGGT 239
NC      NC      ATCAATCCTACCGGCCAAAATCTCGCGAATCATCACTGAACAAGTATTTGGAGCTGGAG 296
AF      AF      ATCAATCCTACCGGCCAAAATCTCGCGAATCATCACTGAACAAGTATTTGGAGCTGGAG 298
                        *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

10      10      TGAGAATTCTTCG-TTATCTGTGTCAGCC-----TTGATATCGTTGTAG-----CACTT 298
21      21      TGAGAATTCTTCGTTATCTGTGTCAGCC-----TTGATATCGTTGTAG-----CACTT 302
8        8      TGAGAATTCTTCGTTATCTGTGTCAGCC-----TTGATATCGTTGTAG-----CACTT 299
15      15      TGAGAATTCTTCGTTATCTGTGTCAGCC-----TTGATATCGTTGTAG-----CACTT 301
13      13      TGAGAATTCTTCGTTATCAGTGTGTCAGCC-----TTGATATCGTTGTAG-----CACTT 288
NC      NC      TGAACGTCGATTACATTGCCAGACCAACTGAAGGATTTATATCTCTGTGACCGCCACCT 356
AF      AF      CGAACGTCGATTACATTGCCAGACCAACTGAAGGATTTATATCTCTGTGACCGCCACCT 358
                        **      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

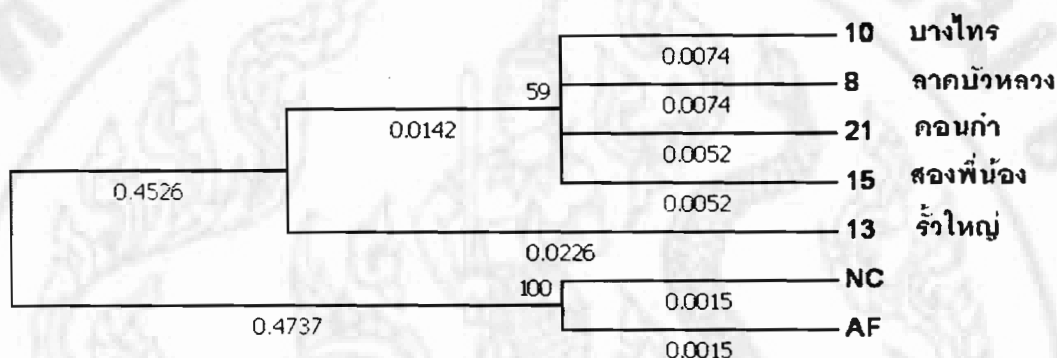
10      10      ATA--GTA----CTTACCGTCCACAGTGATAA-CCGCACGCTCAGCCAATGCCTTCTTCC 351
21      21      ATA--GTA----CTTACCGTCCACAGTGATAA-CCGCACGCTCAGCCAATGCCTTCTTCC 355
8        8      ATA--GTA----CTTACCGTCCACAGTGATAA-CCGCACGCTCAGCCAATGCCTTCTTCC 352
15      15      ATA--GTA----CTTACCGTCCACAGTGATAA-CCGCACGCTCAGCCAATGCCTTCTTCC 355
13      13      ATA--GTA----CTTACCGTCCACAGTGATAA-CCGCACGCTCAGCCAATGCCTTCTTCC 341
NC      NC      ACACGGTAGCTTCTTACTTTGAACGGGGCATCGCCAATTATGACATCAATGCCGTCTTGG 416
AF      AF      ACACGGTAGCTTCTTACTTTGAACGGGGCATCGCCAATTATGACATCAATGCCGTCTTGG 418
                        *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

10	10	TTCCATCGTCAGTATCAGGATAACTTACC---ACGTAATTGGTCGTGTTGT--ATCTGGT	406
21	21	TTCCATCGTCAGTATCAGGATAACTTACC---ACGTAATTGGTCGTGTTGT--ATCTGGT	410
8	8	TTCCATCGTCAGTATCAGGATAACTTACC---ACGTAATTGGTCGTGTTGT--ATCTGGT	407
15	15	TTCCATCGTCAGTATCAGGATAACTTACC---ACGTAATTGGTCGTGTTGT--ATCTGGT	410
13	13	TTCCATCGTCAGTATCAGGATAACTTACC---ACGTAATTGGTCGTGTTGT--ATCTGGT	396
NC	NC	A--CAACATCATTGATAAGACCGATCAACTGAATACAACCGATACCGTCGTTGAGCTACC	474
AF	AF	A--CAACATCATTGATAAGACCGATCAACTGAATACAACCGATACCGTCGTTGAGCTACC	476
		*** ** *	
10	10	GACGATACCGTTTAGGCGCTGGATCATAGGATTAGTGATGCTT--CCACAG-CACATT--	461
21	21	GACGATACCGTTTAGGCGCTGGATCATAGGATTAGTGATGCTT--CCACAG-CACATT--	466
8	8	GACGATACCGTTTAGGCGCTGGATCATAGGATTAGTGATGCTT--CCACAG-CACATT--	463
15	15	GACGATACCGTTTAGGCGCTGGATCATAGGATTAGTGATGCTT--CCACAG-CACATT--	465
13	13	GACGATTCCGTTTAGGCGCTGGATCATAGGATTAGTGATGCTTCCACAGGCACATTT--	455
NC	NC	ATCCATTCCGCCAGAGGACTCGTCAATTGAAGTGGCGACGCCGTCGCACGA-GACGTTCT	533
AF	AF	ATCCATTCCGCCAGAGGACTCGTCAATTGAAGTGGCGACGCCGTCGCACGA-GACATTCT	535
		* ** *	
10	10	ATGATGTATA-TCATGG-TGTTGATATCAAAG--AACGTCTCGTGCGACGGCGTCGCCA-	516
21	21	ATGATGTATA-TCATGG-TGTTGATATCAAAG--AACGTCTCGTGCGACGGCGTCGCCA-	521
8	8	ATGATGTATACTCATGG-TGTTGATATCAAAG--AACGTCTCGTGCGACGGCGTCGCCA-	519
15	15	ATGATGTATA-TCATGG-TGTTGATATCAAAG--AACGTCTCGTGCGACGGCGTCGCCA-	520
13	13	ATGATGTATA-TCATGGGTGTTGATATCAAAGGAAACGTCTCGTGCGACGGCGTCGCCAA	514
NC	NC	TTGATATCAA--CACCA----TGATATACATCATAATGTGCTGTGGAA--GCATCACTA-	584
AF	AF	TTGATATCAA--CACCA----TGATATACATCATAATGTGCTGTGGAA--GCATCACTA-	586
		***** *	
10	10	-CTTCAATTGACGAGTCCTCTGGCGGAATGGATGGTAGCTCAACGACGGTATCGGTTGTA	575
21	21	-CTTCAATTGACGAGTCCTCTGGCGGAATGGATGGTAGCTCAACGACAGTATCGGTTGTA	580
8	8	-CTTCAATTGACGAGTCCTCTGGCGGAATGGATGGTAGCTCAACGACGGTATCGGTTGTA	578
15	15	-CTTCAATTGACGAGTCCTCTGGCGGAATGGATGGTAGCTCAACGACGGTATCGGTTGTA	579
13	13	CTTCCATTTGACGAGTCCTCTGGCGGAATGGATGGTAGCTCAACGACAGTATCGGTTGTA	574
NC	NC	-ATCCTATGATCCAGCGCCTAAACGGTATCGTCAACGAT--ACAACACGACCAATTACG	641
AF	AF	-ATCCTATGATCCAGCGCCTAAACGGTATCGTCAACGAT--ACAACACGACCAATTACG	643
		* * * *	
10	10	TTCAAGTTGATCGGCTTTTCAATGATGTTGTCC--AAGACGGCATTGATGTCATAATTGG	633
21	21	TTCAAGTTGATCGGCTTTTCAATGATGTTGTCC--AAGACGGCATTGATGTCATAATTGG	638
8	8	TTCAAGTTGATCGGCTTTTCAATGATGTTGTCC--AAGACGGCATTGATGTCATAATTGG	636
15	15	TTCAAGTTGATCGGCTTTTCAATGATGTTGTCC--AAGACGGCATTGATGTCATAATTGG	637
13	13	TTCAAGTTGATCGGCTTTTCAATGATGTTGTCC--AAGACGGCATTGATGTCATAATTGG	632
NC	NC	T---GGTAAGTTATCCTGATACTGACGATGGAAGGAAGAAGGCATTGGCTGAGCGTGCGG	698
AF	AF	T---GGTAAGTTATCCTGATACTGACGATGGAAGGAAGAAGGCATTGGCTGAGCGTGCGG	700
		* * * *	
10	10	CAATGCCCCGTTCAAAGTAAGAA-----GCTACCGTGATAGGTGGCGGTTGACAGAGA	685
21	21	CGATGCCCCGTTCAAAGTAAGAA-----GCTACCGTGATAGGTGGCGGTCGACAGAGA	690
8	8	CGATGCCCCGTTCAAAGTAAGAA-----GCTACCGTGATAGGTGGCGGTCGACAGAGA	688
15	15	CGATGCCCCGTTCAAAGTAAGAA-----GCTACCGTGATAGGTGGCGGTCGACAGAGA	689
13	13	CGATGCCCCGTTCAAAGTAAGAA-----GCTACCGTGATAGGTGGCGGTCGACAGAGA	684
NC	NC	TTAT-CACTGTGGACGGTAAGTACTATAAGTGCTACAACG-ATATCAAGGCTGACACAGA	756
AF	AF	TTAT-CACTGTGGACGGTAAGTACTATAAGTGCTACAACG-ATATCAAGGCTGACACAGA	758
		*** ** *	
10	10	TAT----AAATCCTTCAGTGGGTCTGGCAATG-----	713
21	21	TAT----AAATCCTTCAGTGGGTCTGGCAATG-----	718
8	8	TAT----AAATCCTTCAGTGGGTCTGGCAATGTAATCGAC-----	724
15	15	TAT----AAATCCTTCAGTGGGTCTGGCAATGTAATCGAC-----	725
13	13	TAT----AAATCCTTCAGTGGGTCTGGCAATGTAATCGAC-----	721
NC	NC	TAAGCGAAGAATTCTCAACCCAGCTGTCATCAAAGAGGTTATGATTAGTCTGCGTCACTA	816
AF	AF	TAAGCGAAGAATTCTCAACCCAGCTGTCATCAAAGAGGTTATGATTAGTCTGCGTCACTA	818
		** * *	

10	10	-----
21	21	-----
8	8	-----
15	15	-----
13	13	-----
NC	NC	TTGTGGT 823
AF	AF	TTGTGGT 825

ผลจากการหา phylogenetic tree โดยโปรแกรม PAUP ได้ phylogram ที่แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการดังภาพที่ 30



ภาพที่ 31 Distance tree ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ แสดงค่าความยาวของ branch และ bootstrap values ตัวอย่างคือส่วนหนึ่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของ RRSV เส้นที่ 8 จากลาดบัวหลวง จ.อยุธยา(8), บางไทร จ.อยุธยา (10), ร้วใหญ่ จ.สุพรรณบุรี (13), สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี (15) และ ดอนก่ำ อ. สรรคบุรี จ.ชัยนาท (21) เปรียบเทียบกับลำดับ NC และ AF จาก database ของ NCBI

จากการตรวจพบเชื้อ RRSV ในต้นข้าวที่ติดเชื้อและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยเทคนิค RT-PCR ที่ใช้ไพรเมอร์จากจีโนมสายที่ 8 ของไวรัส ขึ้น ds-DNA ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ได้โคลนเข้ากับ พลาสมิด pCR4-TOPO เพื่อวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและเปรียบเทียบเชิงวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งในภาคกลางเมื่อปีพ.ศ.2548

ผลจากการทำ transformation สูเซลล์ *E.coli* พบว่าได้ transformant จากทั้ง 10 แหล่ง เมื่อตรวจสอบการแทรก (insert) โดยปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primers ต่างๆ ได้แก่ forward primer S8U722 + reverse primer S8L1385 และuniversal primers ของพลาสมิด (M13, T₃, และ T₇) พบว่าได้ผลไม่ค่อยชัดเจนดังความคาดหวังจากทั้ง 10 แหล่ง โดยเฉพาะ primer T₇ ที่ไม่ได้ผลเลย จึงได้เลือกเฉพาะโคลนที่มั่นใจในทิศการแทรกดังภาพที่ 30 ได้แก่

8.1.10 จาก อ.ลาดบัวหลวง จ.อยุธยา

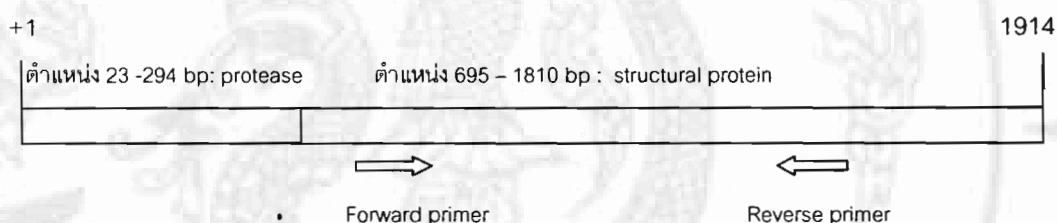
10.1.1 จาก ต.บางไทร จ.อยุธยา

13.2.3 จาก ต.รั้วใหญ่ จ.สุพรรณบุรี

15.2.2 จาก อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี

21.2.4 จาก อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสครั้งนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งของจีโนมส่วนที่ 8 ของ *RRSV* ดังแสดงในภาพที่ 32 จีโนมส่วนที่ 8 ทั้งหมดมีขนาด 1,814 bp ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน P8 ขนาด 67.3 kDa ที่เป็นโปรตีนตั้งต้น จาก 67.3 kDa นี้จะย่อยตัวเองเป็น 2 ส่วน คือ โปรตีน P8A ขนาด 25.6 kDa มีสมบัติเป็น protease ที่ตัดย่อยตัวเองกับโปรตีน P8B ขนาด 41.7 kDa ที่ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของ capsid ของอนุภาคไวรัส

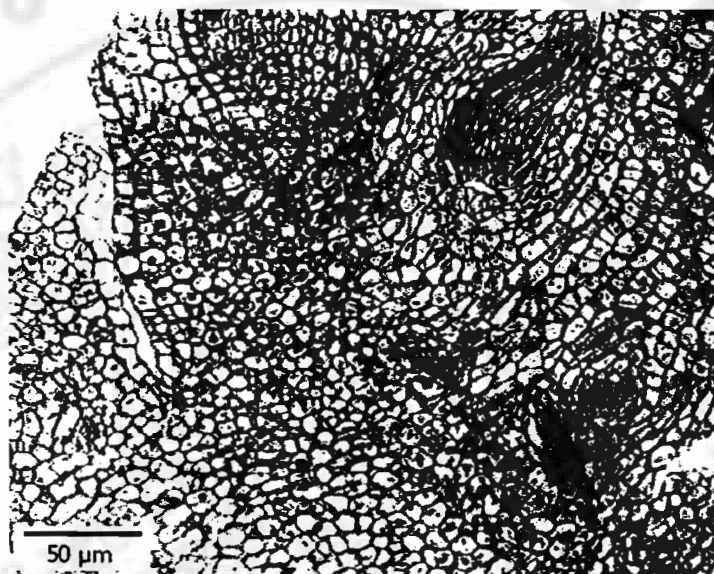


ภาพที่ 32 จีโนมเส้นที่ 8 ของ *RRSV* และช่วงรหัสพันธุกรรมที่ใช้จัดเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

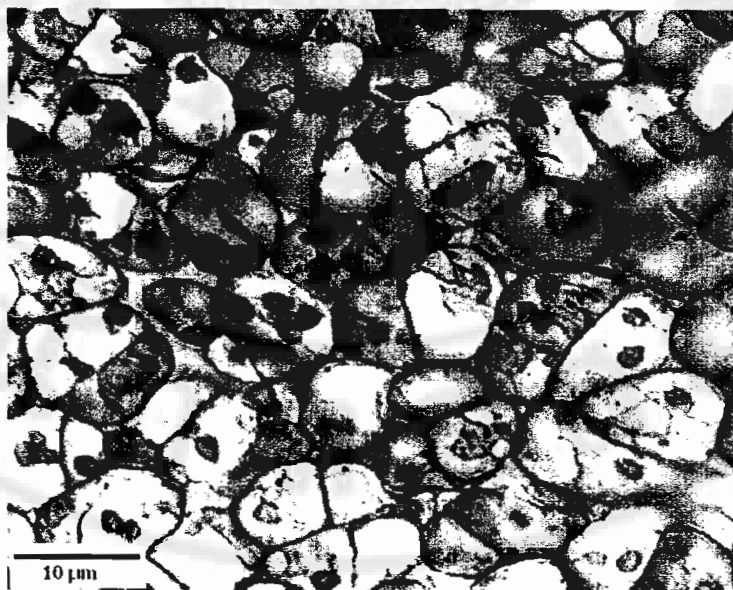
จาก phylogram ที่ได้จากการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมโดยวิธี distance method เห็นได้จากภาพที่ 30 ว่าตัวอย่างจากทั้ง 5 แหล่งมีความแตกต่างกันน้อย และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ได้ แม้ว่าตัวอย่างจาก ต. รั้วใหญ่ จ.สุพรรณบุรีจะต่างจากอีก 4 แหล่ง แต่ 2 สายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบจาก Genbank (ที่ได้จากไทยและฟิลิปปินส์) ซึ่งเหมือนกันมากนั้นกลับแตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างทั้ง 5 จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปอีกโดยส่งโคลนอื่นๆไปหาลำดับและวิเคราะห์เพิ่มเติม

7. ลักษณะกายวิภาคของข้าว และ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อไวรัสใบหงิก

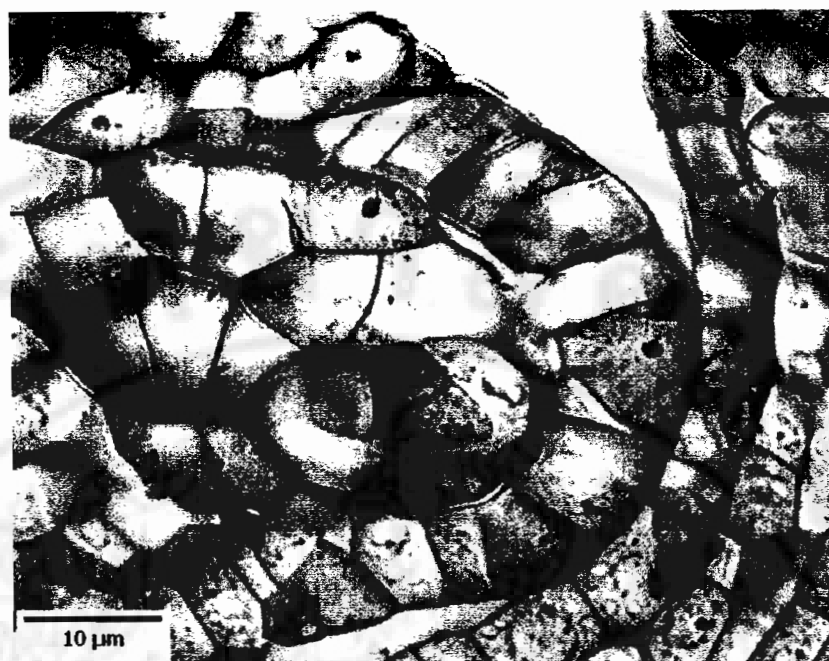
การศึกษาเนื้อเยื่อของข้าวและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อไวรัสโรคใบหงิกจากกล้องจุลทรรศน์แสงครั้งนี้พอสรุปได้ว่าไม่สามารถบอกความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างเนื้อเยื่อจากต้นข้าว และ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อกับที่ไม่ติดเชื้อRRSV ลักษณะของเนื้อเยื่อทั้งข้าวและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ขยายด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงมีแสดงไว้ในภาพที่ 33 - 44



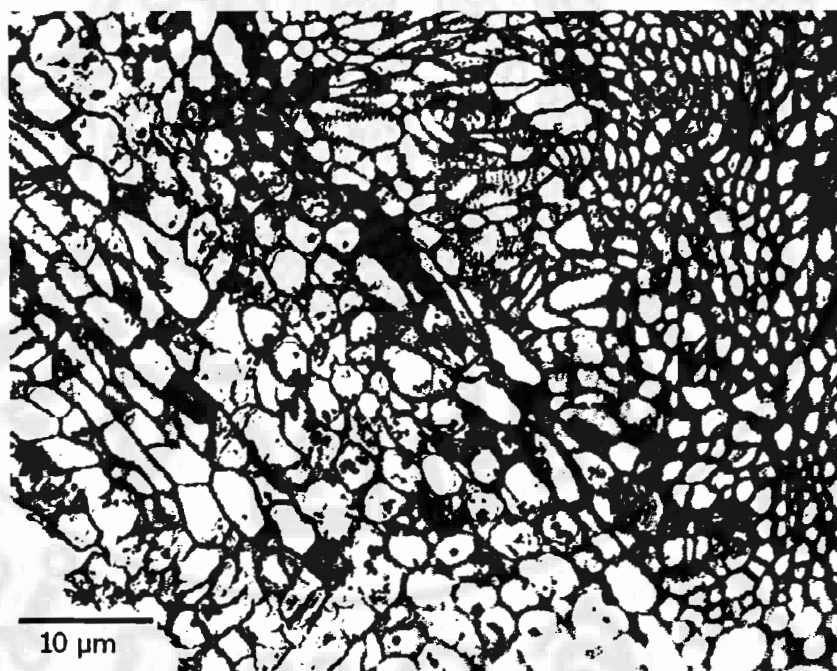
ภาพที่ 33 เนื้อเยื่อส่วนยอดของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตรย้อม methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า



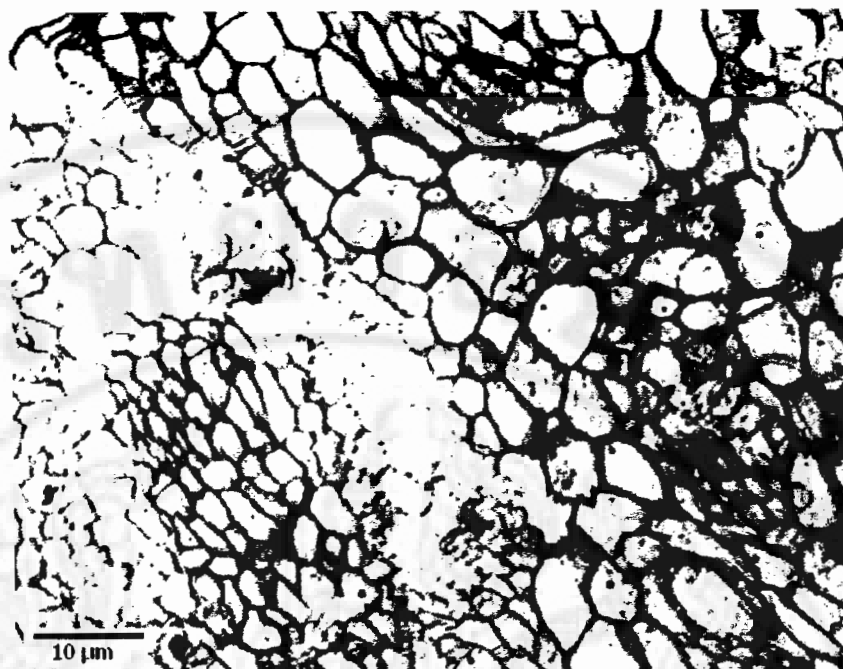
ภาพที่ 34 เนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า



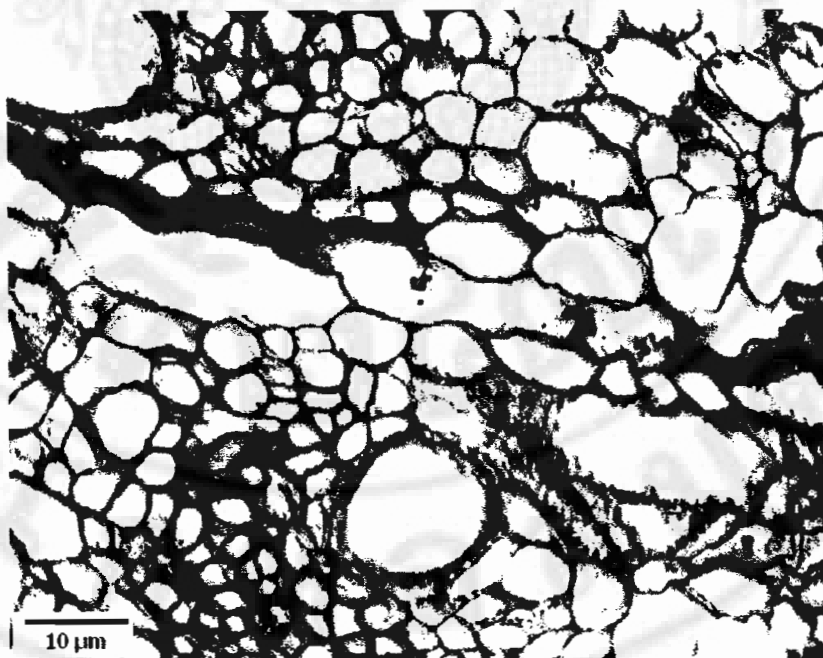
ภาพที่ 35 เนื้อเยื่อส่วนยอดของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า



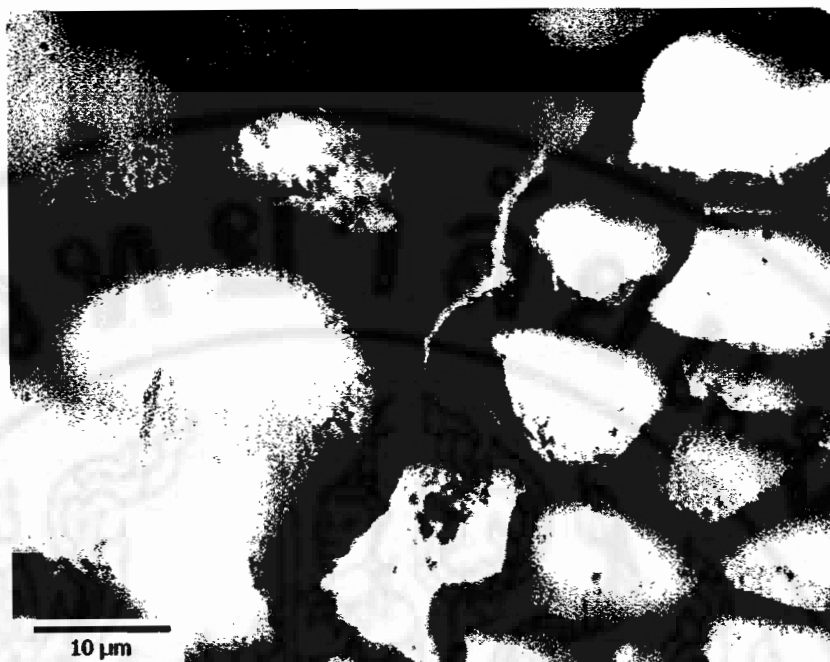
ภาพที่ 36 เนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวติดเชื้อ ตัวอย่างตัดหนา 15 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า



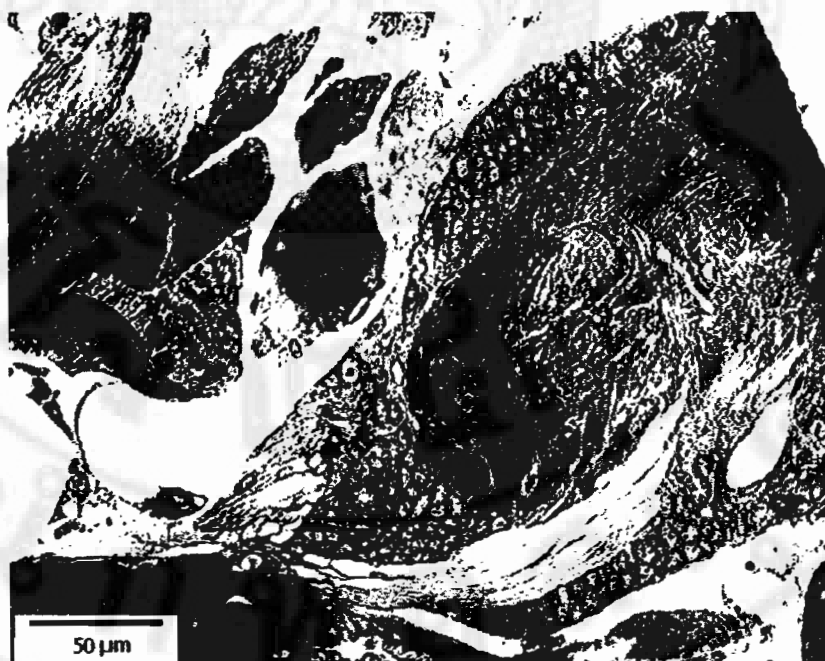
ภาพที่ 37 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า



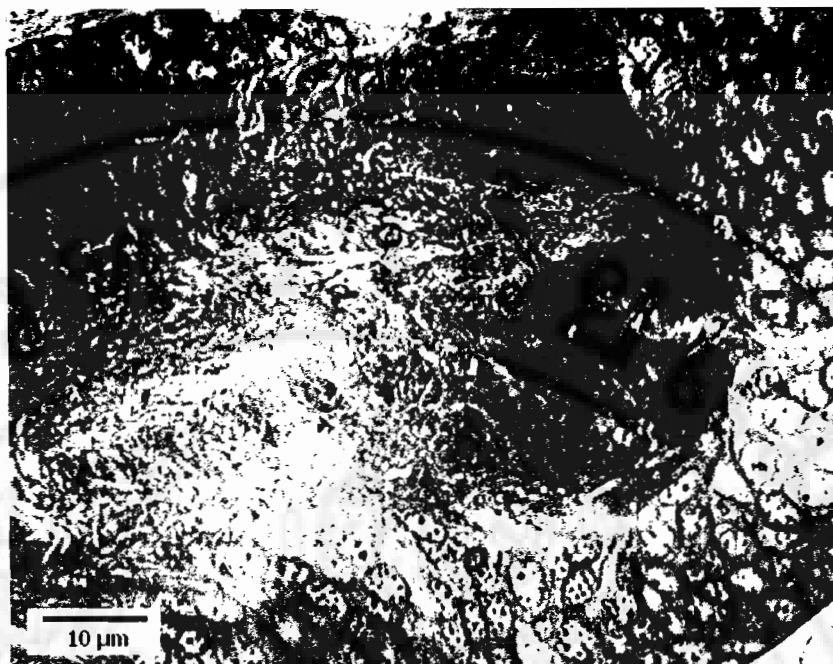
ภาพที่ 38 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า



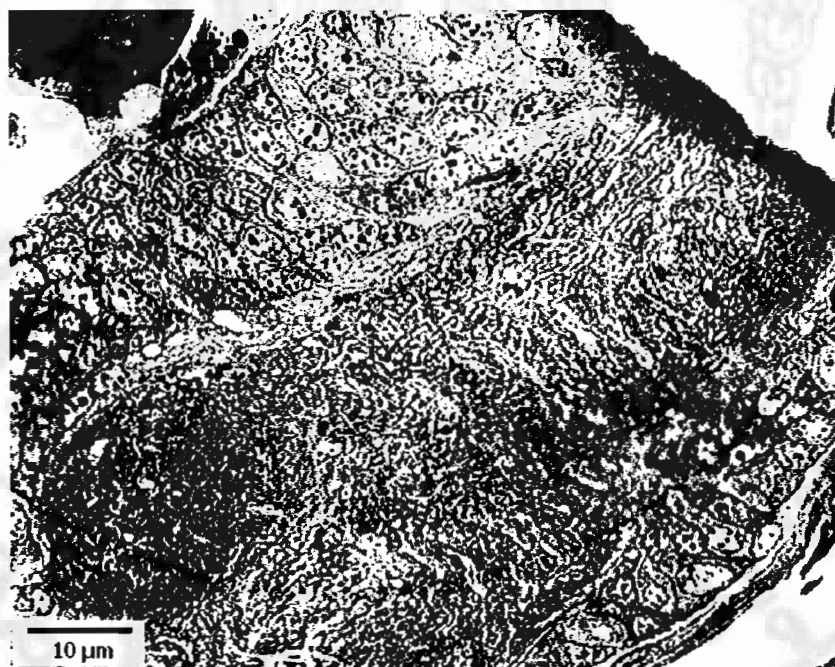
ภาพที่ 39 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า



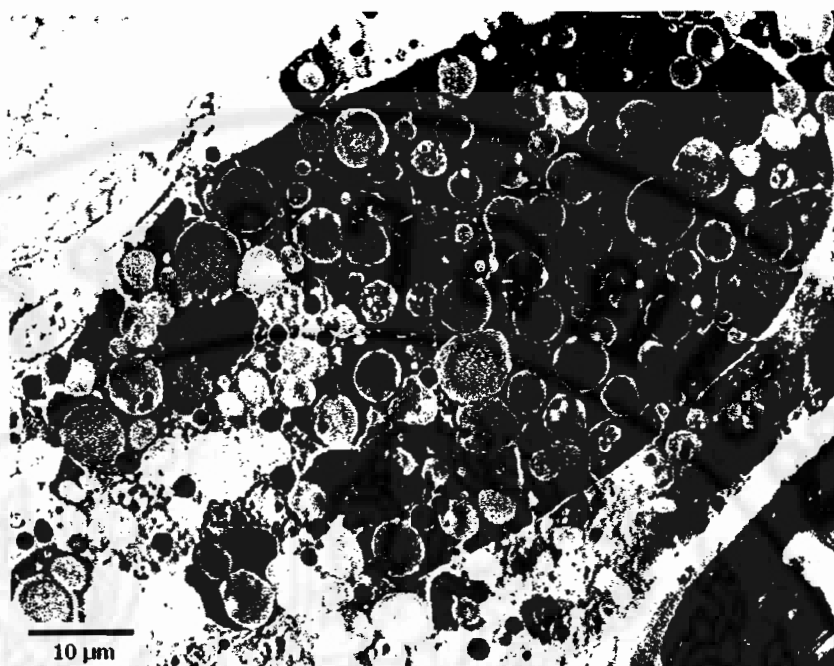
ภาพที่ 40 เนื้อเยื่อเปลือกกระตูดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า



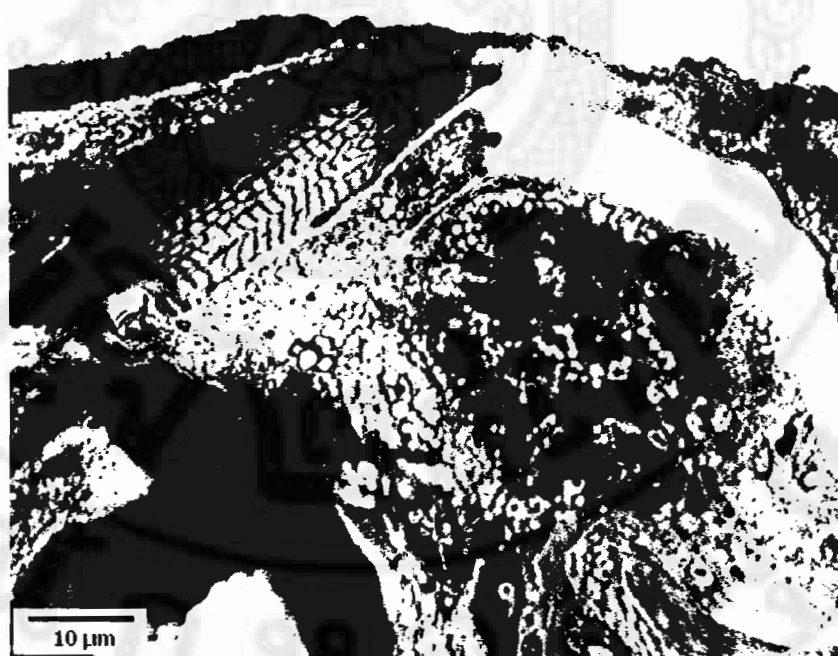
ภาพที่ 41 เนื้อเยื่อเปลือกกระโถดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคไบหิงก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 42 เนื้อเยื่อเปลือกกระโถดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคไบหิงก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 43 เนื้อเยื่อเปลือกกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 44 เนื้อเยื่อเปลือกกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิกตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า

อิเล็กตรอนจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ *Rice ragged stunt virus*

ผลการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) กับตัวอย่างน้ำคั้นจากกาบใบและใบข้าวที่เป็นโรคใบหงิกแสดงไว้ในภาพที่ 45 – 47 ภาพที่ 48 – 58 เป็นภาพจากตัวอย่างเนื้อเยื่อข้าวที่เป็นโรคใบหงิกตัดบาง (ultrathin sections) ขนาด 80 นาโนเมตร และ ผลการศึกษาเนื้อเยื่อเปลือกกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อ *Rice ragged stunt virus* แสดงไว้ในภาพที่ 59 – 72 ทั้งหมดแสดงให้เห็นอนุภาคไวรัสต่างขนาดกันที่ไม่พบในตัวอย่างข้าวและเปลือกกระโดดสีน้ำตาลที่ไม่ติดเชื้อ RRSV (ไม่แสดงภาพ) อนุภาคของ RRSV อาจพบอยู่เซลล์ของตัวอย่างแบบ อยู่กระจาย หรืออยู่เป็นกลุ่มก้อน บางกรณีจะพบเป็นกลุ่มมีเยื่อหุ้มโดยรอบเป็น viroplasm

1. อิเล็กตรอนจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อข้าวที่ติดเชื้อ *Rice ragged stunt virus*

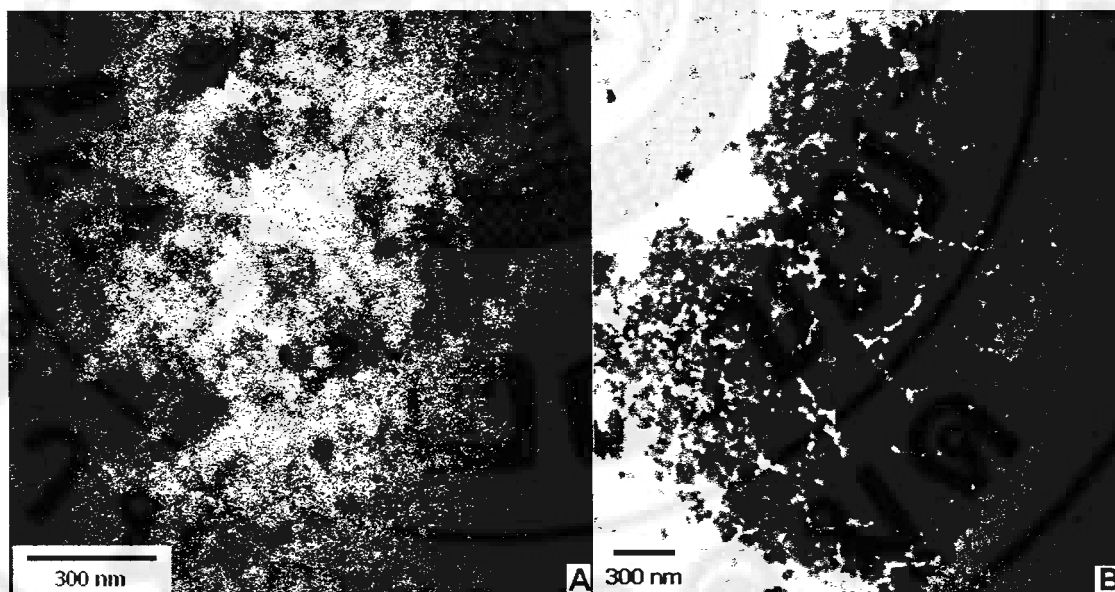
ภาพที่ 45 – 47 แสดงผลการศึกษาทางอิเล็กตรอนจุลทรรศน์ของน้ำคั้นจากกาบใบและกาบใบข้าวเมื่อย้อมแบบ negative staining ด้วย 2% phosphotungstic acid และ ภาพที่ 48 – 58 เป็นผลการศึกษาเนื้อเยื่อของต้นข้าวที่แสดงอาการโรคใบหงิก

ภาพที่ 45 และ 46 แสดงอนุภาค RRSV ที่มีในน้ำคั้นจากกาบและใบข้าว อนุภาคที่พบจะทึบอิเล็กตรอน (electron dense) เป็นรูปหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลมผิวไม่เรียบ มีเงาแสดงมิติที่เห็น ส่วนกลางของอนุภาคที่นูนขึ้นจากพื้นผิว อนุภาคจะพบกระจายอยู่ทั่วไปในน้ำคั้น ขนาดต่างกัน มีเส้นผ่าศูนย์กลางราว 30 – 75 นาโนเมตร ในภาพที่ 47 A และ 47 B แสดงให้เห็นว่าอนุภาคไวรัสในน้ำคั้นอาจอยู่รวมกันอยู่เป็นกลุ่มก้อน โดยมีเส้นใยไมโครไฟเบอร์ประสานอยู่ อนุภาค RRSV ที่พบตัวอย่างน้ำคั้นจากข้าวที่ย้อมแบบ negative staining จะมีความทึบอิเล็กตรอนได้ไม่เท่ากัน บางอนุภาคจะเห็นเป็นจุดดำล้อมด้วยพื้นที่สีเทาขอบนอกทึบ แต่จะไม่ให้รายละเอียดมากนัก

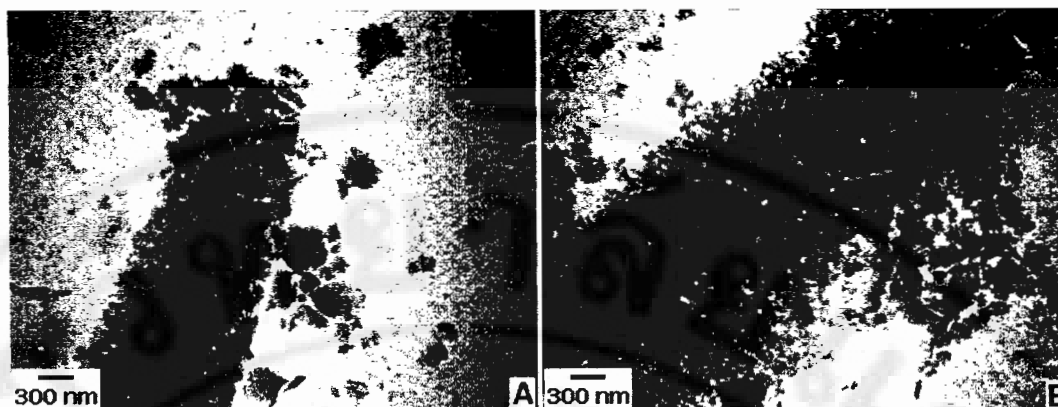
เนื้อเยื่อจากข้าวที่เป็นโรคใบหงิกนั้นเซลล์บริเวณเส้นใบจะมีช่องว่างมาก (ภาพที่ 48) พบอนุภาคไวรัสอยู่เป็นกลุ่มหนาแน่นในเยื่อหุ้ม ในเนื้อเยื่อของข้าวและเปลือกกระโดดสีน้ำตาลนั้นจะพบอนุภาค RRSV ที่อาจอยู่หนาแน่นอยู่เป็นบริเวณภายในไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 49-57) หรืออาจพบอยู่กระจายทั่วไป ขนาดอนุภาคที่พบมีขนาดต่างกัน เช่น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 – 75 นาโนเมตร การปรากฏของอนุภาคไวรัสในเนื้อเยื่อจากเปลือกกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อ RRSV นั้นมีสภาพที่คล้ายกับที่พบในเนื้อเยื่อจากต้นข้าว แต่ส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กกว่าดังภาพที่ 59 - 63



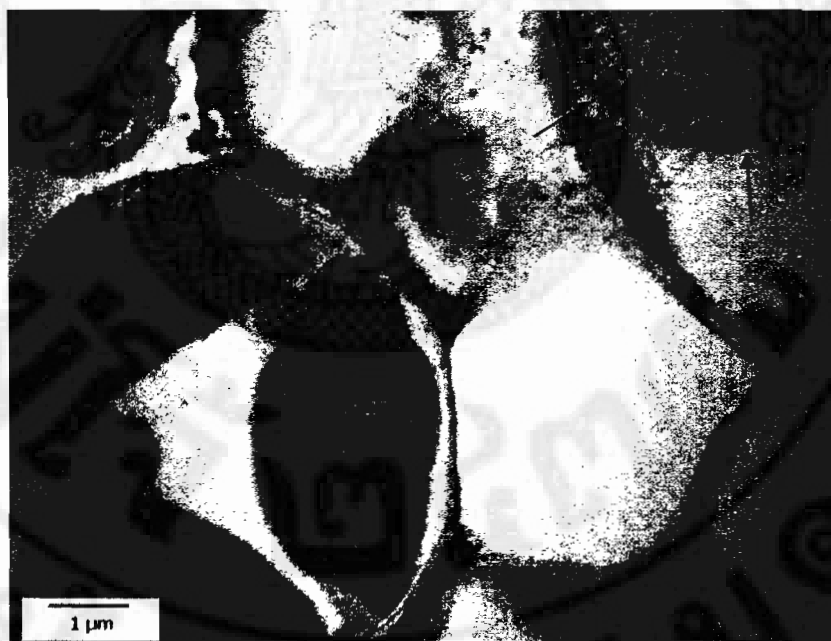
ภาพที่ 45 อนุภาคต่างขนาดที่ทึบอิเล็กตรอนขนาดประมาณ 30 - 75 นาโนเมตรที่พบในน้ำคั้นของใบและกาบใบข้าวที่แสดงอาการโรคใบหงิกหลังจากตรึงด้วย Karnovsky's fixative ย้อมด้วย 2% phosphotungstic acid ขยาย 60,000 เท่าที่ accelerating voltage 100KV



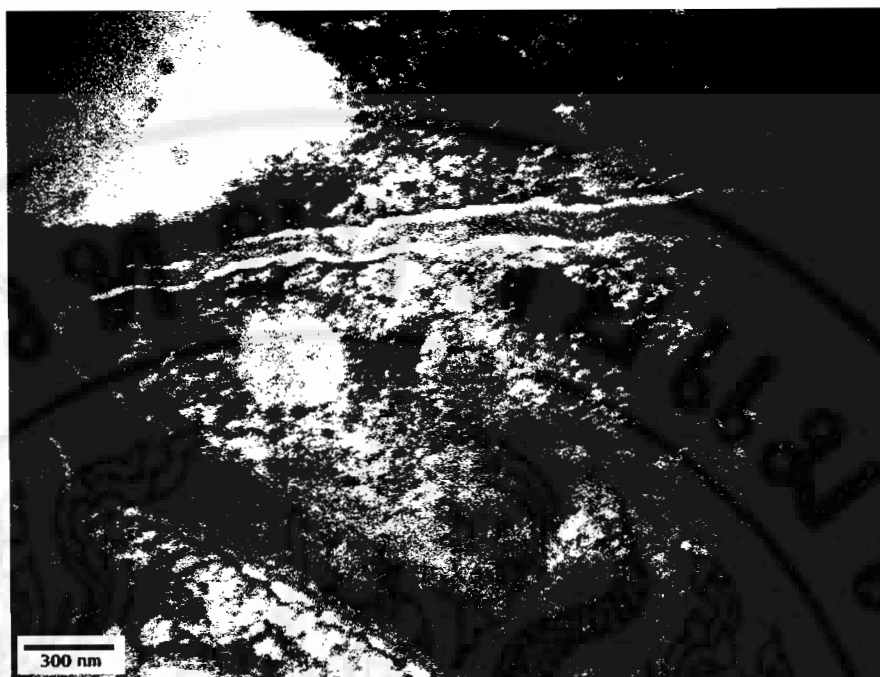
ภาพที่ 46 อนุภาคทึบอิเล็กตรอนต่างขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 - 75 นาโนเมตร ในน้ำคั้นจากใบและกาบใบข้าวที่มีอาการโรคใบหงิกหลังจากตรึงด้วย Karnovsky's fixative แล้วย้อมด้วย 2% phosphotungstic acid A ขยาย 60,000 เท่า B ขยาย 40,000 เท่าด้วยกำลัง acceleration voltage 100 KV



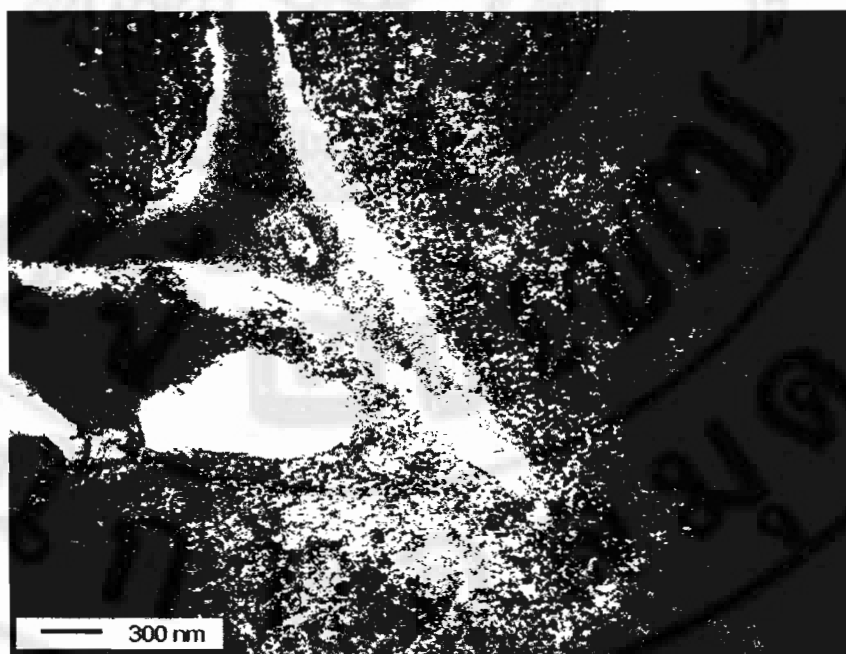
ภาพที่ 47 กลุ่มอนุภาคที่บิเล็คตรอนพบในน้ำคั้นจากใบและกาบใบข้าวที่แสดงอาการโรคใบหงิกหลังจากตรึงด้วย Karnovsky's fixative ย้อมด้วย 2% phosphotungstic acid A อนุภาคอยู่รวมกันหนาแน่นเหมือนอยู่ในถุง B โครงร่างคล้ายถุงมีเส้นใยขนาดเล็กพันประสานและโยงยึดกับเซลล์ข้าว ภาพขยาย 40,000 เท่าที่ accelerating voltage 100 KV



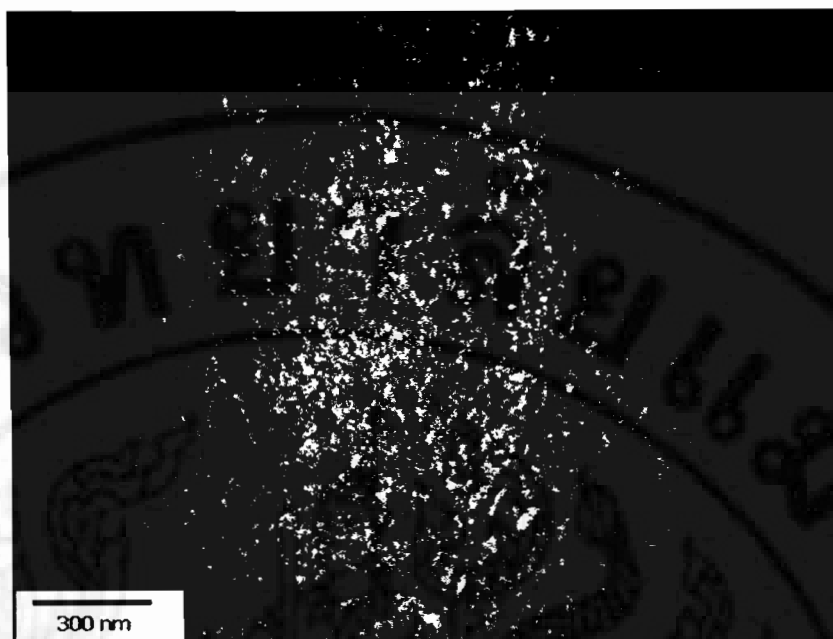
ภาพที่ 48 เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบด้านล่างใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ส่วนที่พองเนื่องจากการเป็นโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 80 นาโนเมตร ย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate ส่องด้วยกำลัง 100KV ขยาย 15000 เท่า ลูกศรชี้แสดงกลุ่มอนุภาคไวรัสเป็นกลุ่มก้อนในเยื่อหุ้ม



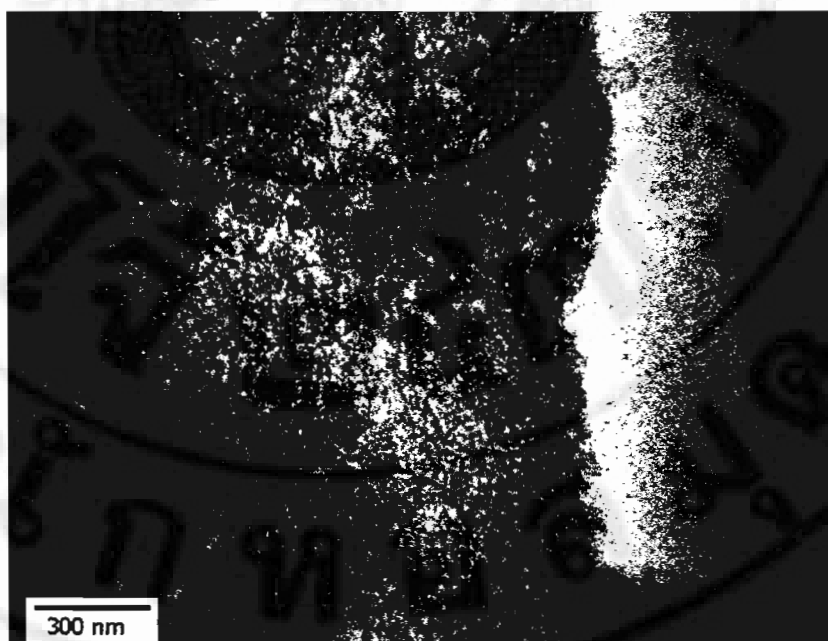
ภาพที่ 49 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 75 นาโนเมตรเรียงต่อกันในเซลล์ใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อตัดบาง 80 นาโนเมตร ย้อมด้วยยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องขยาย 50,000 เท่า ด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV



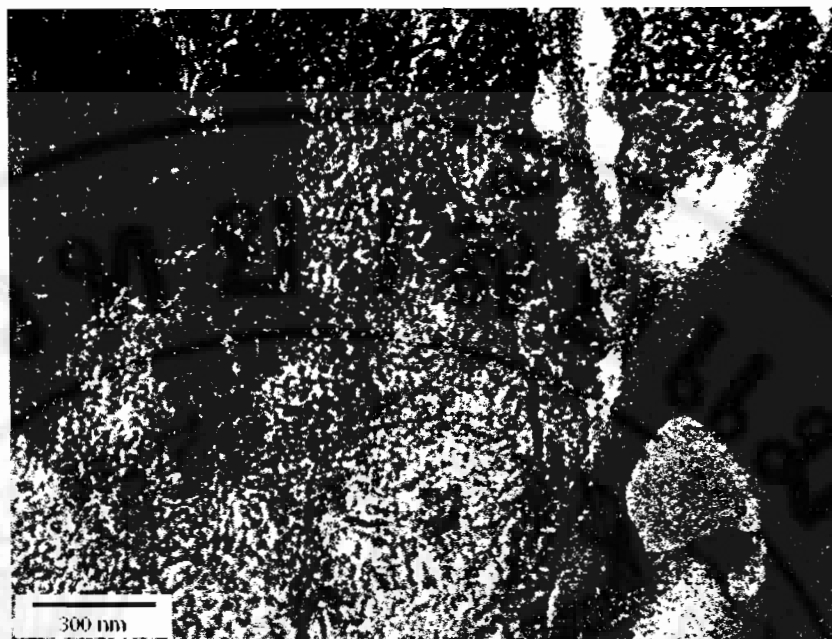
ภาพที่ 50 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร พบอยู่กระจายทั่วไปในเซลล์ของข้าวพันธุ์ TN-1 เมื่อตัดบาง 80 นาโนเมตร ย้อมด้วยยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV ขยาย 40,000 เท่า



ภาพที่ 51 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร พบอยู่กระจายทั่วไปในเซลล์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อตัดขวาง 80 นาโนเมตร ย้อมด้วยยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ขยาย 80,000 เท่า ด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV



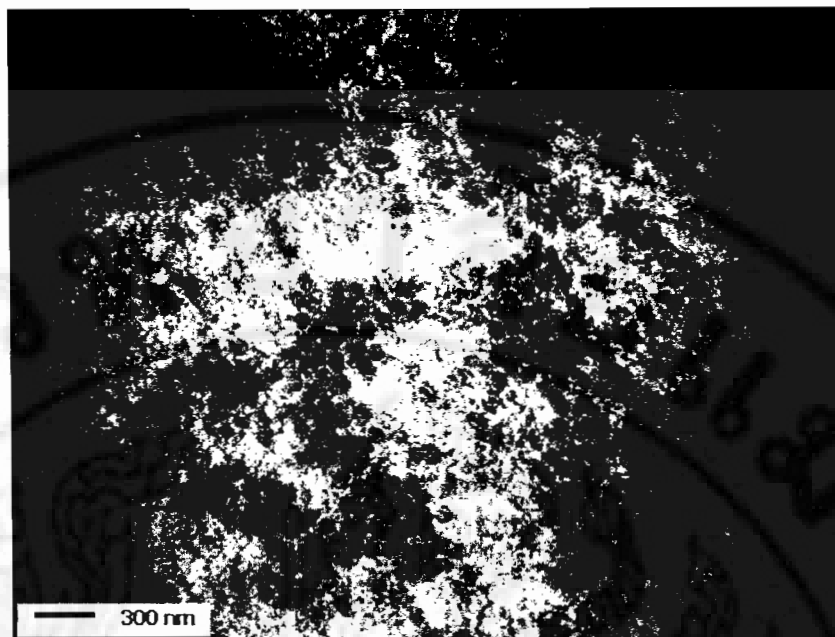
ภาพที่ 52 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร พบอยู่เป็นกลุ่มในเซลล์ของข้าวพันธุ์ TN-1 เมื่อตัดตัวอย่างบาง 80 นาโนเมตร ย้อมด้วยยูเรนิล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องขยาย 80,000 เท่า ด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV



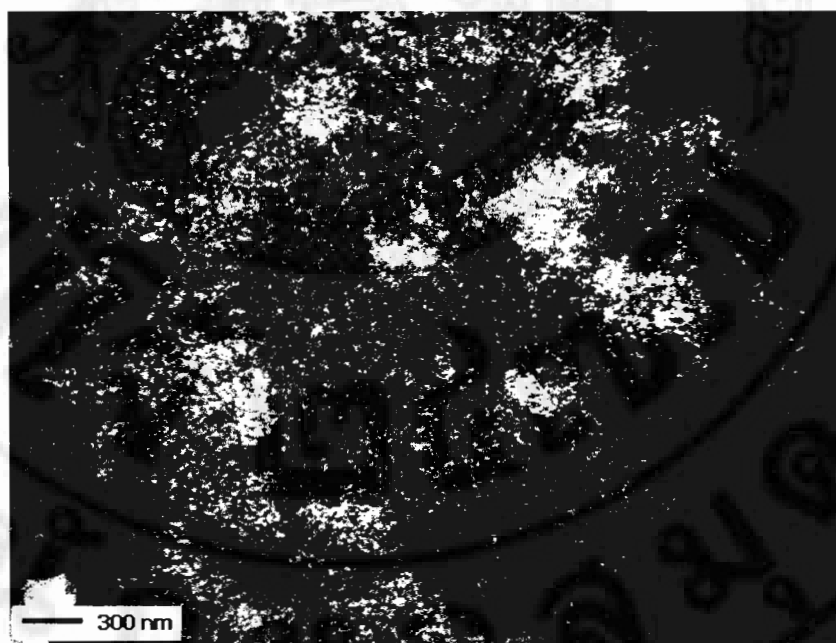
ภาพที่ 53 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 60 - 70 นาโนเมตรแต่ละอนุภาคที่บิอิเล็กตรอนได้ไม่เท่ากัน พบเป็นกลุ่มหนาแน่นอยู่เป็นบางจุดในไฮโดรพลาสซึม โดยเฉพาะส่วนใกล้ผนังเซลล์ ขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV



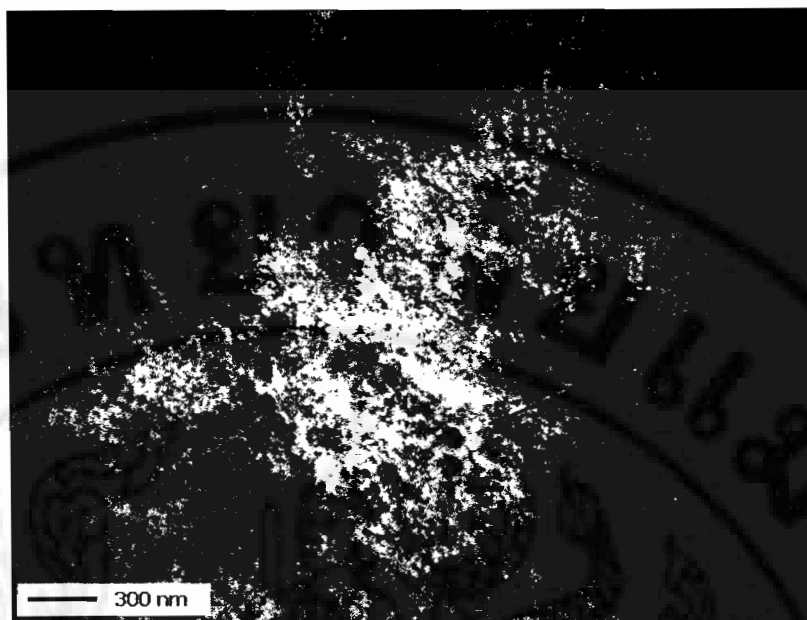
ภาพที่ 54 กลุ่มอนุภาค RRSV ที่บิอิเล็กตรอนไม่เท่ากันขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 60 - 75 นาโนเมตร อยู่เป็นกลุ่มอัดแน่นใกล้ผนังเซลล์ กำลังขยาย 80,000 เท่า



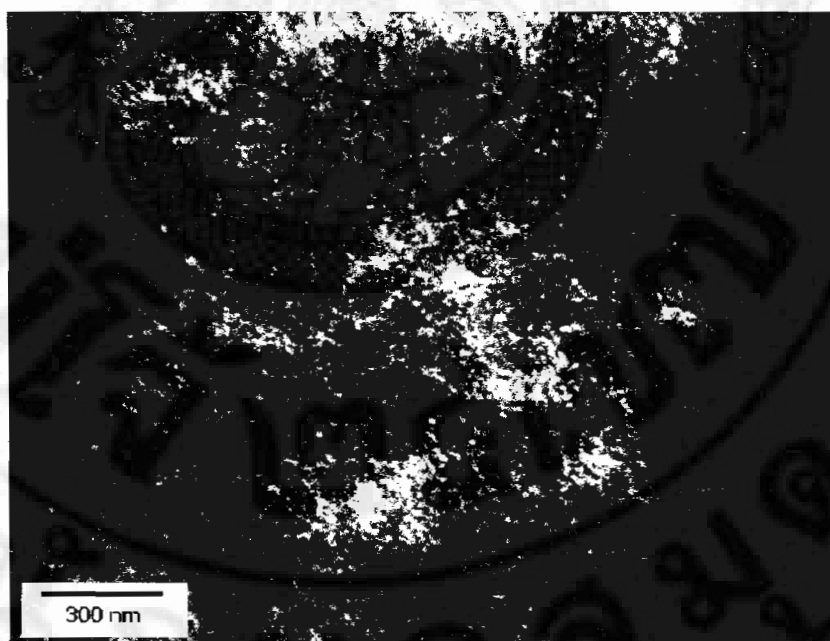
ภาพที่ 55 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80 นาโนเมตร ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ข้าว ภาพขยาย 40,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV



ภาพที่ 56 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75นาโนเมตรอยู่อัดแน่นในไซโตพลาสซึมของเซลล์ข้าว ด้านข้างมีไมโครไฟเบอร์เหมือนยึดประสานกับผนังเซลล์ ภาพขยาย 40,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV



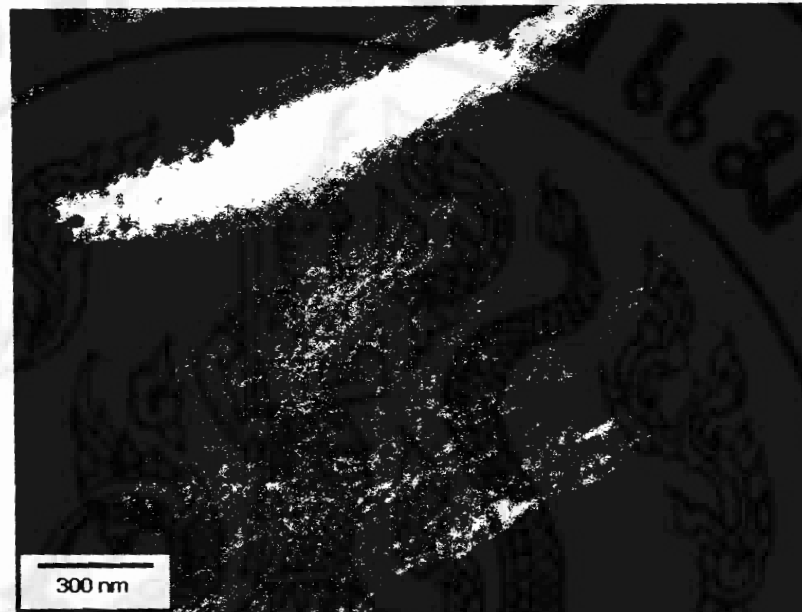
ภาพที่ 57 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75 นาโนเมตร ในเซลล์ข้าว อนุภาคบางกลุ่มอยู่ต่อกันเป็นสายคล้ายลูกปัด (ลูกศรชี้) ภาพขยาย 50,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV



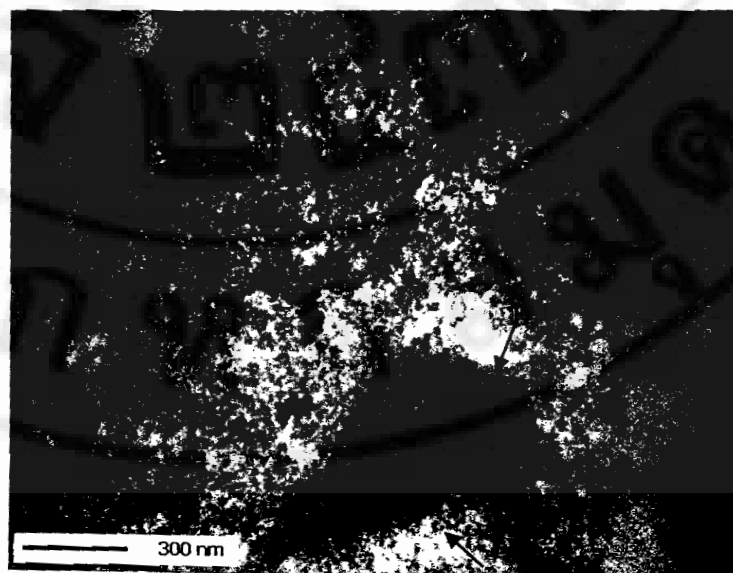
ภาพที่ 58 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 65 นาโนเมตร ในเซลล์ข้าว ที่บิเล็คตรอนเข้มตรงส่วนกลาง มีขอบ คล้ายไข่ดาว ภาพขยาย 80,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV

2. เนื้อเยื่อเพรียกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อ RRSV

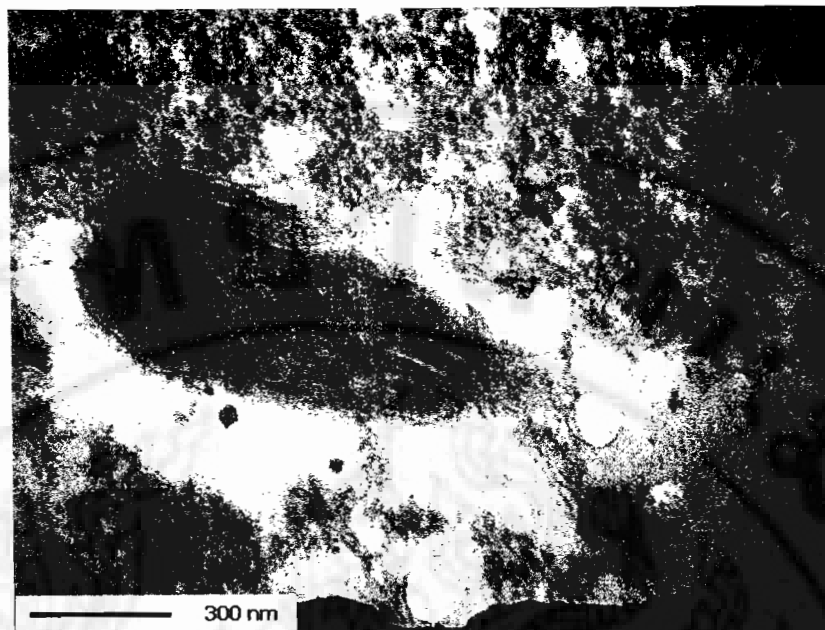
การศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อเพรียกระโดดสีน้ำตาลที่ติดเชื้อโรคใบหงิกัดับบาง 80 nm ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านแสดงผลเป็นภาพไว้ในภาพที่ 59 - 72



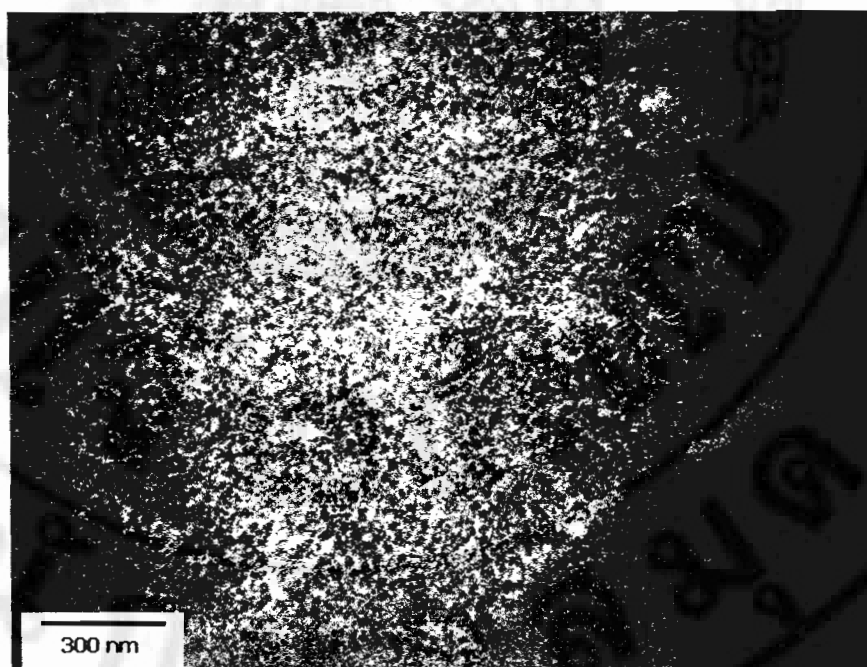
ภาพที่ 59 แสดงอนุภาคของ RRSV ขนาดต่างกันเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45– 75 นาโนเมตร พบในเนื้อเยื่อของเพรียกระโดดสีน้ำตาล ทั้งแบบแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อและอยู่เป็นกลุ่มที่มีเนื้อเยื่อล้อมรอบ ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV



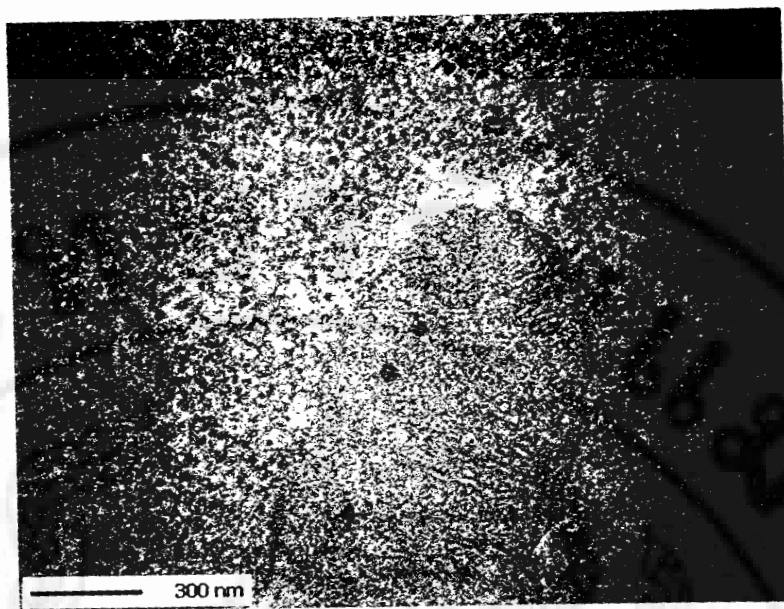
ภาพที่ 60 อนุภาคขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร มีทั้งอยู่ทั่วไปและอยู่เป็นกลุ่มอัดแน่นในเซลล์ของเพรียกระโดดสีน้ำตาล (ลูกศรชี้)



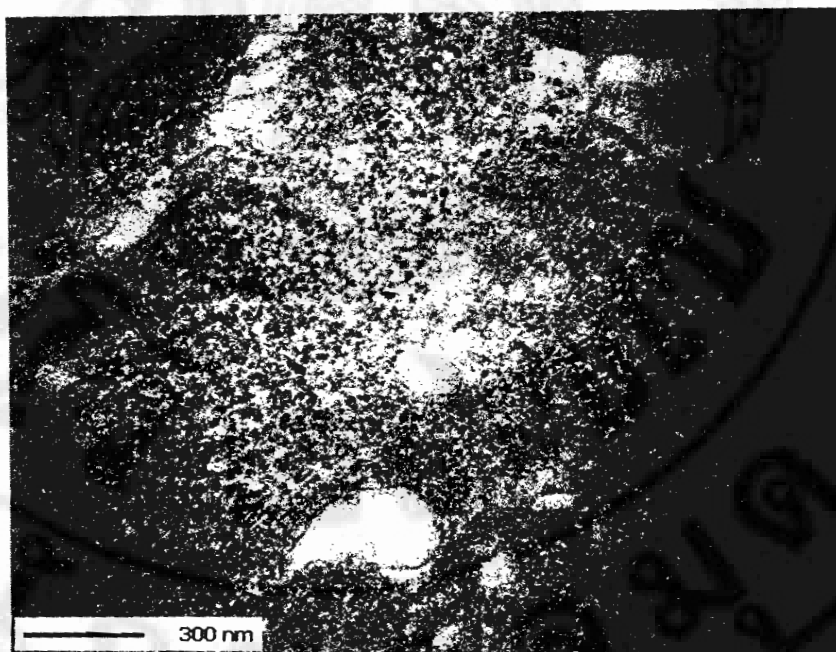
ภาพที่ 61 แสดงอนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 – 50 นาโนเมตร กระจายอยู่ในเซลล์ของเพรียกระโดดสีน้ำตาล ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 100,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV



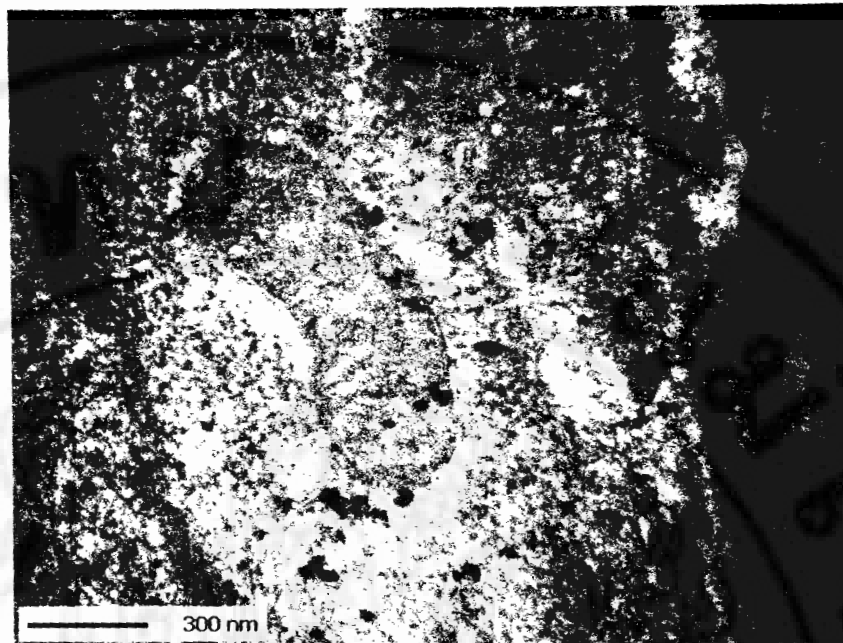
ภาพที่ 62 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 50 นาโนเมตรกระจาย อยู่ในเซลล์ของเพรียกระโดดสีน้ำตาล ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่า ด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV



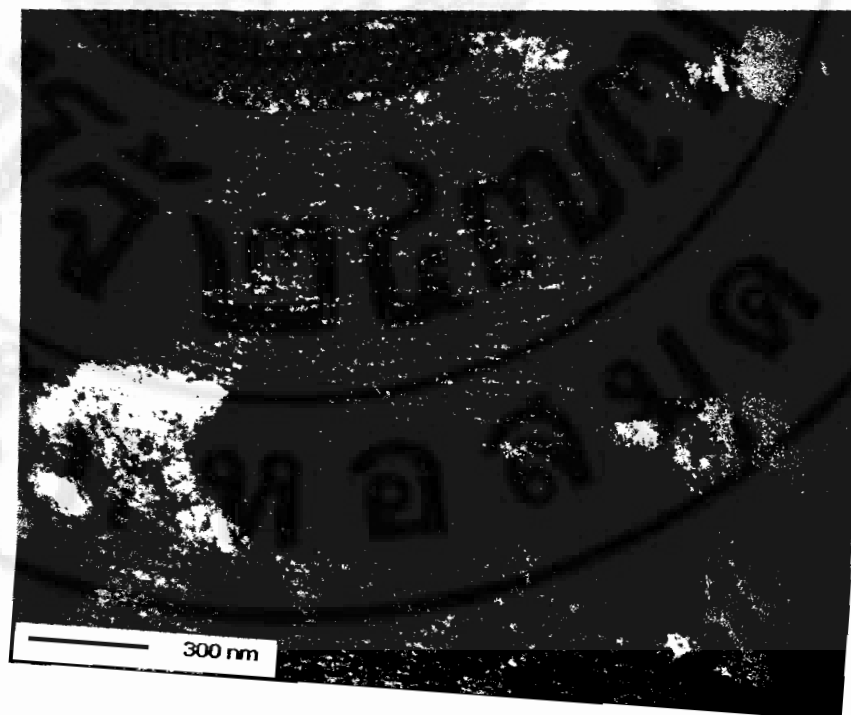
ภาพที่ 63 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45 นาโนเมตรกระจายหนาแน่นอยู่ในเซลล์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล



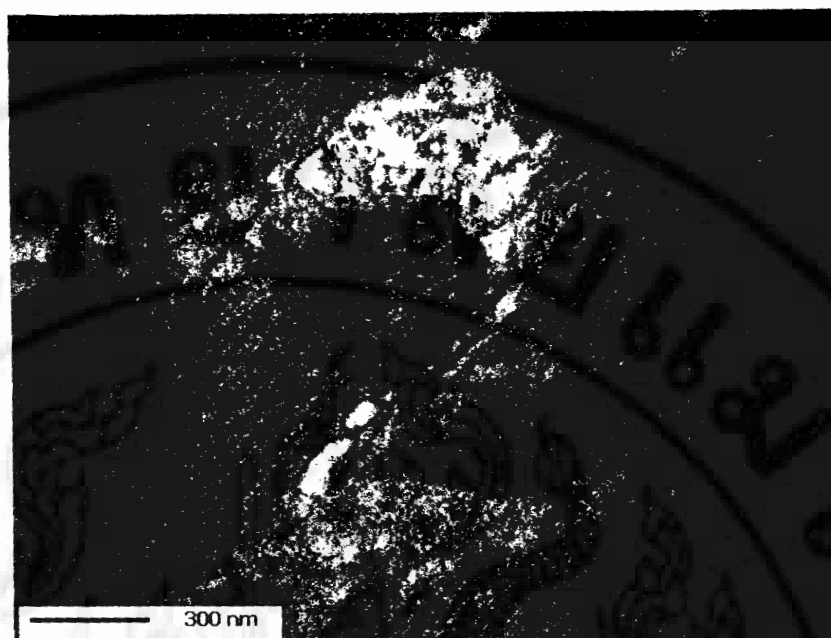
ภาพที่ 64 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 50 นาโนเมตรกระจายอยู่ในเซลล์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่า ด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV



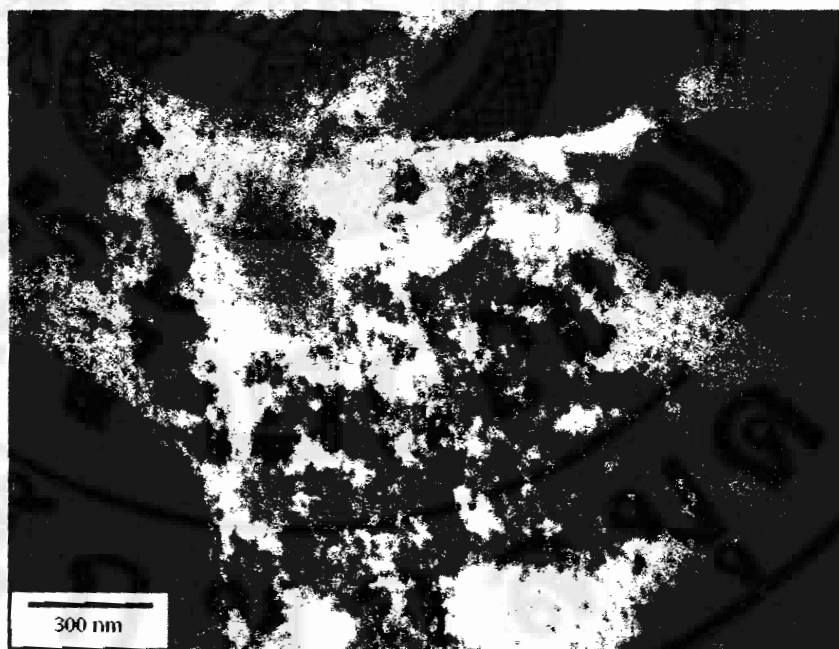
ภาพที่ 65 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45 นาโนเมตรกระจายอยู่ในเซลล์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบได้แม้ภายในและโดยรอบไมโทคอนเดรีย ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV



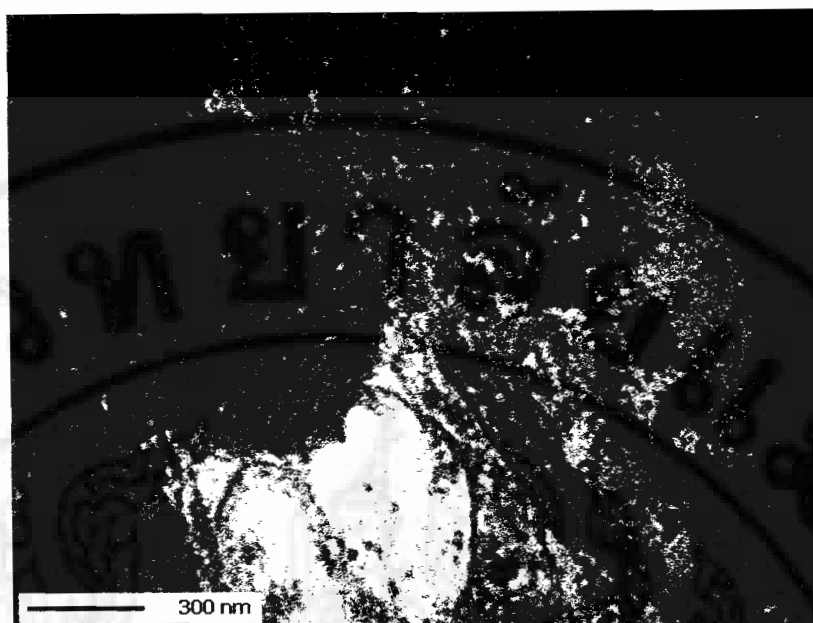
ภาพที่ 66 อนุภาคของ RRSV (เช่นในวงกลม) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 60 นาโนเมตรพบแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล



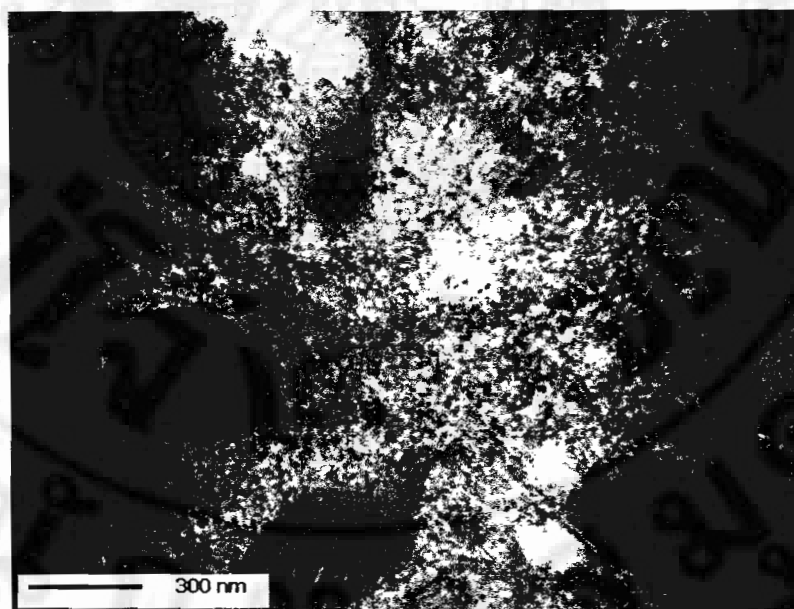
ภาพที่ 67 อนุภาคนาโนเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 50 นาโนเมตรพบทั้งที่อยู่ภายใน และที่กระจายอยู่ในกล้ามเนื้อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลภาพขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV



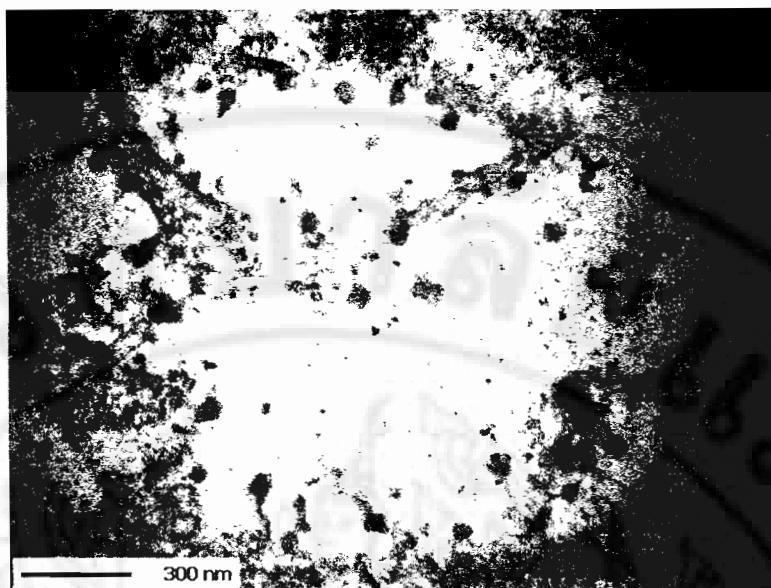
ภาพที่ 68 อนุภาคนาโนเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75 นาโนเมตร ในเนื้อเยื่อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าเท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV



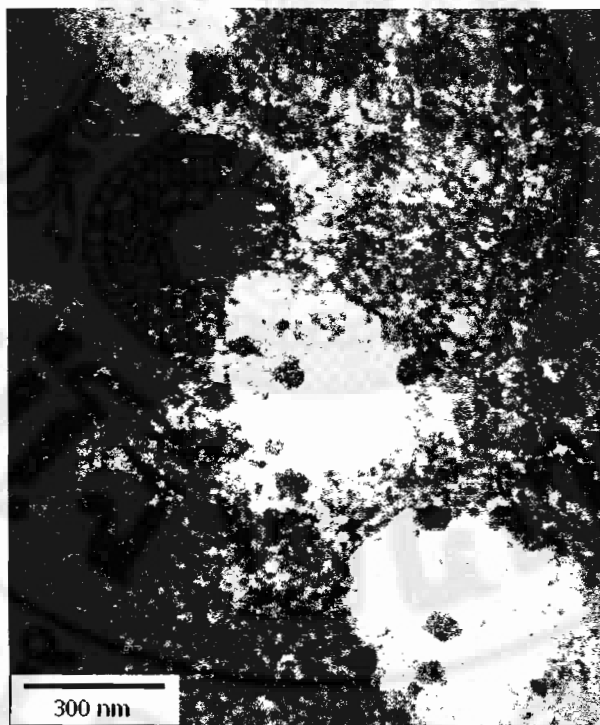
ภาพที่ 69 อนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 60 นาโนเมตร เรียงตัวอยู่ในโครงสร้างแบบฝักถั่วพบในเนื้อเยื่อของพลีเยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV



ภาพที่ 70 อนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกันประมาณ 30 - 60 นาโนเมตรพบในเนื้อเยื่อของพลีเยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV



ภาพที่ 71 อนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45 - 75 นาโนเมตรพบในเซลล์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลภาพขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV



ภาพที่ 72 อนุภาค RRSV ขนาดต่างกันพบในเนื้อเยื่อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าเท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV

วิจารณ์ผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสข้าวใบหงิกโดยใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในช่วงที่มีอากาศร้อนและแห้งในเดือนเมษายนกับต้นเดือนพฤษภาคมในภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่)จะมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลช้าลง การปล่อยเชื้อ RRSV โรคใบหงิกจะเกิดขึ้นได้ดีหากทำการปล่อยเชื้อไวรัสในช่วงฤดูที่มีอากาศชื้น นอกจากนี้ยังพบว่าอายุของต้นข้าวที่จะทำการปล่อยเชื้อไวรัส RRSV คือ ถ้าทำการปล่อยเชื้อไวรัสในช่วงที่ข้าวเป็นต้นกล้าอายุประมาณ 15 วันหากติดโรคใบหงิกจะแตกกอ น้อย หรือไม่แตกกอเลย มีการแตกใบใหม่น้อย แต่หากปล่อยเชื้อไวรัสสู่ต้นข้าวที่มีอายุ 1 เดือน ขึ้นไป ต้นข้าวยังจะมีการแตกกอได้ ปลายใบ หรือทั้งใบข้าวที่เป็นโรคจะบิดเป็นเกลียว ขอบใบเป็นแผล ตามยาวมีรอยขาดตามขวางทำให้มีลักษณะขาดคล้ายฟันเลื่อยขอบแผลมีสีขาว รวงไม่โผล่และไม่สามารถสร้างเมล็ดได้เต็มที่

ช่วงวัยของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในการถ่ายทอดโรคจะมีผลต่อการเกิดโรคได้ ถ้าใช้แมลงที่อยู่ในวัยอ่อน จะทำให้สามารถเกิดโรคได้ดี เนื่องจากแมลงในวัยนี้จะกำลังเจริญเติบโตและดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวได้ดี ต่างกับแมลงแก่ที่มักอยู่นิ่งและดูดกินน้ำเลี้ยงข้าวได้น้อยลง การใช้แมลงในวัยแก่การปล่อยเชื้อ RRSV น่าจะทำให้มีการเกิดโรคได้น้อยลงหรือไม่มีการเกิดโรคได้ ในสภาพธรรมชาตินั้นแต่ละกลุ่มประชากรจะมีแมลงที่ต่างวัย ดังนั้นแมลงพาหะได้ดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นข้าวที่เป็นโรคในเวลาที่ยาวนานยิ่งขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงตาม

ความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มจะไม่มี ความแตกต่างกันมาก เนื่องจากความแตกต่างทางความสูงของต้นข้าวปกติมีมากเมื่อนำมาเฉลี่ยแล้วจะให้ค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้จำนวนต้นที่ใช้ในการทดลองของแต่ละกลุ่มมีจำนวนน้อยจึงทำให้ขอบเขตของการศึกษาแคบทำให้มีการพิจารณาเพื่อการสรุปผลทำได้ยาก

การสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ที่ดัดแปลงจาก Morris และ Dodds (1979) เป็นวิธีการที่ใช้เทคนิคมากและมีหลายขั้นตอน ใช้เวลานานในการปฏิบัติ ประกอบกับที่ต้องใช้ตัวอย่างต้นข้าวที่มาก และต้องใช้ฟีนอล ที่เป็นอันตรายต่อการปฏิบัติงาน แต่ค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก เมื่อทดลองโดยใช้ชุดสำเร็จ RNeasy Plant Mini Kit นั้นพบว่าใช้เวลาเพียง 30 นาที โดยใช้เนื้อเยื่อเยื่อต้นข้าว 100 มิลลิกรัม ก็สามารถสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ได้ แต่ไม่สามารถทำการแยกสกัดจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ ต่างกับชุดสกัด Master Pure™ Complete DNA & RNA Purification Kit ที่สามารถสกัดตัวอย่างเนื้อเยื่อจากกาบใบข้าวและตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพียง 50 และ 10 มิลลิกรัมตามลำดับ ทำให้ได้สกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) โดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที

การทดลองไม่ใช้ไนโตรเจนเหลวช่วยในการสกัดอาร์เอ็นเอสำหรับปฏิกิริยาเพื่อ RT-PCR พบว่า จะไม่สามารถสังเคราะห์ cDNA อาจจะเป็นเพราะในตัวแมลงมีเอนไซม์บางชนิดที่เมื่อทำการบดโดย

ไม่ใช้ความเย็นที่เย็นจัดอาจจะส่งผลให้เอนไซม์ตัวนั้นเกิดปฏิกิริยาไปย่อยสลายอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ที่ต้องการได้ นอกจากนี้การบดตัวอย่างที่ใช้มีปริมาณที่น้อย มากเช่นเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลใช้เพียง 10 มิลลิกรัม ประมาณ 10 ตัว การบดในโถรงจะทำให้สูญเสียได้มากในการทดลองนี้จึงทำการบดด้วยก้านบดพลาสติกในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml. ทำให้ตัวอย่างสูญเสียไปน้อย

ประสิทธิภาพของไพรเมอร์ในการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA จาก RRSV ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความแตกต่างกัน พบว่าไพรเมอร์คู่ที่ 1 คือ S5U617 กับ S5L1539 จากจีโนมของส่วนที่ 5 กับคู่ที่ 3 (S8U617 กับ S8L1385) จากจีโนมส่วนที่ 8 นั้นให้ผลเฉพาะกับอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกาบใบข้าว สำหรับอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลนั้น สามารถสังเคราะห์ปริมาณ cDNA โดยไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Pns6 กับ Ndel) และคู่ที่ 3 ในการทดลองนี้จะพบความจำเพาะของไพรเมอร์คู่ที่ 1 กับแม่พิมพ์ (template) จากตัวอย่างข้าว และของไพรเมอร์คู่ที่ 2 กับแม่พิมพ์ (template) จากตัวอย่างของเพื่อยกระโดดสีน้ำตาล แต่ไพรเมอร์คู่ที่ 3 นั้นให้ผลในการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอของทั้งตัวอย่างข้าวและแมลงพาหะ ถึงอย่างนั้นจะต้องมีการเปรียบเทียบการใช้ไพรเมอร์ซึ่ง

ผลจากการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยไพรเมอร์ต่างกันนั้นพบว่าไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5U617 กับ S5L1539) ให้ผลการสังเคราะห์ที่มีความยาวประมาณ 900 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Pns6 กับ Ndel) และคู่ที่ 3 (S8U617 กับ S8L1385) จะทำให้ได้ cDNA ขนาดประมาณ 600 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) พบว่าไพรเมอร์คู่ที่ 1-3 จะให้ความยาวคู่เบสตามลำดับดังต่อไปนี้คือ 877, 1741 และ 663 คู่เบส แต่ผลของการทดลองกลับพบว่าไพรเมอร์คู่ที่ 2 สามารถสังเคราะห์ cDNA มีความยาวประมาณ 600 คู่เบสซึ่งแตกต่างกับการ BLAST ส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากช่วงเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนของการทำ RT-PCR ไม่เหมาะสมสำหรับใช้กับไพรเมอร์คู่ที่ 2 ทำให้การสังเคราะห์ cDNA ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นในช่วงของขั้นตอนนี้ต้องมีการปรับเปลี่ยนปัจจัยดังกล่าวให้เหมาะสมกับเชื้อ RRSV ในการใช้กับไพรเมอร์คู่ที่ 2 เพื่อที่จะให้ลำดับเบสตรงกับผลการ BLAST

การทดสอบด้วยวิธีการใช้พืชทดสอบ (bioassay) การเกิดโรคโดยเพื่อยกระโดดสีน้ำตาลดูดกินต้นข้าวที่เป็นโรคนาน 1 ชั่วโมงจะพบการเกิดโรคถึง 6.6 เปอร์เซ็นต์หลังจากปล่อยเชื้อ 30 วัน แต่การทดสอบโดยใช้เทคนิคทางด้านโมเลกุลที่ทำโดยใช้เพื่อยกระโดดสีน้ำตาลรับเชื้อเป็นเวลา 90 นาที สามารถตรวจพบเชื้อ RRSV ช่วงเวลาในการตรวจสอบไม่ได้ทำที่เวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งที่เวลานี้เมื่อใช้ทดลองอาจจะพบเชื้อ RRSV ได้ จากวิธีการทดสอบทั้งสองนี้จะเห็นว่าการใช้พืชทดสอบ (bioassay) จะแสดงผลได้ชัดเจนแต่การทำจะใช้เวลานานถึง 30 วันแตกต่างกับการใช้เทคนิคทางด้านโมเลกุลที่ใช้เวลาเพียง 1 วัน

ในการวินิจฉัยโรคใบหงิกของข้าวที่ใช้พืชทดสอบ (bioassay) แม้เป็นวิธีที่ประหยัดแต่ต้องใช้เวลา นาน เมื่อนำเทคนิคทางด้านโมเลกุลเข้ามาช่วยในการวินิจฉัยโรคจะทำได้อย่างรวดเร็ว ให้ผลที่ชัดเจน ขั้นตอนในการทำไม่ยุ่งยากซับซ้อน และทำให้การวินิจฉัยโรคมีประสิทธิภาพสูง

การโคลนโดยใช้ผลผลิต cDNA จากไพรเมอร์ sense S8U722 และ antisense S8L1385 สำหรับลำดับเบสในจีโนมส่วนที่ 8 ของ RRSV เพื่อทำ transformation สู่วัสดุ pCR4-TOPO ของ *E.coli* เพื่อวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมและเปรียบเทียบเชิงวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งในภาคกลางเมื่อปีพ.ศ.2548 แม้ได้ transformant จากตัวอย่างสำรวจ 10 แหล่ง แต่เมื่อตรวจสอบการแทรก (insert) โดยปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primers ต่างๆ ได้แก่ forward primer S8U722 + reverse primer S8L1385 และ universal primers ของพลาสมิด (M13, T₃, และ T₇) พบว่าได้ DNA เพียง 200 – 500 คู่เบสจากทุกตัวอย่างทั้งที่ DNA จาก PCR procts เดิมยาวถึง 700 คู่เบสนั้นแสดงว่าใน insert ต้องมีจุดที่ *EcoRI* เข้าตัดได้ การวิเคราะห์ด้วยลำดับเบสที่ไม่เพียงพออาจทำให้ได้ผลที่ไม่ชัดเจน เมื่อต้องเลือกเฉพาะโคลนที่มั่นใจในทิศทางของการแทรก ได้แก่ 8.1.10 จาก อ.ลาดบัวหลวง จ.อยุธยา, 10.1.1 จาก ต.บางไทร จ.อยุธยา, 13.2.3 จาก ต.รั้วใหญ่ จ.สุพรรณบุรี, 15.2.2 จาก อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี, 21.2.4 จาก อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท สำหรับจัดทำ phylogram การเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมโดยวิธี distance method ใน ภาพที่ 30 แม้พบว่าตัวอย่างจากทั้ง 5 แหล่งมีความแตกต่างจากกันน้อย และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันแต่ได้แต่ตัวอย่างจาก ต. รั้วใหญ่ จ.สุพรรณบุรียังแสดงความแตกต่างไปจากอีก 4 แหล่ง ขณะที่ 2 สายพันธุ์ คือจากไทยและจากฟิลิปปินส์ของ Genebank ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกลับแตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างทั้ง 5 ไปอย่างเด่นชัด ในการศึกษาแม้จะเป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสเพียงสั้นๆ แต่ก็พอแสดงให้เห็นว่า ลำดับเบสเพียงบางส่วนก็อาจใช้แบ่งแยก RRSV ที่พบในประเทศไทยได้

สุชาติและคณะ (2004) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของจีโนมส่วนที่ 5 และ ส่วนที่ 8 ของ RRSV ที่พบในนาข้าว 7 แห่งในประเทศไทยสร้างเป็น phylogenetic tree และ sequence pair distances แสดงความแตกต่างของสายพันธุ์ RRSV ไว้ได้ต่างกันแต่ก็สรุปได้ว่าลำดับเบสของจีโนมส่วนที่ 5 จะมีความหลากหลายน้อยกว่าในจีโนมส่วนที่ 8

ผลจากการศึกษานี้ยังต้องมีการศึกษาซ้ำเพื่อให้ได้ผลที่แน่นอน ทั้งนี้อาจต้องปรับเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบส ใช้ตำแหน่งของยีนที่เหมาะสม หรือ ใช้ชนิดของโปรตีนเป็นส่วนประกอบซึ่งหากศึกษาต่อไปได้แล้วก็น่าจะได้ข้อมูลที่แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ถูกต้องของ RRSV ที่พบในประเทศไทย

การศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้นในตัวอย่างน้ำคั้นจากใบและกาบใบข้าว ตัวอย่างตัดบางขนาด 80 นาโนเมตรของต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิก และ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีเชื้อ โรคนี้มันจะพบอนุภาคของ RRSV ต่างขนาดขณะที่ตัวอย่างอย่างแบบเดียวกันแต่ไม่ติดเชื้อโรคใบหงิกนั้นจะไม่พบอนุภาคดังกล่าว ในตัวอย่างน้ำคั้นนั้นยังพบอนุภาคที่รวมตัวเหมือนอยู่ในถุงโดยมีใยละเอียดเสริมโครงร่างของถุงซึ่งใยละเอียดเหล่านี้จะทำหน้าที่ยึดตัวเข้ากับเซลล์ข้าว

ลักษณะภาพอนุภาคของ RRSV ที่พบจะมีโครงร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยม ค่อนข้างกลม ฐานกลาง โดยทั่วไปมีความทึบอิเล็กตรอนได้ไม่เท่ากัน โดยจะทึบตรงส่วนกลางและมีขอบโดยรอบ

อนุภาค RRSV ที่พบในตัวอย่างแต่ละแบบอาจมีขนาดได้ต่างกัันดังจะเห็นว่าในน้ำคั้นใบและกาบใบข้าวและตัวอย่างตัดบางของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจะมีขนาด 30 – 75 นาโนเมตร ส่วนในตัวอย่างตัดบางจากต้นข้าวพบอนุภาคขนาด 60 – 75 นาโนเมตร ในเนื้อเยื่อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนั้นอาจพบอนุภาค RRSV กระจายตัวอยู่ได้ทั่วไปแม้ในเซลล์กล้ามเนื้อ ภายใน และตามผิวของไมโทคอนเดรีย

อนุภาคของ RRSV ที่มีขนาดต่างกันเช่นนี้จะคล้ายกับที่ Chen และคณะ (1989) พบว่าอนุภาคในเนื้อเยื่อข้าวเป็นโรคใบหงิกจะมีขนาด 40 และ 55 – 70 นาโนเมตร ส่วนในเนื้อเยื่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจะพบอนุภาคขนาด 60 – 75 นาโนเมตร แม้ในการศึกษาของนักวิจัยชาวไต้หวันจะพบอนุภาคไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกมักเรียงตัวอยู่ในแนวยาวเป็นสายเหมือนอยู่ในท่อใส่ และ อยู่เรียงตัวเป็นระเบียบแบบผลึกในตัวอย่างตัดบางของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีเชื้อโรคใบหงิก แต่จากการศึกษาโรคใบหงิกของไทยในข้าวพันธุ์ Taichung TN 1 และพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 มีทั้งแบบอยู่เป็นกลุ่มมีเยื่อบางห่อหุ้ม แบบที่อยู่หนาแน่นไม่มีรูปแบบที่ชัดเจนตามบางบริเวณของเซลล์ และพบการเรียงตัวของอนุภาค RRSV ในเนื้อเยื่อตัดบางของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนั้นมีแบบเรียงตัวเดี่ยวๆตามแนวกรอบแคบๆทั้งสองด้าน ดังภาพที่ 68

เอกสารอ้างอิง

1. กรมส่งเสริมการเกษตร. สรุปรายงานพื้นที่การระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ปี2540. กรมส่งเสริมการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2541.
2. กรมวิชาการเกษตร. 2546. <http://www.doae.go.th/pest/rice/ribph.htm>
3. เจริญ จีนเจียม. 1998. โรคข้าวของข้าว. เอกสารเผยแพร่ที่ 58 กรมส่งเสริมการเกษตร. <http://web.ku.ac.th/agri/juu/index.html>
4. ดารา เจตนะจิตร์, เมธี ปุตตะ,อมรา สนิมทอง, วิชชุดา รัตนกาญจน์, จรรยา อารยาพันธ์ และ สมคิด ดิสถาพร. 2533. โรคข้าวของข้าวและแนวทางแก้ปัญหาเอกสาร (อัดสำเนา) ประกอบการบรรยายโครงการฝึกอบรมเทคนิคการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล วันที่ 20-29 สิงหาคม 2533. สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 119 หน้า
5. ดารา เจตนะจิตร์, สมคิด ดิสถาพร, อมรา สนิมทอง, เมธี ปุตตะ, วิชชุดา รัตนกาญจน์ และ จรรยา อารยาพันธ์. 2533. โรคข้าวของข้าว. หนังสือพิมพ์กสิกร ปีที่ 63 ฉบับที่ 4 หน้า 369-373.
6. ทวีช วิจารณ์. 2544. การตรวจหาเชื้อไวรัสโรคใบหงิกข้าวระดับโมเลกุลในข้าวสามพันธุ์ต่าง ๆ และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.
7. สุวัฒน์ รวยอารีย์. 2533. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวร้ายแห่งทศวรรษ. กสิกร 63(1) : 64-72.
8. สุชาดา ปัฐยวดี, บุญญานาถ นาถวงษ์, ดารา เจตนะจิตร์, วิชชุดา รัตนกาญจน์, ปาริชาติ เบิร์น สุภารัตน์ ปิ่นสุภา, เจษฎาภรณ์ พิทักษ์สุธิพงษ์, นุชนารถ วาริน และ สุพัฒน์ อรรถธรรม Diversity Study of Nucleotide Sequence of Genomic Segment 5 and 8 of Rice Ragged Stunt Virus Isolates in Thailand. Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Plants,Agricultural Extension and Communication. Bangkok (Thailand), 2004, p. 28-32 (651 p.). <http://kucon.lib.ku.ac.th/FullText/KC4201004.pdf>
9. Bergonia, Philipp. Phytopath. 13: 2, 1977. In Milne, R. G., G. Boccardo, and K. C. Ling. 1982. *Rice ragged stunt virus*. Description of plant viruses. Association of Applied Biologists. No. 248. July 1982.
10. Bergonia, H.T., and R. Feuer. 1978. Infectious gall disease or ragged stunt. A new disease of rice in the Philippines. Conference Sess. 11, Plant Protection Committee for the South East Asia and Pacific Region. Kathmandu (Nepal), 22 Sep 1978.

11. Boccardo, G. and R. G. Milne. 1980. Electrophoretic fractionation of the double-stranded RNA genome of rice ragged stunt virus. *Intervirology* 14 : 57-60.
12. Boccardo, G. and R. G. Milne. 1984. Plant reovirus group. No. 294. In: *Descriptions of Plant Viruses*. Commonw. Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
13. Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E.J. Zurcher. (eds.) (1996 onwards). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 16th January 1997. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/>
14. Cabauatan, P.Q., U. Melcher, K. Ishikawa, T. Omura, H. Hibino, H. Koganezawa,, and O. Azzam, 1999. Sequence changes in six variants of rice tungro bacilliform virus and their phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 80, pp. 2229–2237.
15. Chen, C. C., M. J. Chen, R. J. Chiu, และ H. T. Hsu,. 1997. *Rice ragged stunt virus* (*Oryzavirus*) possesses an outer shell and A-spikes. *Plant Protection Bulletin* Vol. 39:383-388.
16. Chen, C. C., M. J. Chen, and H. T. Hsu. 1989. Mophological comparisons of Echinochloa ragged stunt and rice ragged stunt viruses by electron microscopy. *Phytopathology* 79:235-241.
17. Chen, C.C., Y.-H. Hsu, M.-J. Chen, and R.-J. Chiu. 1989. Comparison of proteins and nucleic acids of echinochloa ragged stunt and rice ragged stunt viruses. *Intervirology* 30 : 278-284.
18. Chetanacchit, D., M. Putta, and S. Disthaporn. 1978. Rice ragged stunt in Thailand stunt virus. *Int Rice Res. Newsl.* 3(4) : 14-15.
19. Chou, T. G., T. Senboku, and E. Shikata, 1979. Some *in vitro* stabilities of rice ragged stunt virus. *Plant Protection Bulletin. Taiwan* 21(2) : 226-232.
20. Disthaporn, S., H. D. Catling, D. Chetanachit, and M. Putta. 1985. Effect of time of infection of rice ragged stunt virus on deep water rice. *Int. J. Tropical Pl. Dis.* 3:19-25.

21. Guonying, Z., L. Xiongbai, L. Huijuan, L. Juanli, C. Shengxiang, and Z. Gong. 2008. Rice Ragged Stunt Oryzavirus: role of the viral spike protein in transmission by the insect vector. *Annals of Applied Biology* 135:573 - 578
22. Hagiwara, K., Y. Minobe, Y. Nozu, H. Hibino, L. Kimura, and T. Omura, 1986. Component proteins and structure of rice ragged stunt virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1711-1715.
23. Hayat, M. A. and S. E. Miller, 1990. *Negative Staining*. R. R. Donnelly & Sons Company. 253 pp.
24. Hibino, H. (1979) Rice ragged stunt, a new virus disease occurring in tropical Asia. *Review of. Plant Protection Research*, 12:98-100.
25. Hibino, H., M. Roechan, S. Sudarisman, and D. M. Tantera, 1977. A virus disease of rice kerdil hampa transmitted by brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål.) in Indonesia. *Contrib. Centr. Res. Inst. Agric. Bogor*, No. 35 : 15 pp.
26. Hibino, H., M. Roechan, H. Warsidi, and M. Muchsin, 1980. A greenhouse screening technique for ragged stunt resistance. *Int. Rice Res. Newsl.* 5:2.
27. ICTVdB Management (2006). 00.060. Reoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA
28. ICTVdB Management (2006). 00.060.0.09.001. Rice ragged stunt virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA
29. Karnovsky, M. J. A. 1965. Formaldehyde-glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A-138A.
30. Kawano, S., I. Uyeda, and E. Shikata, 1984. Partial structure and double-stranded RNA of rice ragged stunt virus. *J. Fac. Agri. Hokkaido Univ.* 61(4) : 408-418.
31. Kudo, H., I. Uyeda, , and E. Shikata, 1991. Viruses in the phyto-reovirus genus of the Reoviridae family have the same conserved terminal sequence. *J. Gen. Virol.* 72 : 2857-2866.

32. Kupkanchanakul, T. 1999 Bridging the rice yield gap in Thailand. FAO Corporate Document Repository. Regional Office for Asia and the Pacific. A Paper presented at the Expert Consultation on "Bridging the Rice Yield Gap in Asia and the Pacific", held in Bangkok, Thailand, 5-7 October, 1999.
<http://www.fao.org/docrep/003/x6905e/x6905e-0d.htm>
33. Li Z, Y., N. M. Upadhyaya, W. Kosiratana, H. J. Gibbs. P.M. Waterhouse 1996.Genome segment 5 of rice ragged stunt virus encodes a virion protein. *Journal of General Virology* 77 : 3155-3160.
34. Iida, T. T., A. Shinkai, and I. Kimura, (1972). Rice dwarf virus. *Descriptions of Plant Viruses* No. 102. Association of Applied Biologists.
35. Ling, K.C. (1977). *Int. Rice Res. Newsl.* 2: 6.
36. Ling, K.C., E. R. Tiongco, and V. M. Aguiro, 1978. Rice ragged stunt, a new virus disease. *Plant Dis. Repr.* 62: 701- 705.
37. Ling, K.C., E. R., Tiongco, and G. Z Salamat,. 1978. A possible source of resistance to rice ragged stunt disease. *Int. Rice Res. Newsl.* 3(3): 8-9.
38. Ling, K. C., E. R. Tiongco, V. M. Aguiro, and P. Q. Cabauatan, 1978. Rice ragged stunt disease in the Philippines. *Philippine Phytopathology* 14:38-57.
39. Lu,H. J., C. G. Shao, and Z. X. Gong. 2002. Self-aggregation of the structural protein encoded by rice ragged stunt Oryzavirus genome segment 8. *Acta Biochim Biophys Sin*, 34:565 – 570.
40. Mayo, M. A. and A. A. Brunt, *Plant Virus Taxonomy* – 2005. Available at <http://www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet/posters%5C04.1.Plant%202005A4.pdf>
41. Milne, R.G. and E. Luisoni, 1979. Serological studies of rice ragged stunt virus. *Int. Rice Res. Newsl.* 4(2):12.
42. Milne, R. G., G. Boccardo, and K. C., Ling, 1982. *Rice ragged stunt virus*. *Description of plant viruses*. Association of Applied Biologists. No. 248. July 1982.
43. Mollenhauer, H. H. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technol.* 39:111-4.

44. Morinaka, T., D. Chetanachit, M. Putta, A. Parejarearn, and S. Disthaporn, 1983. *Nilaparvata bakeri* transmission of rice ragged stunt virus. Int. Rice Res. Newsl. 6(5): 12-13.
45. Morris, T. J., and J. A. Dodds, 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69 : 854 – 858.
46. Omura, I., S. Morinaka, D. Chettanachit, M. Putta, A. Parajarearn and S. Disthaporn, 1980. Pl. Dis. 64:795, in Milne, R. G., Boccoardo, G., and Ling, K. C. 1982. in *Rice ragged stunt virus*. Description of plant viruses. Association of Applied Biologists. No. 248. July 1982.
47. Omura, T., Y. Minobe, I. Kimura, H. Hibino, T Tsuchizadi, and Y. Saito, 1983. Improved purification procedure and RNA segments of rice ragged stunt virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 49(5) : 670-675.
48. Otsuka, K. 2005. Green revolution in Asia and its sustainability. www.irri.org/about/irridi/boardbio.asp.
49. Ou, S.H. 1985. Rice Disease. 2d ed., CAB, UK. 380 pp.
50. Palmer, Soepriaman & Mochida, 1978. Int. Rice Res. Newsl. 3: in R. G. Milne, G. Boccoardo, and K. C. Ling. 1982 ใน *Rice ragged stunt virus*. Descriptions of Plant Viruses. Association of Applied Biologist. No. 248
51. Parejarearn, A., and H. Hibino,. 1985. Distribution of rice ragged stunt virus in infected TN-1, plant. Int. Rice Res. Newsl 10(4): 12.
52. Shao, C.-G., H.-J. Lu, J.-H. Wu, and Z.-X. Gong, 2004. Nucleic Acid Binding Activity of Pns6 Encoded by Genome Segment 6 of Rice Ragged Stunt Oryzavirus. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 36(7): 457–466
53. Shao, C.-G., J.-H. Wu, G. Y. Zhou, G. Sun, B.-Z. Peng, J.-L. Lei, D.-D Jin, S.-X. Chen, M. Narayana, N. M. Upadhyaya, W. H. Peter, and Z.-X. Gong, 2003. Ectopic expression of the spike protein of Rice Ragged Stunt Oryzavirus in transgenic rice plants inhibits transmission of the virus to insects. Molecular Breeding 22(4) : 295-301.

54. Shikata, E. 1974 Rice black streaked dwarf virus. Descriptions of Plant Viruses. Association of Applied Biologist. No. 135
55. Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26:31-43.
56. Suparyono, J., L. A., Catindig, and P.Q. Cabauatan. Rice Ragged Stunt Virus (RRSV). http://www.knowledgebank.irri.org/RiceDoctor/Fact_Sheets/Diseases/Rice_Ragged_Stunt.htm
57. Upadhyaya, N. M., K. Ramm, J. A. Gellatly, Z. Li, W. Kositratana, and P. M. Waterhouse, 1997. Rice ragged stunt oryzavirus genome segments S7 and S10 encode non-structural proteins of M_r 68,025 (Pns7) and M_r 32,364 (Pns10). *Archives of Virology* 142, 1719–1726.
58. Upadhyaya, N. M., K. Ramm, J. A. Gellatly, Z. Li, W. Kositratana, P. M. Waterhouse. 1998 Rice ragged stunt oryzavirus genome segment S4 could encode an RNA dependent RNA polymerase and a second protein of unknown function. *Archives of Virology* 143: 1815-1822
59. Upadhyaya, M. N., M. Yang, W. Kositratana, A Gosh, and P. M. Waterhouse, (1995). Molecular analysis of rice ragged stunt oryzavirus segment S9 and sequence conservation among isolates from Thailand and India. *Archives of Virology* 140, 1945-1956.
60. Upadhyaya, N. M., E. Zinkowsky, L. Zhongyi, W. Kositratana, and P. M. Waterhouse, 1996. The Mr 43 k Major capsid protein of rice ragged stunt oryzavirus is a post-translational processed product of a Mr 67, 348 polypeptide encoded by genome segment 8. *Archives of Virology* 141 : 1689-1701.
61. Venable, J. H. and R. Coggeshall, 1965. A Simplified Lead Citrate Stain for Use in Electron Microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 25:407-408.
62. Velusamy, Balasubramanian & Subba Rao, *Int. Rice Res. Newsl.* 4(1): 4, 1979. In R. G. Milne, G. Boccardo, and K. C. Ling. 1982 ใน Rice ragged stunt virus. Descriptions of Plant Viruses. Association of Applied Biologist. No. 248

63. Weerapat, P., and S. Pongprasert, 1978. Ragged stunt disease in Thailand. *Int. Rice Res. Newsl.* 3(1):11-12.
64. Yan, J., H. Dudo, I. Uyeda, , S. Y. Lee, and E. Shikata, 1992. Conserved terminal sequences of rice ragged stunt virus genome RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 785-789.