รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

กายวิภาคในการก่อโรคข้าวใบหงิกและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
ของ *Rice ragged stunt virus*

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

โดย

อุทัย รุ่งเรืองศรี นลินี รุ่งเรืองศรี แสงทอง พงษ์เจริญกิต

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	ฑ
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* ด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์ค่ายบางระจัน 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 การเปลี่ยนแปลงผลผลิตข้าวในประเทศที่เป็นแหล่งสำคัญของการปลูกข้าวในเอเชียในช่วงปี ค.ศ. 1950 – 2000 โดย Otsuka, (2005) 1

ภาพที่ 2 เส้นทางเก็บสำรวจตัวอย่างต้นข้าวจากนาในภาคกลาง 25 แหล่ง เมื่อปีพ.ศ.2548 17

ภาพที่ 3 ชิ้นดีเอ็นเอที่จะเชื่อมต่อกับ TOPO vector ต้องมีปลาย3’ A overhang 19

ภาพที่ 4 พลาสมิด pCR®4-TOPO® และ cloning site 20

ภาพที่ 5 เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล(*Nilaparvata lugen* Stål) จากนาข้าวของเกษตรกรตำบลบ้านกลับ อำเภอค่ายบางระจัน จังหวัดสิงห์บุรีต่างระยะเจริญได้แก่ กลุ่มไข่ กลุ่มเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เจริญบนต้นข้าว และตัวแก่ พร้อมกับการเพาะเลี้ยงด้วยต้นกล้าข้าว 26

ภาพที่ 6 ต้นข้าวแสดงอาการโรคใบหงิกเมื่อติดเชื้อโรคขณะต้นข้าวเติบโตเมื่ออายุต่างกัน A, เป็นต้นข้าวปกติ B, และ C เป็นต้นข้าวติดเชื้อที่ได้จากการสำรวจโรค D-F อาการของโรคที่เกิดกับข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN-1) ที่ปลูกในกระถางและถ่ายทอดเชื้อโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์บ้านกลับที่ได้รับเชื้อจากต้นที่เป็นโรคมาแล้ว 30 วัน โดย D เป็นต้นข้าวที่ปล่อยแมลงติดเชื้อหลังระยะย่างปล้อง E และ F ต้นข้าวเป็นโรคเมื่อปล่อยแมลงติดเชื้อเข้าดูดกินในระยะแตกกอ และและระยะกล้า นาน 3 วันก่อนกำจัดแมลง ต้นข้าวที่ปล่อยแมลงที่ไม่มีเชื้อโรคจะไม่แสดงอาการโรค (ไม่แสดงในภาพ) 27

ภาพที่ 7 ภาพเปรียบเทียบให้เห็นการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ TN 1 ขณะมีอายุเท่ากัน ซ้ายมือเป็นกอปกติ ขวามือเป็นกอที่มีการติดเชื้อหลังระยะแตกกอ ต้นข้าวที่ติดเชื้อมีการเจริญเติบโตและการตกรวงที่ช้ากว่า 28

ภาพที่ 8 อาการทั่วไปของต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกได้แก่ปลายใบบิดม้วนงอไม่มีการคลี่ของใบ ชายขอบใบด้านใดด้านหนึ่งมีแถบสีขาว ด้านในของแถบมีสีเขียวอ่อนและจะเข้มขึ้นเมื่อใกล้เส้นกลางใบ มีรอยขาดตามขวางที่ชายขอบใบทำให้ใบเป็นรอยหยักคล้ายฟันเลื่อย ผิวใบไม่เรียบเส้นใบโป่ง ใบจะบิดม้วนงอ ปลายใบบิดม้วนงอเป็นเกลียว 29

ภาพที่ 9_ ลักษณะของรวงข้าวและเมล็ดข้าวของต้นข้าวพันธุ์ TN 1 ที่เป็นโรค A ปลายใบบิด ใบธงบิด ม้วนเป็นเกลียวแน่น, B เมล็ดข้าวลีบและด่าง และ C รวงข้าวไม่สมบูรณ์เมล็ดเสียหาย D เปรียบเทียบระหว่างเมล็ดและรวงข้าวที่สมบูรณ์(ซ้าย) กับเมล็ดและรวงข้าวจากต้นเป็นโรค(ขวา) 29

ภาพที่ 10 แสดงความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวแต่ละกลุ่มการทดลองหลังการปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำ ตาลที่มีเชื้อ *RRSV* เข้าดูดกินนาน 24 ชั่วโมง จำนวนแมลงพาหะ 5 ตัวต่อต้น สังเกตอาการหลังการปล่อยเชื้อ 30 วัน 32

ภาพที่ 11_ แสดงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบหงิกกับระยะเวลาในการดูดกินเพื่อปล่อยเชื้อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 33

ภาพที่ 12 ระยะเวลาการเข้าดูดกินเพื่อรับเชื้อ *RRSV* ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแมลงพาหะที่สามารถทำให้ต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 เกิดโรคโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 34

ภาพที่ 13 ปริมาณอาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) สกัดจากตัวอย่างข้าวที่ถูกดูดกินนาน 24 ชั่วโมง โดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลต่างกลุ่ม คือ H แมลงพาหะดูดน้ำเลี้ยงจากข้าวไม่เป็นโรคนาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปดูดกินข้าวทดลอง : เลนที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นผลได้จากตัวอย่างข้าวที่ดูดกินด้วยแมลงที่มีประวัติการดูดกินต้นข้าวเป็นโรคใบหงิกนาน 1, 3, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาปล่อยเชื้อ 35

ภาพที่ 14 ปริมาณอาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) ที่สกัดจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ดูดกินต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกเพื่อรับเชื้อ *RRSV* ในระยะเวลาต่างกัน : H แมลงไม่ได้รับเชื้อโรคไวรัส เลนที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เป็นตัวอย่างอาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) จากแมลงพาหะที่ดูดกินเพื่อรับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 15, 30, 45, 90 นาที 36

และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ

ภาพที่ 15 ผลของการสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่าง อาร์เอ็นเอมวลรวม (total RNA) จากตัวอย่างข้าว เมื่อใช้ RNA templateต่างความเข้มข้น และไพรเมอร์ S5, S6 และ S8 ได้แก่ ไพรเมอร์คู่ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ 37

ภาพที่ 16 การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรัส *RRSV* โดย ใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5) และคู่ที่ 3 (S8) กับอาร์เอนเอจากต้นข้าวถูก แมลงพาหะที่ติดเชื้อเข้าดูดกินเพื่อปล่อยเชื้อโรคนาน 48 ชั่วโมง: M, marker , เลนที่ 1 ; ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (S5) กับแม่แบบเจือจาง 1/500 จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ และเลนที่ 2 ; ไพรเมอร์คู่ที่ 3 (S8) กับแม่แบบเจือจาง 1/500 จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 38

ภาพที่ 17_ การสังเคราะห์และการเพิ่มปริมาณ cDNA จากตัวอย่าง อาร์เอ็นเอมวลรวม จากตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยที่แม่แบบ มีความเข้มข้นต่างกัน : S5, S6 และ S8 คือ ไพรเมอร์คู่ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ 39

ภาพที่ 19_ การตรวจพบเชื้อ RRSV จากตัวอย่างข้าวที่เก็บจากนาในเขตภาคกลาง. เห็นได้จากแถบดีเอนเอจากปฏิกิริยา 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 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 40

ภาพที่ 20 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิด: M- High DNA Mass Ladder 1-10 kb (Invitrogen), 1-2 ตัวอย่างจากศูนย์ศิลปาชีพ อ.บางไทร อยุธยา: 3-4 อ. บางปะอิน อยุธยา, 5-6 อ. เมือง อ่างทอง, 7-8 ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง สุพรรณบุรี, 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. ลาดบัวหลวง (1) อยุธยา, 5- 6 อ. ลาดบัวหลวง (2) อยุธยา, 7-8 ต.เนินพระปรางค์ อ.สองพี่น้อง สุพรรณบุรี, 9-10 ต. ดอนกำ อ. สรรคบุรี ชัยนาท, 11 อ. สามโคก ปทุมธานี 7-8 ต.เนินพระปรางค์ อ.สองพี่น้อง สุพรรณบุรี, 9-10 ต. ดอนกำ 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 อยุธยา, 5-6 จาก อ. อ. ลาดบัวหลวง อยุธยา 45

ภาพที่ 23 *Eco*RI digestion พลาสมิด M-marker 100 bp; ตัวอย่าง 1,2,7,8 จากศูนย์ศิลปาชีพ อ. บางไทร อยุธยา; 3,4, 9,10 จากวัดบ่อทอง อ.บางปะอิน อยุธยา; 5,6,11,12 จากอ.เมือง อ่างทอง 45 45

ภาพที่ 24 *Eco*RI 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 อ.ลาดบัวหลวง จ. อยุธยา 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 T_3 primer + specific sense strand primer; 8 เป็นผลของ T_7 primer + specific sense strand primer; 9 เป็นผลของ M13Fwd +specific antisense strand primer; 10 ผลของ M13Rev +specific antisense strand primer; 11เป็นผลของ T_3 primer +specific antisense strand primer;12 ผลของ T_7+specific antisense strand primer 46

ภาพที่ 26 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มีinsertประมาณ700 bp 47

จากศูนย์ศิลปาชีพ อ. บางไทร จ. อยุธยา คำอธิบายภาพเช่น
เดียวกับภาพที่ 24
ภาพที่ 27 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insert ประมาณ700 bp 47
จาก ต.รั้วใหญ่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี คำอธิบายภาพเช่น
เดียวกับภาพที่ 24
ภาพที่ 28 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insertประมาณ70 bp 47
จาก อ.สองพี่น้อง จ. สุพรรณบุรี คำอธิบายภาพเช่น
เดียวกับภาพที่ 24
ภาพที่ 29 ผลปฏิกิริยาPCR กับพลาสมิดที่มี insertประมาณ 700 bp 48
จาก ต. ดอนกำ อ. สรรคบุรี จ.ชัยนาท คำอธิบายภาพเช่น
เดียวกับภาพที่ 24
ภาพที่ 30 ตำแหน่งการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอหรือ insert ในพลาสมิด 48
R คือตำแหน่งของ reverse primer และ F เป็นตำแหน่งของ
forward primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR
ภาพที่ 31 Distance tree ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนา 53
การ แสดงค่าความยาวของ branch และ bootstrap values
ตัวอย่างคือส่วนหนึ่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของ RRSV
เส้นที่ 8 จากลาดบัวหลวง จ.อยุธยา(8), บางไทร จ.อยุธย (10),
รั้วใหญ่ จ.สุพรรณบุรี (13), สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี (15) และ
ดอนกำ อ. สรรคบุรี จ.ชัยนาท (21) เปรียบเทียบกับลำดับ NC
และ AF จาก database ของ NCBI
ภาพที่ 32 จีโนมเส้นที่ 8 ของ *RRSV* และช่วงรหัสพันธุกรรมที่ใช้ 54
จัดเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ
ภาพที่ 33 เนื้อเยื่อส่วนยอดของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร 55
ย้อม methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า
ภาพที่ 34 เนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร 55
ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า
ภาพที่ 35 เนื้อเยื่อส่วนยอดของต้นกล้าข้าวปกติ ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร 56
ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า

ภาพที่ 36 เนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวติดเชื้อ ตัวอย่างตัดหนา 15 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า 56
ภาพที่ 37 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blueกำลังขยาย 400 เท่า 57
ภาพที่ 38 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blueกำลังขยาย 400 เท่า 57
ภาพที่ 39 เนื้อเยื่อใบข้าวติดเชื้อโรคใบหงิก ตัวอย่างตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 1,000 เท่า 58
ภาพที่ 40 เนื้อเยื่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 200 เท่า 58
ภาพที่ 41 เนื้อเยื่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า 59
ภาพที่ 42 เนื้อเยื่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า 59
ภาพที่ 43 เนื้อเยื่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิก ตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า 60
ภาพที่ 44 เนื้อเยื่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อโรคใบหงิกตัดหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย methylene blue กำลังขยาย 400 เท่า 60
ภาพที่ 45 อนุภาคต่างขนาดที่ทึบอิเล็คตรอนขนาดประมาณ 30 - 75 นาโนเมตร ที่พบในน้ำคั้นของใบและกาบใบข้าวที่แสดงอาการโรคใบหงิกหลังจาก ตรึงด้วย Karnovsky's fixative ย้อมด้วย 2% phosphotungstic acid ขยาย 60,000 เท่าที่ accelerating voltage 100KV 62
ภาพที่ 46 อนุภาคทึบอิเล็คตรอนต่างขนาด 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 กลุ่มอนุภาคทึบอิเล็คตรอนพบในน้ำคั้นจากใบและกาบใบข้าวที่แสดง อาการโรคใบหงิก หลังจากตรึงด้วย Karnovsky's fixative ย้อมด้วย 2% phosphotunstic acid A อนุภาคอยู่รวมกันหนาแน่นเหมือนอยู่ในถุง 63

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 ขยาย15000 เท่า ลูกศรชี้แสดงกลุ่มอนุภาคไวรัสเป็นกลุ่มก้อนในเยื่อหุ้ม 63

ภาพที่ 49 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 75 นาโนเมตรเรียงต่อกันในเซลล์ใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อตัดบาง 80 นาโนเมตร ย้อมด้วยยูเรนีล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องขยาย 50,000 เท่า ด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV 64

ภาพที่ 50 อนุภาคของ RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 65 นาโนเมตร พบอยู่กระจายทั่วไปในเซลล์ของข้าวพันธุ์ TN-1 เมื่อตัดบาง 80 นาโนเมตร ย้อมด้วยยูเรนีล อะซีเตท และ เลด ซิเตรท ส่องด้วยกำลัง accelerating voltage 100 KV ขยาย 40,000 เท่า 64

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

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

ภาพที่ 53 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 60 - 70 นาโนเมตร แต่ละอนุภาคทึบอิเล็คตรอนได้ไม่เท่ากัน พบเป็นกลุ่มหนาแน่นอยู่เป็นบางจุดในไซโตพลาสซึมโดยเฉพาะส่วนใกล้ผนังเซลล์ ขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV 66

ภาพที่ 54 กลุ่มอนุภาค RRSV ที่ทึบอิเล็คตรอนไม่เท่ากันขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 60 - 75 นาโนเมตร อยู่เป็นกลุ่มอัดแน่นใกล้ผนังเซลล์ กำลังขยาย 80,000 เท่า 66

ภาพที่ 55 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80 นาโนเมตร 67

ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ข้าว ภาพขยาย 40,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV

ภาพที่ 56 กลุ่มอนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75นาโนเมตรอยู่อัดแน่น ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ข้าว ด้านข้างมีไมโครไฟเบอร์เหมือนยึดประสานกับผนังเซลล์ภาพขยาย 40,000 เท่า ที่กำลัง acceleration voltage 100 KV 67

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

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

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

ภาพที่ 60 อนุภาคขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร มีทั้งอยู่ทั่วไปและอยู่เป็นกลุ่มอัดแน่นในเซลล์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ลูกศรชี้) 69

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

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

ภาพที่ 63 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45 นาโนเมตร กระจายหนาแน่นอยู่ในเซ็ลล์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 71

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

ภาพที่ 65 อนุภาคของ RRSV ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางราว 45 นาโนเมตร กระจายอยู่ในเซ็ลล์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบได้แม้ภายในและโดยรอบไมโตคอนเดรีย ตัวอย่างตัดบาง 80 นาโนเมตรส่องขยาย 80,000 เท่าด้วยกำลัง accelerating voltage ขนาด 100 KV 72

ภาพที่ 66 อนุภาคของ RRSV (เช่นในวงกลม) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 60 นาโนเมตรพบแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 72

ภาพที่ 67 อนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราว 40 - 50 นาโนเมตรพบทั้งที่อยู่ภายใน และที่กระจายอยู่ในกล้ามเนื้อของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลภาพขยาย 80,000 เท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV 73

ภาพที่ 68 อนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75 นาโนเมตร ในเนื้อยื่อของพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าเท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV 73

ภาพที่ 69 อนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 60 นาโนเมตร เรียงตัวอยู่ในโครงร่างแบบฝักถั่วพบในเนื้อยื่อของพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าเท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV 74

ภาพที่ 70 อนุภาค RRSV ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกันประมาณ 30 - 60 นาโนเมตร พบในเนื้อยื่อของพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าเท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV 74

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

ภาพที่ 72 อนุภาค RRSV ขนาดต่างกันพบในเนื้อยื่อของพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นพาหะของโรคใบหงิก กำลังขยาย 80,000 เท่าเท่าที่กำลัง accelerating voltage 100 KV 75

กายวิภาคในการก่อโรคข้าวใบหงิกและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Rice ragged stunt virus*

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

อุทัย รุ่งเรืองศรี นลินี รุ่งเรืองศรี แสงทอง พงษ์เจริญกิต

U-TAI ROONGRUANGSREE**, NALINEE ROONGRUANGSREE*

AND SAENGTONG PONGJAROENKIT*

**ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร *ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

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

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

ABTRACT

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

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