เทคนิค RT-PCR เพื่อการตรวจไวรัสโรคเขียวเตี้ยและโรคใบหงิก ในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และการติดตามการแพร่กระจายเชื้อไวรัสในข้าวเป็นโรค

RT-PCR Technique for Detection of *Rice Grassy Stunt Virus* and *Rice Ragged Stunt Virus* in Brown Planthopper and Virus Distribution in Infected Rice

คนึงนิจ ศรีวิลัย[1)2)] วิชชุดา รัตนากาญจน์[3)]

Kanuengnij Srivirai[1)2)] Witchuda Rattanakarn[3)]

Abstract

The application of PCR (polymerase chain reaction) has been widely used to detect the presence of virus using primers. The advantage of this technique, a specific primer can be directly designed for a target DNA with more accurate than antiserum method. This study aims to optimize RT-PCR technique with primers for detecting rice viruses, *Rice grassy stunt virus* (RGSV) and *Rice ragged stunt virus* (RRSV) in brown planthoppers (*Nilaparvata lugens* (Stål)) to estimate the proportion of viruliferous insects and monitor the virus distribution in the diseased plants. The target is to provide appropriate suggestion on sampling and selection of inoculum sources. The research was carried out at Department of Pathology, Faculty of Agriculture and the Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom province during July 2019 to October 2020. The results showed that brown planthoppers after 8 days of exposure to the virus were 80% infected by detecting RGSV and RRSV with pc5 and S8 genes, respectively. After insect transmission, RGSV spread from the stem infection site to the uppermost leaf and root within ten-days post-inoculation (dpi). At 10-21 dpi, the pc1 gene was detected in the tillers (93.8%) and uppermost leaf (100%) more than the pc5 gene detection. At 14-21 dpi, RGSV was detected in new tillers and uppermost leaf, 64.3-75.0%. At 28-60 dpi when plants showed excessive tillering with yellowing, the virus detection rate increased to 85.7-100%. RRSV spread from the stem infection site to the uppermost leaf and root within ten-days post-inoculation (dpi). At 10-28 dpi, S4 gene was detected in stem (87.5%) and leaf (93.8%), more than S8 gene detection. The RRSV accumulation in ragged top leaves were detected by 100% at 14-60 dpi, while asymptomatic top leaves were detected by 100% at 35-60 dpi. The results suggested that the applied RT-PCR technique was effective in detecting the virus precisely in rice with the excessive tillering or ragged leaf symptoms. 35-60 days after exposure to the virus and appropriate for use as a source of virus for transmission by insect vectors.

Keywords: RT-PCR technique, rice virus disease, *rice grassy stunt virus* (RGSV), *rice ragged stunt virus* (RRSV), insect virus transmission, brown planthopper, viruliferous insects, inoculum source

---

[1)] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โทรศัพท์ 0-3435-1890
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus Tel. 0-3435-1890

[2)] ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000 โทรศัพท์ 0-4271-1471
Sakon Nakhon Rice Research Center, Mueang, Sakon Nakhon 47000 Tel. 0-4271-1471

[3)] ข้าราชการบำนาญ กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
Retired Government Official, Division of Rice Research and Development, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) นิยมใช้ตรวจไวรัสอย่างแพร่หลายโดยใช้ไพรเมอร์ ข้อดีคือ สามารถออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตรง และมีความแม่นยำกว่าการใช้แอนติซีรัม งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสมตรวจไวรัสเขียวเตี้ย (RGSV) และไวรัสใบหงิก (RRSV) ในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål)) เพื่อประเมินสัดส่วนแมลงอมโรค และติดตามการแพร่กระจายของไวรัสในต้นข้าวเป็นโรค เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการสุ่มตรวจโรค และเลือกต้นข้าวที่เป็นแหล่งของโรค (inoculum source) ดำเนินการที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2562 ถึงตุลาคม 2563 พบว่า เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับไวรัสแล้ว 8 วัน จะเป็นแมลงอมโรค 80 เปอร์เซ็นต์ โดยการตรวจเชื้อ RGSV และ RRSV ด้วยยีน pc5 และ S8 ตามลำดับ ต้นข้าวหลังได้รับการถ่ายทอดเชื้อ RGSV ไวรัสจะแพร่กระจายจากต้นไปยังยอดและราก ภายใน 10 วัน ช่วง 10-21 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ตรวจพบยีน pc1 ที่ลำต้น (93.8 เปอร์เซ็นต์) และใบยอด (100 เปอร์เซ็นต์) โดยตรวจพบมากกว่ายีน pc5 ช่วง 14-21 วัน พบไวรัสสะสมที่กอข้าวใหม่และใบยอด 64.3-75.0 เปอร์เซ็นต์ ช่วง 28-60 วัน เมื่อข้าวแตกกอชัดเจนร่วมกับใบเหลือง ตรวจพบไวรัส 85.7-100 เปอร์เซ็นต์ ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อ RRSV ไวรัสแพร่กระจายจากต้นไปใบยอด และราก ภายใน 10 วัน ช่วง 10-28 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ตรวจพบยีน S4 ที่ลำต้น (87.5 เปอร์เซ็นต์) และใบยอด (93.8 เปอร์เซ็นต์) โดยตรวจพบมากกว่ายีน S8 ในช่วง 14-60 วัน ตรวจพบเชื้อ RRSV ในใบยอดที่แสดงอาการ 100 เปอร์เซ็นต์ ช่วง 35-60 วัน ตรวจพบไวรัสในใบยอดที่ไม่แสดงอาการ 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้พบว่า เทคนิค RT-PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจหาไวรัสโรคเขียวเตี้ยในต้นข้าวที่แสดงอาการแตกกอร่วมกับใบเหลือง และโรคใบหงิกที่แสดงอาการใบยอดหงิกได้แม่นยำ ต้นข้าวที่ติดเชื้อ 35-60 วัน เหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งของไวรัสเพื่อใช้ถ่ายทอดโรคด้วยแมลงพาหะ

คำสำคัญ: เทคนิค RT-PCR ไวรัสโรคข้าว ไวรัสโรคเขียวเตี้ย ไวรัสโรคใบหงิก การถ่ายทอดไวรัสโดยแมลง เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แมลงอมโรค แหล่งของโรค

คำนำ

ไวรัสสาเหตุโรคข้าวในประเทศไทยที่มีความสำคัญมี 2 ชนิด ได้แก่ ไวรัสโรคเขียวเตี้ย (*Rice grassy stunt virus* (RGSV)) และไวรัสโรคใบหงิก (*Rice ragged stunt virus* (RRSV)) ไวรัสทั้งสองมีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål)) เป็นแมลงพาหะนำโรค สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ตลอดชีวิตจากการดูดต้นข้าวที่เป็นโรคเพียงครั้งเดียว (Hibino, 1996) โรคข้าวดังกล่าวมักพบภายหลังการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวในแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ling, 1977) รวมทั้งประเทศไทย (Chettanachit *et al*., 1978) ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อ RRSV จะแสดงอาการ ประมาณ 14 วัน (Hibino and Kimura, 1982) ส่วนต้นข้าวที่ได้รับเชื้อ RGSV จะแสดงอาการประมาณ 7-14 วัน (วิชชุดา และคณะ, 2557)

เชื้อ RGSV สาเหตุโรคเขียวเตี้ย จัดอยู่ในสกุล *Tenuivirus* วงศ์ *Phenuiviridae* พบในประเทศไทย เมื่อ พ.ศ. 2509 (Wathanakul and Weerapat, 1969) ลักษณะอาการที่พบ ได้แก่ ต้นเตี้ย แตกกอใหม่มากกว่าปกติ ใบข้าวตั้งตรง ใบแคบและสั้น บางครั้งมีสีเหลืองซีด สีเขียวอ่อน หรือเหลืองส้ม ใบแก่มีจุดสีเหลืองหรือน้ำตาลเล็กๆ คล้ายสนิมกระจายทั่วใบ (Chen and Chiu, 1982; Hibino *et al*., 1985b; Ling, 1972; Shikata *et al*., 1980) ต้นข้าวที่อายุ 7-14 วัน หากได้รับเชื้อ RGSV จะแสดงอาการรุนแรงมาก และข้าวอาจตายภายใน 3-4 สัปดาห์ แต่ถ้าต้นข้าวรอดจากได้รับเชื้อ 28 วัน ข้าวจะแตกกอมากกว่าปกติ การแตกกอเพิ่มขึ้นสูงสุดและมีอาการรุนแรงหลังจาก 60 วันที่ได้รับเชื้อไวรัส (Satoh *et al*., 2013) ส่งผลให้ข้าวตั้งท้องแต่ไม่ออกรวง หรือออกรวงแต่เมล็ดลีบ ทำให้สูญเสียผลผลิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ข้าวที่ได้รับไวรัสเขียวเตี้ยเมื่ออายุ 30-45 วัน ผลผลิตสูญเสีย 70-100 เปอร์เซ็นต์ (Helina *et al.,* 2020; Palomar and Ling, 1968)

เชื้อ RRSV สาเหตุโรคใบหงิกข้าว จัดอยู่ในสกุล *Oryzavirus* วงศ์ *Reoviridae* พบในประเทศไทย เมื่อ พ.ศ. 2520 (Chettanachit *et al*., 1978) ลักษณะอาการที่พบได้แก่ ต้นเตี้ย ใบสั้น ใบและต้นสีเขียวเข้ม ปลายใบบิดเป็นเกลียว ขอบใบขาดแหว่ง หยักเป็นริ้วคล้ายฟันเลื่อย เส้นกลางใบและกาบใบบวมโป่งเป็นแนวยาว ใบธงสั้นผิดรูป (Hibino, 1989) แทงช่อดอกช้า รวงโผล่ไม่พ้นใบธง เมล็ดไม่เต็มเมล็ด หรือเมล็ดลีบ ผลผลิตของต้นที่เป็นโรคลดลง 34-83 เปอร์เซ็นต์ (ดารา และคณะ, 2533; Huang *et al*., 2015; Palmer *et al*., 1978)

การตรวจไวรัสด้วยวิธีทางเซรัมวิทยา เช่น เทคนิค dot immune binding assay (DIBA) และเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้จำนวนมาก ต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัดด้านความจำเพาะเจาะจง แอนติซีรัมบางตัวไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไวรัสภายในสกุลเดียวกันได้ หรือเกิดปฏิกิริยาร่วม (cross reaction) แอนติซีรัมต่อไวรัสใบหงิก ถูกผลิตขึ้นนานมาแล้ว (วิชชุดา และคณะ, 2549) และไม่พบแอนติซีรัมต่อไวรัสทั้งสองชนิดจำหน่ายเป็นการค้า จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้งาน

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction (PCR)) หรือเทคนิคพีซีอาร์ นิยมใช้ตรวจไวรัสกันอย่างแพร่หลายโดยใช้ไพรเมอร์ ข้อดีคือสามารถออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมายได้โดยตรง มีความแม่นยำมากกว่าการใช้แอนติซีรัม (Ichiki *et al*., 2013) ทวัช (2544) ใช้เทคนิค one step RT-PCR ตรวจยีน S4 ของเชื้อ RRSV ในลำต้น ใบ กาบใบ และรากข้าว และในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ไม่มีสต็อก cDNA สำหรับใช้เพิ่มปริมาณในอนาคต Suprihanto และคณะ (2015) ใช้เทคนิค two step RT-PCR ในการตรวจสอบยีน pc5 ของเชื้อ RGSV และยีน S8 ของเชื้อ RRSV ข้อดีของวิธีนี้ คือ มีความไวสูง อาจมีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิค one step RT-PCR และสามารถเก็บ cDNA ไว้เพื่อใช้เพิ่มปริมาณในอนาคตได้ Zheng และคณะ (2014) พบว่า เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับเชื้อ RGSV แล้ว 8-12 วัน ตรวจพบไวรัส 8-26 เปอร์เซ็นต์ ฐานัฏ และคณะ (2560) พบว่า สามารถตรวจพบไวรัสใบหงิกในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลวัย 1-5 หลังจากรับเชื้อไปแล้ว 3 วัน เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสามารถถ่ายทอดไวรัสใบหงิกต้องได้รับไวรัส อย่างน้อย 5 วัน (Huang *et al*., 2015)

ในกระบวนการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานไวรัสโดยกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ ได้แก่ 1) ระยะเวลาที่แมลงดูดรับไวรัสจากต้นข้าวเป็นโรค (acquisition period) 2) ระยะแฝงและระยะฟักตัวของไวรัสในแมลง (latent period and incubation period) และ 3) ระยะเวลาการถ่ายทอดไวรัส (incubation period) ซึ่งสัดส่วนของแมลงอมโรค ระยะเวลาฟักตัวของไวรัสในแมลง ที่มีผลต่อประสิทธิผลของการถ่ายทอดไวรัสในแต่ละครั้ง (Huang *et al.,* 2015; IRRI, 1968; Zhang *et al*., 2013)

ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสเขียวเตี้ยจะแสดงอาการภายใน 7-14 วัน (วิชชุดา และคณะ, 2557; Hibino *et al*., 1985a) และต้นข้าวที่ได้รับไวรัสใบหงิก แสดงอาการภายใน 14 วัน (Hibino and Kimura, 1982) ซึ่งช่วงเวลานี้ต้นข้าวที่ยังไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการไม่ชัดเจน สามารถเป็นแหล่งของไวรัสได้แต่ไม่เหมาะสม สำหรับเตรียมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอมโรค การคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานไวรัส วิธีการถ่ายทอดไวรัสที่มีประสิทธิภาพสูง ตัวแปรที่สำคัญ คือ สัดส่วนของแมลงอมโรคที่ปล่อยถ่ายทอดโรค และปริมาณไวรัส (virus filter) ในต้นข้าวเป็นโรค จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายทอดไวรัสได้ (Li *et al*., 2014)

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการตรวจไวรัสเขียวเตี้ยและไวรัสใบหงิกในแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และต้นข้าวที่เป็นโรค ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่มีความแม่นยำ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรค เพื่อใช้คัดเลือกต้นข้าวเป็นโรค และใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการถ่ายทอดโรคข้าว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ข้าวและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ใช้ทดลอง

ใช้ข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 (TN1) ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อไวรัสโรคเขียวเตี้ย (RGSV) และไวรัสโรคใบหงิก (RRSV) เตรียมต้นกล้า TN1 โดยปลูกในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิ 28-35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 55-75 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาความสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ใช้ทดลอง ได้รับความอนุเคราะห์จากกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว เป็น

ประชากรแมลงจากจังหวัดปทุมธานี โดยเก็บรวบรวมในเดือนสิงหาคม 2560 และนำมาเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลง ในสภาพโรงเรือน ที่อุณหภูมิ 28-35 องศาเซลเซียส เลี้ยงขยายพันธุ์อย่างน้อย 2-3 รุ่น เพื่อให้ได้ประชากรแมลงที่ปลอดไวรัส (virus free insect)

2. สายพันธุ์ไวรัสและการเตรียมต้นข้าวที่เป็นแหล่งของไวรัส

ต้นข้าวที่เป็นโรคเขียวเตี้ย เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดปราจีนบุรี เมื่อ พ.ศ. 2560 ต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิก เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดลพบุรี เมื่อ พ.ศ. 2560 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานโรคข้าว กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ปลูกเพิ่มขยายต้นข้าวเป็นโรคทั้งสองชนิดไว้บนข้าว TN1 จากนั้นตรวจยืนยันชนิดเชื้อ RGSV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยไพรเมอร์ RGSV-P1/P2 ที่จำเพาะต่อยีน pc5 ที่แปลรหัสเป็นโปรตีนนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid protein: NCP) (Toriyama *et al*., 1997) และตรวจยืนยันชนิดเชื้อ RRSV โดยไพรเมอร์ S8U1374/S8E ที่จำเพาะต่อยีน S8 แปลรหัสเป็นโปรตีนเมเจอร์แคปซิด (major outer-capsid protein: CP) (Pattayawat *et al.,* 2004) ส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท Macrogen Inc. (โซล เกาหลีใต้) นำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสแต่ละตำแหน่งกับจีโนมอ้างอิงด้วยวิธี ClustalW หาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนลำดับเบส ด้วยโปรแกรม BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

ต้นข้าว TN1 ที่ตรวจพบไวรัส นำมาใช้เป็นแหล่งไวรัส (inoculum source) ในการเพิ่มปริมาณต้นข้าวเป็นโรค โดยปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล วัย 2-3 ที่ปลอดโรค ไม่น้อยกว่า 100 ตัว ให้ดูดกินต้นข้าวเป็นโรค เป็นเวลา 12 วัน (acquisition period) เพื่อเตรียมแมลงอมโรค (viruliferous insect) จากนั้นนำไปปล่อยบนต้นกล้าข้าว TN1 ที่มีใบจริง 2 ใบ เป็นเวลา 2 วัน เพื่อถ่ายทอดโรค และเก็บต้นข้าวไว้ในกรงปลอดแมลง เพื่อดูอาการ 30 วัน แยกต้นเป็นโรคไปปลูกในกระถาง เส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว และเก็บต้นเป็นโรคให้พัฒนาอาการจนถึง 60 วัน ตรวจสอบไวรัสในต้นข้าวเป็นโรค ด้วยวิธี RT-PCR ก่อนนำใช้ในการทดลองต่อไป

3. การตรวจไวรัสในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ด้วยเทคนิค RT-PCR

ปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลวัย 2-3 ที่ปลอดโรค ประมาณ 500 ตัว บนต้นข้าวเป็นโรคหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อมาแล้ว 60 วัน เป็นเวลา 8 วัน เพื่อให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงและได้รับเชื้อไวรัส จากนั้นสุ่มแมลงจำนวน 5 ตัว นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ แยกสกัดทีละตัว ด้วยน้ำยา Trizol (Invitrogen, USA) ตามวิธีการในคู่มือจากบริษัท วัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ และความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ ReverTra Ace qPCR RT Master Mix ผสมกับ gDNA Remover Kit (ToYoBo, Japan) ตามวิธีการในคู่มือจากบริษัท และปรับความเข้มข้นเป็น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับตรวจไวรัส RGSV

การศึกษาครั้งนี้ การตรวจไวรัสเขียวเตี้ยโดยใช้ไพรเมอร์ RGSV-p5-F/R ที่จำเพาะต่อยีน p5 ไพรเมอร์ RGSV-pc1-F/R ที่จำเพาะต่อยีน pc1 และไพรเมอร์ RGSV-NCP-F1/R ที่จำเพาะต่อยีน pc5 (Suprihanto *et al*., 2015) การตรวจไวรัสใบหงิกโดยไพรเมอร์ S8U1374/S8E3 (Pattayawat *et al*., 2004) ที่จำเพาะต่อยีน S8 ไพรเมอร์ RRSV-S3_F/R (Hoang *et al.,* 2011) ที่จำเพาะต่อยีน S3 และไพรเมอร์ RRSV-S9_F/R (Hoang *et al*., 2011) ที่จำเพาะต่อยีน S9 ใช้ไพรเมอร์ 18S rRNA-F/R ที่จำเพาะต่อยีน 18S rRNA (Huang *et al*., 2015) ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Table 1)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วย PCR SuperMix (Invitrogen, USA) ตามคู่มือของบริษัท เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่มีสภาวะ pre-denaturation (94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ) denaturation (94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที จำนวน 35 รอบ) annealing (55-59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที จำนวน 35 รอบ) extension (72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-60 วินาที จำนวน 35 รอบ) และ final extension (72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ) เมื่อได้ผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และย้อมเจลด้วยเอธิเดียม

โบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Gens Flash, Syngene bioimaging)

4. การติดตามการแพร่กระจายของไวรัสในต้นข้าวที่เป็นโรค

4.1 การถ่ายทอดไวรัสให้ต้นข้าว เตรียมข้าว TN1 ที่มีใบจริง 2 ใบ จำนวน 25 ต้นต่อชนิดไวรัส ปลูกในแก้วพลาสติก จากนั้นนำแก้วพลาสติกขนาดเล็กที่ตัดก้นแก้วออกมาครอบต้นข้าวทดสอบ โดยให้ใบข้าวโผล่พ้นแก้วพลาสติกที่ครอบ ใช้สำลีอุดไว้เพื่อกันระหว่างต้นข้าวกับใบข้าว (Fig. 1) ในขณะเดียวกันเตรียมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอมโรคเพื่อถ่ายทอดไวรัสให้กับต้นข้าว ตามวิธีการข้างต้น โดยปล่อยแมลงปลอดโรค ตัวอ่อนวัย 2-3 ให้ดูดกินต้นข้าวเป็นโรค เป็นเวลา 12 วัน นำแมลงอมโรคมาปล่อยบริเวณลำต้นข้าวที่มีใบจริง 2 ใบ เฉลี่ย 10 ตัวต่อต้น เป็นเวลา 2 วัน แล้วกำจัดแมลง

4.2 ตัวอย่างข้าวสำหรับตรวจไวรัส สุ่มเก็บต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสเขียวเตี้ยที่ระยะ 10 14 18 และ 21 วัน ส่วนต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิก สุ่มที่ระยะ 10 14 21 และ 28 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส โดยสุ่มช่วงเวลาละ 4 ต้น พร้อมกับเก็บตัวอย่างต้นข้าวที่ไม่ได้ถ่ายทอดไวรัส หรือต้นข้าวปกติ ช่วงเวลาละ 1 ต้น นำต้นข้าวมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด แยกออกเป็นส่วนต้น ราก และใบยอด เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอด้วยน้ำยา Trizol (Invitrogen, USA) ตามวิธีการในคู่มือจากบริษัท วัดความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และปรับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอสำหรับใช้งานให้ได้ 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ ReverTra Ace qPCR RT Master Mix ผสมกับ gDNA Remover Kit (ToYoBo, Japan) ทำตามวิธีการในคู่มือจากบริษัท

4.3 การตรวจไวรัสในต้นข้าวด้วยเทคนิค RT-PCR ตรวจไวรัสเขียวเตี้ย โดยใช้ไพรเมอร์ RGSV-pc1-F/R ที่จำเพาะต่อยีน pc1 และไพรเมอร์ RGSV-P1/P2 จำเพาะต่อยีน pc5 ส่วนการตรวจไวรัสใบหงิก ใช้ไพรเมอร์ RRSV-S4F/R (Wijarat, 2001) ที่จำเพาะต่อยีน S4 และไพรเมอร์ S8U1374/S8E3 ที่จำเพาะต่อยีน S8 (major outer protein) (Pattayawat *et al*., 2004) ใช้ไพรเมอร์ Actin-F/R (Yang *et al.,* 2017) สำหรับเพิ่มปริมาณยีน actin ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Table 1) เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ และตรวจสอบขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

5. การศึกษาการสะสมไวรัสในต้นข้าวเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค

เตรียมต้นกล้าข้าว TN1 ที่มีใบจริง 2 ใบ ใช้ต้นข้าวจำนวน 40 ต้นต่อชนิดไวรัส ในขณะเดียวกันเตรียมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอมโรคแต่ละชนิด และทำการถ่ายทอดไวรัส เมื่อต้นข้าวที่ได้รับเชื้อไวรัสเริ่มแตกกอ ที่ 14 21 28 35 และ 60 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส สุ่มเก็บตัวอย่างข้าว

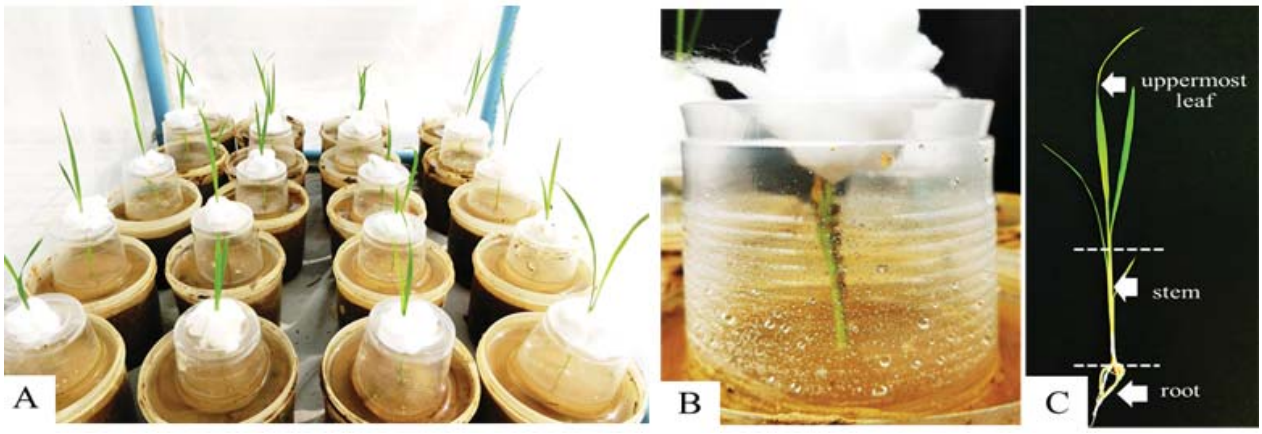

Fig. 1 Virus transmission of rice plant by feeding viruliferous *N. lugens* on rice stem. (A) Two leaves stage of rice seedlings grown in plastic glasses, (B) feeding of 10 viruliferous *N. lugens* on stem for 2 days. (C) Plant parts including uppermost leaf, stem and root were used for monitoring virus distribution in rice plants by RT-PCR technique

Table 1 List of primer pairs used to amplify viral genes in this study

Name of primer	Sequence (5´ -->3´)	Gene	Fragment (bp)	Tm (ºC)	Reference
Actin-F/R	F: ATCACACCTTCTACAACGAGCT	actin	558	57	Yang *et al.* (2017)
	R: CCGCAGCTTCCATTCCTATG				
18S rRNA-F/R	F: CGCTACTACCGATTG AA	18S rRNA	150	55	Huang *et al.* (2015)
	R: GGAAACCTTGTTACGACTT				
RRSV-S3-F/R	F: GTAACTGGTTCTGCCCCGCC	S3	825	59	Hoang *et al.* (2011)
	R: TCGCATTAAAGAATTGCCCTC				
RRSV-S4-F/R	F: ATGCCTAGCGTTCGAGCCTC	S4	970	59	Wijarat (2001)
	R: CGGCGATGAATTGTTGATTG				
S8U1374/S8E3	F: AGTGGCCCGCCGTATCTAAC	S8	540	59	Pattayawat *et al.* (2004)
	R: GCACCCATTCTATCTCTGCC				
RRSV-S9-F/R	F: GCCTTTGCCAGAGATCCTTTTACA	S9	1,110	59	Hoang *et al.* (2011)
	R: GCACCATGGTCTCGCAGTTTTC				
RGSV-P1/P2	P1: ACTAGTCGACACACAAAGTC	pc5	1,100	59	Toriyama *et al.* (1997)
	P2: CTGAACAGCCTAACTGGCGC				
RGSV-NCP-F1/R	F: GGCTTATGATAGTCTGTGATTTG	pc5	450	53	Suprihanto *et al.* (2015)
	R: GTGTAAGATGGGTAAAGTGCA				
RGSV-pc1-F/R	F: TGGAAAGTAGGCACTATGAAGC	pc1	295	55	this study
	R: GCTACCTCTTGCTGCCTAGAA				
RGSV-p5-F/R	F: GCTCAACACCATGCTTCAAA	p5	379	55	this study
	R: ACTGAGTCCGCGAAGTGTTT				

เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณไวรัส โดยสุ่มเก็บกอใหม่ และใบบนสุดของข้าว ในช่วง 14 และ 21 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส เมื่อข้าวเริ่มแตกกอใหม่ สัปดาห์ละ 1-2 หน่อ และที่ 28-35 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ระยะแตกหน่อ 3-5 หน่อ สุ่มเก็บช่วงเวลาละ 5-6 ต้น จำนวน 15 ตัวอย่าง สำหรับต้นข้าวที่ระยะ 60 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ซึ่งข้าวแตกกอมากกว่า 20 กอต่อต้น สุ่มเก็บตัวอย่างทั้งกอเก่า กอใหม่ กระจายทั้งกอ รวม 5 ต้น นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้มาสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา RT-PCR และติดตามการแพร่กระจายของไวรัสเขียวเตี้ยในต้นข้าวที่เป็นโรคจากการเพิ่มปริมาณยีน pc5 โดยใช้ไพรเมอร์ RGSV-P1/P2 และตรวจหาไวรัสใบหงิกจากการเพิ่มปริมาณยีน S8 โดยใช้ไพรเมอร์ RRSV-S8U1374/S8E3 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

ดำเนินการที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2562 ถึงตุลาคม 2563

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สายพันธุ์ไวรัสและต้นข้าวที่เป็นแหล่งของไวรัส

ผลการทำปฏิกิริยา RT-PCR สามารถตรวจพบยีน pc1 ขนาด 295 คู่เบส และ ยีน pc5 ขนาด 1,100 คู่เบส (Fig. 2) ข้อมูลลำดับเบสที่ผ่านการ alignment เปรียบเทียบความเหมือนกับยีน pc1 (256 เบส) ด้วยโปรแกรม BLASTn กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีลำดับเบสคล้ายคลึงของกับเชื้อไวรัสเขียวเตี้ย ไอโซเลท FZ0403 จากประเทศจีน (MF947494) ที่ระดับ 98.83 เปอร์เซ็นต์ ยีน pc5 (856 เบส) มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับเชื้อ RGSV ไอโซเลท PT010 ของประเทศไทย (KF438757) ที่ 99.53 เปอร์เซ็นต์

ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคใบหงิก ให้ชื่อไอโซเลท LRI ตรวจพบยีน S4 ขนาด 970 คู่เบส และ ยีน S8 ขนาด 540 คู่เบส (Fig. 3) ลำดับเบสที่ผ่านการ alignment และนำไปเปรียบเทียบความเหมือนกับ ยีน S4 (915 เบส) ด้วยโปรแกรม BLASTn กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีลำดับเบสคล้ายคลึง

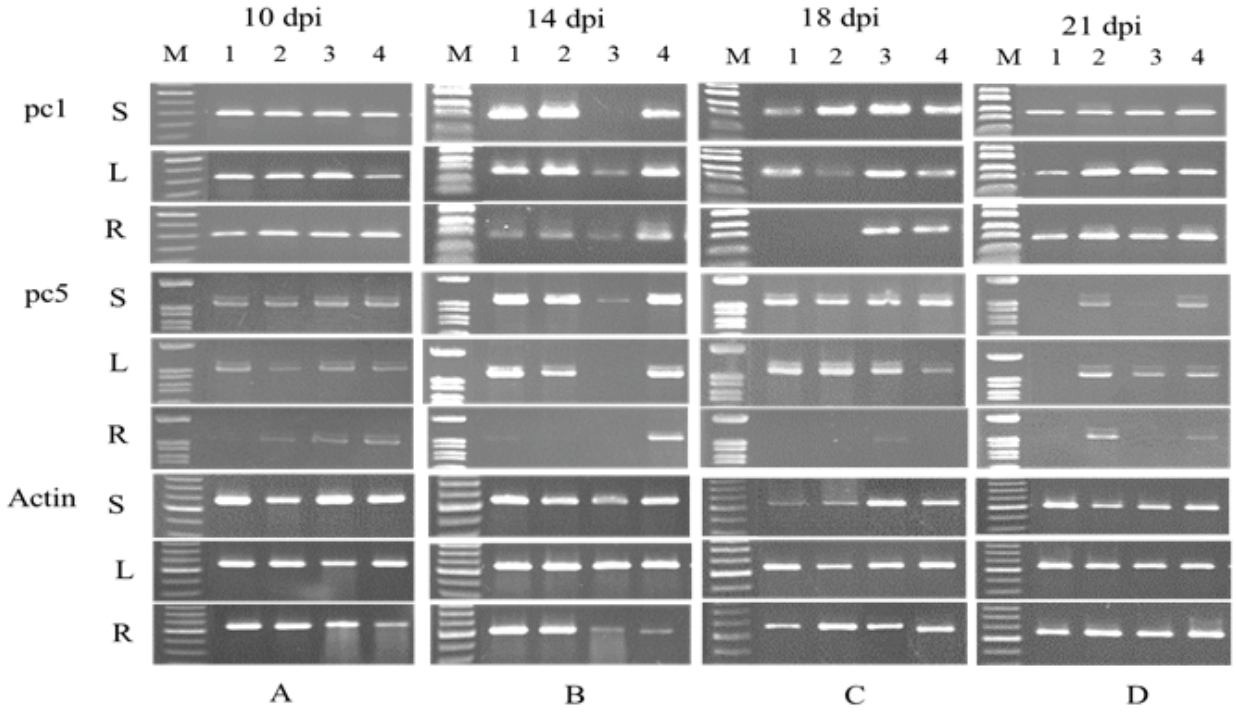

Fig. 2 Electrophoresis of 1.5% agarose gel of RT-PCR products obtained from RNAs of RGSV-infected rice plants (1-4) to detect viral pc1 and pc5 genes in stem (S), leaf (L) and root (R) of rice plants after insect inoculation. (A)10 dpi, (B)14 dpi, (C) 18 dpi and (D) 21 dpi. The actin gene was used as internal control of the extracted RNA quality validation. M= 100 bp DNA Ladder H3 RTU standard markers

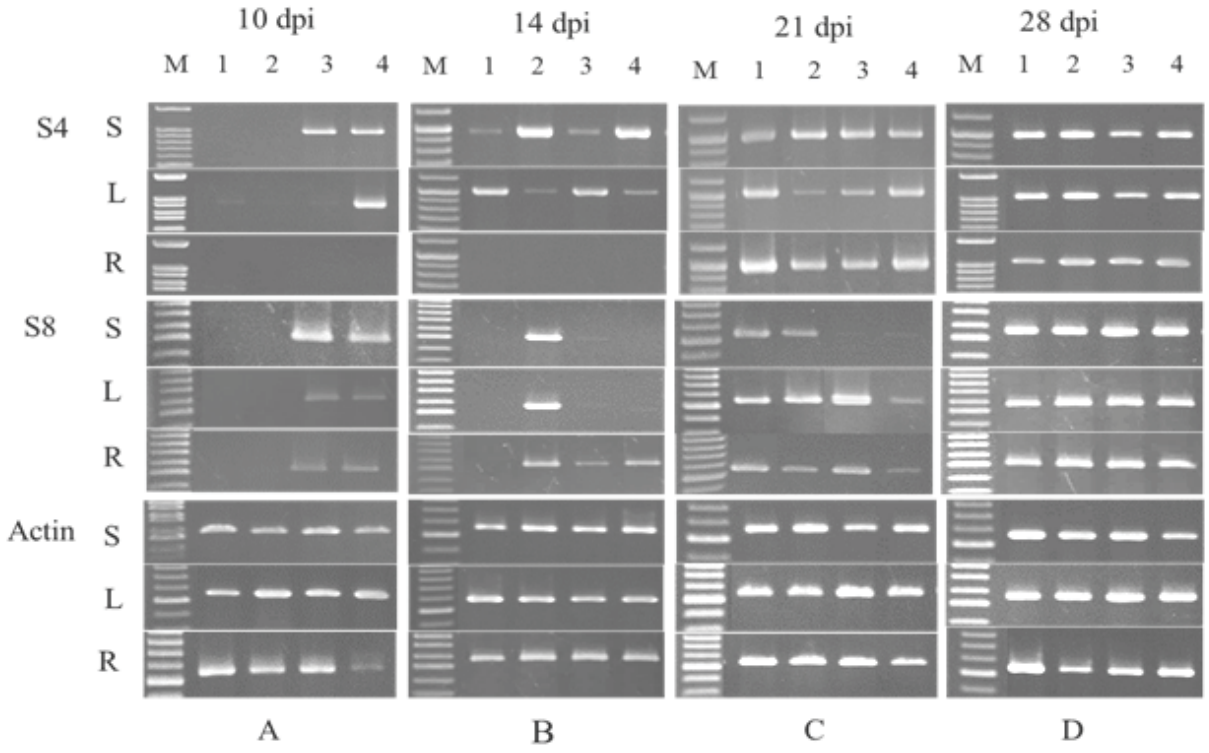

Fig. 3 Electrophoresis of 1.5% agarose gel of RT-PCR products obtained from RNAs of RRSV-infected rice plants (1-4) to detect viral S4 and S8 genes in stem (S), leaf (L) and root (R) of rice plants after insect inoculation. (A)10 dpi, (B)14 dpi, (C) 21 dpi and (D) 28 dpi. The actin gene was used as internal control of the extracted RNA quality validation. M= 100 bp DNA Ladder H3 RTU standard markers

กับเชื้อไวรัสโรคใบหงิกไอโซเลทจากประเทศไทย (Thai isolate) (U66714) ที่ระดับ 98.8 เปอร์เซ็นต์ ยีน S8 (411 เบส) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ RRSV ไอโซเลท Thailand ที่ระดับ 93.49 เปอร์เซ็นต์ (L46682)

2. การตรวจไวรัสในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ด้วยเทคนิค RT-PCR

2.1 การตรวจไวรัสเขียวเตี้ย ใช้ไพรเมอร์ RGSV-P1/P2 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน pc5 ขนาด 1,100 คู่เบสได้ เมื่อเปลี่ยนใช้ไพรเมอร์ RGSV-NCP-F1/R สามารถเพิ่มปริมาณยีน pc5 ขนาด 450 คู่เบส จากแมลง 4 ใน 5 ตัว คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ จึงควรเลือกใช้ไพรเมอร์ RGSV-NCP-F1/R (Fig. 4A) นอกจากนี้ ไพรเมอร์ RGSV-p5-F/R สามารถเพิ่มปริมาณยีน p5 ขนาด 379 คู่เบส ได้เป็น 60 เปอร์เซ็นต์ จึงแนะนำให้ใช้ไพรเมอร์ RGSV-NCP-F1/R

ผลการปรียบเทียบความเหมือนของยีน ด้วยโปรแกรม BLASTn กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ยีน pc5 (319 เบส) และ p5 (358 เบส) มีความความคล้ายคลึงกับไอโซเลท PT010 จากปทุมธานี ที่ระดับ 99.37 และ 99.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าการตรวจไวรัสในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ใช้ยีน pc5 มีความถี่ในการตรวจพบมากกว่ายีน p5 สอดคล้องกับรายงานของ Chomchan และคณะ (2002) ที่ตรวจพบโปรตีน N (pc5) และ p5 ปริมาณมากในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในขณะที่พบโปรตีน p2 และ p6 ปริมาณเล็กน้อยและไม่สม่ำเสมอเมื่อเทียบกับโปรตีน N และ p5

2.2 การตรวจเชื้อไวรัสใบหงิก ใช้ไพรเมอร์ RRSV-S8-F/R พบยีน S8 ขนาด 541 คู่เบส จากแมลง 4 ใน 5 ตัว คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ แมลงที่ตรวจพบยีน S8 (3 ใน 4) ตรวจพบยีน S3 โดยไพรเมอร์ RRSV-S3-F/R และ ยีน S9 โดยไพรเมอร์ RSV-S9-F/R ด้วยเช่นกัน (60 เปอร์เซ็นต์) ได้ดีเอ็นเอขนาด 825 คู่เบส และ 1,110 คู่เบส ตามลำดับ (Fig. 4B) มีแมลง 1 ตัว ที่ตรวจไม่พบทั้งสามยีน

ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน ด้วยโปรแกรม BLASTn กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า ยีน S8

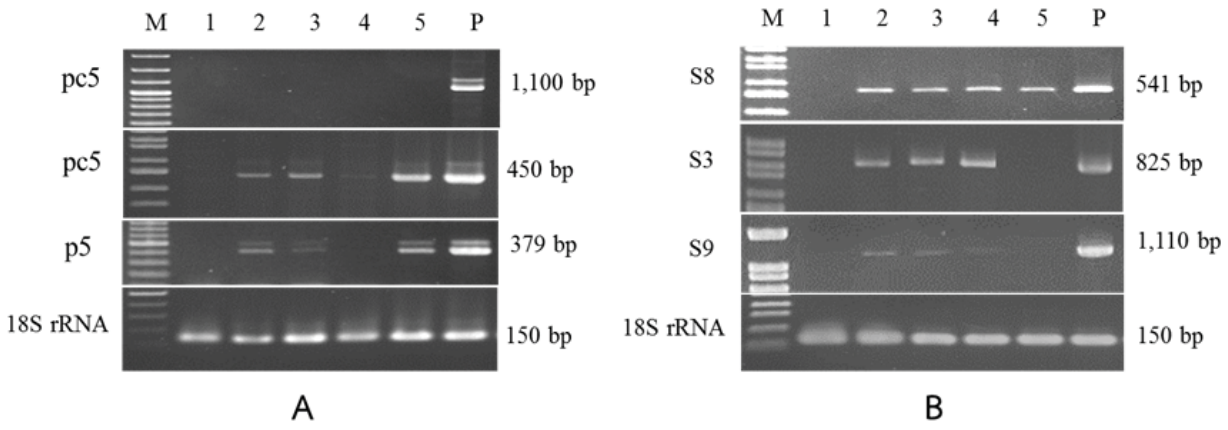

Fig. 4 Electrophoresis of 1.5% agarose gel of RT-PCR products obtained from RNA of viruliferous insects (1-5) at eight days after acquisition feeding on infected rice plant (P). (A) RGSV feeding. (B) RRSV feeding. Viral genes under investigation included pc5 (RGSV-P1/P2), pc5 (RGSV-NCP-F1/R), p5 (RGSV-p5-F/R), S8 (S8U1374/S8E3), S9 (RSV-S9-F/R) and S3 (RRSV-S3-F/R). The 18S rRNA gene was used for positive control of RNA quantity validation. M= 100 bp DNA ladder H3 RTU standard DNA markers

(386 เบส) S3 (1,041 เบส) และ S9 (775 เบส) มีความความคล้ายคลึงกับไอโซเลท Thailand จากประเทศไทย ที่ระดับ 94.4 99.48 และ 99.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการสังเกต พบว่า ยีน S8 และ S3 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอสม่ำเสมอกว่ายีน S9 ส่วนยีน S3 มีความถี่ในการตรวจพบในแมลงได้น้อยกว่ายีน S8 การตรวจเชื้อ RRSV ในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยไพรเมอร์ของยีน S8 จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจพบไวรัสสูงกว่ายีนอื่น สอดคล้องกับ Zhang และคณะ (2013) ที่พบว่า เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่รับเชื้อและพักตัวนาน 9 วัน สามารถตรวจพบยีน S8 ในตัวอ่อน (68.2 เปอร์เซ็นต์) และตัวเต็มวัย (75 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีประสิทธิภาพถ่ายทอดไวรัส เท่ากับ 50 และ 32.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Li และคณะ (2014) พบว่า แมลงที่ดูดต้นข้าวเป็นโรคใบหงิก มีระยะฟักตัวนาน 9 วัน ตรวจพบยีน S8 26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแมลงพักตัวนาน 20 วัน ตรวจพบยีน S8 ได้มากขึ้น 87 เปอร์เซ็นต์ ฐานัฏ และคณะ (2560) พบว่า เชื้อ RRSV มีระยะแฝง (latent period) ในตัวอ่อนเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ 3 วัน ตรวจพบไวรัสได้ต่อเนื่องนาน 16 วัน ในระยะตัวเต็มวัย

3. การแพร่กระจายของไวรัสในต้นข้าวที่เป็นโรค

3.1 ไวรัสโรคเขียวเตี้ย ปริมาณไวรัสที่พบในส่วนต่างๆ ของต้นข้าวโดยพิจารณาจากความเข้มมากน้อยของแถบดีเอ็นเอผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ที่ระยะเวลา 10 วันหลังต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัส RGSV ตรวจพบยีน pc1 ที่บริเวณลำต้น (S) 100 เปอร์เซ็นต์ ใบยอด (L) 100 เปอร์เซ็นต์ และราก (R) 100 เปอร์เซ็นต์ (Fig. 2A) ช่วงระยะ 10 และ 21 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ตรวจพบยีน pc1 ในส่วนลำต้น ใบยอด และราก ในระดับค่อนข้างคงที่กว่ายีน pc5 (Fig. 2A, 2D) โดยมีความผันแปรในราก ในช่วงระยะ 14 และ 18 วัน (Fig. 2B, 2C) ในขณะที่ช่วงระยะ 14 18 และ 21 วัน ตรวจพบยีน pc1 ที่ลำต้น เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ในส่วนใบยอดและราก มีความผันแปรในทุกช่วงระยะเวลาที่ทำการตรวจสอบ (Fig. 3B, 3C) ช่วงระยะ 10 14 และ 21 วัน ตรวจพบยีน pc1 ในราก 100 เปอร์เซ็นต์ ช่วงระยะ 10 และ 18 วัน ตรวจพบยีน pc5 ในลำต้นและใบยอด 100 เปอร์เซ็นต์ ช่วงระยะ 14 และ 21 วัน ตรวจพบยีน pc5 ในลำต้น ใบยอด และราก 50-100 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 10-21 วัน ความถี่ของการตรวจพบยีน pc1 ที่ลำต้น (93.8 เปอร์เซ็นต์) ใบยอด (100 เปอร์เซ็นต์) และราก (87.5 เปอร์เซ็นต์) เฉลี่ย 93.8 เปอร์เซ็นต์ (พบ 45 จาก 48 ตัวอย่าง) ตรวจพบยีน pc5 ที่ลำต้น (93.8 เปอร์เซ็นต์) ใบยอด (87.5 เปอร์เซ็นต์) และราก (56.2 เปอร์เซ็นต์) เฉลี่ย 79.2 เปอร์เซ็นต์ (พบ 38 จาก 48 ตัวอย่าง) แสดงว่ายีน pc1 มีโอกาสที่จะตรวจพบมากกว่ายีน pc5

จากผลการศึกษานี้ แสดงว่าระยะเวลาการแพร่

กระจายของไวรัสทั้งสองชนิดในต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสจากแมลงพาหะ กล่าวคือ เชื้อ RGSV มีการเพิ่มปริมาณในช่วง 10 วันหลังจากเข้าสู่ลำต้น สอดคล้องกับรายงานของ Ling และคณะ (1972) และ Hibino และคณะ (1985a) โดยไวรัสเคลื่อนย้ายจากบริเวณลำต้นที่เป็นจุดรับไวรัสสู่ส่วนรากและใบยอด ภายในเวลา 10 วัน สามารถสังเกตพบไวรัสที่ใบยอด และราก อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ ไม่สามารถระบุช่วงเวลาที่แน่นอนว่าไวรัสเคลื่อนไปที่ใบยอด หรือรากก่อน

3.2 ไวรัสโรคใบหงิก ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัส RRSV ปริมาณไวรัสที่พบในส่วนต่างๆ ของต้นข้าวพิจารณาจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ ที่ 10 วันหลังได้รับการถ่ายทอดไวรัส ตรวจพบยีน S8 ในลำต้น (50 เปอร์เซ็นต์) ใบยอด (50 เปอร์เซ็นต์) และราก (50 เปอร์เซ็นต์) ตรวจพบ S4 ในลำต้น (50 เปอร์เซ็นต์) ใบยอด (75 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบในราก (Fig. 3A) ช่วงระยะ 14 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส พบความไม่สม่ำเสมอของการตรวจยีน S8 ในลำต้น และใบยอด (Fig. 3B) แต่ตรวจพบยีน S4 ในลำต้นและยอด มีความสม่ำเสมอ 100 เปอร์เซ็นต์ ช่วงระยะ 21-28 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ตรวจพบยีน S4 และ S8 ที่ลำต้น ใบยอด และราก 100 เปอร์เซ็นต์ (Fig. 3C, 3D) ช่วงระยะ 10-14 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส การสุ่มตรวจไวรัสมีความผันแปรมากกว่าช่วงระยะ 21-28 วัน สามารถตรวจยีนตลอดระยะเวลา 10-28 วัน ตรวจพบยีน S4 ที่ลำต้น (87.5 เปอร์เซ็นต์) ใบยอด (93.8 เปอร์เซ็นต์) และราก (50 เปอร์เซ็นต์) เฉลี่ย 77.1 เปอร์เซ็นต์ (พบ 37 จาก 48 ตัวอย่าง) ตรวจพบยีน S8 ที่ลำต้น (75 เปอร์เซ็นต์) ใบยอด (75 เปอร์เซ็นต์) และราก (81.3 เปอร์เซ็นต์) เฉลี่ย 77.1 เปอร์เซ็นต์ (พบ 37 จาก 48 ตัวอย่าง) แสดงว่ายีน S4 มีโอกาสตรวจพบที่ลำต้นและใบยอดมากกว่ายีน S8

ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อ RRSV พบไวรัสสะสมในต้นข้าวหลังได้รับการถ่ายทอดไวรัสอย่างน้อย 10 วัน แม้ต้นข้าวที่ไม่แสดงอาการก็สามารถตรวจพบไวรัสได้โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน S4 และ S8 สอดคล้องกับรายงานของ ฐานัฏ และคณะ (2561) ที่พบว่า ที่ 10 วันหลังได้รับเชื้อ เป็นระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดของไวรัสที่สามารถตรวจสอบได้ก่อน โดยที่ต้นข้าวที่ยังไม่แสดงอาการ ซึ่งโอกาสที่จะตรวจพบมีน้อยกว่าในต้นที่แสดงอาการ ที่ระยะ 21-28 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส สอดคล้องกับรายงานของ ทวัช (2544) ที่ตรวจพบยีน S4 ของเชื้อ RRSV ในลำต้น ใบ กาบใบ และรากข้าว

4. การสะสมของไวรัสในต้นข้าวและการตรวจวินิจฉัยโรค

4.1 ไวรัสโรคเขียวเตี้ย ต้นข้าวได้รับการถ่ายทอดเชื้อ RGSV เป็นเวลา 14 วัน สามารถตรวจพบยีน pc5 ที่บริเวณลำต้น 75 เปอร์เซ็นต์ และใบยอด 75 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในช่วง 21 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ข้าวเริ่มแตกกอใหม่ ตรวจพบยีน pc5 ในกอใหม่และใบยอด 64.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะ 28-60 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ตรวจพบไวรัสในกอใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ใบยอด 85.7-100 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) ส่วนต้นข้าวที่รับการถ่ายทอดไวรัส 60 วัน แตกกอเฉลี่ย 28 กอต่อต้น ร่วมกับมีอาการใบเหลืองปลายใบสีส้ม ใบแคบ สั้น และตั้งตรง (Fig. 5D) ตรวจพบไวรัสสม่ำเสมอกระจายทั่วต้นทั้งกอเก่า กอใหม่ และใบยอด

การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-PCR จึงสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับรายงานของ Okuda และคณะ (2019) ที่พบว่า ไวรัส *Rice stripe virus* (type species of *Tenuivirus*) ปริมาณการสะสมไวรัสมีความสัมพันธ์กับปริมาณอาร์เอ็นเอของยีน coat protein การสะสมไวรัสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ที่ใบยอด กาบใบ และลำต้น หลังจากได้รับเชื้อ 7-28 วัน

4.2 ไวรัสโรคใบหงิก ต้นข้าวได้รับการถ่ายทอดเชื้อ RRSV ในช่วง 14 21 และ 28 วัน ตรวจพบยีน S8 ในใบยอดแสดงอาการใบบิดหรือใบแหว่ง 100 เปอร์เซ็นต์

Table 2 Detection percentage of pc5 gene of *Rice grassy stunt virus* (RGSV) in the new tillers and the uppermost leaves of rice plants at 14-60 days post-inoculation (dpi)

Day post inoculation	RGSV-pc5 gene detection (%)	
	New tiller	Uppermost leaf
14	75.0 (9/12)	75.0 (9/12)
21	64.3 (9/14)	64.3 (9/14)
28	100 (14/14)	100 (14/14)
35	100 (14/14)	85.7 (12/14)
60	100 (30/30)	95.5 (43/45)

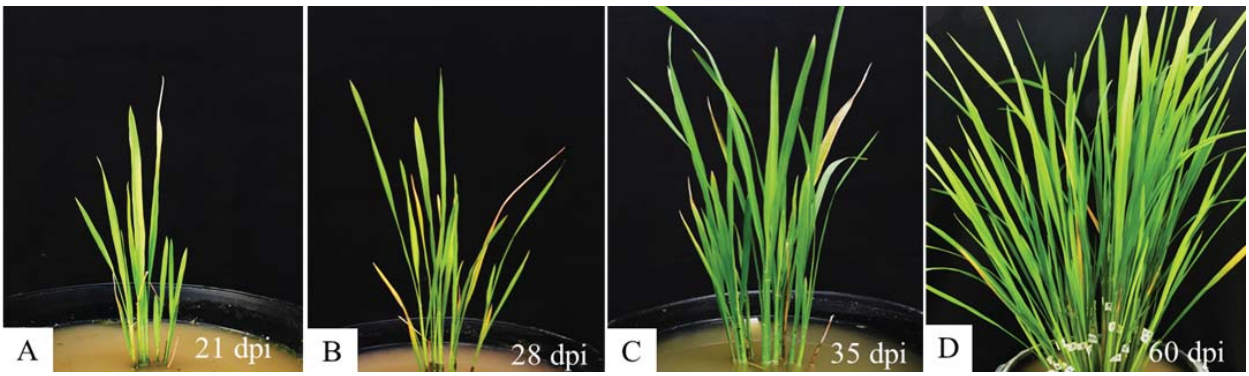

Fig. 5 Disease development and symptoms of RGSV-infected rice plants at 21-60 days after inoculation (dpi). (A-B) Pale green to yellow or orange and shortened narrow leaves, (C-D) profuse tillering to excessive tillering

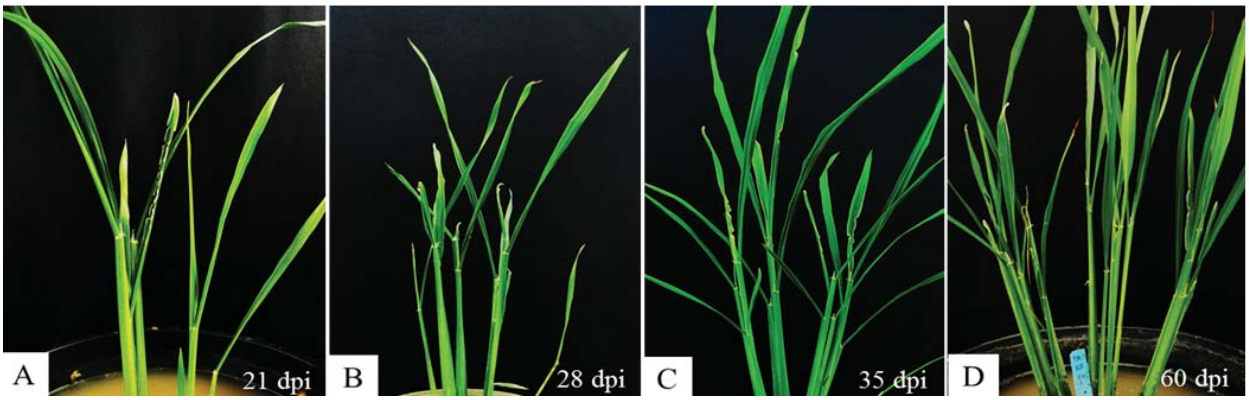

Fig. 6 Disease development and symptoms of RRSV-infected rice plants at 21-60 days after inoculation (dpi). (A-B) shorted and serrated edges leaves. (C-D) ragged and twisted leaves

(Fig. 6) ส่วนใบยอดที่ไม่แสดงอาการ การตรวจพบยีน S8 ไม่สม่ำเสมอ 73.3-85.7 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาที่ระยะ 35-60 วันหลังการถ่ายทอดไวรัส ตรวจพบยีน S8 ในใบยอดที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) ชี้ให้เห็นว่าต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกและได้รับเชื้อ 35 วันขึ้นไป แม้ในใบยอดที่ไม่แสดงอาการ แต่ปริมาณเชื้อ RRSV อยู่ในระดับที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค RT-PCR สอดคล้องกับรายงานของ Li และคณะ (2014) ที่พบว่าข้าวที่แสดงอาการต้นเตี้ย ปลายใบบิดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไวรัสในต้นข้าว และทวัช (2544) ใช้เทคนิค one step RT-PCR ตรวจไวรัสในลำต้น ใบ กาบใบ และรากข้าว โดยปริมาณไวรัสที่ตรวจพบแปรผกผันกับความสูงของต้นเป็นโรค กล่าวคือ ข้าวต้นเตี้ยพบไวรัสมีปริมาณมาก

Table 3 Detection percentage of S8 gene of *Rice ragged stunt virus* (RRSV) in the uppermost leaves of rice plants at 14-60 days post inoculation (dpi)

Day post inoculation	RGSV-S8 gene detection (%)	
	Asymptomatic leaf	Symptomatic leaf
14	73.3 (11/15)	100 (10/10)
21	80.0 (12/15)	100 (15/15)
28	85.7 (12/14)	100 (14/14)
35	100 (15/15)	100 (15/15)
60	100 (15/15)	100 (15/15)

สรุปผลการทดลอง

1. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับไวรัสอย่างน้อย 8 วัน ทำให้เป็นแมลงอมโรค 80 เปอร์เซ็นต์ การตรวจไวรัสโรคเขียวเตี้ยในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แนะนำให้ใช้ไพรเมอร์ RGSV-NCP-F1/R

2. การตรวจไวรัสในต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสโรคเขียวเตี้ย แม้ข้าวยังไม่แสดงอาการ สามารถตรวจพบไวรัสได้ที่ลำต้น ใบยอด และราก ในต้นที่รับไวรัสมาแล้ว 10 วัน โดยแนะนำให้ตรวจยีน pc1 เพราะสามารถตรวจพบได้มากกว่าตรวจยีน pc5

3. ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสโรคเขียวเตี้ย ที่แตกหน่อใหม่ร่วมกับมีอาการใบเหลือง สามารถตรวจพบไวรัสสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่แสดงอาการ การเลือกต้นข้าวสำหรับใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการถ่ายทอดโรค แนะนำให้เลือกใช้ต้นข้าวเป็นโรคหลังจากได้รับการถ่ายทอดไวรัส 35-60 วัน

4. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับไวรัสโรคใบหงิกเป็นเวลา 8 วัน ทำให้เป็นแมลงอมโรค 80 เปอร์เซ็นต์ การตรวจไวรัสในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แนะนำให้ใช้ไพรเมอร์ S8U1374/S8E3 ตรวจยีน S8

5. ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสโรคใบหงิก สามารถตรวจพบเชื้อได้ภายใน 10 วัน แนะนำให้ตรวจยีน S4 หรือ S8 หรือตรวจเมื่อต้นข้าวเริ่มแสดงอาการต้นเตี้ยร่วมกับใบหงิก จะเพิ่มความแม่นยำในการตรวจมากขึ้น

6. การเลือกต้นข้าวเพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัส แนะนำให้เลือกต้นข้าวที่ได้รับเชื้อมาแล้ว 35-60 วัน

ดังนั้น การตรวจไวรัส จึงแนะนำให้ตรวจหลังจากพบเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระบาดในแปลงนา เป็นเวลา 10-14 วัน และหากไม่พบอาการ ควรมีการตรวจซ้ำในกอเดิมอีกภายในระยะ 1 สัปดาห์ โดยการสุ่มตรวจไวรัสในต้นข้าวที่ยังไม่แสดงอาการควรทำซ้ำ ในระยะเวลา 1 สัปดาห์ หรือควรสุ่มตรวจไวรัสหลังจากต้นข้าวได้รับไวรัสอย่างน้อย 10-14 วัน โดยสุ่มบริเวณลำต้น หรือใบยอด

ข้อสังเกต ต้นข้าวหลังได้รับการถ่ายทอดไวรัสโรคเขียวเตี้ยแล้ว 60 วัน มีการแตกกอมากกว่าต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัส 35 วัน เช่นเดียวกันต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสโรคใบหงิกแล้ว 60 วัน มีจำนวนใบที่แสดงอาการโรคมาก และมีไวรัสสะสมในต้นข้าวในปริมาณที่เหมาะสมที่ใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการถ่ายทอดโรค

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ปริญญาเอก ที่ผู้วิจัยได้รับทุนจากโครงการทุนปริญญาเอกเฉลิมพระเกียรติทรงครองราชย์ 70 ปี ประจำปี 2560 ทุนในประเทศ เลขที่ รท24/2561 สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสวรรณ เจียมสมบัติ ที่สนับสนุนการเขียนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ฐานัฏ ณ พัทลุง, วิชชุดา รัตนากาญจน์ และวิภา ตังคนานนท์. 2561. ประสิทธิภาพของเทคนิค Indirect NCM-ELISA สำหรับการประเมินการรอดชีวิตเพื่อการก่อโรค และการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวจากตัวอย่างเนื้อเยื่อต้นข้าวในสภาพการแช่เยือกแข็งโดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* Stål). หน้า 88-95. *ใน*: การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 56. 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2561. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฐานัฏ ณ พัทลุง, วิภา ตังคนานนท์ และวิชชุดา รัตนากาญจน์. 2560. ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค Dot-Immunobinding Assay. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 6(3): 236-246.

ดารา เจตนะจิตร, เมธี ปุตตะ, อมรา สนิมทอง, วิชชุดา รัตนากาญจน์, จรรยา อารยพันธ์ และสมคิด ดิสถาพร. 2533. โรคจู๋ของข้าวและแนวทางแก้ปัญหา. หน้า 25-30. *ใน*: รายงานการสัมมนาเชิงปฏิบัติการการแก้ปัญหาเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและโรคจู๋. 28 มิถุนายน 2533. กรมวิชาการเกษตร, บางเขน, กรุงเทพฯ.

ทวัช วิจารัตน์. 2544. การตรวจหาเชื้อไวรัสโรคใบหงิกข้าวระดับโมเลกุลในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

วิชชุดา รัตนากาญจน์, ดารา เจตนะจิตร และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. การผลิตแอนติเซรัมสำหรับตรวจสอบไวรัสโรคใบหงิกของข้าว. หน้า 95-99. *ใน*: เรื่องย่อการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร.

วิชชุดา รัตนากาญจน์, รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์, พยอม โคเบลลี่,

วันพร เข็มมุกด์, คนึงนิจ ศรีวิไลย, สิทธ์ ใจสงฆ์ และ กิตติพงษ์ ศรีม่วง. 2557. คู่มือสำรวจโรคในนาข้าว. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, กรมการข้าว. 97 หน้า.

Chen, C.C. and R.J. Chiu. 1982. Three symptomatic types of rice virus diseases related to grassy stunt in Taiwan. Plant Disease 66: 15-18.

Chettanachit, D., M. Putta and S. Disthaporn. 1978. Rice ragged stunt in Thailand. IRRN 3(4): 15-16.

Chomchan, P., G.J., Miranda and Y. Shirako. 2002. Detection of rice grassy stunt tenuivirus nonstructural proteins p2, p5 and p6 from infected rice plants and from viruliferous brown planthoppers. Archives of Virology 147(12): 2291-2300.

Helina, S., S. Sulandari, A. Trisyono and S. Hartono. 2020. Assessments of yield losses due to double infection of *Rice ragged stunt virus* and *Rice grassy stunt virus* at different severity in the field. Yogyakarta, Indonesia. Pakistan Journal of Phytopathology 32(2): 129-136.

Hibino, H. 1989. Insect-borne viruses of rice. Advances in Disease Vector Research. 6: 210-241.

_____. 1996. Biology and epidemiology of rice viruses. Annual Review of Phytopathology 34: 249-274.

Hibino, H. and I. Kimura. 1982. Detection of *Rice ragged stunt virus* in insect vectors by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology 72(6): 656-659.

Hibino H., P.Q. Cabauatan, T. Omura and T. Tsuchizaki. 1985a. *Rice grassy stunt virus* strain causing tungro-like symptoms in the Philippines. Plant Disease 69(6): 538-541.

Hibino, H., T. Usugi, T. Omura, T. Tsuchizaki, K. Shohara and M. Iwasaki.1985b. *Rice grassy stunt virus:* a planthopper-borne circular filament. Phytopathology 75(8): 894-899.

Hoang, A.T., H.M. Zhang, J. Yang, J.P. Chen, E. Hébrard, G.H. Zhou, V.N. Vinh and J. A. Cheng. 2011. Identification, characterization, and distribution of Southern rice black-streaked dwarf virus in Vietnam. Plant Disease 95:1063-1069.

Huang, H.J., Y.Y. Bao, S.H. Lao, X.H. Huang, Y.Z. Ye, J.X. Wu, H.J. Xu, X.P. Zhou and C.X. Zhang. 2015. *Rice ragged stunt virus*-induced apoptosis affects virus transmission from its insect vector, the brown planthopper to the rice plant. Scientific Reports 5(1): 1-14.

Ichiki, T.U., T. Shiba, K. Matsukura, T. Ueno, M. Hirae and T. Sasaya. 2013. Detection and diagnosis of rice-infecting viruses. Frontiers in Microbiology 4, 289.

IRRI. 1968. Annual Report 1967. Retrieved from Los Baños, Manila, Philippines.

Li, S., H. Wang and G. Zhou. 2014. Synergism between southern *Rice black-streaked dwarf virus* and *Rice ragged stunt virus* enhances their insect vector acquisition. Phytopathology. 104: 794-799.

Ling, K.C. 1972. Rice Virus Diseases. International Rice Research Institute, Los Baños, Manila, Phillippines. 142 p.

_____. 1977. Transmission of rice grassy stunt by the brown planthopper. The rice brown planthopper. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. Taipei, Taiwan. pp. 73-82.

Okuda, M., T. Shiba, M. Hirae, A. Masunaka and M. Takeshita. 2019. Analysis of symptom development in relation to quantity of *Rice stripe virus* in rice (*Oryza sativa*) to simplify evaluation of resistance. Phytopathology 109(4): 701-707.

Palmer, L.T., Y. Soepriaman and O. Mochida. 1978. The distribution of ragged stunt disease and its resulting rice yield reduction in Indonesia. International Rice Research Newsletter 3(3): 15-16.

Palomar, M.K. and K.C. Ling. 1968. Yield losses due to rice grassy stunt infection. Philippine Phytopathol. 4: 14.

Pattayawat, S., B. Nathwong, D. Chettanachit, W. Ratanakarn, P. Burns, S. Pinsupa, C. Pitaksutheepong, N. Warin and S. Attathom. 2004. Diversity Study of Nucleotide Sequence of Genomic Segment 5 and 8 of *Rice Ragged Stunt*

Virus Isolates in Thailand. pp. 28-32, *In*: Proceedings of the 42nd Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart, Thailand, 3-6 February 2004, Kasetsart University.

Satoh, K., K. Yoneyama, H. Kondoh, T. Shimizu, T. Sasaya, I.R. Choi, K. Yoneyama, T. Omura and S. Kikuchi. 2013. Relationship between gene responses and symptoms induced by *Rice grassy stunt virus*. Frontiers in Microbiology 4: 313.

Shikata, E., T. Senboku and T. Ishimizu. 1980. The causal agent of rice grassy stunt disease. Proceedings of the Japan Academy. Series B, 56(2): 89-94.

Suprihanto, S.S., S, Hartono and Y. Trisyono. 2015. Identification and molecular diversity of *Rice ragged stunt virus* and *Rice grassy stunt virus* in Java. Indonesia. International Journal of Sciences: Basic and Applied Research 24: 374-386.

Toriyama, S., T. Kimishima and M. Takahashi. 1997. The proteins encoded by rice grassy stunt virus RNA5 and RNA6 are only distantly related to the corresponding proteins of other members of the genus Tenuivirus. Journal of General Virology 78(9): 2355-2363.

Wathanakul, L. and P. Weerapat. 1969. Virus diseases of rice in Thailand. pp. 78-85, *In*: The Virus diseases of rice in Thailand Proceedings of a Symposium at the International Rice Research Institute, April, 1967. Baltimore, Maryland, U.S.A. John Hopkins press.

Wijarat, T. 2001. Molecular Detection of *Rice ragged stunt virus* in Rice Varieties and Brown Planthopper in Thailand. Master of Science (Genetic Engineering). Major Field Genetic Engineering. Interdisciplinary Graduate Program. 75 p.

Yang, X., Lv, Kalun, M. Wang and G. Zhou. 2017. Investigation of viruses infecting rice in southern China using a multiplex RT-PCR assay. Crop Protection 91: 8-12.

Zhang, S.B., G.W. Song, L. Yang, Z.J. Wu and L.H. Xie. 2013. Determination of *Rice ragged stunt virus* and vector transmission characteristics. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition). 03.

Zheng, L., Q. Mao, L. Xie and T. Wei. 2014. Infection route of *Rice grassy stunt virus*, a tenuivirus, in the body of its brown planthopper vector, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) after ingestion of virus. Virus Research 188: 170-173.