

การประเมินชนิดและปริมาณรงควัตถุของการสัปดาห์ที่เกิดโรคใบหงิกข้าว ในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของข้าวสายพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1

Evaluation of pigment types and pigment contents in different rice growth stage of Taichung Native 1 with leaf crude rice ragged stunt disease

ฐานันท์ ณ พัทลุง¹ และ วิภา ตังคานานนท์^{1*}

Thanat Na Phatthalung¹ and Wipa Tangkananond^{1*}

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี 12120

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120

* Corresponding author: w_tangkananond@yahoo.com

Received: date; January 29, 2020 Accepted: date; July 9, 2020 Published: date

บทคัดย่อ: โรคใบหงิกข้าวเป็นโรคไวรัสของข้าวที่สำคัญอันดับหนึ่งในกระบวนการปลูกข้าวบริเวณพื้นที่นาชลประทานภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ซึ่งต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์เนื่องจากการบุกรุกของไวรัสและส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินปฏิสัมพันธ์ของระยะเวลาการติดเชื้อไวรัสใบหงิกข้าวในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอมมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 ต่อชนิดและปริมาณรงควัตถุพืช โดยวางแผนการทดลองแบบ 3 × 9 แฟกทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัย A คือ ประชากรต้นข้าวทดสอบจากการดูกินน้ำเลี้ยงของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้แก่ ต้นข้าวที่ไม่มีการให้แมลงดูกินน้ำเลี้ยง ต้นข้าวที่ให้แมลงปกติและแมลงพาหะดูกินน้ำเลี้ยง ตามลำดับ และปัจจัย B คือ ช่วงระยะเวลาติดเชื้อไวรัสในต้นข้าวที่อายุแตกต่างกัน 10–90 วัน ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ปริมาณรงควัตถุในประชากรต้นข้าวทดสอบที่ให้แมลงพาหะดูกินน้ำเลี้ยงมีปริมาณลดลงมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่มีการให้แมลงดูกินน้ำเลี้ยงและต้นข้าวที่ให้แมลงปกติดูกินน้ำเลี้ยง ตามลำดับ ช่วงระยะเวลาติดเชื้อไวรัสในประชากรต้นข้าวทดสอบที่ต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณรงควัตถุหลักมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณรงควัตถุรองมีแนวโน้มลดลง ตามลำดับ ส่วนปฏิสัมพันธ์ของระยะเวลาการติดเชื้อในต้นข้าวต่อชนิดและปริมาณของรงควัตถุพืช พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ต่อชนิดและปริมาณรงควัตถุพืชชนิดคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม แคโรทีนอยด์ และสัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและแคโรทีนอยด์ แต่มีปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ต่อสัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี และพีโอเอฟทิน ตามลำดับ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงการพยายามปรับตัวและฟื้นตัวของต้นข้าว ภายหลังระยะเวลาการติดเชื้อไวรัสที่ต่างกัน ตั้งแต่ช่วงระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ การเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ และการเจริญเติบโตของเมล็ด ตามลำดับ การวิจัยครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อประเมินผลของไวรัสใบหงิกข้าวต่อปริมาณรงควัตถุในพืช การประเมิน

ความต้านทานของพืชเนื่องจากไวรัสก่อโรคต่อกระบวนการทางชีวเคมี และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ต้านทานต่อการทำลายของไวรัสก่อโรคและแมลงพาหะ

คำสำคัญ: ไวรัสใบหงิกข้าว; เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล; พันธุ์ข้าวไทชุงเนทีฟ 1; ปริมาณรงควัตถุพืช

ABSTRACT: Rice ragged stunt disease is one of the major rice viral disease in rice cultivation process of the central and lower northern—irrigated rice field of Thailand. *Rice ragged stunt virus* (RRSV) infected rice plants caused physiological and pathological changes due to virus invasion and affecting the plant photosynthesis. This research aimed to evaluate the interaction of RRSV—infected period on the various pigment types and contents of standard susceptible variety Taichung Native 1 (TN 1) rice plant leaves. The experiment was 3×9 factorial in completely randomized design with 3 replications. Factor A were tested rice plant population from the sap—sucking of the brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) including: non—sucking, non—viruliferous, and viruliferous BPH sucking, respectively, and factor B were the period of RRSV infection in rice plants at various plant ages between 10 and 90 days. The research showed that the pigment contents from the viruliferous BPH sucked rice plant were the most decrease when compared to the non-sucking and non—viruliferous BPH sucked rice plant, respectively. The different infectious periods in tested rice plants affected the increasing contents of primary pigment, whereas the secondary pigment decreased, respectively. The interaction of infectious periods in tested rice plants to the pigment types and contents were non—significant statistical interaction ($P \geq 0.05$) to chlorophyll A (Chl—A), chlorophyll B (Chl—B), total chlorophyll (TChl), carotenoid (Cx+c), and TChl/Cx+c, but significant statistical interaction ($P \leq 0.05$) to Chl—A/B, and phaeophytin (P), respectively. These results demonstrated that the rice plants afforded to improve and recover after the different viral—infected periods of vegetative growth, reproductive growth, and ripening growth stage, respectively. These research results are the important preliminary information to be used to influence of RRSV to pigment contents and plant resistant assessment due to virus-pathogenesis to biochemical processes, and a rice plant variety improving to resist the virus and insect vector disruption.

Keywords: *Rice ragged stunt virus* (RRSV); Brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål); Taichung Native 1 rice plant; plant pigment contents

บทนำ

โรคใบหงิกข้าวหรือโรคจู่ข้าว (Rice ragged stunt disease, RRSV) เป็นโรคข้าวที่มีความสำคัญในบริเวณพื้นที่นาชลประทาน (irrigated rice field) ภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย รวมทั้งพื้นที่ปลูกข้าวเอเชีย ซึ่งสามารถสร้างความเสียหายได้ในระดับสูงสุด 100% โดยมีสาเหตุจากไวรัสใบหงิกข้าว (*Rice ragged stunt virus*, RRSV) ในสกุล *Oryzavirus* วงศ์ *Reoviridae* อนุภาคไวรัสเป็นทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral shape) ขนาด 60–80 นาโนเมตร ไม่มีเปลือกชั้นนอกห่อหุ้ม (non—enveloped virus) แต่มีชั้นโปรตีน 2 ชั้น (double capsid shelled) ห่อหุ้มสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่เส้นตรง (linear dsRNA virus) จำนวน 10 ชิ้นส่วน (segment, S1–S10) (Miyazaki et al., 2008) ไวรัสสามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะจำพวกปากแทงดูด (piercing—sucking) ชนิดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown

planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål) อันดับ Homoptera วงศ์ Delphacidae และมีปฏิสัมพันธ์ในการถ่ายทอดโรคแบบยั่งยืน (persistent-propagative manner) (Sogawa, 1982)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโรคใบหงิกข้าวบนพืชอาศัย จะปรากฏให้เห็นภายหลังการถ่ายทอดไวรัสแล้วประมาณ 20–30 วัน โดยมีลักษณะเด่น คือ ต้นเตี้ย แคระแกรน (stunt) ใบแคบและสั้นกว่าปกติ (short leaves) และมีสีเขียวเข้ม (dark green leaves) บางครั้งมีสีเหลืองซีดซึ่งเป็นลักษณะพร่องคลอโรฟิลล์ (discoloration) ปลายใบบิดเป็นเกลียว (twisted leaves) ขอบใบขาดแหวน (malformed หรือ nicking) และหยักเป็นริ้วคล้ายฟันเลื่อย (ragged leaves) เส้นกลางใบหลัก (main veins) เส้นกลางใบย่อย (minor veins) และบริเวณกาบใบจะเป็นปุ่มนูนบวมโป่งเป็นแถบยาว (vein-swelling หรือ gall) ลำต้นมีการแตกข้อและแขนงกอเพิ่มจากข้อที่อยู่ใกล้หรือสูงกว่าผิวดิน (excess branching) ต้นข้าวที่เป็นโรคจะออกรวงช้า (delayed flowering) รวงไม่สมบูรณ์หรือใฝ่ไม่พังกาบใบธง (malformed flag leaves) เมล็ดต่างลิบ และมีน้ำหนักเบา (unfilled grains) (Milne et al., 1981; Huang et al., 2015; Na Phatthalung et al., 2017)

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์พืชอาศัยเนื่องจากการบุกรุกของไวรัสใบหงิกข้าว โดยการทดสอบโรคจะใช้ข้าวไม่ไวแสงพันธุ์ไทจงเนทีฟ 1 (Taichung Native 1: TN1) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวอ่อนแอมมาตรฐาน การศึกษาของ Hibino et al. (1979) พบว่า อนุภาคไวรัสกระจายเป็นกลุ่ม ลักษณะเป็นผลึก (crystal inclusions หรือ viroplasmic matrix) ที่มีเส้นใยไมโครไฟเบอร์ประสานอยู่ จึงทำให้ทึบแสงอิเล็กตรอน โดยตรวจพบภายในบริเวณไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่อาหารที่มีลักษณะนูนและบวมโป่งจากตัวอย่างบริเวณกาบใบ ราก และใบ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Parejarearn et al. (1985) และ Rungreangsri et al. (2008) และลักษณะอาการของโรคใบหงิกข้าวนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของข้าว โดยความรุนแรงที่ปรากฏนั้นจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับปฏิสัมพันธ์ของไวรัส ปัจจัยทางชีวภาพและกายภาพ เช่น ระยะเวลาการได้รับไวรัส ระยะเวลาติดเชื้อ ระยะแฝง ระยะพักตัว ระยะเวลาการถ่ายทอดโรค กลไกความต้านทานของพืชซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของพืชอาศัยนั้น ๆ และการบริหารจัดการทางการเกษตรในระดับแปลงเพาะปลูกจากการศึกษาของ Disthaporn et al. (1985) พบว่า ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวโดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบหรือระยะแตกกอ ช่วง 15–45 วัน (vegetative stage) จะแสดงอาการรุนแรงกว่าเมื่อได้รับไวรัสในระยะการเจริญทางการสืบพันธุ์ ช่วง 50–70 วัน (reproductive stage) นอกจากนี้ยังพบว่าระยะที่ต้นข้าวเริ่มมีการสร้างช่อดอก ช่วง 60–70 วัน (panicle initiation stage) จะเป็นระยะที่ต้นข้าวอ่อนแอต่อโรคมามากที่สุด และระยะที่ต้นข้าวออกรวงแล้ว ช่วง 90 วัน ขึ้นไป (ripening stage) จะส่งผลกระทบต่อผลผลิตน้อยที่สุดและจะปรากฏลักษณะอาการเส้นใบบวมโป่งเท่านั้น ซึ่งการติดเชื้อไวรัสใบหงิกข้าวต่อระยะพัฒนาการและการเจริญเติบโตของต้นข้าวนี้ล้วนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่เกิดขึ้นในเซลล์พืชอาศัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขัดขวางกลไกการทำงานของรงควัตถุ (pigments) และการเคลื่อนย้ายสารต่าง ๆ ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (photosynthesis) จากแหล่งที่สร้างไปยังแหล่งสะสมหรือแหล่งรับของพืช (source-to-sink flow) (Tomas et al., 2014) รงควัตถุพืชชนิดคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช ซึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลรับพลังงานจากแสงและนำพลังงานดังกล่าวไปใช้ในการสร้างพลังงานทางเคมี จากการรายงานของ Al-Debei et al. (2011) พบว่า การเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชขึ้นอยู่กับสมบัติของคลอโรฟิลล์ที่สามารถสังเคราะห์โมเลกุลแบ่งภายในเซลล์และการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล (total soluble sugar) ที่ส่งผลต่อการตอบสนองการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์และศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตพืช เป็นต้น (Liu et al., 2017) นอกจากนี้ Lu et al. (2016) ได้รายงานว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์และการติดเชื้อไวรัสใบหงิกข้าวในต้นข้าวไม่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของแมลงพาหะในการเลือกดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว อย่างไรก็ตามไม่มีการรายงานถึงช่วงระยะเวลาการติดเชื้อไวรัสที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงได้ประยุกต์การวิจัยในส่วนนี้เพื่อรายงานเพิ่มเติม

การประเมินปริมาณรงควัตถุพืชเนื่องจากการบุกรุกของไวรัสจึงเป็นเรื่องสำคัญทางวิชาการอย่างยิ่ง เนื่องจากในสภาพแปลงเพาะปลูกมักมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณรงควัตถุพืช ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบทั้งในเชิงคุณภาพ

(quality) และปริมาณ (quantity) (Kana et al., 2004) จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้นซึ่งยังไม่ปรากฏการรายงานถึงการประเมินปฏิสัมพันธ์ของระยะเวลาการติดเชื้อของไวรัสใบหงิกข้าวในข้าวพันธุ์อ่อนแอมมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 ต่อชนิดและปริมาณของรวงควัฒุพิช คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยในส่วนนี้ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการประเมินศักยภาพความต้านทานของต้นข้าวต่อการเข้าทำลายของไวรัสใบหงิกข้าว และเพื่อเป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อการทำลายของไวรัสและแมลงพาหะเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว สำหรับรับมือกับการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมและการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกในอนาคต

วิธีการศึกษา

การเตรียมประชากรแมลงพาหะบริสุทธิ์

ตัวอย่างแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิชาการโรคข้าว กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ซึ่งได้คัดเลือกตัวอย่างแมลงพาหะด้วยการใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ดักจับแมลงจากแปลงนาชลประทานของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 16×16×24 นิ้ว ซึ่งผนังกรงบุด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 เมท (mesh: จำนวนช่องเปิดต่อพื้นที่ตารางหนึ่งตารางนิ้ว, 40 เมท = 0.4 มม.) ภายในเรือนทดลองของกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ระดับอุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ (% relative humidity, RH) ประมาณ 70±10 และช่วงแสง (photoperiod) ประมาณ 8–10 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ต้นกล้าข้าว กข7 ปลอดโรค (อายุต้นกล้าข้าว 7–10 วัน และสูงประมาณ 6–9 ซม.) เป็นพืชอาศัยและพืชอาหาร ซึ่งจะทำให้การปล่อยให้แมลงพาหะวางไข่และเจริญเติบโตครบวงจรชีวิตอย่างต่อเนื่อง จำนวนอย่างน้อย 3 รุ่น (F₃) จะได้ประชากรแมลงพาหะบริสุทธิ์ (non-viruliferous หรือ virus-free BPHs) นำมาใช้ในการวิจัย และจะทำการเปลี่ยนต้นกล้าข้าวชุดใหม่เพื่อเลี้ยงแมลง เมื่อต้นกล้าข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ประมาณ 50% (ใช้เวลานาน 3–5 วัน) โดยต้นกล้าข้าวที่นำมาใช้เลี้ยงแมลงนั้นจะไม่มีสารเคมี แต่มีการกำจัดศัตรูของแมลง เช่น มด แมงมุม และจิ้งจก โดยวิธีการจับทำลาย

การเตรียมประชากรต้นข้าวทดสอบเพื่อใช้เป็นแหล่งอาศัยเพิ่มปริมาณไวรัส

ตัวอย่างต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิชาการโรคข้าว กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ซึ่งได้คัดเลือกตัวอย่างต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนจากแปลงนาชลประทานของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี นำมาเพาะปลูกในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งอาศัยเพิ่มปริมาณไวรัสสำหรับการวิจัย และใช้ต้นข้าวพันธุ์อ่อนแอมมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 (TN1) ในการทดสอบโรค โดยนำต้นกล้าข้าวไทชุงเนทีฟ 1 ปลอดโรค (อายุต้นกล้าข้าว 7–10 วัน และสูงประมาณ 6–9 ซม.) มาปักดำในกระถางดินรูปทรงกระบอกก้นปิดขนาด 6×6×6 นิ้ว กระถางละ 3 กอ กอละ 3 ต้น เพื่อเตรียมสำหรับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวโดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลต่อไป

การถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าว

คัดเลือกประชากรแมลงพาหะบริสุทธิ์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระยะตัวอ่อน (virus-free BPHs nymphal stage) วัยที่ 3 (instars) เพื่อดูดกินน้ำเลี้ยง (sap-sucking) จากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกอย่างชัดเจน ประมาณ 50–100 ตัวต่อต้น ก่อนปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรคจะให้แมลงอดอาหาร นาน 2 ชม. (fasting period, FP) เมื่อครบเวลาปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรค นาน 7 วัน (acquisition feeding period, AFP) เพื่อทำการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวสู่แมลง จากนั้นย้ายแมลงที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัส (inoculated vectors) ไปเลี้ยงบนต้นกล้าข้าว กข7 ปลอดโรค ซึ่งใช้เป็นพืชอาศัยและพืชอาหาร เพื่อรอระยะให้ไวรัสแฝงตัวในแมลง นาน 7 วัน (latent period, LP หรือ circulative period, CP) และจะทำการเปลี่ยนต้นกล้าข้าวชุดใหม่เพื่อเลี้ยงแมลงเมื่อต้นข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ประมาณ 50% เมื่อครบระยะแฝงตัวของไวรัสในแมลงจึงย้ายแมลงไปเลี้ยงบนต้นกล้าข้าวพันธุ์อ่อนแอมมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 ปลอดโรคที่

เตรียมไว้ โดยปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวเพื่อทำการถ่ายทอดไวรัส นาน 2 วัน (inoculation feeding period, IFP) จากนั้นนำต้นกล้าข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกแล้ว (inoculated rice plants) มาพ่นสารป้องกันกำจัดแมลง และนำต้นข้าวใส่ในทรงขนาด 20×20×42 นิ้ว ซึ่งผนังทรงปลูกด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 เมท เพื่อสังเกตลักษณะอาการของโรคบนพืชอาศัย และนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการวิจัย

การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA

เตรียมน้ำคั้นพืชจากการคัดเลือกและบดตัวอย่างใบข้าว จำนวน 1 กรัม ในโถรงบดสารซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร ระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ปริมาตร 2.0 มล. ที่แช่เย็น เป็นบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer, EB) [0.01 M phosphate buffered saline (PBS, SIGMA-ALDRICH[®], Lot 23H8927), pH 7.4] ผสมบัฟเฟอร์สกัดและพืชที่บดให้เข้ากัน ดูน้ำคั้นพืชที่ได้ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,290 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Sorvall / DuPont RMC-14 Refrigerated Micro-Centrifuge) จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล. หลอดใหม่ทำการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นพืชที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค DIBA ด้วยการใช้สารละลายแอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกข้าว (anti-RRSV IgG) ที่อัตราการเจือจาง 1:1,000 เท่า ในการตรวจสอบร่วมกับสารละลาย BCIP[®]/NBT (SIGMAFAST[™], Lot #050M8214) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นหรือสับสเตรท (substrate) และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, AP) (ZyMax[™], Lot 40688597) ที่อัตราการเจือจาง 1:5,000 เท่า เป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถหรือประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane, NCM: pore size 0.45 µm, Bio-Rad[®], Cat #1620115) ตามวิธีการรายงาน Na Phatthalong et al. (2017) (แอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกข้าวและสารเคมีในปฏิกิริยาการตรวจสอบได้รับความอนุเคราะห์จากกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว)

การประเมินชนิดและปริมาณของรงควัตถุพืชแบบทำลายใบ

คัดเลือกใบข้าว จำนวนตัวอย่างละ 1 กรัม บดให้ละเอียดในโถรงบดสารซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำสกัดเอทานอล ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 10 มล. ผสมตัวอย่างพืชและสารละลายเอทานอลให้เข้ากัน แล้วจึงดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเซนทริฟิวจ์ ขนาด 15.0 มล. แล้วนำไปวางไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman[™]) เพื่อกรองเศษตะกอนเนื้อเยื่อใบข้าวที่ปะปนในสารละลายออก นำสารละลายที่กรองได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,290 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Sorvall / DuPont RMC-14 Refrigerated Micro-Centrifuge) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo Scientific[™] GENESYS 10S UV-Vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 663, 645, 415, 435 และ 470 นาโนเมตรตามลำดับ โดยใช้สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 95% เป็นสารละลายไร้สิ่งตัวอย่างหรือตัวตั้งค่าที่ศูนย์ (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณรงควัตถุ (มก./มล.) ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll A, Chl-A) คลอโรฟิลล์บี (Chlorophyll B, Chl-B) คลอโรฟิลล์รวม (Total Chlorophyll, TChl: Chl-A + Chl-B) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids, Cx+c) สัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี (Chl-A/B) สัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและแคโรทีนอยด์ (TChl/Cx+c) และฟีโอฟิติน (Phaeophytin, P) ตามลำดับ (Table 1)

การวางแผนการทดลอง

การทดลองแบบ 3 × 9 แฟกทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (3 × 9 factorial experiments in CRD) ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ รูปแบบของประชากรต้นข้าวทดสอบจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของแมลง จำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ชุดควบคุม) กลุ่มที่ 2 แมลงปกติดูดกิน

น้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ใบข้าวปลอดโรค) และกลุ่มที่ 3 แผลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ใบข้าวเป็นโรคใบหงิก) ตามลำดับ และปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสในต้นข้าว (วัน) ที่แตกต่างกัน จำนวน 9 ระดับ (10–90 วัน) ภายหลังจากการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวของแมลง (days after inoculation, DAI) บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืช และคำนวณปริมาณรงควัตถุ (มก./มล.) (Table 1) นำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) เปรียบเทียบความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (SPSS 16.0 for Windows®)

Table 1 Equations to determine concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of plant pigments by 95% Ethanol in UV-Vis spectrophotometer

Plant pigments	Equations/Formula ($\mu\text{g/ml}$)
Chlorophyll A (Chl-A)	$13.36A_{664} - 5.19A_{649}$
Chlorophyll B (Chl-B)	$27.43A_{649} - 8.12A_{664}$
Total Chlorophyll (TChl)	$\text{Chl-A} + \text{Chl-B}$
Carotenoids (Cx+c)	$[1000A_{470} - (2.13\text{Chl-A}) - (97.63\text{Chl-B})]/209$
Phaeophytinization quotient (Pqa)*	A_{435}/A_{415}

Notes: Absorbance (A), *Phaeophytin (P) is the degradation product of chlorophyll, which represents chlorophyll that has lost the central Mg ion (Ronen et al., 1984; Sumanta et al., 2014; Shen et al., 2016)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในตัวอย่างใบข้าวทดสอบด้วยเทคนิค DIBA

ผลการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในตัวอย่างน้ำคั้นจากต้นข้าวทดสอบ ประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ชุดควบคุม) กลุ่มที่ 2 แมลงปกติดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ใบข้าวปลอดโรค) และกลุ่มที่ 3 แมลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ใบข้าวเป็นโรคใบหงิก) ตามลำดับ แสดงดัง **Figure 1** พบว่า สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาชนิดไนโตรเซลลูโลสได้อย่างชัดเจน โดยน้ำคั้นจากตัวอย่างใบข้าวทดสอบในกลุ่มที่ 1 และ 2 ให้สีปฏิกิริยาเป็นสีเขียวอ่อนซึ่งเป็นสีของน้ำคั้นพืช (ผลลบ, negative results) เปรียบเทียบกับน้ำคั้นจากตัวอย่างใบข้าวทดสอบในกลุ่มที่ 3 ซึ่งให้สีของปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินม่วง (ผลบวก, positive results)

สีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาชนิดไนโตรเซลลูโลสนี้เป็นสารผลิตภัณฑ์ (product) ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันระหว่างไวรัสใบหงิกข้าวและแอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกข้าว (anti RRSV-IgG) โดยอาศัยสารละลาย BCIP®/NBT เป็นสารตั้งต้น (substrate) และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, AP) เป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถหรือประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยา สีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะทำหน้าที่ในการคะตะไลซ์ (catalyze) และเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester) บนสารตั้งต้นหรือสับสเตรทชนิดสารละลาย BCIP®/NBT และทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาที่มีลักษณะไม่ละลายน้ำ (insoluble) ปรากฏบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาชนิดไนโตรเซลลูโลสตรงบริเวณจุดที่เกิดปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินม่วง (blue-violet) อย่างชัดเจน (Luttmann et al., 2006)

Treatments	Days after RRSV inoculation								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Non-suck leaves (Trt 1: Control leaf sap)									
Non-viruliferous BPHs suck leaves (Trt 2: Disease-free leaf sap)									
Viruliferous-BPHs suck leaves (Trt 3: RRSV-infected leaf sap)									
Extraction buffer									

Figure 1 The detection and diagnosis of RRSV infected rice cultivar TN1 sap by DIBA

การประเมินชนิดและปริมาณรังควัตถุในประชากรต้นข้าวทดสอบภายหลังจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของแมลง

การประเมินชนิดและปริมาณรังควัตถุเฉลี่ยของประชากรต้นข้าวทดสอบทั้ง 3 กลุ่ม ภายหลังจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของแมลง (ปัจจัย A) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ชุดควบคุม) กลุ่มที่ 2 แมลงปกติดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ใบข้าวปลอดโรค) และกลุ่มที่ 3 แมลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (ใบข้าวเป็นโรคใบหงิก) พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม สัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี สัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและแคโรทีนอยด์ และพีไอฟิทิน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และพบว่าปริมาณรังควัตถุเฉลี่ยของประชากรต้นข้าวทดสอบกลุ่มที่ 3 มีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรังควัตถุเฉลี่ยของประชากรต้นข้าวทดสอบกลุ่มที่ 1 และ 2 และเมื่อประเมินปริมาณรังควัตถุชนิดแคโรทีนอยด์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ตามลำดับ (Table 2)

การประเมินชนิดและปริมาณรังควัตถุในประชากรต้นข้าวทดสอบที่ระยะเวลาติดเชื้อไวรัสใบหงิกข้าวที่แตกต่างกัน

การประเมินชนิดและปริมาณรังควัตถุเฉลี่ยในประชากรต้นข้าวทดสอบที่ระยะเวลาติดเชื้อไวรัสใบหงิกข้าวที่แตกต่างกันช่วง 10-90 วัน ภายหลังจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของแมลงพาหะ (ปัจจัย B) พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเมื่อพิจารณาอิทธิพลระยะเวลาติดเชื้อไวรัสในประชากรต้นข้าวทดสอบที่เพิ่มขึ้นต่อปริมาณรังควัตถุ พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม และสัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและแคโรทีนอยด์ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณรังควัตถุชนิดแคโรทีนอยด์ สัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี และพีไอฟิทิน มีแนวโน้มลดลง ตามลำดับ (Table 2)

การประเมินปฏิสัมพันธ์ของการดูดกินน้ำเลี้ยงต้นข้าวของแมลงและระยะเวลาติดเชื้อไวรัสใบหงิกข้าวต่อชนิดและปริมาณรังควัตถุ

ผลการประเมินปฏิสัมพันธ์ของการดูดกินน้ำเลี้ยงต้นข้าวของแมลง (ปัจจัย A) และระยะเวลาติดเชื้อไวรัสใบหงิกข้าวที่แตกต่างกันช่วง 10-90 วัน ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัส (ปัจจัย B) ต่อชนิดและปริมาณรังควัตถุ พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ต่อปริมาณรังควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม แคโรทีนอยด์ และสัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและแคโรทีนอยด์ แต่มีปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ต่อสัดส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี และพีไอฟิทิน ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Influence of RRSV infected period (10 to 90 DAI) on the pigment types and contents in TN1 rice plant leaf crude sap test samples ($\mu\text{g/mL}$)

Factors	Treatments	Varieties of the pigment types and contents ($\mu\text{g/mL}$)							
		Chl-A ^{1/}	Chl-B ^{1/}	Cx+c ^{1/}	TChl ^{1/}	A/B ^{1/}	TChl/Cx+c ^{1/}	Pqa ^{1/}	
Type of BPH sucking (A)	Non-sucking (Trt1: Control)	2.412 \pm 0.173b	0.816 \pm 0.361b	0.578 \pm 0.074a	3.228 \pm 0.527b	3.525 \pm 1.423a	5.796 \pm 1.780b	1.121 \pm 0.017b	
	Non-viruliferous sucking (Trt:2 Disease free)	2.411 \pm 0.170b	0.816 \pm 0.357b	0.580 \pm 0.072a	3.227 \pm 0.518b	3.514 \pm 1.417a	5.767 \pm 1.723b	1.120 \pm 0.018b	
	Viruliferous sucking (Trt3: RRSV infected)	2.365 \pm 0.164a	0.750 \pm 0.338a	0.581 \pm 0.064a	3.115 \pm 0.497a	3.896 \pm 1.932b	5.519 \pm 1.539a	1.109 \pm 0.010a	
Vegetative growth									
RRSV infected period (B)	10 Initial tillering stage	2.118 \pm 0.027a	0.331 \pm 0.061a	0.647 \pm 0.022e	2.449 \pm 0.081a	6.618 \pm 1.369g	3.790 \pm 0.237a	1.099 \pm 0.008a	
	20 Early tillering stage	2.171 \pm 0.029b	0.402 \pm 0.035b	0.645 \pm 0.020e	2.572 \pm 0.037b	5.443 \pm 0.516f	3.994 \pm 0.133a	1.117 \pm 0.010b	
	30 Middle tillering stage	2.331 \pm 0.057c	0.520 \pm 0.024c	0.640 \pm 0.030e	2.851 \pm 0.046c	4.493 \pm 0.302e	4.463 \pm 0.165b	1.120 \pm 0.016bc	
	40 Final tillering stage	2.378 \pm 0.024d	0.627 \pm 0.057d	0.625 \pm 0.013e	3.004 \pm 0.067d	3.825 \pm 0.382d	4.808 \pm 0.169b	1.141 \pm 0.017d	
	Reproductive growth								
	50 Initial panicle stage	2.391 \pm 0.028d	0.807 \pm 0.095e	0.573 \pm 0.032cd	3.198 \pm 0.082e	2.999 \pm 0.361c	5.609 \pm 0.460c	1.126 \pm 0.013c	
	60 Middle panicle stage	2.450 \pm 0.027e	0.850 \pm 0.043e	0.584 \pm 0.022d	3.299 \pm 0.048f	2.889 \pm 0.146c	5.658 \pm 0.259c	1.116 \pm 0.006b	
70 Flowering stage	2.505 \pm 0.028f	1.010 \pm 0.064f	0.553 \pm 0.028c	3.515 \pm 0.059g	2.488 \pm 0.175b	6.375 \pm 0.404d	1.100 \pm 0.013a		
Ripening growth									
	80 Milk stage	2.575 \pm 0.030g	1.200 \pm 0.077g	0.498 \pm 0.033b	3.775 \pm 0.089h	2.154 \pm 0.128ab	7.621 \pm 0.699e	1.116 \pm 0.009b	
	90 Initial dough stage	2.648 \pm 0.045h	1.398 \pm 0.075h	0.455 \pm 0.023a	4.046 \pm 0.110i	1.898 \pm 0.085a	8.928 \pm 0.587f	1.116 \pm 0.011b	
Type of BPH sucking (A)		$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	0.899ns	$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	0.019*	$\leq 0.001^*$	
RRSV infected period (B)		$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	$\leq 0.001^*$	
AXB		0.092ns	0.319ns	0.090ns	0.178ns	$\leq 0.001^*$	0.590ns	$\leq 0.001^*$	

Notes: ns = non statistically significant difference, * = statistically significant difference ($P \leq 0.05$); 1/ = Means in the same column followed by different letters are significant differences ($P \leq 0.05$) by DMRT; RRSV infected period or days after inoculation (DAI); Chlorophyll A (Chl-A); Chlorophyll B (Chl-B); Carotenoids (Cx+c: xanthophylls and carotenes); Total Chlorophyll (TChl: Chl-A + Chl-B); Chl-A/B (A/B); Total Chlorophyll/Carotenoids (TChl/Cx+c); Phaeophytinization quotient (Pqa)

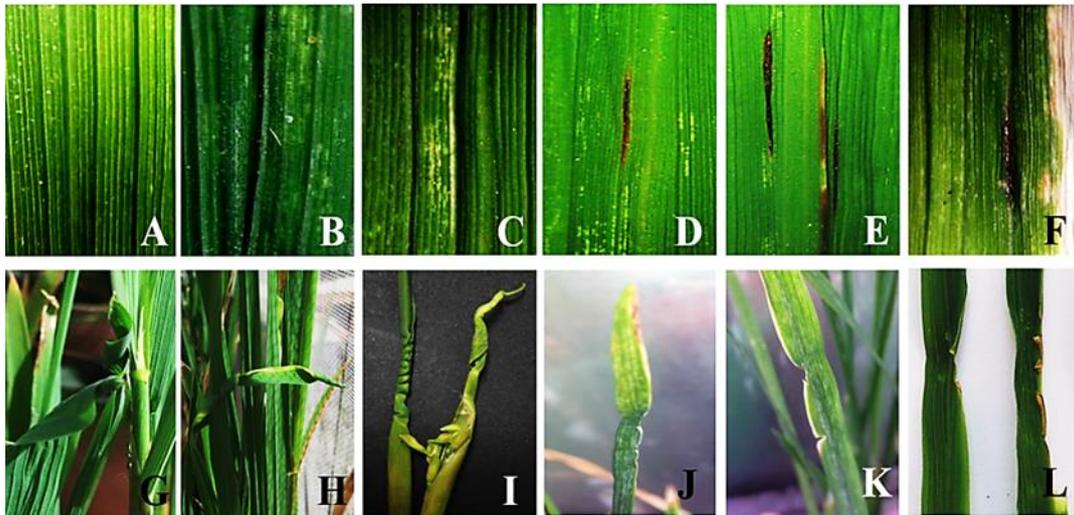


Figure 2 The symptoms of RRSV-infected cultivar TN1 leaves

(A) healthy TN1 rice leaf, (B–C) primary vein swelling on leaf sheaths (19 to 22 DAI), (D–F) development of vein–swelling, white and pale yellow, light brown, and to dark brown about 1 mm. to over 10 cm. long, 0.2 to 1 mm. wide and protrude from 0.1 to 1 mm. on the outer surface of the leaf blades and leaf sheaths (26 to 35 DAI), (G–H) twisted leaves, and (I–L) ragged leaves, respectively. (Source: Photographed by researchers under a stereo microscope)

ปฏิสัมพันธ์ที่จำเพาะระหว่างไวรัสพืชและเซลล์เจ้าบ้านก่อให้เกิดการแพร่กระจายของไวรัสผ่านระบบท่อลำเลียงไปยังบริเวณต่าง ๆ ของต้นพืช (disseminated infection) โดยสามารถตรวจพบเห็นได้ง่ายด้วยตาเปล่า และสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว ระบบท่อลำเลียงในพืชมีความสำคัญในการเคลื่อนย้ายและแพร่กระจายอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (virion) และอนุภาคขนาดเล็กที่ไม่มีสมบัติทำให้เกิดการติดเชื้อ (non-infectious) ซึ่งเป็นอนุภาคเชิงซ้อนที่ปราศจากสารพันธุกรรมของไวรัส (subviral particle) ไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช ทั้งนี้กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้อย่างช้า (slow process) และจัดเป็นการเคลื่อนย้ายเชิงระบบ (systemic movement) โดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงต่อเซลล์ (Vuorinen et al., 2011) การเคลื่อนย้ายไวรัสผ่านระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเริ่มจากความสำเร็จในกระบวนการบุกรุกเซลล์จากรูปแบบในกระบวนการถ่ายทอดต่าง ๆ ซึ่งสมบัติของเซลล์ที่ถูกไวรัสบุกรุก (infected cell หรือ permissive cell) จนสามารถแสดงพฤติกรรมการก่อโรคในเซลล์ได้นั้น จะต้องอาศัยปฏิสัมพันธ์ที่จำเพาะในลักษณะปฏิสัมพันธ์ความเข้ากันได้เชิงซ้อน (multiple compatible interactions) ระหว่างโปรตีนองค์ประกอบของไวรัส (viral proteins) ชนิดตัวจับ (binding protein) ทั้งชนิดตัวจับที่จำเพาะ (specific receptor) หรือตัวจับกับโมเลกุลชนิดที่สอง (co-receptors) เพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformational changes) ของโปรตีนบริเวณพื้นผิวอนุภาคไวรัส (viral particle surface area) และโปรตีนชนิดตัวรับของเซลล์เจ้าบ้าน (host cellular factors) ร่วมกับเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ในกระบวนการบุกรุกเซลล์ และการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมของไวรัส เป็นต้น ซึ่งจัดเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุล (molecular host-virus proteins interaction) เพื่อตอบสนองการบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านของไวรัส ซึ่งเกิดจากกระบวนการถ่ายทอด (inoculation) การเคลื่อนย้ายไวรัส (movement) และแสดงอาการของโรค ตามลำดับ (Otulak-Koziel et al., 2018)

ระยะเริ่มต้นของการบุกรุกเซลล์พืชของไวรัสใบหงิกข้าวจะเกิดการสะสมไวรัสภายในไซโตพลาสซึมบริเวณท่ออาหาร (phloem) ของเส้นใบและกาบใบ จนเกิดเป็นลักษณะเส้นใบปมูนวมโป่งเป็นแถบยาว ซึ่งจะมีลักษณะปมูนสีขาว (white) หรือเหลืองอ่อน (pale yellow) และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (light brown) จนถึงสีน้ำตาลเข้ม (dark brown) ในภายหลัง (Parejarearn et al., 1985, 1987a, b) ทั้งนี้การสะสมอนุภาคไวรัสภายในเซลล์ท่อลำเลียงนี้จะทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการลำเลียงธาตุอาหารจากด้านล่างไปสู่ส่วนใบได้ไม่ดี ใบพืชจึงขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เส้นใบจึงเปลี่ยนสีในลักษณะต่าง ๆ ตามปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไป และในขณะเดียวกันใบซึ่งมีอาหาร

สะสมไว้แล้ว ไม่สามารถที่จะขนส่งน้ำตาลไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ จึงทำการเปลี่ยนน้ำตาลเหล่านั้นมาสะสมไว้ในรูปเม็ดแป้ง (starch grains) ภายในคลอโรพลาสต์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของคลอโรพลาสต์ลดลง (Russin et al., 1996) นอกจากนี้ยังพบลักษณะใบแคบและสั้นกว่าปกติ มีสีเขียวเข้ม และบางครั้งมีสีเหลืองซีดซึ่งเป็นลักษณะพร่องคลอโรฟิลล์ (discoloration) ตามลำดับ (Figure 2) (Ling, 1977; Cabauatan et al., 1978) ซึ่งลักษณะปฏิสัมพันธ์ของไวรัสใบหงิกข้าวและต้นข้าวที่แสดงลักษณะแตกต่างจากต้นข้าวปกตินี้สอดคล้องกับไวรัสสาเหตุโรคข้าวที่สำคัญอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายในพื้นที่เพาะปลูกข้าวเอเชีย ได้แก่ *Rice dwarf virus* (RDV) (Zhu et al., 2005), *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) (Zhou et al., 2013), *Rice stripe virus* (RSV) (Shi et al., 2016), *Rice stripe mosaic virus* (RSMV) (Chen et al., 2019) และ *Rice grassy stunt virus* (RGSV) (Helina et al., 2018) เป็นต้น

การรายงานถึงความอ่อนแอของต้นข้าวต่อโรคใบหงิกและประสิทธิภาพของพฤติกรรมการเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดไวรัสที่แตกต่างกัน ซึ่งมีความไม่แน่นอน (intermittent) และเมื่อศึกษาในสภาวะที่อากาศร้อนและความชื้นสูงในสภาพแปลงเพาะปลูก พบว่า หลังจากที่แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากท่ออาหารไปแล้วนั้น ทำให้การลำเลียงธาตุอาหารในต้นพืชเกิดการชะงัก และจะทำให้เกิดอาการต้นเหลืองซีดและแห้งตาย อาการเช่นนี้เกิดเร็วมากในสภาพอากาศสลัวๆ มีเมฆมาก เปรียบเทียบกับการสังเคราะห์ด้วยแสงในวันที่มีแสงแดดจะทำให้ต้นข้าวฟื้นตัวจากการถูกแมลงทำลายได้ (Na Phatthalung, 2014) อิทธิพลของไวรัสต่อชนิดและปริมาณรงควัตถุพืชที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพและก่อให้เกิดความเสียหายในระดับเซลล์ของพืช (Kaushik et al., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการลดลงของปริมาณรงควัตถุหลัก (primary pigment) ชนิดคลอโรฟิลล์เอและบี และรงควัตถุรอง (accessory pigment) ชนิดแคโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของคลอโรฟิลล์ และยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจากแสง (photo oxidation) จากการรายงานของ Oelmuller (2008) พบว่า เมื่อปริมาณรงควัตถุชนิดแคโรทีนอยด์ลดลงจะเป็นสาเหตุที่ส่งผลให้พืชมีปริมาณรงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์ลดลงด้วย เนื่องจากจะส่งผลต่อลักษณะความโปร่งแสง (abnormally translucent) ของคลอโรฟิลล์

พืชสามารถป้องกันตัวเองจากการรุกรานของเชื้อก่อโรคเมื่อได้รับการกระตุ้น (induced resistance) โดยกระบวนการตายอย่างมีแบบแผนของเซลล์หรือการตายโดยกำหนด (program cell death, PCD) เพื่อยับยั้งการบุกรุกเซลล์ของเชื้อก่อโรค (Srivastava et al., 2017) กลไกที่ตอบสนองต่อการรุกรานดังกล่าวข้างต้น เรียกว่า hypersensitive response (HR) ทำให้เชื้อก่อโรคในเนื้อเยื่อบริเวณเซลล์พืชที่ตายนั้นไม่ได้รับสารอาหารจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ส่งผลให้เกิดการชะงักของกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรค จากการศึกษาของ Taylor et al. (1971) และ Taylor et al. (1971) สนับสนุนว่า ภายในเซลล์พืชจะเกิดการขยายขนาดของคลอโรพลาสต์ ซึ่งจะเกิดควบคู่ไปกับการเสื่อมสภาพ (degeneration) ของกรานา (grana) และไทลาคอยด์ (thylakoid) และได้รับแรงกระตุ้นจากค่าออกซิโสมิติกที่มีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากกิจกรรมการสังเคราะห์ด้วยแสงที่บริเวณของเหลวภายในสโตรมา (Almasi et al., 2001) จนทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แยกออกจากผนังเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เสียหายและตายในที่สุด (Jones et al., 2006) กลไกและผลกระทบของปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสพืชและปริมาณรงควัตถุพืชนี้ ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic changes) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพื้นฐานของคลอโรพลาสต์ (ultrastructure of chloroplasts) ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Almasi et al. (2000) ที่รายงานว่า ปริมาณรงควัตถุพืชเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงระยะเวลาการแฝงของไวรัสในเซลล์พืชและระยะพัฒนาการของพืชอาศัย จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ปริมาณรงควัตถุหลักชนิดคลอโรฟิลล์เอและบีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ลักษณะอาการเด่นของโรคใบหงิกที่ปรากฏบนพืชอาศัย ใบพืชจะมีสีเขียวเข้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นจนถึงระยะที่ต้นข้าวเริ่มมีการสร้างช่อดอก ในขณะที่ลักษณะพร่องคลอโรฟิลล์ที่ปรากฏใบมีสีเหลืองซีดไม่ได้เป็นอาการเด่นของโรคใบหงิก จึงส่งผลให้ปริมาณรงควัตถุรองชนิดแคโรทีนอยด์ในต้นข้าวมีแนวโน้มลดลง

กลไกการตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรคดังกล่าวคล้ายกับกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) ที่เกิดขึ้นในสัตว์ จากการรายงานของ Huang et al. (2015) พบว่า ไวรัสใบหงิกข้าวก่อให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์ต่อม

น้ำลายของแมลงพาหะ และจากผลการวิจัยของ Zhang et al. (2016) พบว่า ต้นข้าวที่เป็นโรคหึงจะมี การเพิ่มขึ้นของไมโครอาร์เอ็นเอ (MicroRNAs: miRNAs) ชนิด miR319 (miR319 overexpression) และมีการลดการแสดงออกของยีน miR319-regulated *TCP* (*TEOSINTE BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF*) ชนิด *TCP21* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช (plant growth) ในระยะพัฒนาการของใบ (leaf development) (Manassero et al., 2013) ปรากฏการณ์ดังกล่าวส่งผลให้เกิดภาวะใบมีสีเขียวเข้มขึ้น (Bhogale et al., 2014) เนื่องจากการลดลงของกรดจัสโมนิก (jasmonic acid, JA) โดยปฏิสัมพันธ์ของ miR319 และ *TCPs* ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ของกรดจัสโมนิก ผ่าน JA-signaling pathway (Schommer et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lu et al. (2016) ที่ได้รายงานไว้ว่า ระดับการแสดงออกของโรคใบหึงข้าวบนพืชอาศัยเกี่ยวข้องกับยีนในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของกรดจัสโมนิก อย่างไรก็ตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้หลายทาง เช่น สัณฐานวิทยา (morphology) กายวิภาควิทยา (anatomy) สรีรวิทยา (physiology) เซลล์วิทยา (cell biology หรือ cytology) และชีวเคมี (biochemistry) เป็นต้น แต่ในบางครั้งความต้านทานที่พืชได้รับการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างขึ้นมานี้ อาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะทำให้พืชรอดพ้นจากการถูกรุกรานของเชื้อก่อโรค เนื่องจากเชื้อก่อโรคมักมีการสร้างโปรตีนที่เรียกว่า effector protein ซึ่งจะส่งเข้าไปภายในเซลล์พืชเพื่อยับยั้งหรือชะลอกระบวนการต้านทานโรคของพืช ทำให้พืชยังคงแสดงอาการของโรค ซึ่งเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกันของหลาย ๆ ปัจจัย ดังรายละเอียดที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ข้อเสนอแนะและแนวคิดเพื่อการพัฒนาเพิ่มเติมในอนาคต สำหรับการรายงานผลการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้มุ่งเน้นศึกษาเบื้องต้นถึงอิทธิพลของระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสใบหึงข้าวต่อความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณรงควัตถุในใบข้าวพันธุ์ใหญ่เนทีฟ 1 เพียงพันธุ์เดียว เนื่องจากเป็นข้าวพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานในการทดสอบโรค ซึ่งสามารถใช้ประยุกต์เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินชนิดและปริมาณรงควัตถุในตัวอย่างใบข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสสายพันธุ์อื่นทั้งในรูปแบบการติดเชื้อเชิงเดี่ยว (single infection) การติดเชื้อเชิงซ้อน (mix infection) รวมทั้งความแตกต่างของพื้นที่เกษตรกรรม ฤดูกาล และการบริหารจัดการในการเพาะปลูก อันจะนำไปสู่การสร้างสายพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อการทำลายของแมลงพาหะและไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น

สรุป

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า รงควัตถุหลักชนิดคลอโรฟิลล์เอและบีมีปริมาณน้อยที่สุดในประชากรต้นข้าวทดสอบที่ให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลซึ่งมีพฤติกรรมเป็นแมลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยง และช่วงระยะเวลาติดเชื้อไวรัสใบหึงข้าวที่เพิ่มขึ้นในประชากรต้นข้าวทดสอบส่งผลให้ปริมาณรงควัตถุหลักมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณรงควัตถุรองชนิดแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มลดลง และไม่มีปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างระยะเวลาการติดเชื้อไวรัสใบหึงข้าวในประชากรต้นข้าวทดสอบต่อชนิดและปริมาณรงควัตถุพืชทั้งชนิดรงควัตถุหลักและรงควัตถุรอง ตามลำดับ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) (Research and Researchers for Industries, RRI) ระดับปริญญาเอก สัญญาเลขที่ PHD59I0061 รหัส 5911004 จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) (Thailand Science Research and Innovation, TSRI) โดยมีบริษัท เจียไต่ จำกัด เป็นบริษัทเอกชนร่วมสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบพระคุณ กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างโรคข้าวและแมลงพาหะ สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Al-Debei, H., and S. Mugnai. 2011. Starch accumulation in the leaves of root-restricted pepper affects plant growth by a feedback-inhibition of the photosynthesis. *Advances in Horticultural Science* 25: 253-259.
- Almasi, A., D. Apatini, K. Bóka, B. Böddi, and R. Gáborjányi. 2000. BSMV infection inhibits chlorophyll biosynthesis in barley plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 227-233.
- Almasi, A., A. Harsanyi, and R. Gaborjanyi. 2001. Photosynthetic alterations of virus infected plants. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 36: 15-29.
- Bhogale, S., A.S. Mahajan, B. Natarajan, M. Rajabhoj, H.V. Thulasiram, and A.K. Banerjee. 2014. MicroRNA156: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiology* 164: 1011-1027.
- Cabauatan, P.Q., and K.C. Ling. 1978. A study of vein-swellings of rice plants infected with ragged stunt. *International Rice Research Notes* 3: 9-10.
- Chen, S., W. Li, X. Huang, B. Chen, T. Zhang, and G. Zhou. 2019. Symptoms and yield loss caused by *Rice stripe mosaic virus*. *Virology Journal* 16: 145.
- Disthaporn, S., H.D. Catling, D. Chettanachit, and M. Putta. 1985. Effect of time of infection of *Rice ragged stunt virus* on deepwater rice. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 3: 19-25.
- Helina, S., S. Sulandari, S. Hartono, and A. Trisyono. 2018. Detection and transmission of rice stunt virus on Cihorang and Situ Bagendit varieties. *Jurnal Hama dan Penyakit Tropika* 18: 169-176.
- Hibino, H., N. Saleh, and M. Roecha. 1979. Reovirus-like particles associated with Rice ragged stunt diseased rice and insect vector cells. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 45: 228-239
- 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: 11413.
- Huang, H.-J., C.-W. Liu, Y.-F. Cai, M.-Z. Zhang, Y.-Y. Bao, and C.-X. Zhang. 2015. A salivary sheath protein essential for the interaction of the brown planthopper with rice plants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 66: 77-87.
- Jones, J.D.G., and J.L. Dangl. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kana, R., M. Spundova, P. Iliik, D. Lazar, K. Klem, P. Tomek, J. Naus, and O. Prasil. 2004. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 78: 161-170.
- Inderjit, S.K. 2006. Phytotoxicity of selected herbicides to mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.). *Environmental and Experimental Botany* 55: 41-48.
- Ling, K.C. 1977. Rice ragged stunt disease. *International Rice Research Notes* 2: 6-7.
- Liu, H., X. Wang, K. Ren, K. Li, M. Wei, W. Wang, and X. Sheng. 2017. Light deprivation-induced inhibition of chloroplast biogenesis does not arrest embryo morphogenesis but strongly reduces the accumulation of storage reserves during embryo maturation in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 8: 1287.

- Lu, G., T. Zhang, Y. He, and G. Zhou. 2016. Virus altered rice attractiveness to planthoppers is mediated by volatiles and related to virus titre and expression of defence and volatile-biosynthesis genes. *Scientific Reports* 6: 38581.
- Luttmann, W., K. Bratke, M. Kupper, and D. Myrtek. 2006. *Immunology*. 1st Edition, Academic Press, MA.
- Manassero, N.G., I.L. Viola, E. Welchen, and D.H. Gonzalez. 2013. TCP transcription factors: architectures of plant form. *Biomolecular Concepts* 4: 111-127.
- Milne, R.G., E. Luisoni, L.K. Zhou, and K.C. Ling. 1981. Morphological and serological similarities of rice ragged stunt samples from China and the Philippines. *International Rice Research Notes* 6: 11-12.
- Miyazaki, N., T. Uehara-Ichiki, L. Xing, L. Bergman, A. Higashiura, A. Nakagawa, T. Omura, and R.H. Cheng.. 2008. Structural evolution of *Reoviridae* revealed by *Oryzavirus* in acquiring the second capsid shell. *Journal of Virology* 82: 11344-11353.
- Na Phatthalung, T. 2014. Comparison of one-step RT-PCR and DIBA for diagnosis of *Rice ragged stunt virus*. M. S. Thesis. Thammasat University, Rangsit Centre, Pathum Thani.
- Na Phatthalung, T., W. Rattanakarn, and W. Tangkananond. 2017. The application of chlorophyll absorbents to enhance efficiency of *Rice ragged stunt virus* detection in plant sap by Dot-immunobinding assay. *King Mongkut's Agricultural Journal* 35: 104-115.
- Na Phatthalung, T., W. Tangkananond, and W. Rattanakarn. 2017. The efficiency of *Rice ragged stunt virus* detection in the brown planthoppers by dot-immunobinding assay. *Thai Journal of Science and Technology* 6: 236-246.
- Oelmuller, R. 2008. Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplasmidic enzyme levels. *Photochemistry and Photobiology* 49: 229-239.
- Otulak-Koziel, K., E. Koziel, and B.E.L. Lockhart. 2018. Plant cell wall dynamics in compatible and incompatible potato response to infection caused by *Potato virus Y* (PVY^{NTN}). *International Journal of Molecular Science* 19: 1-23.
- Parejarearn, A., and H. Hibino. 1985. Distribution of *Rice ragged stunt virus* (RSV) in infected TN1 plants. *International Rice Research Notes* 10: 12.
- Parejarearn, A., and H. Hibino. 1987a. Ragged stunt virus (RSV) concentration in tolerant rice. *International Rice Research Notes* 12: 14.
- Parejarearn, A., and H. Hibino. 1987b. Symptoms and yield reduction in tolerant varieties infected with ragged stunt virus (RSV). *International Rice Research Notes* 12: 14-15.
- Ronen, R., and M. Galun. 1984. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany* 24: 239-245.
- Rungreangsri, U., N. Rungreangsri, and S. Pongjareankit. 2008. Histopathogenesis of *Rice ragged stunt virus* and viral evolution implication. Maejo University, Chiang Mai.
- Russin, W.A., R.F. Evert, P.J. Vanderveer, T.D. Sharkey, and S.P. Briggs. 1996. Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the sucrose export defective1 Maize Mutant. *Plant Cell* 8: 645-658.

- Schommer, C., J.F. Palatnik, P. Aggarwal, A. Chetelat, P. Cubas, E.E. Farmer, U. Nath, and D. Weigel. 2008. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biology* 6: 1991-2001.
- Shen, J., L. Song, K. Müller, Y. Hu, Y. Song, W. Yu, H. Wang, and J. Wu. 2016. Magnesium alleviates adverse effects of lead on growth, photosynthesis, and ultrastructural alterations of *Torreya grandis* seedlings. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-11.
- Shi, B., L. Lin, S. Wang, Q. Guo, H. Zhou, L. Rong, J. Li, J. Peng, Y. Lu, H. Zheng, Y. Yang, Z. Chen, J. Zhao, T. Jiang, B. Song, J. Chen, and F. Yan. 2016. Identification and regulation of host genes related to *Rice stripe virus* symptom production. *New Phytologist* 209: 1106-1119.
- Sogawa, K. 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Annual Review of Entomology* 27: 49-73.
- Srivastava, A., L. Agrawal, R. Raj, M. Jaidi, S.K. Raj, S. Gupta, R. Dixit, P.C. Singh, T. Tripathi, O.P. Sidhu, B.N. Singh, S. Shukla, P.S. Chauhan, and S. Kumar. 2017. *Ageratum enation virus* infection induces programmed cell death and alters metabolite biosynthesis in *Papaver somniferum*. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-15.
- Sumanta, N., C. Haque, J. Nishika, and R. Suprakash. 2014. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences* 4: 63-69.
- Taylor, A.O., and A.S. Craig. 1971. Plants under climatic stress: II. low temperature, high light effects on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiology* 47: 719-725.
- Taylor, A.O., and J.A. Rowley. 1971. Plants under climatic stress: I. low temperature, high light effects on photosynthesis. *Plant Physiology* 47: 713-718.
- Tomas, N., M.P. Zwart, G. Lafforgue, and S.F. Elena. 2014. Within-host spatiotemporal dynamics of plant virus infection at the cellular level. *PLoS Genetics* 10: 1-14.
- Vuorinen, A.L., J. Kelloniemi, and J.P. Valkonen. 2011. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants?. *Plant Science* 181: 355-363.
- Zhang, Y., X. Chen, F. Yang, L. Zhang, and W. Liu. 2016. miRNA: A novel link between *Rice ragged stunt virus* and *Oryza sativa*. *Indian Journal of Microbiology* 56: 219-224.
- Zhou, G., D. Xu, D. Xu, and M. Zhang. 2013. *Southern rice black-streaked dwarf virus*: a white-backed planthopper-transmitted *Fijivirus* threatening rice production in Asia. *Frontiers in Microbiology* 4: 1-19.
- Zhu, S., F. Gao, X. Cao, M. Chen, G. Ye, C. Wei, and Y. Li. 2005. The *Rice dwarf virus* P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. *Plant Physiology* 139: 1935-1945.