การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคข้าวด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา

Serological Studies on Host Range of Rice Virus Diseases

อมรา สนิมทอง[1] วิชชุดา รัตนากาญจน์[1] และ เมธี ปุตตะ[1]

Amara Sanimtong[1] Witchuda Rattanakarn[1] and Methie Putta[1]

ABSTRACT

The two serological techniques which are commonly used in rice virus research are Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Latex Agglutination Test (LA). These techniques were utilized to study host ranges of rice tungro virus (RTV) and rice ragged stunt virus (RRSV). Twelve weed species, 39 wild rice species, barley, wheat and corn were artificially inoculated with viruliferous insect, *Nephotettix virescens*, for RTV which composed of rice tungro bacilliform virus (RTBV) and rice tungro spherical virus (RTSV) and with viruliferous insect, *Nilaparvata lugens*, for RRSV.

Thirty days after inoculation, the second leaves from inoculated plants were collected and homoginized with 0.02 M Phosphate buffer pH 7.2 for ELISA test and with 0.02 M Tris- HCl pH 7.4 for LA test. ELISA technique was employed to detect RRSV in all the species of tested plants while LA and ELISA were used in RTBV and RTSV detection from wild rice and weeds species respectively.

The result showed that *Ischaemum rugosum, Echinochloa crussgali, Leptochloa chinensis* and corn contained solely RTSV wheras all wild rice species tested excepted *Oryzae redleyi* contained both RTBV and RTSV. Six weed species named *Monochoria vaginalis, M. vaginalis var. plantaginea, Digitaria adscendens, Chloris barbata, Echinochloa cruss-gali and Leptochloa chinensis* were found as hosts of RRSV including corn, barley and wheat. RRSV could not be detected from *O.officinalis* whereas all other species of wild rice gave positive reaction in ELISA.

Keywords: host plants, RTV, RRSV, serology

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสของข้าวด้วยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) และวิธี Latex Agglutination test (LA) ซึ่งเป็นเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่อาศัยปฏิกริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างเชื้อไวรัส (antigen) และแอนตีบอดี (antibody) ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากเชื้อไวรัสชนิดนั้น ๆ การทดลองนี้ทำเพื่อศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม และเชื้อไวรัสโรคใบหงิกของข้าว โดยนำเอาวัชพืช 12 ชนิด ข้าวป่า 39 สายพันธุ์ ข้าวโพด ข้าวบาเล่ย์ และข้าวสาลี มาทำการปลูกเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม และเชื้อไวรัสโรคใบหงิกของข้าว โดยใช้แมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นสีเขียว *(Nephotettix virescens)* และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *(Nilaparvata lugens)* ตามลำดับ. โดยใช้แมลงในอัตรา 5 ตัวต่อต้น หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 30-45 วัน จึงตัดใบที่สองจากยอดของพืชที่ทดสอบมาบดกับ 0.02 M Phosphate buffer สำหรับเชื้อไวรัส โรคใบหงิกทั้งบนข้าวป่าและวัชพืชทุกชนิด นำน้ำคั้นพืชมาตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี

(1) กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900.

ELISA ส่วนโรคใบสีส้มของข้าวซึ่งประกอบด้วย อนุภาคไวรัส 2 ชนิด คือ RTBV (Rice Tungro Bacilliform Virus) และ RTSV (Rice Tungro Spherical Virus) นั้นใช้วิธี LA ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในข้าวป่า และวิธี ELISA ตรวจหาเชื้อไวรัสบนวัชพืช

ผลจากการศึกษา พบว่า วัชพืช 3 ชนิด คือ หญ้าแดง *(Ischaemum rugosum)* หญ้าพงละมาน *(Echinochloa crussgali)* และหญ้าดอกขาว *(Leptochloa chinensis)* รวมทั้งข้าวโพด เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม ชนิด RTSV ส่วนข้าวป่าทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบพบอนุภาคไวรัสทั้งRTSV และ RTBV ยกเว้นข้าวป่า *Oryzae redleyi* ตรวจไม่พบอนุภาคทั้งสองชนิด

สำหรับพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิกของข้าวนั้น พบว่า วัชพืช 6 ชนิด คือ ต้นขาเขียดใบกว้าง *(Monochoria vaginalis)* ต้นขาเขียดใบแคบ *(M. varginalis var. plantaginea)* หญ้าพงข้าวนก *(Digitaria adscendens)* หญ้ารังนก *(Chloris barbata)* หญ้าพงละมาน และหญ้าดอกขาว รวมทั้งข้าวโพด ข้าวบาเล่ย์ และข้าวสาลี เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิก สำหรับข้าวป่าพบว่าทุกสายพันธุ์เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิก ยกเว้นข้าวป่าพันธุ์ *O. officinalis*

คำหลัก : พืชอาศัย เชื้อไวรัสโรคใบหงิก เชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม เซรุ่มวิทยา

คำนำ

วัชพืชและข้าวป่า เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในแปลงนาและบริเวณใกล้เคียงทั้งในและนอกฤดูการทำนา แมลงต่างๆ รวมทั้งแมลงพาหะมักจะมาอาศัยอยู่บนวัชพืชและข้าวป่าเหล่านี้ หลังฤดูเก็บเกี่ยวถ้าแมลงนั้นเป็นแมลงอมเชื้อไวรัส(Viruliferous vectors) ก็จะเป็นจุดเริ่มต้นในการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในฤดูการทำนาครั้งต่อไปได้ การที่ทราบว่าวัชพืชและข้าวป่าชนิดใดบ้างที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัส จะทำให้เราสามารถหาวิธีการป้องกันกำจัดไว้ถูกต้อง และทันท่วงที

การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสนอกจากจะเป็นประโยชน์ในแง่ของการป้องกันกำจัดโรคไวรัสแล้ว ยังเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์อีกด้วย เพราะนักปรับปรุงพันธุ์สามารถนำเอายีน(gene) ที่ต้านทานเชื้อไวรัสจากข้าวป่า หรือวัชพืชตระกูลเดียวกันไปผสมกับพืชพันธุ์ปลูกที่ต้องการเพื่อให้ได้พันธุ์พืชที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส(Bos 1981) เช่น ในข้าวป่าพันธุ์ *Oryzae nivara* พบว่ามียีนต้านทานต่อเชื้อไวรัสโรคเขียวเตี้ย (grassy stunt) (Ling 1972) และนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้นำยีนจากข้าวป่าพันธุ์นี้ไปผสมกับข้าวพันธุ์ปลูก ทำให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสโรคเขียวเตี้ยซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรอย่างมาก

โดยทั่วไปการวินิจฉัยว่าพืชใดเป็นโรคหรือไม่นั้น มักจะดูลักษณะอาการผิดปกติที่พืชแสดงออกมาด้วยตาเปล่า แต่วัชพืชและข้าวป่า เมื่อได้รับเชื้อแล้วอาจจะไม่แสดงอาการออกมาให้เห็นอย่างชัดเจนหรือไม่แสดงอาการเลยถึงแม้จะมีเชื้อไวรัสอยู่ ซึ่งอาจจะทำให้การวินิจฉัยโรคด้วยตาเปล่าผิดพลาดได้ โดยเฉพาะโรคใบสีส้มของข้าว ซึ่งในปัจจุบันพบแล้วว่าประกอบด้วยอนุภาคไวรัส 2 ชนิด คือ Rice Tungro Bacilliform Virus (RTBV) และ Rice Tungro Spherical Virus (RTSV) (Hibino *et al.* 1987) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะนำเอาวิธี ELISA และ LA มาใช้ในการศึกษาพืชอาศัยของไวรัสโรคใบสีส้มและเชื้อไวรัสโรคใบหงิก เพราะวิธีการทั้ง 2 นี้ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และให้ผลการตรวจที่แม่นยำ ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์อย่างมาก

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม

มีรายละเอียด ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ทำการเพาะเมล็ดวัชพืช จำนวน 12 ชนิด และข้าวป่า 39 สายพันธุ์ ข้าวโพด ข้าวบาเล่ย์ และข้าวสาลี ในกะบะพลาสติก เมื่อต้นกล้าเริ่มงอกจึงย้ายไปปลูกในกระถางดินจำนวน 5 ต้นต่อกระถาง สำหรับวัชพืช ข้าวป่า ข้าวโพด ข้าวบาเล่ย์ และข้าวสาลี จำนวนที่นำมาทดสอบขึ้นอยู่กับจำนวนกล้าที่งอกจากเมล็ด เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 15 วัน จึงนำมาใช้ในการทดสอบ

2. การเตรียมแมลงอมเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม โดยการนำแมลงตัวเต็มวัยเพลี้ยจักจั่นสีเขียว *(Nephotettix virescens)* มาดูดกินบนต้นข้าวที่เป็นโรคใบสีส้มนาน 4 วัน เนื่องจากเชื้อไวรัสโรคใบสีส้มเป็นไวรัสชนิด semi-persistent หลังจากแมลงดูดกินแล้ว แมลงสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่พืชต้นอื่นได้

3. การปลูกเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม (Inoculation) ลงบนพืชทดลองโดยนำแมลงอมเชื้อที่เตรียมไว้มาปล่อยให้ดูดกินบนต้นวัชพืช ที่แยกปลูกในกระถาง โดยมี mylar cage ครอบอยู่ ใช้แมลงในอัตรา 5 ตัวต่อต้น ปล่อยให้แมลงดูดกินเป็นเวลานาน 48 ชม. วัชพืชแต่ละชนิดจะมี 5 ซ้ำ (กระถาง) หลังจากนั้นจึง

กำจัดแมลงด้วยสารฆ่าแมลง MIPCIN ในอัตราตามสลาก แล้วนำต้นพืชที่ปลูกเชื้อแล้วไปเก็บไว้ในเรือนปฏิบัติการ ส่วนข้าวป่าและข้าวโพดจะทำการปลูกเชื้อแบบ test tube inoculation โดยใช้ข้าวป่าใส่ในหลอดแก้วทดลอง อัตรา 1 ต้นต่อหลอด และปล่อยแมลงอมเชื้อให้ดูดกิน อัตรา 3 ตัวต่อต้น ต้นข้าวป่านั้นมาปักดำในกะบะ และเก็บไว้ในเรือนปฏิบัติการ ข้าวบาเล่ย์และข้าวสาลี จำนวนกล้าที่งอกในกระถางถอนให้เหลือ 20 ต้นต่อกระถาง จำนวน 9 กระถาง หลังจากปลูกเชื้อโดยให้แมลงดูดกินอัตรา 3 ตัวต่อต้น เป็นเวลา 48 ชม. แล้ว จึงนำข้าวบาเล่ย์และข้าวสาลีมาเก็บไว้ในเรือนกระจกที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 16-18° ซ. โดยมีต้นพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อของทุกพันธุ์และข้าวพันธุ์ TN1 ที่ปลูกเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ

4. เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส โรคใบสีส้มในข้าวป่า คือวิธี LA และ นำวิธี ELISA มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคใบสีส้มในวัชพืช ข้าวบาเล่ย์ ข้าวโพด และ ข้าวสาลี ขั้นตอนของการตรวจสอบมีดังนี้

4.1 วิธี Latex Agglutination test (LA)

1) ทำการเก็บใบข้าวป่า ใบที่ 2 จากยอดหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 30 วันมาบดเอาเฉพาะน้ำคั้นใบพืชด้วยเครื่องบดใบพืช (Homoginizer) โดยทำให้เจือจางเป็น 1:5 เท่า ใน Tris- HCL buffer pH 7.2

2) นำน้ำคั้นใบพืชไปผสมกับ Latex suspension ที่ผสมกับ Antiserum (IgG) ของ RTBV และ RTSV เรียบร้อยแล้ว (Sensitized Latex) ในหลุมของ microplate ที่อัตราส่วนน้ำคั้นพืชต่อ Sensitized latex เท่ากับ 1:1 (20 ul : 20 ul)

3) นำ microplate ที่ใส่ตัวอย่างเรียบร้อยแล้วไปเขย่าด้วยเครื่อง microplate shaker ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1-2 ชม.

4) นำสารผสมแต่ละตัวอย่างมาหยดลงบนแผ่นสไลด์ แล้วส่องดูตะกอนใต้กล้องจุลทรรศน์ ตัวอย่างใดมีเชื้อไวรัสอยู่จะเกิดตะกอนใหญ่สีดำ (clump) ถ้าน้ำคั้นพืชตัวอย่างใดเห็นเป็นจุดละเอียดเล็กๆ กระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าตัวอย่างนั้นไม่มีเชื้อไวรัส

4.2 วิธี Emzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ขั้นตอนการตรวจสอบได้ดำเนินตามวิธีของ Hibino และ Kimura (1982) ดังนี้

1) หยด Antiserum (IgG) ของ RTSV หรือ RTBV ที่เจือจางใน Coating Buffer (0.05 M Na_2Co_3 + 0.05 M $NaHCo_3$ + 0.02% NaN_3) อัตราส่วน 500 และ 1000 ul/ml ตามลำดับลงในภาชนะรองรับปฏิกริยา polystyrene microplate (Nunc) ในปริมาณ 200 ul ต่อหลุม และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 2-4 ชม. หลังจากนั้นจึงล้าง plate ทดสอบด้วย PBS-Tween (Phosphate buffer Saline pH 7.4 + 0.05% Tween 20) 3 ครั้ง

2) หยดน้ำคั้นใบพืชซึ่งบดใน 0.02 M PBS-Tween + 0.2% PVP (Polyvinyl pyrrolidone) อัตราส่วน 1:5 เท่า ลงในแต่ละหลุมของ microplate ที่ coat ด้วย antiserum แต่ละชนิดแยกกันในปริมาณ 200 ul ต่อหลุม บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. นาน 24 ชม. หรือที่ 37° ซ. นาน 4 ชม. หลังจากนั้นจึงดูดน้ำคั้นใบพืชออก และล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง

3) หยดสารละลาย IgG -enzyme -conjugate ที่เจือจางใน 0.02M PBS-Tween + 0.2% PVP ความเข้มข้น 1:500 และ 1:1000 สำหรับ RTSV และ RTBV ตามลำดับโดยหยดในปริมาณหลุมละ 200 ul และ บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 4 ชม. แล้วล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง

4) หยด Enzyme Substrate ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง P-Nitrophenyl Phosphate และ 10% Diethanolamine ในอัตราส่วน 1 mg/ml ในปริมาณ 200 ul ต่อหลุมบ่มไว้ประมาณ 20-30 นาที สำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสอยู่จะเกิดปฏิกริยาเห็นเป็นสีเหลือง และสำหรับตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อไวรัสจะเห็นเป็นสีขาว

5) หยุดปฏิกริยาโดยเติม 3N NaOH ในปริมาณ 50 ul ลงในแต่ละหลุมหลังจากนั้นจึงอ่านปฏิกริยาความเข้มของสีด้วยเครื่อง Micro ELISA Plate Reader ที่ช่วงคลื่น 405 นาโมมิเตอร์ ค่าเฉลี่ยของค่า Absorbance ตัวอย่างใดมากกว่า 3 เท่า ของค่า Absorbance ของพืชชนิดเดียวที่ไม่ได้ปลูกเชื้อถือว่าพืชตัวอย่างนั้นมีเชื้อไวรัสอยู่

การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิก

มีรายละเอียดขั้นตอนต่อไปนี้

1. เตรียมวัชพืช ข้าวป่า ข้าวสาลี ข้าวโพด และข้าวบาเล่ย์ เหมือนดังที่กล่าวแล้วข้างต้น ในข้อ 1.

2. การเตรียมแมลงอมเชื้อไวรัสโรคใบหงิก โดยการนำแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *(Nilaparvata lugens)* ตัวอ่อนระยะที่ 2 มาดูดกินบนต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกนาน 4 วัน หลังจากนั้นจึงย้ายแมลงมาดูดกินบนต้นข้าวปกตินาน 8 วัน เพื่อรอให้เชื้อไวรัสทวีจำนวนในแมลงก่อนนำมาใช้เนื่องจากเชื้อไวรัสโรคใบหงิกเป็นไวรัสจำพวก persistent

3. วิธีการปลูกเชื้อไวรัสโรคใบหงิกบนวัชพืช ข้าวป่า

ข้าวบาเล่ย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด ปฏิบัติเช่นเดียวกับการปลูกเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม

4. ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคใบหงิกของข้าวบนพืชทดลองทุกชนิดด้วยวิธี ELISA โดยเก็บใบพืชตำแหน่งที่ 2 จากยอดของต้นหลังปลูกเชื้อ 30 วัน ขั้นตอนการตรวจสอบเหมือนดังที่กล่าวแล้วข้างต้น การอ่านผลของปฏิกริยาอ่านด้วยเครื่อง Micro ELISA Plate Reader ที่ช่วงคลื่น 405 นาโมมิเตอร์ ค่าเฉลี่ยของ Absorbance ของตัวอย่างใดมีค่ามากกว่า 3 เท่าของค่าเฉลี่ยของพืชชนิดเดียวกันที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ถือว่าพืชตัวอย่างนั้นมีเชื้อไวรัสอยู่

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม

จากการตรวจสอบชนิดของไวรัสโรคใบสีส้ม ซึ่งประกอบด้วย 2 อนุภาค คือ RTBV และ RTSV บนวัชพืช 10 ชนิด ด้วยวิธี ELISA พบว่ามีวัชพืช 3 ชนิด คือ หญ้าแดง*(Ischaemum rugosum)* หญ้าพงละมาน*(Echinochloa cruss-gali)* และหญ้าดอกขาว*(Leptochloa chinensis)* รวมทั้งข้าวโพด ตรวจพบเฉพาะไวรัสอนุภาค RTSV เท่านั้น แต่ไม่พบไวรัสอนุภาค RTBV บนพืชทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (Table 1) ผลการทดลองครั้งนี้ตรงกับรายงานของ Ou (1985) ซึ่งพบว่าหญ้าพงละมานและหญ้าแดงเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบสีส้มเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Anjaneyulu *et.al* (1988a) ได้ทำการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม และตรวจหาเชื้อด้วยวิธี ELISA เช่นเดียวกัน เขาได้รายงานว่าพบอนุภาคทั้ง 2 ชนิด คือ RTBV และ RTSV บนหญ้ารัดเขียด*(Fimbristylis liacea)* ซึ่งในการทดลองนี้ไม่พบเชื้อไวรัสบนวัชพืชนี้เลย และในทางตรงกันข้ามเขาไม่พบอนุภาค RTSV บนหญ้าดอกขาว แต่พบบน หญ้าไทร *(Leersia hexandra)* และหญ้าคา*(Imperata cylindrica)* การที่ผลการทดลองไม่ตรงกัน อาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีจำนวนน้อยกว่า และ Anjaneyulu ใช้ค่าเฉลี่ยของ Absorbance เพียงอย่างเดียว ในการตัดสินว่าพืชใดมีเชื้อไวรัสอยู่หรือไม่ ในขณะที่การทดลองนี้ได้ใช้ค่า Absorbance ประกอบกับพิจารณาการเกิดสีเหลืองของปฏิกริยาที่เห็นได้ชัดเจนของแต่ละตัวอย่าง ในการตัดสินว่าตัวอย่างพืชใดมีเชื้อไวรัสอยู่

จากข้าวป่าพันธุ์ต่างๆจำนวน39สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ พบว่า ข้าวป่า 36 สายพันธุ์มีไวรัสทั้ง 2 ชนิด คือ RTBV และ RTSV อยู่ด้วยกัน ในขณะที่ข้าวป่าพันธุ์ *Oryzae officinalis*

Table 1 Detection of RTBV and RTSV in the extracts of weed species and cereal crops by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Plant species		Total Inoculated plant	Plant infected with		
Scientific name	Thai name		RTBV	RTSV	RTBV+RTSV
Chloris barbata	Yaa rangnok	57	0	0	0
Digitaria adscendens	Yaa plong khaaonok	54	0	0	0
Ischaemum rugosum	Yaa daeng	49	0	1	0
Echinochloa cruss-gali	Yaa plong lamaan	36	0	2	0
Imperata cylindrica	Yaa Khaa	23	0	0	0
Leptochloa chinensis	Yaa yon huu	36	0	2	0
Jussica linifolia	Thian naa	15	0	0	0
Leersia hexanda	Yaa sai	5	0	0	0
Sphenochea zeylanica	Phak pot	15	0	0	0
Panicum repens	Yaa channakart	5	0	0	0
Fimbristylis miliacea	Yaa rat khiat	5	0	0	0
Zea maydis		54	0	4	0
Wheat		180	0	0	0
Barley		180	0	0	0

พบแต่อนุภาค RTBV และ *O. eichingeri* พบแต่ RTSV ชนิดเดียว ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด บนข้าวป่าพันธุ์ *O. redliyi* (Table 2)

การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิก

จากการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสใบหงิกด้วยวิธี ELISA พบว่ามีวัชพืช 6 ชนิดที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิก(RRSV) คือ ต้นขาเขียดใบกว้าง*(Monochoria vaginalis)* ขาเขียดใบแคบ*(M. vaginalis var. plantagenea)* หญ้าพงข้าวนก*(Digitaria adscendens)* หญ้ารังนก*(Chloris barbata)* หญ้าพงละมาน และหญ้าดอกขาว (Table 3) แต่ Anjaneyulu *et al.* (1988 b) รายงานว่าไม่พบเชื้อไวรัสโรคใบหงิก ในหญ้ารังนก และหญ้าดอกขาว

นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวบาเลย์ ข้าวโพด และข้าวสาลี ก็เป็นพืชอาสัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิก เช่น ต้นข้าวบาเล่ย์ ข้าวสาลี และข้าวโพด ได้รับเชื้อไวรัสโรคใบหงิกแล้วสามารถแสดงอาการของโรคใบหงิกได้อย่างชัดเจน คือมีใบบิดหงิก ขอบใบแหว่งและต้นเตี้ย

ส่วนผลการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคใบหงิกบนข้าวป่าที่ได้ทำการปลูกเชื้อแล้วนั้น พบว่าข้าวป่า 13 สายพันธุ์ จาก 14 สายพันธุ์ที่ทดสอบมีเชื้อไวรัสโรคใบหงิก เฉพาะข้าวป่าพันธุ์ *Oryzae officinalis* ที่ไม่พบเชื้อไวรัสใบหงิก (Table 4)

การนำเอาเทคนิคทางเชรุ่มวิทยามาใช้ในการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคข้าวนี้นอกจากจะเป็นประโยชน์โดยตรงในแง่การป้องกันกำจัดแล้ว ยังมีประโยชน์อย่างมากในเรื่องของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคโดยนักปรับปรุงพันธุ์สามารถนำเอา gene ของข้าวป่าพันธุ์ *O. officinalis* และ *O. redleyi* ไปผสมกับ gene ของข้าวพันธุ์ปลูก เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่ต้านท่านต่อเชื้อไวรัสโรคใบหงิกและโรคใบสีส้มตามลำดับ

Table 2. Detection of RTV-associated virus in extracts of wild rice by latex agglutination test.1/

Entry	Total Inoculated plants	No. of infected plants			Entry	Total Inoculated plants	No. of infected plants		
		RTBV	RTSV	RTBV+RTSV			RTBV	RTSV	RTBV+RTSV
O. nivara	17	3	0	14	PSL-2-48	30	0	12	18
O. barthii	12	0	6	4	PSL-82-49	28	0	3	24
O.glaberrina	31	4	8	7	PSL-82-50	4	2	0	2
O.rulipogon	84	26	6	3	PSL-82-52	26	0	1	25
O.panclata	33	3	5	6	PSL-82-53	35	0	15	8
O.minuta	35	4	8	6	PSL-82-54	18	0	1	17
O.perennis	10	3	0	4	SPR-83-113	9	0	4	4
O.eichingeri	12	0	3	0	SRB-83-114	16	0	5	11
O.officinalis	15	1	0	0	SRB-83-115	7	0	0	6
O.ridleyi	6	0	0	0	SRB-83-116	4	0	0	4
O.nivaral, O.sativa	17	3	3	3	SRB-83-117	19	1	7	11
O.satival, O.spontaned	26	1	4	6	SRB-883-118	8	1	3	4
TNI (cheek)	53	3	11	35	SPR-83-119	14	1	6	6
Ayy-882-35	20	11	0	9	SPR-83-120	10	0	8	2
Ayy 882-36	25	0	0	25	SPR-83-121-2	5	3	1	1
Ayy-82-37	19	2	11	5	SPR-83-122	18	0	2	16
Ayy-82-38	10	4	2	3	SPB-83-141	4	0	0	4
Ayy-82-39	17	3	4	9	SPB-83-142	10	0	0	10
SRB-82-44	26	1	3	20	SPB-83-143	8	0	1	1
PSL-2-47	26	5	12	9	SPB-83-144	17	0	11	5

1/ Test samples that showed clumping under the microscope compared with unnoculated sampled were considered positive.

Table 3 Detection of rice ragged stunt virus in plant extract by ELISA

Plant species		Inoculated plant (No.)	RRSV infected plant (No.)	Infected plant (%)
Scientific name	Thai name			
Monochoria vaginalis	Kha Khiat	20	2	10
Monochoria vaginalis var. *plantaginea*	Kha Khiat	12	3	25
Digitaria adscendens	Yaa plong Khaaonok	50	9	18
Chloris barbata	Yaa rangnok	48	3	6
Echinochloa crusss-gali	Yaa plong lamaan	23	1	4
Leersia hexandra	Yaa sai	5	0	0
Fimbristylis miliacea	Yaa rat khiat	14	0	0
Leptochloa chinensis	Yaa yon huu	50	1	2
Sphenochea zeylanica	Phak pot	12	0	0
Rattboellic exaltata	Yaa prong khaai	24	0	0
Zea maydis		24	1	5
Wheat		165	27	16
Barley		177	28	16

Table 4 Detection of rice ragged stunt virus in wild rice extract by ELISA

Plant species	Inoculated plant (No.)	RRSV infected[1/] plant (No.)	Infected plant (%)
Oryzae glaberrima	15	7	47
O. nivara	6	3	50
O. officinalis	7	0	0
O. rufipogon	7	1	14
O. nivara X O. sativa	10	2	20
O. ridleyi	5	2	40
Ayy 82-35 [2/]	26	2	8
Ayy 82-36 [2/]	17	1	6
PSL 82-47 [2/]	14	3	21
SRB 82-44 [2/]	8	3	38
SRB 83-115 [2/]	15	6	40
SPR 83-119 [2/]	9	3	33
PPR 83-122 [2/]	26	8	31
SRB 82-143 [2/]	36	6	17

1/ Extract that gave yellow colour in a well and had absorbance value more than three time compared with extract of an uninoculated plant of the same species was considered positive in ELISA

2/ Line of Thai wild rices

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบสีส้ม ซึ่งประกอบด้วยอนุภาค 2 ชนิด คือ RTSV และ RTBV โดยวิธี ELISA และ LA พบว่ามีวัชพืช 3 ชนิด คือ หญ้าแดง หญ้าพงละมาน และหญ้าดอกขาว และข้าวโพด ที่มีไวรัสชนิด RTSV อยู่ แต่ไม่พบ RTBV บนวัชพืชที่ทดสอบ ส่วนข้าวป่าทุกพันธุ์ที่ทดสอบ พบว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดอยู่ด้วยกัน ยกเว้นข้าวป่าพันธุ์ *O. officinalis* และ *O. eichingeri* ซึ่งพบแต่ RTBV และ RTSV อย่างเดียวตามลำดับและไม่พบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ในข้าวป่าพันธุ์ *O. redleyi*

พบวัชพืช 6 ชนิดที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิกของข้าว คือ ต้นขาเขียดใบกว้าง ต้นขาเขียดใบแคบ หญ้าพงข้าวนก หญ้ารังนก หญ้าพงละมาน และหญ้าดอกขาว นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวโพด ข้างบาเล่ย์ และข้าวสาลี เป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิกด้วย ข้าวป่าทุกพันธุ์ที่ทดสอบสามารถเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสโรคใบหงิก ยกเว้น ข้าวป่าพันธุ์ *O. officinalis*

คำนิยม

ขอขอบคุณ คุณสงกรานต์ จิตรากร ศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์ข้าว ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ที่ได้เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวป่า และกลุ่มงานวิทยาการวัชพืช กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตรที่เอื้อเฟื้อเมล็ดวัชพืชชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Anjaneyulu, A., R.D. Daquioaq, Ma.E.Mesina, H.Hibino, R.T. Lubigan and K. Moody. 1988 a. Host plant of rice Tungro (RTV) associated viruses. *IRRN* 13 (4): 30-31.

Anjaneyulu, A., G.Z. Salamat, JR., Ma.E.Mesina, H.Hibino, R.T.Lubigan and K.Moody. 1988 b. Host plant of ragged stunt virus (RSV) *IRRN* 13 (4): 32-33.

Bos, L. 1981. Wild plants in the ecology virus disease *In* plant disease and vector : ecology and epidemiology (Ed. by K. Maramorosch and K.E. Harris) *Academic Press, Inc.*, p 1-33.

Hibino, H., M.Rochan and S. Sudarisman. 1987. Associated of two types of virus particles with Penyakit haband (Tungro disease) of rice in Indonesia. *Phytopathology* 68:1412-1416.

Hibino, H. and I. kimura. 1982. Detection of rice ragged stunt virus in insect vectors by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Phytopathology* 72: 656-659.

Ling, K.C. 1972. *Rice Virus Disease.* International Rice Research Institute Los Banos, Philippines. 142 pp.

Ou, S. 1985. *Rice Disease.* 2nd Edition. Commonwealth Mycological Institute. 380 pp.