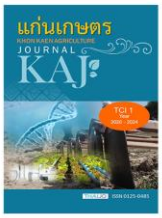
วารสารแก่นเกษตร
THAIJO
Content List Available at ThaiJo
Khon Kaen Agriculture Journal
Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



การประเมินอิทธิพลของระยะการเจริญเติบโตต่อความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณรงควัตถุในตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวทดสอบสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 ปลอดโรคและใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย

Influence of growth stages assessment on the correlation between variety of the pigment types and contents in *Rice grassy stunt virus* (RGSV)–free and infected standard susceptible variety Taichung Native 1 rice plant leaf crude sap test samples

ฐานัฏ ณ พัทลุง[1] และ วิภา ตังคนานนท์[1]*

Thanat Na Phatthalung[1] and Wipa Tangkananond[1,2]*

[1] *สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120*
[1] *Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120*
[2] *หน่วยวิจัยด้านเคมีทางยาแห่งมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี 12120*
[2] *Thammasat University Research Unit in Medicinal Chemistry, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120*

บทคัดย่อ: โรคเขียวเตี้ยข้าวมีสาเหตุจากไวรัสเขียวเตี้ยข้าว (*Rice grassy stunt virus*, RGSV) และสามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper, BPH: *Nilaparvata lugens* Stål) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายในระดับ 10 – 100% ในกระบวนการปลูกข้าวบริเวณพื้นที่นาชลประทานภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย งานวิจัยนี้ได้ทำการประเมินอิทธิพลของระยะการเจริญเติบโตต่อความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณรงควัตถุในใบข้าวสายพันธุ์ อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 (Taichung Native 1, TN1) ภายหลังช่วงระยะเวลาการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวของแมลง 10 – 90 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จากการวิจัย พบว่า ปริมาณรงควัตถุมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืชที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยในตัวอย่างใบข้าวทดสอบปลอดโรคและใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.363 – 4.124 มคก./มล. (แปรผันตรงแบบต่อเนื่อง) และ 0.106 – 2.233 มคก./มล. (แปรผกผันแบบไม่ต่อเนื่อง) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.635 – 0.447 มคก./มล. (แปรผกผันแบบไม่ต่อเนื่อง) และ 0.715 – 0.949 มคก./มล. (แปรผันตรงแบบต่อเนื่อง) ตามลำดับ
คำสำคัญ: ไวรัสเขียวเตี้ยข้าว; เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล; พันธุ์ข้าวไทชุงเนทีฟ 1; ปริมาณรงควัตถุพืช

ABSTRACT: Rice grassy stunt disease is caused by *Rice grassy stunt virus* (RGSV) and transmitted by the brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål), which damage loss in grain yield ranged from 10 to 100% in the rice cultivation process of central and lower-north irrigated rice field of Thailand. This research investigated the influence of growth stages assessment on the correlation between varieties of the pigment types and contents in Taichung Native 1 (TN1) rice plants after 10 to 90 days of acquisition period. The experiment was arranged in a completely randomized design (CRD). The results showed that the pigment contents had growth phases and stages relationship with statistically significant difference. The average of primary pigment contents of RGSV-free and infected rice plant test samples were ranged from 0.363 to 4.124 µg/mL (direct-continuous variation), and 0.106 to 2.233 µg/mL (inverse-discontinuous variation), respectively. Comparison with the average of accessory pigment contents were

* Corresponding author: wipatang@tu.ac.th

Received: date; January 2, 2020 Accepted: date; October 20, 2020 Published: date April 5, 2021

ranged from 0.635 to 0.447 µg/mL (inverse-discontinuous variation), and 0.715 to 0.949 µg/mL (direct-continuous variation), respectively.
Keywords: *Rice grassy stunt virus* (RGSV); brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål); Taichung Native 1 rice plant; plant pigment content

บทนำ

โรคเขียวเตี้ยข้าว (Rice grassy stunt disease, RGSD) เป็นโรคไวรัสข้าว (rice plant viral disease) โดยมีสาเหตุจากไวรัสเขียวเตี้ยข้าว (*Rice grassy stunt virus*, RGSV) ซึ่งจัดอยู่ในสกุล (genus) *Tenuivirus* ที่สามารถถ่ายทอดโดยแมลงพาหะจำพวกปากแทงดูด (piercing-sucking type) ชนิดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper, BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål, 1854) ในอันดับ (order) Hemiptera อันดับย่อย (suborder) Homoptera ซึ่งเป็นอันดับเดียวกับเพลี้ยชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เพลี้ยกระโดด (planthopper) เพลี้ยจักจั่น (leafhopper) แมลงหวี่ขาว (whitefly) และเพลี้ยแป้ง (mealy bug) เป็นต้น และอยู่ในวงศ์ (family) Delphacidae วงศ์ย่อย (subfamily) Fulgoroidea (delphacid planthoppers) (ITIS-Report, database) โรคเขียวเตี้ยข้าวนี้นับเป็นโรคไวรัสข้าวที่มีความสำคัญต่อกระบวนการปลูกข้าว และส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวในเขตพื้นที่นาชลประทานภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยรวมทั้งพื้นที่ปลูกข้าวเอเชียอื่น ๆ โดยครอบคลุมพื้นที่ตั้งแต่เอเชียใต้จนถึงเอเชียตะวันออกในระดับ 10 – 100% (Ramirez, 2008; Satoh et al., 2013; Na Phatthalung et al., 2017; Na Phatthalung and Tangkananond, 2017) ทั้งนี้มีรายงานพบการระบาดครั้งแรกที่สถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ ประเทศฟิลิปปินส์ (International Rice Research Institute, IRRI) ในปี พ.ศ. 2505 และสำหรับประเทศไทยพบโรคนี้ในปี พ.ศ. 2509 แต่ไม่พบการระบาดเป็นพื้นที่กว้างจนกระทั่งมีรายงานการแพร่ระบาดครั้งแรกเมื่อเดือนธันวาคมในปี พ.ศ. 2525 ในพื้นที่ปลูกข้าวพันธุ์มรกตและพันธุ์ไข่มุกดำ บริเวณท้องที่อำเภอบ้านโพธิ์ จังหวัดฉะเชิงเทรา และบริเวณแปลงนาของโครงการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี (Rivera et al., 1966; Hibino et al., 1985; Iwasaki et al., 1985)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏบนพืชอาศัยของไวรัสเขียวเตี้ยข้าวจะมีการแพร่กระจายไปยังบริเวณต่าง ๆ และจะปรากฏให้เห็นภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสแล้วประมาณ 6 - 20 วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นข้าว ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต โดยปรากฏลักษณะที่เด่นชัด ได้แก่ ต้นเตี้ยแคระแกรน (stunt) และแตกกอเป็นพุ่มแจ้ (branching) สีใบซีดจาง (pale leaves) และบริเวณแผ่นใบจะพบจุดประสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลอ่อน (rusty spots) (Shikata et al., 1980) ออกรวงช้า (delayed flowering) ให้เมล็ดด่างลีบและมีน้ำหนักเบา (unfilled grains) ทั้งนี้โรคเขียวเตี้ยข้าวสามารถพบการแพร่ระบาดร่วมกับโรคใบหงิกข้าว (Rice ragged stunt disease, RRSD) (Na Phatthalung, 2014) และโรคใบสีส้ม (Rice tungro disease, RTD) (Palmer and Rao, 1981) โดยความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวปลูก ระยะเวลาการถ่ายทอดโรค ระยะเวลาแฝงตัว ลักษณะประจำพันธุ์และความต้านทานที่จำเพาะของพันธุ์ข้าว ฤดูกาล ความผันแปรของภูมิอากาศ และการบริหารจัดการในแปลงเพาะปลูก เป็นต้น (Chen, 1984; Suzuki et al., 1988)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโรคพืชล้วนเป็นผลสืบเนื่องจากปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งทางชีวภาพและกายภาพ ซึ่งส่งผลต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่เกิดขึ้นในพืชอาศัย (Dardick, 2007; McMenamin et al., 2016) ลักษณะทางสัณฐานของโรคเขียวเตี้ยข้าว นอกจากความสูงและการลดลงของผลผลิตแล้ว ยังพบการเปลี่ยนแปลงขนาดใบและสีใบจากสีเขียวเป็นสีเหลืองซีด ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่สำคัญ ทั้งนี้บริเวณใบพืชหรือส่วนของพืชที่มีสีเขียวจะมีรงควัตถุ (pigments) ชนิดคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (photosynthesis) จากการศึกษาของอิทธิพลของรงควัตถุพืชโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของ Inderjit (2006) พบว่า เมื่อปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์เป็นผลให้เกิดความเสียหายในระดับเซลล์ ทำให้การสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชลดลงและนำมาซึ่งผลกระทบต่อพัฒนาการของกระบวนการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของพืช ตามลำดับ (Salama et al., 2011; García-Morales et al., 2018)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและปริมาณรงควัตถุในพืชอาศัยเนื่องจากไวรัสเขียวเตี้ยข้าวนี้ ยังไม่ปรากฏการรายงานอย่างชัดเจนเกี่ยวกับการเปรียบเทียบปริมาณของรงควัตถุในใบข้าวปลอดโรคและใบข้าวเป็นโรค ซึ่งเป็นเรื่องสำคัญทางวิชาการอย่างยิ่ง แม้ว่าในประเทศไทยอุบัติการณ์ของโรคเขียวเตี้ยข้าวนี้จะเกิดการระบาดน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการระบาดของโรคไวรัสของข้าวชนิดอื่น ๆ ในพื้นที่ปลูกข้าวเอเชียที่สำคัญโดยรอบประเทศไทย ทำให้การศึกษาและการรายงานข้อมูลอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับโรคเขียวเตี้ยข้าวในประเทศไทยมีข้อมูลน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ปลูกข้าวเอเชียอื่น ๆ อย่างไรก็ตามการระบาดของโรคนั้นมีปฏิสัมพันธ์กับการระบาดของแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการประเมินอิทธิพลของระยะการเจริญเติบโตต่อความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของรงควัตถุในใบข้าวปลอดโรคเปรียบเทียบกับใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อประยุกต์ใช้ในการประเมินศักยภาพความต้านทานและเป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสเขียวเตี้ยข้าว และการศึกษากลไกทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลต่อลักษณะของสัณฐานในแต่ละช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว สำหรับรับมือกับการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมที่จะส่งผลต่อการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในถิ่นธรรมชาติของไวรัสสาเหตุโรคข้าวเพื่อทำลายผลผลิตข้าว เป็นต้น

วิธีการศึกษา

การเตรียมประชากรแมลงพาหะบริสุทธิ์

ตัวอย่างแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิชาการโรคข้าว กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ซึ่งได้คัดเลือกตัวอย่างแมลงพาหะด้วยการใช้กับดักแสงไฟ (light trap) กำลังไฟ 40 วัตต์ ตั้งในช่วงเวลา 18:00 - 20:00 น. ดักจับแมลงจากแปลงนาชลประทานของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จับแมลงโดยใช้หลอดดูดแมลงจากกับดัก นำมาเพาะเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 16×16×24 นิ้ว ซึ่งผนังกรงบุด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 เมท (mesh) ภายในสภาพเรือนทดลองของกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ระดับอุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ร้อยละความชื้นสัมพัทธ์ (%relative humidity, RH) ประมาณ 70 ± 10 และช่วงแสง (photoperiod) ประมาณ 8 - 10 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้ต้นกล้าข้าว กข7 ปลอดโรค (อายุข้าว 7 - 10 วัน และสูงประมาณ 6 - 9 ซม.) เป็นพืชอาศัยและพืชอาหาร ซึ่งจะทำการปล่อยแมลงพาหะที่คัดเลือกมาได้ในรุ่น F1 วางไข่และเจริญเติบโตครบวงจรชีวิตอย่างต่อเนื่อง จำนวนอย่างน้อย 3 รุ่น (F3) จะได้ประชากรแมลงพาหะบริสุทธิ์ (non-viruliferous BPHs) นำมาใช้ในการวิจัย (ไวรัสเขียวเตี้ยข้าวไม่มีการถ่ายทอดผ่านทางไข่) และจะทำการเปลี่ยนต้นข้าวชุดใหม่เพื่อเลี้ยงแมลงเมื่อต้นข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ประมาณ 50% (ใช้เวลานาน 3 - 5 วัน) และต้นข้าวที่นำมาใช้เลี้ยงแมลงจะไม่มีการฉีดพ่นสารเคมี แต่มีการกำจัดศัตรูของแมลง เช่น มด แมงมุม และจิ้งจก โดยวิธีการจับทำลาย

การเตรียมประชากรต้นข้าวทดสอบเพื่อใช้เป็นแหล่งอาศัยเพิ่มปริมาณไวรัสเขียวเตี้ย

ตัวอย่างต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคเขียวเตี้ยได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิชาการโรคข้าว กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ซึ่งได้คัดเลือกตัวอย่างต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนจากแปลงนาชลประทานของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี นำมาเพาะปลูกในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งอาศัยเพิ่มปริมาณไวรัสสำหรับการวิจัย และใช้ต้นข้าวพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 (TN1) ในการทดสอบโรค โดยนำต้นกล้าข้าวไทชุงเนทีฟ 1 ปลอดโรค (อายุข้าว 7 - 10 วัน และสูงประมาณ 6 - 9 ซม.) มาปักดำในกระถางรูปทรงกระบอกก้นปิดขนาด 6×6×6 นิ้ว กระถางละ 3 กอ กอละ 3 ต้น หลังจากปักดำแล้ว จึงถ่ายทอดไวรัสเขียวเตี้ยข้าวโดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

การถ่ายทอดไวรัสเขียวเตี้ยข้าว

คัดเลือกแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระยะตัวอ่อน (nymphal stage) วัยที่ 2 - 3 (instars) เพื่อดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคเขียวเตี้ยของข้าวอย่างชัดเจนประมาณ 50 - 100 ตัวต่อต้น ก่อนปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรคจะให้แมลงอดอาหาร (fasting period, FP) นาน 1 - 2 ชม. เมื่อครบเวลาปล่อยแมลงให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรค

(acquisition feeding period, AFP) จนกระทั่งต้นข้าวเริ่มเหี่ยวใช้เวลานาน 7 วัน จากนั้นย้ายแมลงไปเลี้ยงบนต้นกล้าข้าว กข7 ปลอดโรค (อายุข้าว 7 - 10 วัน และสูงประมาณ 6 - 9 ซม.) ซึ่งใช้เป็นพืชอาศัยและพืชอาหาร เพื่อรอระยะให้ไวรัสแฝงตัวในแมลง (lalent period, LP หรือ circulative period, CP) นาน 7 วัน และจะทำการเปลี่ยนต้นข้าวชุดใหม่เพื่อเลี้ยงแมลงเมื่อต้นข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ประมาณ 50% (ใช้เวลานาน 3 - 5 วัน) เมื่อครบเวลาแฝงตัวของไวรัสในแมลง จึงย้ายแมลงไปเลี้ยงบนต้นกล้าข้าวทดสอบพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 ปลอดโรค (อายุข้าว 7 - 10 วัน และสูงประมาณ 6 - 9 ซม.) ปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวเพื่อทำการถ่ายทอดไวรัส (inoculation feeding period, IFP) นาน 2 วัน จากนั้นนำต้นกล้าข้าวทดสอบที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสเขียวเตี้ยแล้ว มาพ่นสารป้องกันกำจัดแมลง และนำต้นข้าวทดสอบใส่ในกรงขนาด 20×20×42 นิ้ว ซึ่งผนังกรงบุด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 เมท เพื่อสังเกตลักษณะอาการของโรคบนพืชอาศัยและนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการวิจัย

การประเมินชนิดและปริมาณของรงควัตถุพืชแบบทำลายใบ

ดัดแปลงวิธีการประเมินชนิดและปริมาณของรงควัตถุพืชแบบทำลายใบจาก Hiscox and Israelstam (1979) และ Lichtenthaler and Wellburn (1983) ด้วยการคัดเลือกใบข้าว จำนวนตัวอย่างละ 1 กรัม บดให้ละเอียดในโกร่งบดสารซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารละลายเอทานอล 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×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 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 95% เป็นสารละลายไร้สิ่งตัวอย่างหรือตัวตั้งค่าที่ศูนย์ (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณรงควัตถุ (มคก./มล.) ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll A, Chl-A) คลอโรฟิลล์บี (Chlorophyll B, Chl-B) คลอโรฟิลล์รวม (Total Chlorophyll, TChl: Chl-A + Chl-B) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids, Cx+c) และฟีโอไฟทิน (Phaeophytin, P) ตามลำดับ **(Table 1)**

Table 1 Equations to determine concentrations (µg/ml) of plant pigments by 95% Ethanol in UV-Vis spectrophotometer

Plant pigments	Equations/Formula (µg/ml)
Chlorophyll A (Chl-A)	$13.36A_{664} - 5.19A_{649}$
Chlorophyll B (Chl-B)	$27.43A_{649} - 8.12A_{664}$
Total Chlorophyll (TChl)	Chl-A + 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 and Galun, 1984; Sumanta et al., 2014; Shen et al., 2016)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยประชากรต้นข้าวทดสอบประกอบด้วย 3 กลุ่มทดลอง (treatment, Trt) แบ่งตามรูปแบบการถ่ายทอด (transmission types) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวหรือสิ่งควบคุม (non-sucking leaves, Trt1) กลุ่มที่ 2 แมลงปกติดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวหรือใบข้าวปลอดโรค (non-

viruliferous BPHs suck leaves, Trt2) และกลุ่มที่ 3 แมลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวหรือใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย (viruliferous-BPHs suck leaves, Trt3) ตามลำดับ แต่ละกลุ่มประชากรต้นข้าวทดสอบนำมาเตรียมน้ำคั้นและคำนวณหาปริมาณรงควัตถุพืช **(Table 1)** ในแต่ละช่วงระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสในต้นข้าว (วัน) ที่แตกต่างกัน ช่วง 10 – 90 วัน (days after inoculation, DAI) ภายหลังจากการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวของแมลง ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) เปรียบเทียบความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (SPSS 16.0 for Windows®)

ผลการศึกษา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโรคเขียวเตี้ยที่ปรากฏบนต้นข้าวทดสอบสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโรคเขียวเตี้ยข้าว จากการทดสอบบนต้นข้าวทดสอบสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 แสดงดัง **Figure 1** ซึ่งพบว่า ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล **(Figure 2)** จะมีลักษณะลำต้นเตี้ยแคระแกรน (stunt) มีการแตกข้อและแขนงกอเพิ่มจากข้อที่อยู่ใกล้หรือสูงกว่าผิวดิน (excess branching) หรือเรียกลักษณะดังกล่าวว่า การแตกกอเป็นพุ่มแจ้ ใบจะแคบและสั้นกว่าปกติ (short leaves) ภายในช่วงระยะเวลา 6 - 7 วัน จากนั้นใบจะมีสีซีดจาง (pale leaves) ตั้งแต่ระดับสีเขียวซีดจาง (pale green) สีเขียวเหลือง (pale green yellow) และสีเหลืองซีดจาง (pale yellow) ตามลำดับ ซึ่งเป็นลักษณะพร่องคลอโรฟิลล์ (discoloration) ภายในช่วงระยะเวลาเริ่มต้น 7 - 12 วัน บริเวณใบและเส้นกลางใบทั้งเส้นกลางใบหลัก (main veins) เส้นกลางใบย่อย (minor veins) จะพบจุดประสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลอ่อน (rusty spots) ลักษณะกระจาย (sporadic) ทั่วแผ่นใบ และจะพบลักษณะสีแผ่นใบไม่สม่ำเสมอ (mottling) ต้นข้าวจะออกรวงช้า (delayed flowering) รวงไม่สมบูรณ์หรือโผล่ไม่พ้นกาบใบธง (malformed flag leaves) เมล็ดด่างลีบและมีน้ำหนักเบา (unfilled grains) ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสส่วนมากจะเกิดความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาและเหลืองแห้งตายภายในช่วงระยะเวลา 25 - 75 วัน

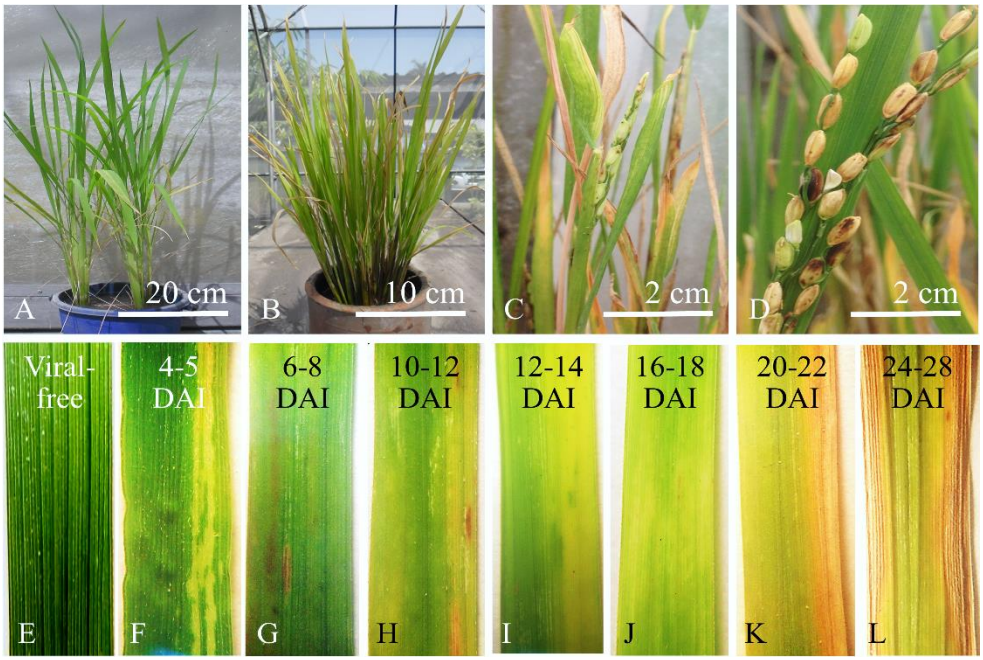


Figure 1 The symptoms of RGSV-infected rice cultivar Taichung Native 1 (TN1) (A) viral-free TN1 rice plants (45 DAG), (B) stunt and excess branching after 18-22 DAI, (C-D) delayed flowering, malformed flag leaves, and unfilled grains, (E) healthy rice leaves, (F-L) discoloration on infected rice leaves (DAI = Days after inoculation, Figure E-L captured under a stereo microscope by researchers)

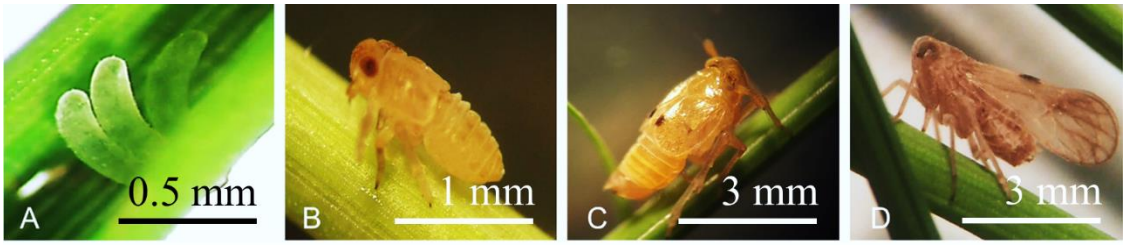


Figure 2 The stages of brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) (A) egg stage, ~6-7 days, (B) nymphal stage, ~7-14 days, and adult stage, ~10-15 days (C) brachypterous form or short winged form, and (D) macropterous form or long winged form (Figures were captured under a stereo microscope by researchers)

อิทธิพลของช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวต่อความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณรงควัตถุในใบข้าวทดสอบ ภายหลังระยะเวลาการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวของแมลงที่แตกต่างกัน

ชนิดและปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ (primary pigment)

การประเมินชนิดและปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม (มคก./มล.) ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างทดสอบ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (Trt1, สิ่งควบคุม) กลุ่มที่ 2 แมลงปกติดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (Trt2, ใบข้าวปลอดโรค) และกลุ่มที่ 3 แมลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว (Trt3, ใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย) ตามลำดับ ในแต่ละช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว (growth phases and stages) ได้แก่ การเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth) การเจริญเติบโตทางด้านการสืบพันธุ์ (reproductive growth) และการเจริญเติบโตของเมล็ด (ripening growth) ตามลำดับ และช่วงระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสในต้นข้าว (วัน) ที่แตกต่างกัน ช่วง 10 – 90 วัน (DAI) ภายหลังระยะเวลาการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวของแมลง แสดงดัง **Table 2** (จำแนกตามช่วงการเจริญเติบโต ระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสในต้นข้าว และกลุ่มตัวอย่างทดสอบ), **Table 3** (จำแนกตามชนิดรงควัตถุเฉลี่ยและกลุ่มตัวอย่างทดสอบ) และ **Figure 1** โดยพบว่า ปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างทดสอบ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

การประเมินปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ จำแนกตามช่วงการเจริญเติบโต ระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสในต้นข้าว และกลุ่มตัวอย่างทดสอบทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างทดสอบ **(Table 2)** พบว่า ปริมาณรงควัตถุเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม มีค่าสูงสุดในช่วงการเจริญเติบโตของเมล็ด (ripening growth) ซึ่งในกลุ่มตัวอย่างทดสอบกลุ่มที่ 1 (Trt1, สิ่งควบคุม) และกลุ่มที่ 2 (Trt2, ใบข้าวปลอดโรค) ปริมาณรงควัตถุเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ มีความสัมพันธ์ในลักษณะแปรผันตรงแบบต่อเนื่อง (direct-continuous variation) ตามช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่เพิ่มมากขึ้น 10 – 90 วัน ตามลำดับ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์เออยู่ในช่วงระดับ 2.119 – 2.674 และ 2.133 – 2.677 มคก./มล. ปริมาณคลอโรฟิลล์บีอยู่ในช่วงระดับ 0.363 – 1.450 และ 0.371 – 1.432 มคก./มล. และคลอโรฟิลล์รวมอยู่ในช่วงระดับ 2.482 – 4.124 และ 2.504 – 4.109 มคก./มล. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรงควัตถุเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ กลุ่มที่ 3 (Trt3, ใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย) พบว่า มีความสัมพันธ์ในลักษณะแปรผกผันแบบไม่ต่อเนื่อง (inverse-discontinuous variation) ตามช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว และระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสในต้นข้าวที่เพิ่มมากขึ้น 10 – 90 วัน ตามลำดับ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม อยู่ในช่วงระดับ 2.084 – 1.730, 0.149 – 0.106 และ 2.233 – 1.836 มคก./มล. ตามลำดับ

การประเมินปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ จำแนกตามชนิดรงควัตถุเฉลี่ยและกลุ่มตัวอย่างทดสอบทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างทดสอบ **(Table 3)** พบว่า ปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมจากกลุ่มตัวอย่างทดสอบกลุ่มที่ 1 (Trt1, สิ่งควบคุม) และกลุ่มที่ 2 (Trt2, ใบข้าวปลอดโรค) ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบจากกลุ่มตัวอย่างทดสอบกลุ่มที่ 3 (Trt3, ใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย) พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยกลุ่มตัวอย่างทดสอบ กลุ่มที่ 3 มีปริมาณรงควัตถุหลัก

เฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์รวมลดลงมากที่สุดที่ระดับ 1.905 และ 2.093 มคก./มล. ตามลำดับ และมีปริมาณรงควัตถุหลักเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดคลอโรฟิลล์บีเพิ่มขึ้นมากที่สุดที่ระดับ 0.188 มคก./มล.

ชนิดและปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ (accessory pigment)

การประเมินปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดแคโรทีนอยด์ จำแนกตามช่วงการเจริญเติบโตระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสในต้นข้าวและกลุ่มตัวอย่างทดสอบทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างทดสอบ แสดงดัง **Table 2** และ **Figure 1** โดยพบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ซึ่งปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบ มีความสัมพันธ์แบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous variation) ตามช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่เพิ่มมากขึ้น 10 – 90 วัน ตามลำดับ ได้แก่ ปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดแคโรทีนอยด์ในกลุ่มตัวอย่างทดสอบกลุ่มที่ 1 (Trt1, สิ่งควบคุม) และกลุ่มที่ 2 (Trt2, ใบข้าวปลอดโรค) มีความสัมพันธ์ในลักษณะแปรผกผันแบบไม่ต่อเนื่อง (inverse-discontinuous variation) โดยมีค่าอยู่ในช่วงระดับ 0.635 – 0.447 และ 0.635 – 0.457 มคก./มล. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดแคโรทีนอยด์ในกลุ่มตัวอย่างทดสอบกลุ่มที่ 3 (Trt3, ใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย) พบว่า มีความสัมพันธ์ในลักษณะแปรผันตรงแบบไม่ต่อเนื่อง (direct-discontinuous variation) โดยมีค่าอยู่ในช่วงระดับ 0.715 – 0.949 มคก./มล. ตามลำดับ

การประเมินปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดแคโรทีนอยด์ จำแนกตามชนิดรงควัตถุรองเฉลี่ยและกลุ่มตัวอย่างทดสอบทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างทดสอบ **(Table 3)** พบว่า ปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดแคโรทีนอยด์จากกลุ่มตัวอย่างทดสอบกลุ่มที่ 1 (Trt1, สิ่งควบคุม) และกลุ่มที่ 2 (Trt2, ใบข้าวปลอดโรค) ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดแคโรทีนอยด์จากกลุ่มตัวอย่างทดสอบกลุ่มที่ 3 (Trt3, ใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย) พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และมีปริมาณรงควัตถุรองเฉลี่ยของน้ำคั้นใบข้าวทดสอบชนิดแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นมากที่สุดที่ระดับ 0.807 มคก./มล.

Table 2 Influence of rice growth stages after 10 to 90 DAI on the correlation between variety of the pigment types and contents in disease-free and RGSV-infected standard susceptible variety TN 1 rice plant leaf crude sap test samples (µg/mL)

Growth phases and stages	DAI	Varieties of the pigment types and contents in disease-free and RGSV-infected standard susceptible variety TN 1 rice plant leaf crude sap test samples (µg/mL)														
		Non-sucking leaves (Trt 1: Control leave sap)					Non-viruliferous BPHs suck leaves (Trt 2: Disease-free leave sap)					Viruliferous-BPHs suck leaves (Trt 3: Infected leave sap)				
		Chl-A[1/]	Chl-B[1/]	Cx+c[1/]	TChl[1/]	Pqa[1/]	Chl-A[1/]	Chl-B[1/]	Cx+c[1/]	TChl[1/]	Pqa[1/]	Chl-A[1/]	Chl-B[1/]	Cx+c[1/]	TChl[1/]	Pqa[1/]
Vegetative phase																
Initial tillering stage	10	2.119a	0.363a	0.635d	2.482a	1.096a	2.133a	0.371a	0.635d	2.504a	1.100a	2.084f[2/]	0.149ab	0.715a	2.233g[2/]	1.116ab
Early tillering stage	20	2.186b	0.403a	0.654d	2.675b	1.123bc	2.184b	0.412ab	0.648e	2.596a	1.119b	2.064f	0.154abc	0.741ab	2.218fg	1.113a
Middle tillering stage	30	2.365c	0.521b	0.658d[2/]	2.886c	1.130cd	2.368c	0.503b	0.661e[2/]	2.871b	1.130b	1.988e	0.240d[2/]	0.727a	2.228g	1.120bc
Final tillering stage	40	2.389c	0.644c	0.630d	3.033d	1.150e[2/]	2.384c	0.671b	0.617cde	3.055c	1.151c[2/]	1.941d	0.220cd	0.771bc	2.161ef	1.121bcd
Reproductive phase																
Initial panicle stage	50	2.399c	0.840d	0.564c	3.239e	1.133d	2.393c	0.852d	0.559b	3.245d	1.130b	1.916d	0.228d	0.800c	2.143e	1.123cd
Middle panicle stage	60	2.461d	0.867d	0.583c	3.328e	1.120b	2.458d	0.861d	0.586bcd	3.319d	1.117b	1.868c	0.208bcd	0.833d	2.076d	1.127d[2/]
Flowering stage	70	2.522e	1.024e	0.547c	3.546f	1.093a	2.518e	1.002e	0.565bc	3.520e	1.092a	1.810b	0.202bcd	0.847d	2.013c	1.118abc
Ripening phase																
Milk stage	80	2.597f	1.229f	0.489b	3.827g	1.118b	2.584f	1.237f	0.490a	3.821f	1.117b	1.746a	0.185bcd	0.885e	1.931b	1.112a
Initial dough stage	90	2.674g[2/]	1.450g[2/]	0.447a	4.124h[2/]	1.124bc	2.677g[2/]	1.432g[2/]	0.457a	4.109g[2/]	1.122b	1.730a	0.106a	0.949f[2/]	1.836a	1.113a
F-test		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CV (%)		3.200	13.800	0.500	28.400	0.031	3.000	13.300	0.500	28.700	0.027	1.636	0.150	0.602	1.949	0.002

Notes: NS = Non significantly different, * = significantly different ($P \leq 0.05$), 1/ = Means in the same column followed by different letters are significant differences ($P \leq 0.05$) by Duncan's multiple range test (DMRT), 2/ = Average maximum, Chlorophyll A (Chl-A), Chlorophyll B (Chl-B), Carotenoids (Cx+c: xanthophylls and carotenes), Total Chlorophyll (TChl: Chl-A + Chl-B), Phaeophytinization quotient (Pqa), days after inoculation (DAI)

Table 3 Influence of transmission type treatments after 10 to 90 DAI on the correlation between varieties of the pigment types and contents in disease-free and RGSV-infected standard susceptible variety TN 1 rice plant leaf crude sap test samples (µg/mL)

TN 1 rice plant leaf crude sap (Transmission type treatments)	Variety of the TN1 rice plant pigment types and contents (µg/mL)				
	Chl-A[1/]	Chl-B[1/]	Cx+c[1/]	TChl[1/]	Pqa[1/]
Non-sucking leaves (Trt 1: Control leave sap)	2.412b[2/]	0.816b	0.578a	3.238b[2/]	1.121a[2/]
Non-viruliferous BPHs suck leaves (Trt 2: Disease-free leave sap)	2.411b	0.816b	0.580a	3.227b	1.120a
Viruliferous-BPHs suck leaves (Trt 3: Infected leave sap)	1.905a	0.188a	0.807b[2/]	2.093a	1.118a
F-test	*	*	*	*	NS
CV (%)	8.455	12.818	1.718	42.173	0.000

Notes: NS = Non significantly different, * = significantly different ($P \leq 0.05$), 1/ = Means in the same column followed by different letters are significant differences ($P \leq 0.05$) by Duncan's multiple range test (DMRT), 2/ = Average maximum, Chlorophyll A (Chl-A), Chlorophyll B (Chl-B), Carotenoids (Cx+c: xanthophylls and carotenes), Total Chlorophyll (TChl: Chl-A + Chl-B), Phaeophytinization quotient (Pqa), days after inoculation (DAI)

วิจารณ์

การประเมินอิทธิพลของช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวต่อชนิดและปริมาณรงควัตถุในตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวทดสอบสายพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 นั้น พบว่า ปริมาณรงควัตถุหลักและรงควัตถุรองในตัวอย่างปลอดโรคและตัวอย่างเป็นโรคเขียวเตี้ยนั้น มีความแตกต่างกันตามระยะเวลาการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับหลักการพื้นฐานของปริมาณรงควัตถุภายในพืชที่มีการรายงานในพืชหลายชนิด โดยจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะแปรผันตรงแบบต่อเนื่องและลักษณะแปรผกผันแบบไม่ต่อเนื่องกับระยะเวลาการเจริญเติบโตหรืออายุของพืชที่เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ (Yang and Lee, 2001) ในกรณีตัวอย่างใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ยนั้นจะพบลักษณะที่มีการแพร่กระจายของไวรัสไปยังบริเวณต่าง ๆ ของต้นพืช (disseminated infection) ก่อให้เกิดความเสียหายในระดับเซลล์ของพืช (Inderjit, 2006) ที่ส่งผลต่อรงควัตถุพืชในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) โดยผลการวิจัยพบว่าปริมาณรงควัตถุรองชนิดแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มในลักษณะแปรผันตรงแบบต่อเนื่องกับระยะเวลาการเจริญเติบโตหรืออายุของพืช และระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสเขียวเตี้ยในต้นข้าวที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ยที่ปรากฏบนต้นข้าวทดสอบ โดยใบข้าวจะมีสีเหลืองปรากฏจุดประสีน้ำตาลเหลืองและสีเขียวเหลืองกระจายไม่สม่ำเสมอทั่วบริเวณแผ่นใบและขอบใบจะแห้ง

พืชทั่วไปสามารถป้องกันตัวเองจากการรุกรานของเชื้อก่อโรคเมื่อได้รับการกระตุ้น (induced resistance) โดยกระบวนการตายอย่างมีแบบแผนของเซลล์หรือการตายโดยกำหนด (program cell death, PCD) เพื่อยับยั้งการบุกรุกเซลล์ของเชื้อก่อโรค (Srivastava et al., 2017) ทั้งนี้ไวรัสพืชจะมีการเพิ่มจำนวนและกระจุกตัวเป็นกลุ่มที่เรียกว่า viroplasms (หรือ cytoplasmic viral inclusions หรือ viral factories หรือ viral inclusion bodies) บริเวณเส้นกลางใบของพืชเป็นหลัก เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีอาหารและปัจจัยเพื่อการเพิ่มปริมาณจากท่อน้ำและท่ออาหารของเซลล์พืช รวมทั้งเป็นบริเวณที่ส่งผลต่อการเคลื่อนย้าย (flow pattern) ของไวรัสไปยังบริเวณต่าง ๆ ของพืชทั้งในระยะทางที่ใกล้และไกล (short and long-distance transport) ในลักษณะการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย (systemic infection) (Opalka et al., 1998) ผลจากการแพร่กระจายของไวรัสทำให้พืชขาดแคลนสารอาหารใน

กระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (chlorophyll biosynthesis) (Almasi et al., 2001) และในขณะเดียวกันนั้นใบพืชซึ่งมีอาหารสะสมไว้แล้ว ไม่สามารถที่จะขนส่งน้ำตาลไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ จึงทำการเปลี่ยนน้ำตาลเหล่านั้นสะสมไว้ในรูปเม็ดแป้ง (starch grains) ภายในคลอโรพลาสต์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของคลอโรพลาสต์ลดลง (Wolf, 1977; Liu et al., 2017) ด้วยเหตุนี้จึงปรากฏลักษณะอาหารใบพืชมีสีเหลืองซีด (leaf yellowing) หรือเรียกลักษณะนี้ว่า ลักษณะพร่องคลอโรฟิลล์ (chlorophyll degradation หรือ chlorosis) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของโรคเขียวเตี้ยข้าว และจากการศึกษาของ Satoh et al. (2013) พบว่า ลักษณะดังกล่าวนี้มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในกระบวนการพัฒนาการของลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphogenesis- and development-related genes) ที่เกี่ยวเนื่องกับการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (chlorophyll synthesis) และการตรึงคาร์บอน (carbon fixation) เพื่อให้ได้สารตั้งต้นสำหรับนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาล (Dardick, 2007) เช่น *Staygreen* (*Sgr*) และ gene encoding red chlorophyll catabolite reductase เป็นต้น และอีกลักษณะหนึ่งที่ปรากฏเด่นชัดของโรคเขียวเตี้ยข้าวบนพืชอาศัย คือ ลักษณะต้นเตี้ยแคระแกรนและแตกกอเป็นพุ่มแจ้ (excessive tillering หรือ shoot branching) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในการพัฒนาการแตกกอของลำต้น (genes associated with tillering) เช่น *RCN1* (*REDUCED CULM NUMBER 1*) (Yasuno et al., 2009), *SPL14* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* 14) (Miura et al., 2010) และ *Ostill1* (*ORYZA SATIVA TILLERING 1*) (Mao et al., 2007) เป็นต้น และจะมีระยะเวลาการแสดงออกของยีนซึ่งส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใน 28 วัน ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสอีกด้วย

จากการศึกษาของ Aguiero and Ling (1977) และ Shikata et al. (1980) พบว่า ประสิทธิภาพการถ่ายทอดไวรัสจากความแตกต่างของแหล่งที่มา (source of inoculum) ทั้งการถ่ายทอดไวรัสจากพืชเป็นโรคสู่แมลงพาหะ (active transmitter) และการถ่ายทอดไวรัสจากแมลงพาหะสู่พืช อยู่ในช่วง 3 – 50% และ 20 – 40% ตามลำดับ โดยแมลงพาหะในแต่ละระยะ (instar) มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดไวรัสได้แตกต่างกัน ดังนี้ ระยะที่ 2, 3, 4 และ 5 ในระดับ 30.8%, 83.3%, 26.6% และ 38.5% ตามลำดับ โดยพฤติกรรมการเป็นพาหะและการถ่ายทอดไวรัสของแมลงจะแปรผันตรงกับระยะแฝงตัวของไวรัส (latent period, LP) ที่เพิ่มมากขึ้นในแหล่งที่มาที่ช่วงระยะ 5 – 28 วัน และช่วงระยะเวลาการได้รับไวรัส (inoculation access period, IAP) ประมาณ 5 – 15 นาที ทั้งนี้จากการศึกษาพฤติกรรมการเป็นแมลงพาหะ พบว่า แมลงเพศผู้ เพศเมีย ชนิดปีกสั้นและปีกยาว ชนิดปีกใสและปีกเข้ม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีประสิทธิภาพการถ่ายทอดไวรัสต่อวันได้ในระดับ 80% และเมื่อแมลงมีพฤติกรรมการเป็นพาหะจะส่งผลให้มีวงจรชีวิตที่สั้นกว่าแมลงปกติที่ระดับ 16.1 และ 20.4 วัน ตามลำดับ (Rivera et al., 1966)

อย่างไรก็ตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวเกิดจากปฏิสัมพันธ์ร่วมกันของหลาย ๆ ปัจจัย ทั้งปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพ ดังนั้นการประเมินอิทธิพลของระยะการเจริญเติบโตต่อความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณรงควัตถุในตัวอย่างน้ำคั้นใบข้าวทดสอบปลอดโรคและใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ยนี้ จึงสามารถพิสูจน์ให้เห็นเป็นรูปธรรมถึงการเปลี่ยนแปลงรงควัตถุพืชเนื่องจากการถ่ายทอดไวรัส ข้อเสนอแนะและแนวทางการวิจัยเพื่อการพัฒนาเพิ่มเติมในอนาคตสำหรับการรายงานผลการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้มุ่งเน้นศึกษาเบื้องต้นถึงอิทธิพลของระยะการเจริญเติบโตต่อความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของรงควัตถุในใบข้าวสายพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 เพียงสายพันธุ์เดียว เนื่องจากเป็นข้าวสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานในการทดสอบโรค ซึ่งจะสามารถใช้ประยุกต์เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประเมินชนิดและปริมาณของรงควัตถุในตัวอย่างข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ความแตกต่างของรูปแบบการติดเชื้อในลักษณะการติดเชื้อเชิงเดี่ยว (single infection) การติดเชื้อเชิงซ้อน (mix infection) รวมทั้งการศึกษาในพื้นที่ปลูกที่หลากหลาย ฤดูกาล และการบริหารจัดการในการเพาะปลูก เพื่อเชื่อมโยงกับการเจริญเติบโตและผลผลิตที่ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างสายพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อการทำลายของแมลงพาหะและไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป เป็นต้น

สรุป

การประเมินปริมาณรงควัตถุหลักชนิดคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม ในตัวอย่างใบข้าวทดสอบสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 ปลอดโรคและใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะแปรผันตรงแบบต่อเนื่องและลักษณะแปรผกผันแบบไม่ต่อเนื่อง ตามลำดับ เปรียบเทียบกับปริมาณรงควัตถุรองชนิดแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างใบ

ข้าวทดสอบปลอดโรคและใบข้าวเป็นโรคเขียวเตี้ย พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะแปรผกผันแบบไม่ต่อเนื่องและแปรผันตรงแบบต่อเนื่อง ตามลำดับ กับช่วงระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวและระยะเวลาติดเชื้อของไวรัสเขียวเตี้ยในต้นข้าวที่แตกต่างกันช่วง 10 – 90 วัน ภายหลังการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวของแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) (Research and Researchers for Industries, RRI) ระดับปริญญาเอก เลขที่สัญญา PHD59I0061 รหัส 5911004 จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) (Thailand Science Research and Innovation, TSRI) โดยมีบริษัท เจียไต๋ จำกัด เป็นบริษัทเอกชนร่วมสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบพระคุณกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างโรคข้าวและแมลงพาหะ สถานที่และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aguiero, V.M., and K.C. Ling. 1977. Transmission of rice grassy stunt by three biotypes of *Nilaparvata lugens*. International Rice Research Notes. 2: 12.

Almasi, A., A. Harsányi, and R. Gáborjányi. 2001. Photosynthetic alterations of virus infected plants. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. 36: 15-29.

Chen, C.C. 1984. Rice virus diseases transmitted by brown planthopper in Taiwan with special reference to rice wilted stunt. Formosan Entomologist. 4: 83-91.

Dardick, C. 2007. Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. Molecular Plant-Microbe Interactions. 20: 1004-1017.

García-Morales, S., F.C. Gómez-Merino, L.I. Trejo-Téllez, L. Tavitas-Fuentes, and L. Hernández-Aragón. 2018. Osmotic stress affects growth, content of chlorophyll, abscisic acid, Na^+, and K^+, and expression of novel NAC genes in contrasting rice cultivars. Biologia Plantarum. 62: 307-317.

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

Hiscox, J.D., and G.F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian Journal of Botany. 57: 1332-1334.

ITIS-Report. (database). *Nilaparvata lugens* (Stål, 1854), Taxonomic Serial No: 902550. Available: shorturl.at/jGWX8. Accessed July 23, 2020.

Iwasaki, M., M. Nakano, and A. Shinkai. 1985. Detection of *Rice grassy stunt virus* in planthopper vectors and rice plants by ELISA. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 51: 450-445.

Inderjit, K.S. 2006. Phytotoxicity of selected herbicides to mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.). Environmental and Experimental Botany. 55: 41-48.

Lichtenthaler, H., and A. Wellburn. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. Biochemical Society Transactions. 11: 591-592.

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.

Mao, C., W. Ding, Y. Wu, J. Yu, X. He, H. Shou, and P. Wu. 2007. Overexpression of a NAC-domain protein promotes shoot branching in rice. New Phytologist. 176: 288-298.

McMenamin, A.J., L.M. Brutscher, W. Glenny, and M.L. Flenniken. 2016. Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. Current Opinion in Insect Science. 16: 14-21.

Miura, K., M. Ikeda, A. Matsubara, X.-J. Song, M. Ito, K. Asano, M. Matsuoka, H. Kitano, and M. Ashikari. 2010. *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. Nature Genetics. 42: 545-549.

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 (in Thai).

Na Phatthalung, T., and W. Tangkananond. 2017. The feeding behavior on rice plants of brown planthopper in the central irrigated rice field of Thailand. Thai Journal of Science and Technology. 6: 369-391 (in Thai).

Opalka, N., C. Brugidou, C. Bonneau, M. Nicole, R.N. Beachy, M. Yeager, and C. Fauquet. 1998. Movement of *Rice yellow mottle virus* between xylem cells through pit membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95: 3323-3328.

Palmer, L.T., and P.S. Rao. 1981. Grassy stunt, ragged stunt and tungro diseases of rice in Indonesia. Tropical Pest Management. 27: 212-217.

Ramirez, B.C. 2008. *Tenuivirus*. P. 24-27. In: B.W.J. Mahy and Marc H.V. van Regenmortel. Encyclopedia of Virology. 3rd Edition. Academic Press, NY.

Rivera, C.T., S.H. Ou, and T.T. Iida. 1966. Grassy stunt disease of rice and its transmission by the planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. Plant Disease Report. 50: 453-456.

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.

Salama, H.M., A.A. Al Watban, and A.T. Al-Fughom. 2011. Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. Saudi Journal of Biological Sciences. 18: 79-86.

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.

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: 1819.

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

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: 1172.

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.

Suzuki, Y., N. Widiarta, N. Raga, S. Nasu, and H. Hibino. 1988. Virulent strain of *Rice grassy stunt virus* (GSV) identified in Indonesia. International Rice Research Notes. 13: 24-25.

Wolf, F.T. 1977. Effects of chemical agents in inhibition of chlorophyll synthesis and chloroplast development in higher plants. The Botanical Review. 43: 395-425.

Yang, C.M., and Y.J. Lee. 2001. Seasonal changes of chlorophyll content in field-grown rice crops and their relationships with growth. Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences. 25: 233-238.

Yasuno, N., I. Takamure, S. Kidou, Y. Tokuji, A.N. Ureshi, A. Funabiki, K. Ashikaga, U. Yamanouchi, M. Yano, and K. Kato. 2009. Rice shoot branching requires an ATP-binding cassette subfamily G protein. New Phytologist. 182: 91-101.