

การประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับบัฟเฟอร์สกัดน้ำคั้นแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค Dot-Immunobinding Assay

Applying adsorbents for extraction buffers of insect vectors of the brown planthopper crude sap to enhance Rice ragged stunt virus detection efficiency by Dot-Immunobinding Assay

ฐานัน ญ พัทลุง^{1*}

Thanat Na Phatthalung^{1*}

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120

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

บทคัดย่อ: โรคใบหงิกข้าวก่อให้เกิดความเสียหายในระดับ 10-100% ในกระบวนการปลูกข้าวบริเวณพื้นที่นาชลประทานภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย โดยมีสาเหตุจากไวรัสใบหงิกข้าว (Rice ragged stunt virus, RRSV) ที่สามารถถ่ายทอดโรคได้โดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper, BPH: *Nilaparvata lugens* Stål) งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเพื่อลดสิ่งรบกวนชนิดเม็ดสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะ และเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค dot-immunobinding assay (DIBA) ผลการวิจัยพบว่า ชนิดสารดูดซับระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการลดสิ่งรบกวนในน้ำคั้นแมลงพาหะมากที่สุด ได้แก่ ผงถ่านกัมมันต์ แมกนีเซียมออกไซด์ และอะลูมิเนียมออกไซด์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจพบไวรัสได้ที่ช่วงอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลงพาหะ ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการเจริญเติบโตจนถึงระยะตัวเต็มวัย ได้แก่ 1:16-1:512, 1:8-1:512 และ 1:8-1:256 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารดูดซับจึงสามารถเพิ่มความไวและประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นแมลงพาหะได้ ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะมีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา การศึกษาระบาดวิทยาและปฏิสัมพันธ์ของไวรัสใบหงิกข้าวและแมลงพาหะ รวมทั้งการวางแผนดำเนินการ กำหนดนโยบายและการพัฒนายุทธศาสตร์ด้านการอารักขาพืช และการบริหารจัดการไวรัสก่อโรคข้าวและแมลงพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประสิทธิผลสูงสุดอย่างยั่งยืนในประเทศไทย

คำสำคัญ: ไวรัสใบหงิกข้าว; เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล; สารดูดซับ; สิ่งรบกวน; เทคนิค dot-immunobinding assay (DIBA)

ABSTRACT: Rice ragged stunt disease has caused from about 10 to 100% rice yield loss in irrigated rice cultivation in central plain and lower north, Thailand. It is caused by Rice ragged stunt virus (RRSV), transmitted by the brown planthopper (BPH: *Nilaparvata lugens* Stål). This research applied mixed adsorbents to extraction buffers to decrease interference of melanin pigments in BPH crude sap and enhance efficiency of RRSV detection by dot-immunobinding assay (DIBA). Results showed that maximum efficiency of 150 mg/mL interfered with adsorbents, including activated carbon, magnesium oxide, and aluminum oxide, respectively. RRSV was detected with the highest dilutions of BPH crude sap from the initial, through the adult, stages of insect growth at 1:16-1:512, 1:8-1:512, and 1:8-1:256, respectively. Therefore, mixing applications of adsorbents can enhance sensitivity and efficiency of RRSV detection

* Corresponding author: naphatthalung_thanat@hotmail.com

Received: date; April 30, 2021 Accepted: date; August 27, 2021 Published: date; March 7, 2022

in BPH crude sap. These findings may be useful for virology laboratory and epidemiological studies of RRSV interactions and insect vectors as well as planning, setting, and developing plant protection strategies and policies for sustainably effective rice virus and insect vector management in Thailand.

Keywords: rice ragged stunt virus (RRSV); brown planthopper (BPH); adsorbents; interference; dot-immunobinding assay (DIBA)

บทนำ

โรคใบหงิกข้าวหรือโรคจูข้าว (Rice ragged stunt disease, RRSD) จัดเป็นโรคไวรัสข้าวอุบัติซ้ำที่มีสาเหตุจากไวรัสใบหงิกข้าว [Rice ragged stunt virus (RRSV), *Oryzavirus. Reoviridae*] (Chen et al., 1997) ที่สามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะชนิดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล [brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål), Hemiptera : Delphacidae] (Ling and Aguiro, 1977; Ling et al., 1977) ซึ่งมีอุบัติการณ์การระบาดในพื้นที่เพาะปลูกข้าวบริเวณภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก โดยก่อให้เกิดความเสียหายในระดับ 10-100% (Palmer and Soepriaman, 1977; Naik, 1979) สำหรับประเทศไทยโรคใบหงิกข้าวพบการรายงานครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2520 ในบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวเจ้าพันธุ์ กข7 (paddy rice variety RD7) อำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา (Chetanachit et al., 1978; Disthaporn et al., 1983a; Disthaporn et al., 1983b) และพบการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในพื้นที่นาชลประทานบริเวณภาคกลางของประเทศไทย ซึ่งเป็นแหล่งปลูกข้าวแหล่งใหญ่ของประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2516 และระบาดเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน (Na Phatthalung and Tangkananond, 2017)

ไวรัสใบหงิกข้าวมีลักษณะอนุภาคเป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral particles) ขนาดประมาณ 60-80 นาโนเมตร (nm) ไม่มีเปลือกชั้นนอกห่อหุ้ม (non-enveloped virus particle หรือ naked virus) แต่มีชั้นโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรม (capsid protein) 2 ชั้น (double shelled) สารพันธุกรรมของไวรัสเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่เส้นตรง (linear dsRNA virus) จำนวน 10 ชิ้นส่วน (segment, S1-S10) รวมอยู่ภายในอนุภาคเดียวกัน (monopartite virus) ขนาดตั้งแต่ 1,162-3,849 คู่เบส จึงทำให้มีขนาดจีโนมประมาณ 26 กิโลเบส ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอนุรักษ์ที่ปลาย 5' และ 3' (conserved terminal sequences) เหมือนกันทุกชิ้นส่วนของจีโนม และมีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 0.76×10^6 - 2.48×10^6 ดาลตัน (Senboku et al., 1978; Yan et al., 1992)

วิธีการวินิจฉัยและตรวจสอบโรคพืชที่มีสาเหตุจากไวรัสนั้นถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นแรกสำหรับการบริหารจัดการโรค หนึ่งในเทคนิควิธีการวินิจฉัยและตรวจสอบที่หลากหลาย คือ เทคนิคทางซีรั่มวิทยา (serology) โดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันของแอนติเจนและแอนติบอดี (Na Phatthalung et al., 2017a; 2018) เทคนิค dot-immunobinding assay (DIBA) เป็นเทคนิคทางซีรั่มวิทยาที่มีหลักการเช่นเดียวกับเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่ให้ผลค่อนข้างเร็ว ใช้ระยะเวลาดำเนินการสั้น สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก ใช้ปริมาณตัวอย่างทดสอบน้อย และสามารถอ่านผลได้อย่างแม่นยำด้วยตาเปล่า (Yoshikawa, 1986; Na Phatthalung et al., 2015) การตรวจสอบไวรัสในพาหะได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบไวรัสเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เทคนิค DIBA จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบไวรัส หนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญ คือ การเตรียมน้ำคั้นตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบ เนื่องจากมีปริมาณของสิ่งรบกวน (interference) ที่ปนเปื้อนออกมาในน้ำคั้นสูง ซึ่งจะรบกวนการตรวจสอบปฏิกิริยาบนตัวรองรับปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อกันของแอนติเจนและแอนติบอดี และหากมีปริมาณไวรัสในตัวอย่างต่ำ (low virus content) อาจทำให้การรายงานผลเกิดความคลาดเคลื่อนได้จากผลบวกปลอม (false positive) และผลลบปลอม (false negative)

Yoshikawa et al. (1986) ได้ปรับปรุงขั้นตอนของเทคนิค DIBA เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบไวรัส พบว่าแอนติบอดีที่นำมาใช้จะต้องทำปฏิกิริยากับโปรตีนจากน้ำคั้นตัวอย่างปกติก่อนเพื่อลดปฏิกิริยาแทรกซ้อน (non-specific reactivity) เนื่องจากโปรตีนในน้ำคั้น และใช้ตัวอย่างน้ำคั้น (crude sap) ในการตรวจสอบไวรัสปริมาณ 1-5 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นของไวรัสในน้ำคั้นประมาณ 2-10 นาโนกรัม และระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีอยู่ในช่วงอัตราการใช้ 1:100-1:1,000 เท่า ขึ้นอยู่กับคุณภาพของแอนติบอดีและระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น นอกจากนี้ Chen et al. (2012) ได้ตรวจสอบ Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV, *Fijivirus. Reoviridae*) โดยประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับตัวทำลายอินทรีย์เพื่อประเมิน

ประสิทธิภาพการลดปริมาณสิ่งรบกวนชนิดคลอโรฟิลล์ในตัวอย่างน้ำคั้นพืช พบว่า ประสิทธิภาพของสารดูดซับที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (มก./มล.) ได้แก่ อะลูมิเนียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ เบนโทไนท์ และผงถ่านกัมมันต์ ตามลำดับ และประสิทธิภาพของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 100% ได้แก่ เอทิลอะซิเตท อะซิโตน เอทานอล เมทานอล และไดเอทิลอีเทอร์ ตามลำดับ และจากรายงานผลการวิจัยของคณะผู้วิจัย Na Phatthalung et al. (2017a) ได้ตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นพืชด้วยเทคนิค DIBA โดยการใช้ชนิดสารดูดซับเช่นเดียวกับการรายงานของ Chen et al. (2012) พบว่า การประยุกต์ใช้สารดูดซับชนิดแมกนีเซียมออกไซด์และอะลูมิเนียมออกไซด์ เปรียบเทียบกับเบนโทไนท์และผงถ่านกัมมันต์ที่ระดับความเข้มข้น 150 มก./มล. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นพืชบริเวณใบและลำต้นได้ในช่วงอัตราการเจือจางสูงสุด 1:1,500 และ 1:1,000 เท่าตามลำดับ และเมื่อใช้แมกนีเซียมออกไซด์และเบนโทไนท์ กับอะลูมิเนียมออกไซด์และผงถ่านกัมมันต์ สามารถตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นพืชบริเวณรากของต้นข้าวได้ในช่วงอัตราการเจือจางสูงสุด 1:50 และ 1:100 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของไวรัสใบหงิกข้าวที่บริเวณใบและลำต้น และบริเวณรากน้อยกว่าเดิมถึง 3 และ 10 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารดูดซับในการเตรียมน้ำคั้นตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค DIBA นี้ จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและความไวของวิธีการตรวจสอบได้

งานวิจัยฉบับนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค DIBA ด้วยการประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเพื่อลดสิ่งรบกวนชนิดเม็ดสีเมลานิน (melanin pigments) ที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการเตรียมน้ำคั้นแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสำหรับการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าว เนื่องจากสิ่งปนเปื้อนในน้ำคั้นแมลงจะรบกวนการปฏิบัติหน้าที่จำเพาะต่อกันของแอนติเจนและแอนติบอดี รวมถึงขั้นตอนการตรวจสอบปฏิกิริยาบนตัวรองรับปฏิกิริยา ผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นทางเลือกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นในระดับห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและภาคสนาม สำหรับการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวหรือไวรัสสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ ในเซลล์สิ่งมีชีวิตให้อาศัยหรือเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ทั้งชนิดแมลงพาหะและพืชอาศัย อีกทั้งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการศึกษาระบาดวิทยา การกำหนดยุทธศาสตร์และนโยบายในการบริหารจัดการเชิงรุกด้านการสอบสวนโรคและการรักษาพืช ป้องกัน ควบคุม และกำจัดแมลงพาหะและไวรัสสาเหตุโรคข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประสิทธิผลสูงสุดอย่างเป็นรูปธรรมที่ยั่งยืน สอดคล้องกับวิถีกษตรกรรมพื้นถิ่นและนวัตกรรมสมัยใหม่ รวมทั้งสถานการณ์ปัจจุบันและนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมประชากรแมลงบริสุทธิ์

คัดเลือกประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) ด้วยการใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ดักจับแมลงจากแปลงนาชลประทานของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอนองสี จังหวัดปทุมธานี นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 16×16×24 นิ้ว ซึ่งผนังกรงบุด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 เมท (mesh) ภายในสภาพเรือนทดลองของกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ระดับอุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity, RH) ประมาณ 70±10% และช่วงแสง (photoperiod) ประมาณ 8-10 ชม./วัน การเตรียมประชากรแมลงบริสุทธิ์ (non-viruliferous BPH population) จะทำการเลี้ยงแมลงโดยใช้ต้นกล้าข้าว กข7 ชนิดปลอดโรค (healthy variety RD7 rice plant seedlings) อายุข้าว 7-10 วัน และสูงประมาณ 6-9 ซม. เป็นพืชอาศัยและพืชอาหาร ซึ่งจะทำให้การปล่อยให้แมลงวางไข่บนต้นกล้าข้าวชนิดปลอดโรค (ไวรัสใบหงิกข้าวไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่ของแมลง) จากนั้นจึงแยกต้นกล้าข้าวที่แมลงได้วางไข่แล้วนำไปเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลงเพื่อรอระยะให้ไข่แมลงฟักเป็นตัวและเจริญเติบโตครบวงจรชีวิต จำนวนอย่างน้อย 3 รุ่น (F₃) จะได้ประชากรแมลงบริสุทธิ์นำมาใช้ในการวิจัย ทั้งนี้จะทำการเปลี่ยนต้นกล้าข้าวชนิดปลอดโรคชุดใหม่เพื่อเลี้ยงแมลง เมื่อต้นกล้าข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ประมาณ 50% (ใช้เวลานาน 3-5 วัน) โดยต้นกล้าข้าวชนิดปลอดโรคที่นำมาใช้เป็นพืชอาศัยและพืชอาหารสำหรับเลี้ยงแมลงนั้นจะไม่มีการฉีดพ่นสารเคมี แต่มีการกำจัดศัตรูของแมลง เช่น มด แมงมุม และจิ้งจก โดยวิธีการจับทำลาย

2. การเตรียมประชากรต้นข้าวเป็นโรคใบหงิกและต้นข้าวทดสอบ

คัดเลือกต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกอย่างชัดเจนจากแปลงนาชลประทานของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอนองแสง จังหวัดปทุมธานี นำมาเพาะปลูกในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นพืชอาศัยเพิ่มปริมาณไวรัสสำหรับการวิจัย และใช้ต้นข้าวพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานไทชุงเนทีฟ 1 (Taichung Native 1, TN1) เป็นพืชทดสอบโรค โดยนำต้นกล้าข้าวทดสอบชนิดปลอดโรค (healthy TN1 rice plant seedlings) อายุข้าว 7-10 วัน และสูงประมาณ 6-9 ซม. มาปักดำในกระถางดินรูปทรงกระบอกก้นปิด ขนาด 6×6×6 นิ้ว กระถางละ 3 กอ กอละ 3 ต้น หลังจากปักดำแล้ว จึงถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

3. การถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวจากพืชอาศัยสู่แมลงพาหะ

คัดเลือกประชากรแมลงบริสุทธิในทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงระยะตัวเต็มวัย เพื่อทำการถ่ายทอดไวรัสและปล่อยแมลงให้ดูดกินน้ำเลี้ยง (sap-sucking) จากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกอย่างชัดเจน โดยก่อนปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรคจะให้แมลงอดอาหาร (fasting period, FP) นาน 1-2 ชม. เมื่อครบเวลาปล่อยแมลงให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวที่เป็นโรค (acquisition feeding period, AFP) นาน 24 ชม. จากนั้นย้ายแมลงไปเลี้ยงบนต้นกล้าข้าว กข7 ชนิดปลอดโรค (อายุข้าว 7-10 วัน และสูงประมาณ 6-9 ซม.) ซึ่งใช้เป็นพืชอาศัยและพืชอาหาร เพื่อบริการระยะแฝงในแมลง (latent period, LP) นาน 3 วัน แมลงจึงจะมีภาวะแฝงของไวรัสในเซลล์ ซึ่งไม่ปรากฏลักษณะอาการ (asymptomatic infection) จากนั้นจึงรอระยะเวลาต่อเนื่องจนถึงระยะฟักตัวในแมลง (incubation period, IP) นาน 4-8 วัน แมลงจึงจะมีพฤติกรรมเป็นพาหะในการถ่ายทอดไวรัส และจะทำการเปลี่ยนต้นกล้าข้าวชุดใหม่เพื่อเลี้ยงแมลงเมื่อต้นข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ประมาณ 50% จากนั้นจึงคัดเลือกประชากรแมลงพาหะที่ได้รับ การถ่ายทอดไวรัส (viruliferous BPH population) ในทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงระยะตัวเต็มวัยมาใช้ในการวิจัย

4. การถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวจากแมลงพาหะสู่ต้นข้าวทดสอบ

คัดเลือกประชากรแมลงพาหะที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสเพื่อทำการถ่ายทอดไวรัสสู่ต้นกล้าข้าวทดสอบ จำนวน 3-5 ตัว/ต้น ก่อนปล่อยให้แมลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นกล้าข้าวทดสอบนั้นจะให้แมลงอดอาหาร นาน 1-2 ชม. เมื่อครบเวลาปล่อยแมลงให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นกล้าข้าวเพื่อทำการถ่ายทอดไวรัส นาน 2 วัน จากนั้นจึงนำต้นกล้าข้าวทดสอบที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกแล้วมาพ่นสารป้องกันกำจัดแมลง และนำไปใส่ในกรงขนาด 20×20×42 นิ้ว ซึ่งผนังกรงบุด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 เมท สำหรับใช้เป็นแหล่งของพืชอาศัยเพิ่มปริมาณไวรัสใบหงิกข้าว และสังเกตลักษณะอาการของโรคบนพืชอาศัย

5. การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในแมลงพาหะด้วยเทคนิค DIBA

5.1 การเตรียมน้ำคั้นแมลงพาหะ

คัดเลือกแมลงพาหะที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสในระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-5 และตัวเต็มวัย จำนวน 1 ตัว/1 ตัวอย่าง ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวซ์ ขนาด 1.5 มล. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 3-6 ชม. เมื่อครบระยะเวลานำหลอดไมโครเซนทริฟิวซ์ที่เตรียมไว้มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer, EB) ที่แช่เย็น (Table 1) จำนวน 0.2 มล. และผสมบัฟเฟอร์สกัดกับแมลงให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายบัฟเฟอร์สกัดขึ้นลง เพื่อบดแมลงในสารละลายบัฟเฟอร์สกัด จากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, VM-4, LABSHOPS) เขย่านาน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว $16,532 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อครบระยะเวลานำหลอดไมโครเซนทริฟิวซ์หลอดเดิมมาบดแมลงในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดด้วยการใช้ปิเปตอัตโนมัติทำซ้ำอีก 2 รอบ จนสามารถบดแมลงในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดให้เข้ากัน และเมื่อหมุนเหวี่ยงเป็นครั้งสุดท้ายแล้ว จึงดูดสารละลายส่วนบนของน้ำคั้นแมลงใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวซ์ ขนาด 1.5 มล. หลอดใหม่ เพื่อเตรียมไว้สำหรับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

5.2 การประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดน้ำคั้นแมลงพาหะ

สารดูดซับที่นำมาใช้ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดน้ำคั้นแมลงพาหะในการวิจัยครั้งนี้ ดัดแปลงจากการรายงานของ Chen et al. (2012) และ Na Phatthalung et al. (2017a) ประกอบด้วยสารดูดซับ 3 ชนิด ได้แก่ แมกนีเซียมออกไซด์ [magnesium oxide (MgO): M] อะลูมิเนียมออกไซด์ [aluminum oxide (Al₂O₃): A] และผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon, C) ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารดูดซับแต่ละชนิดที่นำมาใช้ คือ 150 มก./มล. โดยผสมสารดูดซับกับน้ำคั้นแมลงที่เตรียมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สกัดให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย ปั่นนาน 3 นาที จากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 14,078×*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจึงเก็บสารละลายส่วนบนมาใช้ในการวิจัย

5.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นแมลงพาหะ

นำน้ำคั้นแมลงพาหะที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer) โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งปนเปื้อนหรือสิ่งรบกวนชนิดเม็ดสีเมลานินที่ค่าความยาวคลื่นแสง 405 (A₄₀₅) นาโนเมตร ตามการรายงานของ Huang et al. (2015) และ Siwanowicz and Burrows (2017) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายไร้สิ่งตัวอย่างหรือตัวตั้งค่าที่ศูนย์ (blank)

5.4 การเจือจางน้ำคั้นแมลงพาหะและการเตรียมตัวอย่างบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

แบ่งช่องแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane, NCM: pore size 0.45 µm, Bio-Rad®, Cat #1620115) ให้มีขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วตัดที่มุมหนึ่งเพื่อเป็นเครื่องหมาย นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัด นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 15 นาที จากนั้นจึงเจือจางน้ำคั้นแมลงพาหะที่สกัดได้ด้วยบัฟเฟอร์สกัดแบบสองเท่าลำดับส่วน (two-fold serial dilution) ให้ได้อัตรา 1:2-1:16,384 เท่า หยดตัวอย่างน้ำคั้นที่อัตราเจือจางที่แตกต่างกัน ตัวอย่างปริมาตรละ 6 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (หยดครั้งละ 3 ไมโครลิตร) และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที

5.5 การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

ทำการเตรียมสารเคมี (Table 2) ดำเนินปฏิกิริยาและตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ตามการรายงานของ Rattanakarn et al. (2011) และ Na Phatthalung et al. (2017a) ด้วยการใช้สารละลายแอนติซีรัมของไวรัสไบโหิงข้าว (anti-RRSV IgG) ที่อัตราเจือจาง 1:1,000 เท่า ในการตรวจสอบร่วมกับสารละลาย BCIP®/NBT (SIGMAF457™, Lot #050M8214) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นหรือสับสเตรท (substrate) และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, AP) (ZyMax™, Lot 40688597) ที่อัตราเจือจาง 1:5,000 เท่า เป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถหรือประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส และหยุดปฏิกิริยาโดยการใช้ น้ำกลั่น ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที และนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสวางบนกระดาษกรอง ซับจนแห้ง จากนั้นตรวจสอบสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (เคลื่อนย้ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ปากคีบ และผู้ปฏิบัติการต้องสวมถุงมือ)

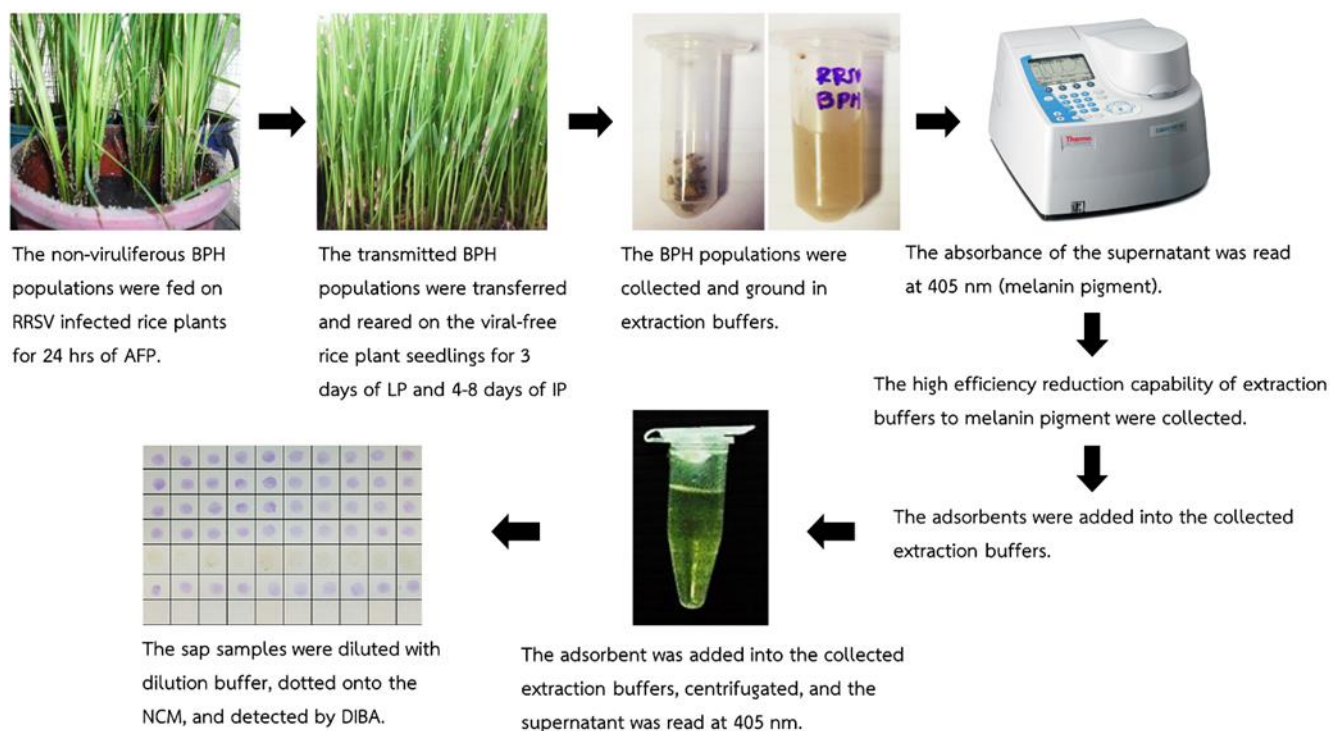


Figure 1 A flow chart of the applying adsorbents for extraction buffers to enhance RRSV detection efficiency in BPH crude sap samples by DIBA (In brief)

6. การวางแผนการทดลอง การบันทึก และการวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเป็นสิ่งที่ทดลอง (treatment, Trt) จำนวน 16 ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สกัด และแต่ละชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สกัดนำมาเตรียมน้ำคั้นแมลงในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแมลง ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-5 และระยะตัวเต็มวัยทั้งชนิดเพศผู้และเพศเมีย และลักษณะปีกทั้งชนิดปีกสั้นและปีกยาว และนำน้ำคั้นแมลงพาหะที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นจึงคำนวณประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์สกัดในการเตรียมน้ำคั้นแมลงพาหะ (Equation 1) และนำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงทั้งหมดไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) เปรียบเทียบความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (SPSS 16.0 for Windows®)

Equation 1: Reduction rate (%) = $[(C - T)/C] \times 100$

Note: C is the number of control sample, and T is the number of the treated sample

Table 1 The extraction buffers for DIBA

EB Code	Extraction Buffers and Components	References
EB-1	Distilled water (control)	—
EB-2	0.01 M Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)	Rattanakarn et al. (2011);
EB-3	0.01 M PBS + 2% Polyvinylpyrrolidone (PVP) (PBS-PVP, pH 7.4)	Na Phatthalung et al. (2017a; 2017b)
EB-4	0.01 M Modified PBS-PVP (M-PBS-PVP, pH 7.4): 0.01 M PBS-PVP + 0.5% Carbon tetrachloride (CCl ₄)	Modified from Na Phatthalung et al. (2017a; 2017b), and
EB-5	0.01 M M-PBS-PVP-Tween 20 (pH 7.4): 0.01 M M-PBS-PVP + 0.5% Tween-20	Ahangaran et al. (2009)
EB-6	0.1 M Tris-HCl buffer (TB, pH 8.0)	Modified from Senboku et al. (1979), and Yang et al. (2017)
EB-7	0.1 M Modified Tris-buffered saline (M-TBS, pH 7.5): 0.1 M TB + 0.15 M Sodium chloride (NaCl) + 2% PVP	Modified from Babitha et al. (2006)
EB-8	0.1 M M-TBS-CCl ₄ (M-TBS-C, pH 7.4): 0.1 M M-TBS + 0.5% CCl ₄	Modified from Firmansyah et al. (2017)
EB-9	0.1 M M-TBS-C-Tween 20 (M-TBS-C-T, pH 7.4): 0.1 M M-TBS-C + 0.5% Tween-20	Modified from Dijkstra and de Jager (1998), and Dje and Diallo (2005)
EB-10	0.1 M Phosphate buffer (PB, pH 7.4): Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O + KH ₂ PO ₄ • H ₂ O	Modified from Filloux and Girard (2006)
EB-11	0.1 M Modified PB (M-PB-PVP, pH 7.4): 0.1 M PB + 1% PVP	Modified from Kearns and Mossop (1984)
EB-12	0.1 M M-PB-PVP-Tween (M-PB-PVP-T, pH 7.4): 0.1 M M-PB-PVP + 0.5% Tween-20	Modified from Dheepa and Paranjothi (2010)
EB-13	0.05 Modified carbonate buffer (M-CB, pH 9.6): Na ₂ CO ₃ + NaHCO ₃ + 2% PVP + 0.5% CCl ₄	Modified from Hettihewa et al. (2018)
EB-14	0.05 M Modified sodium phosphate buffer (M-SPB, pH 7.2): Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O + NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O + 2% PVP + 0.5% CCl ₄ + 0.5% Tween-20	
EB-15	0.1 M Modified potassium phosphate buffer (M-PPB, pH 8.0): KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ + 0.1% 2-mercaptoethanol (2ME)	
EB-16	0.1 M Modified borate saline buffer (M-BSB, pH 8.3): 1M Boric acid + 1.5 M NaCl + 2% PVP + 0.5% CCl ₄	

Note: All EBs were calculated into a final volume of 100 or 1,000 mL, adjusted solution to final desired pH using concentrated hydrochloric acid (conc. HCl) or 2 M NaOH, autoclaved at 121°C for 15 min. at 15 psi, and stored at 4°C or room temperature (25°C), respectively.

Table 2 The solutions for RRSV detection by DIBA

Buffer Solutions	Components	References
Dilution buffer (DB)	0.01 M PBS (pH 7.4)	Rattanakarn et al. (2011); Na Phatthalung et al. (2015; 2017a; 2018)
Blocking buffer (PBS-T-SK)	0.01 M PBS (pH 7.4), 0.5% Tween-20, 5% skimmed milk (SK)	
Washing buffer (PBS-T)	0.01 M PBS (pH 7.4), 0.5% Tween-20	
Antiserum buffer	anti-RRSV IgG diluted 1:1,000 in PBS-T-SK	
Enzyme buffer	GAR-AP (ZyMax™) diluted 1:5,000 in PBS-T	
Substrate solution	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) alkaline phosphatase substrate tablet (SIGMA/FAST™) (pH 9.5)	
Stop solution	Deionized water	

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์สกัดต่อค่าการดูดกลืนแสง และความสามารถในการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะ

ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สกัดจำนวน 5 ลำดับแรก ที่ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยและความสามารถในการเป็นสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเพื่อเพิ่มความใสโดยการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินมากที่สุดในน้ำคั้นแมลงพาหะระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-5 และระยะตัวเต็มวัย เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดชนิดควบคุม (EB-1, 0%) ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-14 (4.762%), EB-12 (4.167%), EB-13 (4.167%), EB-4 (3.571%) และ EB-8 (3.571%) ตามลำดับ (Appendix 1) และจากการประเมินประสิทธิภาพของชนิดสารละลายบัฟเฟอร์สกัดต่อความสามารถในการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 ($p = 0.152$) และระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ปีกสั้น ($p = 0.160$) (Appendix 2) เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของแมลงในระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 แมลงจะมีลำตัวขนาดเล็กและมีสีผิวลำตัวเป็นสีขาว (Figure 5B) และจะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามระยะพัฒนาการตั้งแต่ตัวอ่อนวัยที่ 2-5 (Figure 5C-4F) ตามลำดับ แมลงระยะตัวเต็มวัยจะมีขนาดลำตัว สีผิวของลำตัว และลักษณะแผ่นปีกที่แตกต่างกัน โดยแมลงเพศผู้ชนิดปีกสั้น (Figure 5G) และเพศเมียชนิดปีกสั้น (Figure 5H) จะมีลำตัวขนาดเล็ก สีผิวของลำตัวเป็นสีน้ำตาลอ่อน และมีแผ่นปีกส่วนหน้า (forewing) และส่วนหลัง (hindwing) หดสั้น ซึ่งยาวไม่ปกคลุมตลอดถึงส่วนท้องของแมลง เมื่อเปรียบเทียบกับแมลงตัวเต็มวัยเพศผู้ชนิดปีกยาว (Figure 5I) และเพศเมียชนิดปีกยาว (Figure 5J) จะมีลำตัวขนาดใหญ่ สีผิวของลำตัวเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม และมีแผ่นปีกส่วนหน้าและส่วนหลังปกติ ซึ่งยาวปกคลุมตลอดถึงส่วนท้องของแมลง ดังนั้นขนาดลำตัวและพื้นที่ผิวลำตัวของแมลงตามระยะพัฒนาการของแมลงจึงมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณเมตีสีเมลานิน (Yu et al., 2016; Uchiyama et al., 2018) จากผลการประเมินประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์สกัดต่อค่าการดูดกลืนแสง และความสามารถในการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงคัดเลือกสารละลายบัฟเฟอร์สกัดสามชนิด ได้แก่ EB-8, EB-12 และ EB-14 เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับสารดูดซับในการประเมินประสิทธิภาพของสารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่เหมาะสมต่อการเตรียมน้ำคั้นแมลงพาหะ สำหรับการตรวจสอบไวรัสไบโหมักข้าวด้วยเทคนิค DIBA

2. ประสิทธิภาพของการใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดต่อค่าการดูดกลืนแสง และความสามารถในการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะ

การประยุกต์ใช้สารดูดซับปริมาณ 150 มก./มล. ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-8, EB-12 และ EB-14 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นแมลงพาหะระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-5 และระยะตัวเต็มวัย มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) โดยชนิดของสารดูดซับที่ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย และความสามารถในการเป็นสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเพื่อเพิ่มความใสโดยการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดชนิดควบคุม ได้แก่ ผงถ่านกัมมันต์ (C) อะลูมิเนียมออกไซด์ (A) และแมกนีเซียมออกไซด์ (M) ตามลำดับ (Appendix 3) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาความสามารถในการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะ พบว่า น้ำคั้นแมลงพาหะที่เตรียมจากสารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่ได้มีการเติมสารดูดซับ (Appendix 3) มีความสามารถในการลดสิ่งรบกวนชนิดเมตีสีเมลานินได้มากกว่าน้ำคั้นแมลงพาหะที่เตรียมจากสารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่ไม่มีการเติมสารดูดซับ (Appendix 2) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้น้ำคั้นแมลงพาหะที่เตรียมจากสารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่ได้มีการเติมสารดูดซับทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่ประยุกต์ใช้ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ (EB-12C และ EB-14C), อะลูมิเนียมออกไซด์ (EB-8A และ EB-12A) และแมกนีเซียมออกไซด์ (EB-8M และ EB-14M) ตามลำดับ เพื่อนำมาตรวจสอบไวรัสไบโหมักข้าวด้วยเทคนิค DIBA

3. การตรวจสอบปฏิกิริยาบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเทคนิค DIBA

เตรียมน้ำคั้นแมลงพาหะด้วยการประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-12C, EB-14C, EB-8A, EB-12A, EB-8M และ EB-14M และนำมาตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเทคนิค DIBA พบว่า ช่วงอัตราการเจือจาง

สูงสุดของการเตรียมน้ำคั้นแมลงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่สามารถตรวจพบไวรัส ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-12C (Figure 2A) และ EB-14C (Figure 2B) อยู่ในช่วงระดับ 1:16-1:512 เท่า สารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-8A (Figure 3A), EB-12A (Figure 3B) และ EB-14M (Figure 4B) อยู่ในช่วงระดับ 1:8-1:256 เท่า และสารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-8M (Figure 4A) อยู่ในช่วงระดับ 1:8-1:512 เท่า ตามลำดับ โดยปฏิบัติการตรวจสอบไวรัสใบหงิกขาวในน้ำคั้นแมลงปกตินั้นให้สปีกิริยาเป็นสีน้ำตาลอ่อนปกติซึ่งเป็นสีของน้ำคั้นแมลง (ผลลบ, negative results) ในขณะที่น้ำคั้นแมลงจากแมลงที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกจะให้สีของปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลเข้ม (ผลบวก, positive results) ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันระหว่างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, AP) และสารตั้งต้นชนิด BCIP/NBT ซึ่งถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่แสดงการเปลี่ยนสีของสารที่เกิดสี (chromogenic substrate) โดยจะปรากฏบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสอย่างชัดเจน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสในช่วงอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลงตามระยะการเจริญเติบโตของแมลง พบว่า สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาในช่วงอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลงระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-3 ได้น้อยกว่าช่วงอัตราการเจือจางน้ำคั้นแมลงในระยะตัวอ่อนวัยที่ 4-5 และระยะตัวเต็มวัยตามลำดับ ความแตกต่างของขนาดและระยะการเจริญเติบโตของแมลงนี้จะมีอิทธิพลต่อปริมาณไวรัสในแมลง (virus titers) ซึ่งสามารถประเมินได้จากอัตราการเจือจางน้ำคั้นแมลงพาหะ และจากการศึกษาของ Morinaka et al. (1983) พบว่า ความสามารถในการเป็นแมลงพาหะเพื่อถ่ายทอดไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวอ่อนตั้งแต่วัยที่ 1-5 ได้แก่ วัยที่ 1 (12%), วัยที่ 2 (16%), วัยที่ 3 (18%), วัยที่ 4 (26%) และวัยที่ 5 (28%) ตามลำดับ และระยะตัวเต็มวัย (13%) ดังนั้นไวรัสใบหงิกขาวสามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อแมลงเข้าสู่ระยะพัฒนาการต่าง ๆ และสามารถดำรงอยู่ในตัวแมลงได้ตลอดชีวิตของแมลง ซึ่งไวรัสมีปฏิสัมพันธ์กับแมลงพาหะแบบยั่งยืนชนิดแพร่ขยาย (persistent-propagative manner) (Chen et al., 2014) และไวรัสไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่ของแมลงไปสู่รุ่นต่อไปได้ (non-transovarial transmission) โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณไวรัสในลักษณะนี้จะอาศัยกระบวนการทรานไซโตซิส (transcytosis) ซึ่งเป็นกลไกที่ไวรัสสามารถเคลื่อนผ่านสิ่งกีดขวางทางกายวิภาคระหว่างเซลล์ (anatomical barriers) ในลักษณะการเคลื่อนผ่านเยื่อพิวเซลล์ (tissue associated membrane) เพื่อก่อการตั้งรกราก (establishment) การเจริญครอบครองพื้นที่ (colonization) และการแพร่กระจายไวรัสไปยังเซลล์ต่าง ๆ ของอวัยวะภายในแมลง (Linak et al., 2020; Na Phatthalung and Tangkananond, 2021)

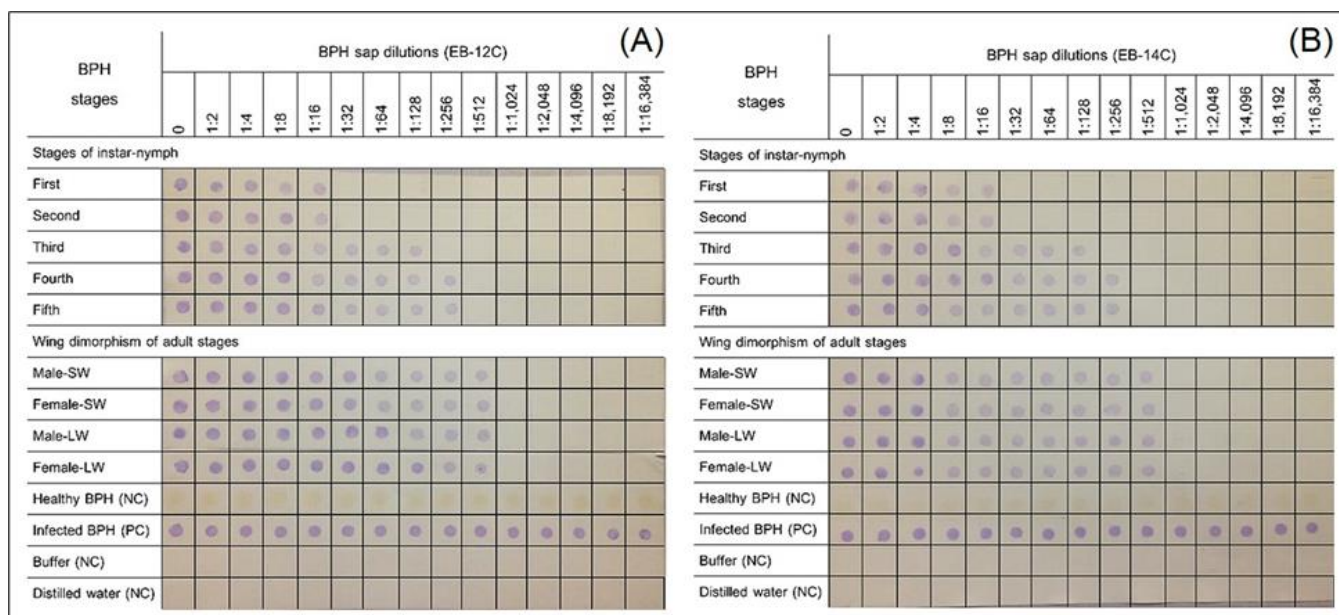


Figure 2 The efficiency of EB-12C (A) and EB-14C (B) to enhance RRSV detection by DIBA

Notes: NC = negative control; PC = positive control; Male-SW = male short-winged brachypterous form; Female-SW = female short-winged brachypterous form; Male-LW = male long-winged macropterous form; Female-LW = female long-winged macropterous form

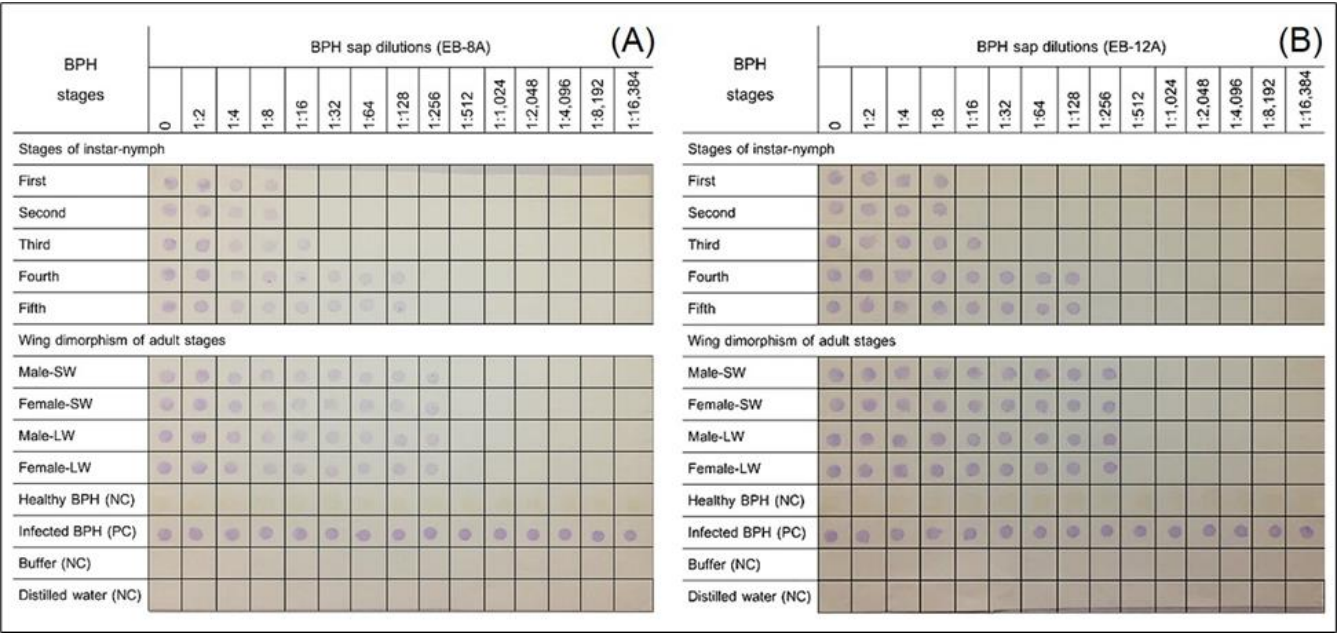


Figure 3 The efficiency of EB-8A (A) and EB-12A (B) to enhance RRSV detection by DIBA

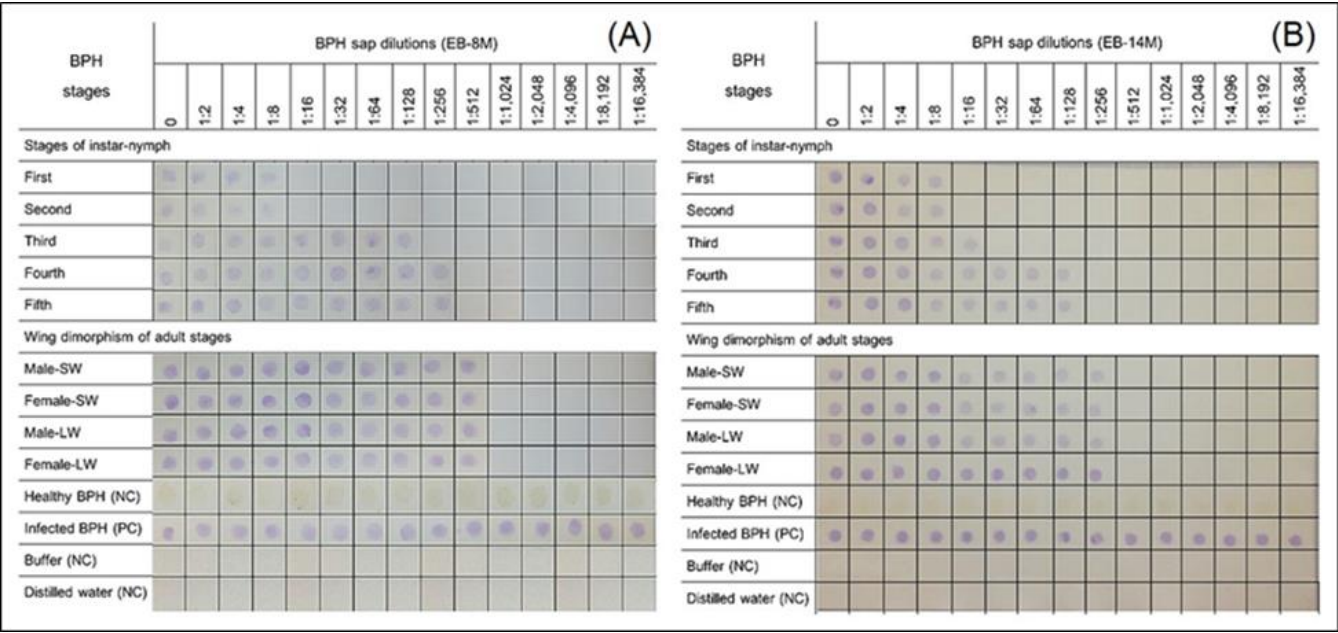


Figure 4 The efficiency of EB-8M (A) and EB-14M (B) to enhance RRSV detection by DIBA

สีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นแมลงบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาชนิดไนโตรเซลลูโลสด้วยเทคนิค DIBA นี้ จัดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่จำเพาะ (specificity) ระหว่างไวรัสใบหงิกข้าวและแอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกข้าวโดยอาศัยสารละลาย BCIP/NBT และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถหรือประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยา สีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นส่วนโดยตรงกับปริมาณไวรัสใบหงิกข้าวที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำคั้นแมลงพาหะ โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะทำหน้าที่ในการกระตุ้น (catalyze) และเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester) กับสารละลาย BCIP/NBT และทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาที่มีลักษณะไม่ละลายน้ำ (insoluble) ปรากฏบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาชนิดไนโตรเซลลูโลสตรงบริเวณจุดที่เกิดปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินม่วง (blue-violet) อย่างชัดเจน (Luttmann et al., 2006)

Michen and Graule (2010) รายงานว่า สารละลายอนุภาคไวรัสส่วนมากมีจุดไอโซอิเล็กทริกที่เป็นกรด (acid isoelectric point, pH 3.5-7.0) ซึ่งสามารถแขวนลอยหรือละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 7-8 เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation) และการตกตะกอน (viral-precipitation) ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับบัฟเฟอร์สกัดน้ำคั้นแมลงพาหะสามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA ได้ในช่วงอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลง 1:8-1:512 เท่า นอกจากนี้งานวิจัยก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบระยะเวลาแฝง (minimum latent period, MLP) ของไวรัสใบหงิกข้าวในแมลงพาหะ โดยเตรียมน้ำคั้นแมลงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สักรหัส EB-3 [0.01 M PBS + 2% Polyvinylpyrrolidone (PVP) (PBS-PVP, pH 7.4)] ซึ่งพบว่า สามารถตรวจพบไวรัสได้ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสเป็นระยะเวลาน้อยที่สุด 3 วัน ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงระยะตัวเต็มวัย ที่ช่วงอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลง 1:2-1:50 เท่า (Na Phatthalung et al., 2017b) ดังนั้นสารดูดซับที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้จึงสามารถที่จะประยุกต์ใช้เพื่อเป็นทางเลือกในขั้นตอนการเตรียมน้ำคั้นแมลงพาหะร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัด สำหรับการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA ได้ ทั้งนี้จากการทบทวนวรรณกรรมถึงประสิทธิภาพของเทคนิควิธีการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวและวิธีที่ได้จากประยุกต์ใช้ร่วมกับสารดูดซับในงานวิจัยนี้ แสดงดัง Table 3

Table 3 The summary of the efficiency methods used for RRSV detection

Detection Methods	Rice Plant Parts			BPH Stages		References
	Leaves	Shoot	Root	Nymph	Adult	
Dilution end-point (DEP)	10 ⁻⁵	—	—	—	10 ⁻⁶	Senboku et al. (1979)
Nucleic-Acid-Based Techniques						
RT-LAMP	1:1,000	—	—	—	—	Lai et al. (2018); Le et al. (2010)
Conventional RT-PCR	≥1:1,000	—	—	—	≥1:1,000	Lai et al. (2018); Lei et al. (2001)
Nucleic acid hybridization	10 ⁻¹²	—	—	—	—	Pochanukul (1995)
Serological Techniques						
LF	1:10	—	1:40	—	—	Omura et al. (1984); Omura (1985)
ELISA	1:8,192	—	—	—	1:10,240	Luisoni et al. (1982); Hibino and Kimura (1982)
ACP-ELISA	1:40,960	—	—	—	1:12,800	Liu et al. (2014)
BS-DAS-ELISA	1:10,240	—	—	—	—	Chotelersak (2000)
DAS-ELISA	1:5,120	—	—	—	—	Chotelersak (2000)
Indirect-ELISA	1:1,024	—	—	—	—	Srilunchang (1996)
IC-RT-PCR	1:655,360	—	—	—	—	Liu et al. (2014)
ICA	1:10	—	—	—	1:10	Rattanakarn et al. (2011)
ISEM	1:1,000	—	—	—	—	Luisoni et al. (1982)
Conventional DIBA	1:500	1:500	1:10	1:50	1:50	Na Phatthalung et al. (2017b)
	1:1,280	—	—	—	1:1,600	Liu et al. (2014)
Modified DIBA with chlorophyll adsorbents	1:1,500	1:1,500	1:100	—	—	Na Phatthalung et al. (2017a); Na Phatthalung (2014)
Modified DIBA with adsorbents in BPH crude sap	—	—	—	1:256	1:512	This research

Notes: RT-LAMP = Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; LF = Latex flocculation test; ACP-ELISA = Antigen coated plate enzyme-linked immunosorbent assay; IC-RT-PCR = Immunocapture-RT-PCR; DAS-ELISA = Double antibody sandwich ELISA; ISEM = Immunosorbent electron microscopy; ICA = Immunochromatographic assay; BS-DAS-ELISA = Biotin-streptavidin double-antibody sandwich ELISA

การพัฒนาเทคนิค DIBA ในการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยการประยุกต์ใช้สารดูดซับในการเตรียมน้ำคั้นแมลงในงานวิจัยนี้ เป็นการประยุกต์ใช้เพื่อลดสิ่งรบกวนในน้ำคั้นแมลงและเพิ่มความไวของการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีบนตัวรองรับปฏิกิริยา โดยชนิดของสารดูดซับที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีสมบัติทำให้น้ำคั้นแมลงมีความใส (clarifying agents) และเป็นสารที่ช่วยในการตกตะกอนโปรตีน (fining agent) และสิ่งรบกวนปฏิกิริยาอื่น ๆ ซึ่งเป็นกระบวนการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption หรือ physisorption) (Leite et al., 2012) ชนิดสารดูดซับที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดสิ่งรบกวนและเพิ่มอัตราการเจือจางน้ำคั้นแมลงในการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA ของการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ผงถ่านกัมมันต์ แมกนีเซียมออกไซด์ และอะลูมิเนียมออกไซด์ ตามลำดับ และการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของสารดูดซับทั้งสามชนิดจากการทบทวนวรรณกรรมแสดงดัง Table 4

Table 4 The comparison of characterization of adsorbent properties

Characteristics of Adsorbent	Activated Carbon (C)	Magnesium Oxide (MgO)	Aluminum Oxide (Al ₂ O ₃)
Molecular weight (g/mol)	12.01	40.3	101.96
Average pore size diameter (nm)	microporous (< 2 nm), mesoporous (2 to 50 nm) and macroporous (> 50 nm) (Herawan et al., 2013; Funabashi et al., 2017)		
Surface area (m ² /g)	range 500 - 2,900 (Chaemsanit et al., 2018)	range 200 - 700 (Isahak et al., 2013)	range 300 - 700 (Stengl et al., 2003; 2004)
Pore volume (cm ³ /g)	0.1 - 0.8	≥ 0.4	≥ 0.15
Surface polarity	non-polar	non-polar and polar	polar
Specific gravity (g/mL)	1.8 - 2.1	3.58	3.7 - 4.0
pH range	5.0 - 10.0	10.3	3.0 - 8.0
Melting point (°C)	3,550	2,852	2,040 - 2,072
Boiling point (°C)	500 - 600	3,600	2,977
Surface functional groups	carbonyl, lactone, phenol, quinone, pyrone, ketone, aldehyde, carbonate, hydroxide, xanthene, etc. (Tessmer et al., 1997; Bernal et al., 2018)	hydroxyl, methyl, etc. (Chizallet et al., 2006)	hydroxyl, carboxyl, etc. (Pletincx et al., 2017)

สารดูดซับชนิดผงถ่านกัมมันต์เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมน้ำคั้นแมลงเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ในการวิจัยนี้สามารถเพิ่มความไวและประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบได้ โดยพิจารณาจากผลการตรวจสอบปฏิกิริยาบนตัวรองรับปฏิกิริยา ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากอัตราการเจือจางน้ำคั้นแมลงที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสารดูดซับชนิดผงถ่านกัมมันต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสมบัติและข้อได้เปรียบของสารดูดซับชนิดผงถ่านกัมมันต์ (Table 4) พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ดีจึงส่งผลให้เกิดรูพรุนที่มีขนาดเล็ก (microporosity) และมีช่วงการกระจายขนาดของรูพรุนกว้าง (pore size distribution) ทำให้มีพื้นที่ผิวดูดซับมาก สิ่งรบกวนการตรวจสอบปฏิกิริยาในน้ำคั้นแมลงจึงสามารถแทรกเข้าไปในรูพรุนของผงถ่านกัมมันต์ได้ทันทีที่เคลื่อนมาสัมผัสบริเวณพื้นผิว ทำให้เกิดการดูดซับหลายชั้น (multilayer adsorption) โดยทั่วไปประจุบนพื้นผิวสิ่งรบกวนหรือโปรตีนหุ้มห่ออนุภาคไวรัสนั้นมีทั้งประจุบวก (Karlin and Brendel, 1988; Requião et al., 2019; 2020) และประจุลบ และผงถ่านกัมมันต์มีประจุพื้นผิวเฉลี่ยเป็นประจุลบ ซึ่งสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่มีประจุตรงกันข้ามได้ดี แต่เมื่อพิจารณาขนาดของรูพรุนผงถ่านกัมมันต์ แม้จะมีช่วงขนาดของรูพรุนที่กว้าง แต่มีขนาดรูพรุนโดยเฉลี่ยเล็กกว่าอนุภาคไวรัสใบหูกข้าว จึงส่งผลต่อความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาการดูดซับบริเวณพื้นผิวอนุภาคไวรัสได้น้อย การศึกษาของ Canh et al. (2021) ซึ่งประยุกต์ใช้ผงถ่านกัมมันต์ในกระบวนการทำน้ำให้บริสุทธิ์ พบว่า ผงถ่านกัมมันต์มีความสามารถในการกำจัดไวรัสที่ปนเปื้อนในน้ำได้น้อย และขนาดรูพรุนที่เหมาะสมของผงถ่านกัมมันต์ที่จะดูดซับไวรัสได้ดีจะต้องมีขนาดใกล้เคียงหรือใหญ่กว่าอนุภาคไวรัส และ Matsushita et al. (2013) รายงานว่า ขนาดอนุภาค พื้นผิวจำเพาะ และชนิดของหมู่สำคัญในการทำงาน (functional group) ของผงถ่านกัมมันต์ ไม่มีความสัมพันธ์กับการกำจัดไวรัส

ผงถ่านกัมมันต์มีความร้อนจากการดูดซับต่ำและมีค่าความร้อนจำเพาะสูง ทำให้กระบวนการดูดซับสามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิปกติ และสิ่งรบกวนที่ถูกดูดซับไว้สามารถตกตะกอนไปพร้อมกับสารดูดซับเมื่อมีการนำไปหมุนเหวี่ยง ในขณะที่อนุภาคไวรัสใบหูกข้าวซึ่งไม่ได้ถูกดูดซับบนพื้นผิวผงถ่านกัมมันต์นี้จะอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัด นอกจากนี้ผงถ่านกัมมันต์ยังมีค่าความเป็นกรดต่ำและดูดซับสารประกอบได้ในช่วงกว้าง มีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย (Quinlivan et al., 2005;

Goto et al., 2015) สิ่งรบกวนในน้ำคั้นแมลงจะถูกดูดซับบนพื้นผิวผนังกันมันต์ด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลทั้งประเภทแรงดึงดูดอย่างอ่อน (weak molecular interaction) และแรงดึงดูดอย่างเข้ม (strong molecular interaction) ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) พันธะระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bond) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) และแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (dipole bond force) เป็นต้น (Chaemsanit et al., 2018) อีกทั้งผนังกันมันต์ยังมีชนิดของหมู่สำคัญในการทำงานบนพื้นผิวสารดูดซับที่หลากหลายทั้งออกไซด์ของกรดและออกไซด์ของเบส รวมทั้งเป็นสารดูดซับที่ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก (Tarapitakcheevin et al., 2013)

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือการถอดรูปเพื่อการเจริญเติบโตแบบไม่สมบูรณ์ (hemi-metabolous หรือ incomplete metamorphosis) ซึ่งเป็นกระบวนการเจริญเปลี่ยนแปลงในด้านมวลและรูปร่าง ดังนั้นจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell multiplication) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อการทำหน้าที่เฉพาะของเซลล์ (cell differentiation) และการเกิดอวัยวะรูปร่างของสิ่งมีชีวิต (organogenesis and morphogenesis) โดยมีวงจรชีวิต (life cycle) แบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ (1) ระยะไข่ (egg stage) (2) ระยะตัวอ่อน (nymph stage) ซึ่งมีระยะของแมลงที่อยู่ระหว่างการลอกคราบแต่ละครั้ง (instar) จำนวน 5 ระยะ และ (3) ระยะตัวเต็มวัย (adult stage) ตามลำดับ ซึ่งการเจริญเติบโตแบบนี้ส่วนมากจะใช้วิธีการลอกคราบ (molting) ลักษณะของตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะมีรูปร่างโดยทั่ว ๆ ไปเหมือนกัน แต่จะต่างกันที่ขนาดของลำตัว พัฒนาการของแผ่นปีก และสีของลำตัว (Figure 5) (Na Phatthalung and Tangkananond, 2017)

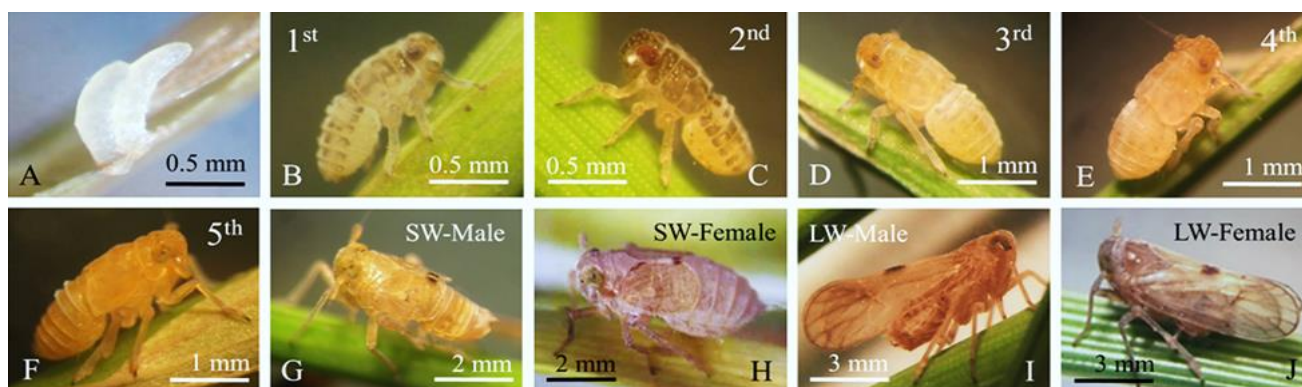


Figure 5 The developmental stages of brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål)

(A) egg stage (6-7 days); (B) the first instar nymph stage (3 days after hatching, DAH); (C-F) developmental stages of second to fifth instar nymph at 5 DAH, 7 DAH, 11 DAH and 15 DAH, respectively; adult stages (13-15 days) of the short-winged (SW) brachypterous form of male (G) and female (H); and the long-winged (LW) macropterous form of male (I) and female (J), respectively (Figures were captured under a stereo microscope by researcher)

ลักษณะทางกายภาพของแมลงในระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-5 นั้น (Figure 5B-5F) มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาที่เห็นเด่นชัดมากยิ่งขึ้นโดยผ่านการลอกคราบ ซึ่งจะมีขนาดของลำตัวที่ใหญ่ขึ้นและการเปลี่ยนแปลงสีของลำตัว (body coloration) และสีของดวงตา (eye coloration) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงสีของลำตัวแมลงจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสี (melanogenesis) บริเวณผนังลำตัวของแมลง (body wall) ซึ่งเป็นโครงสร้างเกราะแข็งภายนอก (exoskeleton) มีหน้าที่ป้องกันการกระแทกกระเทือน สร้างอวัยวะป้องกันตัว และมีความไวต่อสภาพแวดล้อมและสารต่าง ๆ โดยสามารถแบ่งได้เป็นชั้นใหญ่ ๆ 3 ชั้น (Pan et al., 2018) ได้แก่ (1) ผนังลำตัวชั้นนอก (cuticle) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต โดยสามารถแบ่งชั้นนี้ออกเป็น 2 ชั้นย่อย คือ ชั้นผิวนอก (epicuticle) ซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ด้านนอกสุดของลำตัวแมลง มีลักษณะเป็นเยื่อบาง ๆ มีความหนาประมาณ 0.03-4.0 ไมโครเมตร ไม่มีสารไคติน (chitin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีสี มีความทนทานสูง ไม่ละลายในน้ำและแอลกอฮอล์หรือกรดและด่างเจือจาง และชั้นผิวกกลาง (procuticle) ซึ่งอยู่ถัดจากชั้นผิวนอก โดยมีความหนาประมาณ 200 ไมโครเมตร ซึ่งเมื่อแมลงลอกคราบแล้วส่วนนี้จะกลายเป็น “คราบของแมลง” ผนังลำตัวแมลงชั้นผิวกกลาง

นี้เป็นชั้นที่มีสารไคติน และ cuticular proteins (CPs) ซึ่งประกอบด้วยชั้นนอก (exocuticle) ที่มีสีเข้มและมีลักษณะแข็ง และชั้นใน (endocuticle) ที่มีสีจางและแนบติดกับชั้นหนังกำพร้า (Xi et al., 2014) ทั้งนี้ นอกจากบริเวณผนังลำตัวของแมลงจะมีสารไคตินแล้วยังประกอบด้วยเม็ดสีหลักที่สำคัญ คือ เม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทางชีวภาพ (biopolymer) ที่มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะพัฒนาการของแมลงจากสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม จนถึงสีน้ำตาลดำ ตามลำดับ (Krishnaiah, 2015) (2) ผนังลำตัวชั้นกลาง (epidermis) ซึ่งเป็นชั้นของเซลล์ที่มีชีวิต และ (3) ผนังลำตัวชั้นในหรือชั้นเยื่อรองรับฐาน (basement membrane) ซึ่งเป็นชั้นบาง ๆ ไม่มีเซลล์เป็นองค์ประกอบ เกิดจากการสร้างของผนังลำตัวชั้นกลางซึ่งใช้สำหรับเป็นที่ยึดเกาะของกล้ามเนื้อ ตามลำดับ

นอกจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีของลำตัวแมลงแล้ว อีกลักษณะหนึ่งที่ปรากฏเด่นชัด คือ สีของดวงตา ซึ่งจัดเป็นลักษณะเม็ดสีที่มองเห็นได้ (ommochrome หรือ visual pigment) โดยมีเม็ดสีหลักสองชนิด คือ xanthommatin (สีน้ำตาล) และ pteridine (สีแดง) เป็นต้น (Shu-hua et al., 2016; Jairin et al., 2017) แมลงในระยะตัวอ่อนจะมีตาสีแดง และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามระยะการเจริญเติบโต ซึ่งมองเห็นได้ชัดในระยะตัวอ่อนวัยที่ 4-5 และระยะตัวเต็มวัย นอกจากนี้ลักษณะทางกายภาพของแมลงในระยะตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะโครงสร้างเหมือนกัน แต่แมลงเพศเมียส่วนใหญ่จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ แมลงตัวเต็มวัยจะมีลักษณะของแผ่นปีก (wing-dimorphisms) 2 รูปแบบ คือ แบบปีกสั้น [brachypterous form หรือ short winged form (SW, non-migratory) หรือ half-developed wings] และแบบปีกยาว [macropterous form หรือ long winged form (LW, migratory) หรือ fully-developed wings] (Figure 5G-5J) ซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ตัวเต็มวัยชนิดปีกสั้นจะบินไม่ได้และจะอาศัยอยู่ในแปลงนาเพื่อดูดกินน้ำเลี้ยงและขยายพันธุ์บนต้นข้าว ส่วนตัวเต็มวัยชนิดปีกยาวจะสามารถบินอพยพออกไปจากแปลงนาได้ (Iwanaga and Tojo, 1986)

ขั้นตอนการเตรียมน้ำคั้นแมลงเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของไวรัสจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ทั้งนี้ไวรัสใบหงิกข้าวและแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนั้นมีปฏิสัมพันธ์กันแบบยั่งยืน โดยไวรัสจะสามารถเพิ่มจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อแมลงเข้าสู่ระยะต่าง ๆ และสามารถคงอยู่ในตัวแมลงได้ตลอดช่วงชีวิตของแมลง อีกทั้งไม่สามารถที่จะประเมินการสะสมของไวรัสในแมลงได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากเมื่อแมลงได้รับไวรัสเข้าสู่ตัวของแมลงนั้นจะไม่ปรากฏลักษณะอาการที่ผิดปกติไปจากแมลงปกติอีกด้วย นอกจากนี้ น้ำคั้นแมลงที่เตรียมได้จะมีสิ่งรบกวนชนิดเม็ดสีเมลานินที่ปนเปื้อนออกมา แม้ว่าจะนำน้ำคั้นไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์แมลงหรืออนุภาคต่าง ๆ แล้ว ดังนั้นหากสามารถที่จะลดสิ่งรบกวนที่ปนเปื้อนในน้ำคั้นได้มากที่สุดจะสามารถเพิ่มความไวของปฏิกิริยาในการตรวจสอบไวรัสได้

การประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเพื่อตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นแมลงพาหะในงานวิจัยนี้พบว่า การประยุกต์ใช้สารดูดซับชนิดผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-12C และ EB-14C มีประสิทธิภาพสูงสุด เปรียบเทียบกับการใช้สารดูดซับชนิดเมกนีเซียมออกไซด์ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-14M และ EB-8M และการใช้สารดูดซับชนิดอะลูมิเนียมออกไซด์ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดรหัส EB-8A และ EB-12A ตามลำดับ ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นการรายงานครั้งแรกถึงการประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่สามารถนำมาใช้ในการลดสิ่งรบกวนชนิดเม็ดสีเมลานิน ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นของแมลงพาหะเพื่อตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DBIA การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในแมลงพาหะสามารถตรวจพบไวรัสได้ในแมลงทุกระยะพัฒนาการของการเจริญเติบโต ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะมีประโยชน์ต่อการศึกษา ลักษณะการแพร่กระจายของไวรัสในแมลงพาหะและพืชอาศัย ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและแมลงพาหะเพื่อการก่อโรคและแพร่ระบาด และสามารถใช้ในการพยากรณ์รูปแบบและแนวโน้มการระบาดของแมลงพาหะและไวรัสก่อโรคได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการเจริญเติบโตของต้นข้าว การคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อไวรัสใบหงิกข้าวและแมลงพาหะ ตลอดจนประยุกต์เพื่อวางแผนและกำหนดนโยบายทางด้านอารักขาพืช เพื่อเตือนภัยเกษตรกรในพื้นที่ที่มีการตรวจพบหรือพื้นที่ใกล้เคียงให้มีการเฝ้าระวัง และรู้เท่าทันสถานการณ์การระบาดของโรค

สรุป

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้สารดูดซับร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดเพื่อเพิ่มความใส โดยการลดสิ่งรบกวนชนิดเม็ดสีเมลานินในน้ำคั้นแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นแมลงด้วยเทคนิค DIBA ผลการวิจัยพบว่า ชนิดสารดูดซับที่ใช้ร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ได้แก่ ผงถ่านกัมมันต์ แมกนีเซียมออกไซด์ และอะลูมิเนียมออกไซด์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจพบไวรัสได้ที่ช่วงอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นในทุกระยะการเจริญเติบโตของแมลง ได้แก่ 1:16-1:512, 1:8-1:512 และ 1:8-1:256 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นการประยุกต์ใช้สารดูดซับจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นแมลงพาหะได้

คำขอบคุณ

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

เอกสารอ้างอิง

- Ahangaran, A., G.M. Mohammadi, M.K. Habibi, S. Khezri, and N. Shahraeen. 2009. Use of rapid serological and nucleic acid-based methods for detecting the soybean mosaic virus. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 11(1): 91-97.
- Babitha, M.P.U., D. Madhu, H.S. Prakash, and H.S. Shetty. 2006. Production of polyclonal antisera to manganese superoxide dismutase expressed in downy mildew resistant pearl millet and its application for immunodiagnosis. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(2): 133-143.
- Bernal, V., L. Giraldo, and J.C. Moreno-Piraján. 2018. Physicochemical properties of activated carbon: Their effect on the adsorption of pharmaceutical compounds and adsorbate-adsorbent interactions. *Journal of Carbon Research* 4(4): 62.
- Canh, V.D., S. Tabata, S. Yamanoi, Y. Onaka, T. Yokoi, H. Furumai, and H. Katayama. 2021. Evaluation of porous carbon adsorbents made from rice husks for virus removal in water. *Water*. 13(9): 1280.
- Chaemsanit, S., N. Matan, and N. Matan. 2018. Activated carbon for food packaging application: Review. *Walailak Journal of Science and Technology*. 15(4): 255-271.
- Chen, C.C., M.J. Chen, R.J. Chiu, and H.T. Hsu. 1997. Rice ragged stunt virus (*Oryzavirus*) possesses an outer shell and A-spikes. *Plant Protection Bulletin (Taipei)*. 39(4): 383-388.
- Chen, Z., J. Liu, M. Zeng, Z. Wang, D. Yu, C. Yin, L. Jin, S. Yang, and B. Song. 2012. Dot immunobinding assay method with chlorophyll removal for the detection of southern rice black-streaked dwarf virus. *Molecules*. 17(6): 6886-6900.
- Chen, H., L. Zheng, Q. Mao, Q. Liu, D. Jia, and T. Wei. 2014. Development of continuous cell culture of brown planthopper to trace the early infection process of oryzaviruses in insect vector cells. *Journal of Virology*. 88(8): 4265-4274.

- Chetanachit, D., M. Putta, and S. Disthaporn. 1978. Rice ragged stunt in Thailand. International Rice Research Newsletter. 3(4): 14-15.
- Chizallet, C., G. Costentin, H. Lauron-Pernot, J. Krafft, P. Bazin, J. Saussey, F. Delbecq, P. Sautet, and M. Che. 2006. Role of hydroxyl groups in the basic reactivity of MgO: A theoretical and experimental study. Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP. 61(4): 479-488.
- Chotelersak, K. 2000. Development of immunoassay for detection of rice ragged stunt virus by using monoclonal antibody. M.S. Thesis. Kasetsart University. Bangkok, Thailand.
- Dheepa, R., and S. Paranjothi. 2010. Transmission of cucumber mosaic virus (CMV) infecting banana by aphid and mechanical methods. Emirates Journal of Food and Agriculture. 22(2): 117-129.
- Dijkstra, J., and C.P. de Jager. 1998. Practical Plant Virology: Protocols and Exercises. 1st Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Disthaporn, S., H.D. Catling, D. Chettanachit, and M. Putta. 1983a. Influence of time of rice ragged stunt virus infection on deepwater rice yield. International Rice Research Newsletter. 8(5): 11.
- Disthaporn, S., D. Chettanachit, and M. Putta. 1983b. Unknown virus-like rice disease in Thailand. International Rice Research Newsletter. 8(6): 12.
- Dje, Y., and A. Diallo. 2005. Detection and distribution of sweetpotato feathery mottle virus in sweetpotato using membrane immunobinding assay. African Journal of Biotechnology. 4(7): 717-723.
- Filloux, D., and J.C. Girard. 2006. Indexing and elimination of viruses infecting yams (*Dioscorea* spp.) for the safe movement of germplasm. pp. 13. In: Proceedings of the 14th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crop, 20-26 Nov 2006. Thiruvananthapuram Kerala, India.
- Firmansyah, D., S. Hidayat, and W. Widodo. 2017. Chitosan and plant growth promoting rhizobacteria application to control squash mosaic virus on cucumber plants. Asian Journal of Plant Pathology. 11(3): 148-155.
- Funabashi, H., S. Takeuchi, and S. Tsujimura. 2017. Hierarchical meso/macro-porous carbon fabricated from dual MgO templates for direct electron transfer enzymatic electrodes. Scientific Reports. 7(1): 45147.
- Goto, T., Y. Amano, M. Machida, and F. Imazeki. 2015. Effect of polarity of activated carbon surface, solvent and adsorbate on adsorption of aromatic compounds from liquid phase. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 63(9): 726-730.
- Herawan, S.G., M.S. Hadi, M.R. Ayob, and A. Putra. 2013. Characterization of activated carbons from oil-palm shell by CO₂ activation with no holding carbonization temperature. The Scientific World Journal. 2013: 624865.
- Hettihewa, S.K., Y. Hemar, and H.P.V. Rupasinghe. 2018. Flavonoid-rich extract of *Actinidia macrosperma* (a wild kiwifruit) inhibits angiotensin-converting enzyme in vitro. Foods (Basel, Switzerland). 7(9): 146.
- Hibino, H., and I. Kimura. 1982. Detection of rice ragged stunt virus in insect vectors by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology. 72(6): 656-659.
- Huang, H.-C., Y.-C. Ho, J.-M. Lim, T.-Y. Chang, C.-L. Ho, and T.-M. Chang. 2015. Investigation of the anti-melanogenic and antioxidant characteristics of *Eucalyptus camaldulensis* flower essential oil and determination of its chemical composition. International Journal of Molecular Sciences. 16: 10470-10490.
- Isahak, W.N.R.W., Z.A.C. Ramli, M.W.M. Hisham, and M.A. Yarmo. 2013. Magnesium oxide nanoparticles on green activated carbon as efficient CO₂ adsorbent. 1571(1): 882-889.

- Iwanaga, K., and S. Tojo. 1986. Effects of juvenile hormone and rearing density on wing dimorphism and oöcyte development in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology*. 32(6): 585-590.
- Jairin, J., P. Leelagud, A. Pongmee, and K. Srivilai. 2017. Chromosomal location of a recessive red-eye mutant gene in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) (Insecta: Hemiptera). *Advances in Entomology*. 5(1): 33-39.
- Karlin, S., and V. Brendel. 1988. Charge configurations in viral proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(24): 9396-9400.
- Kearns, C.G., and D.W. Mossop. 1984. Detection of nepoviruses of *Vitis vinifera* in New Zealand using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 27(3): 431-435.
- Krishnaiah, N.V. 2015. Influence of diversity in rice, BPH and humans on BPH management strategies. *Molecular Entomology*. 6(5): 1-13.
- Lai, D., Y. Zhang, Q. Huang, G. Yin, K.K. Pennerman, Z. Liu, and A. Guo. 2018. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification to rapidly detect rice ragged stunt virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25(8): 1577-1584.
- Le, D.T., O. Netsu, T. Uehara-Ichiki, T. Shimizu, I.R. Choi, T. Omura, and T. Sasaya. 2010. Molecular detection of nine rice viruses by a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Virological Methods*. 170(1-2): 90-93.
- Lei, J.L., Y.P. Lu, D.D. Jin, S.X. Chen, and J. Chen. 2001. RT-PCR detection of rice ragged stunt virus in rice plant and insect vector. *Acta Phytopathologica Sinica*. 31: 306-309.
- Leite, F.L., C.C. Bueno, A.L. Da Róz, E.C. Ziemath, and O.N. Oliveira. 2012. Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(10): 12773-12856.
- Linak, J.A., A.L. Jacobson, T.L. Sit, and G.G. Kennedy. 2020. Relationships of virus titers and transmission rates among sympatric and allopatric virus isolates and thrips vectors support local adaptation. *Scientific Reports*. 10(1): 7649.
- Ling, K.C., and V.M. Aguiero. 1977. Transmission of rice ragged stunt by biotypes of *Nilaparvata lugens*. *International Rice Research Newsletter*. 2(6): 12.
- Ling, K.C., E.R. Tiongco, and V.M. Aguiero. 1977. Transmission of rice ragged stunt disease. *International Rice Research Newsletter*. 2(6): 11-12.
- Liu, H., X.-J. Song, Y.-Q. Ni, L.-N. Lu, X.-P. Zhou, and J.-X. Wu. 2014. Highly sensitive and specific monoclonal antibody-based serological methods for rice ragged stunt virus detection in rice plants and rice brown planthopper vectors. *Journal of Integrative Agriculture*. 13(9): 1943-1951.
- Luisoni, E., R.G. Milne, and P. Roggero. 1982. Diagnosis of rice ragged stunt virus by enzyme-linked immunosorbent assay and immunosorbent electron microscopy. *Plant Disease*. 66(10): 929-932.
- Luttmann, W., K. Bratke, M. Kupper, and D. Myrtek. 2006. *Immunology (The Experimenter Series)*. 1st Edition. Academic Press, USA.
- Matsushita, T., H. Suzuki, N. Shirasaki, Y. Matsui, and K. Ohno. 2013. Adsorptive virus removal with super-powdered activated carbon. *Separation and Purification Technology*. 107: 79-84.

- Michen, B., and T. Graule. 2010. Isoelectric point of viruses. *Journal of Applied Microbiology*. 109(2): 388-397.
- Morinaka, T., M. Putta, D. Chettanachit, A. Parejarearn, and S. Disthaporn. 1983. Transmission of rice ragged stunt disease in Thailand. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 17(2): 138-144.
- 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, Thailand.
- Na Phatthalung, T., W. Rattanakarn, and W. Tangkananond. 2015. The minimum infected time for detection and diagnosis of rice ragged stunt virus (RRSV) infected rice by one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (one-step RT-PCR) and dot-immunobinding assay (DIBA) technique, pp. 757-768. In: *Proceeding of the 5th International Silpakorn Graduate Study Conference (ISGSC)*, 16-17 July 2015. The Princess Maha Chakri Sirindhorn Anthropology Centre, Bangkok, Thailand.
- Na Phatthalung, T., W. Rattanakarn, and W. Tangkananond. 2017a. 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(2): 104-115.
- 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(4S): 369-391.
- Na Phatthalung, T., and W. Tangkananond. 2021. The specific feeding behavior modes, interactions between virus and host components, and mechanisms of circulative non-propagative and circulative propagative plant viral disease transmission by insect vectors. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 49(4): 939-955.
- Na Phatthalung, T., W. Tangkananond, and W. Rattanakarn. 2017b. The efficiency of rice ragged stunt virus detection in the brown planthoppers by dot-immunobinding assay. *Thai Journal of Science and Technology*. 6(3): 236-246.
- Na Phatthalung, T., W. Rattanakarn, and W. Tangkananond. 2018. Efficiency of an indirect NCM-ELISA for assessment of infectivity survival and rice ragged stunt virus transmission from frozen rice plant tissue samples by an insect vectors, the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål), pp. 88-95. In: *Proceeding of the 56th Kasetsart University Annual Conference*, Jan 30-Feb 2 2018, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Naik, R. 1979. Occurrence of rice ragged stunt disease in West Bengal, India. *International Rice Research Newsletter*. 4(2): 12.
- Omura, T., H. Hibino, T. Usugi, H. Inoue, T. Morinaka, S. Tsurumachi, C.A. Ong, M. Putta, T. Tsuchizaki, and Y. Saito. 1984. Detection of rice viruses in plants and individual insect vectors by latex flocculation test. *Plant Disease*. 68(5): 374-378.
- Omura, T. 1985. Detection of rice viruses in plants and individual insect vectors by serological methods. *Japan International Research Center for Agricultural Sciences*. 19: 183-186.
- Palmer, L.T., and Y. Soepriaman. 1977. Rice ragged stunt disease in Indonesia. *International Rice Research Newsletter*. 2 (5): 5-6.
- Pan, P.-L., Y.-X. Ye, Y.-H. Lou, J.-B. Lu, C. Cheng, Y. Shen, B. Moussian, and C.-X. Zhang. 2018. A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 115(20): 5175-5180.

- Pletincx, S., L. Trotochaud, L.L. Fockaert, J.M. Mol, A.R. Head, O. Karslioğlu, H. Bluhm, H. Terryn, and T. Hauffman. 2017. In situ characterization of the initial effect of water on molecular interactions at the interface of organic/inorganic hybrid systems. *Scientific Reports*. 7: 45123.
- Pochanukul, A. 1995. Development of cDNA probe for the detection of rice ragged stunt virus. M.S. Thesis. Kasetsart University. Bangkok, Thailand.
- Quinlivan, P.A., L. Li, and D.R. Knappe. 2005. Effects of activated carbon characteristics on the simultaneous adsorption of aqueous organic micropollutants and natural organic matter. *Water Research*. 39(8): 1663-1673.
- Rattanakarn, W., R. Dhitikiattipong, and W. Khemmuk. 2011. Developing of rice ragged stunt virus test kit using immunochromatographic assay. *Agricultural Science Journal*. 42(2S): 645-649.
- Senboku, T., E. Shibata, E.R. Tiongco, and K.C. Ling. 1978. Bioassay of rice ragged stunt virus. *International Rice Research Newsletter*. 3(1): 11.
- Senboku, T., T.-G. Chou, and E. Shikata. 1979. Some physical properties of rice ragged stunt virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 45: 735-737.
- Requião, R.D., R.L. Carneiro, M.H. Moreira, M. Ribeiro-Alves, S. Rossetto, F.L. Palhano, and T. Domitrovic. 2019. Icosahedral viruses defined by their positively charged domains: A signature for viral identity and capsid assembly strategy. *bioRxiv*. 600981.
- Requião, R.D., R.L. Carneiro, M.H. Moreira, M. Ribeiro-Alves, S. Rossetto, F.L. Palhano, and T. Domitrovic. 2020. Viruses with different genome types adopt a similar strategy to pack nucleic acids based on positively charged protein domains. *Scientific Reports*. 10(1): 5470.
- Shu-hua, L., T. Jian, L. Ju, Y. Bao-jun, W. Ai-ying, and W. Jin-cai. 2016. Cloning and characterization of karmoisin homologue gene (*Nlka*) in two brown planthopper strains with different eye colors. *Rice Science*. 23(2): 104-110.
- Siwanowicz, I., and M. Burrows. 2017. Three dimensional reconstruction of energy stores for jumping in planthoppers and froghoppers from confocal laser scanning microscopy. *eLife*. 6: e23824.
- Srilunchang, M. 1996. Production of monoclonal antibody for diagnosis of rice ragged stunt disease in Thailand. M.S. Thesis. Kasetsart University. Bangkok, Thailand.
- Stengl, V., S. Bakardjieva, M. Marikova, J. Subrt, F. Oplustil, and M. Olsanska. 2003. Aerogel nanoscale aluminium oxides as a destructive sorbent for mustard gas. *Ceramics Silikaty*. 47(4): 175-180.
- Stengl, V., S. Bakardjieva, M. Marikova, J. Subrt, F. Oplustil, and M. Olsanska. 2004. Aerogel nanoscale magnesium oxides as a destructive sorbent for toxic chemical agents. *Central European Journal of Chemistry*. 2(1): 16-33.
- Tarapitakcheevin, P., P. Weerayutsil, and K. Khuanmar. 2013. Adsorption of acid dye on activated carbon prepared from water hyacinth by sodium chloride activation. *GMSARN International Journal*. 7: 83-90.
- Tessmer, C.H., R.D. Vidic, and L.J. Uranowski. 1997. Impact of oxygen-containing surface functional groups on activated carbon adsorption of phenols. *Environmental Science & Technology*. 31(7): 1872-1878.

- Uchiyama, H., S. Maehara, H. Ohta, T. Seki, and Y. Tanaka. 2018. Elevenin regulates the body color through a G protein-coupled receptor NLA42 in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *General and Comparative Endocrinology*. 258: 33-38.
- Xi, Y., P.L. Pan, Y.X. Ye, B. Yu, and C.X. Zhang. 2014. Chitin deacetylase family genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Molecular Biology*. 23(6): 695-705.
- Yan, J., H. Kudo, I. Uyeda, S.-Y. Lee, and E. Shikata. 1992. Conserved terminal sequences of rice ragged stunt virus genomic RNA. *Journal of General Virology*. 73: 785-789.
- Yang, X., J. Huang, C. Liu, B. Chen, T. Zhang, and G. Zhou. 2017. Rice stripe mosaic virus, a novel Cytorhabdovirus infecting rice via leafhopper transmission. *Frontiers in Microbiology*. 7: 2140.
- Yoshikawa, N. 1986. Improving of dot-immunobinding assay for very rapid detection of plant viruses, pp. 25-26. In: *Proceedings of the 4th Annual Conference on Methodological Techniques in Biological Sciences*, 12-13 Nov 1986. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand.
- Yoshikawa, N., P. Poolpol, and T. Inouye. 1986. Use of a dot-immunobinding assay for rapid detection of strawberry pseudo mild yellow-edge virus. *Japanese Journal of Phytopathology*. 52(4): 728-731.
- Yu, B., D.T. Li, S.L. Wang, H.J. Xu, Y.Y. Bao, and C.X. Zhang. 2016. Ion transport peptide (ITP) regulates wing expansion and cuticle melanism in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*. 25(6): 778-787.

Appendix 1: The efficiency of extraction buffers to BPH-melanin pigment reduction

EB-Code	Melanin Pigment Absorbance (A ₄₀₅)									Avg (n=3)	% Removal
	BPH-Instar Nymph Stages					Wing Dimorphism of Adult Stages					
	First	Second	Third	Fourth	Fifth	SW- Male	SW- Female	LW- Male	LW- Female		
EB-1	0.014	0.017	0.038	0.070	0.120	0.304	0.310	0.314	0.321	0.168	0.000
EB-2	0.013	0.016	0.036	0.069	0.119	0.302	0.309	0.311	0.319	0.166	1.190
EB-3	0.013	0.016	0.036	0.069	0.118	0.301	0.308	0.310	0.318	0.165	1.786
EB-4*	0.013	0.015	0.032	0.063	0.114	0.300	0.302	0.308	0.312	0.162	3.571
EB-5	0.012	0.016	0.036	0.069	0.119	0.302	0.308	0.310	0.318	0.166	1.190
EB-6	0.013	0.015	0.037	0.070	0.118	0.301	0.309	0.310	0.317	0.166	1.190
EB-7	0.012	0.016	0.036	0.070	0.117	0.301	0.307	0.310	0.318	0.165	1.786
EB-8*	0.012	0.016	0.031	0.062	0.114	0.302	0.300	0.308	0.313	0.162	3.571
EB-9	0.013	0.015	0.036	0.068	0.116	0.300	0.308	0.311	0.319	0.165	1.786
EB-10	0.012	0.014	0.035	0.067	0.116	0.301	0.308	0.311	0.319	0.165	1.786
EB-11	0.013	0.015	0.036	0.068	0.115	0.301	0.309	0.310	0.318	0.165	1.786
EB-12*	0.013	0.015	0.030	0.060	0.113	0.302	0.298	0.306	0.311	0.161	4.167
EB-13*	0.013	0.015	0.030	0.060	0.114	0.301	0.300	0.307	0.311	0.161	4.167
EB-14*	0.013	0.015	0.029	0.060	0.112	0.301	0.296	0.304	0.309	0.160	4.762
EB-15	0.013	0.015	0.035	0.068	0.112	0.300	0.308	0.309	0.317	0.164	2.381
EB-16	0.014	0.015	0.035	0.069	0.115	0.301	0.307	0.309	0.318	0.165	1.786

Note: *The high efficiency reduction capability of extraction buffers to BPH-melanin pigment in crude sap

Appendix 2: The ability of extraction buffers for interfering removal in BPH crude sap

Buffers	Sap of BPH-Instar Nymphs ^{1/}					Sap of BPH Adults ^{1/}			
	First	Second	Third	Fourth	Fifth	Short-Winged Brachypterous Form		Long-Winged Macropterous Form	
						Male	Female	Male	Female
EB-1	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a
EB-4	7.143±7.143a	9.804±3.397b	15.789±2.632b	10.476±1.650b	4.722±0.481b	1.206±0.828b	2.473±0.812b	2.017±0.368b	2.700±0.360b
EB-8	11.905±10.911a	7.843±3.397b	17.544±4.020bc	10.953±0.825b	4.722±0.481b	0.219±0.190ab	3.333±0.372c	1.911±0.319b	2.596±0.180b
EB-12	7.143±7.143a	13.726±3.396b	20.176±1.520bcd	13.810±0.825c	5.833±0.834c	0.768±0.685ab	3.871±0.323cd	2.548±0.319c	3.219±0.360c
EB-13	4.762±8.248a	9.804±3.397b	21.930±1.519cd	13.810±0.825c	5.278±0.481bc	0.877±0.685ab	4.194±0.323d	2.972±0.184cd	3.219±0.180c
EB-14	4.762±4.124a	9.804±3.397b	22.807±4.020d	14.762±0.824c	6.945±0.481d	0.877±0.503ab	4.409±0.186d	3.291±0.184d	3.635±0.360c
p-value	0.152ns	0.004*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	0.160ns	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*

Appendix 3: The ability of adsorbents for melanin pigment removal in BPH crude sap

Buffers	Sap of BPH-Instar Nymphs ^{1/}					Sap of BPH Adults ^{1/}			
	First	Second	Third	Fourth	Fifth	Short-Winged Brachypterous Form		Long-Winged Macropterous Form	
						Male	Female	Male	Female
EB-1	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a	0.000a
(A) Magnesium Oxide (MgO)									
EB-8M	38.095±8.248c	35.294±5.882b	33.334±1.520bc	25.238±1.649b	16.389±0.482b	8.772±0.190d	10.753±0.492c	9.023±0.184b	11.423±0.360de
EB-12M	26.190±4.123b	39.215±3.396bc	33.334±1.520bc	23.810±2.182b	17.778±1.273c	7.785±0.190b	11.398±0.186d	9.554±0.552c	10.696±0.180c
EB-14M	33.333±4.124bc	45.098±3.397c	32.456±1.520b	27.619±0.824c	18.889±0.482d	8.334±0.190c	10.215±0.372b	8.917±0.319b	10.176±0.180b
(B) Aluminum Oxide (Al₂O₃)									
EB-8A	40.476±8.248c	39.215±3.396bc	36.842±5.263cd	28.095±0.824c	17.222±0.481bc	9.649±0.190e	11.398±0.372d	9.448±0.184bc	12.565±0.360g
EB-12A	33.333±4.124bc	37.255±3.396b	40.351±3.039de	27.619±1.649c	18.889±0.482d	8.443±0.380cd	12.150±0.186e	9.873±0.552c	11.942±0.180f
EB-14A	26.190±4.123b	45.098±3.397c	37.719±1.520de	29.047±0.825c	20.555±0.481e	9.649±0.379e	11.398±0.186d	9.979±0.368cd	11.319±0.180d
(C) Activated Carbon (A)									
EB-8C	52.381±8.248d	45.098±3.397c	39.474±2.632de	29.047±0.825c	18.889±0.482d	10.636±0.190f	12.688±0.372f	10.722±0.184e	12.877±0.180g
EB-12C	54.762±4.124d	62.745±3.396d	45.614±1.519f	29.524±0.825cd	22.222±0.481f	9.649±0.190ef	13.763±0.373g	12.208±0.487f	11.423±0.360de
EB-14C	52.381±4.124d	60.785±3.396d	41.228±1.519e	31.429±1.429d	22.778±0.481f	10.416±0.190f	11.720±0.186de	10.510±0.551de	11.734±0.180ef
p-value	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*

Notes: Appendix 2 and Appendix 3; ns = non significantly different; * = significantly different ($p < 0.05$); 1/ = Means [decreased percent (%) ±SD] in the same column followed by different letters were significant differences ($p < 0.05$) by DMRT; EB-1: BPH sap solution stock (control)