

ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวใน เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค Dot-Immunobinding Assay

The Efficiency of Rice Ragged Stunt Virus Detection in the Brown Planthoppers by Dot-Immunobinding Assay

ฐานัญญ์ ณ พัทลุง และวิภา ตั้งคนานนท์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

วิชชุดา รัตนากัญจน์

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ถนนพหลโยธิน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Thanat Na-Phatthalung and Wipa Tangkananond*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Witchuda Rattanakarn

Bureau of Rice Research and Development, Rice Department, Phaholyothin Road,

Ladyao, Chatuchack, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

การตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุด (minimum latent period) ของไวรัสใบหงิกข้าว (Rice ragged stunt virus, RRSV) ในน้ำคั้นแมลงพาหะชนิดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper, *Nilaparvata lugens*) ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกสู่เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ด้วยเทคนิค dot-immunobinding assay (DIBA) สามารถตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นแมลงพาหะได้ทั้งในระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัย โดยสามารถตรวจพบไวรัสในระยะตัวอ่อนของแมลง ตั้งแต่วัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 และระยะตัวเต็มวัย ทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง (3 วัน) ที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลงระยะตัวอ่อนที่ระดับ 1:2, 1:2, 1:5, 1:50 และ 1:50 เท่า ตามลำดับ และที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลงระยะตัวเต็มวัยทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาวที่ระดับ 1:50 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นการใช้เทคนิค DIBA จึงสามารถใช้ตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวของไวรัสใบหงิกข้าวในแมลงพาหะได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการเจริญเติบโต จนถึงระยะตัวเต็มวัย

คำสำคัญ : ไวรัสใบหงิกข้าว; เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล; ชีววิทยา

Abstract

The detection of the minimum latent period of *Rice ragged stunt virus* (RRSV) in the insect sap (brown planthopper, *Nilaparvata lugens*) after transmitted from the symptomatic infected rice plants to the insect vectors was performed. Dot-immunobinding assays (DIBA) could detected the RRSV in the insect sap within the first to fifth instars of the nymphal stages and the females, males, short winged form (brachypterous form) and long winged form (macropterous form) of the adult stages at 72 hours (3 days) after infestation. The maximum dilutions of insect sap of the first to fifth instars of the nymphal stages were at 1:2, 1:2, 1:5, 1:50 and 1:50, respectively. For the dilutions of those females and males, short winged and long winged forms were the same, 1:50. Therefore, the DIBA can be used to check the minimum latent period of RRSV in the insect vectors at the initial stage through the adult stage of the insect's growth.

Keywords: *Rice ragged stunt virus*; brown planthopper; serology

1. คำนำ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper, BPH) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nilaparvata lugens* (Stål) เป็นแมลงศัตรูข้าวจำพวกดูดกินน้ำเลี้ยง (juice sucker) อยู่ในอันดับ (order) *Homoptera* และจัดอยู่ในวงศ์ (family) *Delphacidae* ซึ่งมีความสำคัญมากเป็นอันดับหนึ่งในกระบวนการปลูกข้าวของประเทศไทยและพื้นที่ปลูกข้าวเอเชีย เนื่องจากเป็นแมลงศัตรูข้าวที่มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับพันธุ์ข้าวใหม่ ๆ ได้อย่างรวดเร็ว และมีการอพยพหรือย้ายที่ (displacement) ในช่วงระหว่างฤดูและสิ้นสุดฤดูการปลูกข้าว จึงทำให้สามารถที่จะรวมตัวและแพร่ระบาดไปได้อย่างกว้างขวางและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าว (*Rice ragged stunt virus*, RRSV) ซึ่งเป็นไวรัสในสกุล (genus) *Oryzavirus* อยู่ในวงศ์ (family) *Reoviridae* โดยไวรัสและแมลงพาหะนั้นจะมีปฏิสัมพันธ์ต่อกันแบบยั่งยืน (persistent-propagative manner) (ดารา และคณะ, 2533; วารี, 2543; สุเทพ, 2552; อุทัย และคณะ, 2551) ลักษณะอาการของต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกนั้นสามารถ

เกิดขึ้นได้ทุกส่วนของต้นข้าว โดยจะแสดงอาการต้นเตี้ย แคระแกรน (stunt) สีของใบเขียวเข้ม (dark green leaf) มีลักษณะแคบและสั้นกว่าปกติ (short leaf) บริเวณปลายใบจะบิดม้วนเป็นเกลียวจนแน่น (twisted leaf) ขอบใบขาดแหวน (malformed) บริเวณผิวใบด้านนอกจะพบเส้นใบบวมโป่งเป็นแถบยาว (vein-swellings) มีการแตกหน่อตรงข้อส่วนบนของลำต้น ลักษณะอาการเช่นนี้ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงประมาณ 30-75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมล็ดจะต่างสี และเสียคุณภาพเป็นส่วนมาก และจะปรากฏลักษณะอาการของโรคให้เห็นภายหลังจากต้นข้าวได้รับการถ่ายทอดโรคแล้วเป็นระยะเวลาประมาณ 15-30 วัน ขึ้นกับพันธุ์ข้าวที่ใช้ ฤดูกาล และการบริหารจัดการ (วิชชุตา, 2553; ฐานัญ, 2557; Na-Phatthalung *et al.*, 2015) และในปัจจุบันยังไม่มีพันธุ์ข้าวใดที่สามารถต้านทานต่อการทำลายของแมลงในสภาพธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งหากสามารถที่จะตรวจสอบไวรัสในแมลงได้ตั้งแต่เริ่มต้นฤดูปลูกช่วงที่แมลงมีการอพยพเข้ามาในแปลงนา (immigration) รวมทั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของแมลง

จะทำให้สามารถที่จะประเมินสถานการณ์การระบาดเบื้องต้นในพื้นที่ปลูกข้าวทั้งในประเทศและพื้นที่ใกล้เคียงได้ เพื่อลดความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้น

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสใบหงิกขาวในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค dot-immunobinding assay (DIBA) ซึ่งเป็นเทคนิคทางชีววิทยา เช่นเดียวกับเทคนิค ELISA และเป็นวิธีที่มีความไวสูง (high sensitivity) โดยสามารถใช้ในการตรวจสอบไวรัสได้ในระดับพิโคกรัม ตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้ง่ายและแปลผลได้อย่างแม่นยำด้วยตาเปล่า

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมแมลงพาหะ ไวรัสใบหงิกขาว พืชอาหาร พืชอาศัย และการถ่ายทอดไวรัส

2.1.1 การเตรียมแมลงพาหะและไวรัสใบหงิกขาว

เลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) โดยใช้ต้นข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 (Taichung Native 1, TN1) เป็นพืชอาหารและพืชอาศัยของแมลง ภายในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ (% relative humidity, RH) 70 ± 10 เปอร์เซ็นต์ และช่วงแสง (photoperiod) 12 ชั่วโมงต่อวัน ตกกล้าข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 ในถาดเพาะต้นกล้า ขนาด $6 \times 12 \times 1.5$ นิ้ว เมื่อต้นกล้าข้าวอายุได้ 10 วัน นำไปให้แมลงดูดกินในกรงเลี้ยงแมลงขนาด $16 \times 16 \times 24$ นิ้ว ซึ่งผนังกรงบุด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 mesh และจะเปลี่ยนต้นกล้าข้าวชุดใหม่เพื่อให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดูดกิน เมื่อต้นกล้าข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 การเตรียมพืชอาหารและพืชอาศัยของแมลงพาหะ

เตรียมตัวอย่างต้นข้าวที่แสดงอาการ

ของโรคใบหงิก อายุข้าว 60 วัน เพื่อใช้ในการถ่ายทอดโรคใบหงิกโดยแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไปสู่ต้นข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรค และใช้เป็นพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานสำหรับการทดสอบอาการของโรคใบหงิกขาว (ตัวอย่างต้นข้าวและเมล็ดข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิชาการโรคข้าว สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว) นำต้นกล้าข้าวอายุ 10 วัน มาปักดำในกระถางดินรูปทรงกระบอกก้นปิด ขนาด $6 \times 6 \times 6$ นิ้ว กระถางละ 3 กอ กอละ 3 ต้น ภายหลังปักดำเพื่อระยะเวลาให้ต้นกล้าข้าวฟื้นตัวนาน 3 วัน จึงถ่ายทอดไวรัสใบหงิกขาวโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพื่อใช้เป็นพืชอาหารและพืชอาศัยของไวรัสใบหงิกขาวต่อไป

2.1.3 การถ่ายทอดไวรัสใบหงิกขาว

เลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในระยะตัวเต็มวัย โดยใช้แมลงจำนวน 50-100 ตัวต่อต้น และใช้ต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกอย่างชัดเจนเป็นพืชอาหารและพืชอาศัย เพื่อให้แมลงวางไข่บนต้นข้าว รอให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนในระยะที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 และระยะตัวเต็มวัย แล้วถ่ายทอดไวรัสใบหงิกขาวสู่แมลงพาหะ (เปลี่ยนต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิก เมื่อต้นข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ 50 %) และคัดเลือกแมลงตามระยะการเจริญเติบโต (ตัวอ่อนวัยที่ 1-5 และตัวเต็มวัย) ชนิดเพศ และลักษณะปีกด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) ซึ่งจะคัดเลือกและเก็บตัวอย่างแมลงในระยะต่าง ๆ ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวสู่แมลงที่ระยะเวลาเป็นชั่วโมง ได้แก่ 1, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง และระยะเวลาเป็นวัน ได้แก่ 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 และ 16 วัน ตามลำดับ

2.2 การตรวจสอบไวรัสใบหงิกขาวในแมลงพาหะด้วยเทคนิค DIBA

2.2.1 การเตรียมน้ำคั้นแมลง

คัดเลือกแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัส ตามระยะการเจริญเติบโต (ตัวอ่อนวัยที่ 1-5 และตัวเต็มวัย) ชนิดเพศ และลักษณะปีกด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป โดยใช้ตัวอย่างแมลงจำนวน 10 ตัว นำแมลงใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และฆ่าโดยการใช้อีเทอร์เพื่อให้แมลงสลบ จากนั้นนำแมลงไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา นำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่เตรียมไว้มาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร ระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ที่เติมสารละลายโพลีไวนิลไพโรลิโดน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer, EB) [0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 2 % polyvinylpyrrolidone (PVP)] จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น ผสมบัฟเฟอร์สกัดและแมลงให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายบัฟเฟอร์สกัด และแมลงขึ้นลง เพื่อบดแมลงในสารละลายบัฟเฟอร์สกัด และผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เขย่านาน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 16,532g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อครบระยะเวลา นำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์มาบดแมลงในสารละลายบัฟเฟอร์สกัด ด้วยการใช้ปิเปตอัตโนมัติ ดูดสารละลายบัฟเฟอร์สกัดและแมลงขึ้นลง ทำซ้ำอีก 2 รอบ จนสามารถบดแมลงในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดให้เข้ากัน

2.2.2 การเจือจางน้ำคั้นแมลง

เจือจางน้ำคั้นแมลงด้วยบัฟเฟอร์สกัดในอัตราการแข่งขัน 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 และ 1:500 เท่า ตามลำดับ โดยพิจารณาอัตราการเจือจางของน้ำคั้นแมลงสูงสุดที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน เปรียบเทียบกับน้ำคั้นแมลงจากตัวอย่างแมลงปกติ (healthy insect sap, HIS) ที่

เตรียมด้วยวิธีเดียวกันกับน้ำคั้นแมลงที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิก และสารละลายบัฟเฟอร์สกัด (EB) ซึ่งใช้เป็นสิ่งควบคุมเชิงลบ (negative control, NC)

2.2.3 การเตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลส

แบ่งช่องแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitro-cellulose membrane) (7x8.4 cm, pore size 0.45 μ m, Bio-Rad) ให้มีขนาด 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วตัดที่มุมหนึ่งเพื่อเป็นเครื่องหมาย นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัด นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 15 นาที

2.2.4 การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (ฐานภู, 2557; Na-Phatthalung *et al.*, 2015)

(1) หยดสารละลายในแต่ละตัวอย่างที่เตรียมไว้ ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

(2) แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย PBS-T-SK [0.01 M PBS (pH 7.4), 0.5 % Tween-20, 5 % skimmed milk (SK)] (เตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้) จำนวน 30 มล. และบ่มปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่า (VSR-50 Laboratory Platform Rocker) ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

(3) ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย PBS-T [0.01 M PBS (pH 7.4), 0.5 % Tween-20] จำนวน 30 มล. ในภาชนะปิด และตั้งบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที

(4) แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายแอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกขาว (anti-RRSV IgG) ที่อัตราการเจือจาง 1:1,000 เท่า ด้วยสารละลาย PBS-T-SK จำนวน 30 มล. บ่มปฏิกิริยาที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (overnight) (แอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกขาวได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณวิชชุดา รัตนากาญจน์ สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว)

(5) ล้างส่วนเกินของแอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกขาวออก โดยใช้สารละลาย PBS-T-SK จำนวน 30 มล. บนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที

(6) แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย Goat anti-rabbit serum conjugate alkaline phosphatase (GAR-AP) (ZyMax™) ที่อัตราการเจือจาง 1:5,000 เท่า ด้วยสารละลาย PBS-T จำนวน 30 มล. (เตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง

(7) ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS-T จำนวน 30 มล. บนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที

(8) แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย BCIP/NBT (SIGMAFAST™) จำนวน 30 มล. บ่มไว้ในที่มีดจนกระทั่งสีของปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างชัดเจน นาน 3-5 ชั่วโมง

(9) หยุดปฏิกิริยาโดยการใช้น้ำกลั่นจำนวน 30 มล. ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที และนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสวางบนกระดาษกรอง ซับจนแห้ง จากนั้นตรวจสอบสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (เคลื่อนย้ายแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ปากคีบ และผู้ปฏิบัติการต้องสวมถุงมือ)

2.3 การตรวจสอบผลการวิจัย

ตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุด (minimum latent period) และอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลง ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกขาวจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคสู่แมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยตรวจสอบทั้งในระยะตัวอ่อน วัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 และระยะตัวเต็มวัย ทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว



รูปที่ 1 ลักษณะพัฒนาการของระยะตัวอ่อนเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ก) ลักษณะไข่ (ข) ตัวอ่อน ระยะที่ 1 อายุ 3 วัน (ค) ตัวอ่อน ระยะที่ 2 อายุ 6 วัน (ง) ตัวอ่อน ระยะที่ 3 อายุ 9 วัน (จ) ตัวอ่อน ระยะที่ 4 อายุ 11 วัน และ (ฉ) ตัวอ่อน ระยะที่ 5 อายุ 14 วัน

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวของไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวอ่อนของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวอ่อนตั้งแต่วัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (รูปที่ 1) ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิก คือ 72 ชั่วโมง (3 วัน)

โดยปฏิบัติการตรวจสอบไวรัสใบหงิกขาวในน้ำคั้นแมลงจากแมลงปกติ (HIS) นั้นให้สปีกิริยาเป็นสีน้ำตาลอ่อนปกติซึ่งเป็นสีของน้ำคั้นแมลง ในขณะที่น้ำคั้นแมลงจากแมลงที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกจะให้สีของปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินม่วง ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันระหว่างแอนติบอดีอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และสารตั้งต้นที่ใช้ คือ BCIP/NBT โดยจะปรากฏบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสอย่างชัดเจน (รูปที่ 2)

ระยะตัวอ่อน	ระยะเวลาแฝงตัวของไวรัสใบหงิกขาวในแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ชั่วโมง)											
	1	6	12	18	24	36	48	72	96	120	HIS	EB
1												
2												
3												
4												
5												

รูปที่ 2 การตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุด (ชั่วโมง) ของไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวอ่อน (วัยที่ 1-5) ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค DIBA [หมายเหตุ : ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control, NC) คือ น้ำคั้นจากแมลงปกติ (healthy insect sap, HIS) และสารละลายบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer, EB)]

ระยะตัวอ่อน	อัตราการใช้ (เท่า)						EB
	1:2	1:5	1:10	1:50	1:100	1:500	
1							
2							
3							
4							
5							

รูปที่ 3 อัตราการใช้ของน้ำคั้นแมลงที่ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดของไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวอ่อน (วัยที่ 1-5) ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค DIBA [หมายเหตุ : ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control, NC) ที่ใช้ในการวิจัย คือ สารละลายบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer, EB)]

3.2 อัตราการเจริญของน้ำคั้นแมลงที่ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดของไวรัสใบหงิกข้าวในระยะตัวอ่อนของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในระยะตัวอ่อนตั้งแต่วัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิก คือ 72 ชั่วโมง (3 วัน) โดยสามารถตรวจสอบอัตราการเจริญสูงสุด ได้ที่ระดับ 1:2, 1:2, 1:5, 1:50 และ 1:50 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 3)

3.3 การตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวของไวรัสใบหงิกข้าวในระยะตัวเต็มวัยของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในระยะตัวเต็มวัยทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิก คือ 72 ชั่วโมง (3 วัน) โดยปฏิบัติการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นแมลงจากแมลงปกติ (HIS) นั้น ให้สปีฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลอ่อนปกติซึ่งเป็นสีของน้ำคั้นแมลง ในขณะที่น้ำคั้นแมลงจากแมลงที่ได้รับการ

ถ่ายทอดไวรัสใบหงิกจะให้สีของปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินม่วง โดยสามารถตรวจพบปฏิกิริยาได้ต่อเนื่องตลอดชั่วชีวิตของแมลง ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทดสอบสิ้นสุดที่ช่วงอายุของแมลง 16 วัน ภายหลังแมลงเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย โดยเป็นผลจากปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันระหว่างแอนติบอดีอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และสารตั้งต้นที่ใช้ คือ BCIP/NBT โดยจะปรากฏบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสอย่างชัดเจน (รูปที่ 5)

3.4 อัตราการเจริญของน้ำคั้นแมลงที่ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดของไวรัสใบหงิกข้าวในระยะตัวเต็มวัยของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในระยะตัวเต็มวัยทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิก คือ 72 ชั่วโมง (3 วัน) โดยสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาได้จากอัตราการเจริญสูงสุดของน้ำคั้นแมลงที่ระดับ 1:50 เท่า ทั้งชนิดตัวเต็มวัยเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ตามลำดับ (รูปที่ 6)



รูปที่ 4 ลักษณะตัวเต็มวัยและเพศของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ก) ตัวเต็มวัยเพศเมีย ชนิดปีกสั้น (ข) ตัวเต็มวัยเพศผู้ ชนิดปีกสั้น (ค) ตัวเต็มวัยเพศเมีย ชนิดปีกยาว และ (ง) ตัวเต็มวัยเพศผู้ ชนิดปีกยาว

เพศ และชนิดปีก		ระยะเวลาแฝงตัวของไวรัสใบหงิกขาวในแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล																							
		ชั่วโมง										วัน													
		1	6	12	18	24	36	48	72	96	120	6	7	8	9	10	HIS	11	12	13	14	15	16	HIS	EB
F	S																								
	L																								
M	S																								
	L																								

รูปที่ 5 การตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุด (ชั่วโมง/วัน) ของไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวเต็มวัย ทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค DIBA [หมายเหตุ : F (เพศเมีย, female), M (เพศผู้, male), S (ตัวเต็มวัยแมลงชนิดปีกสั้น, short winged form), L (ตัวเต็มวัยแมลงชนิดปีกยาว, long winged form), ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control, NC) คือ น้ำคั้นจากแมลงปกติ (healthy insect sap, HIS) และสารละลายบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer, EB)]

รูปที่ 6 อัตราการเจือจางของน้ำคั้นแมลงที่ระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดของไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวเต็มวัยทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค DIBA [หมายเหตุ : F (เพศเมีย, female), M (เพศผู้, male), S (ตัวเต็มวัยแมลงชนิดปีกสั้น, short winged form), L (ตัวเต็มวัยแมลงชนิดปีกยาว, long winged form), ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control, NC) ที่ใช้ในการวิจัย คือ สารละลายบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer, EB)]

เพศ และชนิดปีก		อัตราการเจือจาง (เท่า)						
		1:2	1:5	1:10	1:50	1:100	1:500	EB
F	S							
	L							
M	S							
	L							

วิธีการตรวจสอบไวรัสใบหงิกขาวในน้ำคั้นแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัส ด้วยเทคนิค DIBA ในการรายงานครั้งนี้ อาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันระหว่างไวรัสใบหงิกขาว และแอนติซีรัมของไวรัสใบหงิกขาว บนแผ่นรองรับปฏิกิริยาในโตรเซลลูโลสที่ใช้สารละลาย BCIP/NBT เป็นสารตั้งต้น และเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปฏิกิริยา เป็นเทคนิคที่ให้ผลค่อนข้างเร็ว มีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจสอบ

โดยใช้พืชทดสอบ และสามารถแปลผลปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า (จุฑามาศ, 2545) โดยสารตั้งต้น BCIP/NBT จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งจะทำให้สารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นสารที่มีสี และความเข้มของสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาในโตรเซลลูโลส จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติซีรัมที่มีอยู่ ซึ่งสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาในโตรเซลลูโลสนั้นจะเป็นตะกอนสีน้ำเงินม่วง มีลักษณะที่ไม่ละลายน้ำ

(insoluble) ทำให้สติดกับบนแผ่นรองรับปฏิกิริยา ไนโตรเซลลูโลสบริเวณจุดที่เกิดปฏิกิริยา เมื่อพิจารณาถึงสมบัติของแผ่นไนโตรเซลลูโลส พบว่า จะมีความสามารถในการยึดจับ (binding capacity) ที่ระดับ 80-100 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยที่แผ่นไนโตรเซลลูโลสจะมีประจุบวกซึ่งมีความสามารถในการจับกับประจุลบของโปรตีนบริเวณ พื้นผิวอนุภาคไวรัสด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) (Amersham Biosciences, 1998)

ผลจากการตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวที่ น้อยที่สุด (ชั่วโมง-วัน) ของไวรัสใบหงิกขาว ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดง อาการของโรคสู่แมลงพาหะในแต่ละระยะของการ เจริญเติบโต พบว่าระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดของ ไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวอ่อนวัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล คือ 72 ชั่วโมง (3 วัน) เท่ากันในแต่ละระยะตัวอ่อน เนื่องมาจากตัวอ่อนใน วัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มีอายุแต่ละวัยที่ 4-5, 3-5, 3-5 และ 4-5 วัน ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อ พิจารณาอัตราการเจริญสูงสุดของน้ำคั้นแมลงใน แต่ละวัย พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาที่อัตราการ เจริญสูงสุดของน้ำคั้นแมลงที่ระดับ 1:2, 1:2, 1:5, 1:50 และ 1:50 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ พิจารณาระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุด (ชั่วโมง-วัน) ของไวรัสใบหงิกขาวในระยะตัวเต็มวัยทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ของเพลี้ยกระโดดสี น้ำตาล พบว่าระยะเวลาแฝงตัวที่น้อยที่สุดภายหลั กจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดงอาการ ของโรคใบหงิกสู่แมลงพาหะ คือ 72 ชั่วโมง (3 วัน) และสามารถตรวจสอบอัตราการเจริญสูงสุดได้ที่ ระดับ 1:50 เท่า ทั้งชนิดตัวเต็มวัยเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ อัตราการเจริญของน้ำคั้นแมลงในแต่ละวัย พบว่า อัตราการเจริญของน้ำคั้นตัวอ่อนแมลงในวัยที่ 1

และ 2 ให้อัตราการเจริญที่สามารถตรวจสอบ ปฏิกิริยาได้ที่ระดับ 1:2 เท่า และอัตราการเจริญ ของน้ำคั้นตัวอ่อนแมลงสามารถตรวจสอบปฏิกิริยา ได้ที่ระดับอัตราการเจริญที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อตัวอ่อน มีพัฒนาการเข้าสู่วัยที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการเจริญของน้ำคั้นแมลงระยะตัว เต็มวัยทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ไม่ แตกต่างกัน โดยสามารถตรวจสอบอัตราการเจริญ สูงสุดได้ที่ระดับ 1:50 เท่า ทั้งนี้เนื่องมาจากไวรัสใบ หงิกขาวและแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมี ปฏิกิริยาต่อกันแบบยั่งยืน ดังนั้นไวรัสจะสามารถทวี จำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อแมลงเข้าสู่ระยะต่าง ๆ และ สามารถอยู่ในตัวแมลงได้ตลอดชีวิตของแมลง ซึ่ง สอดคล้องกับผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าไวรัส จะต้องอาศัยช่วงระยะเวลาหนึ่งในการแฝงตัวและ เพิ่มปริมาณในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ดังนั้นการ ตรวจสอบการมีอยู่ของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านนั้น จึง สามารถที่จะตรวจสอบได้เมื่อไวรัสมีการทวีจำนวน และมีปริมาณมากพอในเซลล์เจ้าบ้าน และหาก พิจารณาถึงความเข้มของสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นรองรับ ปฏิกิริยาไนโตรเซลลูโลสแล้ว จะพบว่าสีของ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นรองรับปฏิกิริยาไนโตร เซลลูโลสจะเข้มขึ้น เมื่อแมลงพัฒนาการเข้าสู่ระยะ ต่าง ๆ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ แอนติเจนหรือไวรัสที่มีอยู่ในตัวของแมลง ดังนั้น ข้อมูลประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสใบ หงิกขาวในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ด้วยเทคนิค DIBA นี้ แสดงให้เห็นถึงระยะแฝงตัวของไวรัสใบ หงิกขาวในแมลงพาหะ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ใน ทุก ๆ ระยะของการเจริญเติบโตของแมลง และ เนื่องจากการประเมินการสะสมของไวรัสในตัวแมลง นั้น ไม่สามารถที่จะประเมินได้ด้วยตาเปล่า เพราะ เมื่อแมลงได้รับไวรัสเข้าสู่ตัวของแมลงจะไม่ปรากฏ ลักษณะอาการที่ผิดปกติไปจากแมลงปกติ ดังนั้น การตรวจสอบแมลงจึงต้องอาศัยวิธีการอื่น ๆ เพื่อ

ตรวจสอบ เทคนิค DIBA จึงสามารถใช้ในการประเมินระยะแฝงตัวของไวรัสในแมลงได้ เพื่อสามารถใช้พยากรณ์ระยะการแฝงตัวของไวรัสในแมลงตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อประเมินสถานการณ์การระบาดของโรค และเตือนภัยเกษตรกรในพื้นที่ที่มีการตรวจพบหรือพื้นที่ใกล้เคียงให้มีการเฝ้าระวังการระบาดของโรคใบหงิกข้าว อันจะลดความเสียหายที่เกิดขึ้นได้

4. สรุป

การตรวจสอบระยะเวลาแฝงตัวของไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นแมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ด้วยเทคนิค DIBA ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสจากต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกสู่แมลงพาหะ สามารถตรวจพบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ในระยะตัวอ่อนของแมลง ตั้งแต่วัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 และระยะตัวเต็มวัย ทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง (3 วัน) โดยสามารถตรวจพบปฏิกิริยาที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลงระยะตัวอ่อน ที่ระดับ 1:2, 1:2, 1:5, 1:50 และ 1:50 เท่า ตามลำดับ และสามารถตรวจพบปฏิกิริยาที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นแมลงระยะตัวเต็มวัยทั้งชนิดเพศเมีย เพศผู้ ปีกสั้น และปีกยาว ที่ระดับ 1:50 เท่า ตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) (Research and Researchers for Industries, RRI) ระดับปริญญาเอก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (The Thailand Research Fund, TRF) โดยมีบริษัท เจียไต๋ จำกัด เป็นบริษัทเอกชนร่วมสนับสนุนทุนวิจัย เลขที่สัญญา PHD59I0061 และ

ขอขอบพระคุณ สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่าง สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

6. รายการอ้างอิง

- จุฑามาศ เพี้ยชัย, 2545, การยับยั้งเชื้อ *Odontoglossum ringspot tobamovirus* โดยใช้สายเปปไทด์สังเคราะห์ melittin, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- ฐานัญ ณ พัทลุง, 2557, การเปรียบเทียบวิธี One-Step RT-PCR และ DIBA ในการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าว, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.
- ดารา เจตนะจิตร, สมคิด ดิสถาพร, อมรา สนิมทอง, เมธี ปุตตะ, วิชชุดา รัตนกาญจน์ และจรรยา อารยาพันธ์, 2533, โรคจู๋ของข้าว, นสพ.กสิกร 63(4): 369-372.
- วารี หงส์พฤกษ์, 2543, เพลี้ยจักจั่นและเพลี้ยกระโดดศัตรูพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย, กองกีฏวิทยาและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- วิชชุดา รัตนกาญจน์, 2553, โรคใบหงิกและโรคเขียวเตี้ย : ภัยร้ายของชาวนาที่มาจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล, ว.วิชาการข้าว 4(1): 83-94.
- สุเทพ สหายา, 2552, การจัดการเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอย่างยั่งยืน, ว.กีฏและสัตววิทยา 27(2): 63-65.
- อุทัย รุ่งเรืองศรี, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และนลินี รุ่งเรืองศรี, 2551, กายวิภาคในการก่อโรคข้าวใบหงิกและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Rice ragged stunt virus*, รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- Amersham Biosciences, 1998, Protein blotting

(Development Technique File No. 220 PhastSystem™), Available Source: <http://goo.gl/gKCPlq>, January 18, 2014.

Na-Phatthalung, T., Rattanakarn, W. and Tangkananond, W., 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, The 5th International Silpakorn Graduate Study Conference 2015 (IGSC2015), Silpakorn University, Bangkok.