

แนวทางการควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยใช้เชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัย ในแมลงพาหะ

New Bacterial Symbiont in Insect Vector of Sugarcane White Leaf Disease and its Potential Use as a Control Agent

จूरีมาร์ท วังคีรี¹ และ ยูปา หาญบุญทรง^{1*}

Jureemart Wangkeeree¹ and Yupa Hanboonsong^{1*}

บทคัดย่อ: โรคใบขาวอ้อยก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลมากที่สุด ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถป้องกันการเกิดหรือการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษาวิจัยนี้ เพื่อหาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยอยู่ในเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) แมลงพาหะนำเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุของการเกิดโรคใบขาวอ้อยเพื่อเป็นตัวเลือกในการใช้ควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อย ตามวิธีการแบบ symbiotic control ผลการศึกษา 16S rRNA ของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่นชนิดที่พบมากที่สุด จัดอยู่ใน class *Betaproteobacteria* เป็นชนิดแบคทีเรียที่ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลมาก่อน จึงได้เรียกชื่อว่า “Bacterium Associated with *M. hiroglyphicus*” (BAMH) โดยประชากรในธรรมชาติของเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ตรวจพบว่า มีแบคทีเรีย BAMH ในเพศเมีย 98% และ ในเพศผู้ 94% ซึ่งแบคทีเรีย BAMH สามารถตรวจพบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย และเพลี้ยจักจั่นที่พบเชื้อไฟโตพลาสมาจะตรวจพบแบคทีเรีย BAMH 98% ในเพศเมีย และ 86% ในเพศผู้ จากผลการศึกษาครั้งนี้ คาดว่าแบคทีเรียชนิดนี้ มีความสัมพันธ์กับแมลงพาหะ จึงถือได้ว่าเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยตามวิธีการแบบ symbiotic control

คำสำคัญ: โรคใบขาวอ้อย, แมลงพาหะ, เชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงพาหะ

ABSTRACT: Sugarcane white leaf (SCWL) disease is one of the most destructive sugarcane disease, threatening the sugarcane industry in Thailand. Up to now there are no effective methods to control SCWL disease. The purpose of this study was to identify bacterial symbionts in the leafhopper *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) vector sugarcane white leaf disease for possible use in the symbiotic control method. The results from 16S rRNA analysis was found the most dominant bacterial type which belonging to *Betaproteobacteria* and did not closely match any sequences in the database. It was named “Bacterium Associated with *M. hiroglyphicus*” (BAMH). Natural population of the leafhopper was found BAMH in 98% of female and 94% of male leafhoppers. BAMH was found in all developmental stages including eggs, nymphs, and adults of insect vector. In addition 98% of female and 86% of male leafhoppers were infected with SCWL phytoplasma also were infected with BAMH. We speculate that BAMH is the bacteria symbiont of *M. hiroglyphicus* and might have mutualistic relation with the insect host. These results are the first report of bacterial symbionts in a leafhopper vector of SCWL disease and it is useful information for future research of symbiotic control development.

Keywords: Sugarcane white leaf disease, leafhopper vector, bacterial symbiont

¹ สาขาชีววิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Section of Entomology, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

* Corresponding author: yupa_han@kku.ac.th

บทนำ

โรคใบขาวอ้อยก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลามากที่สุด สาเหตุโรคเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา โดยมีเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และ *Yamatotettix flavovittatus* เป็นแมลงพาหะ (Hanboonsong et al., 2002; 2006) ปัจจุบัน วิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคใบขาว คือการแนะนำให้ทำการชุดถอนทำลายต้นอ้อยที่เป็นโรค หรือการผลิตท่อนพันธุ์ปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ก็ยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถป้องกันการเกิดหรือการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับการจัดการแมลงพาหะเป็นเป้าหมายสำคัญในการลดการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งนอกจาก แมลงพาหะเป็นพาหะนำเชื้อสาเหตุโรคแล้วยังเป็นแหล่งเพาะอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมาอีกด้วย (Hanboonsong et al., 2002) การควบคุมแมลงพาหะนำโรคด้วยวิธีการใหม่ที่เรียกว่า “symbiotic control” เป็นวิธีการที่แยกเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลงพาหะมาดัดแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนที่สามารถทำลายเชื้อสาเหตุโรค และนำกลับเข้าสู่แมลงพาหะให้ยีนนั้น แสดงออกอยู่ในตัวแมลงพาหะได้ (Beard et al., 1992) วิธีการนี้เริ่มมีการศึกษาและพัฒนาการใช้ควบคุมโรค Chagas disease แมลงพาหะนำโรคโดยมวน *Rhodnius prolixus* (Beard et al., 1992; 2002) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาการดัดแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียร่วมอาศัยในยุงพาหะนำโรคไข้มาเลเรีย (Favia et al., 2007) การศึกษาการดัดแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่นพาหะนำโรค Pierce's disease ขององุ่น (Bextine et al., 2004)

จากรายงานการศึกษาดังกล่าว วิธีการแบบ symbiotic control น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมการระบาดของเชื้อสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาของเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงพาหะของโรคใบขาวอ้อยมาก่อน ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้ จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาแนวทางการใช้ “symbiotic control” กับแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย ซึ่งต้องมีการศึกษาชนิดของ

เชื้อร่วมแบคทีเรียอาศัยในแมลงพาหะเพื่อเป็นตัวเลือกใช้ในการควบคุมตามวิธีการดังกล่าว การวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับเชื้อร่วมแบคทีเรียอาศัยในแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยและแนวทางการประยุกต์ใช้ในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอแมลงพาหะ

เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* จากแปลงอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาว ทั้งหมด 6 แปลง ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2551 ในเขตพื้นที่ 4 จังหวัด คือ ขอนแก่น อุดรธานี มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ โดยใช้ชุดกับดักแสงไฟ และหลอดดูดแมลง นำตัวอย่างแมลงพาหะมาแยกชนิดและเพศ ในห้องปฏิบัติการ เก็บรักษาใน 100% เอทานอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาศึกษาทดลอง นำตัวอย่างแมลงมาทำความสะอาดภายนอกเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ผิวด้านนอกด้วยเอทานอล 75% และ Clorox ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ นำเพลี้ยจักจั่นจากแต่ละแปลงๆ ละ 4 ตัว ประกอบด้วย เพศผู้ 2 ตัว และ เพศเมีย 2 ตัว ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยบดแมลงแต่ละตัวให้ละเอียดกับสารละลายบัฟเฟอร์ (200 mM Tris pH8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. สกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol: Chloroform: Iso-amyl alcohol ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3M Sodium acetate และ Isopropanol ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 75% และละลายดีเอ็นเอด้วย TERNase จากนั้นเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาศึกษาทดลอง

เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR), การโคลนยีน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย

ใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR โดยคัดเลือกไพรเมอร์ (universal primer) เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในส่วนของยีน 16S

rRNA gene คือ rP1: AGAGTTTGATCM TGGCT-CAG และ fD2: ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dNTPs 2 mM, primer ชนิดละ 2 μ M, Taq DNA polymerase 1U, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 2.5 mM, ดีเอ็นเอของแมลง 2 μ l และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 30 รอบ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, Annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 30 นาที นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยามาแยกด้วย gel electrophoresis บน 0.8% agarose gel เพื่อตรวจสอบผลและขนาดของยีนที่ได้ คือประมาณ 1.5 kb นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์โดยใช้ชุดของ TOPO-TA vector (Invitrogen) จากนั้นคัดเลือกลำดับจำนวน 5 ลำดับจากดีเอ็นเอของแมลง 1 ตัว เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปเปรียบเทียบกับ 16S rRNA ยีนของแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล NCBI

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียชนิดที่พบมากที่สุด มาจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยทำการเรียงเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalX (Thompson et al., 1997) และวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม PHYLIP package version 3.6 (Felsenstein, 2004) โดยวิธี Neighbor-Joining และ Kimura 2 parameter วิเคราะห์หาค่า bootstraps จำนวน 1,000 ซ้ำ และแสดงผลด้วยโปรแกรม TREEVIEW (Page, 1996)

การออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียอาศัยในแมลงพาหะ

จากผลการเรียงเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล เลือกชนิดของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดเพื่อออกแบบคู่ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจง โดยใช้

โปรแกรม Primer-Blast ของฐานข้อมูล NCBI โดยคู่ไพรเมอร์ MHF 5'TTATTCTAGTGGCGAACGGG'3 และ MHR 5'GCGGTGTGTACAAGACCAGT'3 (Wangkeeree et al., 2012) สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียชนิด BAMH ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุด ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับคู่ universal primer 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย (rP1 และ fD2) ตามวิธีที่อธิบายไว้แล้ว ยกเว้นในช่วง annealing ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงและเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในประชากรของแมลงพาหะ

เก็บตัวอย่างแมลงจากแปลงอ้อย นำมาแยกชนิดและเพาะในห้องปฏิบัติการ เก็บรักษาใน 100% เอทานอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol: Chloroform: Iso-amyl alcohol เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบแบคทีเรีย BAMH และตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธีการ nested-PCR โดยใช้ชุด primer ที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในส่วนของยีน 16S rRNA และ intergenic spacer region ที่มีส่วนของยีน 23S rRNA จำนวนสองชุด ชุดแรกคือ MLO-X และ MLO-Y โดยนำผลิตภัณฑ์ที่สุ่มจากรอบแรก มาทำปฏิกิริยา nested-PCR ด้วย primer ชุดที่สองคือ P1 และ P2 โดยอุณหภูมิและรอบของปฏิกิริยาอ้างตาม Hanboonsong et al., (2002 และ 2006)

การตรวจสอบการถ่ายทอดผ่านทางไข่ของแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงพาหะ

เก็บตัวอย่างแมลงตัวเต็มวัยเพื่อนำมาเลี้ยงด้วยต้นอ้อยที่ตรวจสอบแล้วว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียอาศัยชนิด BAMH ซึ่งเตรียมโดยนำตาที่ได้จากบริเวณส่วนยอดและส่วนโคนของลำต้น มาสกัดดีเอ็นเอและตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย BAMH ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำท่อนพันธุ์ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ มาตัดแบ่งเป็นข้อๆ แต่ละข้อมี 1 ตา แล้วนำไปปลูกในกระถางพลาสติกจนกระทั่งต้นอ้อยมีอายุ 20-30 วัน จึงนำมาเลี้ยงแมลงพาหะ เก็บตัวอย่างแมลงในระยะต่างๆ ตั้งแต่ระยะไข่

และตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ในรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2 จากนั้น นำมาสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างแมลงด้วย Phenol: Chloroform: Iso-amyl alcohol และตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียชนิด BAMH ในแต่ละตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus*

จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า 67% ของจำนวนโคลนทั้งหมดของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียมีค่าความเหมือนเฉลี่ยที่ 85% กับแบคทีเรียในเห็บชนิดหนึ่ง ซึ่งจากค่าความเหมือนที่ค่อนข้างต่ำกับชนิดของแบคทีเรียในฐานข้อมูล ดังนั้นแบคทีเรียที่พบนี้ ถือเป็นชนิดใหม่ ที่ยังไม่มีเคยมีรายงานในฐาน

ข้อมูลมาก่อน จึงได้เรียกชื่อว่า Bacterium Associated with *M. hiroglyphicus* (BAMH) แบคทีเรียชนิดนี้พบมากที่สุด และพบในเพลี้ยจักจั่นทุกตัวจากทุกสถานที่ที่นำมาศึกษา จากการวิเคราะห์ สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบว่า BAMH เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม class *Betaproteobacteria* (Figure 1)

แบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบรองลงมาคือ 33% ของจำนวนโคลนทั้งหมด มีค่าความเหมือนเฉลี่ยที่ 98% กับแบคทีเรียชนิด *Candidatus Sulcia muelleri* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน class *Flavobacteria* ซึ่งจัดเป็น primary endosymbiont และอาศัยอยู่ในส่วนของ bacteriome ของแมลงปากดูดใน suborder Auchenorrhyncha มีหน้าที่ในการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นแก่แมลง (McCutcheon and Moran, 2010)

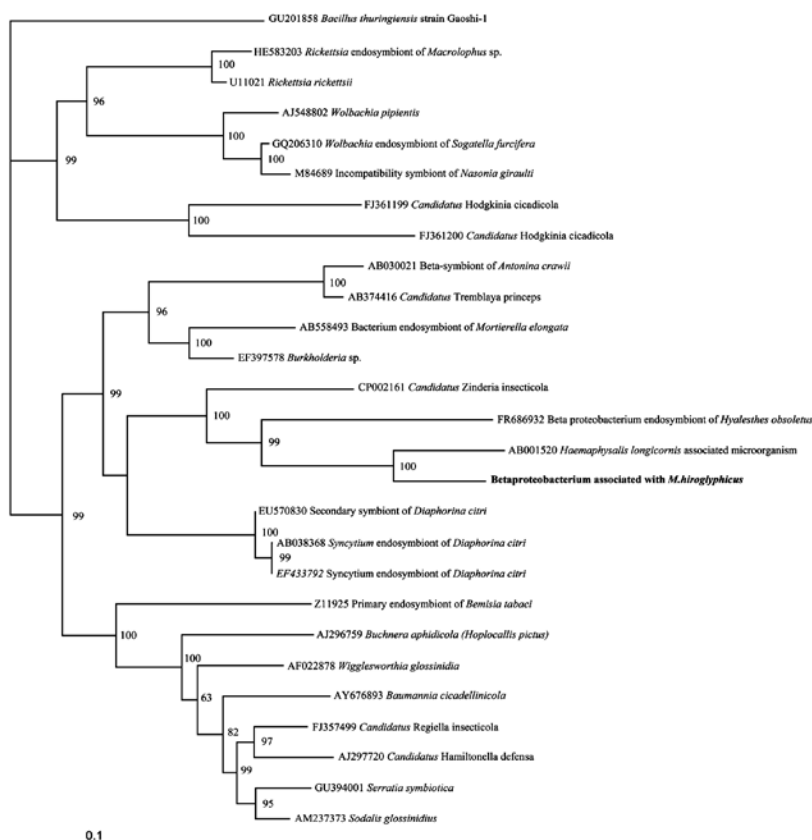


Figure 1 Phylogenetic relationship of bacterium associated with *M. hiroglyphicus* with other 26 selected 16S rRNA bacterial gene sequences class in *Alpha*-, *Beta*- and *Gamma*- *proteobacteria*. Numbers at each node indicate the percentage of 1,000 bootstraps replication.

การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยและเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในประชากรของแมลงพาหะ

จากการตรวจสอบแบคทีเรียชนิด BAMH ด้วยเทคนิค PCR และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค nested-PCR ในประชากรของเพลี้ยจักจั่นที่เก็บตัวอย่างจากแปลงอ้อย ผลการศึกษาพบว่าเพลี้ยจักจั่นเพศเมีย 98% มีแบคทีเรียชนิด BAMH ในขณะที่แมลงเพศผู้พบแบคทีเรียชนิดนี้ 94% ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยพบว่าเพลี้ยจักจั่นเพศเมียมีเชื้อ 67% เพศผู้มีเชื้อ 46% และเมื่อเปรียบเทียบเพลี้ยจักจั่นที่พบทั้งเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและแบคทีเรีย BAMH พบว่า จำนวน 98% ของเพลี้ยจักจั่นเพศเมียที่พบเชื้อไฟโตพลาสมาตรวจพบแบคทีเรีย BAMH และเพศผู้ 86% ของแมลงเพศผู้ที่พบเชื้อไฟโตพลาสมาตรวจพบแบคทีเรีย BAMH (Table 1) แสดงให้เห็นว่า ทั้งเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและแบคทีเรีย BAMH อยู่ร่วมกันในลำตัวแมลงพาหะ

การตรวจสอบเชื้อร่วมอาศัยในแต่ละระยะการเจริญของเพลี้ยจักจั่น

จากผลการศึกษาการเลี้ยงเพลี้ยจักจั่นด้วยต้นอ้อยที่ตรวจสอบแล้วว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรีย BAMH อยู่ และนำตัวอย่างแมลงแต่ละระยะมาตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิด BAMH พบในทุกระยะการเจริญของแมลงพาหะ โดยเปอร์เซ็นต์การตรวจพบ BAMH ในรุ่นที่หนึ่งคือ 46%, 79%, 100% และ 100% ในระยะไข่, ตัวอ่อนวัยที่ 1-5 และ ตัวเต็มวัยทั้งเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การตรวจพบ BAMH ในรุ่นที่สองคือ 85%, 100% และ 100% ในระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ (Figure 2) ซึ่งการถ่ายทอดเชื้อ แบคทีเรีย BAMH อาศัยในแมลงพาหะจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นถัดไปนี้ เป็นลักษณะเช่นเดียวกับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของแมลงพาหะจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นถัดเช่นกัน (Hanboonsong et al., 2002)

Table 1 Infection frequency of BAMH and SCWL phytoplasma in natural population of *M. hiroglypticus*.

Location	Leafhopper	No. tested	No. of positive (Percent of positive)		
			BAMH	Phytoplasma	Phytoplasma+BAMH ^{1/}
Udonthani	female	36	35(97)	25(70)	25(100)
	male	20	20(100)	8(40)	6(75)
Udonthani	female	23	23(100)	14(71)	14(100)
	male	14	12(86)	8(57)	7(88)
Khon Kaen	female	26	25(96)	18(70)	17(94)
	male	14	13(93)	6(43)	6(100)
Total	female	85	83(98)	57(67)	56(98)
	male	48	45(94)	22(46)	19(86)

^{1/} Calculate from the number of infected phytoplasma leafhopper that also infected with BAMH

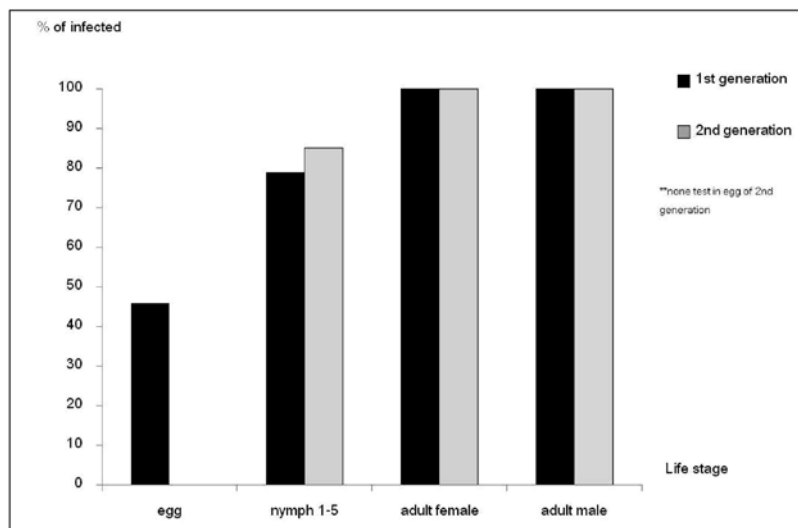


Figure 2 PCR result of BAMH detection in each developmental life stage of leafhopper *M. hiroglyphicus*

สรุป

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่นพาหะนำโรคใบขาวอ้อยซึ่งเป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกที่เกี่ยวข้องกับโรคใบขาวนั้น พบแบคทีเรียอาศัยในเพลี้ยจักจั่นพาหะชนิดที่พบมากที่สุดคือ แบคทีเรียที่ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลมาก่อนจัดเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่และเรียกชื่อว่า BAMH จากผลการศึกษาสรุปว่าแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยอยู่กับแมลงพาหะ (bacterial symbiont) เนื่องจาก 1) เป็นชนิดที่พบมากที่สุด 2) พบมากในประชากรของแมลงพาหะในธรรมชาติ จากทุกสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ทั้งเพศผู้และเพศเมีย 3) พบทุกระยะการเจริญและสามารถถ่ายทอดจากแมลงจากรุ่นสู่รุ่นได้ และ 4) พบอยู่ร่วมกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

บทบาทของแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงนั้น จากรายงานการศึกษาพบว่าแบคทีเรียทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการสืบพันธุ์ของแมลงอาศัยซึ่งไม่ได้รับจากการกินอาหาร (Baumann, 2005) แบคทีเรียบางชนิดสามารถเพิ่ม

ความต้านทานความร้อนให้กับแมลงอาศัยได้ (Montllor et al., 2002) หรือสามารถเพิ่มความต้านทานแมลงเบียนของแมลงอาศัยได้ (Oliver et al., 2006) ซึ่งในการศึกษานี้คาดว่า BAMH มีความสัมพันธ์หรือบทบาทสำคัญบางอย่างกับเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* แบคทีเรียชนิดนี้จึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาและประยุกต์ใช้สำหรับควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยตามแนวทางแบบ symbiotic control อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของบทบาทของแบคทีเรียต่อแมลงพาหะและแบคทีเรียต่อเชื้อไฟโตพลาสมา เช่น การใช้สารปฏิชีวนะทำลายเชื้อแบคทีเรียในตัวของแมลงพาหะโดยศึกษาถึงผลกระทบต่อตัวแมลงเองในด้านของการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์หรือความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรค และศึกษาถึงผลกระทบต่อเชื้อไฟโตพลาสมาภายในตัวแมลงพาหะ

เอกสารอ้างอิง

- Acyrtosiphon pisum* under heat stress. Ecol. Entomol. 27: 189-195. and expression of a foreign gene in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46: 195-200.

- Baumann, P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insect. *Annu. Rev.*
- Beard, B.C., C.C. Rosales and R.V. Durvasula. 2002. Bacterial symbiont of the Triatominae and their potential use in
- Beard, C.B., P.W. Mason, S. Aksoy, R.B. Tesh and F.F. Richards. 1992. Transformation of an insect symbiont
- Bextine, B., C. Lauzon, S. Potter, D. Lampe, and T.A. Miller. 2004. Delivery of a genetically marked *Alcaligenes* Biosci. 12:357-358. control of Chagas disease transmission. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 123-141.
- Disease. *Appl. Environ. Microbiol.* (in Press).
- Favia, G., I. Ricci, C. Damiani, N. Raddadi, E. Crotti, M. Marzorati, A. Rizzi, R. Urso, L. Brusetti, S. Borin, D. Mora, P.
- Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Hanboonsong, Y, W. Ritthison, C. Choosai, P. Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by
- Hanboonsong, Y., C. Choosai, S. Panyim and S. Damark. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
- McCutcheon, J.P., and N.A. Moran. 2010. Functional convergence in reduced genomes of bacterial symbionts *Microbiol.* 59: 155-189.
- Montllor, C.B, A. Maxmen and A.H. Purcell. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids
- Oliver, K.M., J.A. Russell, N.A. Moran, M.S. Hunter. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. phytoplasma in the insect vector* *Matsumuratetrix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Mol. Biol.* 11: 97-103.
- Scuppa, L. Pasqualini, E. Clementi, M. Genchi, S. Corona, I. Negri, G. Grandi, A. Alma, L. 1 Kramer, F. Esposito, C. Bandi, L. Sacchi, and D. Daffonchio. 2007. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 9047-9051.
- sp. to the glass-winged sharpshooter for use in paratransgenic control strategy. *Curr. Microbiol.* 48: 327-331.
- spanning 200 My of evolution. *Genome Biol. Evol.* 2:708-718.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 1803-1807.
- Wangkeeree, J., T.A. Miller, and Y. Hanboonsong. 2012. Candidates for Symbiotic Control of Sugarcane White Leaf *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. *J. Econ. Entomol.* 99: 1531-1537.