ระยะเวลาการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาวอ้อยของเพลี้ยจักจั่นพาหะ

Optimal latent period for sugarcane white leaf phytoplasma disease transmission by leafhopper vector

จริยา รอดดี[1] และ ยุพา หาญบุญทรง[1*]

Jariya Roddee[1] and Yupa Hanboonsong[1*]

บทคัดย่อ: เพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) เป็นแมลงพาหะที่สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย กระบวนการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแบบเชื้อเพิ่มปริมาณและหมุนเวียนในลำตัวแมลง ประกอบด้วย ระยะรับเชื้อจากพืช ระยะการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อ และระยะถ่ายทอดเชื้อสู่พืช ระยะเวลาบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้แมลงมีคุณสมบัติเป็นพาหะที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นพืชได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์การศึกษาเพื่อตรวจสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ โดยใช้แมลงเพศเมีย เพศผู้และตัวอ่อนวัย 5 ที่ได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาจากต้นอ้อยใบขาวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มและเพาะเชื้อบนต้นอ้อยปลอดเชื้อเป็นเวลา 7, 14 , 21 , 28 , 35 , และ 42 วัน และให้แมลงถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่พืช ผลการศึกษาพบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพศเมียมีจำนวนมากที่สุดในทุกระยะของการบ่มเพาะเชื้อ ระยะเวลาบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่สั้นที่สุดของแมลงพาหะคือ 14 วัน เพศเมีย เพศผู้และตัวอ่อนวัย 5 สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 85% 65% และ 55% ตามลำดับ ระยะเวลาบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่ถ่ายทอดเชื้อได้ 100% ในแมลงตัวเต็มวัยที่ 21 วัน และตัวอ่อนวัย 5 ที่ 28 วัน ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ เพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคใบขาวอ้อยได้

คำสำคัญ: ลักษณะการถ่ายทอดเชื้อ, โรคใบขาวอ้อย, *Matsumuratettix hiroglyphicus*, แมลงพาหะ

ABSTRACT: Leafhopper *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) is an important vector in transmission of the sugarcane white leaf (SCWL) phytoplasma disease. The phytopalsma transmission process of this insect vector is circulative propagative transmission which includes an acquisition access period (AAP), latent period (LP) and inoculation access period (IAP). The LP is an important process during which the insect is able to transmit phytoplasma into the plant and become the vector of SCWL phytoplasma. The purpose of this study was to investigate the optimal LP of the leafhopper vector. Female, male, and 5th instar nymph insects were fed on infected sugarcane plants for 24 hours of AAP and then moved to feed on disease - free sugarcane plants for LP of 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days. The insect vectors were checked for the transmission efficiency of SCWL phytoplasma after each LP process. The results

[1] สาขากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Entomology Division, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: yupa_han@kku.ac.th

showed that the number of SCWL phytoplasma cells was highest at all of LPs in female insects. The minimum LP in female, male and 5th instar nymph insects was 14 days, the insects showed the percentage of phytoplasms transmission at 85% 65% and 55%, respectively. The optimal LP for 100% phytoplasma transmission was 21 days for adult insects and 28 days for 5th instar nymph insects. This study can be used to test the insect transmission efficiency for screening sugarcane cultivars for resistance to sugarcane white leaf phytoplasma disease.
Keywords: transmission characteristics, sugarcane white leaf disease, *Matsumuratettix hiroglyphicus*, insect vector

บทนำ

โรคใบขาวอ้อยเป็นโรคที่มีความสำคัญและทำความเสียหายต่อการปลูกอ้อยในประเทศไทย ซึ่งสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา จัดอยู่ในเชื้อไฟโตพลาสมากลุ่มย่อย 16 SrXI-B ที่ทำให้พืชแสดงอาการใบสีขาวทั้งใบหรือใบเหลืองซีดปนขาว เนื่องจากการสูญเสียคลอโรฟิลด์ ระยะข้อปล้องสั้นกว่าต้นปกติ มีอาการแตกตาข้างและหน่อมากกว่าปกติ ต้นอ้อยที่เป็นโรครุนแรงทำให้ต้นอ้อยแห้งตายได้ (Nakashima et.al.,1994; Wongkeaw et al., 1997; Lee et al.,1998) เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยอยู่ในส่วนท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ของอ้อย โดยมีเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลเป็นแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ถ่ายทอดเชื้อจากต้นอ้อยเป็นโรคไปสู่ต้นอ้อยปกติ (Chen 1973; Hanboonsong et al., 2002) ซึ่งกลไกการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* จากต้นอ้อยเป็นโรคไปยังต้นอ้อยปกตินั้นมีส่วนสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคนี้ โดยทั่วไปกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะเป็นแบบเชื้อเพิ่มปริมาณและหมุนเวียนในลำตัวแมลงพาหะ (circulative propagative transmission) ประกอบด้วยระยะเวลาการรับเชื้อ (acquisition access period) ระยะเวลาการบ่มเพิ่มปริมาณเชื้อ (latent period, incubation period) และระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ (inoculation access period) (Purcell, 1982; Weintraub and Beanland, 2006) เมื่อแมลงได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาจากพืชที่เป็นโรคแล้วแมลงจะมีคุณสมบัติเป็นแมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่พืชและทำให้พืชเป็นโรคได้ก็ต่อเมื่อแมลงต้องมีระยะเวลาในการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในตัวแมลงให้มีจำนวนที่มากพอก่อน จึงจะเคลื่อนไปสู่ต่อมน้ำลาย แมลงจึงสามารถถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นพืชในขณะที่ดูดกิน (Lefol et al., 1994) ระยะเวลาในการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาหะอาจใช้เวลาหลายวันจนถึงหลายสัปดาห์ (Weintraub and Beanland, 2006, Hogenhout et al., 2008) สำหรับแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* มีรายงานการถ่ายทอดเชื้อจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูกโดยผ่านทางไข่ (transovarial transmission) และเป็นแมลงพาหะที่เชื้อไฟโตพลาสมามีการเพิ่มปริมาณและหมุนเวียนในลำตัวแมลง (Hanboonsong et al., 2002) แต่ยังไม่มีรายงานระยะเวลาในการบ่มและเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในลำตัวและต่อมน้ำลายของแมลงก่อนที่แมลงจะสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นพืชทำให้เกิดโรคได้ ดังนั้นการทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในลำตัวและในต่อมน้ำลายที่ทำให้แมลงมีคุณสมบัติเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้นั้นจะสามารถใช้แมลงพาหะในทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นอ้อย เพื่อคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานต่อโรคใบขาวอ้อย นำไปสู่ลดการระบาดของโรคใบขาวอ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการศึกษา

การเลี้ยงแมลงเพิ่มปริมาณและเตรียมต้นอ้อย

เก็บแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* โดยใช้กับดักแสงไฟ (black light trap) ตั้งกับดักในช่วงเวลา 18.00 – 20.00 น. จากแปลงอ้อย ตำบลท่าพระ อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 28±2°C ผสมพันธุ์แมลงเพศเมีย 5 ตัวและเพศผู้ 5 ตัวต่อ 1 กระถาง (ต้นอ้อย 1 ต้น/กระถาง) เลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงพาหะบนต้นอ้อยปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาจนได้แมลงรุ่นที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา โดยสกัด DNA และตรวจสอบเชื้อไฟพลาสมาด้วยเทคนิค real-time PCR (qPCR) ด้วยชุด primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย (Hanboonsong et al. 2002; 2006) แล้วจึงนำมาแมลงที่ปลอดเชื้อมาใช้ในการศึกษา

การเตรียมต้นอ้อยสำหรับใช้ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้อ้อยปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา พันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น นำเนื้อเยื่อบริเวณลำต้นมาสกัด DNA และตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เพื่อยืนยันว่าปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค qPCR ด้วยชุด primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย (Hanboonsong et al. 2002; 2006) จากนั้นปลูกต้นอ้อยในกระถางขนาด 11 X 15 ซม. ครอบด้วยพลาสติกใสขนาด 14 x 35 ซม. เก็บในเรือนทดลองที่มีตาข่ายเพื่อป้องกันแมลง จนกระทั่งต้นอ้อยอายุประมาณ 2 เดือน จึงนำมาศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยแมลงพาหะ

การเตรียมต้นอ้อยติดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยนำท่อนพันธุ์อ้อยซึ่งแสดงอาการใบขาวจากแปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย อำเภอโนนสะอาด จังหวัดอุดรธานี ตัดเนื้อเยื่อบริเวณโคนและปลายต้นอ้อยนำไปตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อยืนยันการติดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค qPCR จากนั้นตัดแบ่งเป็นข้อปล้อง แต่ละข้อปล้องมี 1 ตา นำไปปลูกลงกระถางพลาสติกขนาด 11 X 15 ซม. (1 ตาอ้อย/กระถาง) เมื่อต้นอ้อยงอกจากท่อนพันธุ์จะแสดงอาการใบขาวนำมาใช้ในการศึกษา

ระยะเวลาการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของแมลงพาหะ

เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ เพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 ทำการศึกษาโดยใช้แมลงเพศเมียจำนวน 120 ตัว เพศผู้จำนวน 120 ตัว และตัวอ่อนวัย 5 จำนวน 120 ตัว ให้ดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวเพื่อรับเชื้อไฟโตพลาสมาระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงไปดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นอ้อยปลอดเชื้อเพื่อบ่มเพิ่มปริมาณเชื้อ จำนวน 72 ต้น (แมลง 5 ตัว/ 1 ต้น) เมื่อครบระยะเวลา 7, 14 , 21, 28 , 35 และ 42 วัน ตามลำดับ นำแมลงไปสกัด DNA เพื่อตรวจวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงโดยใช้เทคนิค qPCR

การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของแมลงพาหะ

เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ เพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 ทำการศึกษาโดยใช้แมลงเพศเมียจำนวน 120 ตัว เพศผู้จำนวน 120 ตัว และตัวอ่อนวัย 5 จำนวน 120 ตัว ให้ดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวเพื่อรับเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงไปดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นอ้อยปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อ จำนวน 72 ต้น (แมลง 5 ตัว/ ต้น) เมื่อครบระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อที่ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน จากนั้นนำแมลงเพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 ที่ได้รับการบ่มเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาในระยะเวลาต่างๆให้ดูดกินบนต้นอ้อยปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน (แมลง 1 ตัว/ ต้น) จำนวนต้นที่ใช้ทั้งหมด 360 ต้น โดยแต่ละระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อใช้ต้นอ้อย จำนวน 20 ต้น) เพื่อถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากนั้นนำต้นอ้อยที่ถูกถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาเก็บไว้ในโรงเรือนเพื่อสังเกตการเกิดโรคโดยแสดงอาการใบขาว 30 และ 60 วัน และเมื่อครบระยะเวลา 30 วันหลังได้รับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาแล้ว นำเนื้อเยื่อต้นอ้อยไปตรวจวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค qPCR

ระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต่อมน้ำลายของแมลงพาหะ

เพื่อศึกษาระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต่อมน้ำลายของแมลงพาหะก่อนแมลงสามารถถ่ายทอดเชื้อสู่พืชได้ โดยนำแมลงเพศเมียจำนวน 120 ตัว ดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อรับเชื้อ จากนั้นย้ายแมลงไปดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นอ้อยปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อจำนวน 24 ต้น (แมลง 5 ตัว/ 1 ต้น) เมื่อครบระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อที่ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน นำแมลงผ่าแยกต่อมน้ำลายออก จากนั้นนำไปตรวจและวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค qPCR

การตรวจและวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

หลังจากแมลงพาหะได้บ่มเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในลำตัวและได้ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นพืชแล้ว การสกัด DNA แมลงพาหะตามวิธีการของ Hanboonsong et al. (2002) และสกัด DNA พืชที่ใช้ศึกษาตามวิธีการของ Kollar et al. (1990) และ Nakashima et al. (1991) และตรวจวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค qPCR ด้วยชุด primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในส่วนของยีน 16s rRNA และ 23 s rRNA คือ ชุดprimer MLO–X 5'- GTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGC -3' และMLO–Y 5'- GTGAGGCATCCACTGTA TGCC -3' โดยใช้น้ำยา SYBR ® Green SuperMixes ตรวจวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเครื่อง Bio-Rad iCycler (Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA) ตามวิธีการของ Roddee et al. (2018)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการตรวจและวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะและต้นอ้อยด้วยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis Software) 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพศเมีย เพศผู้ ตัวอ่อนวัย 5 และต่อมน้ำลายที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ด้วยวิธีการ Least significant different (LSD)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ระยะเวลาการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของแมลงพาหะ

หลังจากแมลงพาหะเพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 ได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยจากพืชแล้ว ให้แมลงมีการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในลำตัวเป็นเวลา 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน พบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่มีการบ่มเพาะเชื้อที่นานขึ้น โดยที่ระยะเวลา 7 วัน แมลงเริ่มมีการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 เฉลี่ย คือ 1,668.79 ± 202.96, 991.54 ± 119.73 และ 704.45 ± 56.81 เซลล์ของเชื้อไฟโตพลาสมาเซลล์ต่อไมโครกรัม (µg) ของ DNA แมลง ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อเพิ่มขึ้นที่ 14 วัน พบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงเพิ่มมากขึ้นทั้งเพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 เฉลี่ย 3,216.85 ± 374.91, 2,722.68 ± 170.51 และ 2,466.21 ± 157.28 เซลล์ของเชื้อไฟโตพลาสมาเซลล์ต่อไมโครกรัม (µg) ของ DNA แมลง ตามลำดับ และเชื้อมีปริมาณการเพิ่มขึ้นแบบคงที่ในระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาที่มากขึ้นตั้งแต่ 21 วันจนถึง 42 วัน ส่วนในเพศเมียพบว่ามีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมามากที่สุดในทุกระยะเวลาของการบ่มเพาะเชื้อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับแมลงพาหะเพศผู้และตัวอ่อนวัน 5 (**Figure 1**) เนื่องจากแมลงพาหะเพศเมียมีระยะเวลาการดูดกินน้ำเลี้ยงในส่วนของท่อลำเลี้ยงอาหาร (phloem) ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ยาวนานกว่าเพศผู้ (Roddee et al., 2017) จึงสามารถรับเชื้อและมีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาได้มากกว่า นอกจากนี้แมลงเพศเมียมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าเพศผู้และตัวอ่อนวัย 5 จึงทำให้มีพื้นที่ในการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงเพศเมียได้มากกว่าเพศผู้และตัวอ่อนวัย 5

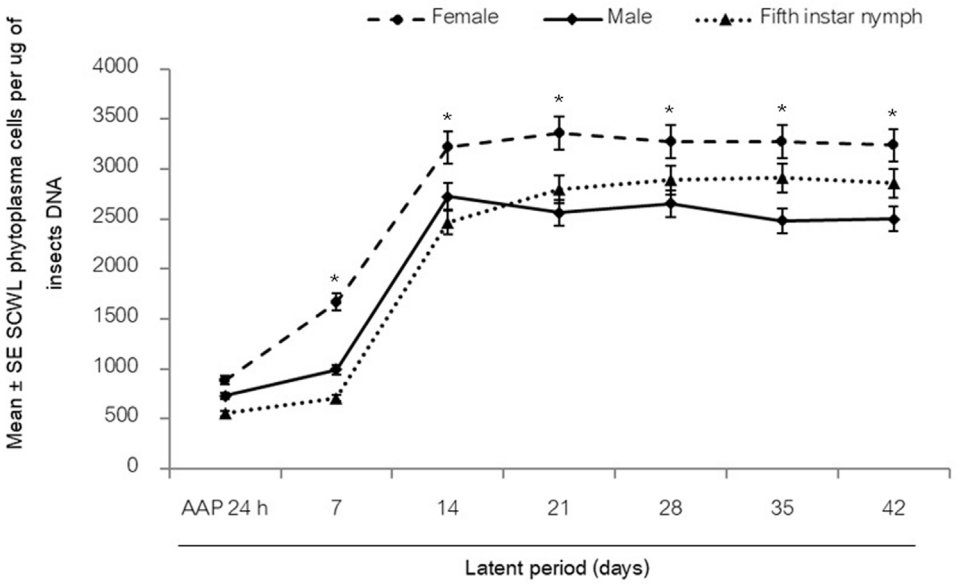

Figure 1 Numbers of sugarcane white leaf (SCWL) phytoplasma cells per µg of insect DNA in female, male and fifth instar nymph of *Matsumuratettix hiroglyphicus*. Insects were maintained on disease-free sugarcane for latent periods (LPs) of 7, 14, 21, 28, 35 and 42 d, after an acquisition access period (AAP) of 24 h. Error bars indicate one standard error of the mean. Asterisk indicates the significant difference between female, male and fifth instar nymph at $P<0.05$.

การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของแมลงพาหะ

เมื่อนำแมลงพาหะเพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 ที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นระยะเวลา 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน มาถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นอ้อยปลอดเชื้อ พบว่าระยะเวลาที่บ่มเพาะเชื้อที่ 7 วัน แมลงพาหะยังไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นอ้อยได้ แต่เมื่อระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อผ่านไปที่ 14 วัน แมลงพาหะเพศเมียสามารถถ่ายทอดเชื้อได้มากที่สุด คือ 85% รองลงมาคือ เพศผู้และตัวอ่อนวัย 5 ที่ 65% และ 55% ตามลำดับ (Table 1) และเมื่อระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อที่ 21 วัน แมลงพาหะเพศเมีย และเพศผู้สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 100% ในขณะที่ตัวอ่อนวัย 5 สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 95% เช่นเดียวกับระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อที่ 28, 35 และ 42 วัน พบว่า แมลงพาหะเพศเมีย เพศผู้ และตัวอ่อนวัย 5 สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 100 % (Table 1) นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นอ้อยที่ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเพศเมียที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาที่ 28 วัน แสดงอาการใบขาวจำนวน 2 ต้น หลังถ่ายทอดเชื้อ 60 วัน (Table 1)

Table 1 Relationship between the length of the latent period (LP) for leafhopper-transmitted sugarcane white leaf (SCWL) phytoplasma, and (i) the number of infected sugarcane plants after 30 d inoculation, and (ii) the number of plants showing symptoms after 60 d inoculation.

LP [1/]	No. of SCWL - infected plants/ no. of test plants (%) after 30 d inoculation			No. of plants showing symptoms/ no. of tested plants (%) after 60 d inoculation		
	Female	Male	Fifth instar	Female	Male	Fifth instar
7 d	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)
14 d	17/20 (85)	13/20 (65)	11/20 (55)	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)
21 d	20/20 (100)	20/20 (100)	19/20 (95)	0/20 (0)	0/20 (0)	0/20 (0)
28 d	20/20 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	2/20 (10)	0/20 (0)	0/20 (0)
35 d	20/20 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	1/20 (5)	1/20 (5)	1/20 (5)
42 d	18/18 (100)	17/17 (100)	20/20 (100)	1/18 (5.55)	1/17 (5.88)	1/20 (5)

[1/] Insects received an AAP of 24 h on an SCWL-infected plant, and were then transferred to test plants for LPs of 7,14, 21, 28, 35 and 42 d; after which they were transferred to test plants for an inoculation access period (IAP) of 24 h.

ระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต่อมน้ำลายของแมลงพาหะ

การตรวจวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต่อมน้ำลายของแมลงพาหะเพศเมีย พบว่าระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาที่ 7 วัน ยังไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาที่ต่อมน้ำลายของแมลง และที่ 14 วัน พบเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย 1,203 ± 35.74 เซลล์ของเชื้อไฟโตพลาสมาต่อไมโครกรัม (µg) ของ DNA แมลง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อที่ 21, 28 , 35 และ 42 วัน คือมีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย 2,115 ± 70.54, 2,126 ± 135.14, 2,119 ± 241.84 และ 2,150 ± 257.97 เซลล์ของเชื้อไฟโตพลาสมาต่อไมโครกรัม (µg) ของ DNA แมลง ตามลำดับ เชื้อไฟโตพลาสมาเริ่มเพิ่มปริมาณขึ้นในต่อมน้ำลายที่มีการบ่มเพาะเชื้อ 14 วัน และเพิ่มปริมาณมากขึ้นแบบคงที่ในเวลา 21 วัน จนถึง 42 วัน (Figure 2) ซึ่งระยะเวลาที่พบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต่อมน้ำลายสอดคล้องกับความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ โดยหลังจากเชื้อเข้าสู่ลำตัวแมลงแล้ว เชื้อมีการบ่มเพาะและเพิ่มปริมาณในลำตัวแมลงอย่างน้อย 14 วัน จนได้ปริมาณเชื้อมากพอ แล้วเชื้อไฟโตพลาสมากระจายตัวไปยังต่อมน้ำลายของแมลง แมลงจึงสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นพืชได้ (Lefol et al., 1994)

แมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ละชนิดมีระยะเวลาการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงที่แตกต่างกัน บางชนิดมีระยะเวลาหลายสัปดาห์ ก่อนที่แมลงจะสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นพืชได้ สำหรับแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอื่นมีระยะเวลาการบ่มเชื้อที่แตกต่างกัน เช่น เพลี้ยไก่แจ้ *Cacopsylla pruni* (Scopoli) แมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อ European stone fruit yellows phytoplasma ใช้ระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อ 14 - 21 วัน (Carraro, 2001) เพลี้ยจักจั่น *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum) แมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อ chrysanthemum yellows phytoplasma ใช้ระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อ 30 วัน (Bosco et al., 2007) และเพลี้ยจักจั่น *Neoaliturus fenestratus* (Herrich-Schaffer) แมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อ lettuce phyllody phytoplasma ใช้ระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อ 14 - 32 วัน (Dehghan et al., 2012) สำหรับตัวเต็มวัยของเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* แมลงพาหะของโรคใบขาวอ้อยมีระยะการบ่มเพาะเชื้อที่ 14 – 21 วัน เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ

สรุปและข้อเสนอแนะ

การบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลง *M. hiroglyphicus* พาหะนำเชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวอ้อยเป็นกระบวนการที่

สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุของโรค ซึ่งหลังจากแมลงพาหะดูดกินน้ำเลี้ยงและได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่เป็นโรคใบขาว เชื้อต้องผ่านการบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในลำตัวก่อน จากนั้นเชื้อไฟโตพลาสมาเคลื่อนไปยังต่อมน้ำลายของแมลงพาหะ จึงสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นพืชที่แมลงดูดกินใหม่ได้ ระยะบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวที่สั้นที่สุดสำหรับแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ทั้งเพศเมีย เพศผู้และตัวอ่อนวัย 5 คือ 14 วัน ระยะเวลาบ่มและเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่เหมาะสมสำหรับตัวเต็มวัยคือ 21 วัน และเหมาะสมสำหรับตัวอ่อยวัน 5 คือ 28 วัน ดังนั้นการนำแมลงพาหะไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาควรให้แมลงพาหะรับเชื้อและบ่มเชื้อในระยะเวลาที่เหมาะสมอย่างน้อย 14 วัน ก่อนนำแมลงมาใช้สำหรับถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นอ้อย

คำขอบคุณ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนร่วมทุนระหว่างจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กับมหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสทุนการศึกษา (PHD54K0162)

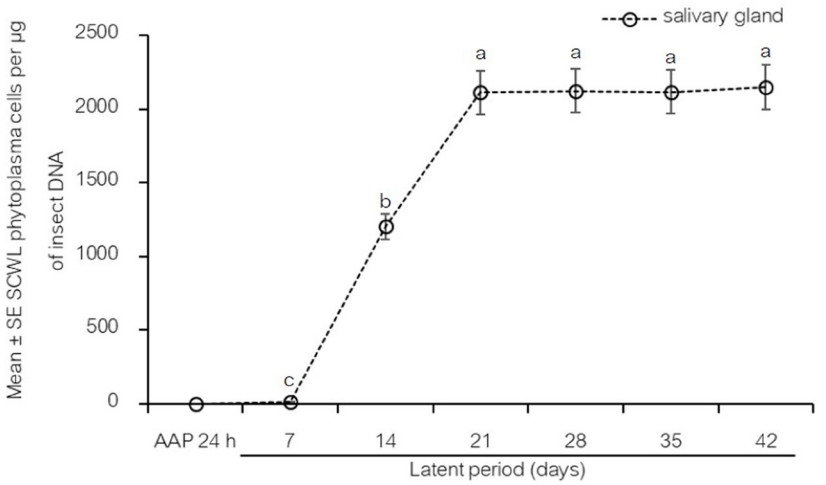

Figure 2 Number of sugarcane white leaf (SCWL) phytoplasma cells per µg of insect DNA in the salivary glands of females *Matsumuratettix hiroglyphicus*. The females were maintained on disease- free sugarcane for latent periods (LPs) of 7, 14, 21, 28, 35 and 42 d, after an acquisition access period (AAP) of 24 h. Error bars indicate one standard error of the mean. The different letter indicates the significant difference between male and female at $P < 0.05$.

เอกสารอ้างอิง

Bosco, D., L. Galetto, P. Leoncini, P. Saracco, B. Raccah, and C. Marzachì. 2007. Interrelationships between '*Candidatus* Phytoplasma *asteris*' and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). J. Econ. Entomol. 100: 1504–11.

Carraro, L. 2001. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. European. Plant. Pathol. 107: 695-700.

Chen, C. T. 1973. Insect transmission sugarcane white leaf disease by single leafhopper *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). Rep. Taiwan. Sugar. Rec. Inst. 60: 25-33.

Dehghan, S., M. Salehi, A. Khanchezar, N. Rastegari, and M. Salari. 2012. Transmission characteristics of lettuce phyllody phytoplasma by *Neoaliturus fenestratus* in Fars. Iran J. Plant. Pathol. 48: 35–36.

Hanboonsong, Y., C. Choosai, S. Panyim, and S. Damark. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). Insect. Mol. Biol. 11: 97-103.

Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai, and P. Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. J. Econ. Entomol. 99:1531-1537.

Hogenhout, S. A., K. Oshima, E. D. Ammar, S. Kakizawa, H. N. Kingdom, and S. Namba. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molec. Plant. Pathol. 9: 403–423.

Kollar, A., E. Seemuller, F. Bonnet, C. Saillard, and J. M. Bove. 1990. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma like phytoplasmas from infected plants. Phytopathology, 80: 233-237.

Lee, I. M., D. E. Gundersen – Rindal, and A. Bertaccini. 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity.Phytopathology. 88: 1359-1366.

Lefol, C., J. Lherminier, J. Boudon-Padieu Larrue, and C. Louis. 1994. Propagation of *Flavescence dorée* MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. J. Invertebr. Pathol. 63: 285–93.

Matsumoto, T., C. S. Lee, and W.S. Teng. 1969. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan, with special reference to the transmission by a leafhopper, *Epitettix hiroglyphicus* Mats. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 35: 251-259.

Nakashima, K., S. Kato, S. Iwanami, and N. Murata. 1991. Cloning and detection of chromosomal DNA from mycoplasma like organisms that cause yellow dwarf disease of rice. Appl. Environ. Microbiol, 57: 3570-3575.

Nakashima, K., W. Chaleeprom, P. Wongkaew, and P. Sirithorn. 1994. Detection of mycoplasma-like organisms associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probes. JIRCAS Journal for Scientific Papers. 1(1): 57-67.

Purcell, A. H., 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 20: 397-417.

Roddee, J., Y, Kobori, H. Yorozuya, and Y. Hanboonsong. 2017. Characterization of direct current electrical penetration graph waveforms and correlation with the probing behavior of *Matsumuratettix hiroglyphicus*, the insect vector of sugarcane white leaf phytoplasma. J. Econ. Entomol. 110: 893–902.

Roddee, J., Y. Kobori, and Y. Hanboonsong. 2018. Multiplication and distribution of sugarcane white leaf phytoplasma transmitted by the leafhopper, *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) (Hemiptera: Cicadellidae), in infected sugarcane. Sugar. Tech. 20(4): 445-453.

Weintraub, P. G., and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Ann. Rev. Entomol. 51: 91–111.

Wongkaew, P., Y. Hanboonsong, P. Sirithorn, C. Choosai, S. Boonkrong, T. Tinnangwattana, R. Kitchareanpanya, and S. Damak. 1997. Different of phytoplasma associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. Theor. Appli. Genet. 95: 660-663.