แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่น (*Yamatotettix flavovitatus*) พาหะนำโรคใบขาวอ้อย

Culturable Bacteria from Leafhopper, *Yamatotettix flavovitatus*, the Vector of Sugarcane White Leaf Disease

จุรีมาศ วังคีรี* และภิญญา เจริญพานิชสันติ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ยุพา หาญบุญทรง

สาขากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Jureemart Wangkeree* and Pinya Chareanpanitsanti

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

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

Yupa Hanboonsong

Entomology Division, Department of Plant Science and Agricultural Resources,

Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Nai Muang, Muang, Khon Kaen 40002

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovitatus*) พาหะนำโรคใบขาวอ้อย เพื่อคัดเลือกนำไปใช้ควบคุมแมลงแบบชีววิธี โดยแยกแบคทีเรียให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จำแนกชนิดโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 29 โคโลนี พบแบคทีเรียจาก 6 อันดับ 13 สกุล 22 ชนิด คัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ *Arthrobacter woluwensis* YF-01, *Bacillus subtilis* YF-01 และ *Bacillus megaterium* YF-01 มาทดสอบการก่อให้เกิดโรค โดยให้เพลี้ยจักจั่นหลังขาวดูดกินแบคทีเรียที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ การตาย 16.67-26.67 % และตรวจสอบการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในเพลี้ยจักจั่นและในต้นอ้อยด้วยเทคนิค PCR พบว่าทั้งสามชนิดสามารถตรวจพบในทุกระยะการเจริญตั้งแต่ ไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย และตรวจพบในตัวอย่างต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร จากงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่คาดว่ามีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงพาหะแบบไม่ใช้สารเคมี

คำสำคัญ : เพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovitatus*); โรคใบขาวอ้อย; แบคทีเรีย

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** jureemart@yahoo.com

Abstract

This study was to identify the cultivable bacteria from leafhopper *Yamatotettix flavovitatus* vector of sugarcane white leaf disease for biological control approach. The isolated bacteria were cultured on Nutrient agar and identified by analysis of *16S rRNA* gene sequence. Twenty nine bacterial colonies were classified into 6 order 13 genus and 22 species. Three isolates including *Arthrobacter woluwensis* YF-01, *Bacillus subtilis* YF-01 and *Bacillus megaterium* YF-01 were selected to test for their pathogenicity. After feeding the leafhopper with those bacteria at $1x10^9$ cell/ml for 72 hrs, the mortality rate was 16.67-26.67 %. The prevalence of these bacteria in the leafhopper and sugarcane was tested by PCR. They were distributed in both sugarcane and all developmental stages of insect vector. These three isolated bacteria might be possible to be used as a biological control agent against leafhopper in the future.

Keywords: leafhopper (*Yamatotettix flavovitatus*); sugarcane white leaf disease; bacteria

1. บทนำ

โรคใบขาวอ้อย (sugarcane white leaf disease) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของอ้อย โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในระบบการผลิตอ้อยและน้ำตาล [1] มีการแพร่ระบาดของโรคได้ 2 ทางหลัก คือ การขนย้ายอ้อยที่เป็นโรคไปปลูกในพื้นที่อื่นและการแพร่กระจายโดยแมลงพาหะ ซึ่งเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovitatus*, Family: Cicadelidae, Order: Hemiperta) เป็นแมลงที่มีปากแบบเจาะดูด (picering sucking) โดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อย และสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากต้นอ้อยที่เป็นโรคไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ [2] การแพร่ระบาดของแมลงพาหะก่อให้เกิดความเสียหายแก่ต้นอ้อยและผลผลิตอ้อยเป็นบริเวณกว้างโดยเฉพาะพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำให้ผลผลิตของอ้อยลดลงอย่างมาก ดังนั้นการควบคุมแมลงพาหะจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดการแพร่ระบาดของโรค

ปัจจุบัน พบว่ามีการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้จากแมลงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมและศึกษาความสัมพันธ์หรือบทบาทต่าง ๆ ที่มีกับแมลงในกลุ่มของแมลงที่มีปากแบบเจาะดูด เช่น การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงและการทดสอบการก่อให้เกิดโรค การคัดแยกแบคทีเรียจากแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) นำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับตัวอ่อน คือ *Erwinia persicinus* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 52 % [3] แบคทีเรียที่คัดแยกจากเพลี้ยอ่อน (*Toxoptera aurantii*) ทดสอบการก่อให้เกิดโรคโดยให้เพลี้ยอ่อนดูดกินแบคทีเรียเป็นเวลานาน 4 วัน พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescen* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 50 % [4] แบคทีเรีย *E. aphidicola* ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับเพลี้ยอ่อน (*Acyrthosiphon pisum*) พบว่าทำให้เพลี้ยอ่อนมีอัตราการตาย 81-100 % [5] นอกจากนี้แบคทีเรีย *Serratia marcescens* ที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) เมื่อทดสอบการเกิดโรคสามารถทำให้แมลงตายได้มากกว่า 50 % ภายในเวลา 4-5 วัน [6] เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้

ยังมีความสัมพันธ์กับกับแมลงอาศัย โดยมีบทบาทสามารถดึงดูด (kairomones) แมลงศัตรูธรรมชาติ ตัวอย่าง เช่น ในเพลี้ยอ่อน *Acyrthosiphon pisum* พบแบคทีเรีย *Staphylococcus sciuri* ที่แยกเพาะเลี้ยงได้จากมูลหวาน มีบทบาทในการดึงดูดตัวหนอนของแมลงวันดอกไม้ (*Episyrphus balteatus*) ซึ่งเป็นตัวห้ำให้เข้ามาหาเพลี้ยอ่อนมากขึ้น [7] เป็นแนวทางการนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยอ่อน นอกจากนี้การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ยังมีการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อใช้ในการยับยั้งการถ่ายทอดเชื้อของแมลงพาหะนำโรค โดยคัดเลือกแบคทีเรียจากแมลงและใช้เป็นตัวนำพายีนที่ทำลายเชื้อสาเหตุที่อาศัยในตัวแมลงพาหะนั้น เช่น การคัดแยกแบคทีเรีย *Alcaligenes xylosoxidans* จากเพลี้ยจักจั่น *Homalodisca coagulata* ซึ่งเป็นแมลงพาหะนำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค Pierce's disease ขององุ่น เพื่อให้แบคทีเรียเป็นตัวนำพายีนที่สามารถทำลายเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวเข้าไปในตัวแมลง [8] และการใช้แบคทีเรียในสกุล *Asaia* เป็นตัวนำพายีนที่เข้าไปในเพลี้ยจักจั่น *Scaphoideus titanus* พาหะนำเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคในองุ่น เพื่อให้ทำลายเชื้อที่อยู่ในตัวแมลงได้ [9]

ในรายงานการศึกษาวิจัยจะพบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากแมลงศัตรูนั้น สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุม หรือศึกษาความสัมพันธ์กับแมลงเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการจัดการแมลงศัตรูนั้น ๆ ได้ สำหรับเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovitatus* ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้มาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ เพื่อคัดเลือกนำไปทดสอบการก่อให้เกิดโรคต่อแมลงพาหะ ตรวจสอบการแพร่กระจายตัวในประชากรธรรมชาติของแมลง และในอ้อยที่เป็นพืชอาหาร เพื่อเป็นแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการการควบคุมแมลงพาหะโรคใบขาวอ้อยต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากแมลงพาหะ *Y. flavovittatus*

2.1.1 พื้นที่ที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่น

เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อย พื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลงและหลอดดูดแมลง ในช่วงเวลา 19:00-20:00 น. เก็บตัวอย่างแมลงใส่ในกรงพลาสติกที่มีต้นอ้อยอยู่เลี้ยงแมลงในโรงเรือนปฏิบัติการเพื่อนำตัวอย่างแมลงที่มีชีวิตอยู่มาศึกษาทดลอง

2.1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่น

ตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นระยะตัวเต็มวัยที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 60 ตัว (เพศเมีย 30 ตัว และเพศผู้ 30 ตัว) การทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปได้ คือ nutrient Agar (NA) และ nutrient broth (NB) ทำความสะอาดตัวแมลงก่อนเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปะปนอยู่ภายนอกก่อนการแยกแบคทีเรียออกมาเพาะเลี้ยง โดยใช้อุปกรณ์และเทคนิคที่ปลอดเชื้อ ล้างแมลงใน 75 % ethanol และ 6 % sodium hypochlorite นานอย่างละ 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

บดตัวแมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวอยู่ 100 ไมโครลิตร (หนึ่งตัวต่อหนึ่งหลอด) เจือจางความเข้มข้นลงโดยแบ่ง 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารใหม่ 100 ไมโครลิตร แล้วดูดจากหลอดที่เจือจางแล้ว 20 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง บ่มในตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลาประมาณ

24-48 ชั่วโมง ให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต

2.1.3 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

สุ่มคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร จากแมลงแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 โคโลนี เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเซลล์ในอาหารเหลว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยแยกเซลล์แบคทีเรียจากอาหารเหลวด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 2 นาที เติม TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) ปริมาตร 460 ไมโครลิตร สารละลาย 10 % SDS 30 ไมโครลิตร และเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 5 mg/ml 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชม. สกัดด้วยการเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่และเติม phenol : chloroform (24 : 1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน และหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรสารในหลอด และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด วางทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที และละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโคร ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

2.1.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน *16S rRNA*

จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงด้วยการนำดีเอ็นเอที่สกัดมาทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) เพื่อวิเคราะห์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์ (universal primer) 25F และ 1513R [10] มีส่วนประกอบ คือ dNTP 0.2 mM ไพรเมอร์ 0.3 µM (25F: 5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′, 1513R: 5′-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′) *Taq* DNA polymerase 1 U, $MgCl_2$ 2.5 mM, 1X buffer ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 2 ไมโครลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ initial denaturation 95 °C 5 นาที และ 30 รอบ denaturation 95 °C 1 นาที, Annealing 55 °C 1 นาที , Extension 72 °C 2 นาที และ final extension 72 °C 10 นาที นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยามาแยกด้วย gel electrophoresis บน 0.8 % agarose gel เพื่อตรวจสอบผลและขนาดของยีนที่ได้ จากนั้นนำส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณแล้วมาทำการ purify ด้วย PCR Clean-Up Kit เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สถาบัน ATIbiotech โดยใช้คู่ไพร์เมอร์เดียวกันกับที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และเปรียบเทียบกับยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล NCBI

2.2 การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่น

หลังจากได้ข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากการแยกออกมาเพาะเลี้ยง จึงคัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ *Arthrobacter woluwensis*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* เพื่อนำมาศึกษาการก่อให้เกิดโรคในแมลง โดยเตรียมแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดเลือก นำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5 % ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1x10^9$ cell/ml การให้แมลง

ดูดกินสารละลายแบคทีเรีย นำแมลงพาหะใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มที่ยืดให้มีความบางประมาณ 4 เท่า จากนั้นหยดสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5 % ร่วมกับแบคทีเรียลงบนพาราฟิล์มปริมาณ 50 ไมโครลิตร และปิดด้วยพาราฟิล์มอีกครั้งหนึ่ง นำไปติดไว้ที่ใต้ใบอ้อยเพื่อล่อให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย บันทึกการตายของแมลงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design สิ่งทดลอง คือ ชนิดของแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว (ทั้งแมลงเพศผู้และเพศเมีย) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแมลงที่ตาย โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรม SAS 9.0 กลุ่มควบคุมให้แมลงดูดกินสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5 %

2.3 การตรวจสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกในแมลงพาหะและอ้อยด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียในแมลงและในต้นอ้อย ด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อยืนยันว่าชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถพบได้ในธรรมชาติของประชากรแมลงรวมทั้งพบในพืชที่เป็นแหล่งอาหาร

2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลง

นำเพลี้ยจักจั่นระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1-5 ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย จำนวน 20 ตัวอย่าง ของแต่ละระยะ สกัดดีเอ็นเอ โดยบดให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ (1 M Tris pH 8.0, 0.5 M EDTA, 1M NaCl, 10 % SDS, proteinase K 2 mg/ml) ปริมาตร 20-50 มิลลิลิตร สำหรับระยะไข่และตัวอ่อน และ 80 มิลลิลิตร สำหรับตัวเต็มวัย บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยด้วยการเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่และเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน และหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรสารในหลอดผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 30 นาทีและตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ที่ผสม RNase 2 mg/ml ผสมอยู่ในอัตราส่วน 200 : 1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 6-24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อย

เก็บตัวอย่างอ้อยจาก 3 สถานที่ คือ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น และอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี โดยตัดยอดอ้อยสถานที่ละ 30 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ไนโตรเจนเหลวบดให้ละเอียดเป็นผง นำตัวอย่างอ้อยที่บดแล้วใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2 % CTAB บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากัน

จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ที่ผสม RNase 2 mg/ml ผสมอยู่ในอัตราส่วน 200:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 6-24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

2.3.3 การตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายโดยวิธีการ PCR

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกมาออกแบบไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงด้วยโปรแกรม Primer-Blast ในฐานข้อมูล NCBI โดยไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกแต่ละชนิดดังนี้ แบคทีเรีย *Arthrobacter woluwensis* F: 5′-AGGTAATGGCTCACCAAGGC-3′ และ R: 5′-CATCACTCAAGTCTGCCCGT-3′ ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 400 คู่เบส แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* F: 5′-CGGCGCATTAGCTAGTTGGT-3′ และ R: 5′-ACGTAGTTAGCCGTGGCTTT-3′ ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 281 คู่เบส แบคทีเรีย Bacillus megaterium F: 5′-CTTCGGGAAACCGAAGCTAA-3′ และ R: 5′-TTGCTCCGTCAGACTTTCGT-3′ ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 254 คู่เบส

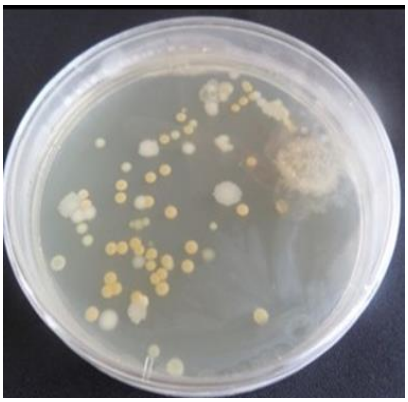
การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียเป้าหมายโดยนำดีเอ็นเอของแมลงและยอดอ้อยที่สกัดมาทำปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบคือ dNTP 0.2 mM, ไพรเมอร์ 0.3 µM, *Taq* DNA polymerase 1 U, $MgCl_2$ 2.5 mM, 1X buffer ดีเอ็นเอของแมลง 2 ไมโครลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ initial denaturation 95 °C 5 นาที และ 30 รอบ denaturetion 95 °C 1 นาที, annealing 55 °C 1 นาที, extension 72 °C 2 นาที และ final extension 72 °C 10 นาที นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยามาแยกด้วย gel electrophoresis บน 0.8 % agarose gel เพื่อตรวจสอบผล โดยมีดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกเป็น positive control และ ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็น negative control ในปฏิกิริยา PCR

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากแมลงพาหะ *Y. flavovittatus*

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างแมลงที่ใช้ในการทดลองจำนวน 60 ตัว พบว่ามีแมลงประมาณ 30 ตัว ที่มีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่ามีแบคทีเรียหลาย ๆ โคโลนีจากแมลงหนึ่งตัวที่สามารถเจริญบนอาหาร (รูปที่ 1) ดังนั้นจึงสุ่มคัดเลือก 1 โคโลนีจากตัวอย่างแมลงหนึ่งตัว เพื่อนำไปจำแนกชนิด โดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน *16S rRNA* จากค่าความเหมือนในการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่เท่ากับหรือมากกว่า 99 % ระบุเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ค่าความเหมือนระหว่าง 95-98 % ระบุเป็นแบคทีเรียในระดับสกุล [11] ผลการศึกษาพบแบคทีเรียจาก 6 อันดับ 13 สกุล 22 ชนิด ได้แก่ อันดับ Bacillales (14 โคโลนี 8 ชนิด) Actinomycetales (7 โคโลนี 7 ชนิด) Pseudomonadales (2 โคโลนี 2 ชนิด) Burkholderiales (3 โคโลนี 3 ชนิด) Sphingobacteriales (1 โคโลนี 1 ชนิด) และ Flavobacteriales (1 โคโลนี 1 ชนิด) (ตารางที่ 1) แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียใน order Bacillales โดยชนิดที่พบ ได้แก่ *Bacillus megaterium*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *B. thuringiensis* และ *B. subtilis* เป็นต้น รองลงมา คือ แบคทีเรียที่อยู่ในอันดับ Actinomycetales ชนิดที่พบได้แก่ *A. woluwensis*, *Leifsonia lichenia*, *Curtobacterium herbarum* และ *Micrococcus endo-*

phyticus เป็นต้น



รูปที่ 1 ตัวอย่างของโคโลนีแบคทีเรียที่ได้จากการแยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* บนอาหาร nutrient agar

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* สามารถพบได้ในแมลงชนิดอื่น ๆ เช่น *Bacillus megaterium* เพาะเลี้ยงได้จากแมลงช้าง (*Myrmeleon bore*) ซึ่งเป็นแมลงตัวห้ำ และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ฉีดเข้าสู่ตัวหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) พบว่ามีผลทำให้ตัวหนอนตาย [12] และมีรายงานว่าแยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยอ่อน *(Aphis pomi)* [13]

B. thuringiensis เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคแมลงและมีการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในปัจจุบันหรือเรียกว่า Bt ส่วน *B. subtilis* พบว่าคัดแยกได้จากจากแมลงหวี่ขาว *(B. tabaci)* และเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงชนิดนี้ [3] เช่นเดียวกับรายงานของ Lacava และคณะ [14] ที่พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สามารถแยกเพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่น *Homalodisca vitripennis*

นอกจากพบในแมลงแล้ว แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* มีรายงานว่าพบในดินบริเวณรากพืช และพบในพืช โดยเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (plant growth - promoting rhizobacteria or PGPR) [15,16]

แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* โดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค แต่ก็มีรายงานว่าสามารถแยกเพาะเลี้ยงได้จากแมลงบางชนิด ได้แก่ ในแมลงหวี่ขาว (*B. tabaci*) [3] เพลี้ยแป้ง *(Rhizoecus amorphophalli)* [17] และรายงานของ Podgwaite และคณะ[18] พบว่าพบแบคทีเรีย *Staphylococcus sciuri* สามารถแยกได้จากด้วงหนวดยาว (*Anoplophora glabripennis*) เป็นต้น

อันดับ Actinomycetales พบแบคทีเรียสกุล *Arthrobacter* พบทั่วไปในดิน [19] และในแมลง เช่น แมลงช้าง *(M. bore)* [12] แบคทีเรีย *Microbacterium testaceum* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ถั่วเหลือง โดยที่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรค [20] และมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคในมันฝรั่งได้ [21] ในขณะเดียวกันก็พบแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคกับอ้อย คือ แบคทีเรียในสกุล *Leifsonia* ที่เป็นสาเหตุของโรคตออ้อยแคระแกรน (ratoon stunting disease) [22] แบคทีเรีย *Micrococcus endophyticus* สามารถแยกได้จากรากพืช [23] แบคทีเรีย *Cellulosimicrobium terreum* สามารถแยกได้จากดิน [24] แบคทีเรียสกุล *Curtobacterium* สามารถแยกเพาะเลี้ยงได้จากอ้อย [25] และในรายงานของ Gai และคณะ [26] พบแบคทีเรีย *Curtobacterium* spp. แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *Dilobopterus costalimai*

แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน คัดแยกได้จากแมลงบางชนิด เช่น พบในเพลี้ยจักจั่น *H. vitripennis* [13] ซึ่งบางชนิดเป็นสาเหตุโรคแมลง เช่น *P. entomophila* เป็นเชื้อก่อโรคในแมลงวันผลไม้ [27] แบคทีเรียในสกุล *Massilia* สามารถแยกได้จากดิน [28] เช่นเดียวกับ *Novosphingobium soli* [29] ส่วนแบคทีเรีย *Chryseobacte-*

rium rhizoplane สามารถแยกได้จากรากของต้นข้าวโพด [30]

ดังนั้นแบคทีเรียที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบในแมลงแบคทีเรียที่พบในพืชซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนโดไฟท์ คือ ไม่ก่อให้เกิดโรค มีบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในพืช และแบคทีเรียกลุ่มที่มีรายงานว่าพบอาศัยอยู่ในดิน ซึ่งเป็นแหล่งสภาพแวดล้อมของพืชและแมลง

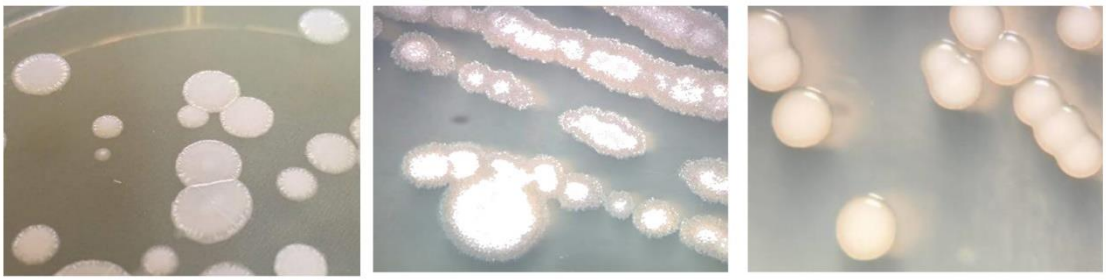
ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ในแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* กับฐานข้อมูล NCBI

อันดับแบคทีเรีย	ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี	ค่าเฉลี่ยความเหมือน (%)
Bacillales	*Bacillus megaterium*	5	99
	Staphylococcus sciuri	2	99
	Staphylococcus sp.	2	98
	Bacillus thuringiensis	1	99
	Bacillus subtilis	1	99
	Bacillus subterraneus	1	99
	Staphylococcus cohnii	1	99
	Staphylococcus arlettae	1	99
Actinomycetales	*Arthrobacter woluwensis*	1	99
	Leifsonia shinshuensis	1	99
	Leifsonia soli	1	99
	Curtobacterium luteum	1	99
	Cellulosimicrobium cellulans	1	99
	Microbacterium testaceum	1	99
	Micrococcus endophyticus	1	99
Pseudomonadales	*Pseudomonas aeruginosa*	1	99
	Pseudomonas sp.	1	96
Burkholderiales	*Massilia* sp.	2	95
	Massilia haematophila	1	99
	Burkholderia plantarii	1	99
Sphingomonadales	*Novosphingobium panipatense*	1	99
Flavobacteriales	*Chryseobacterium geocarposphaerae*	1	99

3.2 ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกและการก่อให้เกิดโรคในแมลงพาหะ *Y. flavovittatus*

หลังจากการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย จึงคัดเลือกชนิดหรือไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดเลือกตามคุณลักษณะที่มีรายงานมาก่อน คือ แบคทีเรียที่มีรายงานว่าเป็นเอนโดไฟท์ของพืช เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลง แบคทีเรียอาศัยอยู่ในดิน ได้แก่ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99 % กับฐานข้อมูล) *B. subtilis* (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99 % กับฐานข้อมูล) และ *A. woluwensis* (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99 % กับฐานข้อมูล) ซึ่งทั้งสามชนิดมีลักษณะดังกล่าวข้างต้น และใช้ชื่อสำหรับไอโซเลทที่คัดเลือก คือ *B. megaterium* YF-01, *B. subtilis* YF-01 และ *A. woluwensis* YF-01 ตามลำดับ (รูปที่ 2)

นอกจากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน *16S rRNA* แล้ว ยังมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือก เพื่อให้เกิดความแน่ชัดในการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย จากการศึกษาพบว่า *B. megaterium* YF-01 และ *B. subtilis* YF-01 มีรูปร่างเซลล์แบบแท่ง ติดสีย้อมเอนโดสปอร์ และมีการสร้างกรดที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาล การติดสีแกรมพบว่าทั้ง 3 ชนิด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเคลื่อนที่ได้และสามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลสได้



Arthrobacter woluwensis YF-01 *Bacillus subtilis* YF-01 *Bacillus megaterium* YF-01

รูปที่ 2 โคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก

เมื่อให้แมลงดูดกินแบคทีเรียที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกก่อให้เกิดโรคในเพลี้ยจักจั่นหลังขาว พบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลง 26.67, 26.67 และ 16.67 % ที่แมลงดูดกินแบคทีเรีย *A. woluwensis* YF-01, *B. subtilis* YF-01 และ *B. megaterium* YF-01 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาแบคทีเรียสกุล *Bacillus* โดยพบ *B. subtilis* จากแมลงหวี่ขาว *(B. tabaci)* และมีประสิทธิภาพเป็นเชื้อก่อให้เกิดโรคทำให้แมลงตายประมาณ 50 % [3] *B. megaterium* คัดแยกได้จากแมลงช้าง (*M. bore*) และมีผลก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก (*S. litura*) ส่วน *A. woluwensis* คัดแยกได้จากแมลงช้างเช่นกัน เมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้ฉีดเข้าสู่ตัวหนอนกระทู้ผัก พบว่าทำให้หนอนตาย 15 % [11] แต่ *B. megaterium* ก่อให้เกิดโรคเพลี้ยอ่อน *(A. pomi)* ทำให้แมลงตาย 90-100 % [13] ซึ่งความรุนแรงของแบคทีเรียหรือประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคกับแมลงมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิด ไอโซเลทของแบคทีเรียและชนิดของแมลง

ตารางที่ 2 การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียที่คัดเลือกกับเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

ชนิดแบคทีเรียที่คัดเลือก	เปอร์เซ็นต์การตายโดยเฉลี่ย*
Control	0[b]
A. woluwensis YF-01	26.67[a]
B. subtilis YF-01	26.67[a]
B. megaterium YF-01	16.67[ab]

*ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

3.3 การตรวจสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกในแมลงและในต้นอ้อย

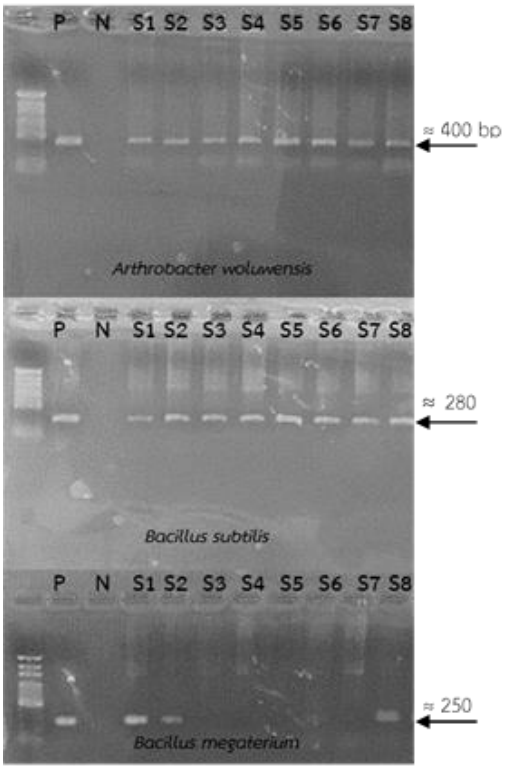
การตรวจสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ของแมลงพาหะ ด้วยเทคนิค PCR โดยการออกแบบไพร์เมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา ผลจากการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis แสดงดังรูปที่ 3 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ที่คัดเลือก สามารถตรวจพบได้ในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะและในตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากทั้งสามสถานที่ โดยการตรวจพบแบคทีเรียแต่ละชนิดดังนี้ *A. woluwensis* YF-01 ตรวจพบในระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1-5 และตัวเต็มวัยเพศเมีย และเพศผู้ 100 % (ยกเว้นตัวอ่อนวัย 2 ตรวจพบ 95 %) รวมทั้งตรวจพบในตัวอย่างอ้อย 100% แบคทีเรีย *B. subtilis* YF-01 พบในสัดส่วน 100 % ในระยะไข่ และตัวอ่อนวัย 1-3 ส่วนตัวอ่อนในวัย 4-5 ตัวเต็มวัยเพศเมีย และเพศผู้ พบ 85, 75, 95 และ 65 % ตามลำดับ และตรวจพบในตัวอย่างอ้อย 100 % เช่นเดียวกัน ในขณะที่สัดส่วนการตรวจพบ *B. megaterium* YF-01 ในระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1-5 ตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้อยู่ที่ 85, 65, 50, 45, 80, 40, 75, และ 45 % ตามลำดับ และตรวจพบในตัวอย่างอ้อย 60 % (ตารางที่ 3) ในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer-BLAST ในฐานข้อมูล NCBI โดยออกแบบให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายเท่านั้น และตรวจสอบด้วย gel electrophoresis อย่างไรก็ตาม ไม่ได้มีการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

จากการตรวจสอบแบคทีเรีย 3 ชนิด ทั้งในแมลงพาหะและในต้นอ้อยพืชอาศัย ทำให้ทราบว่านอกจากแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในแมลงแล้วยังสามารถอาศัยอยู่ในพืชอาศัยของแมลง เป็นไปได้ว่าการดูดกินน้ำเลี้ยงต้นอ้อยของแมลงพาหะจะเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดแบคทีเรียระหว่างพืชกับแมลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Magnani และคณะ [25] ที่คัดแยกแบคทีเรีย *Methylobacterium* spp. และ *Curtobacterium* spp. จากเพลี้ยจักจั่น *Dilobopterus costalimai* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้จัดเป็นเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในต้นส้ม ซึ่งเป็นหนึ่งในแหล่งพืชอาหารของเพลี้ยจักจั่น

เปอร์เซ็นต์การตรวจพบในแมลงแต่ละระยะมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะแบคทีเรีย *B. megaterium* YF-01 นั้นอาจเป็นไปได้ว่าในตัวแมลงพาหะที่เป็นแมลงดูดกินนำเลี้ยงจากพืช มีการขับถ่ายมูลหวาน (honey dew) อยู่ตลอดเวลา อาจทำให้แบคทีเรียบางชนิดอาจถูกขับถ่ายออกมา ซึ่งในรายงานของ [31] พบว่ามีแบคทีเรีย *B. endophyticus B. niacini* และ *Roseomonas* ในมูลหวานของแมลงหวี่ขาว ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ได้รับจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชและถูกขับถ่ายออกมา อย่างไรก็ตาม การตรวจพบ *B. megaterium* ในตัวอย่างแมลงมีเปอร์เซ็นต์ที่พบประมาณ 40-85 % ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับในการตรวจพบในอ้อยคือพบประมาณ 60 %

ตารางที่ 3 การตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกในระยะต่าง ๆ ของแมลงพาหะ *Y. flavovitatus* ด้วยเทคนิค PCR

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด/จำนวนที่พบเชื้อ		
	A. woluwensis YF-01	*B. subtilis* YF-01	*B. megaterium* YF-01
ไข่	20/20	20/20	20/17
ตัวอ่อนวัย 1	20/20	20/20	20/13
ตัวอ่อนวัย 2	20/19	20/20	20/10
ตัวอ่อนวัย 3	20/20	20/20	20/9
ตัวอ่อนวัย 4	20/20	20/17	20/12
ตัวอ่อนวัย 5	20/20	20/15	20/8
ตัวเต็มวัย (เมีย	20/20	20/19	20/15
ตัวเต็มวัย (ผู้)	20/20	20/13	20/9
ตัวอย่างต้นอ้อย	90/90	90/90	90/54



รูปที่ 3 ผลของการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบแบคทีเรีย *Arthrobacter woluwensis* YF-01, YF-01, *Bacillus subtilis* YF-01 และ *Bacillus megaterium* ในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovitatus* (P = positive control, N = negative control, S = sample)

4. สรุป

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *(Y. flavovitatus)* แมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย เมื่อคัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ *A. woluwensis* YF-01, *B. subtilis* YF-01, *B. megaterium* YF-01 นำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรค โดยให้แมลงดูดกินแบคทีเรียที่ความเข้มข้นระดับสูง พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกทำให้แมลงตายอยู่ระหว่าง 16.67 ถึง 26.67 % ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคในแมลงค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียดังกล่าวเป็นทางเลือกที่น่าสนใจและเป็นจุดเริ่มต้นในการนำมาควบคุมเพลี้ยจักจั่นแมลงพาหะแบบไม่ใช้สารเคมี ดังนั้นควรมีการ

ศึกษาวิจัยต่อถึงกลไกหรือสารพิษที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ซึ่งส่งผลต่อแมลง แล้วนำมาใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ แบคทีเรียมีการแพร่กระจายตัวในประชากรแมลงพาหะในธรรมชาติ และยังพบในต้นอ้อย แสดงให้เห็นว่าเพลี้ยจักจั่นได้รับแบคทีเรียเหล่านั้นมาจากการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อยเป็นอาหาร ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกนี้เป็นตัวนำมายีนที่สามารถทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าสู่เพลี้ยจักจั่นโดยผ่านทางการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อย นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปศึกษาบทบาทความสัมพันธ์ของแบคทีเรียกับเพลี้ยจักจั่น เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการจัดการแมลงพาหะต่อไปได้

5. รายการอ้างอิง

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

[2] Hanboonsong, Y., Ritthison, W., Choosai, C. and Sirithorn, P., 2006, Transmission of Sugarcane White Leaf Phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector, J. Econ. Entomol. 99: 1531-1537.

[3] Ateyyat,M.A.,Shatnawi,M.andAl-Mazra'awi, M.S., 2009, Culturable whitefly associated bacteria and their potential as biological control agents, Jordan J. Biol. Sci. 3(2): 139-144.

[4] Sevim, E., Celebi, O. and Sevim, A., 2012, Determination of the bacterial flora as a microbial control agent of *Toxoptera aurantii* (Homoptera: Aphididae), Biologia 67: 397-404.

[5] Harada, H. and Ishikawa, H., 1997, Experimental pathogenicity of *Erwinia aphidicola* to pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, J. Gen. Appl. Microbiol. 43: 363-367.

[6] Niu, H., Liu, B., Li, Y. and Guo, H., 2016, Identification of a bacterium isolated from the diseased brown plant hopper and determination of its insecticidal activity, Biocon. Sci. Technol. 26: 217-226.

[7] Leroy, P. D., Ahmed, S., Stéphanie, H., Philippe, T., Georges, L., François, J. V., Frédéric, F., Yves, B., Gary, W. F. and Eric, H., 2011, Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies, Nat. Commun. 2(348): 1-12.

[8] Bextine, B., Lauzon, C., Potter, S., Lampe, D. and Miller, T. A., 2004, Delivery of a genetically marked *Alcaligenes* sp. to the glass- winged sharpshooter for use in paratrangenic control strategy, Curr. Microbiol. 48: 327-331.

[9] Crotti, E., Damiani, C., Pajoro, M., Gonella, E., Rizzi, A., Ricci, I., Negri, I., Scuppa, P., Rossi, P., Ballarini, P., Raddadi, N., Marzorati, M., Sacchi, L., Clementi, E., Genchi, M., Mandrioli, M., Bandi, C., Favia, G., Alma, A. and Daffonchio, D., 2009, *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross- colonizing insects of phylogenetic-

cally distant genera and orders, Environ. Microbiol. 11: 3252-3264.

[10] Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, J. Bacteriol. 173: 697-703.

[11] Vĕtrovský, T. and Baldrian, P., 2013, The variability of the *16S rRNA* gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses, PLoS One 8: e57923.

[12] Nishiwaki, H., Ito, K., Shimomura, M., Nakashima, K. and Matsuda, K., 2007, Insecticidal bacteria isolated from predatory larvae of the antlion species *Myrmeleon bore* (Neuroptera: Myrmeleontidae), J. Invertebr. Pathol. 96: 80-88.

[13] Aksoy, H.M. and Ozman-Sullivan, S.K., 2008, Isolation of *Bacillus megaterium* from *Aphis pomi* (Homoptera: Aphididae) and assessment of its pathogenicity, J. Plant Pathol. 90: 449-452.

[14] Lacava, P.T., Parker, J., Andrete, F.D., Ramirez, J.L. and Miller, T.A., 2007, Analysis of the bacterial community in glassy-winged sharpshooter heads, Entomol. Res. 37: 261-266.

[15] Garcia, J.A.L., Agustin, P., Beatriz, R., Maria, P. and Francisco, J.G.M., 2004, Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper, Agronomie 24: 169-176.

[16] Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L.M.P., 2012, Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents, Genet. Mol. Biol. 35: 1044-1051.

[17] Ravikumar, S.S., Jayaprakas, C.A., Ragesh, L. and Sasidharan, N.K., 2014, Endosymbiotic bacteria associated with the mealy Bug, *Rhizoecus amorphophalli* (Hemiptera: Pseudococcidae), Int. Schol. Res. Not. 2014: 1-9, Available Source: http://dx.doi.org/10.1155/2014/268491.

[18] Podgwaite, J.D., Vincent, D.A., Roger, T.Z. and Heidi, S., 2013, Bacteria associated with larvae and adults of the Asian long horned beetle (Coleoptera: Cerambycidae), J. Entomol. Sci. 48: 128-138.

[19] Dorothy, J. and Keddie, R.M., 2006, The Genus *Arthrobacter*, Prokaryotes 945-960.

[20] Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G. and Vidaver, A.K., 2002, Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and Prairie Plants, Appl. Environ. Microbiol. 68: 2198-2208.

[21] Morohoshi, T., Wang, W., Someya, N. and Ikeda, T., 2011, Genome sequence of *Microbacterium testaceum* StLB037, an N-Acylhomoserine lactone-degrading bacterium isolated from potato Leaves, J. Bacteriol. 193: 2072-2073.

[22] Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E., van

Sluys, M.A., Kitajima, J.P., Truffi, D., Amaral, A.M., Harakava, R., Oliveira, J.C., Wood, D., de Oliveira, M.C., Miyaki, C., Takita, M.A., da Silva, A.C., Furlan, L.R., Carraro, D.M., Camarotte, G., Almeida, N.F.Jr, Carrer, H., Coutinho, L.L., El-Dorry, H.A., Ferro, M.I., Gagliardi, P.R., Giglioti, E., Goldman, M.H., Goldman, G.H., Kimura, E.T., Ferro, E.S., Kuramae, E.E., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Mauro, S.M., Machado, M.A., Marino, C.L., Menck, C.F., Nunes, L.R., Oliveira, R.C., Pereira, G.G., Siqueira, W., de Souza, A.A., Tsai, S.M., Zanca, A.S., Simpson, A.J., Brumbley, S.M. and Setúbal, J.C., 2004, The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, Mol. Plant Microbe Interact. 17: 827-36.

[23] Chen, H.H., Zhao, G.Z., Park, D.J., Zhang, Y.Q., Xu, L.H., Lee, J.C., Kim, C.J., Li, W.J., 2009, *Micrococcus endophyticus* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Aquilaria sinensis* roots, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1070-1075.

[24] Yoon, J.H., Kang, S.J., Schumaan, P. and Oh, T.K., 2007 *Cellulosimicrobium terreum* sp. isolated from soil, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2493-2497.

[25] Magnani, G.S., Didonet, C.M., Cruz, L.M., Picheth, C.F., Pedrosa, F.O. and Souza, E.M., 2010, Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane, Genet. Mol. Res. 9: 250-258.

[26] Gai, C.S., Andreote, F.D., Andreote, F.D., Spotti, J.R., Araújo, W.L., Miller, T.A., Azevedo, J.L. and Lacava, P.T., 2011, Endophytic bacteria associated to sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae), Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *Pauca,* Plant Pathol. Microbiol. 2(3):1-8.

[27] Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F. and Lemaitre, B., 2005, Drosophila host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102**:** 11414-11419

[28] Wang, J.W., Zhang, J.L., Pang, H., Zhang, Y.B., Li, Y.Y. and Fan, J.P., 2012, *Massilia flava* sp. nov., isolated from soil, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 580-585.