การจำแนกชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยและบทบาท
ต่อแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย

โดย

นางสาวภิญญา เจริญพานิชสันติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยและบทบาท
ต่อแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย

โดย

นางสาวภิญญา เจริญพานิชสันติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

BACTERIAL SYMBIONTS ISOLATION AND ITS ROLE ON THE LEAFHOPPER VECTOR OF SUGARCANE WHITE LEAF DISEASE

BY

MISS PINYA JAROENPANICHSANTI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (AGRICULTURAL TECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2016

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวภิญญา เจริญพานิชสันติ

เรื่อง

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยและบทบาทต่อแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)

เมื่อ วันที่ 18 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(อาจารย์ ดร. พรชัย หาระโคตร)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก _____
(อาจารย์ ดร. จุรีมาศ วังคีรี)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____
(อาจารย์ ดร. วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ _____
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยุพา หาญบุญทรง)

คณบดี _____
(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจำแนกชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยและบทบาทต่อแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย
ชื่อผู้เขียน	นางสาวภิญญา เจริญพานิชสันติ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
ภาควิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	เทคโนโลยีการเกษตร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อาจารย์ ดร. จุรีมาศ วังคีรี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

โรคใบขาวอ้อยมีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในระบบการผลิตอ้อยและน้ำตาล แพร่ระบาดโดยมีแมลงพาหะที่สำคัญ คือ เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) (Matsumura) เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นผ่านทางไข่ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในประชากรแมลง และเกิดการแพร่ระบาดของโรค จึงมีความจำเป็นในการป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล เพื่อลดการระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมา ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่เพาะเลี้ยงได้จากแมลงพาหะนำโรค เป็นกลยุทธ์ใหม่ในการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงและการเกิดโรค การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงพาหะและการระบาดของโรคใบขาวอ้อย โดยคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อนำมาศึกษาบทบาทต่อแมลงพาหะ ประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา และการกระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในประชากรแมลงพาหะและต้นอ้อย ในการศึกษาแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วน ประกอบด้วย

การทดลองในส่วนที่ 1 จำแนกชนิดของแบคทีเรียจากตัวอย่างแมลงในอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี อำเภอเขาสวนกวาง และอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น จากแบคทีเรียจำนวน 117 โคโลนี พบว่าเป็นแบคทีเรียจาก 9 order 18 genus 45 species โดยแมลงที่เก็บในพื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น พบแบคทีเรีย 38 โคโลนี จัดเป็นแบคทีเรียใน 9 order 15 genus 24 species ได้แก่ order Actinomycetales (7 species), Bacillales (7 species),

Pseudomonadales (2 species), Rhizobiales (3 species), Burkholderiales (1 species), Sphingobacteriales (1 species), Xanthomonadales (1 species), Alteromonadales (1 species) และ Lactobacillales (1 species) เช่น *Bacillus cereus, Arthrobacter woluwensis, A. enclensis*, *Brachybacterium phenoliresistens, B. subtilis, B. licheniformis, Sphingobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia, Oceanimonas* sp., *Acinetobacter pittii, Enterococcus casseliflavus* และ *Agrobacterium tumefaciens* พื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี ตัวอย่างโคโลนี 40 โคโลนี เป็นแบคทีเรียจาก 3 order 10 genus 21 species ได้แก่ order Actinomycetales (12 species), Bacillales (7 species) และ Pseudomonadales (2 species) เช่น *A. nicotianae, B. licheniformis, A. junii, B. phenoliresistens, Microbacterium testaceum* และ *Tsukamurella inchonensis* และพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 39 โคโลนี แบคทีเรีย 2 order 7 genus 18 species ได้แก่ order Actinomycetales (14 species) และ Bacillales (4 species) เช่น *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Tsukamurella pulmonis* และ *Rhodococcus corynebacterioides*

การทดลองในส่วนที่ 2 คัดเลือกแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *M. testaceum, B. licheniformis, B. subtilis, B. megaterium, A. woluwensis* และ *A. nicotianae* ทดสอบการก่อให้เกิดโรค โดยให้แมลงดูดกินแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียทำให้แมลงตาย 6.66-23.33% โดย *B. megaterium* ทำให้แมลงมีการตายสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ส่วนการศึกษาผลของแบคทีเรียต่อการขยายพันธุ์ โดยให้แมลงเพศผู้และเพศเมียดูดกินแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^8$ cell/ml นาน 72 ชั่วโมง ก่อนการผสมพันธุ์ พบว่าแมลงที่ดูดกินแบคทีเรียวางไข่ลดลง โดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 21.07-59.20 ฟอง/คู่ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่แมลงที่ไม่ได้ดูดกินแบคทีเรียมีการวางไข่โดยเฉลี่ย 84.53 ฟอง/คู่

การทดลองในส่วนที่ 3 ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ โดยให้แมลงดูดกินแบคทีเรียชนิดที่คัดเลือกที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cell/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาจากต้นอ้อยโรคใบขาว 1 วัน เลี้ยงแมลงด้วยต้นอ้อยปกติเป็นเวลา 14 และ 21 วัน เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา และทำการถ่ายทอดเชื้อ โดยให้แมลงดูดกินอ้อยปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน ดูแลรักษาต้นอ้อยในโรงเรือนทดลองนาน 30 วัน ตัดยอดมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โดยเทคนิค Nested PCR ต้นอ้อยที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงที่บ่มเชื้อไว้นาน 21 วัน พบว่าแมลงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา 5-15% แมลงไม่ได้ดูดกินแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ 15% แมลงที่ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย

B. megaterium ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 10% แมลงที่ดูดกินเชื้อ *A. nicotinae*, *A. woluwensis* และ *B. subtilis* ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 5% และแมลงที่ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย *M. testaceum* และ *B. licheniformis* ตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ส่วนแมลงที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

และการทดลองในส่วนที่ 4 ตรวจสอบการกระจายตัวของแบคทีเรียในต้นอ้อย และในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล พบว่า ต้นอ้อยที่เก็บจากทั้ง 3 พื้นที่ดังกล่าวข้างต้น ตรวจพบ *M. testaceum, A. woluwensis* และ *B. subtilis* 100%, *B. licheniformis* (95-100%), *A. nicotinae* (70-86.66%) และ *B. megaterium* (40-83.33%) ของจำนวนอ้อยทั้งหมด 90 ตัวอย่าง และในประชากรเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล ตรวจพบ *M. testaceum* 80-100%, *B. licheniformis* (50-95%), *A. woluwensis* (90-100%), *A. nicotinae* (80-100%), *B. megaterium* (25-70%) และ *B. subtilis* (50-95%) ของจำนวนแมลงทั้งหมด 120 ตัว

สรุปจากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ในเพลี้ยจักจั่น *M. hirolgphicus* และคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *A. nicotinae*, *B. megaterium*, *M. testaceum*, *B. subtilis* และ *A. woluwensis* ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคทำให้แมลงตาย 6.66-23.33% แบคทีเรียดังกล่าวมีผลทำให้แมลงวางไข่ได้ลดลง 30-75% จากการตรวจสอบพบแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดในประชากรธรรมชาติแมลงพาหะและในต้นอ้อยพืชอาหาร แต่ยังไม่พบผลของแบคทีเรียที่มีต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาในงานทดลองครั้งนี้ งานวิจัยนี้เป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาการควบคุมแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยด้วยแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ อาจเป็นในลักษณะของการใช้แบคทีเรียที่เป็นเอนโดไฟท์มีประโยชน์ต่อพืช แต่มีผลในด้านลบกับแมลงพาหะ ทั้งนี้วิธีการหรือรูปแบบการนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม

คำสำคัญ: แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากแมลง, โรคใบขาวอ้อย, เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*)

Thesis Title	BACTERIAL SYMBIONTS ISOLATION AND ITS ROLE ON THE LEAFHOPPER VECTOR OF SUGARCANE WHITE LEAF DISEASE
Author	Miss Pinya Jaroenpanichsanti
Degree	Master of Science (Agricultural Technology)
Department/Faculty/University	Agricultural Technology Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Jureemart Wangkeeree, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Wilawan Chuaboon, Ph.D.
Academic Years	2016

ABSTRACT

The sugarcane white leaf disease is caused by the phytoplasma, it's the most destructive disease in sugarcane industry. This phytoplasma is transmitted by leafhoppers vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura), its the transmission agent as well as the pathogen reservoir. This cause the spread of phytoplasma in the population of insects and the spread of disease as a results. Therefore, the management or reduction the leafhopper is necessary. Up to date, the identification of the cultural bacteria from the insect vectors is one of the novel strategies to apply for the insects and diseases management. The purpose of this study is to identify the cultivable bacteria from the leafhopper *M. hiroglyphicus* approach to use for controlling the vector and disease distribution. Some of the bacteria are selected to test their effect on the vector, effect of bacteria on phytoplasma transmission by the leafhopper has investigated also the prevalence of those bacteria in the vector natural population and sugarcane host plant are determined. In the study were divided four components.

In the first experiment, bacteria were isolated from the leafhoppers were collected from Amphur Kumpavapee, Udonthani province, Amphur Kaosuankwang,

and Amphur Muang, Khon Kaen province. The results of 117 bacteria colonies sequenced were classified into 9 order 18 genus 45 species. Including order Bacillales, Actinomycetales, Pseudomonadales, Burkholderiales, Sphingobacteriales, Xanthomonadales, Alteromonadales, Rhizobiales and Lactobacillales. Bacteria isolated from *M. hiroglyphicus* those collected at Amphur Kaosuankwang, Khon Kaen province 38 colonies as a bacterium in 9 order 15 genus 24 species, including order Actinomycetales (7 species), Bacillales (7 species), Pseudomonadales (2 species), Rhizobiales (3 species), Burkholderiales (1 species), Sphingobacteriales (1 species), Xanthomonadales (1 species), Alteromonadales (1 species) and Lactobacillales (1 species), such as *Bacillus cereus, Arthrobacter woluwensis, A. enclensis, Brachybacterium phenoliresistens, B. subtilis, B. licheniformis, Sphingobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia, Oceanimonas* sp., *Acinetobacter pittii, Enterococcus casseliflavus* and *Agrobacterium tumefaciens.* Bacteria isolated from *M. hiroglyphicus* those collected at Amphur Kumpavapee, Udonthani province 40 colonies as a bacterium in 3 order 10 genus 21 species, including order Actinomycetales (12 species), Bacillales (7 species) and Pseudomonadales (2 species), such as *A. nicotianae*, *B. licheniformis, A. junii, B. phenoliresistens, Microbacterium testaceum* and *Tsukamurella inchonensis.* Bacteria were isolated from *M. hiroglyphicus* those collected at Amphur Muang, Khon Kaen province 39 colonies as a bacterium in 2 order 7 genus 18 species, including order Actinomycetales (14 species) and Bacillales (4 species), such as *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Tsukamurella pulmonis* and *Rhodococcus corynebacterioides*.

In the second, six species of bacteria include *B. subtilis, B. megaterium, B. licheniformis, A. nicotianae, M. testaceum* and *A. woluwensis* were test for their pathogenicity. The leafhoppers feed each bacteria species at concentration $1x10^9$ cell/ml for 7 days. The results show that insects have mortality from 6.66 to 23.33% by *B. megaterium* have the highest mortality ($p \leq 0.05$). The effect of bacteria on the leafhoppers fecundity was examined. The male and female were feed with each bacteria at concentration $1x10^8$ cell/ml for 72 hours before to mating. Number of egg laid decrease in the leafhoppers which were feed bacteria. The average of egg laid

were 21.07 to 59.20 of egg laid/pair ($p \leq 0.05$), while the leafhoppers were not feed any bacteria have the highest average number of egg laid as 84.53 egg/pair.

In the third, The effect of selected bacteria on phytoplasma transmission by the leafhopper vector was investigated. The leafhopper were feed each bacteria species at a concentration of $1x10^8$ cell/ml for 72 hours the they acquire phytoplasma from sugarcane white leaf disease for 1 day. The leafhoppers were reared with normal sugarcane plant for 14 and 21 days to incubation the phytoplasma, then the transmission proceed by transferred the vector feed on disease-free sugarcane for 1 day. The tested sugarcane plant were maintain in the green house for 30 days and shoot cutting to extract DNA and the phytoplasma was checked by using Nested-PCR. The results found that the sugarcane that fed with the leafhopper which 21 days phytoplasma incubation shown 5-15% of disease infection. The leafhoppers with no bacteria feeding were shown 15% sugarcane infection when the leafhoppers fed with *B. megaterium* were 10% phytoplasma transmission and for fed with *A. nicotinae*, *A. woluwensis* and *B. subtilis* were shown 5% transmission whereas there is no transmission for feeding with *M. testaceum* and *B. licheniformis*. However, we did not find any statically difference with the control group. Although, the leafhopper which 14 days phytoplasma incubation were none of phytoplasma transmission.

In the fourth, the distribution of selected bacteria in the leafhoppers vector and sugarcane host plants. For the sugarcane plants were collected from three fields of sugarcane, results shown that the *M. testaceum, A. woluwensis* and *B. subtilis* were found positive 100%, *B. licheniformis* were found positive 95-100%, *A. nicotinae* were found positive 70-86.66%, *B. megaterium* were found positive 40-83.33% of all 90 samples were tested. The natural population of the leafhoppers those collected from the same three fields were detected *M. testaceum* at 80-100% *B. licheniformis* at 50-95%, *A. woluwensis* at 90-100%, *A. nicotinae* at 80-100%, *B. megaterium* at 25-70% and *B. subtilis* at 50-95% from all 120 insects.

In conclude, the bacteria that isolated from leafhopper *M. hirolgphicus* and 6 species were selected include *B. licheniformis, A. nicotinae, B. megaterium, M. testaceum, B. subtilis* and *A. woluwensis.* Their pathenogenic mortality causing

was tested and there show 6.66-23.33% leafhopper death. Those bacteria had influence on the leafhopper fecundity which resulting decrease the number of eggs laid 30-75%. Also, these bacteria are prevalence in natural population of the leafhopper and in the sugarcane host plant. However, this experiment was not found the bacteria effect on the phytoplasma transmission by the vector. This experiment is initiation of our research strategy to use the cultivable bacteria to control this leafhopper vector. The possibility is using the bacteria that benefit to plant host as the endophytes but it have negative effect on the leafhopper. However, this applications are need to further investigated.

Keywords: Culturable bacteria, Sugarcane White Leaf Disease, Leafhopper vector (*Matsumuratettix hiroglyphicus*)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. จุรีมาศ วังคีรี อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้เสียสละเวลาในการอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ แนวคิด คำแนะนำที่ดีต่างๆ ตลอดจนแนวทางการใช้ชีวิตในการทำงาน คอยดูแลอบรมสั่งสอนจนกระทั่งแก้ไขปัญหาต่างๆ และช่วยดูแลจนกระทั่งวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี และอาจารย์ ดร. วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่เสียสละเวลามาให้คำปรึกษาและช่วยให้ข้อเสนอแนะและคำแนะนำต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. พรชัย หาระโคตร ที่เสียสละเวลาในการมาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์มากขึ้น ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ยุพา หาญบุญทรง ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นกรรมการ และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งสนับสนุนและแนะแนวทาง ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ช่วยให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยเครือข่ายองค์กรบริหารงานวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานทดลอง ขอบคุณ เจ้าหน้าที่ ที่ช่วยดำเนินการติดต่อประสานงานต่างๆ จนลุล่วงไปได้ด้วยดี รุ่นพี่ และรุ่นน้อง ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ทุกท่านที่ช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

และขอขอบพระคุณกำลังใจจากบิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อนๆ ที่ช่วยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ทำให้มีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

นางสาวภิญญา เจริญพานิชสันติ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(8)
สารบัญตาราง	(13)
สารบัญภาพ	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ขอบเขตการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของอ้อยและความเสียหายจากโรคใบขาว	6
2.2 เชื้อไฟโตพลาสมาและแมลงพาหะนำโรค	10
2.2.1 การจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมา	10
2.2.2 ลักษณะรูปร่างของเชื้อไฟโตพลาสมา	10
2.2.3 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา	11
2.2.4 รูปแบบการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา	11
2.2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีเบื้องต้น	12
2.3 เพลี้ยจักจั่นแมลงพาหะนำโรคใบขาว	13

หน้า

2.4 จุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลง 15
2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากแมลง 16
2.6 แนวทางการใช้จุลินทรีย์ร่วมอาศัยในการควบคุมแมลง 18
2.7 บทบาทของจุลินทรีย์ร่วมอาศัยต่อการถ่ายทอดโรคของแมลงพาหะ 20
2.8 ความสัมพันธ์ของเอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืชอาหารและแมลงปากเจาะดูด 21

บทที่ 3 วิธีการวิจัย 24

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 24
3.1.1 พื้นที่ที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างแมลง 24
3.1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัยจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 26
3.1.3 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 28
3.1.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA 29
3.2 การศึกษาบทบาทของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 29
3.2.1 การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดทุติยภูมิเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเป็นเชื้อก่อโรคกับเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล 29
3.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัยทุติยภูมิที่คัดเลือกเพื่อทดสอบ 30
3.2.3 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล 30
3.2.4 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล 32
3.3 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 34
3.3.1 การเตรียมต้นอ้อยปลอดเชื้อและต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว 34
3.3.2 ขั้นตอนการศึกษาผลของแบคทีเรียต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล 34
3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอของต้นอ้อย 35
3.3.4 การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในต้นอ้อยด้วยวิธีการ Nested PCR 35

หน้า

3.4 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และในต้นอ้อย 36

3.4.1 พื้นที่ที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างแมลงและต้นอ้อยพืชอาศัย 36

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยจักจั่น 36

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอของต้นอ้อย 37

3.4.4 การตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายโดยวิธีการ Nested PCR 37

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 39

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 39

4.2 การศึกษาบทบาทของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 49

4.2.1 ทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล 49

4.2.2 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล 51

4.3 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 53

4.4 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และในต้นอ้อย 55

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 58

5.1 สรุปผลการทดลอง 58

5.2 ข้อเสนอแนะ 59

รายการอ้างอิง 61

หน้า

ภาคผนวก 67

ภาคผนวก ก 68

ภาคผนวก ก1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจาก อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น 68

ภาคผนวก ก2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจาก อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี 70

ภาคผนวก ก3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจาก อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 73

ภาคผนวก ข 75

ภาคผนวก ข1 จำนวนแมลงที่ตายในแต่ละวันเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน (ทดสอบครั้งที่ 1) 75

ภาคผนวก ข2 จำนวนแมลงที่ตายในแต่ละวันเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน (ทดสอบครั้งที่ 2) 75

ภาคผนวก ข3 จำนวนแมลงที่ตายในแต่ละวันเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน (ทดสอบครั้งที่ 3) 76

ภาคผนวก ข4 จำนวนไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียและไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย 76

ภาคผนวก ค 77

ภาคผนวก ค1 ผลการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ของระยะเวลา การเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 14 วัน 77

ภาคผนวก ค2 ผลการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ของระยะเวลา การเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 21 วัน 78

ประวัติผู้เขียน 79

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมาย 38

4.1 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ทั้ง 3 พื้นที่การศึกษา 40

4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเขาสวนกวางจังหวัดขอนแก่นกับฐานข้อมูล NCBI 42

4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอกุมภวาปีจังหวัดอุดรธานีกับฐานข้อมูล NCBI 44

4.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเมืองจังหวัดขอนแก่นกับฐานข้อมูล NCBI 45

4.5 จำนวนไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด 52

4.6 แสดงผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 14 วัน และบ่มเชื้อในต้นอ้อย 30 วัน 54

4.7 แสดงผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 21วัน และบ่มเชื้อในต้นอ้อย 30 วัน 54

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

2.1 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานีที่มีการระบาดของโรคใบขาว 7

2.2 ต้นอ้อยปกติ 8

2.3 ต้นอ้อยแสดงอาการของโรคใบขาว 9

2.4 เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 14

2.5 เพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Y. flavovittatus*) 14

3.1 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี 24

3.2 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น 25

3.3 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 25

3.4 เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อยโดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลงในช่วงเวลา 19.00-20.00 น. 26

3.5 การทำความสะอาดภายนอกตัวแมลงด้วยการแช่ในเอทานอล 75% และ 6% sodium hypochloride 27

3.6 ส่วนท้องของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 27

3.7 บดส่วนท้องของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 28

3.8 เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตบนอาหาร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง 28

3.9 แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และคัดเลือกเพื่อทดสอบการก่อให้เกิดโรคต่อแมลงพาหะ 31

3.10 หยดสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ร่วมกับแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml บนพาราฟิล์ม 31

3.11 นำหลอดไปติดที่ใต้ใบอ้อยเพื่อล่อให้แมลงดูดกินเชื้อแบคทีเรีย 32

3.12 จับคู่แมลงเพศผู้และเมียใส่กรงเลี้ยงแมลงที่มีต้นอ้อยอยู่กรงละ 1 คู่ 33

3.13 การตรวจนับไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) โดยนำทรายไปตรวจดูไข่แมลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 33

หน้า

4.1 แสดงสัดส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น 41
4.2 แสดงสัดส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี 43
4.3 แสดงสัดส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 45
4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดเป็นเวลา 7 วัน 51
4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบแบคทีเรีย 6 ชนิดในต้นอ้อย 56
4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบแบคทีเรีย 6 ชนิดในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) 57

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคใบขาวอ้อย (sugarcane white leaf disease) เป็นโรคที่มีความสำคัญสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในระบบการผลิตอ้อย และน้ำตาลปีละกว่า 1,000 ล้านบาท (Hanboonsong et al., 2002 ; กลุ่มพัฒนาสื่อส่งเสริมเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร, 2558) โดยสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไฟโตพาสมา โรคใบขาวอ้อยแพร่ระบาดได้ 2 ทางหลัก คือ การขนย้ายอ้อยที่เป็นโรคไปปลูกในพื้นที่อื่น และการแพร่กระจายโดยมีแมลงพาหะ 2 ชนิด คือ เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) (Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovitatus*) แมลงศัตรูที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อย และถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากต้นอ้อยที่เป็นโรคไปสู่ต้นอ้อยปกติ โดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล มีประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อได้ดีกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว คิดเป็น 55% และ 45% ตามลำดับ (วรรณภา, 2547; Hanboonsong et al., 2006) พบปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่นมาก ตั้งแต่ช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายน โดยปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิดนี้มีทิศทางตรงข้ามกัน หากมีปริมาณเพลี้ยจักจั่นหลังขาวมากขึ้นจะมีเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลลดน้อยลง (ยุพา, 2552) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ต้นอ้อย และผลผลิตอ้อยเป็นบริเวณกว้างโดยเฉพาะพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ส่งผลให้ผลผลิตของอ้อยลดลงมากกว่า 50% (แฉล้ม, 2551) การศึกษาของ Hanboonsong et al. (2002) ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ด้วยวิธีการ nested-PCR พบเชื้อไฟโตพลาสมาในทั้ง 3 ระยะ แสดงให้เห็นว่าเชื้อไฟโตพลาสมาสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นผ่านทางไข่ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไฟโตพลาสมาในประชากรแมลง แต่ในเพลี้ยจักจั่นหลังขาวยังไม่มีรายงานถึงความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากรุ่นสู่รุ่น นอกจากนี้ยังพบการแพร่ระบาดและความเสียหายของผลผลิตอ้อยจากเพลี้ยจักจั่นหลังขาวน้อยกว่าเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการป้องกัน เพื่อลดการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลแมลงพาหะนำโรค ซึ่งการป้องกันกำจัดแมลงแบบชีววิธีเป็นวิธีการที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมแมลง

แมลงมีเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัย (insect symbiosis) แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ จุลินทรีย์ร่วมอาศัยปฐมภูมิ (primary symbiont) เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรค อาศัยอยู่ในโครงสร้าง

เฉพาะที่เรียกว่า mycetome หรือ bacteriome อยู่บริเวณส่วนท้องของแมลง ส่วนใหญ่จัดเป็นแบคทีเรีย มีความสัมพันธ์เป็นแบบให้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกได้ แต่ไม่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงนอกตัวแมลงอาศัยได้ เช่น แบคทีเรีย *Buchnera aphidicola* ในเพลี้ยอ่อนมีบทบาทในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นให้กับเพลี้ยอ่อน แบคทีเรีย *Wigglesworthia glossinidia* อยู่ในโครงสร้างของ bacteriome ของแมลงวัน Tsetse ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์วิตามินบี (Douglas, 1989; Wernegreen, 2002) จุลินทรีย์ร่วมอาศัยประเภทนี้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของแมลง อีกประเภทหนึ่ง คือ จุลินทรีย์ร่วมอาศัยทุติยภูมิ (secondary symbiont) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ต่อมน้ำลาย ทางเดินอาหาร เลือด (hemolymph) และรังไข่ มีทั้งให้ประโยชน์ และโทษแก่แมลงอาศัย บางชนิดสามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ เช่น แบคทีเรีย *Enterobacter agglomerans* และ *Klebsiella oxytoca* ที่แยกจากทางเดินอาหารของแมลงวันผลไม้ (*Rhagoletis pomonella*) มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ให้สมบูรณ์ แบคทีเรียเหล่านี้มีหน้าที่สร้างแหล่งไนโตรเจนให้แก่แมลง โดยทำหน้าที่ย่อยสลายพิวรีน (purines) และอนุพันธ์ของพิวรีน (purine derivatives) ให้กลายเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญเพื่อให้แมลงนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Lauzon et al., 2000) แบคทีเรีย *Hamiltonella* ในแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศของแมลง (Su et al., 2013) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัย และการทดสอบการก่อให้เกิดโรคในแมลงศัตรูพืช แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแก่แมลงอาศัย มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวควบคุมแบบชีววิธี แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการควบคุมแมลงต้องไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียที่คัดแยกจากแมลงนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืชประเภทปากแบบเจาะดูด (piercing sucking) เช่น การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแมลงหวี่ขาว นำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับตัวอ่อน พบว่าแบคทีเรีย *Erwinia persicinus* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 52% (Ateyyat et al., 2009) แบคทีเรียที่คัดแยกจากเพลี้ยอ่อน (*Toxoptera aurantii*) 5 ชนิด ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับตัวอ่อน โดยให้ดูดกินแบคทีเรียเป็นเวลา 4 วัน พบว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescen* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 50% (Sevim et al., 2012) นอกจากนี้ แบคทีเรีย *Er. aphidicola* ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับเพลี้ยอ่อน (*Acyrthosiphon pisum*) หลังจากการทดสอบ พบว่า *Er. aphidicola* ทำให้เพลี้ยอ่อนมีอัตราการตาย 81-100% (Harada and Ishikawa, 1997) แบคทีเรีย *Serratia marcescens* ที่คัดแยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* เมื่อทดสอบการก่อให้เกิดโรคโดยพ่นแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 8×10^{8} cfu/ml พบว่าทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิดปีกสั้นมีค่า LC_{50} น้อยที่สุด คือ 1.53×10^{8} cfu/ml ชนิดปีกยาว 1.65×10^{9} cfu/ml และตัวอ่อนวัยที่สาม 1.86×10^{9} cfu/ml หลังจากได้รับเชื้อ 5 วัน เปอร์เซ็นต์การตาย

มากกว่า 50% (LT_{50}) โดยเพลี้ยกระโดดชนิดปีกสั้น ปีกยาว และตัวอ่อนวัยที่ 3 ใช้เวลา 4.5, 5.5 และ 5.7 วัน ตามลำดับ (Niu et al., 2016) ซึ่งนอกจากการก่อให้เกิดโรคแล้ว แบคทีเรียร่วมอาศัยยังมีบทบาทต่อการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคพืชของแมลงพาหะ โดยการทดลองของ Su et al. (2013) พบว่า เมื่อให้แมลงหวี่ขาวที่มีและไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *Hamiltonella* ดูดรับเชื้อไวรัส TYLCV จากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคใบหงิกเหลือง เมื่อตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสในแมลงหวี่ขาวที่มี *Hamiltonella* มากกว่าในตัวที่ไม่มี *Hamiltonella* ระยะการบ่มเชื้อไวรัสในตัวแมลง พบว่าแมลงตัวที่มีเชื้อ *Hamiltonella* มีปริมาณของเชื้อไวรัส TYLCV สูงกว่าในตัวที่ไม่มี *Hamiltonella* โดยการตรวจสอบด้วย q-PCR และในระยะการถ่ายทอดเชื้อ พบว่าต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อจากแมลงหวี่ขาวที่มี *Hamiltonella* มีปริมาณเชื้อไวรัสสูงกว่าในต้นที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อจากแมลงที่ไม่มี *Hamiltonella* ดังนั้นจากการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่าแบคทีเรีย *Hamiltonella* มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศของแมลงหวี่ขาว

ในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ได้มีรายงานการศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภท primary symbiont คือ Bacteria Associated with *M. hiroglyphicus* (BAMH) พบอยู่ในส่วนของ bacteriome เป็นชนิดที่พบมากในประชากรของแมลงในธรรมชาติพบทุกระยะการเจริญ ตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อน ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้มีความจำเพาะ และมีบทบาทสำคัญกับแมลงพาหะชนิดนี้ (Wangkeeree et al., 2012) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิหรือแบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเลี้ยงได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิที่คัดแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ เพื่อคัดเลือกนำไปศึกษาบทบาทต่อแมลง และผลของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ อาจเป็นแนวทางในการนำเชื้อแบคทีเรียไปใช้ในการควบคุมเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พาหะนำโรคใบขาวอ้อย ด้วยวิธีการแยกออกมาเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA

2. เพื่อศึกษาบทบาทของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิที่คัดเลือกต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พาหะนำโรคใบขาวอ้อย

3. เพื่อศึกษาบทบาทของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิที่คัดเลือกต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

4. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และในต้นอ้อยพืชอาหาร

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยทุติยภูมิในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล แมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย ด้วยวิธีการแยกออกมาเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิต่อแมลงพาหะ โดยคัดเลือกชนิดแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ นำไปการทดสอบการก่อให้เกิดโรค ให้แมลงดูดกินเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml บันทึกการตายนาน 7 วัน และให้แมลงดูดกินเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^8$ cell/ml บันทึกอัตราการวางไข่ของแมลงตลอดชั่วอายุ ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของแมลงพาหะ โดยให้แมลงดูดกินเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^8$ cell/ml ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาจากต้นอ้อยที่เป็นโรค จากนั้นถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปสู่ต้นอ้อยปกติ ต้นอ้อยที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา นำมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่คัดเลือกในประชากรแมลงพาหะ และในต้นอ้อย ด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยทุติยภูมิของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) แมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย ที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้

2. ทราบผลของแบคทีเรียทุติยภูมิที่คัดเลือกต่อแมลงพาหะ ในการก่อให้เกิดโรคและผลต่ออัตราการวางไข่

3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียทุติยภูมิกับประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ

4. ทราบการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในแมลงพาหะและต้นอ้อยพืชอาศัย

5. แนวทางการใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการควบคุมแมลงพาหะแบบชีววิธี

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของอ้อยและความเสียหายจากโรคใบขาว

อ้อย (Sugarcane : *Saccharum officinarum*) เป็นพืชตระกูลหญ้าวงศ์ Poaceae ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและอุตสาหกรรมการผลิตอื่นๆ เช่น การผลิตเอทานอล เป็นต้น ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผู้ปลูกอ้อยและส่งออกน้ำตาลทรายเป็นอันดับต้นๆ ของโลก มูลค่าการจำหน่ายน้ำตาลทรายทั้งในประเทศและส่งออกได้ปีละ 180,000 ล้านบาท ล่าสุดในปี 2558 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกน้ำตาลทรายกว่า 5 หมื่นล้านบาท โดยปีการผลิต 2557/58 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกอ้อยทั้งหมด 105.3 ล้านไร่ โดยมีพื้นที่เพิ่มขึ้นจากปีการผลิต 2556/57 จำนวน 455,784 ไร่ คิดเป็น 4.52% ซึ่งมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากที่สุดอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 4.56 ล้านไร่ ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออก เป็น 2.99, 2.41 และ 0.58 ล้านไร่ ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบพื้นที่ปลูกอ้อยในปี 2549/50-2557/58 พบว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกอ้อยเพิ่มขึ้นสูงกว่าภาคอื่นจาก 2.66 เป็น 4.56 ล้านไร่ คิดเป็น 41.66% ประสิทธิภาพการผลิตอ้อยและน้ำตาลทรายในประเทศไทยประจำปีการผลิต 2557/58 อยู่ที่ 11.30 ล้านตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2558) แม้ว่าประเทศไทยจะมีพื้นที่ปลูกอ้อยและผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น แต่ยังพบว่ามีรายงานการเกิดโรคใบขาวอ้อยที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของอ้อยบางพื้นที่ โดยเฉพาะพื้นที่ปลูกอ้อยภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการปลูกอ้อยมากที่สุดและพบการระบาดของโรคใบขาวอ้อย ส่งผลกระทบทำให้ผลผลิตอ้อยลดลง

ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคใบขาวอ้อยอย่างรุนแรงครั้งแรกตั้งแต่ปี 2495 พบในอ้อยพันธุ์ NCo. 421 ที่จังหวัดลำปางและระบาดไปยังพื้นที่ปลูกอ้อยทุกภาคส่งผลให้ผลผลิตอ้อยได้รับความเสียหาย 30-100% ต่อมาในปี 2532 พบการระบาดที่จังหวัดอุดรธานีและมีพื้นที่ได้รับเสียหาย 50,000 ไร่ (แฉล้ม, 2551) มูลค่าความเสียหายกว่า 225 ล้านบาท (อนุสรณ์, 2534) ในปี 2543 พบการระบาดของโรคที่รุนแรงเพิ่มขึ้นในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกและภาคตะวันตก ทำให้เกิดความเสียหายเป็นบริเวณกว้างมากกว่า 200,000 ไร่ มูลค่าความเสียหายของผลผลิตมากกว่า 700 ล้านบาท โดยในพื้นที่จังหวัดขอนแก่นมีพื้นที่การระบาดของโรคใบขาวเป็นบริเวณกว้าง 6 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเวียงเก่า อำเภอเมือง อำเภอหนองนาคำ อำเภอโนนศิลา อำเภอเขาสวนกวาง และอำเภอน้ำพอง ถูกประกาศให้เป็นเขตภัยพิบัติโรคใบขาวอ้อย ซึ่งมีพื้นที่ได้รับความเสียหายประมาณ 70,000 ไร่ จากพื้นที่ทั้งหมดกว่า 600,000 ไร่ และในช่วงเวลาเดียวกันก็พบว่า

มีการลุกลามของโรคใบขาวไปยังพื้นที่ภาคกลางบางส่วน ในปี 2551 พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นก็ยังพบการระบาดของโรคใบขาวอยู่เป็นจำนวนมาก และพบว่ามีการระบาดของโรคไปยังพื้นที่จังหวัดมหาสารคามจังหวัดใกล้เคียง พื้นที่พบการระบาดราว 30,000 ไร่ จากพื้นที่ปลูกอ้อยกว่า 100,000 ไร่ มูลค่าความเสียหายกว่า 14 ล้านบาท และมีรายงานว่า 3 จังหวัดที่พบการระบาดของโรคใบขาวเป็นบริเวณกว้าง ได้แก่ อุดรธานี ขอนแก่น และมหาสารคาม คิดเป็น 1.06% ของพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด (ภาพที่ 2.1) ทำให้ผลผลิตได้รับความเสียหายลดลงมากกว่า 50% (แฉล้ม, 2551) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคใบขาวอ้อยในต่างประเทศเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไต้หวัน พบการระบาดครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2501 มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงที่เมืองไทซานและเกาสู และแพร่ระบาดลุกลามไปยังจังหวัดใกล้เคียง และพื้นที่อื่นๆ ทั่วประเทศ จนมีการเลิกปลูกอ้อยในประเทศไต้หวัน ในประเทศบังคลาเทศก็พบว่าโรคใบขาวอ้อยส่งผลกระทบให้เกิดความเสียในอ้อยปลูก 20% และ 100% ในอ้อยตอ มีรายงานการพบโรคใบขาวในประเทศญี่ปุ่นเช่นกันแต่ไม่มีความรุนแรง ในปัจจุบันก็ยังพบการระบาดของโรคใบขาวทั้งในประเทศอินเดีย พม่า ศรีลังกา ซูดาน และไทย

ภาพที่ 2.1 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานีที่มีการระบาดของโรคใบขาว

โรคใบขาวอ้อย (sugarcane white leaf disease) เป็นโรคที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นเชื้อสาเหตุ โดยเชื้อไฟโตพลาสมาจะอาศัยอยู่ในท่อลำเลียงอาหาร (phloem) โดยทั่วไปต้นอ้อยปกติใบจะมีสีเขียวเข้ม ลำต้นสูง ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2.2) ส่วนต้นอ้อยที่เป็นโรคจะแสดงลักษณะอาการ

โดยลำต้นจะมีขนาดเล็กกว่าต้นอ้อยปกติ หากเกิดโรคอย่างรุนแรงจะแสดงอาการแตกตาข้าง และมีหน่อมากกว่าปกติ ส่วนของใบจะมีขนาดเล็ก สั้นกว่าปกติ ใบแคบ และแตกเป็นฝอย เกิดเป็นสีขาวทั้งใบหรือมีสีเขียวปนขาว เนื่องจากคลอโรฟิลล์ภายในใบถูกทำลาย โรคใบขาวอ้อยพบได้ตั้งแต่ระยะงอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ส่วนมากอ้อยตอ หรืออ้อยที่งอกจากท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบขาวอย่างรุนแรงมากกว่าอ้อยปลูก โดยแสดงอาการให้เห็นชัดเจน เป็นใบแคบ สีขาว ใบมีขนาดเล็ก ต้นแคระแกร็น (ภาพที่ 2.3) ตั้งแต่เริ่มงอกจากท่อนพันธุ์ (ยุพา, 2547) อ้อยบางกออาจมีอาการแฝงของโรค คือ มีการติดเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ไม่แสดงอาการเป็นใบขาวออกมา ใบมีสีเขียวปกติ การเจริญเติบโตของต้นอ้อยอาการแฝงเหมือนกับต้นอ้อยปกติทุกประการ แต่เมื่อตรวจดูอย่างละเอียดจะพบว่าต้นอ้อยมีอาการเป็นโรคอยู่บริเวณรอบในของต้นอ้อย หน่ออ้อยที่จะแตกออกมาใหม่จากตาของลำต้นเดิม มักจะเกิดเป็นอ้อยแสดงอาการของโรคใบขาวออกมา ความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายปัจจัย ได้แก่ อายุอ้อย พันธุ์อ้อย ความแข็งแรงของต้นอ้อย คุณภาพของท่อนพันธุ์ที่นำปลูก ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อย และสภาพภูมิอากาศภายในแปลงปลูก (พรทิพย์, 2542)

ภาพที่ 2.2 ต้นอ้อยปกติ

ภาพที่ 2.3 ต้นอ้อยแสดงอาการของโรคใบขาว

การแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในพื้นที่ใกล้เคียง และแพร่ระบาดไปทั่วภูมิภาคของประเทศไทยนั้น เกิดขึ้นจากการนำท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคใบขาวไปปลูกในพื้นที่อื่น เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่อาศัยอยู่ในส่วนท่อลำเลียงของลำต้นอ้อย เมื่อนำไปปลูกต่อเชื้อไฟโตลาสมาที่อาศัยอยู่ในลำต้นเดิมจะแสดงอาการให้เห็นเมื่อตาข้างของท่อนพันธุ์เดิมงอกออกมา บางท่อนพันธุ์อาจไม่แสดงอาการของโรคใบขาวออกมา เปรียบเสมือนว่าต้นอ้อยเป็นปกติ ไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งเป็นอาการแฝงของโรค เมื่อเกษตรกรนำไปเป็นท่อนพันธุ์เพื่อปลูกขยายพันธุ์ จึงทำให้โรคใบขาวอ้อยแพร่ระบาดเป็นพื้นที่บริเวณกว้างได้อย่างรวดเร็ว (พรทิพย์, 2542) ส่วนการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยอีกทางหนึ่ง คือ การแพร่ระบาดจากแมลงพาหะ ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น 2 ชนิด คือ เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Y. flavovittatus*) เป็นแมลงศัตรูที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อย และสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย จากต้นอ้อยที่เป็นโรคไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ พบปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่นมาก ตั้งแต่ช่วงเดือนเมษายนจนถึงเดือนกันยายน โดยพบมากในช่วงฤดูฝน เนื่องจากความชื้นอากาศสูง ต้นอ้อยเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์ของเพลี้ยจักจั่น (ยุพา, 2552)

2.2 เชื้อไฟโตพลาสมาและแมลงพาหะนำโรค

2.2.1 การจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมา

เชื้อไฟโตพลาสมาจัดอยู่ Class Mollicutes อยู่ใน Order Mycoplasmatales ประกอบด้วย 4 divisions โดยจำแนกจากพื้นฐานขององค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของ cell envelopes ได้แก่

divisions I Gracilicutes ย้อมติดสีแกรมลบ cell envelopes ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ผิวชั้นนอก ผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ผิวชั้นในเป็นไขมันชนิด fatty acid-glycerol ester type lipids

division II Firmicutes ย้อมติดสีแกรมบวก มีผนัง peptidoglycan หนา มีเยื่อหุ้มเซลล์ผิวชั้นใน ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ผิวชั้นนอก เซลล์อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือแตกกิ่งก้าน

division III Tenericutes ไม่มีผนังเซลล์มีแต่เยื่อหุ้มเซลล์ และมีรูปร่างไม่แน่นอน

division IV Mendosicutes มี cell envelopes ที่ไม่ใช่สาร peptidoglycan ผนังเซลล์ประกอบด้วยโปรตีน หรือน้ำตาลหลายชนิด เมื่อย้อมสีอาจเป็นแกรมบวกหรือแกรมลบ เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมันชนิด ester-linked polyisoprenoid branch-chain lipids

การจัดจำแนกกลุ่มของไฟโตพลาสมา ใช้คุณสมบัติทางชีววิทยา เช่น ลักษณะอาการ และพืชอาศัย จัดกลุ่มตามอาการของโรคได้เป็น 4 กลุ่ม คือ อาการเหลือง อาการทรุดโทรม อาการแตกพุ่ม และอาการดอกเขียว อย่างไรก็ตามเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นเชื้อที่ยังไม่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงนอกต้นพืชอาศัยได้ การจัดแบ่งกลุ่มเชื้อจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจสอบ คุณสมบัติในระดับชีวโมเลกุลเป็นหลัก ได้แก่ ขนาดจีโนม สัดส่วนของ guanine และ cytosine (G+C content) ของจีโนม ความคล้ายคลึงกันของส่วนประกอบดีเอ็นเอ คุณสมบัติทางเซรัมวิทยา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ เช่น ยีน 16S rRNA, ยีน 23S rRNA, 16S/23S spacer regions, ยีน ribosomal protein, ยีน transcription factor Tu, ยีน protein translation เป็นต้น (สุภาพร, 2552)

2.2.2 ลักษณะรูปร่างของเชื้อไฟโตพลาสมา

เชื้อไฟโตพลาสมา เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียมีขนาดเล็ก เป็นเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ และองค์ประกอบภายในเซลล์ แต่ไม่มีผนังเซลล์ จึงทำให้เซลล์มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน สารพันธุกรรมมีขนาด 600-1000 กิโลเบส มีลักษณะกลมจนถึงรี ขนาด 80-800 นาโนเมตร มีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ และการแบ่งตัวไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารสังเคราะห์

(พรทิพย์, 2542) ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมามีการดำรงชีวิตแบบปรสิต (obligate parasites) ต้องอาศัยอยู่ภายในสิ่งมีชีวิตอื่น แหล่งอาศัยที่พบ ได้แก่ พืช และแมลง

2.2.3 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา

สำหรับการอาศัยอยู่ในต้นพืชของเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าอาศัยอยู่ในท่อลำเลียงอาหารของต้นพืช (Garnier et al., 2001) และก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย การเคลื่อนที่ของเชื้อในต้นพืชเคลื่อนที่โดยอาศัยการไหลเวียนของของเหลวในท่ออาหาร พืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาจะแสดงอาการหลายอย่าง เช่น การเกิดดอกเป็นสีเขียว ดอกเป็นหมัน แตกพุ่ม ปล้องยืดยาวผิดปกติ และอาการแคระแกร็น (Bertaccini and Duduk, 2009) เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะในวงศ์ Cicadellidae (เพลี้ยจักจั่น), Cixidae (เพลี้ยกระโดด), Psyllidae (เพลี้ยไก่ฟ้า), Delphacidae (เพลี้ยกระโดด) และ Derbidae (เพลี้ยกระโดด) (Weintraub and Beanland, 2006) พบการเกิดโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชหลายชนิด เช่น โรค Citrus huanglongbing (HLB) หรือโรคยอดเหลืองในพืชตระกูลส้ม ทำให้ใบพืชมีสีส้มเหลือง พบการระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศจีน อาการแตกพุ่มของถั่วมะแฮะ (pigeon pea) ในประเทศบราซิล (Chen et al., 2009) โรคพุ่มไม้กวาดของมะม่วง ลักษณะอาการแตกยอดเป็นกระจุก ใบเป็นฝอย ถ่ายทอดเชื้อได้โดยวิธีการเสียบกิ่ง แต่ยังไม่มีรายงานถึงการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะ (พิสุทธิ์, 2553) เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคเหลืองขององุ่น โดยมีแมลง *Scaphoideus titanus* เป็นพาหะนำโรค (Alma et al., 1997) โรคแคระแกร็นของต้นหม่อน (Mulberry dwarf) แมลงพาหะ คือ *Hishimonoides sellatiformis* (Kawakita et al., 2000) โรคแตกพุ่มฝอยของงา (Seaame phyllody) ในหลายประเทศของทวีปเอเชียและแอฟริกา เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยจักจั่น *Orocius albicinetus*, *O. cillulosus* และ *Neoaliturus baematoceps* (สุภาพร, 2552) ซึ่งโรคใบขาวอ้อยโดยมีเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Y. flavovittatus*) เป็นแมลงพาหะ (Hanboonsong et al., 2002)

2.2.4 รูปแบบการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา

1. การถ่ายทอดภายในต้นพืชเชื้อติดไปกับท่อนพันธุ์ เชื้อไฟโตพลาสมาแพร่กระจายไปตามท่ออาหารทั่วต้น การใช้ท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อในการขยายพันธุ์จึงทำให้โรคแพร่ระบาดได้อย่างกว้างขวาง

2. การติดตาต่อกิ่ง การนำตาหรือกิ่งที่มีเชื้อไฟโตพลาสมามาต่อเข้ากับต้นปกติ เมื่อเกิดเนื้อเยื่อเชื่อมต่อ เนื้อเยื่อนี้จะช่วยถ่ายทอดเชื้อไปยังต้นปกติ

3. การถ่ายทอดระหว่างต้นพืช เป็นการถ่ายทอดโดยฝอยทอง ฝอยทองหลายชนิดสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ แต่มักนำมาใช้ในการถ่ายทอดโรคในห้องปฏิบัติการ โดยถ่ายทอดโรคระหว่างพืชต่างชนิดกันที่ไม่สามารถถ่ายททอดได้ด้วยวิธีการติดตาต่อกิ่ง

4. การถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ แมลงที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาจะสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ตลอดชีวิต แมลงพาหะจึงสำคัญที่สุดในการแพร่ระบาดของโรค (สุภาพร, 2552)

โดยกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ เริ่มต้นจากการได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาในขณะที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากท่ออาหารของพืช ช่วงเวลาที่ดูดกินน้ำเลี้ยงแมลงจะได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาเข้ามา เรียกว่า ระยะเวลาในการดูดรับการเชื้อ (Acquisition Access Period; AAP) อาจใช้เวลาเป็นนาทีหรือชั่วโมง โอกาสได้รับเชื้อปริมาณมากขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการรับและปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่อยู่ในต้นพืช หลังจากที่ได้รับเชื้อแล้ว เชื้อไฟโตพลาสมาจะมีการเพิ่มปริมาณในตัวแมลง จนมีปริมาณมากพอที่จะถูกถ่ายทอดจากตัวแมลงไปสู่ต้นพืช และก่อให้เกิดโรคได้ เรียกว่า ระยะบ่มเชื้อ (Latent Period; LP) ในระยะนี้เชื้อไฟโตพลาสมาจะมีการเคลื่อนย้าย และจำลองตัวเองในอวัยวะของแมลงพาหะ โดยเชื้อจะผ่านเข้าไปในชั้นเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้และจำลองตัวเองภายใน vesicle และเคลื่อนย้ายเข้าสู่ระบบเลือด (haemolymph) จากนั้นจะเข้าสู่เนื้อเยื่ออื่น เช่น อวัยวะขับถ่าย (malpighian tube) ไขมันและสมอง แล้วจึงวนกลับเข้าสู่ระบบเลือดและต่อมน้ำลาย (salivary glands) ระยะเวลาในการบ่มเชื้อขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ อาจระยะเวลาเพียงนาที หรือจนถึง 80 วัน เชื้อไฟโตพลาสมาจะมีการสะสมในต่อมน้ำลายปริมาณมาก และถ่ายทอดออกไปสู่ต้นพืชจากดูดกินน้ำเลี้ยงบนพืชต้นอื่น (Weintraub and Beanland, 2006) หลังจากที่ต้นพืชได้รับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงพาหะ เชื้อไฟโตพลาสมาจะอยู่อาศัย และเพิ่มปริมาณภายในเซลล์พืชจนต้นพืชแสดงอาการอ่อนแอออกมา เรียกว่า ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (Inoculation Access Period; IAP) โดยต้นพืชจะแสดงอาการอ่อนแอ หรือเป็นโรคช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่พืชได้รับ

2.2.5 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีเบื้องต้น

1. การวินิจฉัยจากลักษณะอาการ เชื้อไฟโตพลาสมาทำให้พืชที่เป็นโรคแสดงอาการค่อนข้างจำเพาะเจาะจง คือ อาการพุ่มแจ้ อาการแตกพุ่มฝอย อาการดอกเขียว และอาการใบขาว ดังนั้นการวินิจฉัยเบื้องต้นทำได้โดยการถ่ายทอดโรคไปยังพืชปกติโดยการติดตา ทาบกิ่ง หรือใช้ฝอยทองในการถ่ายทอดโรค

2. ทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะโดยใช้สารในกลุ่มเตตรซัยคลิน เพื่อยับยั้งการเจริญของไฟโตพลาสมา ทำได้โดยการฉีดสารละลายเตตราซัยคลิน แช่กิ่งหรือ

รากเพื่อให้สารละลายเข้าไปในต้นพืชที่คาดว่าเป็นโรค และนำไปปลูก สังเกตการเจริญเติบโตและอาการของโรค

3. การตรวจเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาเจริญและอาศัยอยู่เฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช จึงสามารถตรวจหาเชื้อภายในเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ประเภทต่างๆ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบ dark-field กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

4. การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ การแยกสกัดดีเอ็นเอและตรวจดูแถบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา

5. การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชเป็นโรคมาทำปฏิกิริยาในหลอดทดลอง โดยปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ Denaturation, Annealing และ Extention เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดจะได้ดีเอ็นเอปริมาณมาก นำตรวจดูด้วยเทคนิค gel electrophoresis (สุภาพร, 2552)

2.3 เพลี้ยจักจั่นแมลงพาหะนำโรคใบขาว

เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) จัดอยู่ในอันดับ Hemiptera วงศ์ Cicadellidae เป็นแมลงพาหะนำเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาว (ภาพที่ 2.4) สามารถพบเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้ได้ตามพื้นที่ปลูกอ้อย (ชุตินันท์, 2541) ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นอ้อยเป็นอาหาร วางไข่ภายในดิน ซึ่งดินที่ค่อนข้างเป็นดินทรายมีความชื้นในดินประมาณ 10% และอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่น วงจรชีวิตของเพลี้ยจักจั่นที่ได้มีการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่า ระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยจักจั่นเริ่มจากระยะการเป็นไข่ฟักเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 ใช้เวลาประมาณ 7-8 วัน และเจริญจากตัวอ่อนวัยที่ 1 เป็นตัวอ่อนวัย 2 ใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน จากตัวอ่อนวัยที่ 2 เป็นวัยที่ 3 ใช้เวลาประมาณ 3 วัน จากตัวอ่อนวัยที่ 3 เป็นวัยที่ 4 ใช้เวลาประมาณ 3 วัน จากตัวอ่อนวัยที่ 4 เป็นตัวอ่อนวัยที่ 5 ใช้เวลาประมาณ 3 วัน จากตัวอ่อนวัยที่ 5 เจริญเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน ซึ่งพร้อมที่จะผสมพันธุ์ และวางไข่ต่อไปได้ โดยเพลี้ยจักจั่นเพศผู้มีวงจรชีวิต 40.9 วัน และเพศเมีย 43.8 วัน ในสภาพแปลงอ้อยปกติ พบว่าเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้สามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี แต่ไม่ได้มีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นตลอดไป เนื่องจากมีปัจจัยสภาพแวดล้อมเป็นตัวควบคุมการเพิ่มปริมาณของแมลง (ยุพา, 2552)

ภาพที่ 2.4 เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

ภาพที่ 2.5 เพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Y. flavovittatus*)

เพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Y. flavovittatus*) (ภาพที่ 2.5) จัดอยู่ในอันดับและวงศ์เดียวกันกับเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) จากการศึกษาวงจรชีวิตภายในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีระยะไข่ 7-9 วัน ระยะตัวอ่อนมี 5 วัย มีระยะเวลา 15-17 วัน ตัวอ่อนในระยะแรกมีสีขาวเหลืองและมีจุดสีดำ 4 จุด ที่ด้านบนของปล้องท้อง ตัวอ่อนวัยสุดท้ายลำตัวด้านบนสันหลังมีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่ว ระยะตัวเต็มวัยมีอายุ 35-45 วัน (ยุพา, 2552)

การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเพลี้ยจั่นสีน้ำตาล และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว เมื่อแมลงดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นอ้อยที่เป็นโรค เชื้อไฟโตพลาสมาจะผ่านเข้าไปในทางเดินอาหาร และเพิ่มจำนวนในอวัยวะต่างๆ ของแมลง จากนั้นก็จะเคลื่อนเข้าสู่ลำไส้ และช่องว่างภายในตัว แล้ววนกลับเข้าสู่ลำไส้เลือด และต่อมน้ำลาย เมื่อแมลงเจาะดูดน้ำเลี้ยงของต้นพืชอีกครั้ง ทำให้เชื้อไฟโตพลาสมาที่อยู่บริเวณต่อมน้ำลายออกสู่ต้นพืช เชื้อไฟโตพลาสมามีระยะเวลาในการบ่มเชื้ออยู่ภายในตัวแมลง 3-4 สัปดาห์ แมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสามารถถ่ายทอดเชื้อได้จนกระทั่งตาย ในการศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยวิธีกล จากต้นอ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติของแมลงพาหะทั้ง 2 ชนิด พบว่า เพลี้ยจั่นสีน้ำตาลใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ในการดูดรับเชื้อ และถ่ายทอดไปยังต้นปกติได้ 10-55% ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาว ใช้เวลาในการดูดรับเชื้ออย่างน้อย 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ในการถ่ายทอด 5-45% แสดงให้เห็นว่าเพลี้ยจั่นสีน้ำตาลมีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (ยุพาและคณะ, 2547)

2.4 จุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลง

จุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลง คือ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในตัวแมลง และมีบทบาทต่อแมลงอาศัย แบ่งเป็น 2 ประเภท ตามตำแหน่งที่อยู่อาศัย ได้แก่ จุลินทรีย์ร่วมอาศัยปฐมภูมิ (primary symbiont) ตำแหน่งที่อยู่อาศัย คือ ส่วนที่เรียกว่า bacteriome มีลักษณะเป็นวงรีสีเหลือง อยู่บริเวณส่วนท้องของแมลง จุลินทรีย์ประเภทนี้มีบทบาทสำคัญต่อแมลงโดยการสังเคราะห์สารอาหารบางอย่างให้กับแมลงใช้ในการดำรงชีวิต เจริญเติบโต และขยายพันธุ์ ซึ่งสารอาหารเหล่านั้นแมลงไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคกับแมลง ไม่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *B. aphidicola* ที่อาศัยอยู่ในเพลี้ยอ่อนมีบทบาทในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นให้กับเพลี้ยอ่อน แบคทีเรีย *W. glossinidia* มีบทบาทในการสังเคราะห์วิตามินบีให้กับแมลงวัน Tsetse (Douglas, 1989; Wernegreen, 2002) แบคทีเรีย *Portiera aleyrodidarum* มีบทบาทสังเคราะห์กรดอะมิโนให้กับแมลงหวี่ขาว (Jiang et al., 2012) และพบแบคทีเรีย BAMH

(Bacteria Associated with *M. hiroglyphicus*) ในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) โดยพบอยู่ในส่วนของ bacteriome ทุกระยะการเจริญเติบโต สามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้ มีความจำเพาะ และมีบทบาทสำคัญกับแมลงพาหะชนิดนี้ (Wangkeeree et al., 2012) แบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* มีบทบาทสังเคราะห์กรดอะมิโนให้กับเพลี้ยจักจั่น *Homalodisca coagulate* (Wu et al., 2006)

ส่วนอีกประเภทหนึ่ง คือ จุลินทรีย์ร่วมอาศัยทุติยภูมิ (secondary symbiont) ตำแหน่งที่อยู่อาศัย คือ เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ต่อมน้ำลาย ทางเดินอาหาร เลือด (hemolymph) และรังไข่ จุลินทรีย์ประเภทนี้มีบทบาททั้งที่ให้ประโยชน์และโทษแก่แมลงอาศัย บางชนิดสามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกได้ แบคทีเรียที่ให้ประโยชน์แก่แมลงอาศัย ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *E. agglomerans* และ *K. oxytoca* มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ (*R. pomonella*) ให้สมบูรณ์ สร้างแหล่งไนโตรเจนให้แก่แมลง โดยทำหน้าที่ย่อยสลายพิวรีน (purines) และอนุพันธ์ของพิวรีน (purine derivatives) ให้กลายเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญเพื่อให้แมลงนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Lauzon et al., 2000) แบคทีเรีย *Hamiltonella* มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศโดยแมลงหวี่ขาว (Su et al., 2013)

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากแมลง

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากแมลงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของแมลงศัตรู การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากแมลงชนิดต่างกันอาจมี วิธีการ ระยะเวลาในการทำความสะอาดแมลง หรืออาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพืชอาหารและสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแมลงปากแบบเจาะดูด เช่น เพาะเลี้ยงแบคทีเรียจาก เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*N. lugens*) โดยการทำความสะอาดแมลงด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บดตัวแมลงให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เจือจางให้มีความเข้มข้น 30-300 cfu/ml 100 µl plate บน LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงในที่มืด ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแมลงที่เป็นโรค ชนิดของแบคทีเรียที่พบคือ *S. marcescens* (Niu et al., 2016) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแมลงหวี่ขาว (*B. argentifolii*) โดยการทำความสะอาดแมลงด้วย ethanol และ chlorine ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มใน liquid nutrient broth-yeast extract-salts medium หรือ brain heart infusion broth หรือบดใน 0.9% saline และเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar, brain heart infusion agar, tryptose agar, luria agar, purple agar และ

chocolate agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วย MIDI แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากแมลงหวี่ขาวทั้งในตัวอ่อนและตัวเต็มวัยมีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรีย ชนิดที่พบในตัวอ่อน ได้แก่ *Bacillus* sp., *Sporosarcina* sp., *Staphylococcus epidermidis, S. aureus, Agromonas* sp., *B. licheniformis* และ *Cellulomonas turbata* แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากตัวเต็มวัย ได้แก่ *B. amyloliquefasciens, B. licheniformis, B. megaterium, Bacillus* spp., *Chryseomonas luteola, Acinetobacter lwoffsii, Citrobacter* sp., *Flavomonas oryzihabitans, A. baumanii* และ *E. cloacae* (Davidson et al., 2000) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากเพลี้ยอ่อน (*T. aurantii*) ทำความสะอาดแมลงด้วยเอทานอล 70% 3 ครั้ง บดตัวอ่อนในอาหาร NB ด้วยแก้วบดเนื้อเยื่อ วิธีการแยก 2 วิธี คือ เจือจางสารละลายตัวอ่อนจาก 10^{-1} ให้เป็น 10^{-5} เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน หรือเจือจางสารละลายตัวอ่อนโดยใช้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน จำแนกชนิดของแบคทีเรียทางลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และจำแนกทางชีวโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรีย *B. tequilensis, Chryseobacterium stagni, P. flourescens, Rahnella aquatilis* และ *Staphylococcus* sp. (Sevim et al., 2012)

นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแมลงชนิดอื่น เช่น การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากมดคันไฟ (*Solenopsis invicta*) โดยทำความสะอาดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อด้วยเอทานอล 70% และจุ่มใน 15% bleach solution ล้างด้วยน้ำกลั่น บดทางเดินอาหารและเจือจาง 1,000-10,000 เท่า เลี้ยงบนอาหาร BHI และ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หรือบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แบคทีเรียที่จำแนกได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Bacilli 4 ไอโซเลท ได้แก่ *Enterococcus* sp., *Lactococcus garvieae, B. pumilus* และ *Listeria* sp. ส่วนในกลุ่ม Proteobacteria 4 ไอโซเลท ได้แก่ *Enterococcus* sp., *Kluyvera cryocrescens, P. aeruginosa* และ *S. marcescens* (Li et al., 2005) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากหนอนด้วง (*Cyclocephala signaticollis*) ทำความสะอาดตัวอ่อนใน 0.1% sodium hypochlorite นาน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง สกัดเลือด เจือจางและเทบนอาหาร NA หรือในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จำแนกชนิดโคโลนีของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S ribosomal RNA (rRNA) พบว่าจำแนกได้เป็นแบคทีเรีย 9 ชนิด ได้แก่ *Microbacterium* sp., *Ochrobactrum* sp., *Chryseobacterium* sp., *B. thuringiensis, B. cereus, Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., และ *Bacillus* sp. (Consolo et al., 2010)

2.6 แนวทางการใช้จุลินทรีย์ร่วมอาศัยในการควบคุมแมลง

เชื้อแบคทีเรียที่ให้โทษแก่แมลงอาศัย เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ซึ่งชนิดของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการควบคุมแมลงนั้นจะต้องเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างการใช้แบคทีเรียที่แยกจากตัวแมลงนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืชที่เป็นแมลงปากแบบเจาะดูด เช่น การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแมลงหวี่ขาว สามารถคัดแยกได้ 11 ชนิด ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาว โดยให้ตัวอ่อนดูดกินแบคทีเรียที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml เป็นเวลานาน 5 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 17-52% ได้แก่ *E. persicinus* (52%), *E. acetylicum* (43%), *B. pumilus* (40%), *E. undae* (33%), *S. gallinarum* (28%), *B. subtilis* (28%), *Micrococcus caseolyticus* (25%), *Brevibacterium casei* (20%), *B. licheniformis* (18%), *P. putida* และ *P. plecoglossicida* (17%) ซึ่ง *E. persicinus* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตายสูงสุด 52% (Ateyyat et al., 2009) แบคทีเรียที่คัดแยกจากเพลี้ยอ่อน (*T. aurantii*) ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับตัวอ่อนโดยให้ดูดกินแบคทีเรีย เป็นเวลานาน 4 วัน พบว่าเชื้อ *P. fluorescen* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 50%, *Rahnella aquatilis* (20%), *B. tequilensis* และ *Staphylococcus* sp. (10%), *Chryseobacterium stagni* (8%) (Sevim et al., 2012) แบคทีเรีย *E. aphidicola* และ *Escherichia coli* ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับเพลี้ยอ่อน (*A. pisum*) ความเข้มข้นของแบคทีเรีย $1x10^5$ cfu/ml นาน 1 วัน พบว่า *E. aphidicola* ทำให้เพลี้ยอ่อนมีอัตราการตาย 81-100% แต่ *E. coli* ไม่ก่อให้เกิดโรคกับเพลี้ยอ่อน (Harada and Ishikawa, 1997) แบคทีเรีย *S. marcescens* ที่คัดแยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *N. lugens* เมื่อทดสอบการก่อให้เกิดโรคโดยฉีดพ่นแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 8×10^8 cfu/ml พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิดปีกสั้นมีค่า LC_{50} น้อยที่สุด คือ 1.53×10^8 cfu/ml ชนิดปีกยาว 1.65×10^9 cfu/ml และตัวอ่อนวัยที่ 3 1.86×10^9 cfu/ml หลังจากได้รับเชื้อ 5 วัน และมีเปอร์เซ็นต์การตายมากกว่า 50% (LT_{50}) โดยเพลี้ยกระโดดชนิดปีกสั้น ปีกยาว และตัวอ่อนวัย 3 ใช้เวลา 4.5, 5.5 และ 5.7 วัน ตามลำดับ (Niu et al., 2016)

การศึกษาการใช้แบคทีเรียในการควบคุมแมลงชนิดอื่นๆ เช่น แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากด้วงเจาะรากมันฝรั่ง (*Cyclocephala signaticollis*) คือ *B. thuringiensis* และ *Arthrobacter* sp. เมื่อนำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรค พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำให้ตัวหนอนมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง 100% และ 90% ตามลำดับ ภายหลังจากการให้ตัวหนอนได้รับเชื้อเพียง 4 วัน (Consolo et al., 2010) การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวหนอนของผีเสื้อเจาะผล (*Cydia pomonella*) พบว่าแยกแบคทีเรียออกมาได้ 8 ชนิดได้แก่ *Proteus rettgeri*, *Eschericia coli*, *P. stutzeri*, *P. aeroginosa*, *B. laterosporus*, *Micrococcus* sp., *P. vulgaris* และ *Deinococcus* sp.

เมื่อทดสอบการก่อให้เกิดโรคพบว่า *B. laterosporus* ทำให้ตัวหนอนของผีเสื้อเจาะผล มีอัตราการตายสูงที่สุด 65% ภายหลังจากได้รับเชื้อ 8 วัน ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่น ทำให้ตัวอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ที่ 17-60% (Erturk and Demirbag, 2006)

นอกจากนี้การค้นคว้าวิจัยในประเทศไทย ได้มีการนำแบคทีเรียบีที (*B. thuringiensis*) เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและสามารถนำเชื้อที่แยกได้มาใช้ประโยชน์ โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดที่ต้องการ ทั้งในห้องปฏิบัติการ สภาพเรือนปลูกทดลอง และสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร แบคทีเรียบีทีมีการสร้างสปอร์จึงสามารถขยายพันธุ์ และเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมได้อย่างต่อเนื่อง หากมีสภาพเหมาะสมแบคทีเรียบีทีจะเจริญเติบโต และสร้างผลึกโปรตีนซึ่งเป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืช

ปัจจุบันพบบีทีในประเทศไทย 17 สายพันธุ์ จาก 70 สายพันธุ์ทั่วโลก ส่วนใหญ่การศึกษาวิจัยมุ่งเน้นการใช้บีทีในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูที่ดื้อต่อสารเคมีสังเคราะห์ หลังจากใช้แล้วจุลินทรีย์บางส่วนตายไป แต่บางส่วนยังสามารถเจริญเติบโตได้ในธรรมชาติ และขยายพันธุ์ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยการสร้างสปอร์ (spore) เป็นเซลล์รูปแท่ง (rod) แบ่งตัว (binary fission) ได้เซลล์รูปแท่งต่อกันเป็นสายคล้ายลูกโซ่ (vegetative cell) หลังจากนั้นจะสร้างสปอร์ และผลึกโปรตีน (crystal protein) ผลึกโปรตีนมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปพีรามิดคู่ รูปกลม รูปลูกบาศก์ หรือหลายรูปแบบอยู่ด้วยกัน เป็นต้น รูปร่างของผลึกโปรตีนจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียบีที ผลึกโปรตีนมีฤทธิ์ในการทำลายแมลง โดยสารพิษที่สร้างขึ้นมีหลายชนิด บีทีต่างสายพันธุ์สร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกัน และความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกัน สารพิษส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียบีทีสร้างขึ้นมามีอยู่ 4 ชนิดหลัก คือ

1. Delta endotoxin เป็นสารพิษชนิดที่นำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ไม่ทนต่อความร้อน ผลึกประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีน (proteinaceous crystal) ซึ่งมีทั้งสารพิษ และเอนไซม์เกาะกันเป็นรูปดัมเบลล์ (dumbbell)

2. Beta exotoxin เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นภายนอกเซลล์ ละลายน้ำได้ ไม่ทนต่อความร้อน มีคุณสมบัติในการทำลายเม็ดเลือด ขัดขวางการทำงานของระบบสรีรวิทยาหลายอย่างในตัวแมลง แมลงที่ได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไปจะเจริญเติบโตช้า ไม่เข้าดักแด้ หรือถ้าเข้าดักแด้จะไม่ออกเป็นตัวเต็มวัย

3. Alpha exotoxin สารพิษชนิดนี้สร้างขึ้นก่อนการสร้างสปอร์ น้ำหนักโมเลกุลต่ำ แต่ทนความร้อนได้สูงถึง 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที มีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera หนอนแมลงวันในอันดับ Diptera และหนอนด้วงในอันดับ Coleoptera โดยมีผลต่อระบบฮอร์โมน กระบวนการเมทาบอลิซึมและการสร้างเอนไซม์ต่างๆ แมลงที่กินสารพิษนี้เข้าไป

จะทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลง ตัวเต็มวัยไม่สมบูรณ์ วงชีวิตสั้น และไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีการอนุญาตให้มีสารพิษชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์บีทีที่จำหน่ายเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

4. Gamma exotoxin เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน อ่อนแอต่อสภาพอากาศ ก๊าซออกซิเจน และแสงอาทิตย์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จะถูกทำลายภายใน 10-15 นาที กลไกการเข้าทำลายแมลงของสารพิษชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

กลไกการเข้าทำลายแมลงของแบคทีเรียบีที เกิดขึ้นหลังจากที่แมลงกินแบคทีเรียบีทีซึ่งมีส่วนประกอบของสปอร์ และผลึกโปรตีนเข้าไปในกระเพาะอาหาร สภาพความเป็นด่างในกระเพาะอาหารส่วนกลาง จะช่วยย่อยสลายผลึกโปรตีนขนาดใหญ่ให้ได้ protoxin และน้ำย่อยโปรตีน (protease) จะช่วยย่อยสลาย protoxin ได้ สารพิษเข้าทำลายเซลล์ผนังกระเพาะอาหาร สารพิษจากบีทีสายพันธุ์ต่างๆ จะเฉพาะเจาะจงกับจุดเข้าทำลาย (receptor site) ที่ผนังกระเพาะอาหารของแมลงแต่ละชนิด เมื่อเซลล์ผนังกระเพาะอาหารถูกทำลายจะบวมและแตกออก เกิดเป็นรอยแยกที่ผนังกระเพาะอาหาร ทำให้อาหาร ของเหลว และเอนไซม์ต่างๆ ที่มีอยู่ภายในกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาพเป็นด่างไหลออกมาปะปนกับน้ำเลือดในช่องว่างของลำตัวแมลงซึ่งมีสภาพเป็นกรด มีผลให้แมลงหยุดกินอาหาร เคลื่อนไหวเชื่องช้า แสดงอาการโลหิตเป็นพิษ ชักกระตุก เป็นอัมพาต และตายในที่สุด (อัจฉรา, 2544)

2.7 บทบาทของจุลินทรีย์ร่วมอาศัยต่อการถ่ายทอดโรคของแมลงพาหะ

แบคทีเรียร่วมอาศัยปฐมภูมิ เป็นแบคทีเรียที่ให้ประโยชน์แก่แมลงอาศัย โดยแบคทีเรียที่พบในแมลงหวี่ขาว คือ *Portiera* ส่วนแบคทีเรียร่วมอาศัยทุติยภูมิ เป็นเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ต่อมน้ำลาย ทางเดินอาหาร เลือด (hemolymph) รังไข่ มีทั้งให้ประโยชน์และโทษแก่แมลงอาศัย ซึ่งในแมลงหวี่ขาวพบแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Hamiltonella, Arsenophonus, Cardinium, Wolbachia, Rickettsia* และ *Fritschea* (Baumann, 2005)

จากการทดลองของ Su et al. (2013) ทดสอบการรับเชื้อ (AAP) บ่มเชื้อ (LP) และถ่ายทอดเชื้อไวรัส (IAP) สาเหตุโรคหงิกมะเขือเทศ (Tomato yellow leaf curl virus :TYLCV) ของแมลงหวี่ขาว โดยให้แมลงหวี่ขาวที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Hamiltonella* (H^+) และไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *Hamiltonella* (H^-) ซึ่งเป็น secondary symbiont ในแมลงหวี่ขาวชนิดนี้ ดูดรับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (AAPs) ตรวจสอบเชื้อไวรัส ภายในตัวแมลงหวี่ขาวด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่า ระยะเวลาดูดรับเชื้อที่ 0.5-12 ชั่วโมง แมลง H^+ มีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อไวรัส TYLCV สูงกว่าแมลง H^- เมื่อตรวจหาปริมาณไวรัสด้วย q-PCR ที่ช่วงเวลา 1, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (AAPs) พบว่า ปริมาณของไวรัสใน H^+ สูงกว่า H^-

อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งแมลง H^+ และ H^- มีปริมาณไวรัสเริ่มคงที่เมื่อดูดรับเชื้อเป็นเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ ทดสอบการบ่มเชื้อโดยให้แมลงหวี่ขาวทั้ง 2 ประเภท (H^+ และ H^-) ดูดรับเชื้อไวรัสจากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค 24 ชั่วโมง และย้ายแมลงไปยังต้นฝ้ายปกติเพื่อบ่มเชื้อภายในตัวแมลงเป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 วัน การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าเชื้อไวรัส TYLCV ใน H^+ และ H^- ในทุกช่วงเวลาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วย q-PCR ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 3, 6, 9 และ 12 วัน พบว่าปริมาณไวรัสในแมลง H^+ สูงกว่า H^- ทุกช่วงเวลา และปริมาณของไวรัสในแมลง H^- มีอัตราการลดลงสูงกว่า H^+ ส่วนการถ่ายทอดเชื้อไวรัสของแมลงหวี่ขาว ทดสอบโดยการให้ H^+ และ H^- ดูดรับเชื้อไวรัสจากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค 24 ชั่วโมง ย้ายแมลงลงใน clip-cage (1, 5 และ 10 ตัว/กรง) ติดบนต้นมะเขือเทศปกติเพื่อถ่ายเชื้อไวรัสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น 30 วัน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไวรัส พบว่ามีเชื้อไวรัสภายในต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง H^+ สูงกว่า H^- อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง H^+ 1, 5 และ 10 ตัว มีเชื้อไวรัส 60, 100 และ 100% ตามลำดับ และการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในใบมะเขือเทศหลังจากที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อจากแมลงหวี่ขาวนาน 10-20 วัน ด้วย q-PCR พบว่าปริมาณไวรัสในใบมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อจากแมลง H^+ และ H^- ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใบที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง H^+ เพศเมีย มีปริมาณเชื้อไวรัสสูงสุด รองมาคือ H^+ เพศผู้ ส่วนใบที่ได้รับการถ่ายเชื้อจาก H^- เพศผู้และเพศเมียมีปริมาณน้อยสุดและไม่แตกต่างกัน จากการทดลองดังกล่าวนี้ ทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Hamiltonella* มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศของแมลงหวี่ขาว

2.8 ความสัมพันธ์ของเอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืชอาหารและแมลงปากเจาะดูด

เอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืช คือ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชแบบพึ่งพาอาศัยและไม่เป็นอันตรายต่อพืช (Mano and Morisaki, 2008) เอนโดไฟติกแบคทีเรียให้ประโยชน์ต่อพืชในหลายรูปแบบ ได้แก่ เป็นแบคทีเรียที่ช่วยตรึงไนโตรเจน สร้าง phytohomone เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชบริเวณราก หรือช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหาร ส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืช เอนโดไฟติกแบคทีเรียพบได้หลากหลาย เช่น *Pantoea, Methylobacterium, Azospirillum, Herbaspirillum, Burkholderia* และ *Rhizobium* เป็นต้น และสามารถพบเอนโดไฟติกแบคทีเรียในส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ เมล็ด และผล แต่ส่วนใหญ่มักพบเอนโดไฟติกแบคทีเรียภายในรากมากกว่าในส่วนของลำต้นเหนือดิน (Roesnblueth and Mertinez-Romero, 2006) ชนิดและบทบาทของเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่พบในส่วนต่างๆ ของพืช

เช่น แบคทีเรีย *Microbacterium testaceum* พบในใบของมันฝรั่ง ซึ่งมี AHL-degrading genes มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Morohoshi et al., 2011) พบในรากฝ้าย (Zinniel et al., 2002) หรือพบใน red clover (*Trifolium pratense*) มีบทบาทช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือทำงานร่วมกับ *Rhizobium* spp. (Sturz et al., 1997) แบคทีเรีย *B. subtilis* พบในเนื้อเยื่อชั้นในของต้นฝ้าย (Reva et al., 2002) *Curtobacterium* พบในพืชตระกูลส้ม และมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* เชื้อสาเหตุก่อให้เกิดโรคใบเหลือง (CVC) ในพืชตระกูลส้ม (Gai et al., 2011) อย่างไรก็ตาม เอนโดไฟติกแบคทีเรียของพืช แต่ละชนิดแตกต่างกันไป แม้ว่าจะให้ประโยชน์แก่พืชชนิดหนึ่ง แต่ก็อาจจะให้ผลเสียกับพืชอีกชนิดหนึ่ง เช่น เอนโดไฟติกแบคทีเรียในต้น Clover ให้ประโยชน์แก่พืชอาศัยแต่ให้ผลเสียแก่ต้นข้าวโพด โดยเป็นสาเหตุให้เมล็ดข้าวโพดมีการงอกลดลง และยับยั้งการเจริญทางด้านความสูงของลำต้น (Sturz and Christie, 1996)

เอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืชตระกูลหญ้า วงศ์ Poaceae เช่น เอนโดไฟติกแบคทีเรียที่พบในต้นอ้อยโดยการรายงานของ Magnani et al. (2010) ศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียของต้นอ้อยในประเทศบราซิล พบว่า ส่วนของลำต้นพบแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ชนิดแบคทีเรียได้แก่ *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. และ *Citrobacter* sp. ในส่วนใบแบคทีเรียที่พบจัดอยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae ได้แก่ *Pseudomonas* sp. ข้าวเจ้าพันธุ์หอมสุพรรณบุรี พบ *B. safensis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากราก เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่ามีความสามารถในการละลายฟอสเฟตระหว่าง 421.7-465.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลิตออกซิน (IAA) 8.0-21.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และผลิตจิบเบอริลลิน 143.7-292.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (สุจิตตรา และคณะ, 2556) เอนโดไฟติกแบคทีเรียที่คัดแยกจากเมล็ดข้าวโพด พบว่าเป็น *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* มีบทบาทในการสร้าง lipopeptide ขึ้นมา เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชให้กับพืชอาศัย (Gond et al., 2015) ในข้าวสาลี พบแบคทีเรีย *Klebsiella* sp. strain Kp342 มีบทบาทช่วยในการตรึงไนโตรเจนให้พืชอาศัย (Iniguez et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิดนี้ต้นข้าวโพด และพบว่าช่วยเพิ่มผลผลิตข้าวโพด (Riggs et al., 2001) หญ้าที่เจริญเติบโตในดินทรายที่มีธาตุอาหารต่ำพบว่าแบคทีเรียใน genus *Burkholderia* เป็นเอนโดไฟติกแบคทีเรีย ช่วยตรึงไนโตรเจนให้ต้นหญ้าเนื่องจากตรวจพบเอนไซม์ nitrogenase ในราก รวมทั้งในผนังเซลล์ของลำต้นและเหง้า

เอนโดไฟติกแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงจากรากของอ้อยในประเทศไทยพบเป็นแบคทีเรีย 14 genus ได้แก่ *Streptomyces, Microbispora, Enterobacter, Bacillus, Actinomadura, Pantoea, Acinetobacter, Kosakonia, Micromonospora, Paenibacillus, Staphylococcus, Lysinibacillus, Micrococcus* และ *Pseudomonas* เมื่อนำเอนโดไฟติกแบคทีเรียที่แยกได้มา

ทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย โดยการปลูกเชื้อในกับต้นอ้อย พบว่าการใช้เอนโดไฟติกแบคทีเรีย *Microbispora* หรือ *Streptomyces* ร่วมกับ *Enterobacter* และ *Bacillus* ทำให้การเจริญเติบโตของอ้อยเพิ่มสูงขึ้น และมีประสิทธิภาพดีกว่าการปลูกเชื้อให้กับต้นอ้อยเพียงเชื้อเดียว (Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016)

นอกจากนี้ พบเอนโดไฟติกแบคทีเรียได้ในแมลงพาหะ เช่น ในการทดลองของ Gai et al. (2011) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่น 3 ชนิด ได้แก่ *Dilobopterus costalimai Acrogonia citrine* และ *Oncometopia facialis* ซึ่งเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอด *X. fastidiosa* เชื้อสาเหตุก่อให้เกิดโรคใบเหลือง (CVC) ในพืชตระกูลส้ม วิธีการคัดแยกแบคทีเรียจากแมลงประเภทปากแบบเจาะดูด สามารถทำได้โดยการทำความสะอาดแมลงด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บดส่วนหัวของแมลงใน saline solution (NaCl 0.85 %) และเลี้ยงบนอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 วัน แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงพาหะจัดอยู่ใน genus *Methylobacterium* spp. และ *Curtobacterium* spp. ซึ่งทั้ง 2 genus นี้ พบว่า เป็นเอนโดไฟติกแบคทีเรียในภายต้นส้มที่เป็นพืชอาศัย โดยแบคทีเรีย *C. flaccumfaciens* จะขัดขวางการทำงานของ *X. fastidiosa* แต่ *Methylobacterium* spp. จะกระตุ้นกิจกรรมการทำงานของ *X. fastidiosa* และได้มีการตรวจหาแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดในประชากรของแมลงพาหะทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ จากการตรวจสอบ พบแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดในแมลงพาหะทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ในการทดลองอื่น ยังพบแบคทีเรียใน genus *Curtobacterium* ในทางเดินอาหารของเพลี้ยจักจั่น ซึ่งเป็นแบคทีเรีย genus เดียวกับแบคทีเรียคัดแยกได้จากท่อน้ำ (xylem) ของต้นส้ม

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

3.1.1 พื้นที่ที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างแมลง

แปลงอ้อยที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย 3 พื้นที่ คือ เขตพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี (ภาพที่ 3.1) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีประวัติการระบาดของโรคใบขาวมาก อำเภอเขาสวนกวาง (ภาพที่ 3.2) และอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น (ภาพที่ 3.3) มีระดับการระบาดของโรคน้อยกว่า เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อยโดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลง และหลอดดูดแมลงในช่วงเวลา 19.00-20.00 น. (ภาพที่ 3.4) ในช่วงที่มีการระบาดของแมลงพาหะเดือนกรกฎาคม เพื่อนำมาศึกษาโดยแยกเก็บตัวอย่างเป็นแปลงอ้อยปลูก และอ้อยตอของแต่ละพื้นที่ เก็บตัวอย่างแมลงใส่ในกรงพลาสติกที่มีต้นอ้อยอยู่ เลี้ยงแมลงในโรงเรือนปฏิบัติการเพื่อนำตัวอย่างแมลงที่มีชีวิตอยู่มาศึกษาทดลอง

ภาพที่ 3.1 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี

ภาพที่ 3.2 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น

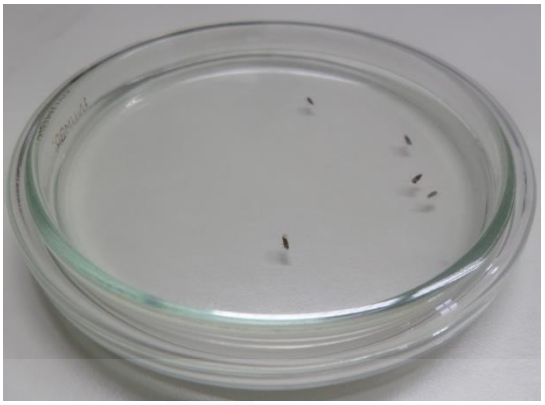
ภาพที่ 3.3 แปลงอ้อยพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ภาพที่ 3.4 เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อยโดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลงในช่วงเวลา 19.00- 20.00 น.

3.1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัยจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

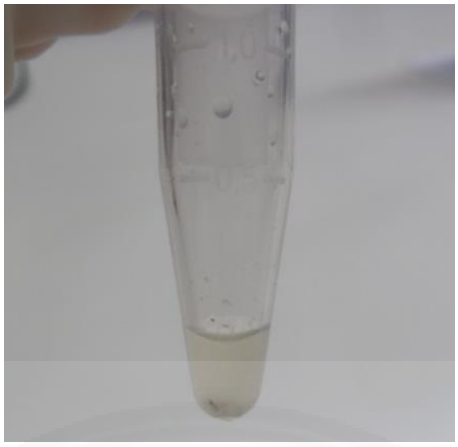
ตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นที่ใช้ในการศึกษาจาก 3 พื้นที่ พื้นที่ละ 60 ตัว (แปลงอ้อยปลูก เพศเมีย 10 ตัว และเพศผู้ 10 ตัว ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด) การทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปได้ คือ nutrient agar (NA) tryptic soy agar (TSA) และ brain heart infusion agar (BHI) ก่อนการแยกแบคทีเรียออกมาเพาะเลี้ยง ต้องทำความสะอาดตัวแมลงก่อน เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปะปนอยู่ภายนอกตัวแมลง โดยใช้อุปกรณ์ และเทคนิคที่ปลอดเชื้อ ทำการล้างแมลงในเอทานอล 75% และ 6% sodium hypochloride นานอย่างละ 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที (ภาพที่ 3.5)

โดยแยกแบคทีเรียเฉพาะในส่วนบริเวณส่วนท้องของแมลง (ภาพที่ 3.6) นำตัวอย่างส่วนท้องที่ตัดแยกแล้วมาบดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงแบคทีเรียอยู่ 100 ไมโครลิตร (หนึ่งชิ้นส่วนที่แยกต่อหนึ่งหลอด) (ภาพที่ 3.7) เจือจางความเข้มข้นลงโดยแบ่ง 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารใหม่ 100 ไมโครลิตร แล้วดูดจากหลอดที่เจือจางแล้ว 20 ไมโครลิตร กระจายเชื้อลงบน อาหารแข็ง จากนั้นบ่มในตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต (ภาพที่ 3.8)

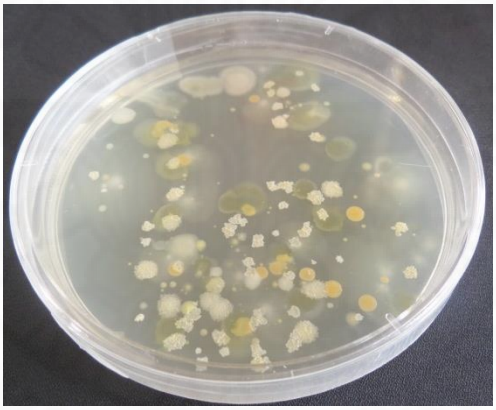


ภาพที่ 3.5 การทำความสะอาดภายนอกตัวแมลงด้วยการแช่ในเอทานอล 75% และ 6% sodium hypochloride

ภาพที่ 3.6 ส่วนท้องของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)



ภาพที่ 3.7 บดส่วนท้องของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย



ภาพที่ 3.8 เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตบนอาหาร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง

3.1.3 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเซลล์ในอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยแยกเซลล์แบคทีเรียจากอาหารเหลวด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เติม TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA) ปริมาตร 460 ไมโครลิตร สารละลาย 10% SDS 30 ไมโครลิตร และเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง สกัดด้วยการเติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol

(25:24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่และเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 3M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรสารในหลอด และตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด วางทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/วินาที นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/วินาที นาน 5 นาที และละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.1.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA

โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดมาทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อวิเคราะห์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์ (Universal primer) 25F และ 1513R มีส่วนประกอบคือ 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 และดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 2 ไมโครลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 30 รอบ Denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยามาแยกด้วย gel electrophoresis บน 0.8% agarose gel เพื่อตรวจสอบผลและขนาดของยีนที่ได้ จากนั้นนำส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณแล้วมาทำการ purify ด้วย PCR Clean-Up Kit เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สถาบัน ATIbiotech ประเทศสิงคโปร์ และเปรียบเทียบกับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล NCBI

3.2 การศึกษาบทบาทของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

3.2.1 การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดทุติยภูมิเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเป็นเชื้อก่อโรคกับเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

แบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกเป็นแบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ หรือมีคุณลักษณะ เช่น แบคทีเรียที่เป็น endophyte ของพืช คือแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อ

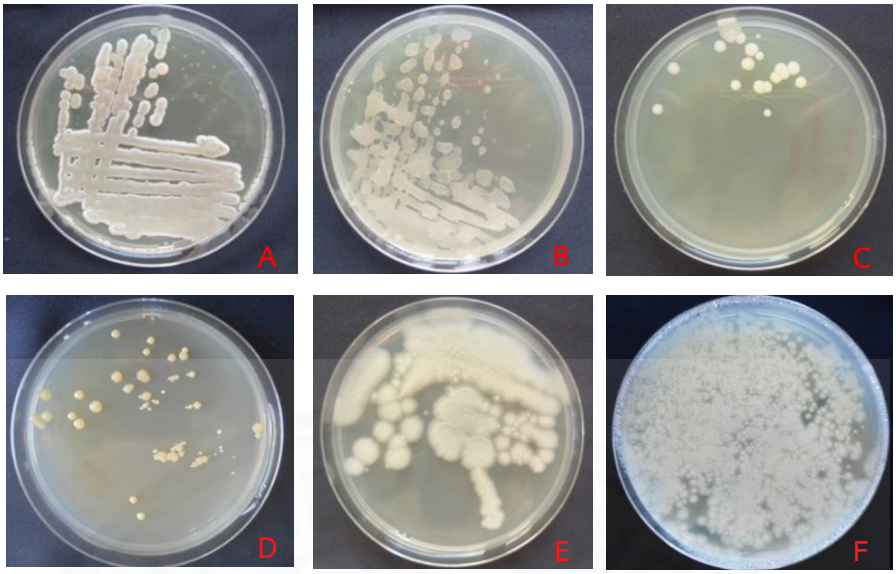
พืชแบบพึ่งพาอาศัยและไม่เป็นอันตรายต่อพืช แบคทีเรียก่อให้เกิดโรคกับแมลง แบคทีเรียอาศัยอยู่ในดิน (ภาพที่ 3.9)

3.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัยทุติยภูมิที่คัดเลือกเพื่อทดสอบ

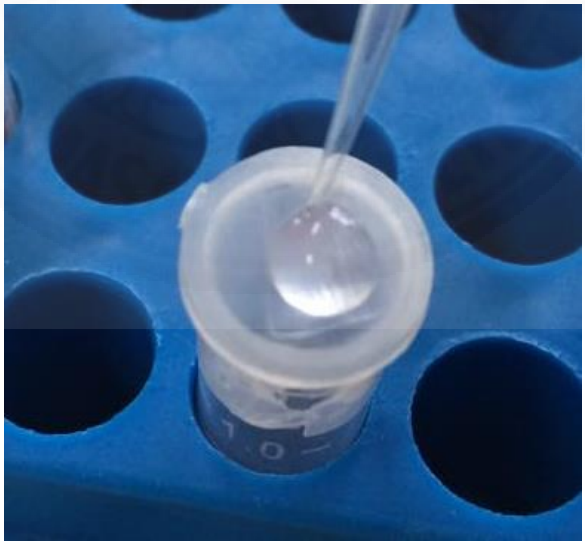
เตรียมแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดเลือก นำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วย Haemacytometer และปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1x10^9$ cell/ml

3.2.3 การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

ให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย โดยนำแมลงพาหะใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว เพศเมียและเพศผู้อย่างละ 5 ตัว ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มที่ยืดให้มีความบางประมาณ 4 เท่า จากนั้นหยดสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ร่วมกับแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml ลงบนพาราฟิล์มปริมาณ 50 ไมโครลิตร (ภาพที่ 3.10) และปิดด้วยพาราฟิล์มอีกครั้งหนึ่ง กลุ่มควบคุมให้แมลงดูดกินสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% นำไปติดไว้ที่ใต้ใบอ้อยเพื่อล่อให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย (ภาพที่ 3.11) บันทึกการตายของแมลงเป็นเวลานาน 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely randomize design (CRD) สิ่งทดลอง คือ ชนิดของแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SAS 9.0



ภาพที่ 3.9 แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และคัดเลือกเพื่อทดสอบการก่อให้เกิดโรคต่อแมลงพาหะ (A) *B. subtilis* (B) *B. licheniformis* (C) *B. megaterium* (D) *M. testaceum* (E) *A. woluwensis* และ (F) *A. nicotinae*



ภาพที่ 3.10 หยดสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ร่วมกับแบคทีเรียความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml บนพาราฟิล์ม

ภาพที่ 3.11 นำหลอดไปติดที่ใต้ใบอ้อยเพื่อล่อให้แมลงดูดกินเชื้อแบคทีเรีย

3.2.4 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

เตรียมแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดเลือก นำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วย Haemacytometer และปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1x10^8$ cell/ml

นำแมลงพาหะที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์เพศเมียและเพศผู้ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มที่ยืดให้มีความบางประมาณ 4 เท่า จากนั้นหยดสารละลาย TE buffer ประกอบด้วยซูโครส 5% ที่ผสมแบคทีเรีย ลงไปบนพาราฟิล์มปริมาณ 50 ไมโครลิตร และปิดด้วยพาราฟิล์มอีกครั้ง นำหลอดที่ใส่แมลงแล้วไปติดไว้ที่ใต้ใบอ้อย เพื่อล่อให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง จากนั้นจับคู่แมลงเพศผู้และเพศเมียใส่กรงเลี้ยงแมลงที่มีต้นอ้อยอยู่ กรงละ 1 คู่ ในกระถางขนาด 4 นิ้ว โดยใช้แผ่นฟิวเจอบอร์ดตัดกลมวางคลุมบนผิวหน้าดิน และโรยทราย 2 ช้อน (4 กรัม) ปกคลุมให้ทั่วผิวหน้า เพื่อให้เหมาะสมกับการวางไข่ของแมลง (ภาพที่ 3.12) หลังจากจับคู่ผสม 1 สัปดาห์ เริ่มตรวจนับจำนวนไข่ของแมลงจนกระทั่งแมลงตาย (ภาพที่ 3.13) กลุ่มควบคุมให้แมลงดูดกินเฉพาะสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% วางแผนการทดลองแบบ CRD สิ่งทดลอง คือ ชนิดของแบคทีเรีย สิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 คู่ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SAS 9.0

ภาพที่ 3.12 จับคู่แมลงเพศผู้และเมียใส่กรงเลี้ยงแมลงที่มีต้นอ้อยอยู่ กรงละ 1 คู่

ภาพที่ 3.13 การตรวจนับไข่ของเพลี้ยจักจั่น (*M. hiroglyphicus*) โดยนำทรายไปตรวจดูไข่แมลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

3.3.1 การเตรียมต้นอ้อยปลอดเชื้อและต้นอ้อยเป็นโรคใบขาว

ต้นอ้อยที่ใช้ในการทดสอบเตรียมต้นอ้อยปลอดเชื้อและต้นอ้อยที่เป็นโรคใบขาว ทำได้โดยการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาจากท่อนพันธุ์โดยวิธี Nested PCR ด้วย primer ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว ตามวิธีการของ Hanboonsong et al. (2002) จากนั้นตัดแบ่งท่อนพันธุ์เป็นข้อปล้อง ปลูกในถุงเพาะ ถุงละ 1 ข้อ ส่วนต้นอ้อยโรคใบขาว เตรียมได้จากท่อนพันธุ์อ้อยที่แสดงโรคใบขาวจากแปลงอ้อยของเกษตรกร นำมาตัดแบ่งเป็นข้อปล้อง ปลูกในถุงเพาะ ถุงละ 1 ข้อ เช่นเดียวกัน

3.3.2 ขั้นตอนการศึกษาผลของแบคทีเรียต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียนำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วย Haemacytometer และปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1x10^8$ cell/ml นำแมลงเพศผู้และเพศเมียใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มที่ยืดให้มีความบางประมาณ 4 เท่า จากนั้นหยดสารละลาย TE buffer ประกอบด้วยซูโครส 5% ที่ผสมแบคทีเรียลงบนพาราฟิล์มปริมาณ 50 ไมโครลิตร และปิดด้วยพาราฟิล์มอีกครั้ง นำหลอดที่ใส่แมลงแล้วไปติดไว้ที่ใต้ใบอ้อยเพื่อล่อให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง ย้ายแมลงออกจากหลอดไปยังกรงที่มีต้นอ้อยปลอดเชื้อ เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโตภายในตัวแมลง จากนั้นให้แมลงดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมา โดยปล่อยให้ดูดกินต้นอ้อยที่เป็นโรคใบขาว เป็นเวลา 1 วัน ย้ายไปยังต้นอ้อยปลอดเชื้อ เพื่อให้เชื้อไฟโตพลาสมามีการเพิ่มปริมาณในตัวแมลงเป็นเวลา 14 วัน และ 21 วัน ย้ายแมลงสู่ต้นอ้อยปลอดเชื้อเพื่อให้แมลงถ่ายทอดเชื้อในอัตรา 1 ตัวต่อต้น เป็นเวลา 1 วัน ดูแลต้นอ้อยที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อตามปกติ นาน 30 วัน นำต้นที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อมาสกัด DNA ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธี Nested PCR วางแผนการทดลองแบบ CRD สิ่งทดลอง คือ ชนิดของแบคทีเรียที่ให้แมลงดูดกิน สิ่งทดลองละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ แมลงที่ไม่ได้ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย

3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอของต้นอ้อย

นำตัวอย่างบริเวณยอดต้นอ้อยมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งบด เติมไนโตรเจนเหลวลงไป และบดให้ละเอียดเป็นผง นำตัวอย่างอ้อยที่บดแล้วใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัพเฟอร์ 2% CTAB ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดวางที่อุณหภูมิห้องให้เย็น เติมสารละลาย chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีอยู่ในหลอดทดลอง เขย่าหลอดทดลองเบาๆ ให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสชั้นบนใส่หลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่า ของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอดทดลอง เขย่าหลอดทดลองเบาๆ สังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอ นำหลอดทดลองไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% นำหลอดทดลองไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอทานอลทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้ง โดยการคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษทิชชูที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE ที่ผสม RNase 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมอยู่ในอัตราส่วน 200:1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เพื่อขจัด RNA เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.3.4 การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในต้นอ้อยด้วยวิธีการ Nested PCR

นำดีเอ็นเอของต้นอ้อยที่สกัดมาทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อย 2 ชุด ชุดแรก คือ MLO-X : 5-GTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGC-3 และ MLO-Y : 5-GTGCCAAGGCATCCACTGTATGCC-3 และชุดที่ 2 คือ P1 : 5-GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGG-3 และ P2 : 5-GGTGGGCCTAAATGGACTTGAACC-3 โดยมีโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ครั้งแรกโดยใช้ไพรเมอร์ MLO-X และ MLO-Y ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ส่วนประกอบคือ dNTP 0.2 mM, ไพรเมอร์ 0.25 µM, *Taq* DNA polymerase 1 U, $MgCl_2$ 1.5 mM, 1X buffer และดีเอ็นเอของอ้อย 2 ไมโครลิตร โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ Initial denaturation 92 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 35 รอบ, Denaturation 92 องศาเซลเซียส 1 นาที, Annealing 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรกมาเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอเอ็นเอในครั้งที่ 2 โดยการใช้ไพรเมอร์ P1 และ P2 ทำปฏิกิริยา 40 รอบ โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ Initial denaturation 92 องศาเซลเซียส

5 นาที และ 40 รอบ, Denaturation 92 องศาเซลเซียส 1 นาที, Annealing 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยามาแยกด้วย gel electrophoresis บน 0.8% agarose gel เพื่อตรวจสอบผล

3.4 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และในต้นอ้อย

ตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อยืนยันว่าชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนมาก รวมทั้งชนิดที่เป็น endophyte พืช และชนิดที่เป็นสาเหตุโรคแมลง สามารถพบได้ในประชากรแมลงพาหะและในต้นอ้อยพืชอาศัย

3.4.1 พื้นที่ที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างแมลงและต้นอ้อยพืชอาศัย

แปลงอ้อยที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย 3 พื้นที่ คือ เขตพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี อำเภอเขาสวนกวางและอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อยโดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลง และหลอดดูดแมลง ในช่วงเวลา 19.00-20.00 น. ในช่วงที่มีการระบาดของแมลงพาหะเดือนกรกฎาคม และเก็บตัวอย่างต้นอ้อยโดยตัดส่วนยอดเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น

นำเพลี้ยจักจั่นมาบดให้ละเอียดในสารละลายบัพเฟอร์ (1M Tris pH 8.0, 0.5M EDTA, 1M NaCl, 10% SDS, Proterase 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยด้วยการเติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่และเติม phenol-chloroform (24:1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 3M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรสารในหลอดผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปั่นเหวี่ยงที่

13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ที่ผสม RNase 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมอยู่ในอัตราส่วน 200:1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6-24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอของต้นอ้อย

รายละเอียดเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 3.3.3

3.4.4 การตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายโดยวิธีการ PCR

การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียเป้าหมายโดยนำดีเอ็นเอของแมลงที่สกัดมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อวิเคราะห์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1) ของแบคทีเรียเป้าหมายมีส่วนประกอบคือ dNTP 0.2 mM, ไพรเมอร์ 0.3 µM, *Taq* DNA polymerase 1 U, $MgCl_2$ 2.5 mM, 1X buffer และดีเอ็นเอของแมลงหรืออ้อย 2 ไมโครลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 30 รอบ Denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, Annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยามาแยกด้วย gel electrophoresis บน 0.8% agarose gel เพื่อตรวจสอบผล

ตารางที่ 3.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงในการตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมาย

ชนิดแบคทีเรีย	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	จำนวนคู่เบสผลิตภัณฑ์ PCR (bp)
Microbacterium testaceum	F	5-GAAGCCTGATGCAGCAACG-3	~210
	R	5-TCGGGATTTCACAGCAGACG-3	
Bacillus licheniformis	F	5-GACGAAAGTCTGACGGAGCA-3	~226
	R	5-CAGACTTAAGAAACCGCCTGC	
Bacillus megaterium	F	5-CTTCGGGAAACCGAAGCTAA-3	~254
	R	5-TTGCTCCGTCAGACTTTCGT-3	
Bacillus subtilis	F	5-CGGCGCATTAGCTAGTTGGT-3	~281
	R	5-ACGTAGTTAGCCGTGGCTTT-3	
Arthrobacter nicotenae	F	5-CCACACTGGGACTGAGACAC-3	~294
	R	5-GGTTGAGCCTCGGACTTTCA-3	
Arthrobacter woluwensis	F	5-AGGTAATGGCTCACCAAGGC-3	~384
	R	5-CATCACTCAAGTCTGCCCGT-3	

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการอารักขาพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนมิถุนายน 2557 ถึงเดือนสิงหาคม 2559 ใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 26 เดือน

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

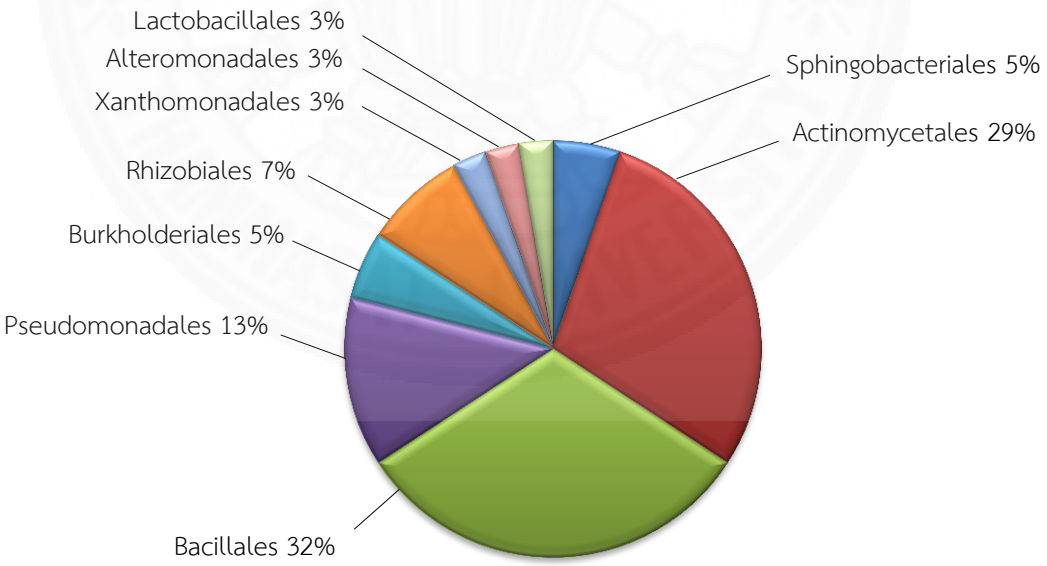
การคัดแยกแบคทีเรียจากแมลงพาหะพื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น และอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี จากแมลงทั้งหมด 174 ตัว คัดเลือกตัวอย่างโคโลนีที่เพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ NA, TSA และ BHI ตรวจดูลักษณะภายนอกของโคโลนีที่แตกต่างกัน ได้แก่ รูปร่าง การยกตัว ขอบ สี และผิวของโคโลนี (ตารางผนวก ก 1-3) จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้จากแมลงเพศเมียที่เก็บจากอำเภอเขาสวนกวาง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น และอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี คิดเป็น 93.33, 87.50 และ 73.33% ตามลำดับ ส่วนแมลงเพศผู้พบเพียง 1 โคโลนีเท่านั้น เป็นโคโลนีที่พบบนอาหาร BHI จากการทดลอง พบว่า แมลงเพศเมียสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียออกมาได้ แต่ในเพศผู้ไม่สามารถคัดแยกแบคทีเรียออกมาได้ อาจเนื่องมาจากแมลงเพศผู้มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ปริมาณแบคทีเรียร่วมอาศัยที่อยู่ภายในอาจมีปริมาณน้อย และในขั้นตอนการล้างทำความสะอาดด้วยเทคนิคที่ปลอดเชื้ออาจทำให้สารเคมีที่ใช้ ทำลายผนังลำตัวได้มากกว่าแมลงเพศเมีย เนื่องจากเพศผู้มีผนังลำตัวบางกว่าเพศเมีย จึงทำให้แบคทีเรียที่มีอยู่ในปริมาณน้อยถูกจำกัดออกไป

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงพาหะ ที่เก็บจากอำเภอเขาสวนกวาง คัดเลือกได้จำนวน 38 โคโลนี พบว่าเป็นโคโลนีที่เจริญบนอาหารจาก NA, TSA และ BHI เป็น 19, 8 และ 11 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียจากแมลงพาหะที่เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น คัดเลือกได้ 39 โคโลนี เป็นแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารทั้ง 3 ชนิด NA, TSA, BHI เป็น 12, 16 และ 11 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงพาหะที่เก็บจากอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี คัดเลือกได้ 40 โคโลนี เป็นแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารทั้ง 3 ชนิด NA, TSA และ BHI เป็น 16, 10 และ 14 โคโลนี ตามลำดับ โคโลนีแบคทีเรียที่พบสามารถเจริญบนอาหาร NA, TSA และ BHI ได้ในปริมาณเท่าๆ กัน (ตารางที่ 4.1) จากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแต่ละชนิด พบว่าแมลงแต่ละตัวมีโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นจำนวนมาก ทั้งลักษณะที่เหมือนและแตกต่างกัน ดังนั้นในการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย จึงสุ่มเลือกจากแมลงแต่ละตัว โดยโคโลนีที่มีความแตกต่างกันจะถูกสุ่มเลือกออกมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ซึ่งแบคทีเรียจำนวน 38, 39 และ 40 โคโลนีที่กล่าวข้างต้นเป็นจำนวนโคโลนีตัวอย่างของแบคทีเรียที่สุ่มเลือกจากแมลงแต่ละตัว

ตารางที่ 4.1 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ทั้ง 3 พื้นที่การศึกษา

พื้นที่	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เพศแมลง	จำนวนแมลงที่ใช้ (ตัว)/แมลงที่มีโคโลนีแบคทีเรีย (ไอโซเลท)	จำนวนโคโลนีที่จำแนกชนิด (โคโลนี)
อ. เขาสวนกวาง	NA	เมีย	10/10	19
จ. ขอนแก่น		ผู้	10/0	0
	TSA	เมีย	10/8	8
		ผู้	10/0	0
	BHI	เมีย	10/10	11
		ผู้	10/0	0
อ. เมือง	NA	เมีย	8/6	12
จ. ขอนแก่น		ผู้	10/0	0
	TSA	เมีย	8/7	15
		ผู้	10/1	1
	BHI	เมีย	8/8	11
		ผู้	10/0	0
อ. กุมภวาปี	NA	เมีย	10/8	16
จ. อุดรธานี		ผู้	10/0	0
	TSA	เมีย	10/7	10
		ผู้	10/0	0
	BHI	เมีย	10/7	14
		ผู้	10/0	0

เมื่อนำแบคทีเรียไปสกัดดีเอ็นเอและจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับฐานข้อมูล NCBI โดยให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 99% จัดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน 95-98% สามารถระบุได้เพียงระดับ genus เปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ต่ำกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ระบุเพียงระดับ order (Niu et al., 2016) ผลการศึกษาพบว่า จัดเป็นแบคทีเรียจาก 9 order 18 genus 45 species ได้แก่ order Bacillales, Actinomycetales, Pseudomonadales, Burkholderiales, Sphingobacteriales, Xanthomonadales, Alteromonadales, Rhizobiales และ Lactobacillales จากผลการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากแมลงที่เก็บตัวอย่างจากอำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น พบว่าแบคทีเรียจำนวน 38 โคโลนี ที่นำมาวิเคราะห์ จำแนกเป็นแบคทีเรีย 9 order 15 genus 24 species โดยพบแบคทีเรีย ได้แก่ order Bacillales มีจำนวนโคโลนีมากที่สุด (12 โคโลนี จำแนกเป็น 7 species) รองลงมา คือ order Actinomycetales (11 โคโลนี จำแนกเป็น 7 species), Pseudomonadales (5 โคโลนี จำแนกเป็น 2 species), Rhizobiales (3 โคโลนี จำแนกเป็น 3 species), Burkholderiales และ Sphingobacteriales (2 โคโลนี จำแนกเป็น 1 species) order Xanthomonadales, Alteromonadales และ Lactobacillales พบน้อยที่สุด (1 โคโลนี จำแนกเป็น 1 species) (ภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.2)

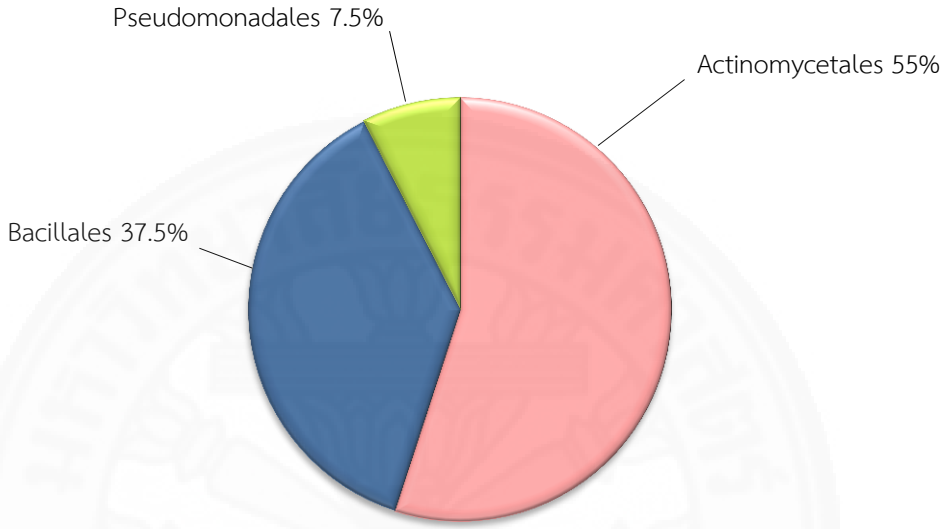


ภาพที่ 4.1 แสดงสัดส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่นกับฐานข้อมูล NCBI

อันดับแบคทีเรีย	ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี	ค่าเฉลี่ยความเหมือน (%)	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Actinomycetales	*Arthrobacter woluwensis* (NR_044894.1)	2	99	1347,1367
	Arthrobacter enclensis (NR_134699.1)	2	99	1052,1406
	Brachybacterium phenoliresistens (NR_043966.1)	2	99	1401,1402
	Tsukamurella inchonensis (NR_041804.1)	1	99	1348
	Tsukamurella paurometabola (NR_074458.1)	1	99	1324
	Microbacterium sp.	1	98	894
	Microbacterium testaceum (NR_074641.1)	1	99	1401
	Unknown	1	<95	1314
Bacillales	*Bacillus cereus* (NR_074540.1)	3	99	1121,1358,1366
	Bacillus subtilis (NR_102783.1)	2	99	1425,1431
	Bacillus licheniformis (NR_118996.1)	2	99	1415,1435
	Bacillus firmus (NR_112635.1)	1	99	1424
	Bacillus sp.	1	97	825
	Lysinibacillus xylanilyticus (NR_116698.1)	1	99	744
	Lysinibacillus sp.	1	97	896
	Unknown	1	<95	459
Pseudomonadales	*Acinetobacter pittii* (NR_117621.1)	3	95-98	1119,1277,1278
	Pseudomonas denitrificans (NR_102805.1)	1	99	745
	Unknown	1	<95	599
Rhizobiales	*Ochrobactrum anthropi* (NR_074243.1)	1	99	1339
	Ochrobactrum haematophilum (NR_042588.1)	1	99	1372
	Agrobacterium tumefaciens (NR_041396.1)	1	99	897
Burkholderiales	*Achromobacter mucicolens* (NR_117613.1)	1	99	1427
	Unknown	1	<95	675
Sphingobacteriales	*Sphingobacterium* sp. (NR_074508.1)	2	95-98	1363,1408
Xanthomonadales	*Stenotrophomonas maltophilia* (NR_041577.1)	1	99	1431
Alteromonadales	*Oceanimonas* sp. (NR_074966.1)	1	97	889
Lactobacillales	*Enterococcus casseliflavus* (NR_102793.1)	1	99	1122

พื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี ตัวอย่างโคโลนี 40 โคโลนี จำแนกเป็นแบคทีเรียจาก 3 order 10 genus 21 species ได้แก่ order Actinomycetales พบมากที่สุด (22 โคโลนี จำแนกเป็น 12 species) รองลงมา คือ order Bacillales (15 โคโลนี จำแนกเป็น 7 species) และ Pseudomonadales (3 โคโลนี จำแนกเป็น 2 species) (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.3)

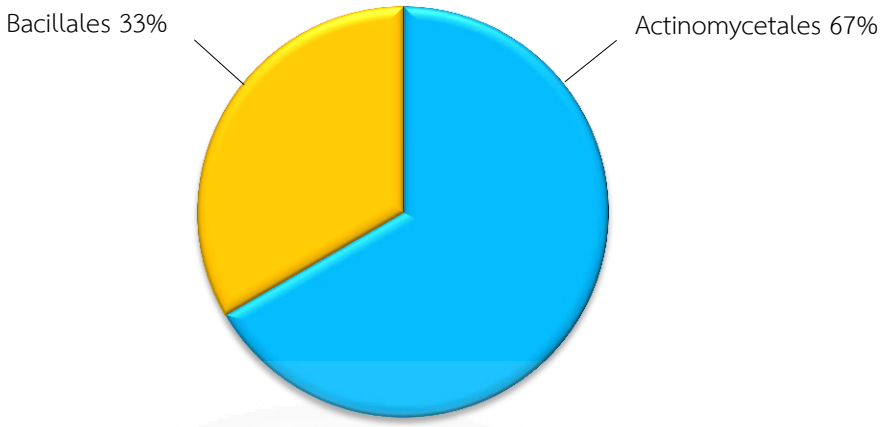


ภาพที่ 4.2 แสดงสัดส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานีกับฐานข้อมูล NCBI

อันดับแบคทีเรีย	ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี	ค่าเฉลี่ยความเหมือน (%)	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Actinomycetales	*Arthrobacter nicotianae* (NR_026190.1)	6	99	1342,1376,1388,1390,1401, 1404
	Arthrobacter mysorens (NR_025613.1)	2	99	1219,1306
	Arthrobacter oryzae (NR_041545.1)	1	98	967
	Brachybacterium phenoliresistens (NR_043966.1)	4	99	1386,1393,1395,1407
	Microbacterium testaceum (NR_026163.1)	2	99	1268
	Microbacterium esteraromaticum (NR_026468.1)	1	99	1269
	Microbacterium sp.	1	97	1120
	Microbacterium ginsengiterrae (NR_116483.1)	1	99	1391
	Tsukamurella inchonensis (NR_041804.1)	1	99	1391
	Brevibacterium epidermidis (NR_029262.1)	1	99	1396
	Rhodococcus corynebacterioides (NR_041873.1)	1	99	1397
	Mycobacterium mageritense (NR_115232.1)	1	99	1406
Bacillales	*Bacillus licheniformis* (NR_118996.1)	7	99	1411-1444
	Bacillus endophyticus (NR_025122.1)	2	99	1430,1436
	Bacillus safensis (NR_113945.1)	1	99	1420
	Bacillus cereus (NR_074540.1)	1	99	894
	Bacillus subtilis (NR_113265.1)	1	99	1433
	Lysinibacillus fusiformis (NR_112569.1)	1	99	1427
	Unknown	2	<95	930,991
Pseudomonadales	*Acinetobacter junii* (NR_117623.1)	2	99	1353,1430
	Acinetobacter sp.	1	98	1320

พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ตัวอย่างโคโลนี 39 โคโลนี จำแนกเป็นแบคทีเรียจาก 2 order 7 genus 18 species โดยพบแบคทีเรีย order Actinomycetales เป็นสัดส่วนมากที่สุด (26 โคโลนี จำแนกเป็น 14 species) และ Bacillales (13 โคโลนี จำแนกเป็น 4 species) (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.3 แสดงสัดส่วนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นกับฐานข้อมูล NCBI

อันดับแบคทีเรีย	ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี	ค่าเฉลี่ยความเหมือน (%)	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Actinomycetales	*Arthrobacter* sp. (NR_074590.1)	4	95-98	1002,1088,1203, 1424
	Microbacterium arabinogalactanolyticum (NR_044932.1)	2	99	1315,1354
	Microbacterium sp. (NR_026163.1)	2	95-98	1293,1318
	Microbacterium insulae (NR_044440.1)	2	99	1271,1337
	Microbacterium testaceum (NR_026163.1)	2	99	1339,1341
	Microbacterium jejuense (NR_134085.1)	1	99	1269
	Microbacterium flavum (NR_041562.1)	1	99	1300
	Microbacterium ginsengiterrae (NR_116483.1)	1	99	1313
	Microbacterium enclense (NR_136462.1)	1	99	1343
	Tsukamurella pulmonis (NR_029302.1)	2	99	1378,1391
	Rhodococcus corynebacterioides (NR_041873.1)	2	99	1335, 1392
	Arthrobacter woluwensis (NR_044894.1)	1	99	1388
	Arthrobacter ureafaciens (NR_029281.1)	1	99	1267
	Curtobacterium oceanosedimentum (NR_104839.1)	1	99	1396
	Micrococcus endophyticus (NR_044365.1)	1	99	967
	Unknown	2	<95	1225,1385
Bacillales	*Bacillus* sp.	5	95-98	527,663,745,747, 1072
	Bacillus cereus (NR_074540.1)	3	99	746,971,1436
	Bacillus megaterium (NR_112636.1)	2	99	1418,1433
	Bacillus subtilis (NR_113265.1)	1	99	1420
	Unknown	2	<95	743,1114

จากการศึกษาทั้ง 3 พื้นที่ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จัดอยู่ใน order Actinomycetales และ Bacillales ชนิดแบคทีเรียใน order Actinomycetales ที่พบ เช่น *M. testaceum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็น endophyte พืช คือ อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืชแบบพึ่งพาอาศัย ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืช สามารถพบได้ในรากฝ้าย (Zinniel et al., 2002) และพบได้ในใบของมันฝรั่ง ซึ่งมี AHL-degrading genes ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Morohoshi et al., 2011) ส่วนแบคทีเรีย *Tsukamurella inchonensis* พบบริเวณข้อของถั่วเหลือง (*Glycine soja*) (Hung and Annapurna, 2004) แบคทีเรีย genus *Arthrobacter* ส่วนมากพบทั่วไปในดิน (Dorothy and Ronald, 2006) แต่มีบางชนิดสามารถพบได้ในแมลง เช่น *A. woluwensis* คัดแยกจากแมลงช้าง (*Myrmeleon bore*) ซึ่งเป็นแมลงตัวห้ำ เมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้ฉีดเข้าสู่ตัวหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) พบว่ามีผลทำให้หนอนตาย (Nishiwaki et al., 2007) ส่วน *A. nicotianae* มักพบในดินหรืออาศัยอยู่บริเวณรากพืช (Wang, 2015) แต่ยังไม่ทราบถึงบทบาทของแบคทีเรียชนิดนี้อย่างชัดเจน แบคทีเรียใน order Bacillales พบ *B. cereus* และ *B. megaterium* โดยคัดแยกจากแมลงช้าง ซึ่งเป็นแมลงตัวห้ำ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ฉีดเข้าสู่ตัวหนอนกระทู้ผัก พบว่ามีผลทำให้หนอนตาย (Nishiwaki et al., 2007) เช่นเดียวกับการทดลองของ Consolo et al. (2010) ที่แยก *B. cereus* ได้จากเลือดของหนอนด้วง แบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. licheniformis* คัดแยกได้จากแมลงหวี่ขาว ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงชนิดนี้ (Ateyyat et al., 2009) ส่วน *B. endophyticus, B. licheniformis* และ *B. subtilis* พบว่าเป็น endophyte ในเนื้อเยื่อชั้นในของต้นฝ้าย (Reva et al., 2002)

แบคทีเรีย order Pseudomonadales ที่พบใน 2 พื้นที่ แบคทีเรีย genus *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงบางชนิด เช่น *P. plecoglossicida* และ *P. putida* คัดแยกได้จากแมลงหวี่ขาว (Ateyyat et al., 2009), *Pseudomonas* sp. คัดแยกจากหนอนด้วง (Consolo et al., 2010) และ *P. flourescens* คัดแยกจากเพลี้ยอ่อน (*T. aurantii*) (Sevim et al., 2012) และมักพบแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในส่วนของใบอ้อย (Magnani et al., 2010) นอกจากนี้พบแบคทีเรียใน order อื่นๆ โดยเป็นแบคทีเรียที่พบในพื้นที่ อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่นเพียงพื้นที่เดียว ได้แก่ แบคทีเรีย order Rhizobiales ได้แก่ *Ochrobactrum anthropic, O. haematophilum* และ *Agrobacterium tumefaciens* แบคทีเรีย order Sphingobacteriales ที่พบคือ *Sphingobacterium* sp. โดยแบคทีเรียใน order นี้ พบได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไป (Boone and Castenholz, 2001) แบคทีเรีย order Xanthomonadale ที่พบ คือ *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นแบคทีเรียที่พบภายในพืช และในดิน (Berg et al., 1999) แบคทีเรีย order Alteromonadales ชนิดที่พบคือ *Oceanimonas* sp. และ

แบคทีเรียใน order Lactobacillales ที่พบคือ *Enterococcus casseliflavus* แบคทีเรียใน genus นี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกของ Firmicutes (Gilmore et al., 2002)

แบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดเป็น endophyte พืช เช่น *B. endophyticus, B. licheniformis* และ *B. subtilis* พบในต้นฝ้าย (Reva et al., 2002) *M. testaceum* พบในใบของมันฝรั่ง (Morohoshi et al., 2011) ในรากฝ้าย (Zinniel et al., 2002) และใน red clover นอกจากนี้ยังพบว่า *A. tumefaciens* และ *B. megaterium* เป็น endophyte ของพืชชนิดนี้ด้วย (Sturz et al., 1997) ส่วน *B. subtilis, B. safensis,* และ *Lysinibacillus macrolides* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในอ้อย (Kruasuwan and Thamchaipenet, 2016)

แบคทีเรียที่พบในแมลงหรือเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลง เช่น *B. cereus, B. megaterium, A. woluwensis, B. subtilis, B. licheniformis* และ *O. haematophilum* และแบคทีเรียที่พบในดิน เช่น แบคทีเรียใน genus *Arthrobacter* (Mongodin et al., 2006) ได้แก่ *A. nicotianae, A. oryzae* และ *A. woluwensis* โดยมีรายงานว่าพบ *A. oryzae* ในดินนาที่ประเทศญี่ปุ่น (Kageyama et al., 2008) เป็นต้น

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงทั้ง 3 พื้นที่ พบว่าพื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น พบว่าแบคทีเรียมีความหลากหลายทั้งในระดับ order, genus และ species มากกว่าพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี และอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

เมื่อพิจารณาในระดับ order พบว่าทั้ง 3 พื้นที่ ส่วนใหญ่พบแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน 2 order เหมือนกัน คือ Actinomycetales และ Bacillales แบคทีเรียใน order Actinomycetales ได้แก่ genus *Arthrobacter* พบแบคทีเรียใน genus นี้เหมือนกันทั้ง 3 พื้นที่ โดยพื้นที่อำเภอกุมภวาปี พบ *A. nicotianae* 6 โคโลนี, *A. mysorens* 2 โคโลนี และ *A. oryzae* 1 โคโลนี พื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น พบ *A. woluwensis* 2 โคโลนี และ *A. enclensis* 2 โคโลนี ส่วนที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น พบ *Arthrobacter* sp. 4 โคโลนี, *A. ureafaciens* 1 โคโลนี และ *A. woluwensis* 1 โคโลนี นอกจากนี้ทั้ง 3 พื้นที่ยังพบชนิดของแบคทีเรียใน genus อื่นเหมือนกันส่วนมาก ได้แก่ genus *Brachybacterium, Tsukamurella* และ *Microbacterium* แต่พื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น พบชนิดของแบคทีเรียใน genus *Microbacterium* มีความหลากหลายมากกว่าอีก 2 พื้นที่

แบคทีเรียใน order Bacillales ทุกพื้นที่พบ genus *Bacillus* เช่นเดียวกัน พื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี พบ *B. licheniformis* 7 โคโลนี, *B. endophyticus* 2 โคโลนี, *B. safensis* 1 โคโลนี, *B. cereus* 1 โคโลนี และ *B. subtilis* 1 โคโลนี พื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น พบ *B. cereus, B. subtilis, B. licheniformis, B. firmus* และ *Bacillus* sp. เป็น

3, 2, 2, 1 และ 1 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น พบ *Bacillus* sp., *B. cereus, B. megaterium* และ *B. subtilis* เป็น 5, 3, 2 และ 1 โคโลนี ตามลำดับ ซึ่งในทุกพื้นที่พบชนิดที่เหมือนกัน

จากการศึกษาดังกล่าว เมื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่พบในพื้นที่ศึกษาทั้ง 3 พื้นที่กับความรุนแรงของการระบาดโรคใบขาวอ้อยที่เคยมีรายงานในอดีตว่า พื้นที่อำเภอกุมภวาปี มีการระบาดของโรคมากที่สุด รองลงมา คือ อำเภอเขาสวนกวาง และอำเภอเมือง มีการระบาดของโรคน้อยที่สุด พิจารณาแบคทีเรีย order Actinomycetales พบว่าทั้ง 3 พื้นที่มีการพบแบคทีเรีย genus *Arthrobacter* เหมือนกัน และปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่พบต่อพื้นที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาถึงแบคทีเรีย genus *Microbacterium* พบว่าพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่นที่มีการระบาดของโรคน้อย พบแบคทีเรียในสกุลนี้ 13 โคโลนี แต่อีก 2 พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคปานกลาง และสูงจะพบแบคทีเรีย genus นี้ 2 และ 5 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียใน order Bacillales genus *Bacillus* ในพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี พบ 12 โคโลนี พื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น พบ 9 โคโลนี และพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น พบ 11 โคโลนี ซึ่งพิจารณาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียใน genus นี้กับการระบาดของโรคแล้ว พบว่าทุกพื้นที่พบแบคทีเรียชนิดที่เหมือนกันและพบในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด

ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้ ชนิดของแบคทีเรียที่พบในแต่ละพื้นที่มีทั้งชนิดที่เหมือนกัน และชนิดที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแบคทีเรียที่พบกับระดับการระบาดของโรคได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่พบต่างกันนี้มีจำนวนหลายชนิด และจำนวนโคโลนีที่พบ ไม่มีความแตกต่างกัน และไม่สัมพันธ์กับการระบาดของโรคอย่างชัดเจน

จากการคัดแยกแบคทีเรีย และจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA ทั้ง 3 พื้นที่ศึกษา จากนั้นนำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับแมลงพาหะ โดยการคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียตามคุณลักษณะ ได้แก่ แบคทีเรียที่เป็น endophyte ของพืช เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลง และแบคทีเรียอาศัยอยู่ในดิน โดยแบคทีเรียที่พบจากแหล่งอาศัย ได้แก่ แมลง พืช หรือดิน มีแนวโน้มความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เนื่องจากแหล่งอาศัยของแบคทีเรียทั้ง 3 แหล่งนี้มีความสัมพันธ์กัน โดยคัดเลือกแบคทีเรียมา 6 ชนิด ได้แก่ *M. testaceum, B. licheniformis, B. subtilis, B. megaterium, A. woluwensis* และ *A. nicotianae* โดยพบว่า *M. testaceum* เป็น endophyte พืช มีบทบาทในการป้องกันเชื้อสาเหตุโรคพืช *B. licheniformis, B. subtilis* และ *B. megaterium* เป็น endophyte พืชและเป็นเชื้อสาเหตุก่อให้เกิดโรคกับแมลง เช่น ก่อให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาว *A. woluwensis* เป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคกับแมลง และ *A. nicotianae* เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน โดยอาศัยอยู่บริเวณรากพืช แต่ยังไม่ทราบถึงบทบาท

ที่ชัดเจน แบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

4.2 การศึกษาบทบาทของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

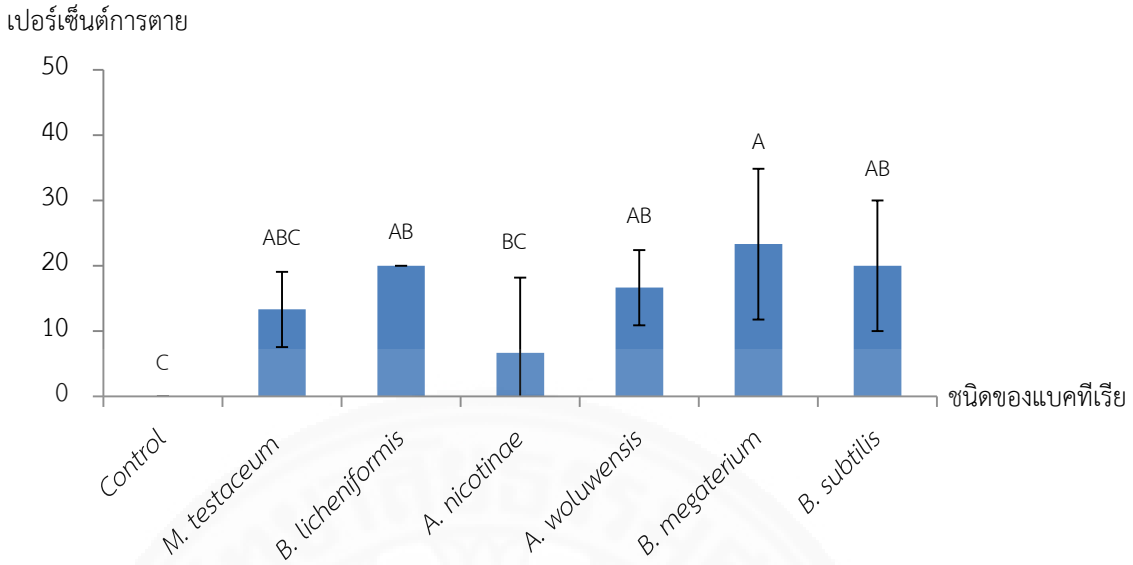
4.2.1 ทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

จากการทดลองเมื่อให้แมลงดูดกินเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *B. megaterium* ทำให้แมลงมีอัตราการตาย 23.33% *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ทำให้แมลงมีอัตราการตาย 20% เช่นเดียวกับการทดลองของ Ateyyat et al. (2009) พบว่าเมื่อให้แมลงหวี่ขาวดูดกิน *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cfu/ml ทำให้มีอัตราการตาย 18% และ 27% ตามลำดับ หลังจากที่ให้แมลงได้รับแบคทีเรีย *A. woluwensis* เป็นเวลา 5 วัน แมลงมีอัตราการตาย 16.66% เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Nishiwaki et al. (2007) ที่พบว่า แบคทีเรีย *A. woluwensis* ที่คัดแยกได้จากแมลงช้างซึ่งเป็นแมลงตัวห้ำ เมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้ฉีดเข้าสู่ตัวหนอนกระทู้ผัก พบว่าทำให้หนอนตาย 15% ส่วนแบคทีเรีย *M. testaceum* และ *A. nicotianae* ทำให้แมลงตาย 13.33% และ 6.66% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองของ Aksoy and Ozman-Sullivan (2008) ทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรีย *B. megaterium* ต่อเพลี้ยอ่อน พบว่าเชื้อแบคทีเรียทำให้เพลี้ยอ่อน มีอัตราการตายสูง 92-100% เมื่อให้เพลี้ยอ่อนได้รับแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8-10^9 cfu/ml เป็นเวลา 5 วัน แม้ว่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน แต่อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียที่ใช้นั้นต่าง strain กัน และทดสอบในแมลงต่างชนิดกัน จากการทดลอง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ทำให้แมลงมีอัตราการตายอยู่ระหว่าง 6.66-23.33% เมื่อได้รับเชื้อเป็นเวลา 7 วัน สิ่งทดลองมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ แมลงที่ได้รับเชื้อ *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *A. woluwensis* (ภาพที่ 4.4) โดยส่วนใหญ่แล้วพบว่า แมลงตายในช่วง 5-7 วัน หลังจากดูดกินแบคทีเรีย

จากการทดลองพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายค่อนข้างต่ำ มีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่แมลงดูดกินเข้าไปสามารถขับถ่ายออกมาได้โดยมูลหวานอาจลดประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียต่อแมลง ซึ่งในการทดลองของ Davidson et al. (2000) เมื่อให้แมลงหวี่ขาวดูดกินแบคทีเรีย และนำมูลหวานของตัวที่ดูดรับเชื้อนั้นมาตรวจสอบ พบว่า ในมูลหวานตรวจพบแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับที่ดูดรับเข้าไป ได้แก่ แบคทีเรีย *C. turbata* และ *E. cloacae* แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แมลงดูดรับเข้าไปภายในลำตัวจะถูกขับปะปนมากับมูลหวาน ในส่วนของแมลงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง คือ แบคทีเรีย *E. cloacae* เมื่อนำตัวแมลงที่ตาย

ไปตรวจดูด้วยกล้องอิเล็กตรอน พบว่า มีแบคทีเรียชนิดนี้จำนวนมาก และเนื้อเยื่อส่วนของทางเดินอาหารลดลง อาจมีสาเหตุมาจากการสร้างสารพิษของแบคทีเรียเมื่อเข้าสู่ตัวแมลง แบคทีเรียใน genus *Bacillus* เช่น *B. thuringiensis* มีกลไกการทำลายแมลงจากการสร้างสารพิษที่เรียกว่า deltaendotoxin ขบวนการสร้างสารพิษชนิดนี้ จะสร้างขึ้นในระหว่างที่เซลล์สร้างสปอร์ หลังจากที่สปอร์ และผนึกสารพิษสร้างเสร็จ เซลล์จะแตกออกเพื่อปล่อยสปอร์ และผลึกสารพิษออกมา สารพิษที่แมลงกินเข้าไปอยู่ในรูปของ protoxin เมื่อเข้าไปอยู่ที่กระเพาะซึ่งมีน้ำย่อยที่มีความเป็นด่างค่อนข้างสูง ทำให้เกิดขบวนการย่อย protoxin โดยน้ำย่อย (proteolytic) ออกมาเป็น active toxin สารพิษนี้จะไปอยู่ที่ผนังเซลล์ของกระเพาะอาหาร และทำลายผนังเซลล์ให้เป็นแผล น้ำย่อยที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะเข้าไปตามรอยแผลไปอยู่ที่ช่องว่างภายในลำตัว (hemocoel) ของแมลง ทำให้แมลงเกิดอาการชะงัก หยุดกินอาหาร สปอร์จะขยายพันธุ์อยู่ในลำไส้ และบางส่วนเข้าไปตามรอยแผลแบ่งตัวอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ ในตัวแมลง เป็นสาเหตุของ septicemia ทำให้แมลงตายในที่สุด (อัจฉรา, 2544) แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียทำให้แมลงตาย หรือก่อให้เกิดโรคกับแมลงได้ โดยการเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อในส่วนของทางเดินอาหาร แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียบางส่วนอาจถูกขับถ่ายออกมาทางมูลหวาน จึงอาจทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเนื้อเยื่อลดลง และมีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำ

นอกจากการก่อให้เกิดโรคโดยการสร้างสารพิษแล้ว แบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *B. firmus, B. pantothenticus, B. polymyxa, B. pumilus* และ *B. maquarienis* มีการผลิตเอนไซม์ protease และ chitinase (จาตุรงค์ และสุพรรนี, 2553) โดยเอนไซม์ protease ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ chitinase ย่อย chitin ซึ่ง protein และ chitin เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในร่างกายแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง chitin เป็นสารสำคัญของผนังหุ้มลำตัว ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างในการป้องกัน และสร้างความแข็งแรงให้กับร่างกายแมลง ดังนั้นเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่แบคทีเรียสร้างขึ้นอาจมีส่วนช่วยในการย่อย หรือทำลายส่วนประกอบของตัวแมลง แบคทีเรียใน genus *Arthrobacter* ยังไม่ทราบถึงกลไกการเข้าทำลายแมลงอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม Nishiwaki et al. (2007) ได้ศึกษาถึงการเข้าทำลายหนอนกระทู้โดยการปลดปล่อยสารพิษของแมลงช้าง แมลงจะปลดปล่อยสารพิษที่เรียกว่า ALMB-toxin เข้าสู่ลำตัวของเหยื่อ ทำให้เหยื่อค่อยๆ หยุดนิ่ง และลำตัวกลายเป็นสีน้ำตาล อาการที่พบนี้มีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับอาการของแมลงที่ได้รับสารพิษจากแบคทีเรีย ซึ่งจากการคัดแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของแมลงช้าง พบว่าเป็นแบคทีเรีย *A. woluwensis* ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียชนิดนี้อาจเป็นตัวสร้างสารพิษให้กับแมลงช้างในการเข้าทำลายศัตรู ส่วนแบคทีเรียใน genus *Microbacterium* ยังไม่เคยมีการศึกษาการก่อให้เกิดโรคหรือกลไกการเข้าทำลายแมลง



ภาพที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน

4.2.2 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล

การทดลองให้แมลงดูดกินแบคทีเรียชนิดที่คัดเลือกที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cell/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจับคู่เพศผู้เพศเมียใส่กรงละ 1 คู่ ตรวจนับจำนวนไข่ของแมลงจนกระทั่งแมลงตาย พบว่า ในกลุ่มควบคุม แมลงมีการวางไข่โดยเฉลี่ย 84.53 ฟอง แมลงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด คือ *B. licheniformis, A. nicotinae, B. megaterium, M. testaceum, B. subtilis* และ *A. woluwensis* มีการวางไข่โดยเฉลี่ยเป็น 59.20, 54.13, 49.00, 47.47, 33.47 และ 21.07 ฟอง ตามลำดับ แมลงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียมีการวางไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *B. subtilis* และ *A. woluwensis* ทำให้แมลงมีอัตราการวางไข่ลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ *A. nicotinae, B. megaterium, M. testaceum* และ *B. licheniformis* (ตารางที่ 4.5)

แบคทีเรียก่อให้เกิดโรคกับแมลงสามารถทำให้แมลงตายได้ภายในระยะเวลา 3-5 วัน อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียบางชนิดทำให้การเจริญเติบโตของแมลงผิดปกติ เช่น เพลี้ยอ่อนที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Er. aphidicola* ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml ทำให้น้ำหนักตัวของเพลี้ยอ่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแบคทีเรียชนิดนี้ยับยั้งการลอกคราบของตัวอ่อนในระยะก่อนเป็นตัวเต็มวัย (Harada and Ishikawa, 1997) ซึ่งอาจเป็นตัวยับยั้งการขยายพันธุ์ของแมลงอีกทางหนึ่ง เนื่องจากแมลงมีสภาพร่างกายไม่สมบูรณ์ และวงจรชีวิตของแมลงมีระยะตัวอ่อนที่นานขึ้น การสร้างเอนไซม์ chitinase ของแบคทีเรีย *S. marcescens* มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนหนอนกระทู้ โดย

ตัวอ่อนที่ได้รับแบคทีเรียที่ความเข้มข้นน้อยกว่า (sublethal dose) ระดับที่ทำให้ตาย (lethal dose) จะทำให้ตัวหนอน และดักแด้มีน้ำหนักลดลง ดักแด้ผิดปกติ และมีระยะเป็นตัวหนอนยาวนานขึ้น (Chetana et al., 2015) อาจทำให้การขยายพันธุ์ของผีเสื้อหนอนกระทู้ชนิดนี้เกิดช้าลง นอกจากนี้การสร้างสารพิษของแบคทีเรียที่อยู่ในแมลงบางชนิด ทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นเป็นเชื้อก่อให้เกิดโรค และทำให้การเจริญของแมลงผิดปกติ เช่น *Er. persicinus, B. pumilus* และ *Exiquobacterium acetylicum* เป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาว ทำให้แมลงตายได้ โดยการสร้างสาร antimicrobial metabolites ที่ส่งผลเสียต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแมลงหวี่ขาวแบบพึ่งพาอาศัย (Ateyyat et al., 2009) การสร้างสารพิษของแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคอาจส่งผลต่อตัวแมลง โดยสารพิษอาจทำลายเนื้อเยื่อของทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ หรือทำลายแบคทีเรียที่ช่วยสร้างสารอาหารที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของแมลง แมลงจึงไม่ได้รับสารอาหารที่จำเป็น เกิดการขาดสารอาหาร และร่างกายเกิดความผิดปกติ

ตารางที่ 4.5 จำนวนไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cell/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนการผสมพันธุ์

สิ่งทดลอง	จำนวนไข่โดยเฉลี่ยต่อตัว (ฟอง)*
กลุ่มควบคุม (Control)	$84.53±42.61^{A}$
M. testaceum	$47.47±23.51^{BC}$
B. licheniformis	$59.20±32.14^{B}$
A. nicotinae	$54.13±36.87^{BC}$
A. woluwensis	$21.07±20.32^{D}$
B. megaterium	$49.00±38.89^{BC}$
B. subtilis	$33.47±18.69^{CD}$

*ค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ตามหลังด้วยอักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.3 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*)

การทดลองให้แมลงดูดกินแบคทีเรียชนิดที่คัดเลือกที่ความเข้มข้น $1x10^8$ cell/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนำแมลงไปดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาจากต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาว 1 วัน (Acquisition Access Period ; AAP) เลี้ยงแมลงด้วยต้นอ้อยปกติเป็นเวลา 14 และ 21 วัน เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาหะ (Latent Period; LP) หรือระยะเวลาการบ่มเชื้อ จากนั้นให้แมลงถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยปกติเป็นเวลา 1 วัน เก็บต้นอ้อยไว้ในโรงเรือน ดูแลตามปกติเป็นเวลา 30 วัน ตัดยอดของต้นอ้อยมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาด 210 คู่เบส โดยเทคนิค Nested PCR ต้นอ้อยที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงที่บ่มเชื้อไฟโตพลาสมาไว้นาน 14 วัน เมื่อตรวจสอบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเทคนิค Nested PCR ตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนในทุกสิ่งทดลอง (ตารางที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่า แมลงไม่มีการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นอ้อย ส่วนแมลงที่บ่มเชื้อไว้นาน 21 วัน ทุกสิ่งทดลองมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ 5-15% โดยในกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่แมลงไม่ได้ดูดกินแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ 15% แมลงที่ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 10% แมลงที่ดูดกินเชื้อ *A. nicotinae, A. woluwensis* และ *B. subtilis* ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 5% แมลงที่ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย *M. testaceum* และ *B. licheniformis* ตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา (ตารางที่ 4.7) จากการทดลองเป็นไปได้ว่าแมลงไม่ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสู่ต้นอ้อย อาจมีสาเหตุมาจากการใช้พันธุ์อ้อยในการถ่ายทอดเชื้อที่ไม่เหมาะสม อ้อยที่นำมาใช้ คือ พันธุ์สายน้ำผึ้ง

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 14 วัน และบ่มเชื้อในต้นอ้อย 30 วัน

สิ่งทดลอง	สัดส่วนต้นอ้อยที่แสดงอาการของโรคต่อต้นอ้อยที่ใช้ทดสอบ (ต้น/ต้น)
กลุ่มควบคุม (Control)	(0/20)
M. testaceum	(0/20)
B. licheniformis	(0/20)
A. nicotinae	(0/20)
A. woluwensis	(0/20)
B. megaterium	(0/20)
B. subtilis	(0/20)

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 21 วัน และบ่มเชื้อในต้นอ้อย 30 วัน

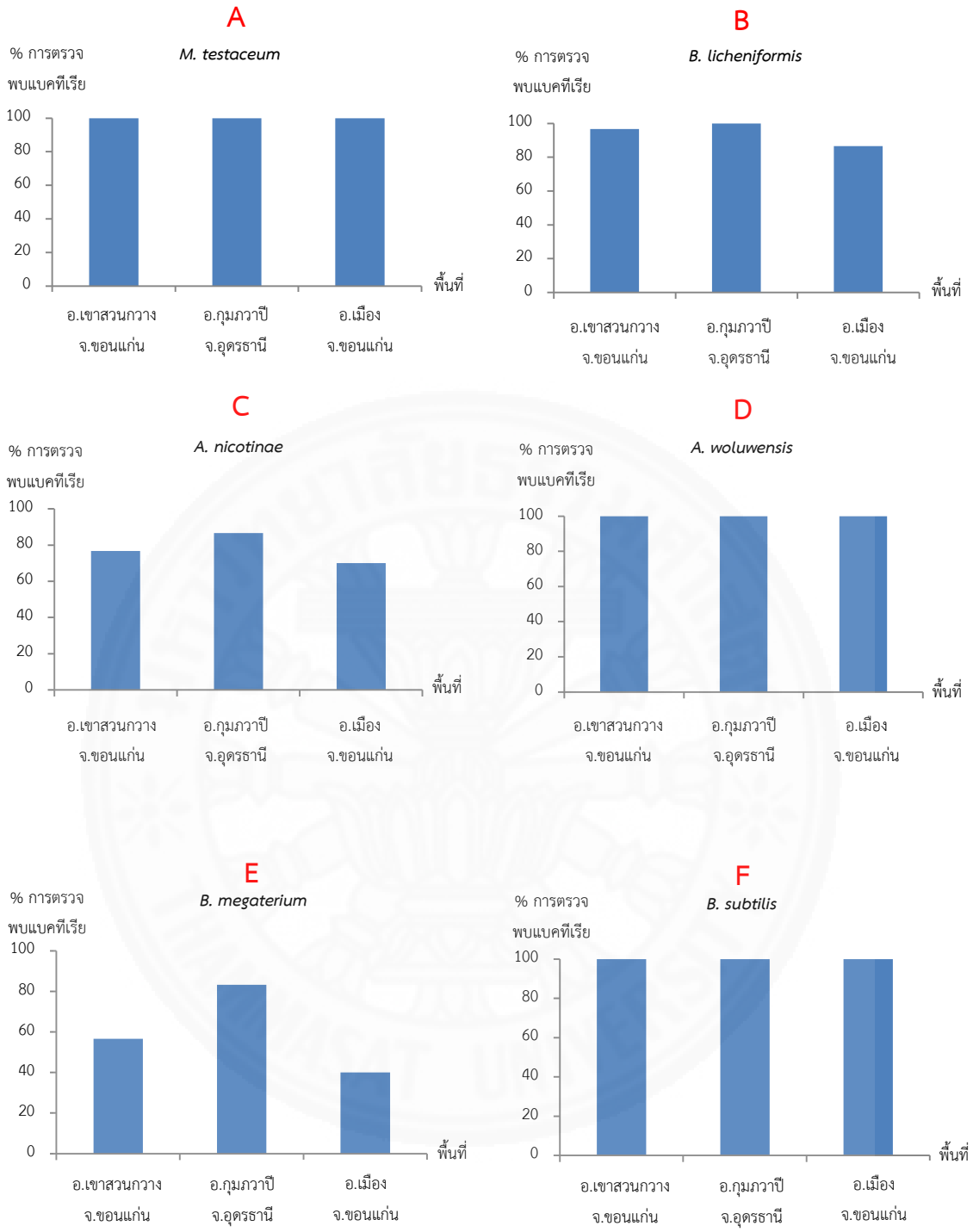
สิ่งทดลอง	สัดส่วนต้นอ้อยที่แสดงอาการของโรคต่อต้นอ้อยที่ใช้ทดสอบ (ต้น/ต้น)
กลุ่มควบคุม (Control)	(3/20)
M. testaceum	(0/20)
B. licheniformis	(0/20)
A. nicotinae	(1/20)
A. woluwensis	(1/20)
B. megaterium	(2/20)
B. subtilis	(1/20)

4.4 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และในต้นอ้อย

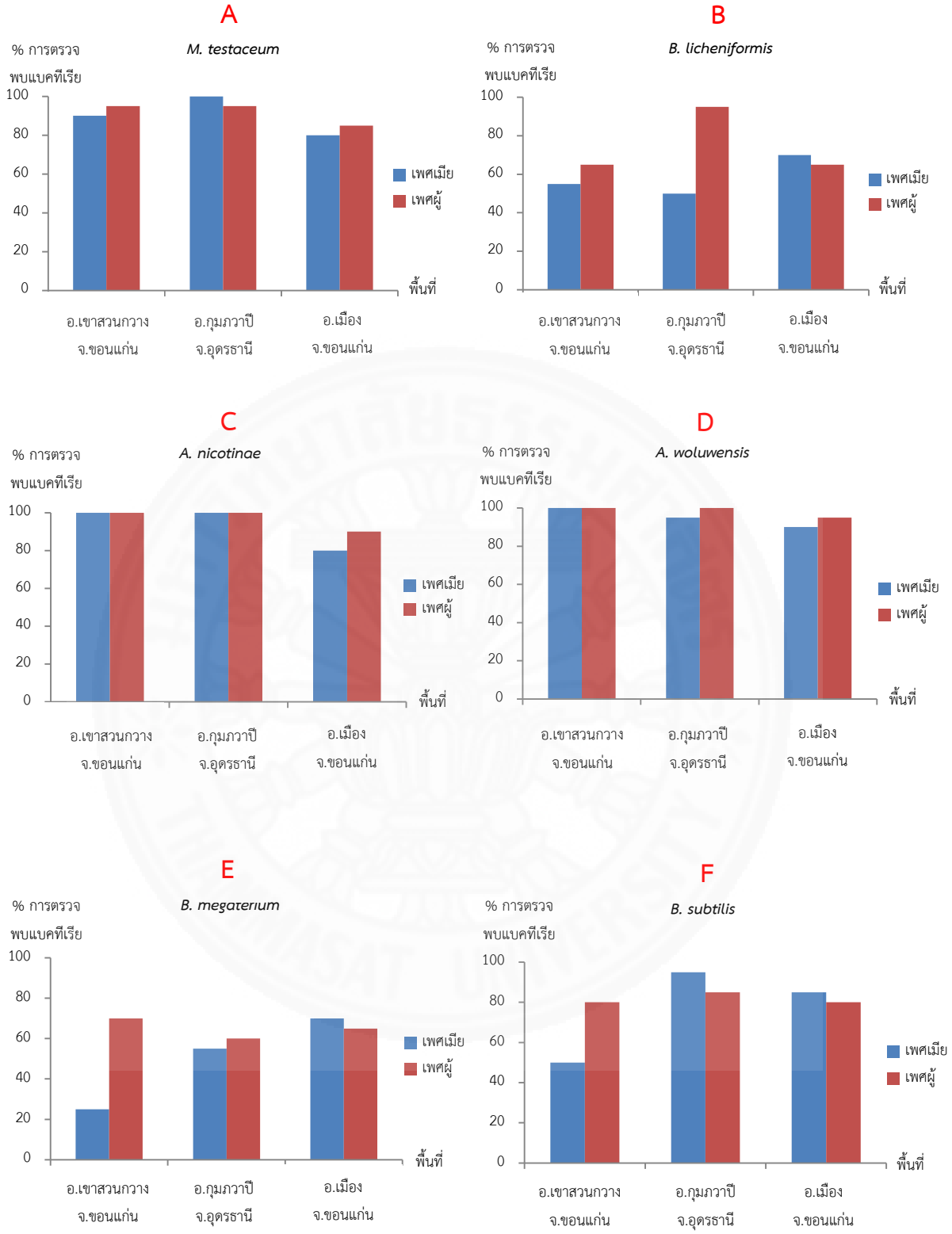
การตรวจสอบแบคทีเรียในต้นอ้อยพืชอาศัยของแมลงพาหะ ตรวจพบ *M. testaceum A. woluwensis,* และ *B. subtilis* ในต้นอ้อย 100% ของจำนวนอ้อยทั้งหมด จากทั้ง 3 พื้นที่ ตรวจพบ *B. licheniformis* 95-100%, *A. nicotinae* 70-86.66% และ *B. megaterium* 40-83.33% (ภาพที่ 4.5) เช่นเดียวกับการทดลองของ Kruasuwan and Thamchaipenet (2016) ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากรากอ้อยในประเทศไทย พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรีย *B. subtilis* ออกมาได้ อย่างไรก็ตามในการทดลองอื่นให้ผลที่แตกต่างออกไป เช่น การรายงานของ Magnani et al. (2010) ศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียของต้นอ้อยในประเทศบราซิล พบว่า พบแบคทีเรียในลำต้นอ้อย ได้แก่ *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. และ *Citrobacter* sp. และในใบพบแบคทีเรีย คือ *Pseudomonas* sp. ซึ่งชนิดของแบคทีเรียที่พบอาจมีปัจจัยของสภาพแวดล้อม เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน สภาพอากาศของแต่ละพื้นที่ เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีคุณสมบัติหรือลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน

การตรวจสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกในแมลงพาหะ พบว่า มีการตรวจพบแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ในประชากรแมลงพาหะทั้งในเพศผู้และเพศเมีย โดยเปอร์เซ็นต์การตรวจพบแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *M. testaceum* (80-100%), *B. licheniformis* (50-95%), *A. woluwensis* (90-100%), *A. nicotinae* (80-100%), *B. megaterium* (25-70%) และ *B. subtilis* (50-95%) (ภาพที่ 4.6) แบคทีเรียที่คัดแยก และตรวจพบในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล สามารถพบได้จากแมลงชนิดอื่นอีกด้วย เช่น พบ *B. megaterium* และ *A. woluwensis* โดยคัดแยกได้จากแมลงช้าง (Nishiwaki et al., 2007) แบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. licheniformis* คัดแยกได้จากแมลงหวี่ขาว (Ateyyat et al., 2009)

จากการตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ในแมลงพาหะและในต้นอ้อยพืชอาศัย ทำให้ทราบว่า นอกจากแบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในแมลงแล้ว ยังสามารถอาศัยอยู่ในพืชอาศัยของแมลงอีกด้วย เป็นไปได้ว่าการดูดกินน้ำเลี้ยงต้นอ้อยของแมลงพาหะจะเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดแบคทีเรียระหว่างพืชกับแมลง



ภาพที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบแบคทีเรีย 6 ชนิด ในต้นอ้อย (A) *M. testaceum* (B) *B. licheniformis* (C) *A. nicotinae* (D) *A. woluwensis* (E) *B. megaterium* (F) *B. subtilis*



ภาพที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบแบคทีเรีย 6 ชนิด ในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*): (A) *M. testaceum* (B) *B. licheniformis* (C) *A. nicotinae* (D) *A. woluwensis* (E) *B. megaterium* (F) *B. subtilis*

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) จำนวน 117 โคโลนี จำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียจาก 9 order 18 genus 45 species ได้แก่ order Bacillales, Actinomycetales, Pseudomonadales, Burkholderiales, Sphingobacteriales, Xanthomonadales, Alteromonadales, Rhizobiales, และ Lactobacillales โดยแมลงที่เก็บในพื้นที่อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น พบแบคทีเรีย 38 โคโลนี จัดเป็นแบคทีเรียใน 9 order 15 genus 24 species ได้แก่ order Actinomycetales (7 species), Bacillales (7 species), Pseudomonadales (2 species), Rhizobiales (3 species), Burkholderiales (1 species), Sphingobacteriales (1 species), Xanthomonadales (1 species), Alteromonadales (1 species) และ Lactobacillales (1 species) พื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี ตัวอย่างโคโลนี 40 โคโลนี เป็นแบคทีเรียจาก 3 order 10 genus และ 21 species ได้แก่ order Actinomycetales (12 species), Bacillales (7 species) และ Pseudomonadales (2 species) และพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ตัวอย่างโคโลนี 39 โคโลนี พบว่าเป็นแบคทีเรียจาก 2 order 7 genus และ 18 species ได้แก่ order Actinomycetales (14 species) และ Bacillales (4 species)

2. การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียต่อเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล พบว่า แบคทีเรียทำให้แมลงมีการตายอยู่ระหว่าง 6.66-23.33% โดย *B. megaterium* ทำให้แมลงตาย 23.33% *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ทำให้แมลงตาย 20%, *A. woluwensis* ทำให้แมลงตาย 16.66%, *M. testaceum* และ *A. nicotianae* ทำให้แมลงตาย 13.33% และ 6.66% ตามลำดับ

3. การทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล พบว่าแมลงที่ไม่ได้ดูดกินเชื้อแบคทีเรียมีการวางไข่โดยเฉลี่ย 84.53 ฟอง/ตัว แมลงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *B. licheniformis, A. nicotinae, B. megaterium, M. testaceum, B. subtilis* และ *A. woluwensis* วางไข่โดยเฉลี่ยเป็น 59.20, 54.13, 49.00, 47.47, 33.47 และ 21.07 ฟอง/ตัว ตามลำดับ แบคทีเรียทำให้แมลงวางไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย *A. woluwensis*

ทำให้แมลงวางไข่ลดลงมากที่สุด รองลงมา คือ *B. subtilis, A. nicotinae, B. megaterium, M. testaceum* และ *B. licheniformis* ตามลำดับ

4. การทดสอบผลของแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล พบว่าต้นอ้อยที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงที่บ่มเชื้อไว้นาน 21 วัน มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ 5-15% ส่วนแมลงไม่ได้ดูดกินแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ 15% แมลงที่ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 10% แมลงที่ดูดกินเชื้อ *A. nicotinae, A. woluwensis* และ *B. subtilis* ถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 5% แมลงที่ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย *M. testaceum* และ *B. licheniformis* ตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา และแมลงที่บ่มเชื้อไฟโตพลาสมาไว้นาน 14 วัน ตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา

5. การตรวจสอบการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลและในต้นอ้อย ตรวจพบ *M. testaceum, A. woluwensis* และ *B. subtilis* 100% *B. licheniformis* 95-100%, *A. nicotinae* 70-86.66%, *B. megaterium* 40-83.33%, และในประชากรแมลงพาหะ ตรวจพบ *M. testaceum* 80-100%, *B. licheniformis* 50-95%, *A. woluwensis* 90-100%, *A. nicotinae* 80-100%, *B. megaterium* 25-70% และ *B. subtilis* 50-95%

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลอง การก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียต่อแมลงพาหะ พบว่า แบคทีเรียสามารถก่อให้เกิดโรคต่อแมลงได้ แต่ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การตายค่อนข้างต่ำ อาจเลือกชนิดของแบคทีเรียหรือ strain อื่นมาทดสอบ

2. จากการทดลอง การตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และคัดเลือกนำมาทดสอบในการทดลอง สามารถตรวจพบได้ในต้นอ้อยพืชอาศัย แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่พบในแมลงสามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งภายในตัวแมลงและภายในต้นอ้อย เป็นไปได้ว่าการดูดกินน้ำเลี้ยงต้นอ้อยของแมลงพาหะอาจจะเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดแบคทีเรียระหว่างพืชกับแมลง ซึ่งอาจเป็นเรื่องง่ายในการที่จะใช้แบคทีเรียเหล่านี้ในการควบคุมแมลงพาหะจากแหล่งอาศัยและแหล่งอาหาร

3. จาการทดลอง แบคทีเรียมีผลทำให้การวางไข่ของแมลงลดลง แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อถึงอัตราการฟักเป็นตัวอ่อน เพื่อทราบความแน่ชัดว่าแบคทีเรียมีส่วนช่วยให้การขยายพันธุ์ของแมลงลดลงอย่างแท้จริง

4. จากการทดลอง ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะยังไม่พบการถ่ายทอดเชื้อได้สำเร็จ เนื่องจากการบ่มเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยอาจใช้เวลาน้อยไป หากมีการศึกษาในอนาคตควรบ่มเชื้อไว้ให้นานกว่านี้

5. จากการทดลอง เชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่อแมลง และมีผลต่อการขยายพันธุ์โดยการวางไข่ของแมลง อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพ และการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมแมลงพาหะชนิดนี้

รายการอ้างอิง

กลุ่มพัฒนาสื่อส่งเสริมเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร. แปลงพันธุ์สะอาดป้องกันโรคใบขาวอ้อยโดยชุมชน http://agrimedia.com/home/news_detail/102. ค้นเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน 2558.

จาตุรงค์ จงจีน และสุพรรนี แก่นสาร อะโอกิ. การคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสจากดิน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41: 317-320.

แฉล้ม มาศวรรณา และสุพัตรา ดลโสภณ. 2551. “โรคใบขาวอ้อย การระบาดที่เรื้อรังและรุนแรง”. กสิกร. 81: 45-54.

ชุตินันท์ ชูสาย. 2541. การตรวจสอบและแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในอ้อยและแมลงพาหะโดยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. T&R CELECA PRODUCTS LTD., PART, ขอนแก่น. 80 หน้า.

พิสุทธิ์ เอกอำนวย. 2553. โรคและแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่สวนสัตว์แมลงสยาม , เชียงใหม่ 591 หน้า.

ยุพา หาญบุญทรง พิศาล ศิริธร และชุตินันท์ ชูสาย. 2547. การตรวจชนิดแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยและความสามารถในการถ่ายทอดโรคสู่อ้อย. สาขาวิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ยุพา หาญบุญทรง. 2552. การศึกษาสภาพนิเวศวิทยา พฤติกรรม ประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคของแมลงพาหะชนิดใหม่นำโรคใบขาวอ้อยและแนวทางการป้องกันกำจัด. สาขาวิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วรรณภา ฤทธิสนธิ์. 2547. การตรวจสอบแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยและการถ่ายทอดโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุจิตตรา ปะนันโต ภาคภูมิ ตันเตชสาธิต ศิริลักษณ์ จิตรอักษร รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ และกรรณิการ์ สัจจาพันธ์. 2556. เอนโดไฟติกแบคทีเรียและผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว. แก่นเกษตร. 41: 457-468.

สุภาพร กลิ่นคง. 2552. ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท ศูนย์การพิมพ์เพชรรุ่ง จำกัด, นนทบุรี. 118 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2558. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยประจำปีการผลิต 2557/58.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที การควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 183-203.

อนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2534. โครงการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อย จังหวัดอุดรธานี. เอกสารรายงานผลการป้องกันกำจัดโรคใบขาว. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทรายกระทรวงอุตสาหกรรม.

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.

Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M. and Arzone, A. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. Insect Mol. Biol. 6: 115-121.

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

Baumann, P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insect. Annu. Rev. Microbiol. 59: 155-189.

Berg, G., Roskot, N. and Smalla, K. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J. Clin. Microbiol. 37: 3594–3600.

Bertaccini, A. and Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. Phytopathol Mediterr. 48: 355–378.

Boone D. R. and R.W. Castenholz. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, volume 1 (The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria). Springer-Verlag, New York. 722 p.

Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H. and Civerolo, E. 2009. A phytoplasma related to *Candidatus* phytoplasma asteris detected in citrus showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong, P.R. China. Phytopathology. 99: 236-242.

Chetana, A., Paul, S., Tripathi, V., Paul, B. and Khan, M. A. 2015. Chitinolytic activity in *Serratia marcescens* (strain SEN) and potency against different larval instars of *Spodoptera litura* with effect of sublethal doses on insect development. Iobc. 60: 631-640.

Consolo, V. F., Mucci, V., Salerno, G. L. and Bero, C. M. 2010. Pathogenicity of bacterial isolates to *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae). Biocontrol Sci Techn. 20: 475-482.

Davidson, E. W., Rosell, R. C. and Hendrix, D. L. 2000. Culturable bacteria associated with the whitefly, *Bemisia Argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Fla. Entomol. 83: 159-171.

Dorothy, J. and Keddie, R. M. 2006. The genus *Arthrobacter*. The Prokaryotes. 3: 945-960.

Douglas AE. 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. Biol. Rev. Camb. Philos. 64: 409-434.

Erturk, O. and Demirbag, Z. 2006. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). J. Biotechnol. 5: 2081-2085.

Gai, C., S. Dini-Andreote F., Andreote, F. D., Lopes, J. R. S., Araújo, W. L., Miller, T. A., Azevedo, J. L. and La cava, P. T. 2011. Endophytic bacteria associated to sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae), insect vectors of *Xylella fastidiosa* sub sp. *Pauca.* J. Plant Pathol. Microbiol. 2: 1-8.

Garnier, G., Foissac, X., Gaurivaud, P., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C. and Bove, J. M. 2001. Mycoplasmas, Plant, insect vectors: a matrimonial triangle. Life Sci. 324: 923-928.

Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Courvalin, P., Dunny, G. M., Murray B. E. and Rice L. B. 2002. The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. ASM Press. Washington, D.C. 439 p.

Gond, K. S., Bergen M. S., Torres, M. S. and White Jr, J. F. 2015. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. Microbol. Res. 172: 79-87.

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.

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.

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

Hung, P. Q. and Annapurna, K. 2004. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*glycine* sp.). Omonrice. 12: 92-101.

Iniguez, A. L., Dong, Y., and Triplett, E. W. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumonia* 342. Mol. Plant Microbe. Interact. 17: 1078-1085.

Jiang, Z., Xia, F., Johnson, K. W., Bartom, E., Tuteja, J. H., Stevens, R., Grossman, R. L., Brumin, M., White, K. P. and Ghanim, M. 2012. Genome sequences of the primary endosymbiont candidatus *Portiera aleyrodidarum* in the whitefly *Bemisia tabaci* B and Q biotypes. J. Bacteriol. 194: 6678-6679.

Kageyama, A., Morisaki, K., Omura, S. and Takahashi, Y. 2008. *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Micr. 58: 53-56.

Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K. and Sato, M. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis.* Phytopathology. 90: 909-914.

Kruasuwan, W. and Thamchaipenet, A.. 2016. Diversity of culturable plant growth-promoting bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-inoculation of diazotrophs and actinomycetes. J. Plant Growth Regul. 35: 1-14.

Lauzon, C. R., Sjogren, R. E., Prokopy, R. J. 2000. Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: a postulated role in attraction. J. Chem. Ecol. 26: 953-967.

Li, H., Medina, F., Vinson, S. B. and Coates C. J. 2005. Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut. J. Invertebr. Pathol. 89: 203-209.

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.

Mano, H. and Morisaki, H. 2008. Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes Environ. 23: 109-117.

Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty S. C., DeBoy R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L. P., Nelson, K. E. and Sadowsky, M. J. 2006. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. Plos Genet. 2: 2094-2106.

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.

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.

Niu, H., Liu, B., Li, Y. and Guo, H. 2016. Identification of a bacterium isolated from the diseased brownplanthopper and determination of its insecticidal activity. Biocontrol Sci. Techn. 26: 217-226.

Reva, O. N., Smirnov, V. V., Pettersson, B. and Priest, F. G. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). Int. J. Syst. Evol. Micr. 52: 101–107.

Riggs, P. J., Chelius, M. K., Iniguez, A. L., Kaeppler, S. M., and Triplett, E. W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. Aust. J. Plant Physiol. 28: 829-836.

Rosenblueth, M. and Martinez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Mpmi. 19: 827-837.

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.

Sturz, A. V., and Christie, B. R. 1996. Endophytic bacteria of red clover as agents of allelopathic clover-maize syndromes. Soil Biol. Biochem. 28: 583-588.

Sturz, A.V., Christie, B. R., Matheson, B. G. and Nowak, J. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. Biol. Fert. Soils. 25: 13–19.

Su, Q., Pan, H., Liu, B., Chu, D., Xie, W., Wu, Q., Wang S., Xu, B. and Zhang, Y. 2013. Insect symbiont facilitates vector acquisition, retention, and transmission of plant virus. Scientific reports. 3: 1-6.

Tsuchida T, Koga, R., Fujiwara, A., Fukatsu, T. 2014. Phenotypic effect of Candidatus *Rickettsiella viridis*, a facultative symbiont of the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*), and its interaction with a coexisting symbiont. Appl. Environ. Microbiol. 80: 525-533.

Wang, Y., Wang, C., Li, A. and Gao, J. 2015. Biodegradation of pentachloronitrobenzene by *Arthrobacter nicotianae* DH19. Lett. Appl. Microbiol. 61: 403-410.

Wangkeeree, J., Miller, T. A. and Hanboonsong, Y. 2012. Candidates for symbiotic control of sugarcane white leaf disease. Appl Environ Microb. 78: 6804-6811.

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

Wernegreen, J. J. 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. Nat. Rev. Genet. 3: 850-861.

Wu, D., Daugherty, S., Aken, S., Pai, G. H., Watkins, K. L., Khouri, H., Tallon, L. J., Zaborsky, J. M., Dunbar, H. E., Tran, P. L., Moran, N. A. and Eisen, J. A. 2006. Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. Plos Biol. 4: 1079-1092.

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, Ishimaru, P., 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. Microbe. 68: 2198-2208.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ ก 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น

อาหาร	อ้อย	เพศแมลง (แบคทีเรียที่ขึ้น/ตั้งหมด)	แมลงตัวที่	โคโลนีที่	no.sequence	Isolate	ลักษณะโคโลนี							การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล		% ความเหมือน	ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์
							รูปร่าง	สี	การยกตัว	ขอบ	ผิว	แกรม	morphology				
TSA	ปลูก	F(4/5)	1	1	T1	TF1	ไม่สามารถอธิบายได้	ครีม	-	-	มัน	+	Single bacillus	*Lysinibacillus xylanilyticus*	NR_116698.1	742/744 (99%)	744
			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
			3	1	T2	TF2	L-form	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Single bacillus	No significant similarity			
			4	1	T3	TF3	ไม่สามารถอธิบายได้	ครีม	-	-	มัน	+	Single bacillus	*Lysinibacillus fusiformis*	NR_112569.1	849/876 (97%)	896
			5	1	T4	TF4/1	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Acinetobacter pittii*	NR_117621.1	1218/1283 (95%)	1277
				2	T5	TF4/2	Rhizoid	ขาว	Hilly	Thread-like	แห้ง	+	Single bacillus	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1411/1412 (99%)	1415
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(5/5)	1	1	T6	TF5	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	641/658 (97%)	825
			2	1	T7	TF6	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_113266.1	373/415 (90%)	459
			3	1	T8	TF7	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	-	-	แห้ง	-	Cocci	*Achromobacter insolitus*	NR_025685.1	615/659 (93%)	675
			4	1	T9	TF8	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	-	Cocci	*Pseudomonas denitrificans*	NR_102805.1	741/743 (99%)	745
			5	1	T10	TF9	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	No significant similarity			
		M(0/5)	-														
BHI	ปลูก	F(5/5)	1	1	B1	BF1/1	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Raised	-	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	1338/1349 (99%)	1358
				2	B2	BF1/2	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Raised	Wavy	มัน	+	Cocci	*Arthrobacter woluwensis*	NR_044894.1	1348/1358 (99%)	1367
			2	1	B3	BF2	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	-	Cocci	*Acinetobacter junii*	NR_117623.1	549/618 (89%)	599
			3	1	B4	BF3	Wrinkle	ขาว	Umbonate	Wavy	แห้ง	+	Cocci	*Tsukamurella inchonensis*	NR_041804.1	1299/1317 (99%)	1348
			4	1	B5	BF4/1	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	1335/1351 (99%)	1366
				2	B6	BF4/2	Round	ขาว	Raised	Wavy	มัน	+	Coccobacillus	*Arthrobacter woluwensis*	NR_044894.1	1325/1334 (99%)	1347
			5	1	B7	BF5/1	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	-	Staphylococci	*Ochrobactrum anthropi*	NR_074243.1	1325/1335 (99%)	1339
				2	B8	BF5/2	Irregular and spreading	ขาว	Hilly	Irregular	แห้ง	+	Cocci	*Tsukamurella paurometabola*	NR_074458.1	1306/1315 (99%)	1324
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(5/5)	1	1	B9	BF6	ไม่สามารถอธิบายได้	ใส	-	-	มัน	+	Coccobacillus	No significant similarity			
			2	1	B10	BF7	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Cocci	No significant similarity			
			3	1	B11	BF8	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	-	-	แห้ง	+	Single bacillus	*Bacillus subtilis*	NR_102783.1	1411/1419 (99%)	1431
			4	1	B12	BF9	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Oceanimonas* sp.	NR_074966.1	851/879 (97%)	889
			5	1	B13	BF10	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Bacillus firmus*	NR_112635.1	1405/1426 (99%)	1424
		M(0/5)	-														

ตารางผนวกที่ ก 1 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น

NA	ปลูก	F(5/5)	1	1	NA1	NAF1/1	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Coccobacillus	*Arthrobacter enclensis*	NR_134699.1	1389/1403 (99%)	1406
				2	NA2	NAF1/2	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Brachybacterium phenoliresistens*	NR_043966.1	1394/1401 (99%)	1402
				3	NA3	NAF1/3	Rhizoid	ครีม	Raised	Irregular	แห้ง	+	Spirillum	*Sphingobacterium* sp.	NR_074508.1	1331/1408 (95%)	1408
				4	NA4	NAF1/4	Round with scalloped margin	เหลือง	Raised	Wavy	มัน	+	Cocci	*Microbacterium arabinogalactanolyticum*	NR_044932.1	1236/1319 (94%)	1314
			2	1	NA5	NAF2	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Achromobacter mucicolens*	NR_117613.1	1414/1425 (99%)	1427
			3	1	NA6	NAF3/1	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Coccobacillus	*Brachybacterium phenoliresistens*	NR_043966.1	1394/1400 (99%)	1401
				2	NA7	NAF3/2	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	-	Cocci	*Ochrobactrum haematophilum*	NR_042588.1	1346/1365 (99%)	1372
				3	NA8	NAF3/3	Rhizoid	ขาว	Raised	Irregular	แห้ง	+	Vibrio	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1427/1428 (99%)	1435
				4	NA9	NAF3/4	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Microbacterium testaceum*	NR_074641.1	880/897 (98%)	894
			4	1	NA10	NAF4/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Diplococci	*Sphingobacterium multivorum*	NR_040953.1	1337/1363 (98%)	1363
				2	NA11	NAF4/2	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Stenotrophomonas maltophilia*	NR_041577.1	1416/1427 (99%)	1431
			5	1	NA12	NAF5/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Arthrobacter enclensis*	NR_134699.1	1030/1041 (99%)	1052
				2	NA13	NAF5/2	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Coccobacillus	No significant similarity			
				3	NA14	NAF5/3	Filamentous	ครีม	Flat	Branching	มัน	-	Cocci	*Acinetobacter pittii*	NR_117621.1	654/671 (97%)	1119
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(5/5)	1	1	NA15	NAF6	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Acinetobacter pittii*	NR_117621.1	825/868 (95%)	1278
			2	1	NA16	NAF7	Round	ขาว	Raised	Wavy	มัน	+	Cocci	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	1114/1128 (99%)	1121
			3	1	NA17	NAF8/1	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	-	Diplococci	*Agrobacterium tumefaciens*	NR_041396.1	893/897 (99%)	897
				2	NA18	NAF8/2	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Microbacterium testaceum*	NR_074641.1	1376/1390 (99%)	1401
			4	1	NA19	NAF9	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	-	-	แห้ง	+	Cocci	*Bacillus subtilis*	NR_113265.1	1410/1423 (99%)	1425
			5	1	NA20	NAF10	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	-	-	แห้ง	+	Cocci	*Enterococcus casseliflavus*	NR_102793.1	1118/1124 (99%)	1122
		M(0/5)	-														

ตารางผนวกที่ ก 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี

อาหาร	อ้อย	เพศแมลง (แบคทีเรียที่ขึ้น/ทั้งหมด)	แมลงตัวที่	โคโลนีที่	no.sequence	Isolate	ลักษณะโคโลนี							การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล		% ความเหมือน	ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์
							รูปร่าง	สี	การยกตัว	ขอบ	ผิว	แกรม	morphology				
TSA	ปลูก	F(4/5)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
			2	1	T11	TF1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	-	Steptococci	*Arthrobacter nicotianae*	NR_026190.1	1380/1383 (99%)	1388
			3	1	T12	TF2/1	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	-	Single bacillus	*Arthrobacter mysorens*	NR_025613.1	1203/1219 (99%)	1219
				2	T13	TF2/2	Filamentous	ครีม	Raised	Branching	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1402/1411 (99%)	1411
			4	1	T14	TF3/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	diplococci	*Arthrobacter nicotianae*	NR_026190.1	1386/1390 (99%)	1390
				2	T15	TF3/2	Round with raised margin	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Spirillum	*Bacillus megaterium*	NR_116873.1	868/954 (91%)	930
				3	T16	TF3/3	Irregular and spreading	ครีม	Flat	Branching	มัน	+	Vibrio	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1399/1411 (99%)	1418
			5	1	T17	TF4	Round	ขาว	Raised	Smooth	แห้ง	-	Cocci	*Microbacterium esteraromaticum*	NR_026468.1	1266/1269 (99%)	1269
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(3/5)	1	1	T18	TF5/1	Round	ขาว	Raised	Smooth	แห้ง	+	Single bacillus	No significant similarity			
				2	T19	TF5/2	Irregular and spreading	ขาว	Raised	Lobate	แห้ง	+	Single bacillus	*Bacillus safensis*	NR_113945.1	1415/1418 (99%)	1420
			2	1	T20	TF6	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Microbacterium ginsengiterrae*	NR_116483.1	1369/1386 (99%)	1391
			3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
			4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
			5	1	T21	TF7/1	Round with raised margin	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Single bacillus	No significant similarity			
				2	T22	TF7/2	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Lysinibacillus fusiformis*	NR_112569.1	1392/1411 (99%)	1427
		M(0/5)	-														

ตารางผนวกที่ ก 2 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี

BHI	ปลูก	F(5/5)	1	1	B14	BF1	Filamentous	ครีม	Flat	Branching	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1418/1425 (99%)	1425
			2	1	B15	BF2/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Acinetobacter junii*	NR_117623.1	1330/1334 (99%)	1353
				2	B16	BF2/2	Filamentous	ครีม	Raised	Branching	มัน	+	Staphylococci	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1417/1434 (99%)	1429
				3	B17	BF2/3	Round	ไข่	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Brachybacterium phenoliresistens*	NR_043966.1	1381/1392 (99%)	1395
			3	1	B18	BF3	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Hilly	Wavy	มัน	+	Staphylococci	No significant similarity			
			4	1	B19	BF4/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Arthrobacter mysorens*	NR_025613.1	1290/1306 (99%)	1306
				2	B20	BF4/2	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Arthrobacter nicotianae*	NR_026190.1	1387/1399 (99%)	1401
				3	B21	BF4/3	Round	ไข่	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Brachybacterium phenoliresistens*	NR_043966.1	1372/1381 (99%)	1386
			5	1	B22	BF5/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Diplococci	*Arthrobacter nicotianae*	NR_026190.1	1324/1344 (99%)	1342
				2	B23	BF5/2	Round with raised margin	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Coccobacillus	*Bacillus endophyticus*	NR_025122.1	1421/1435 (99%)	1430
				3	B24	BF5/3	Round	ไข่	Convex	Smooth	มัน	+	Diplococci	*Brachybacterium phenoliresistens*	NR_043966.1	1391/1395 (99%)	1393
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(4/5)	1	1	B25	BF6/1	Round with scalloped margin	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Cocci	*Tsukamurella inchonensis*	NR_041804.1	1373/1384 (99%)	1391
				2	B26	BF6/2	Filamentous	ครีม	Raised	Branching	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1414/1416 (99%)	1417
				3	B27	BF6/3	Round	เหลือง	Raised	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Brevibacterium epidermidis*	NR_029262.1	1381/1390 (99%)	1396
			2	1	B28	BF7	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Coccobacillus	No significant similarity			
			3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4	1	B29	BF8	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Arthrobacter oryzae*	NR_041545.1	954/970 (98%)	967
			5	1	B30	BF9	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	No significant similarity			
		M(0/5)	-														

ตารางผนวกที่ ก 2 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี

NA	ปลูก	F(5/5)	1	1	NA21	NAF1	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	893/894 (99%)	894
			2	1	NA22	NAF2	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Arthrobacter nicotianae*	NR_026190.1	1353/1373 (99%)	1376
			3	1	NA23	NAF3/1	Filamentous	ครีม	Drop-like	Branching	มัน	+	Steptobacilli	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1422/1429 (99%)	1441
				2	NA24	NAF3/2	Round with raised margin	ครีม	Raised	Wavy	มัน	+	Cocci	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	909/1000 (91%)	991
			4	1	NA25	NAF4/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Acinetobacter junii*	NR_117623.1	1426/1431 (99%)	1430
				2	NA26	NAF4/2	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Arthrobacter nicotianae*	NR_026190.1	1380/1401 (99%)	1404
			5	1	NA27	NAF5/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Acinetobacter haemolyticus*	NR_117622.1	1300/1321 (98%)	1320
				2	NA28	NAF5/2	Rhizoid	ครีม	Convex	Ciliate	มัน	+	Cocci	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	1437/1441 (99%)	1444
				3	NA29	NAF5/3	Round	ขาว	Raised	Wavy	มัน	+	Coccobacillus	*Bacillus endophyticus*	NR_025122.1	1423/1433 (99%)	1436
				4	NA30	NAF5/4	Irregular and spreading	ครีม	Flat	Lobate	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus subtilis*	NR_113265.1	1430/1432 (99%)	1433
				5	NA31	NAF5/5	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	-	Staphylococci	*Brachybacterium phenoliresistens*	NR_043966.1	1398/1404 (99%)	1407
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(3/5)	1	1	NA32	NAF6/1	Round with scalloped margin	ขาว	Raised	Wavy	มัน	+	Cocci	*Microbacterium testaceum*	NR_026163.1	1250/1268 (99%)	1268
				2	NA33	NAF6/2	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Microbacterium testaceum*	NR_026163.1	1249/1268 (99%)	1268
				3	NA34	NAF6/3	Round	แดง	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Rhodococcus corynebacterioides*	NR_041873.1	1387/1395 (99%)	1397
			2	1	NA35	NAF7	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Cocobacillus	*Microbacterium testaceum*	NR_026163.1	1098/1132 (97%)	1120
			3	1	NA36	NAF8/1	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Spirillum	*Mycobacterium mageritense*	NR_115232.1	1384/1397 (99%)	1406
				2	NA37	NAF8/2	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Cocobacillus	No significant similarity			
			4	-	-		-	-	-	-	-	-	-				
			5	-	-		-	-	-	-	-	-	-				
		M(0/5)	-														

ตารางผนวกที่ ก 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

อาหาร	อ้อย	เพศแมลง (แบคทีเรียที่ขึ้น/ทั้งหมด)	แมลงตัวที่	โคโลนีที่	no.sequence	Isolate	ลักษณะโคโลนี							การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล		% ความเหมือน	ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์
							รูปร่าง	สี	การยกตัว	ขอบ	ผิว	แกรม	morphology				
TSA	ปลูก	F(2/3)	1	1	T23	TF1	Irregular and spreading	ครีม	Flat	Lobate	มัน	+	Single bacillus	*Microbacterium arabinogalactanolyticum*	NR_044932.1	1313/1315 (99%)	1315
			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
			3	1	T24	TF2/1	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Microbacterium testaceum*	NR_026163.1	1233/1280 (96%)	1318
				2	T25	TF2/2	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Vibrio	*Microbacterium jejuense*	NR_134085.1	1255/1270 (99%)	1269
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(5/5)	1	1	T26	TF3/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Vibrio	*Arthrobacter ureafaciens*	NR_029281.1	1262/1266 (99%)	1267
				2	T27	TF3/2	Filamentous	ครีม	Raised	Branching	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus licheniformis*	NR_118996.1	699/721 (97%)	745
			2	1	T28	TF4/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Vibrio	*Microbacterium insulae*	NR_044440.1	1318/1335 (99%)	1337
				2	T29	TF4/2	Filamentous	ครีม	Raised	Branching	มัน	+	Single bacillus	*Microbacterium arabinogalactanolyticum*	NR_044932.1	1343/1348 (99%)	1354
				3	T30	TF4/3	Wrinkled	ขาว	Umbonate	Smooth	แห้ง	+	Single bacillus	*Bacillus megaterium*	NR_112636.1	1413/1418 (99%)	1418
			3	1	T31	TF5/1	Wrinkled	ขาว	Umbonate	Wavy	แห้ง	+	Single bacillus	*Tsukamurella pulmonis*	NR_029302.1	1339/1344 (99%)	1378
				2	T32	TF5/2	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Microbacterium flavum*	NR_041562.1	1288/1300(99%)	1300
				3	T33	TF5/3	Round with raised margin	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Steptobacillus	No significant similarity			
				4	T34	TF5/4	Round	เหลืองใส	Raised	Smooth	มัน	-	Cocci	*Microbacterium testaceum*	NR_026163.1	1320/1340 (99%)	1339
				5	T35	TF5/5	Round	เหลืองขุ่น	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Curtobacterium oceanosedimentum*	NR_104839.1	1381/1384 (99%)	1396
				6	T36	TF5/6	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Arthrobacter* sp.	NR_074590.1	662/679 (97%)	1203
			4	1	T37	TF6	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	393/414 (95%)	663
			5	1	T38	TF7	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Microbacterium insulae*	NR_044440.1	1251/1269 (99%)	1271
		M(1/5)	5	1	T39	TM1	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Micrococcus endophyticus*	NR_044365.1	956/961 (99%)	967

ตารางผนวกที่ ก 3 (ต่อ) ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ที่เก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

BHI	ปลูก	F(3/3)	1	1	B31	BF1	Round with scalloped margin	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Single bacillus	*Arthrobacter woluwensis*	NR_044894.1	1361/1374 (99%)	1388
			2	1	B32	BF2/1	Round	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Steptobacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	514/549 (94%)	743
				2	B33	BF2/2	Round	ขาว	Drop-like	Smooth	มัน	+	Cocci	*Arthrobacter pascens*	NR_026191.1	1051/1108 (95%)	1088
			3	1	B34	BF3/1	Round with raised margin	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Steptobacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	211/220 (96%)	527
				2	B35	BF3/2	Round	ขาว	Convex	Smooth	แห้ง	+	Staphylococci	*Arthrobacter liuii*	NR_134700.1	1237/1313 (94%)	1385
		M(0/5)	-	-			-	-	-	-	-						
	ตอ	F(5/5)	1	1	B36	BF4	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Steptobacillus	No significant similarity			
			2	1	B37	BF5/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Microbacterium testaceum*	NR_026163.1	1264/1293 (98%)	1293
				2	B38	BF5/2	Round	แดง	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Rhodococcus corynebacterioides*	NR_041873.1	1372/1379 (99%)	1392
			3	1	B39	BF6	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	960/964 (99%)	971
			4	1	B40	BF7	Round	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	719/729 (99%)	746
			5	1	B41	BF8/1	Wrinkled	ขาว	Umbonate	Wavy	แห้ง	+	Staphylococci	*Tsukamurella pulmonis*	NR_029302.1	1376/1386 (99%)	1391
				2	B42	BF8/2	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Microbacterium ginsengiterrae*	NR_116483.1	1300/1315 (99%)	1313
				3	B43	BF8/3	Round	ขาว	Convex	Smooth	แห้ง	+	Coccobacillus	No significant similarity			
		M(0/5)	-														
NA	ปลูก	F(2/3)	1	1	NA38	NAF1	ไม่สามารถอธิบายได้	ขาว	Raised	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	702/729 (96%)	747
			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
			3	1	NA39	NAF2/1	Round with raised margin	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Single bacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	927/955 (97%)	1072
				2	NA40	NAF2/2	Round	ขาว	Convex	Smooth	แห้ง	+	Single bacillus	*Bacillus subtilis*	NR_113265.1	1400/1411 (99%)	1420
		M(0/5)	-														
	ตอ	F(4/5)	1	1	NA41	NAF3/1	Round	ครีม	Convex	Smooth	มัน	+	Cocci	*Arthrobacter* sp.	NR_074590.1	965/1001 (96%)	1002
				2	NA42	NAF3/2	Round	เหลือง	Convex	Smooth	มัน	+	Diplococci	*Microbacterium enclense*	NR_136462.1	1321/1332 (99%)	1343
				3	NA43	NAF3/3	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Cocobacillus	*Microbacterium flavum*	NR_041562.1	1324/1343 (99%)	1341
				4	NA44	NAF3/4	Round with raised margin	ขาว	Raised	Wavy	มัน	+	Cocci	*Bacillus megaterium*	NR_112636.1	1421/1423 (99%)	1433
				5	NA45	NAF3/5	Round	แดง	Convex	Smooth	มัน	+	Staphylococci	*Rhodococcus corynebacterioides*	NR_119107.1	1324/1335 (99%)	1335
			2	1	NA46	NAF4	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Vibrio	*Arthrobacter ureafaciens*	NR_029281.1	1386/1421 (98%)	1424
			3	1	NA47	NAF5	L-from	ขาว	Raised	Wavy	แห้ง	+	Steptobacillus	*Bacillus cereus*	NR_074540.1	1421/1425 (99%)	1436
			4	1	NA48	NAF6/1	Round	ครีม	Raised	Smooth	มัน	+	Cocobacillus	*Microbacterium arthrosphaerae*	NR_117046.1	178/199 (89%)	1225
				2	NA49	NAF6/2	Round	ขาว	Convex	Smooth	มัน	+	Single bacillus	*Bacillus drentensis*	NR_114085.1	526/584 (90%)	1114
			5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		M(0/5)	-														

ตารางผนวก ข

ตารางผนวกที่ ข 1 จำนวนแมลงที่ตายในแต่ละวันเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน (ทดสอบครั้งที่ 1)

สิ่งทดลอง	ทดสอบครั้งที่ 1							จำนวนแมลงที่ตาย
	จำนวนแมลงที่ตายดูดกินแบคทีเรียในแต่ละวัน							
	1	2	3	4	5	6	7	
Control								0
M. testaceum	1		1					2
B. licheniformis					1	1		2
A. nicotinae								0
A. woluwensis	1		1					2
B. megaterium				2		1		3
B. subtilis						1	1	2

ตารางผนวกที่ ข 2 จำนวนแมลงที่ตายในแต่ละวันเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน (ทดสอบครั้งที่ 2)

สิ่งทดลอง	ทดสอบครั้งที่ 2							จำนวนแมลงที่ตาย
	จำนวนแมลงที่ตายดูดกินแบคทีเรียในแต่ละวัน							
	1	2	3	4	5	6	7	
Control								0
M. testaceum							1	1
B. licheniformis					1	1		2
A. nicotinae		1					1	2
A. woluwensis						2		2
B. megaterium						2	1	3
B. subtilis				1			2	3

ตารางผนวกที่ ข 3 จำนวนแมลงที่ตายในแต่ละวันเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น $1x10^9$ cell/ml เป็นเวลา 7 วัน (ทดสอบครั้งที่ 3)

สิ่งทดลอง	ทดสอบครั้งที่ 3							จำนวนแมลงที่ตาย
	จำนวนแมลงที่ตายดูดกินแบคทีเรียในแต่ละวัน							
	1	2	3	4	5	6	7	
Control								0
M. testaceum						1		1
B. licheniformis			1			1		2
A. nicotinae								0
A. woluwensis							1	1
B. megaterium							1	1
B. subtilis		1						1

ตารางผนวกที่ ข 4 จำนวนไข่ของเพลี้ยจักจั่น (*M. hiroglyphicus*) หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียและไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย

สิ่งทดลอง	จำนวนไข่ของเพลี้ยจักจั่น (ฟอง/ตัว) (ซ้ำ)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	52	60	149	95	94	53	84	114	69	47	39	101	13	157	141
M. testaceum	82	69	45	42	81	39	54	47	89	18	30	14	24	32	46
B. licheniformis	91	44	48	113	101	65	108	74	53	35	29	58	38	18	13
A. nicotinae	12	71	74	13	44	22	81	6	52	115	122	37	76	70	13
A. woluwensis	30	11	33	17	7	3	0	9	15	6	29	14	13	57	72
B. megaterium	1	24	8	25	26	80	87	44	86	53	131	101	20	15	34
B. subtilis	28	25	16	33	56	36	16	31	55	9	14	44	21	77	41

ตารางผนวก ค

ตารางผนวกที่ ค 1 ผลการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 14 วัน

ซ้ำที่	จำนวนต้นอ้อยที่พบเชื้อไฟโตพลาสมาจากการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period ; LP) 14 วัน						
	Control	*M. testaceum*	*B. licheniformis*	*A. nicotinae*	*A. woluwensis*	*B. megaterium*	*B. subtilis*
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-
รวม	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค 2 ผลการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period; LP) 21 วัน

ซ้ำที่	จำนวนต้นอ้อยที่พบเชื้อไฟโตพลาสมาจากการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* ของระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อ (Latent Period ; LP) 21 วัน						
	Control	*M. testaceum*	*B. licheniformis*	*A. nicotinae*	*A. woluwensis*	*B. megaterium*	*B. subtilis*
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	+	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	+	-
รวม	3	0	0	1	1	2	1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวภิญญา เจริญพานิชสันติ (ชื่อเดิม นางสาวกมลวรรณ เจริญพานิชสันติ)
วัน เดือน ปี เกิด	14 มกราคม 2535
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2556 : วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลงานทางวิชาการ

ภิญญา เจริญพานิชสันติ จุรีมาศ วังคีรี และยุพา หาญบุญทรง. 2559. ผลของแบคทีเรียที่คัดเลือกต่อการขยายพันธุ์ของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) พาหะนำโรคใบขาวอ้อย. การประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 13. วันที่ 8-9 ธันวาคม 2559. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 144-151.

กมลวรรณ เจริญพานิชสันติ จุรีมาศ วังคีรี และยุพา หาญบุญทรง. 2558. การคัดแยกแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) พาหะนำโรคใบขาวอ้อยและทดสอบการก่อให้เกิดโรค. การประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 12. วันที่ 8-9 ธันวาคม 2558. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 647-656.

กมลวรรณ เจริญพานิชสันติ จุรีมาศ วังคีรี และยุพา หาญบุญทรง. 2557. การศึกษาแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดทุติยภูมิของเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* พาหะนำโรคใบขาวอ้อย. โครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 34. วันที่ 27 มีนาคม 2557. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 696-700.