



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การจัดการแมลงพาหะนำเชื้อโรคใบขาวอ้อย

โดย
รองศาสตราจารย์ ดร. ยุพา หาญบุญทรง และคณะ

สัญญาเลขที่ RDG 5750034

ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจัดการแมลงพาหะนำเชื้อโรคใบขาวอ้อย

คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. ยุพา หาญบุญทรง
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. อาจารย์ ดร. จุริมาศ วังศิริ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช. สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รายงานสรุปย่อแผนบริหาร
โครงการ “การจัดการแมลงพาหะนำเชื้อโรคใบขาวอ้อย” RDG 5750034

รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงาน/โครงการ (ชื่อเรื่องวิจัย,ชื่อนักวิจัย,หน่วยงาน)

ชื่อเรื่อง : การจัดการแมลงพาหะนำเชื้อโรคใบขาวอ้อย

: Management of insect vectors of sugarcane white leaf disease

ชื่อโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย

โครงการย่อยที่ 1: การศึกษาปัจจัยของการระบาดของโรคใบขาวและแมลงพาหะนำโรค

: Studies on factors affecting the epidemiology of sugarcane white leaf disease and insect vectors

โครงการย่อยที่ 2 : การคัดเลือกชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัยจากแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย

: Screening and selection the cultivable bacteria symbionts from the vector of sugarcane white leaf disease

ชื่อหัวหน้าชุดโครงการ

ชื่อ-สกุล.....รศ.ดร. ยูพา หาญบุญทรง

ชื่อ-สกุล.....Assoc. Prof. Dr. Yupa Hanboonsong

คุณวุฒิ.....Ph.D. (Entomology)

ตำแหน่งรองศาสตราจารย์

หน่วยงาน ...สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร

ที่อยู่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต. ในเมือง อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 0-4324-2331 ต่อ 2311, 0-4336-2108 โทรสาร 0-4336-2108

Email..... yupa_han@kku.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล.....ดร.ชุตินันท์ ชูสาย

ชื่อ-สกุล.....Dr. Chutinan Choosai

คุณวุฒิ..... Ph.D. (Entomology)

ตำแหน่ง.....นักวิชาการเกษตรชำนาญการ

หน่วยงาน ...สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร

ที่อยู่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต. ในเมือง อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 0-4324-2331 ต่อ 2311, 0-4336-2108 โทรสาร 0-4336-2108

E-mailchucho@kku.ac.th

ชื่อ-สกุล.....ดร. จุริมาศ วังศิริ

ชื่อ-สกุล.....Dr. Jureemart Wangkeeree

คุณวุฒิ..... ปรชญาคุณภักดิ์ (กวีวิทยา)

ตำแหน่ง.....อาจารย์

หน่วยงานภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ที่อยู่เลขที่ 99 ถนน พหลโยธิน ตำบล คลองหนึ่ง อำเภอ คลองหลวงจังหวัด ปทุมธานี 12121

โทรศัพท์...02 564 4488 /โทรสาร.....02 5644525

E-mailtookta.wang@yahoo.com

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคใบขาวจัดเป็นโรคที่มีความร้ายแรงอันดับหนึ่งของการปลูกอ้อยในประเทศไทยและไม่มีพันธุ์ต้านทานโรค การพยายามลดการระบาดของโรคโดยใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรคอย่างเดียวไม่สามารถทำได้ ต้องใช้องค์ความรู้หลายๆ ด้านร่วมกัน ทั้งการจัดการท่อนพันธุ์และแมลงพาหะ ซึ่งทั้งสองอย่างเป็นสาเหตุหลักการแพร่ระบาดของโรค แมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นนำโรคใบขาวอ้อยเป็นทั้งพาหะ และแหล่งสะสมและเพิ่มปริมาณเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย ดังนั้นการควบคุมประชากรหรือการยับยั้งการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุของแมลงพาหะ จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการลดการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ดังนั้นชุดโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนางานวิจัยเพื่อแก้ปัญหาการระบาดของโรคใบขาวอ้อย โดยการศึกษาปฏิกิริยาสัมพันธ์ของแมลงพาหะ เชื้อไฟโตพลาสมา การเกิดโรคใบขาวอ้อย และการตรวจคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลงพาหะเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการแมลงพาหะนำโรคหรือลดการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคของแมลงพาหะ ซึ่งโครงการนี้ประกอบด้วย 2 โครงการวิจัยย่อย คือ 1) การศึกษาปัจจัยของการระบาดของโรคใบขาวและแมลงพาหะนำโรค และ 2) การคัดเลือกชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัยจากแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

พัฒนางานวิจัยเพื่อแก้ปัญหาการระบาดของโรคใบขาวอ้อย โดยการศึกษาปฏิกิริยาสัมพันธ์ของแมลงพาหะ เชื้อไฟโตพลาสมา การเกิดโรคใบขาวอ้อย และการตรวจคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลงพาหะเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการแมลงพาหะนำโรคหรือลดการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคของแมลงพาหะ

Executive summary

โครงการย่อยที่ 1 :

1. แมลงพาหะทั้งเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura เป็นแมลงพาหะที่พบในแปลงปลูกอ้อย ซึ่งจำนวนประชากรของเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลเป็นแมลงพาหะหลัก พบประชากรประมาณ 90% ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว และเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีประชากรมากในช่วงต้นฝน มิถุนายน-กรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงแรกของการเจริญเติบโตหรืออยู่ในระหว่างย่างปล้อง ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาวมีจำนวนประชากร ในช่วงอ้อยเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงเก็บเกี่ยว โดยมีประชากรมากในช่วงเดือนกันยายน ดังนั้นการหลีกเลี่ยงหรือจัดการช่วงเวลาปลูกอ้อยโดยไม่ปลูกในช่วงต้นฝนอาจสามารถลดความเสี่ยงจากการคุกคามและถ่ายทอดเชื้อของแมลงพาหะได้

2. แมลงพาหะมีการรับเชื้อ และเพิ่มปริมาณในตัว แต่มีปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคต่อตัวแมลงพาหะไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ แต่จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวมีปริมาณมากในแมลงพาหะเพศเมียมากกว่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกพื้นที่ และ สัดส่วนเพศของแมลง (แมลงเพศเมียมากกว่าเพศผู้) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงในการเกิดโรค

3. จำนวนแมลงพาหะ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดโรคใบขาว โดยระดับความรุนแรงในการเกิดโรคใบขาวอ้อยขึ้นอยู่กับจำนวนแมลงพาหะที่อาศัยอยู่ในแปลงอ้อย และแมลงพาหะเพศเมียมีความสำคัญต่อการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย พื้นที่ปลูกอ้อยทั้งสองพื้นที่ในจังหวัดอุดรธานี มีการระบาดของโรคใบขาวและจำนวนแมลงพาหะมากกว่าในพื้นที่ปลูกอ้อยในจังหวัดขอนแก่น

4. ความรุนแรงของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงที่มาจากพื้นที่ต่างๆทั้ง 3 พื้นที่ เมื่อนำมาทดสอบถ่ายทอดเชื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ในการทำให้เกิดโรคต่อต้นอ้อย

5. จากการสำรวจโรคใบขาวในสภาพไร่ และจากการถ่ายทอดเชื้อโรคแมลงพาหะในห้องปฏิบัติการพบว่าต้นอ้อยที่ได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงพาหะ ต้นอ้อยมีเชื้อสาเหตุของโรคอยู่แต่มีการแสดงอาการของโรคออกมาได้น้อย ดังนั้นต้นอ้อยจึงเป็นพวกที่มีเชื้อแอบแฝง ไม่แสดงอาการใบขาวออกมา และเมื่อนำไปเป็นท่อนพันธุ์ปลูกอาจแสดงอาการใบขาวปรากฏออกมาได้ อนึ่งในต้นอ้อยที่มีเชื้อแอบแฝงนี้พบว่าเมื่อเกษตรกรมีการดูแลแปลงอย่างต่อเนื่องและใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง (ระยะก่อนปลูกและแตกกอ) และกำจัดวัชพืชอย่างสม่ำเสมอ ทำให้ต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อยปรากฏออกมามีไม่มากนัก

โครงการย่อยที่ 2 :

สรุปผลงานวิจัย

- ชนิดของแบคทีเรียที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงจากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus*

แมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น พบแบคทีเรียในอันดับ Bacillales มากที่สุด ชนิดที่พบเช่น *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis* และ *B. firmus* รองลงมาคือ อันดับ Actinomycetale เช่น *Microbacterium testaceum*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brachybacterium saurashtrense*, *Tsukamurella inchoensis* เป็นต้น แมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.กุมภวาปี จ. อุดรธานี อันดับที่พบมากที่สุด คือ Actinomycetales เช่น *A. nicotianae*, *Brachybacterium saurashtrense*, *M. testaceum* เป็นต้น และแบคทีเรียในอันดับ

Bacillales พบมากเป็นอันดับสองรองลงมา เช่น *B. licheniformis*, *B. endophyticus* และ *B. megaterium* เป็นต้น และแมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.เมือง อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น แบคทีเรียอันดับ Actinomycetale พบมากที่สุด เช่น *M. testaceum*, *A. phenanthrenivorans*, *A. ureafaciens*, *Tsukamurella pulmonis* และอันดับ Bacillales ชนิดแบคทีเรียที่พบ เช่น *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* เป็นต้น

เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น แบคทีเรียที่พบมาก คือ อันดับ Bacillale เช่น *B. megaterium*, *Staphylococcus sciuri*, *S. epidermidis* เป็นต้น และอันดับ Actinomycetale ชนิดที่พบเช่น *A. woluwensis*, *Leifsonia lichenia* และ *L. lichenia* เป็นต้น

- การกระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในประชากรของเพลี้ยจักจั่น

คัดเลือกแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท คือ *M. testaceum*, *A. woluwensis*, *A. nicotianae*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* เพื่อนำมาศึกษาถึงศักยภาพความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ควบคุมแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* การตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทในประชากรธรรมชาติของแมลงสามารถพบแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ทั้งแมลงเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งในระยะไข่ นอกจากนี้สามารถตรวจพบในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร

คัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* คือ *A. woluwensis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* ซึ่งสามารถตรวจพบในประชากรแมลงในธรรมชาติทุกระยะการเจริญเช่นเดียวกัน

- การก่อให้เกิดโรคและผลต่ออัตราการวางไข่

แบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกสามารถก่อให้เกิดโรคกับในเพลี้ยจักจั่นทั้งสองชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ที่ประมาณ 10-30% และแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ยกเว้น *A. nicotinae*) ผลทำให้อัตราการวางไข่เฉลี่ยของแมลงเพศเมียลดลงมากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

- การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ด้วยเทคนิค

Metagenomic analysis

พบแบคทีเรีย phylum Bacteroidetes และ Proteobacteria ในอัตราส่วนที่ค่อนข้างมาก โดยพบแบคทีเรีย 2 ชนิดที่พบในอัตราส่วนที่มากในแมลงส่วนใหญ่ คือ *Sulcia muelleri* และ BAMH (Bacterial Associated with *M. hiroglyphicus*) ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภทปฐมภูมิ (Primary endosymbiont) ที่อยู่ในส่วนแบคทีริโอม (Bacteriome) ของเพลี้ยจักจั่น

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

โครงการย่อยที่ 1 :

ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้สามารถนำมาเป็นข้อมูลหรือคำแนะนำให้กับเกษตรกรในการจัดการการปลูกอ้อยเพื่อลดการระบาดของโรคใบขาวได้ เช่น

1. หลีกเลี่ยงการปลูกอ้อยในช่วงที่มีการระบาดของแมลงพาหะ มาก ซึ่งได้แก่ในช่วงต้นฤดูฝน เดือน มิถุนายน – กรกฎาคม เพราะอาจมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อยได้ เพราะต้นอ้อยอยู่ในระยะแรกของการเจริญเติบโตมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคมกกว่าต้นอ้อยที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว
2. การเลือกช่วงเวลาในการป้องกันกำจัดหรือลดประชากรแมลงพาหะด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง ควรเลือกช่วงที่มีปริมาณแมลงพาหะมีการแพร่ระบาดมาก

3. ปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดของของโรคใบขาวอ้อย คือ จำนวนตัวหรือปริมาณของเพลี้ยจักจั่น แผลงพาหะ ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรเฝ้าระวัง เช่น ในแปลงอ้อยที่ไม่มีต้นอ้อยแสดงอาการของโรคใบขาวเลย แต่หากมีการสำรวจพบว่ามีปริมาณของแผลงพาหะจำนวนมากในแปลงนั้น ก็มีโอกาที่จะเกิดการระบาดของโรคใบขาวได้มากขึ้น
4. ในการเลือกพื้นที่หรือแปลงท่อนพันธุ์อ้อยที่จะนำมาปลูก นอกจากคัดเลือกจากพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของโรคใบขาวแล้ว ต้องคำนึงถึงปริมาณของเพลี้ยจักจั่น แผลงพาหะ ในพื้นที่นั้นด้วย เช่น พื้นที่ไม่มีต้นอ้อยแสดงอาการของโรคใบขาวแต่มีปริมาณของแผลงพาหะมากกว่าย่อมมีความเสี่ยงที่ท่อนพันธุ์นั้นจะมีเชื้อโรคติดมา มากกว่าพื้นที่ที่ไม่มีแผลงพาหะ

โครงการย่อยที่ 2 :

ได้ชนิดหรือไอโซเลทของแบคทีเรียเป้าหมาย ที่มีคุณลักษณะตามที่ต้องการ คือ เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบในต้นอ้อยที่เป็นแหล่งอาหาร สามารถพบได้ในประชากรแผลงพาหะในธรรมชาติทุกระยะการเจริญเติบโต และมีศักยภาพสามารถนำไปใช้ในการควบคุมแผลงพาหะได้ เช่น การก่อให้เกิดโรคหรือผลต่อขยายพันธุ์ของแมลง ซึ่งในการนำไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงรูปแบบหรือวิธีการใช้ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อไป

บทคัดย่อ

โรคใบขาวจัดเป็นโรคที่มีความร้ายแรงอันดับหนึ่งของการปลูกอ้อยในประเทศไทยและไม่มี พันธุ์ต้านทานโรค การพยายามลดการระบาดของโรคโดยการใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรคอย่างเดียวไม่สามารถทำได้ ต้องใช้ องค์ความรู้หลายๆ ด้านร่วมกัน ทั้งการจัดการท่อนพันธุ์และแมลงพาหะ ซึ่งทั้งสองอย่างเป็นสาเหตุหลักการแพร่ระบาดของโรค แมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นนำโรคใบขาวอ้อยเป็นทั้งพาหะ และแหล่งสะสมและเพิ่มปริมาณเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย ดังนั้นการควบคุมประชากรหรือการยับยั้งการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุของแมลงพาหะ จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการลดการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ดังนั้นชุดโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนางานวิจัยเพื่อแก้ปัญหาการระบาดของใบขาวอ้อย โดยการศึกษาปฏิกิริยาสัมพันธ์ของแมลงพาหะ เชื้อไฟโตพลาสมา การเกิดโรคใบขาวอ้อย และการตรวจคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลงพาหะเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการแมลงพาหะนำโรคหรือลดการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคของแมลงพาหะ ซึ่งโครงการนี้ประกอบด้วย 2 โครงการวิจัยย่อย คือ 1) การศึกษาปัจจัยต่อการระบาดวิทยาของแมลงพาหะนำโรคใบขาว และ 2) การคัดเลือกชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัยจากแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย โดยมีรายละเอียดผลโครงการดังนี้

โครงการย่อยที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดและความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยจากแมลงพาหะ โดยหารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะ จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะและ ในต้นอ้อยรวมถึงการเกิดโรคใบขาวอ้อยในแต่ละพื้นที่ในสภาพไร่ที่มีความรุนแรงของการระบาดของโรคที่แตกต่างกัน รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคใบขาวอ้อยจากแมลงพาหะจากพื้นที่ที่มีความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยแตกต่างกันในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำการสำรวจติดตามจำนวนประชากรแมลง และ จำนวนต้นอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาว ร่วมกับการตรวจวัดจำนวนเชื้อสาเหตุของโรคในต้นอ้อยที่ไม่แสดงอาการโรค และในตัวแมลงพาหะในสภาพแปลงอ้อยที่มีระดับความรุนแรงของโรคใบขาวแตกต่างกันจากการระบาดมาก (การเกิดโรค มากกว่า 50 %) ปานกลาง (การเกิดโรค น้อยกว่า 50 %) และน้อย การเกิดโรค น้อยกว่า 10 % หรือไม่มีประวัติการระบาดเลย) ในพื้นที่ อ. กุมภวาปี จ. อุดรธานี อ. เขาสวนกวาง และ ต.บ้านค้อ อ. เมือง จ. ขอนแก่น ตามลำดับตั้งแต่เดือนกรกฎาคม – พฤศจิกายน 2557 (ฤดูกาลที่ 1) และ ตั้งแต่เดือน ธันวาคม 2557 – ธันวาคม 2558 ผลการศึกษาพบว่าแมลงพาหะ 2 ชนิดในทั้ง 3 พื้นที่สำรวจได้แก่ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura ซึ่งจำนวนประชากรของเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลพบประมาณประชากรประมาณ 90% ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว และเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีประชากรมากในช่วงต้นฝน มิถุนายน- กรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงแรกของการเจริญเติบโตหรืออยู่ในระยะอย่างปล้อง ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาวมีจำนวนประชากร ในช่วงอ้อยเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงเก็บเกี่ยวโดยมีประชากรมากในช่วงเดือนกันยายน จำนวนประชากรของแมลงพาหะ พบระบาดมากในพื้นที่ที่มีการเกิดโรครุนแรงมากและปานกลาง (ในจังหวัดอุดรธานี) และแมลงเพศเมียมีจำนวนประชากรกว่าเพศผู้

เมื่อตรวจสอบจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะและความรุนแรงของเชื้อในการเกิดโรคในแมลงจากพื้นที่ทั้ง 3 แห่ง โดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล (ด้วย Nested PCR และ Real time PCR ด้วย specific SCWL primer) พบว่าจำนวนเชื้อในตัวแมลง และความรุนแรงของเชื้อในการเกิดโรคไม่มีความแตกต่างกัน ของแมลงจากทั้ง 3 พื้นที่ แต่แมลงตัวเมียพบจำนวนเชื้อสาเหตุโรคมกกว่าแมลงเพศผู้

ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดของโรคพบว่าจำนวนแมลงพาหะมีผลในทิศทางเดียวกับการระบาดของโรค โดยเมื่อมีจำนวนแมลงพาหะมากจะส่งผลทำให้จำนวนการที่ต้นอ้อยติดเชื้อไฟโตพลาสมา

สาเหตุของโรคก็มากด้วยเช่นกันซึ่งแม้ว่าการแสดงออกของโรคใบขาวไม่สามารถแสดงออกได้ชัดเจน แต่การติดเชื้อโรคใบขาวแต่ไม่แสดงอาการสามารถตรวจพบได้ ดังนั้นข้อมูลจำนวนแมลงพาหะมีผลต่อการระบาดและเกิดโรคใบขาวนี้สามารถนำไปเป็นแนะนำและใช้ในการป้องกัน ระวังการแพร่ระบาดของโรค ตลอดจนหาทางควบคุมแมลงพาหะต่อไปได้

โครงการย่อยที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นแมลงพาหะทั้งสองชนิด โดยวิธีการแยกออกมาเพาะเลี้ยง และคัดเลือกชนิดที่มีศักยภาพที่คาดว่าจะสามารถนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวได้ และศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ด้วย Metagenomics analysis

การศึกษาวิจัยในโครงการย่อยที่ 2 คือศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงพาหะนำโรคทั้งสองชนิดที่สามารถแยกออกมาเพาะได้ เพื่อคัดเลือกลำมาศึกษาถึงศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะหรือลดการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา สำหรับเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ซึ่งเป็นแมลงพาหะหลัก มีแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือก 6 ไอโซเลท คือ *Microbacterium testaceum*, *Arthrobacter woluwensis*, *A. nicotianae*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* ที่พบว่าการแพร่กระจายตัวในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะทุกระยะการเจริญ และพบว่ามีอยู่ในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร ทั้ง 6 ชนิด เมื่อให้แมลงได้รับแบคทีเรียเหล่านี้ในอัตราความเข้มข้นที่ระดับสูง พบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคในเพลี้ยจักจั่นได้ โดยแมลงมีเปอร์เซ็นต์การตาย 10-30% ซึ่งยังถือว่าเป็นเปอร์เซ็นต์การตายที่ค่อนข้างต่ำ แต่อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท (ยกเว้น *A. nicotianae*) ทำให้อัตราการวางไข่ของแมลงเพศเมียต่ำกว่ากลุ่มควบคุมถึง 50% การคัดเลือก แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* คือ *A. woluwensis*, *B. megaterium* และ *B. subtilis* พบว่าการแพร่กระจายตัวในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะทุกระยะการเจริญ และสามารถ ก่อให้เกิดโรคในแมลงได้ประมาณ 10-30% เช่นเดียวกัน จากผลการศึกษาได้แบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือก สามารถก่อให้เกิดโรคในแมลง และมีผลทำให้การขยายพันธุ์ของแมลงลดลง ซึ่งนำไปสู่แนวทางของการศึกษาเพื่อนำไปใช้แบคทีเรียดังกล่าวในการควบคุมแมลงพาหะ

การศึกษาคความหลากหลายของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *M.hiroglyphicus* ด้วยเทคนิค Metagenomic ananlysis ผลการศึกษาการจำแนกพบแบคทีเรีย 2 ชนิดที่พบในอัตราส่วนที่มากในแมลงส่วนใหญ่ คือ *Sulcia muelleri* และ BAMH (Bacterial Associated with *M.hiroglyphicus*) ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภท ปฐมภูมิ (Primary endosymbiont) ที่อยู่ในส่วนแบคทีริโอม (Bacteriome) ของเพลี้ยจักจั่น

ข้อเสนอแนะของงานวิจัย

1. ควรมีการนำเอาองค์ความรู้เกี่ยวกับแมลงพาหะที่ได้จากงานวิจัยไปเผยแพร่ฝึกอบรมให้เกษตรกรได้มีความรู้ ความเข้าใจ และสามารถนำไปปฏิบัติได้ เช่น ชนิดของแมลงพาหะที่สำคัญ ช่วงเวลาการแพร่ระบาด ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการวาง วิธีการติดตามจำนวนประชากร เพื่อนำมาเป็นปัจจัยที่สำคัญในการบ่งชี้ความเสี่ยงในการเกิดโรคใบขาว หรือความเสี่ยงของการที่ท่อนพันธุ์อ้อยจะมีเชื้อแฝงในพื้นที่ๆ ก็ตามที่มีการระบาดของแมลงพาหะ ถึงแม้ว่าจะไม่พบต้นอ้อยที่เป็นโรคใบขาว

2. ในการจัดการแมลงพาหะโดยใช้เชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกนั้น ต้องมีการศึกษาวิจัยต่อถึงรูปแบบที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เช่น การเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ้อยได้ เพื่อศึกษาแนวทางให้เชื้อนั้นสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในต้นอ้อย และสามารถเข้าสู่แมลงพาหะได้โดยผ่านดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืช รวมทั้งการศึกษาค้นคว้าของแบคทีเรียที่คัดเลือกนั้นต่อความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อโรคโดยแมลงพาหะ

โครงการย่อย 2 : การคัดเลือกชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัยจากแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย

กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
<u>วัตถุประสงค์</u> 1. เพื่อศึกษาชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลงพาหะนำเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค <u>กิจกรรม</u> - สํารวจและ เก็บแมลง พาหะ <i>M.hiroglyphicus</i> 100 - แยกและเพาะ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียร่วมจากเพลี้ยจักจั่น 100 <i>M.hiroglyphicus</i> จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพื้นฐานและการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ - สํารวจและ เก็บแมลง พาหะ <i>Y.flavivittatus</i> 100 - แยกและเพาะ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียร่วมจากเพลี้ยจักจั่น 100 <i>Y.flavivittatus</i> จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาพื้นฐานและการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ - ศึกษาชนิดของแบคทีเรียในเพลี้ยจักจั่น 100 <i>M.hiroglyphicus</i> จากทั้งสามสถานที่ด้วยวิธีการ Metagenomic analysis		เป็นส่วนเพิ่มเติมจากคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ
2. ตรวจสอบการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียอาศัยร่วมในประชากรของแมลงพาหะ และในต้นอ้อย <u>กิจกรรม</u> - เก็บตัวอย่าง แมลงพาหะทั้งสองชนิด <i>M.hiroglyphicus</i> และ <i>Y.flavovittatus</i> จาก แหล่งปลูกอ้อยพื้นที่ต่างๆกัน เพื่อนำมาตรวจหาแบคทีเรียร่วม อาศัยเป้าหมาย 100 - เก็บตัวอย่างต้นอ้อยปกติ จากพื้นที่ปลูก ต่างๆ เพื่อนำมาตรวจ หาแบคทีเรียเป้าหมาย 100		

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการย่อยที่ 1

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง : การศึกษาปัจจัยของการระบาดของโรคใบขาวและแมลงพาหะนำโรค

: Studies on factors affecting the epidemiology of sugarcane white leaf disease and insect vectors

ชื่อผู้วิจัย

ชื่อหัวหน้าชุดโครงการ

ชื่อ-สกุล.....รศ.ดร. ยุพา หาญบุญทรง

ชื่อ-สกุล.....Assoc. Prof. Dr. Yupa Hanboonsong

คุณวุฒิ.....Ph.D. (Entomology)

ตำแหน่งรองศาสตราจารย์

หน่วยงาน ...สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร

ที่อยู่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต. ในเมือง อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 0-4324-2331 ต่อ 2311, 0-4336-2108 โทรสาร 0-4336-2108

Email..... yupa_han@kku.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล.....ดร.ชุตินันท์ ชูสาย

ชื่อ-สกุล.....Dr. Chutinan Choosai

คุณวุฒิ..... Ph.D. (Entomology)

ตำแหน่ง.....นักวิชาการเกษตรชำนาญการ

หน่วยงาน ...สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร

ที่อยู่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต. ในเมือง อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 0-4324-2331 ต่อ 2311, 0-4336-2108 โทรสาร 0-4336-2108

E-mailchucho@kku.ac.th

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

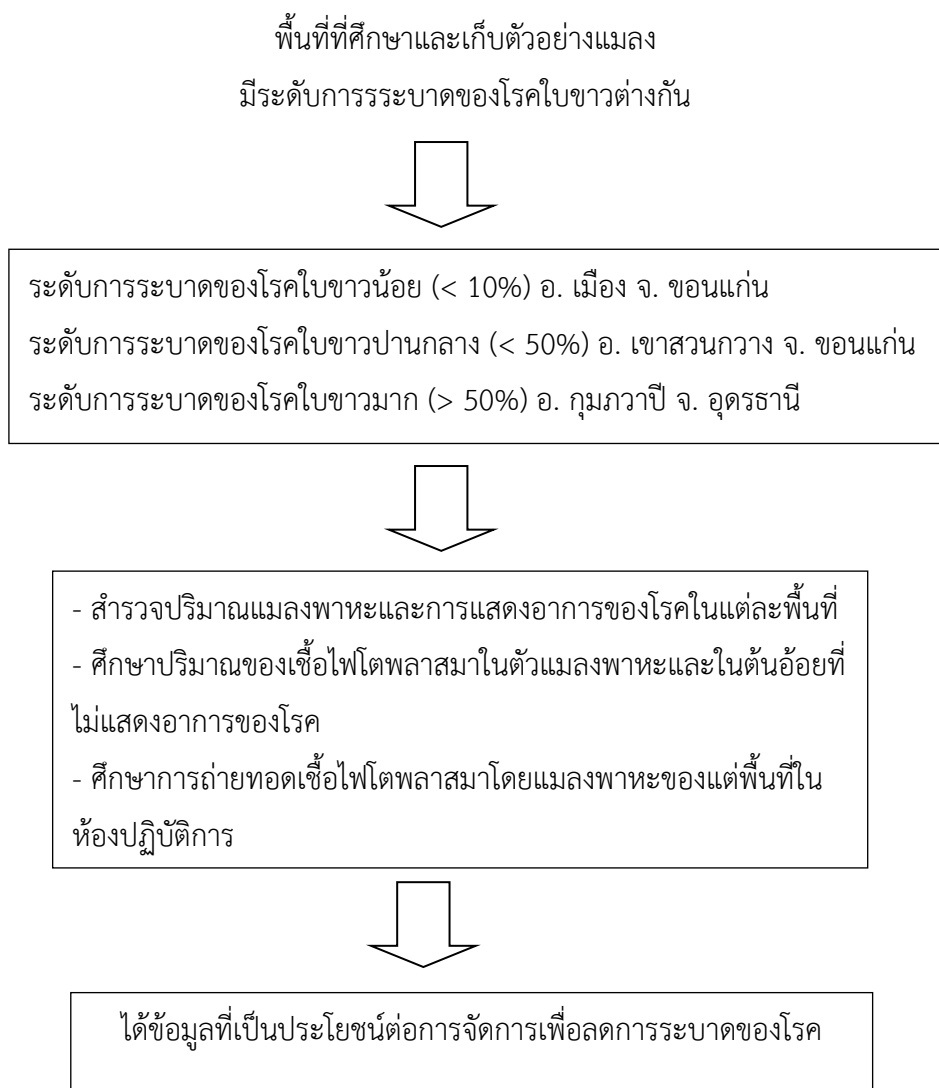
โรคใบขาวอ้อยจัดเป็นปัญหาที่สำคัญของการปลูกอ้อยในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) การระบาดวิทยาของโรค เกิดจากการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์และมีเพลี้ยจักจั่นสองชนิดเป็นแมลงพาหะได้แก่เพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และ *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura (Hanboonsong et al., 2002, 2006) โดยเฉพาะแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* มีการเพาะขยายเชื้อโรคใบขาวภายในตัวแมลงเอง และสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านไปได้ นอกจากแมลงเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อได้แล้ว ยังเป็นแหล่งเพาะอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคด้วย เพราะถึงแม้ว่าจะปลูกท่อนพันธุ์ที่สะอาดไม่มีโรค แต่อ้อยก็สามารถได้รับเชื้อสาเหตุโรคใบขาวจากแมลงพาหะได้โดยตรงจากการดูดกินแมลงพาหะจึงถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการระบาดของโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งและปัจจุบันยังไม่มีอ้อยพันธุ์ต้านทานต่อโรคใบขาวอ้อย และยังไม่มียุทธวิธีที่มีประสิทธิภาพในป้องกันกำจัดและควบคุมโรคใบขาว จากการติดตามประชากรแมลงพาหะและการเกิดโรคใบขาวมาอย่างต่อเนื่อง มีข้อสังเกตถึงการเกิดโรคใบขาวอ้อยในบางพื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรงและต่อเนื่อง ขณะที่บางพื้นที่ไม่ค่อยมีการระบาด

ดังนั้นโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดวิทยาและความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยโดยหารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะ จำนวนเชื้อสาเหตุของโรคในแมลงพาหะ ในต้นอ้อยต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อยในแต่ละช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพไร่จากแหล่งที่มีความรุนแรงของการระบาดของโรคที่แตกต่างกัน รวมทั้งทำการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคและทำให้เกิดโรคของแมลงพาหะที่เพาะเลี้ยงจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคแตกต่างกันในสภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งหากทราบข้อมูลปัจจัยใดที่มีผลต่อการระบาดวิทยาและความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยตลอดจนช่วงเวลาใดที่สามารถพบเชื้อสาเหตุโรคและทำให้เกิดการระบาดของโรคใบขาวมาก รวมทั้งประสิทธิภาพของการถ่ายทอดเชื้อของแมลงพาหะจากสภาพแปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวต่างกัน ซึ่งสามารถเป็นข้อมูลเพื่อนำไปใช้ในการจัดการแมลงพาหะเพื่อลดการระบาดของโรคโดยแมลงพาหะ

1.2 วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย

การศึกษาความสัมพันธ์ของการระบาดของโรคใบขาวจำนวนของเชื้อไฟโตพลาสมาและแมลงพาหะในสภาพแปลงอ้อยที่มีการระบาดของโรคใบขาวที่แตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตการวิจัย



1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

รายละเอียดของวิธีการดำเนินการวิจัยอยู่ในบทที่ 3

2. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. แมลงพาหะทั้งเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura เป็นแมลงพาหะที่พบในแปลงปลูกอ้อย ซึ่งจำนวนประชากรของเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลเป็นแมลงพาหะหลัก พบประชากรประมาณ 90% ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว และเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีประชากรมากในช่วงต้นฝน มิถุนายน-กรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงแรกของการเจริญเติบโตหรืออยู่ในระหว่างอย่างปล้อง ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาวมีจำนวนประชากร ในช่วงอ้อยเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงเก็บเกี่ยว โดยมีประชากรมากในช่วงเดือนกันยายน ดังนั้นการหลีกเลี่ยงหรือจัดการช่วงเวลาปลูกอ้อยโดยไม่ปลูกในช่วงต้นฝนอาจสามารถลดความเสี่ยงจากการดูดกินและถ่ายทอดเชื้อของแมลงพาหะได้

2. แมลงพาหะมีการรับเชื้อ และเพิ่มปริมาณในตัว แต่มีปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคต่อตัวแมลงพาหะไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ แต่จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวมีปริมาณมากในแมลงพาหะเพศเมียมากกว่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกพื้นที่ และ สัดส่วนเพศของแมลง (แมลงเพศเมียมากกว่าเพศผู้) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงในการเกิดโรค

3. จำนวนแมลงพาหะ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดโรคใบขาว โดยระดับความรุนแรงในการเกิดโรคใบขาวอ้อยขึ้นอยู่กับจำนวนแมลงพาหะที่อาศัยอยู่ในแปลงอ้อย และแมลงพาหะเพศเมียมีความสำคัญต่อการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย พื้นที่ปลูกอ้อยทั้งสองพื้นที่ในจังหวัดอุดรธานี มีการระบาดของโรคใบขาวและจำนวนแมลงพาหะมากกว่าในพื้นที่ปลูกอ้อยในจังหวัดขอนแก่น

4. ความรุนแรงของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงที่มาจากพื้นที่ต่างๆทั้ง 3 พื้นที่ เมื่อนำมาทดสอบถ่ายทอดเชื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ในการทำให้เกิดโรคต่อต้นอ้อย

5. จากการสำรวจโรคใบขาวในสภาพไร่ และจากการถ่ายทอดเชื้อโรคแมลงพาหะในห้องปฏิบัติการ พบว่าต้นอ้อยที่ได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงพาหะ ต้นอ้อยมีเชื้อสาเหตุของโรคอยู่แต่มีการแสดงอาการของโรคออกมาได้น้อย ดังนั้นต้นอ้อยจึงเป็นพวกที่มีเชื้อแอบแฝง ไม่แสดงอาการใบขาวออกมา และเมื่อนำไปเป็นท่อนพันธุ์ปลูกอาจแสดงอาการใบขาวปรากฏออกมาได้ อนึ่งในต้นอ้อยที่มีเชื้อแอบแฝงนี้พบว่าเมื่อเกษตรกรมีการดูแลแปลงอย่างต่อเนื่องและใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง (ระยะก่อนปลูกและแตกกอ) และกำจัดวัชพืชอย่างสม่ำเสมอ ทำให้ต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อยปรากฏออกมามีไม่มากนัก

บทคัดย่อ

โรคใบขาวเป็นโรคที่มีความร้ายแรงต่อผลผลิตอ้อยในประเทศไทย การระบาดของโรคโดยเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ ซึ่งเป็นทั้งแหล่งสะสมและเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมา ดังนั้นวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการระบาดของโรคใบขาว และแมลงพาหะในสภาพแปลงอ้อยที่มีการระบาดของใบขาวที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ แปลงที่มีการระบาดของโรคในระดับน้อยที่ อ.เมือง จ.ขอนแก่น แปลงที่มีการระบาดของโรคในระดับปานกลางที่ อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น และแปลงที่มีการระบาดของโรคในระดับมากที่ อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี โดยสำรวจจำนวนแมลงพาหะด้วยกับดักแสงไฟและนับจำนวนต้นอ้อยที่เป็นโรคใบขาวทุกเดือนในสภาพไร่ และตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาทั้งในอ้อยและแมลงพาหะ โดยใช้ real time PCR ด้วยไพรเมอร์เฉพาะเจาะจงของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย ผลการศึกษาพบว่าแมลง 2 ชนิดคือเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura)) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovittatus* Matsumura) เป็นแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย ซึ่งแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลเป็นแมลงพาหะหลักในการนำเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งมีจำนวนประชากรมากในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของอ้อย ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาว เป็นแมลงพาหะที่พบในช่วงที่อ้อยมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ไกล่ระยะเก็บเกี่ยว จึงไม่มีผลกระทบต่อผลผลิตมาก จำนวนประชากรของเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีผลโดยตรงต่อการแพร่ระบาดของโรค โดยในแปลงที่มีการระบาดของโรคในระดับมาก อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี มีจำนวนแมลงพาหะมาก ส่วนแปลงที่มีการระบาดของโรคน้อย พบการระบาดของจำนวนประชากรแมลงพาหะน้อยเช่นกัน และพบว่าจำนวนแมลงพาหะ สัดส่วนเพศเมียพบจำนวนตัวและจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวมากกว่าเพศผู้ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงในการเกิดโรค ข้อมูลปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการระบาดและความรุนแรงของการเกิดโรคใบขาวอ้อยมีประโยชน์นำมาใช้ในการบริหารจัดการโรคใบขาวอ้อย

คำสำคัญ: แมลงพาหะ จำนวนของเชื้อไฟโตพลาสมา ระดับการระบาดของโรค

Abstract

Sugarcane white leaf disease (SCWLD) is a major disease of sugarcane in Thailand, caused by phytoplasma which is transmitted to the plant by leafhopper vectors which are also a pathogen reservoir where the phytoplasma multiply. The objective of this study was to evaluate factors involving the epidemiology of sugarcane white leaf disease and insect vectors from sugarcane fields with three different levels of disease occurrence as a low level of SCWLD at Muang District Khon Kaen, moderate and high levels of SCWLD at Khao Suan Kwang District Khon Kaen and Kumphawapi District Udon Thani Province, respectively. Insect vectors were monitored by using light trap and sugarcane plants exhibiting white leaf symptoms were surveyed in sugarcane fields monthly from both plant cane and ratoon cane. Latent disease symptoms in sugarcane plants were investigated by randomly sampling from field and diagnosis by PCR and real time PCR techniques with SCWL specific primers of 16S rRNA. The amount of SCWL phytoplasma from both insect vectors and sugarcane plants collected from three selected sugarcane fields were compared by using real time PCR. The result showed that two insect vectors *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) and *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura were found in all fields. The leafhopper *M. hiroglyphicus* is dominant species occurs during young vegetative stage of sugarcane growth whereas the leafhopper *Y. flavovittatus* appears during the sugarcane mature stage near the harvesting period therefore has almost no affected on the sugarcane yield. A higher number of insect vectors and higher amount of SCWL phytoplasma found in female insects as well as higher number of female vectors were seen in the sugarcane field with high amount of disease occurrence (at Kumphawapi Districts Udon Thani Province) compared with the low disease field. Conclusion the high number of insect vectors correlates affecting high SCWLD occurrence. This information can be useful for SCWLD management.

Keyword: insect vector, phytoplasma quantity, distributions of diseases

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	7
บทที่ 4 ผลการวิจัย	18
บทที่ 5 สรุปผลงานวิจัย	42

บทที่ 1

บทนำ

โรคใบขาวอ้อยจัดเป็นปัญหาที่สำคัญของการปลูกอ้อยในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) การระบาดวิทยาของโรค เกิดจากการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์และมีเพลี้ยจักจั่นสองชนิดเป็นแมลงพาหะได้แก่เพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และ *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura (Hanboonsong et al., 2002, 2006) โดยเฉพาะแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* มีการเพาะขยายเชื้อโรคใบขาวภายในตัวแมลงเอง และสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านไปทางไข่ได้ นอกจากแมลงเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อได้แล้วยังเป็นแหล่งเพาะอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคด้วย เพราะถึงแม้ว่าจะปลูกท่อนพันธุ์ที่สะอาดไม่มีโรคแต่อ้อยก็สามารถได้รับเชื้อสาเหตุโรคใบขาวจากแมลงพาหะได้โดยตรงจากการดูดกินแมลงพาหะจึงถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการระบาดของโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งและปัจจุบันยังไม่มีอ้อยพันธุ์ต้านทานต่อโรคใบขาวอ้อย และยังไม่มียูวิธีที่มีประสิทธิภาพในป้องกันกำจัดและควบคุมโรคใบขาว จากการติดตามประชากรแมลงพาหะและการเกิดโรคใบขาวอย่างต่อเนื่อง มีข้อสังเกตถึงการเกิดโรคใบขาวอ้อยในบางพื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรงและต่อเนื่อง ขณะที่บางพื้นที่ไม่ค่อยมีการระบาด

ดังนั้นโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดวิทยาและความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยโดยหารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะ จำนวนเชื้อสาเหตุของโรคในแมลงพาหะ ในต้นอ้อยต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อยในแต่ละช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพไร่ จากแหล่งที่มีความรุนแรงของการระบาดของโรคที่แตกต่างกัน รวมทั้งทำการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคและทำให้เกิดโรคของแมลงพาหะที่เพาะเลี้ยงจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคแตกต่างกันในสภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งหากทราบข้อมูลปัจจัยใดที่มีผลต่อการระบาดวิทยาและความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยตลอดจนช่วงเวลาใดที่สามารถพบเชื้อสาเหตุโรคและทำให้เกิดการระบาดของโรคใบขาวมาก รวมทั้งประสิทธิภาพของการถ่ายทอดเชื้อของแมลงพาหะจากสภาพแปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวต่างกัน ซึ่งสามารถเป็นข้อมูลเพื่อนำไปใช้ในการจัดการแมลงพาหะเพื่อลดการระบาดของโรคโดยแมลงพาหะ

วัตถุประสงค์

การศึกษาความสัมพันธ์ของการระบาดของโรคใบขาวจำนวนของเชื้อไฟโตพลาสมาและแมลงพาหะในสภาพแปลงอ้อยที่มีการระบาดของใบขาวที่แตกต่างกัน

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

อ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปี 2013/2014 ประเทศไทยมีการส่งออกน้ำตาล 7.5 ล้านตัน ซึ่งมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากประเทศบราซิล (Statista, 2015) คาดการณ์ว่าในปีการผลิต 2015/2016 ประเทศไทยมีโอกาที่จะส่งออกน้ำตาลได้มากขึ้นถึง 8.8 ล้านตัน เนื่องจากความต้องการที่มากขึ้นของประเทศจีนและชูดาน (USUD, 2015) ในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยในปีการผลิต 2557/2558 มีมากถึง 10,530,927 ไร่ มีการปลูกอ้อยในภาคเหนือ 2,414,043 ไร่ ภาคกลาง 2,992,584 ไร่ ภาคตะวันออก 558,167 ไร่ และปลูกมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถึง 4,566,133 ไร่ คิดเป็น 43.36% ของพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล, 2558) มีการจ้างงานในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลมากกว่า 1,000,000 คน ในปีการผลิต 2556/57 มีผลผลิตอ้อย 103.67 ล้านตัน ผลิตเป็นน้ำตาลได้ มากกว่า 11 ล้านตัน แบ่งเป็นการบริโภคภายในประเทศ 2.5 ล้านตัน ส่วนที่เหลือส่งออกไปยังต่างประเทศสร้างรายได้ประมาณ 180,000 ล้านบาท นอกจากการผลิตน้ำตาลแล้วยังสามารถนำกากอ้อยที่เหลือจากการผลิตน้ำตาลแปรรูปในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น เอทานอล สุรา ขอส ผงชูรส อาหารสัตว์ ไม้อัด กระดาษ ปุ๋ยอินทรีย์ และเชื้อเพลิงไฟฟ้า (ประสิทธิ์, 2558)

ประวัติโรคใบขาวอ้อย

โรคใบขาวอ้อยมีรายงานการค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1947 ที่ประเทศอินเดีย (Masumoto et al., 1968) ในประเทศได้ค้นพบโรคใบขาวอ้อยครั้งแรกที่ทางใต้ของประเทศในปี ค.ศ. 1958 ในอ้อยพันธุ์ NCo 310 (Masumoto et al., 1968; Lin et al., 1969) ซึ่งการระบาดของโรคใบขาวทำให้ผลผลิตอ้อยของได้หวั่นในช่วงปี ค.ศ. 1965 -1972 เสียหายมากกว่า 10 % ของพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด (Leu, 1974) ในช่วงแรกที่มีการค้นพบโรคใบขาวอ้อยนั้นเข้าใจว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเนื่องจาก ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคที่ผิวพืช อาการของโรคสามารถหายได้ และการใช้น้ำร้อนแช่ท่อนพันธุ์สามารถลดการเกิดโรคได้ จนกระทั่งภายหลังพบว่าเกิดจากเชื้อคล้ายมายโคพลาสมา (Shikata et al., 1969)

ส่วนประเทศไทยมีการนำเข้าพันธุ์อ้อยจากต่างประเทศเข้ามาปลูกเพื่อหาพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่ออุตสาหกรรมน้ำตาลโดยมีการนำพันธุ์อ้อยจากประเทศอินเดียเข้ามาหลายพันธุ์ได้แก่ พันธุ์ Co 281, Co 421, Co 419, Co 775, Co 798, Co 1148 และ Nco 310 (รณยุทธ, 2550) จึงเป็นเหตุให้มีการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยในประเทศไทย โดยการเกิดโรคใบขาวในประเทศไทยครั้งแรกรายงานโดย Mangeldorf ในปี ค.ศ. 1954 ที่อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง (ยุพา, 2519) ในอ้อยพันธุ์ Co 421 ต่อมาโรคใบขาวอ้อยได้แพร่กระจายไปในพื้นที่ปลูกอ้อยทั่วทั้งประเทศไทย (Martin, 1964) โรคใบขาวอ้อยสร้าง

ความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลเป็นอย่างมาก เช่น ในปี 2505/06 ที่จังหวัดลำปางมีการระบาดของโรครุนแรงทำให้ผลผลิตลดลง 50% ต่อมาในปี พ.ศ. 2517 เกิดการระบาดในหลายจังหวัดมากกว่าหมื่นไร่ เกิดความเสียหายมากกว่า 100 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2524 -2526 โรคใบขาวระบาดอย่างรุนแรงในเขตจังหวัดชลบุรี ต้องเผาอ้อยทิ้งหลายพันไร่ ปี 2532 มี การระบาดอย่างรุนแรงในอำเภอกุมภวาปี และอำเภอศรีธาตุ จังหวัดอุดรธานี 50,000 ไร่ มูลค่าความเสียหายไม่ต่ำกว่า 255 ล้านบาท ปี 2533/34 มีการระบาดของโรคเป็นพื้นที่ 179,000 ไร่ ทำให้ผลผลิตอ้อยเสียหายประมาณ 800,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 774 ล้านบาท (พรทิพย์, 2542) โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปีการผลิต 2554/2555 มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย มากกว่า 170,000 ไร่ คือเป็น 38% ของพื้นที่ปลูก ส่งผลผลิตเสียหายต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลเป็นมูลค่าความประมาณ 1,700 ล้านบาท (คณะกรรมการแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคใบขาว, 2556)

เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถก่อโรคในอ้อยได้หลายโรค ได้แก่ โรคกอตะไคร้ จะมีอาการแตกใบเป็นฝอย ใบเป็นสีเขียวหรืออาจมีอาการใบสีขาวร่วมด้วย มีใบขนาดเล็ก อ้อยมีการแตกตาข้างหรือแตกหน่อมาก ผิดปกติคล้ายกอตะไคร้ ซึ่งอาการที่มีใบขาวเรียกว่า Sugarcane grassy shoot มีความคล้ายของระดับนิวคลีโอไทด์กับโรคใบขาวอ้อย 99% ส่วนที่แตกพุ่มใบเขียว (Sugarcane green grassy shoot) เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาคนละสายพันธุ์กับโรคใบขาวอ้อยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันจากการลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S ITS (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2555) โรคใบเหลืองอ้อย (sugarcane yellow leaf syndrome) อ้อยจะแสดงอาการเหลืองที่เส้นกลางใบและแผ่นใบที่อยู่ติดกับเส้นกลางใบ สีของอาการแตกต่างออกไปตามพันธุ์อ้อย อาการที่พบส่วนใหญ่พบในอ้อยที่มีอายุมากกว่า 4 เดือน อาการใบที่มีสีเหลืองจะเกิดเฉพาะในใบแก่ อ้อยที่เป็นโรคนี้อาจบางครั้งพบว่ามีเชื้อสาเหตุทั้งไฟโตพลาสมาและไวรัสร่วมกัน เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบเหลืองอ้อยอยู่ในกลุ่ม X-disease phytoplasma การแพร่กระจายของโรคพบว่ามีการแพร่กระจายผ่านท่อนพันธุ์ และ โรค sugarcane ramu stunt อ้อยแสดงอาการใบชิดเหลือง มีจุดตามใบแตกกอมากผิดปกติและแคระแกร็น มีการแพร่กระจายผ่านท่อนพันธุ์และแมลงพาหะ *Eumetopina flavipes* เชื้อไฟโตพลาสมาโรค sugarcane ramu stunt มีความคล้ายคลึงกับโรคใบขาวอ้อย 95.98% (Marcone, 2002) แต่ภายหลัง Braithwaite et al. (2007) ทำการศึกษาโรค sugarcane ramu stunt พบว่าเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส และไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคนี้

สำหรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย (Sugarcane white leaf phytoplasma) มีลักษณะกลม (pleomorphic shape) มีขนาด 80-900 นาโนเมตร อยู่ในกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมากลุ่มย่อย 16 SrXI-B ซึ่งเป็นเชื้อไฟโตพลาสมากลุ่มเดียวกับที่เกิดอาการโรคกอตะไคร้ของอ้อย (sugarcane grassy shoot) และจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา 16 SrXI (Rice yellow dwarf group) ซึ่งเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งทำให้พืชแสดงอาการใบชิดขาวหรือใบเหลือง ใบสีส้ม อันเนื่องมาจากการสูญเสียเม็ดสีเขียว

หรือคลอโรฟิลล์ (Davis and Sinclair, 1998; Lee et al., 2000)) เชื้อไฟโตพลาสมาไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ต้องอาศัยภายในเซลล์พืชและแมลงซึ่งปัจจุบันยังไม่พบว่ามีพืชชนิดใดเป็นพื้กอาศัยหรือสำรองเก็บเชื้อไว้ได้ (Wongkaew et.al., 1997)

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์ความเหมือนของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยกับเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆ จากการจำแนกเชื้อโดยใช้ 16S rDNA sequence **ที่มา:** ดัดแปลงจาก Wongkaew (2012)

เชื้อไฟโตพลาสมา	ชื่อโรค	%ความเหมือนกับโรคใบขาวอ้อย
<i>Candidatus Phytoplasma oryzae</i>	Rice yellow dwarf	97.6
	Kalimantan wilt disease of coconut	98
	Waligama wilt disease of coconut	98
	Root wilt disease of coconut	99
	Yellow leaf disease of areca palms	99
<i>Candidatus Phytoplasma cynodonits</i>	Burmuda grass white leaf	97.8-98.4
	Delhi grass white leaf	97.9
	Chlorotic streak and white leaf disease of <i>Oplismenus burmannii</i> and <i>Digitalis saguinailis</i> grasses	97
	Coconut yellow decline	98
	Brachiaria grass white leaf	97.9-98.4
BraWL		

ลักษณะอาการโรคใบขาวอ้อย

อ้อยที่เป็นโรคใบขาวจะมีอาการใบขาวปนเหลืองหรือขาวซีดทั้งใบในต้นอ้อยที่มีอาการรุนแรงมีการแตกตาข้างและหน่อมากกว่าปกติ อาการใบขาวในอ้อยเกิดจากการที่เชื้อไฟโตพลาสมาไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงทำให้เกิดการสลายตัวของคลอโรฟิลล์และคาร์โรทีนอยด์ เมื่อขาดคลอโรฟิลล์ใบจึงเปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีขาว (Bertamini and Nedunchezian, 2001) โรคใบขาวอ้อยแสดงอาการได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต ส่วนมากพบในระยะต้นอ่อนที่งอกจากอ้อยตอหรือท่อนพันธุ์ที่เป็นโรค ต้นอ้อยที่เป็นโรคโดยถ้าอาการรุนแรงมากอ้อยต้นนั้นจะแห้งตายไปในที่สุด ในอ้อยบางลำที่ไม่แสดงอาการอาจมีเชื้อแฝงซึ่งต้นอ้อยสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติเนื่องจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณของเชื้อที่ไม่มากพอ สารอาหารที่ได้รับเหมาะสม และความสมบูรณ์แข็งแรงของต้นอ้อย เป็นต้น แต่เมื่อมีการนำไปปลูกใหม่ใน

สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต้นอ้อยมีภาวะเครียดต้นที่ออกมาใหม่อาจจะแสดงอาการใบขาวได้ (พรทิพย์, 2542; ศุจิรัตน์ และคณะ 2555)

การแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อย

เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวไม่สามารถเจริญภายนอกเซลล์ได้ต้องอาศัยภายในเซลล์พืชและแมลงพาหะ ดังนั้นการแพร่ระบาดของโรคได้แก่

1 การแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยผ่านทางท่อนพันธุ์

โรคใบขาวอ้อยสามารถแพร่ระบาดได้โดยท่อนพันธุ์ที่มีเชื้อ ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมาอาศัยอยู่ในทุกส่วนของลำอ้อย เมื่อเกษตรกรนำท่อนพันธุ์ที่มีเชื้อไปปลูกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การเกิดโรค อ้อยที่งอกจะแสดงอาการใบขาว ซึ่งการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยผ่านทางท่อนพันธุ์เป็นวิธีการที่ทำให้โรคแพร่กระจายได้รวดเร็วและกว้างขวาง ถึงแม้จะเลือกต้นอ้อยที่ไม่มีอาการไปใช้เป็นท่อนพันธุ์แต่อาจจะมีเชื้อแฝงอยู่ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีอ้อยสายพันธุ์ใดที่สามารถต้านทานโรคใบขาวอ้อยได้ (พรทิพย์, 2542)

2 แมลงพาหะโรคใบขาวอ้อย

โรคใบขาวอ้อยมีแมลงพาหะนำโรคที่สำคัญคือเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura (ภาพที่ 1) อยู่ในวงศ์ Cicadellidae อันดับ Hemiptera เป็นแมลงปากดูดที่พบได้ทั่วไปในแหล่งปลูกอ้อย กินโดยใช้ปากที่มีลักษณะแหลมยาว (stylet) เจาะลงไปถึงท่อลำเลียงอาหารของใบหรือต้นอ้อย (Chen, 1979; Hanboonsong et al., 2002; 2006) ซึ่งแมลงเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* (Matsumura) เป็นแมลงพาหะหลักที่สำคัญ (Matsumoto et al., 1968; Chen, 1974) โดยเชื้อไฟโตพลาสมาสามารถเพิ่มปริมาณภายในตัวแมลงและส่งผ่านเชื้อต่อไปยังรุ่นต่อไปของแมลงเองได้ โดยถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่ ทำให้แมลงพาหะเองนี้เป็นแหล่งเพาะอาศัยและสำรองเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยที่สำคัญ (Hanboonsong et al., 2002) และ Hanboonsong et al. (2006) รายงานว่าเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* เพศเมียมีความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อได้ดีกว่าเพศผู้โดยเมื่อปล่อยเพลี้ยจักจั่นเพศผู้

นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Hanboonsong et al. (2006) พบว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Y. flavovittatus* มีความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อ แต่ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื่อน้อยกว่าเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* โดยเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Y. flavovittatus* ทำให้อ้อยปกติเกิดโรค 45% ส่วนเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* ทำให้อ้อยปกติเกิดโรค 55% เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* มีการระบาดมากในช่วงฤดูฝนระหว่างปลายเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม และพบได้น้อยในช่วงฤดูแล้ง ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Y. flavovittatus* จะพบมากในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน (Hanboonsong et al., 2006 ; Thein, 2012; Kaewmanee, 2013)

ดังนั้นถึงแม้ว่าจะปลูกท่อนพันธุ์ที่สะอาดไม่มีโรคแต่อ้อยก็สามารถได้รับเชื้อสาเหตุโรคใบขาวจากแมลงพาหะได้โดยตรงจากการดูดกินแมลงพาหะจึงถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการระบาดของโรคที่สำคัญอย่างหนึ่ง ซึ่งการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคใบขาวนั้นขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์อ้อย ความรุนแรงของเชื้อสาเหตุ และแมลงพาหะทั้งจำนวนประชากรและประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อโรค ในกรณีแมลงพาหะที่เป็นทั้งตัวการทำให้เชื้อโรคแพร่กระจายและแหล่งสะสมเชื้อ ซึ่งประชากรแมลงพาหะมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับการเกิดโรคใบขาวในแปลงอ้อยคือพบว่าอ้อยมีการแสดงออกของโรคสูงสุดในช่วงเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ซึ่งมีประชากรแมลงพาหะจำนวนมาก แต่การศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะในแต่ละช่วงเวลากับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยและการเกิดโรคใบขาวอ้อย ตลอดจนประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคของแมลงจากแหล่งที่มีระดับการระบาดของโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลต่างๆดังกล่าวจะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการระบาดวิทยาและความรุนแรงของโรค ที่นำโดยแมลงพาหะ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการจัดการแมลงพาหะเพื่อลดการระบาดของโรคโดยแมลง



ภาพที่ 1 เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura)
และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของการระบาดของโรคใบขาวอ้อย เชื้อไฟโตพลาสมา และเพลี้ยจักจั่น แมลงพาหะในสภาพไร่

3.1.1 การสำรวจและคัดเลือกพื้นที่การศึกษา

การคัดเลือกแปลงปลูกอ้อย ในเขตจังหวัดขอนแก่นและจังหวัดอุดรธานี โดยคัดเลือกพื้นที่สามระดับของการระบาดของโรคใบขาว ซึ่งใช้ข้อมูลการระบาดของโรคจากสอบถามเกษตรกร เจ้าหน้าที่ส่งเสริมของโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล และมีข้อมูลการระบาดของโรคจากการเก็บข้อมูลการระบาดอย่างต่อเนื่องจากงานวิจัยเดิม โดยแปลงอ้อยที่คัดเลือกต้องลักษณะแปลงปลูก พันธุ์ที่ใช้ พืชอื่นๆที่ติดกับแปลงเป้าหมาย และการจัดการแปลงต้องมีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้นแปลงที่คัดเลือกจากพื้นที่ ได้แก่

- 1) แปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวรุนแรงมาก ซึ่งเป็นแปลงที่มีเปอร์เซ็นต์การระบาดของโรคใบขาวอ้อยมากกว่า 50% ได้แก่ แปลงปลูกอ้อยในพื้นที่ อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี
- 2) แปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวรุนแรงปานกลาง ซึ่งเป็นแปลงที่มีเปอร์เซ็นต์การระบาดของโรคใบขาวอ้อยน้อยกว่า 50% ได้แก่ แปลงปลูกอ้อยในพื้นที่ อำเภอเขาสวนกวาง จังหวัดขอนแก่น
- 3) แปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวน้อยกว่า 10% หรือไม่มีการระบาด ได้แก่ แปลงปลูกอ้อยในพื้นที่ ตำบลบ้านค้อ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

การเก็บข้อมูลของแปลงอ้อยที่คัดเลือกโดยบันทึกพันธุ์อ้อย อายุอ้อย การจัดการแปลงอ้อย พืชอื่นๆที่ปลูกในบริเวณนั้น ตลอดจนวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมีของคุณสมบัติของดินในแต่ละพื้นที่ที่คัดเลือก รวมทั้งการบันทึกข้อมูลสภาพอากาศ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝน

3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนแมลงพาหะ จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมา และการระบาดของโรคใบในสภาพแปลงอ้อย

3.2.1 การสำรวจจำนวนประชากรแมลงพาหะ เก็บตัวอย่างแมลงพาหะและตรวจหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลง

การศึกษารูปแบบการการระบาดของแมลงพาหะทั้งสองชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) และ เพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Y. flavovittatus*) และเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะในช่วงหนึ่งฤดูกาลของการปลูกอ้อย โดยสำรวจพลวัตจำนวนประชากรและเก็บตัวอย่างแมลงพาหะจากแปลงอ้อยที่มีการระบาดของโรคทั้งสามระดับใน 3 พื้นที่ที่คัดเลือก ซึ่งแต่ละพื้นที่สำรวจแปลงขนาด 1.5 ไร่ แบ่งเป็นแปลง 0.5 ไร่ จำนวน 3 ซ้ำ ใช้กับดักแสงไฟ black light blue ขนาด 20 วัตต์ ร่วมกับ

แผ่นพลาสติกกาวยเหนียวในพื้นที่ 1 ม. ต่อกับดัก (1 กัดัก/ข้า/แปลง) รวมทั้งหมด 3 กัดัก/พื้นที่ เปิดกับดักแสงไฟดักจับแมลงตั้งแต่ช่วงเวลา 18:00 – 20:00 น. ดักเก็บแมลงเดือนละครั้ง โดยบันทึกนับจำนวนแมลงพาหะทั้งสองชนิด เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล และ เพลี้ยจักจั่นหลังขาว และบันทึกสัดส่วนเพศในทุกเดือน

การตรวจหาจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาหะ โดยนำแมลงพาหะตัวเต็มวัย 10 ตัว/เพศ/แปลง/พื้นที่ที่เก็บจากแปลงย่อยในแต่ละเดือนมาสกัด DNA วัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA และตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวอย่างด้วยวิธี nested-PCR โดยใช้ชุด Primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อย จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในส่วนของยีน 16S rRNA และ intergenic spacer region ที่มีต่อส่วนของยีน 23S rRNA จำนวน 2 ชุด ชุดแรกคือ ชุด Primer MLO-X; 5-GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC-3; MLO-Y; 5-GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC-3 (700 กิโลเบส) และชุดที่สองคือ ชุด Primer P1 -5-GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG -3 และ P2-5-GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC-3 (210 กิโลเบส) โดยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการ Hanboonsong et al. (2002, 2006)

ส่วนการตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยต่อตัวของแมลงพาหะ (ที่ความเข้มข้นของ DNA 100 ng/μl เท่ากันทุกตัวอย่าง) โดยใช้วิธี real-time PCR ซึ่งใช้สารย้อมสีปฏิกิริยาโดยสารละลาย SYBR Green ใช้ ยีน CO I (Cytochrome C Oxidase subunit I) เป็น Reference gene เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time PCR และมีตัวเทียบมาตรฐาน (standard) ที่ได้จากโคลนยีนไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในส่วนของยีน 16S rRNA ตามวิธีการของ Kaewmanee et al. (2015) อ้างตาม Folmer et al. (1994) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจพบ reference gene นำมาตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว โดยใช้ primer ชุด MLO-X/MLO-Y (Kaewmanee et al., 2015) โดยใช้แมลงพาหะเพศเมียและผู้ชายอย่างละ 4 ตัว/แปลง/พื้นที่

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ การนับจำนวนแมลงพาหะจากกับดักวางแผนการทดลองแบบ RCBD ใน 3 พื้นที่ โดยมีแปลงขนาด 0.5 ไร่ จำนวน 3 ข้า ต่อพื้นที่ ส่วนการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อในตัวแมลงพาหะและจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาหะ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) และหาค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SAS (Statistical Analysis Software) รุ่นที่ 9.1

3.2.2 การสำรวจการเกิดโรคใบขาวและการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย

การสำรวจการเกิดโรคใบขาวอ้อยในสภาพไร่

โดยการสำรวจอาการที่แสดงใบขาวและเก็บตัวอย่างต้นอ้อยที่ไม่แสดงอาการใบขาว

3.2.2.1 การสำรวจอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาว

การสำรวจการเกิดโรคใบขาวในแปลงอ้อยเพื่อศึกษารูปแบบการระบาดของโรคและ

แพร่กระจายเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อย เริ่มสำรวจในเดือนกรกฎาคม 2557 จนครบฤดูเก็บเกี่ยว ในพื้นที่ศึกษาขนาดทั้งหมด 1.5 ไร่ โดยแบ่งเป็นสำรวจ 0.5 ไร่/ซ้ำ/แปลง ทั้งหมด 3 ซ้ำใน 1 แปลงจำนวน 3 พื้นที่ของระดับความรุนแรงของโรค โดยเดินสำรวจต้นอ้อยทุกต้นในพื้นที่ที่กำหนดและตรวจนับจำนวนต้นอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาวเดือนละ 1 ครั้ง

3.2.2.2 การสำรวจอ้อยเป็นโรคที่ไม่แสดงอาการ

ทำการเก็บยอดอ้อยที่ไม่แสดงอาการของโรคเพื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวโดยสุ่มเก็บส่วนยอดอ้อย จำนวน 10 ยอด/ซ้ำ/แปลงอ้อยปลูก ทั้งหมด 3 ซ้ำใน 1 แปลงจำนวนจาก 3 พื้นที่ นำมาตรวจหาการพบเชื้อและปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยโดยวิธี nested PCR และ Real-time PCR

การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อย ที่เก็บจากแปลงอ้อยในแต่ละเดือนมาสกัด

DNA วัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA และตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธี nested-PCR โดยใช้ชุด Primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อย จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในส่วนของยีน 16S rRNA และ intergenic spacer region ที่มีต่อส่วนของยีน 23S rRNA จำนวน 2 ชุด ชุดแรกคือ ชุด Primer MLO-X; 5-GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC-3; MLO-Y; 5-GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC-3 และชุดที่สองคือ ชุด Primer P1 -5-GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG -3 และ P2-5-GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC-3 โดยปฏิกิริยา PCR ตาม วิธีการ Wongkaew et al. (1997) และ Hanboonsong et al. (2002, 2006)

ส่วนการตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยต่อยอดอ้อย (ที่ความเข้มข้นของ DNA 100 ng/μl เท่ากันทุกตัวอย่าง) โดยใช้วิธี real-time PCR ซึ่งใช้สารย้อมสีปฏิกิริยาโดยสารละลาย SYBR Green ใช้ ยีน APRT (Anthranilate phosphoribosyltransferase) เป็น Reference gene เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยา real-time PCR และมีตัวเทียบมาตรฐาน (standard) ที่ได้จากการโคลนยีนไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในส่วนของยีน 16S rRNA ตามวิธีการของ Kaewmanee et al. (2015) อ้างตาม Casu et al. (2012) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจพบ reference gene นำมาตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว โดยใช้ primer ชุด MLO-X/MLO-Y (Kaewmanee et al., 2015)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ การเกิดโรคใบขาวอ้อยและการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อในยอดอ้อยปกติและจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อย วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) และหาค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SAS รุ่นที่ 9.1

3.3 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลงพาหะสู่ต้นอ้อย และติดตามการเกิดโรคใบขาวอ้อย ในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.3.1 การเตรียมและการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนแมลงพาหะ

การสำรวจและติดตามประชากรแมลงพาหะในพื้นที่การศึกษาและการเกิดโรคใบขาวอ้อยทั้ง 3 แหล่ง ใน จ.อุดรธานี และ จ.ขอนแก่น ในช่วงที่มีการระบาดโดยใช้กับดักแสงไฟและอุปกรณ์หลอดดูดแมลง ตั้งแต่เวลา 18:00 – 20:00 น. นำแมลงที่ได้จากแต่ละแห่งมาเลี้ยงแยกกันบนต้นอ้อยที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเลี้ยงไว้ในโรงเรือนกระจกควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส จนได้ลูกรุ่นที่ 1 (F1) จึงนำมาศึกษาการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโดยแมลงพาหะ

3.3.2 การเตรียมต้นอ้อยปลอดเชื้อสำหรับศึกษาการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวโดยแมลงพาหะ อ้อยเนื้อเยื่อสายพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ได้คัดเลือกให้ปลอดจากเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อยโดยใช้วิธี PCR ด้วย Primer เฉพาะเจาะจงของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย มาเลี้ยงในโรงตาข่ายกันแมลง เพาะเลี้ยงจนอายุ 2 เดือน จึงนำมาทดสอบการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ

3.3.3 การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาเชื้อใบขาวอ้อยโดยแมลงพาหะ

แมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* ที่เก็บจากแปลงอ้อยทั้ง 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนได้ลูกรุ่นที่ 1 (F1) นำมาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโดยแมลงพาหะตัวเต็มวัย ซึ่งมีขั้นตอนการดูดรับเชื้อบนต้นเป็นโรคใบขาวเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นย้ายแมลงที่มีเชื้อไปต้นอ้อยปกติเพื่อให้แมลงมีระยะเวลาการบ่มเชื้อและเพิ่มจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาหะเป็นเวลา 21 วัน และสำหรับการถ่ายทอดเชื้อจากแมลงพาหะสู่ต้นอ้อยปลอดโรคที่มีอายุ 2 เดือน เป็นระยะเวลา 1 วัน ซึ่งแบ่งแมลงที่ทดลองออกเป็นการถ่ายทอดเชื้อโดยเพศเมียและผู้อย่างละ 20 ตัว/แปลง/พื้นที่ ในแต่ละซ้ำการทดลองมีจำนวนแมลงทั้งหมด 3 ตัว

การบันทึกผลโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อโรคของแมลงพาหะจากทั้งสามแหล่ง โดยนับจำนวนต้นอ้อยที่แสดงออกของอาการโรคใบขาว และตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในต้นอ้อยที่ไม่แสดงอาการและจำนวนเชื้อของโรคในตัวของแมลง ด้วยวิธี real-time PCR การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) และหาค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SAS รุ่นที่ 9.1

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของการระบาดของโรคใบขาวอ้อย เชื้อไฟโตพลาสมา และเพลี้ยจักจั่นแมลงพาหะนำโรค

4.1.1 การสำรวจและคัดเลือกพื้นที่การศึกษา

การคัดเลือกแปลงจากเกษตรกรรายย่อย ที่มีพื้นที่ของการระบาดของโรคใบขาวระดับรุนแรง ที่พื้นที่ใน อ.กุ่มกาวปี จ.อุดรธานี และพื้นที่ของการระบาดของโรคใบขาวระดับปานกลาง และระดับต่ำ ที่ อ.เขาสวนกวาง และ อ.เมือง จ.ขอนแก่น ตามลำดับ (ภาพที่ 2) โดยมีทั้งแปลงอ้อยปลูกและอ้อยต่อ และติดหรือใกล้กับแปลงมันสำปะหลัง ทั้ง 3 พื้นที่ อ้อยทุกแปลงเป็นพันธุ์เดียวกันคือ ขอนแก่น 3 และมีอายุเท่ากันคือปลูกในเดือนตุลาคม พ.ศ.2556 รวมทั้งลักษณะดินเป็นดินทราย การสำรวจการเกิดโรคใบขาวอ้อยจำนวนแมลงพาหะ และดิน ดำเนินการในแปลงอ้อยปลูก ซึ่งแปลงอ้อยปลูกทั้ง 3 พื้นที่ แต่ละพื้นที่สำรวจ 1.5 ไร่ โดยแบ่งเป็น 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีพื้นที่ 0.5 ไร่ (จำนวนต้นอ้อย 15 แถวๆ ละ 35 ต้น)

เมื่อเริ่มคัดเลือกแปลงและสำรวจแมลงและโรคในเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2557 (ระยะอ้อยย่างปล้อง) ซึ่งเกษตรกรได้ปลูกอ้อยไปแล้วตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2556 ทำให้ไม่ได้สำรวจและติดตามแมลงพาหะ และการเกิดโรคใบขาวตั้งแต่อ้อยเริ่มงอก นอกจากนี้ในเดือนพฤศจิกายนเป็นช่วงที่เริ่มเก็บเกี่ยวผลผลิต ดังนั้นจึงต้องคัดเลือกแปลงใหม่ และในเดือนธันวาคมได้คัดเลือกแปลงอ้อยปลูกใหม่ อ้อยมีอายุ 2 เดือน แปลงอ้อยปลูกใหม่อยู่ใกล้กับแปลงเดิม และติดหรือใกล้กับแปลงมันสำปะหลัง เพื่อสำรวจและติดตามแมลง และโรคใบขาวตั้งแต่ระยะอ้อยเริ่มงอกให้ครบวงจรการเจริญเติบโตของอ้อย ทำการสำรวจและเก็บข้อมูลตั้งแต่เดือนธันวาคม 2557-ธันวาคม 2558 (ฤดูกาลที่ 2)

เกษตรกรรายย่อยที่ปลูกอ้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่จะมีระบบการปลูกอ้อยสลับกับพืชไร่อื่นๆ เช่น มันสำปะหลัง ยางพารา ข้าว(บางพื้นที่) เป็นต้น พื้นที่ที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่เป็นดินทราย ไม่มีแหล่งน้ำและไม่มีการให้น้ำในแปลงอ้อย การดูแลจัดการแปลงมีขั้นตอนไม่มาก ดังนี้คือ การถอนวัชพืชในช่วงต้นอ้อยเจริญเติบโตระยะแรก และใส่ปุ๋ย 2 ครั้งก่อนปลูกและระยะอ้อยเจริญเติบโตอายุประมาณ 3 เดือน



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงการคัดเลือกแปลงอ้อยในพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย

4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนแมลงพาหะ จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมา และการระบาดของโรคใบในสภาพแปลงอ้อย

4.2.1 การสำรวจจำนวนประชากรแมลงพาหะ เก็บตัวอย่างแมลงพาหะและตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลง

4.2.1.1 จำนวนประชากรแมลงพาหะ

การสำรวจและติดตามประชากรแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล และ เพลี้ยจักจั่นหลังขาว ในฤดูกาลที่ 1 การเกิดโรคจากพื้นที่ที่มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน 3 พื้นที่ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ.2557 ซึ่งเป็นช่วงอายุอ้อยตั้งแต่ 8-12 เดือน (ระยะเก็บเกี่ยว) พบว่าประชากรของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (จำนวน 5737 ตัว หรือ 88.48%) ซึ่งเป็นแมลงพาหะหลักของการนำเชื้อสาเหตุโรคใบขาวมีจำนวนประชากรมากกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (จำนวน 747 ตัว หรือ 11.52%) ในทุกๆพื้นที่ที่สำรวจ ส่วนในฤดูกาลที่ 2 ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ.2557 ถึงธันวาคม พ.ศ.2558 ซึ่งเป็นช่วงอายุอ้อยตั้งแต่ 2-14 เดือน (ระยะแตกกอ ถึง ระยะเก็บเกี่ยว) พบว่าประชากรของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (จำนวน 11,445 ตัว หรือ 89.91%) ซึ่งเป็นแมลงพาหะหลักของการนำเชื้อสาเหตุโรคใบขาวมีจำนวนประชากรมากกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (จำนวน 1,285 ตัว หรือ 10.09%) ในทุกๆ

พื้นที่ที่สำรวจ (ตารางที่ 1) และจำนวนแมลงพาหะเพศเมียมีจำนวนมากกว่าเพศผู้ในแปลงอ้อยทุกพื้นที่ 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย

ผลจำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล ในฤดูกาลที่ 1 จากการนับจำนวนประชากรแมลงโดยกับดัก พบว่าจำนวนแมลงพาหะทั้งหมดมีมากที่สุดคือ 717.33 ตัว/พื้นที่ ในพื้นที่ที่มีความรุนแรงของโรคมาก (อ.กุ่มกาวปี จ.อุดรธานี) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับพื้นที่ที่มีความรุนแรงอื่นๆ (ตารางที่ 2) และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีจำนวนประชากรระหว่างเดือนกรกฎาคม-กันยายน โดยมีจำนวนประชากรมากสุดในเดือน กรกฎาคม ของทั้ง 3 พื้นที่ (ตารางที่ 4) และจำนวนประชากรลดลงในเดือนถัดมาอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

ในฤดูกาลที่ 2 เกษตรกรในพื้นที่ความรุนแรงของโรคน้อยและมาก ได้คัดเลือกท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคมาปลูกในแปลง ส่วนเกษตรกรจากพื้นที่ความรุนแรงของโรคปานกลางคัดเลือกท่อนพันธุ์ที่ไม่แสดงอาการโรคใบขาวจากแปลงอ้อยในฤดูกาลที่ 1 ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวมีการแสดงออกของโรคประมาณ 20.33% จำนวนแมลงพาหะ เพศเมียมีจำนวนมากกว่าเพศผู้ในแปลงอ้อยทุกพื้นที่ 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย และจำนวนแมลงพาหะทั้งหมดมีมากที่สุดคือ 2,117.67 ตัว/พื้นที่ ในพื้นที่ที่มีความรุนแรงของโรคปานกลาง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพื้นที่ที่มีความรุนแรงอื่นๆ (ตารางที่ 3) และแมลงพาหะมีจำนวนประชากรระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม พ.ศ.2558 จำนวนแมลงมากที่สุดในเดือน มิถุนายน (ตารางที่ 5) แมลงพาหะมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นจากระยะแตกกอจนถึงระยะย่างปล้องและจำนวนประชากรลดลงอย่างต่อเนื่องจากระยะย่างปล้องจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาว พบจำนวนประชากรแมลงในระดับที่น้อยประมาณ 10-11% และพบจำนวนประชากรมากในเดือน กันยายน ในทั้งสองฤดูกาล ซึ่งเป็นระยะอ้อยใกล้ระยะเก็บเกี่ยว และไม่มีผลต่อการแสดงออกของอาการโรคใบขาวอ้อย (ตารางที่ 6,7)

สรุปจากผลการศึกษาเห็นว่าแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลซึ่งเป็นแมลงพาหะหลักของการเกิดโรคใบขาวอ้อย มีจำนวนมากกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว เพศเมียมีจำนวนมากกว่าเพศผู้ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีประชากรมากในช่วงต้นฝน มิถุนายน- กรกฎาคม ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาวมีจำนวนประชากร ในช่วงอ้อยเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงเก็บเกี่ยวโดยมีประชากรมากในช่วงเดือนกันยายน สำหรับพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรค ในฤดูกาลที่ 1 แมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล มีจำนวนมากในพื้นที่ที่มีความรุนแรงของโรคมาก ส่วนในฤดูกาลที่ 2 แมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล มีจำนวนมากในพื้นที่ที่มีความรุนแรงของโรคปานกลางและมีการเกิดโรคมากที่สุดนี้ด้วย

ตารางที่ 1 จำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* ทั้งหมดในฤดูกาลที่ 1 ระหว่างเดือนกรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ.2557 และฤดูกาลที่ 2 ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ.2557-ธันวาคม พ.ศ.2558 จากกับดักแสงไฟร่วมกับกาวเหนียวในพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย

พื้นที่ระดับ ความรุนแรง ของโรค	จำนวนแมลงพาหะทั้งหมด (ตัว)					
	ฤดูกาลที่ 1			ฤดูกาลที่ 2		
	<i>M. hiroglyphicus</i>	<i>Y. flavovittatus</i>	ทั้งหมด	<i>M. hiroglyphicus</i>	<i>Y. flavovittatus</i>	ทั้งหมด
น้อย	1,489	431	1,920	2,123	477	2,600
ปานกลาง	2,098	143	2,241	6,353	578	6,931
มาก	2,150	173	2,323	2,969	230	3,199
รวมทั้งหมด	5,737	747	6,484	11,445	1,285	12,730
เปอร์เซ็นต์	88.48%	11.52%	100%	89.91%	10.09%	100%

ตารางที่ 2 จำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* เฉลี่ยต่อพื้นที่จากกับดักแสงไฟร่วมกับกาวเหนียวในแปลงอ้อยปลูก แต่ละระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยระหว่างเดือนกรกฎาคม-พฤศจิกายน พ.ศ.2557 (ฤดูกาลที่ 1)

พื้นที่ระดับความ รุนแรงของโรค	จำนวนแมลงพาหะ <i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i> เฉลี่ย (ตัว) /พื้นที่				
	เพศเมีย		เพศผู้		ทั้งหมด
	เฉลี่ย	%	เฉลี่ย	%	เฉลี่ย
น้อย	325.67 a ^{1/}	65.61	170.67 a	34.38	496.33 a
ปานกลาง	451.00 a	64.49	248.33 a	35.51	699.33 a
มาก	482.70 a	67.24	235.00 a	32.76	717.33 a
F-test	ns		ns		ns
C.V.(%)	36.38		26.65		31.92

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 จำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* เกลี้ยต่อพื้นที่จากกับดักแสงไฟร่วมกับกาวเหนียวในแปลงอ้อยปลูก แต่ละระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ.2557-ธันวาคม พ.ศ.2558 (ฤดูกาลที่ 2)

พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค	จำนวนแมลงพาหะ <i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i> เกลี้ย (ตัว) /พื้นที่				
	เพศเมีย		เพศผู้		ทั้งหมด
	เฉลี่ย	%	เฉลี่ย	%	เฉลี่ย
น้อย	320.33 c ^{1/}	45.27	387.33 b	54.73	707.67 b
ปานกลาง	1,026.67 a	48.48	1091.00 a	51.52	2,117.67 a
มาก	531.00 b	53.65	458.67 b	46.35	989.67 b
F-test	**		**		**
C.V.(%)	11.30		27.19		12.77

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT (P≤0.05)

ตารางที่ 4 จำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* เกลี้ยต่อพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนกรกฎาคม-กันยายน พ.ศ.2557 (ฤดูกาลที่ 1)

เดือน	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย			F-test	C.V.(%)
	น้อย	ปานกลาง	มาก		
กรกฎาคม	300.33 a ^{1/} , A ^{2/}	522.33 a, A	575.33 a, A	ns	36.70 ^{3/}
สิงหาคม	9.67 b, B	104.33 b, A	107.67 b, A	*	37.97
กันยายน	186.00 b, A	72.33 b, B	33.00 b, B	**	39.64
F-test	*	**	**		
C.V.(%)	50.95 ^{3/}	21.36	22.92		

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT (P≤0.05)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT (P≤0.05)

^{3/} จำนวนแมลงพาหะเฉลี่ยถูกตัดแปลงข้อมูล (Transform data) ในรูป $\sqrt{x}$

ตารางที่ 5 จำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* เกลี้ยต่อพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม พ.ศ.2558 (ฤดูกาลที่ 2)

เดือน	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย			F-test	C.V.(%)
	น้อย	ปานกลาง	มาก		
มิถุนายน	299.33 a ^{1/} , A ^{2/}	620.67 ab, A	346.33 a, A	ns	27.24 ^{3/}
กรกฎาคม	73.67 b, B	189.67 b, A	236.33 a, A	**	21.29
สิงหาคม	207.00 ab, B	481.33 a, A	465.33 a, B	**	25.41
F-test	*	*	ns		
C.V.(%)	45.93	45.59	18.12		

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

^{3/} จำนวนแมลงพาหะเกลี้ยถูกดัดแปลงข้อมูล (Transform data) ในรูป $\sqrt{x}$

ตารางที่ 6 จำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* เกลี้ยต่อพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนสิงหาคม-ตุลาคม พ.ศ.2557 (ฤดูกาลที่ 1)

เดือน	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย			F-test	C.V.(%)
	น้อย	ปานกลาง	มาก		
สิงหาคม	12.00 a ^{1/} , A ^{2/}	7.33 b, A	7.67 b, A	ns	38.84
กันยายน	74.00 b, A	29.33 a, B	27.33 a, B	*	32.70
ตุลาคม	33.67 b, A	7.33 b, AB	3.00 b, B	*	52.60 ^{3/}
F-test	*	*	*		
C.V.(%)	48.23	68.29	68.47		

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

^{3/} จำนวนแมลงพาหะเกลี้ยถูกดัดแปลงข้อมูล (Transform data) ในรูป $\sqrt{x}$

ตารางที่ 7 จำนวนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* เกลี้ยต่อพื้นที่
ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนกันยายน-พฤศจิกายน พ.ศ.2558
(ฤดูกาลที่ 2)

เดือน	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย			F-test	C.V.(%)
	น้อย	ปานกลาง	มาก		
กันยายน	11.33 a ^{1/} , B ^{2/}	137.00 a, A	12.33 ab, B	**	21.49
ตุลาคม	25.33 a, A	38.33 b, A	22.00 a, A	ns	38.84
พฤศจิกายน	5.33 b, B	60.33 b, A	2.33 b, B	*	55.70 ^{3/}
F-test	ns	*	*		
C.V.(%)	54.89 ^{3/}	35.18	53.37		

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

^{3/} จำนวนแมลงพาหะเกลี้ยถูกตัดแปลงข้อมูล (Transform data) ในรูป $\sqrt{x}$

4.2.1.2 จำนวนเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในตัวแมลงพาหะ

จำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเดือนกรกฎาคม-กันยายน พ.ศ.2557 ในฤดูกาลที่ 1 และเดือนมิถุนายน-สิงหาคม พ.ศ. 2558 ในฤดูกาลที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่มีประชากรแมลงพาหะชนิดนี้มากที่สุด พบว่าทั้งแมลงพาหะเพศเมียและเพศผู้ที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมามีจำนวนการตรวจพบเชื้อในตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติของแปลงทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย และจากการตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะพบว่าเพศเมียมีจำนวนเชื้อมากกว่าเพศผู้ทั้ง 3 แปลง และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะในแปลง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยพบว่าทั้งเพศเมียและเพศผู้มีจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 8 และ 9)

ส่วนจำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นหลังขาวที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในเดือนสิงหาคม-ตุลาคม พ.ศ.2557 ในฤดูกาลที่ 1 และเดือนกันยายน-พฤศจิกายน พ.ศ.2558 ในฤดูกาลที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่มีประชากรแมลงชนิดนี้มากที่สุด พบว่าทั้งแมลงพาหะเพศเมียและเพศผู้ถูกตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมามีจำนวนแมลงพบเชื้อสาเหตุของโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติของแปลงทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย และจากการตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะพบว่าเพศเมียมีจำนวนเชื้อมากกว่าเพศผู้ทั้ง 3 แปลง และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะในแปลง 3 ระดับความรุนแรงของ

โรคใบขาวอ้อยพบว่าทั้งเพศเมียและเพศผู้มีจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 10 และ 9)

สรุปจากผลการศึกษาเห็นได้ว่าประชากรแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลพบจำนวนมากในเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม ส่วนแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นหลังขาวพบจำนวนมากในเดือนกันยายน จำนวนแมลงพาหะเพศเมียมากกว่าเพศผู้ ทั้งแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นหลังขาว โดยเพศเมียมีจำนวนเชื้อสาเหตุโรคใบขาวมากกว่าเพศผู้ในแมลงพาหะทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าแมลงพาหะเพศเมียมีความสำคัญต่อการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ยในตัวแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* ใน 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน พ.ศ.2557 ตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR

ระดับ ความ รุนแรงของ โรคใบขาว	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (copies/μl ของ genomic DNA แมลง)					
	กรกฎาคม		สิงหาคม		กันยายน	
	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย
น้อย	2.43×10^3 a ^{1/}	2.13×10^1 - 1.43×10^4	1.76×10^3 a	2.63×10^1 - 1.12×10^4	1.43×10^3 a	3.48×10^1 - 1.01×10^4
ปานกลาง	2.39×10^3 a	1.71×10^1 - 1.65×10^4	2.69×10^3 a	2.67×10^1 - 2.13×10^4	2.90×10^3 a	1.28×10^1 - 3.47×10^4
มาก	3.57×10^3 a	2.01×10^1 - 2.02×10^4	4.09×10^3 a	9.16×10^1 - 1.04×10^4	4.37×10^3 a	1.16×10^1 - 5.18×10^4
ระดับ ความ รุนแรงของ โรคใบขาว	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (copies/μl ของ genomic DNA แมลง)					
	กรกฎาคม		สิงหาคม		กันยายน	
	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้
น้อย	4.80×10^3 a ^{1/}	0.06×10^3 a	1.99×10^3 a	0.04×10^3 a	2.73×10^3 a	0.13×10^3 a
ปานกลาง	4.63×10^3 a	0.16×10^3 a	5.97×10^3 a	0.04×10^3 a	2.11×10^3 a	0.16×10^3 a
มาก	5.64×10^3 a	0.05×10^3 a	8.40×10^3 a	1.24×10^3 a	2.64×10^3 a	0.39×10^3 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 9 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ยในตัวแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* ใน 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม พ.ศ.2558 ตรวจโดยเทคนิค real-time PCR

ระดับ	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล					
ความ	(copies/ μ l ของ genomic DNA แมลง)					
รุนแรงของ	มิถุนายน		กรกฎาคม		สิงหาคม	
โรคใบขาว	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย
น้อย	7.04×10^3 a ^{1/}	3.26×10^3 - 1.54×10^4	2.27×10^3 a	2.22×10^2 - 1.95×10^4	5.77×10^3 a	5.99×10^2 - 2.94×10^4
ปานกลาง	7.45×10^3 a	9.39×10^2 - 3.75×10^4	3.63×10^3 a	2.67×10^2 - 2.60×10^4	9.64×10^3 a	2.78×10^3 - 2.25×10^4
มาก	7.92×10^3 a	9.39×10^2 - 1.50×10^4	5.98×10^3 a	9.09×10^1 - 3.73×10^4	6.93×10^3 a	2.52×10^2 - 1.39×10^4

ระดับ	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล					
ความ	(copies/ μ l ของ genomic DNA แมลง)					
รุนแรงของ	มิถุนายน		กรกฎาคม		สิงหาคม	
โรคใบขาว	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้
น้อย	6.28×10^3 a ^{1/}	5.91×10^3 a	3.67×10^3 a	0.86×10^3 a	7.50×10^3 a	2.04×10^3 a
ปานกลาง	6.93×10^3 a	4.76×10^3 a	5.29×10^3 a	1.97×10^3 a	8.48×10^3 a	6.67×10^3 a
มาก	7.52×10^3 a	6.72×10^3 a	8.71×10^3 a	3.25×10^3 a	6.79×10^3 a	5.43×10^3 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ยในตัวแมลงพาหะ *Yamatotettix flavovittatus* ใน 3 พื้นที่
ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม พ.ศ.2557 ตรวจโดย
เทคนิค real-time PCR

ระดับ	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล					
ความ	(copies/ μ l ของ genomic DNA แมลง)					
รุนแรงของ	สิงหาคม		กันยายน		ตุลาคม	
โรคใบขาว	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย
น้อย	3.69×10^3 a ^{1/}	2.90×10^1 - 1.37×10^4	3.28×10^3 a	4.42×10^2 - 8.31×10^3	4.60×10^3 a	1.38×10^3 - 1.29×10^4
ปานกลาง	4.76×10^3 a	2.77×10^1 - 1.23×10^4	3.19×10^3 a	4.30×10^2 - 1.58×10^4	5.51×10^3 a	9.61×10^2 - 1.56×10^4
มาก	4.31×10^4 a	2.67×10^2 - 1.26×10^4	3.21×10^3 a	4.06×10^2 - 1.23×10^4	4.05×10^3 a	1.19×10^3 - 1.00×10^4
ระดับ	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล					
ความ	(copies/ μ l ของ genomic DNA แมลง)					
รุนแรงของ	สิงหาคม		กันยายน		ตุลาคม	
โรคใบขาว	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้
น้อย	7.66×10^3 a ^{1/}	0.12×10^3 a	4.82×10^3 a	0.52×10^3 a	5.53×10^3 a	2.86×10^3 a
ปานกลาง	9.37×10^3 a	0.16×10^3 a	4.76×10^3 a	0.57×10^3 a	7.23×10^3 a	2.32×10^3 a
มาก	9.45×10^3 a	0.20×10^3 a	4.14×10^3 a	1.87×10^3 a	5.13×10^3 a	3.25×10^3 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 11 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ยในตัวแมลงพาหะ *Yamatotettix flavovittatus* ใน 3 พื้นที่
ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน พ.ศ.2558
ตรวจโดยเทคนิค real-time PCR

ระดับความรุนแรงของโรคใบขาว	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (copies/ μ l ของ genomic DNA แมลง)					
	กันยายน		ตุลาคม		พฤศจิกายน	
	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย
น้อย	5.14×10^3 a ^{1/}	9.73×10^2 - 1.90×10^4	4.75×10^3 a	2.90×10^1 - 2.49×10^4	3.69×10^3 a	2.34×10^2 - 2.64×10^4
ปานกลาง	5.94×10^3 a	7.59×10^2 - 1.89×10^4	4.76×10^3 a	2.77×10^1 - 1.23×10^4	2.61×10^3 a	2.24×10^2 - 1.58×10^4
มาก	4.05×10^3 a	4.26×10^2 - 1.00×10^4	6.38×10^3 a	2.67×10^1 - 3.20×10^4	2.35×10^3 a	2.89×10^2 - 1.23×10^4

ระดับความรุนแรงของโรคใบขาว	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (copies/ μ l ของ genomic DNA แมลง)					
	กันยายน		ตุลาคม		พฤศจิกายน	
	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้
น้อย	7.66×10^3 a ^{1/}	0.12×10^3 a	4.82×10^3 a	0.52×10^3 a	5.53×10^3 a	2.86×10^3 a
ปานกลาง	9.37×10^3 a	0.16×10^3 a	4.76×10^3 a	0.57×10^3 a	7.23×10^3 a	2.32×10^3 a
มาก	9.45×10^3 a	0.20×10^3 a	4.14×10^3 a	1.87×10^3 a	5.13×10^3 a	3.25×10^3 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

4.2.2 การสำรวจการเกิดโรคใบขาวและการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย

การสำรวจการเกิดโรคใบขาวอ้อยในแปลงเริ่มศึกษาในเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม พ.ศ.2557 (เนื่องจากเกษตรกรเก็บเกี่ยวผลผลิตเดือนพฤศจิกายน) ผลการศึกษาพบว่าจำนวนต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวมีมากที่สุด (เฉลี่ย 465 ต้น หรือ 30%) ในแปลงอ้อยที่มีระดับความรุนแรงของโรคมก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับระดับความรุนแรงอื่นๆ ซึ่งพบต้นที่เป็นโรคใบขาวมากที่สุดในเดือนสิงหาคมและลดน้อยลงในเดือนถัดไป ทั้งนี้เนื่องจากต้นที่แสดงอาการโรคอย่างรุนแรงได้ทยอยแห้งตายลงไป (ตารางที่ 12) ส่วนในฤดูการที่ 2 (ธันวาคม พ.ศ.2557-ธันวาคม พ.ศ.2558) เกษตรกรได้คัดเลือกท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคมารปลูกจึงพบต้นที่แสดงอาการใบขาวอ้อยไม่มากนัก และไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกแปลงอ้อยที่มีระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรค (ตารางที่ 12) จากการสังเกตต้นอ้อยที่แสดงอาการเป็นโรคอย่างชัดเจนนั้นทยอยแห้งตายไปในทุกๆ เดือนที่บันทึกผล

นอกจากนี้ได้ตัดยอดอ้อยจากต้นปกติที่ไม่แสดงอาการโรคใบขาวเพื่อมาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยมากที่สุดตั้งแต่ 66-100% โดยเฉลี่ยมากที่สุด 86% ในแปลงอ้อยที่มีระดับความรุนแรงของโรคมามากที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแปลงอื่นๆ (ตารางที่ 13) ส่วนในฤดูกาลที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกแปลง (ตารางที่ 14) นอกจากนี้จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในยอดอ้อยจากการตรวจด้วยวิธี real-time PCR พบว่าจำนวนเชื้อมากที่สุดในการแปลงระดับความรุนแรงของโรคมามาก มีจำนวน 11,500 copies/ μ l ของ DNA อ้อย ในฤดูกาลที่ 1 ส่วนฤดูกาลที่ 2 จำนวนเชื้อมากที่สุดในการแปลงระดับความรุนแรงของโรคปานกลางมีจำนวน 5,400 copies/ μ l ของ DNA แผลง (ตารางที่ 15 และ 16)

สรุปจากผลของเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยปกติและตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในยอดอ้อยสอดคล้องและไปในทิศทางเดียวกันคือพื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคมามีเปอร์เซ็นต์ของต้นที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยมากและพบจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยปกติมากเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 3) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเกิดโรคใบขาวอ้อยมากในแปลงอ้อยมีความสอดคล้องกับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาที่มากในยอดอ้อย

ตารางที่ 12 จำนวนต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวในแปลงอ้อยทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรค

ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม พ.ศ.2557^{1/} (ฤดูกาลที่ 1) และ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557-ธันวาคม พ.ศ.2558 (ฤดูกาลที่ 2)

พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค	ต้นอ้อยที่แสดงอาการเป็นโรคใบขาว จำนวน (ต้น/พื้นที่) ^{4/}			
	ฤดูกาลที่ 1		ฤดูกาลที่ 2	
	เฉลี่ย	พิสัย	เฉลี่ย	พิสัย
น้อย	0.25 c ^{1/}	0 ^{3/} - 2	6.54 a ^{2/}	0 ^{3/} - 17
ปานกลาง	46.75 b	12 - 128	25.92 a	0 - 113
มาก	465.08 a	395 - 516	11.33 a	0 - 30
F-test	**		ns	
C.V.(%)	24.37		32.46	

^{1/} เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2557 อ้อยถูกตัดส่งโรงงานน้ำตาล

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

^{3/} 0 หมายถึง ไม่พบต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาว

^{4/} จำนวนต้นอ้อยที่สำรวจ ทั้งหมด 1,575 ต้นต่อ พื้นที่

ตารางที่ 13 จำนวนยอดอ้อยและเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยโดยเทคนิค nested PCR ใน 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึง พฤศจิกายน พ.ศ.2557 (ฤดูกาลที่ 1)

เดือน	ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย					
	น้อย		ปานกลาง		มาก	
	จำนวนที่พบ เชื้อ/ทั้งหมด	%	จำนวนที่พบ เชื้อ/ทั้งหมด	%	จำนวนที่พบ เชื้อ/ทั้งหมด	%
กรกฎาคม	4/30	13.33	11/30	36.67	20/30	66.67
สิงหาคม	23/30	76.67	25/30	83.33	30/30	100
กันยายน	13/30	43.33	24/30	80.00	30/30	100
ตุลาคม	22/30	73.33	22/30	73.33	25/30	83.33
พฤศจิกายน	21/30	70.00	22/30	73.33	24/30	80.00
รวม	83/150	55.33 b ^{1/}	104/150	69.33 ab	129/150	86.00 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 14 จำนวนยอดอ้อยและเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยโดยเทคนิค nested PCR ใน 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 ถึงธันวาคม พ.ศ.2558 (ฤดูกาลที่ 2)

เดือน	ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย					
	น้อย		ปานกลาง		มาก	
	จำนวนที่พบ เชื้อ/ทั้งหมด	%	จำนวนที่พบ เชื้อ/ทั้งหมด	%	จำนวนที่พบ เชื้อ/ทั้งหมด	%
ธันวาคม	6/30	20.00	2/30	6.67	0/30	0
มกราคม	3/30	10.00	6/30	20.00	0/30	0
กุมภาพันธ์	1/30	3.33	3/30	10.00	5/30	16.67
มีนาคม	4/30	13.33	4/30	13.33	1/30	3.33
เมษายน	29/30	96.67	30/30	100	29/30	96.67
พฤษภาคม	2/30	6.67	24/30	80.00	5/30	16.67
มิถุนายน	5/30	16.67	19/30	63.33	15/30	50.00
กรกฎาคม	12/30	40.00	5/30	16.67	4/30	13.33
สิงหาคม	25/30	83.33	29/30	90.00	26/30	86.67
กันยายน	4/30	13.33	3/30	10.00	7/30	23.33
ตุลาคม	4/30	13.33	4/30	13.33	6/30	20.00
พฤศจิกายน	3/30	10.00	5/30	16.67	9/30	30.00
ธันวาคม	5/30	16.67	4/30	13.33	6/30	20.00
รวม	103/390	26.41 a ^{1/}	138/390	35.38 a	113/390	28.97 a

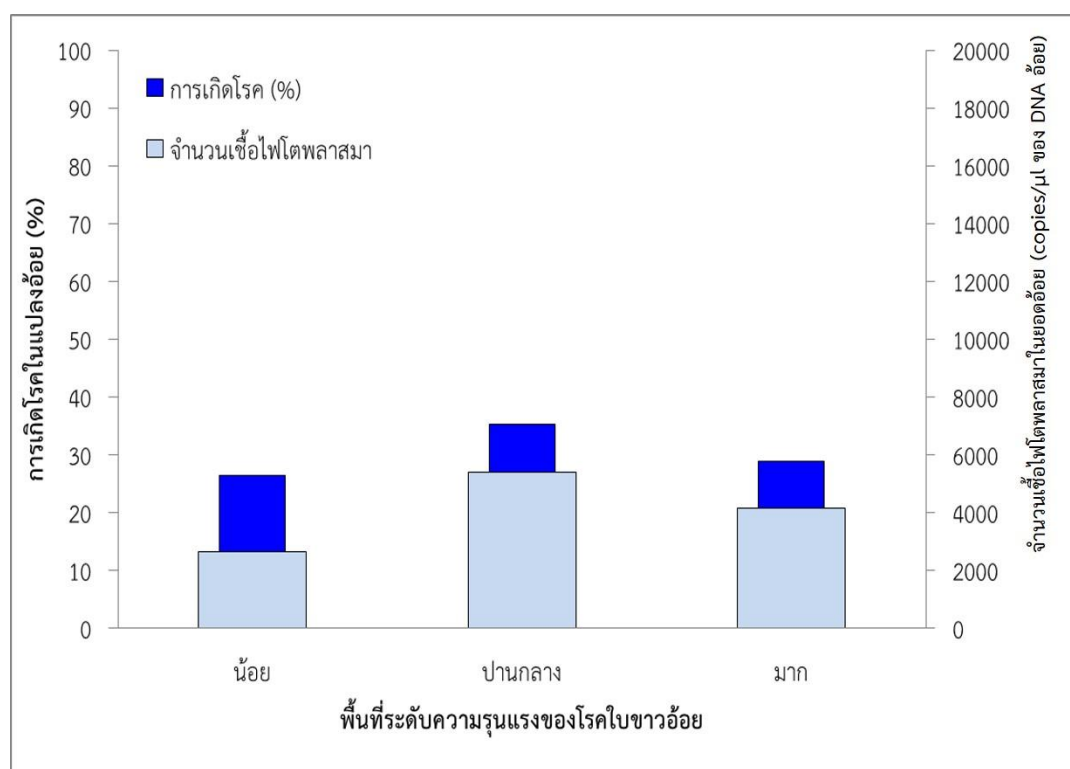
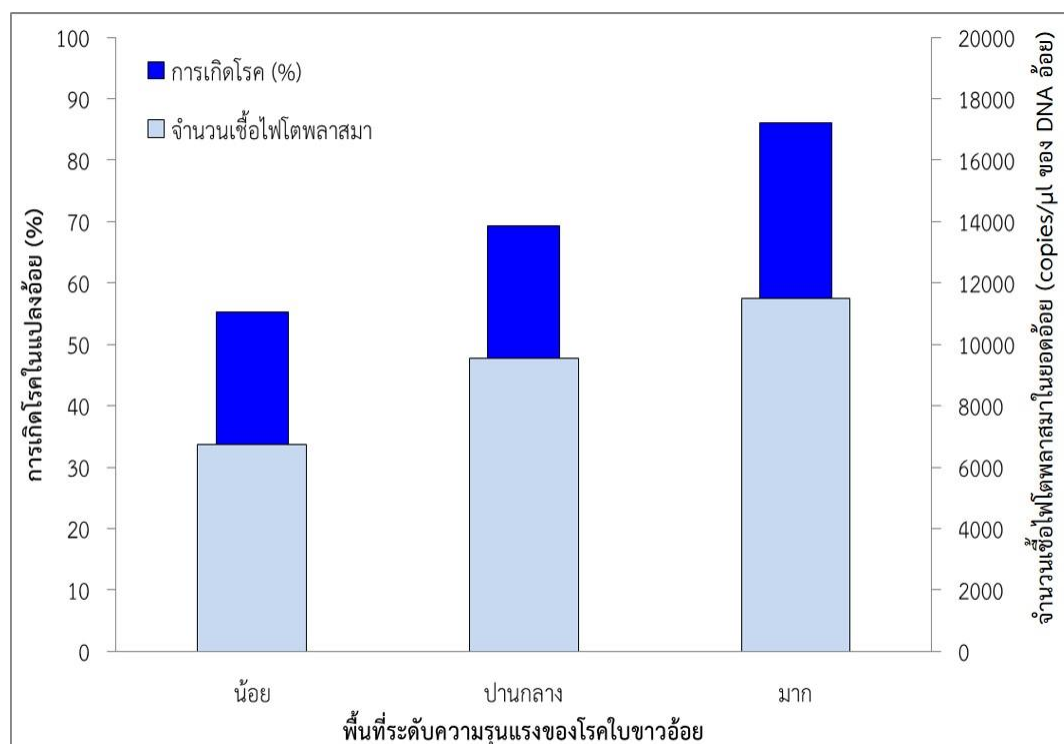
^{1/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 15 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย (copies/ μ l ของ genomic DNA อ้อย) ในยอดอ้อยโดยเทคนิค real-time PCR ในแปลงอ้อยทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือน กรกฎาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ.2557 (ฤดูกาลที่ 1)

เดือน	ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย					
	น้อย		ปานกลาง		มาก	
	จำนวนเชื้อ	พืช	จำนวนเชื้อ	%	จำนวนเชื้อ	%
กรกฎาคม	9.71×10^3	5.65×10^3 - 2.25×10^4	14.00×10^3	5.67×10^3 - 4.65×10^4	15.58×10^3	9.86×10^3 - 1.48×10^4
สิงหาคม	0.83×10^3	6.08×10^1 - 3.91×10^3	7.93×10^3	1.86×10^1 - 4.27×10^3	4.71×10^3	3.54×10^1 - 1.75×10^4
กันยายน	15.99×10^3	4.67×10^3 - 4.25×10^4	11.71×10^3	3.49×10^3 - 1.52×10^4	13.50×10^3	6.23×10^3 - 3.02×10^4
ตุลาคม	9.87×10^3	4.09×10^3 - 2.04×10^4	9.73×10^3	5.36×10^3 - 2.17×10^4	14.64×10^3	8.37×10^3 - 2.21×10^4
พฤศจิกายน	7.15×10^3	1.87×10^3 - 3.00×10^4	4.32×10^3	1.47×10^3 - 6.35×10^3	8.90×10^3	2.85×10^3 - 2.04×10^4
เฉลี่ย	6.74×10^3		9.54×10^3		11.50×10^3	

ตารางที่ 16 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย (copies/ μ l ของ genomic DNA อ้อย) ในยอดอ้อยโดยเทคนิค real-time PCR ในแปลงอ้อยทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ.2557 ถึง ธันวาคม พ.ศ.2558 (ฤดูกาลที่ 2)

เดือน	ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย					
	น้อย		ปานกลาง		มาก	
	จำนวนเชื้อ	พืช	จำนวนเชื้อ	%	จำนวนเชื้อ	%
ธันวาคม	5,420.10	$1.57 \times 10^0 - 4.58 \times 10^4$	11,200	$9.08 \times 10^0 - 2.07 \times 10^3$	863.64	$2.98 \times 10^1 - 2.09 \times 10^3$
มกราคม	1,208.30	$6.63 \times 10^2 - 3.65 \times 10^3$	950	$4.66 \times 10^2 - 1.49 \times 10^3$	1,956.20	$5.86 \times 10^2 - 9.73 \times 10^3$
กุมภาพันธ์	781.80	$2.54 \times 10^2 - 2.32 \times 10^3$	935	$4.91 \times 10^2 - 1.28 \times 10^3$	3,175.60	$5.04 \times 10^3 - 1.77 \times 10^4$
มีนาคม	2,509.40	$5.58 \times 10^2 - 1.71 \times 10^4$	6,670	$4.12 \times 10^2 - 1.03 \times 10^4$	6,328	$3.01 \times 10^3 - 1.05 \times 10^4$
เมษายน	15,467.5	$7.00 \times 10^3 - 3.84 \times 10^4$	17,400	$8.24 \times 10^3 - 2.60 \times 10^4$	22,214	$3.46 \times 10^3 - 5.38 \times 10^4$
พฤษภาคม	2,050.10	$9.08 \times 10^2 - 6.32 \times 10^3$	8,870	$1.18 \times 10^3 - 6.13 \times 10^4$	10,940	$1.09 \times 10^3 - 8.69 \times 10^4$
มิถุนายน	892.33	$2.24 \times 10^2 - 3.70 \times 10^3$	534	$1.99 \times 10^2 - 7.03 \times 10^2$	645.50	$3.52 \times 10^2 - 1.51 \times 10^3$
กรกฎาคม	1,062.70	$4.47 \times 10^2 - 1.66 \times 10^3$	2,000	$7.12 \times 10^2 - 3.54 \times 10^3$	1,986.56	$1.17 \times 10^3 - 4.44 \times 10^5$
สิงหาคม	3,217.50	$1.09 \times 10^2 - 2.80 \times 10^4$	4,600	$4.32 \times 10^1 - 4.05 \times 10^4$	413.30	$5.64 \times 10^1 - 2.40 \times 10^3$
กันยายน	146.15	$1.40 \times 10^1 - 8.66 \times 10^2$	82.1	$1.39 \times 10^3 - 1.49 \times 10^2$	138.25	$2.95 \times 10^1 - 2.94 \times 10^2$
ตุลาคม	108.07	$3.51 \times 10^1 - 2.39 \times 10^2$	251	$4.55 \times 10^1 - 1.29 \times 10^3$	1,005.82	$6.06 \times 10^1 - 7.67 \times 10^3$
พฤศจิกายน	541.53	$2.81 \times 10^0 - 2.69 \times 10^3$	2,880	$2.55 \times 10^0 - 6.84 \times 10^3$	3,679.62	$4.25 \times 10^0 - 2.23 \times 10^4$
ธันวาคม	1,068.57	$1.39 \times 10^1 - 1.69 \times 10^4$	14,000	$1.86 \times 10^0 - 8.36 \times 10^4$	626.89	$1.07 \times 10^1 - 4.00 \times 10^3$
เฉลี่ย	2.65×10^3		5.41×10^3		4.15×10^3	



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของการตรวจพบโรคใบขาวอ้อยในยอดอ้อยปกติกับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุ

โรคใบขาวอ้อยในพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย

ก. ฤดูกาลที่ 1 (กรกฎาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ.2557)

ข. ฤดูกาลที่ 2 (ธันวาคม พ.ศ.2557 ถึง ธันวาคม พ.ศ.2558)

4.2.3 ความสัมพันธ์ของการเกิดโรคใบขาวอ้อยและจำนวนประชากรแมลงพาหะในพื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคทั้ง 3 ระดับ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคใบขาวอ้อยและจำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล ในพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย พบว่า ในฤดูกาลที่ 1 ช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม พ.ศ.2557 (อ้อยอายุ 8-11 เดือน) พบว่าจำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีความสัมพันธ์กับจำนวนต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อย เปอร์เซ็นต์ที่ยอดอ้อยตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา และจำนวนเชื้อในยอดอ้อย แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในพื้นที่ที่มีระดับความรุนแรงของโรคใบขาวมาก (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 4 ก) และในฤดูกาลที่ 2 ช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ.2557 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2558 (อ้อยอายุ 2-14 เดือน) ในพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาว พบว่าจำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีความสัมพันธ์กับจำนวนต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อย เปอร์เซ็นต์ที่ยอดอ้อยตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา และจำนวนเชื้อในยอดอ้อย แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในพื้นที่ที่มีระดับความรุนแรงของโรคใบขาวปานกลาง (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 4 ข) ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า ความรุนแรงการเกิดโรคใบขาวอ้อย จำนวนเชื้อสาเหตุของโรค มีความสัมพันธ์กับทิศทางเดียวกับจำนวนของแมลงพาหะ

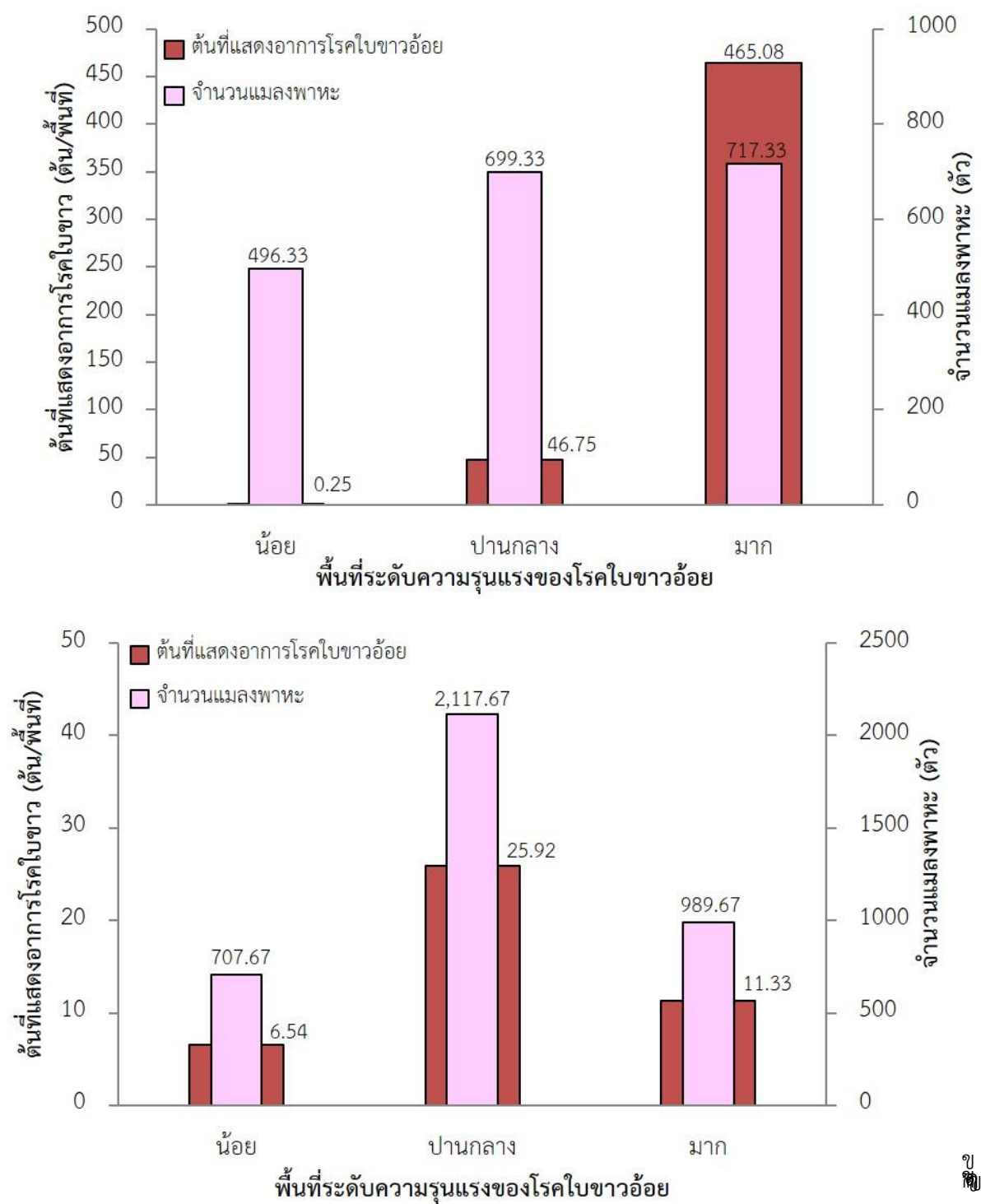
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระดับความรุนแรงในการเกิดโรคใบขาวอ้อยขึ้นอยู่กับจำนวนแมลงพาหะที่อาศัยอยู่ในแปลงอ้อย และแมลงพาหะเพศเมียมีความสำคัญต่อการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hirogluphicus* ต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อย เปอร์เซ็นต์ยอดอ้อยที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา และจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยในพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ.2557 (ฤดูกาลที่ 1)

พื้นที่ระดับ ความรุนแรง ของโรค	จำนวนแมลง พาหะ (ตัว)	ต้นที่แสดงอาการ โรคใบขาว (ต้น/พื้นที่)	ยอดอ้อยที่ตรวจ พบเชื้อ (%)	จำนวนเชื้อในยอดอ้อย (copies/ μ l ของ DNA อ้อย)
น้อย	496.33	0.25	55.33	6.74×10^3
ปานกลาง	699.33	46.75	69.33	9.54×10^3
มาก	717.33	465.08	86.00	11.50×10^3

ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hirogluphicus* ต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อย เปรอร์เซ็นต์ยอดอ้อยที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา และจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยในพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ.2557 ถึง ธันวาคม พ.ศ.2558 (ฤดูกาลที่ 2)

พื้นที่ระดับ ความรุนแรง ของโรค	จำนวนแมลง พาหะเพลี้ย (ตัว/พื้นที่)	ต้นที่แสดงอาการ โรคใบขาว (ต้น/พื้นที่)	ยอดอ้อยที่ตรวจ พบเชื้อ (%)	จำนวนเชื้อในยอดอ้อย (copies/ μ l ของ DNA อ้อย)
น้อย	707.67	6.54	26.41	2.65×10^3
ปานกลาง	2,117.67	25.92	35.38	5.41×10^3
มาก	989.67	11.33	28.97	4.15×10^3



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hirogluphicus* และต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อยในพื้นที่ระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อย

ก. ฤดูกาลที่ 1 (กรกฎาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ.2557)

ข. ฤดูกาลที่ 2 (ธันวาคม พ.ศ.2557 ถึง ธันวาคม พ.ศ.2558)

5.3. การศึกษาความรุนแรงของเชื้อในแมลงพาหะจากพื้นที่ต่างๆ และติดตามการเกิดโรคใบขาวอ้อยในสภาพห้องปฏิบัติการ

การเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อในตัวแมลงจากพื้นที่ที่แตกต่างกันทั้ง 3 พื้นที่ ที่มีผลต่อการเกิดโรคใบขาว ได้ดำเนินการโดยเพาะเลี้ยงแมลงพาหะจาก 3 พื้นที่ แยกกัน ทำการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้แมลงพาหะเพศเมียและเพศผู้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวโดยแมลงพาหะสู่ต้นอ้อยปลอดโรคที่มีอายุ 2 เดือน และตรวจนับเชื้อโดยวิธี real-time PCR ในยอดอ้อย 30 (อ้อยอายุ 3 เดือน) วัน และสังเกตอาการแสดงออกของโรคใบขาวที่อ้อยอายุ 30, 60 และ 90 วัน หลังจากถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา ส่วนแมลงพาหะจะถูกตรวจหาเชื้อโดยวิธี nested PCR และตรวจนับเชื้อไฟโตพลาสมาโดยวิธี real-time PCR เช่นกัน

ผลการศึกษาพบว่าจำนวนตัวแมลงพาหะเพศเมียที่นำมาถ่ายทอดเชื้อตรวจพบเชื้อทุกตัว (180 ตัว) ในทุกพื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค คิดเป็น 100% ส่วนเพศผู้ตรวจพบเชื้อ 177 ตัว คิดเป็น 98.33% (ตารางที่ 19) จำนวนเชื้อในตัวแมลงพาหะทั้งเพศเมียและเพศผู้ที่แมลงถูกนำมาใช้ถ่ายทอดเชื้อไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ทั้งนี้จำนวนเชื้อในตัวแมลงพาหะเพศเมียมีจำนวนเชื้อมากกว่าเพศผู้ (ตารางที่ 20) เนื่องจากเพศเมียมีขนาดลำตัวใหญ่กว่าเพศผู้ เชื้อจึงสามารถเพิ่มจำนวนได้มากพร้อมทั้งเพศเมียมีความต้องการอาหารเพื่อการสร้างไข่ และจากการตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยที่อ้อยอายุหลังการถ่ายทอดเชื้อ 30 วัน พบว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ทุกต้นที่ใช้ทดสอบ อ้อยที่ถูกถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ เพศเมีย พบว่าต้นอ้อยยังไม่แสดงอาการเป็นโรคใบขาว แต่อาการแสดงออกในต้นอ้อยที่อายุ 90 วัน หลังการถ่ายทอดเชื้อ พบต้นอ้อยที่แสดงอาการโรค 13.33% อาการเริ่มแสดงเป็นยอดสีขาว (ตารางที่ 21) ทั้งนี้จำนวนเชื้อในยอดอ้อยที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงพาหะจาก 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 21) และการตรวจนับจำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาในยอดอ้อยที่อ้อยถูกถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ เพศผู้ พบว่าต้นอ้อยไม่แสดงอาการเป็นโรคใบขาวเลย และจำนวนเชื้อในยอดอ้อยที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงพาหะจาก 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบจำนวนเชื้อมากในยอดอ้อยจากพื้นที่ที่มีระดับความรุนแรงของโรคมก รองลงมาคือ ปานกลาง และน้อย ตามลำดับ (ตารางที่ 22) ทั้งนี้จำนวนเชื้อในยอดอ้อยจากต้นอ้อยที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงพาหะเพศเมียมีจำนวนเชื้อมากกว่าต้นอ้อยที่ถูกถ่ายทอดโดยเพศผู้ เนื่องจากเพศเมียมีความต้องการอาหารมากกว่าเพศผู้จึงดูดกินน้ำเลี้ยงในต้นอ้อยในจำนวนที่บ่อยครั้งมากกว่าเพศผู้ ดังนั้นโอกาสการถ่ายทอดเชื้อจึงมีมากเช่นกัน

จากการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลงพาหะ พบว่าเพศเมียสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ดีกว่าเพศผู้ และต้นที่ได้รับเชื้อจากแมลงพาหะเพศเมียมีจำนวนเชื้อมากกว่าต้นที่ได้รับเชื้อจากแมลงพาหะเพศผู้

แมลงพาหะจากพื้นที่ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคแตกต่างกัน โดยที่จำนวนเชื้อสาเหตุของโรคไม่มีความแตกต่างในตัวแมลงนั้น สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้เท่าๆ กัน

ตารางที่ 19 จำนวนและเปอร์เซ็นต์แมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* เพศเมียและเพศผู้ที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาโดยวิธี nested PCR

ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย	แมลงพาหะ <i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i>			
	เพศเมีย		เพศผู้	
	จำนวน (ตัว)	%	จำนวน (ตัว)	%
น้อย	60/60	100	59/60	98.33
ปานกลาง	60/60	100	60/60	100
มาก	60/60	100	58/60	96.67

ตารางที่ 20 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย (copies/ μ l ของ genomic DNA แมลงพาหะ) ในตัวแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* เพศเมียและเพศผู้ (F1) ที่เพาะเลี้ยงจากรุ่นพ่อแม่ที่ได้จาก แปลงอ้อยทั้ง 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย โดยวิธี real-time PCR

ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย (copies/ μ l ของ genomic DNA อ้อย) ^{1/}			
	เพศเมีย		เพศผู้	
	จำนวนเชื้อ	พิสัย	จำนวนเชื้อ	พิสัย
น้อย	63.6×10^3 a ^{2/}	9.59×10^2 - 5.25×10^5	2.37×10^3 a	3.04×10^1 - 1.37×10^4
ปานกลาง	83.7×10^3 a	3.73×10^3 - 3.69×10^5	2.60×10^3 a	3.31×10^1 - 3.19×10^4
มาก	97.7×10^3 a	2.04×10^3 - 7.85×10^5	2.39×10^3 a	8.14×10^1 - 2.59×10^4

^{1/} จำนวนแมลงพาหะเฉลี่ยถูกตัดแปลงข้อมูล (Transform data) ในรูป $\sqrt{x}$

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 21 ต้นที่แสดงอาการของโรคใบขาวอ้อยหลังจากการถ่ายทอดเชื้อ 30, 60 และ 90 วัน โดยแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* เพศเมีย (F1) ที่เพาะเลี้ยงจากรุ่นพ่อแม่ที่ได้จากแปลง อ้อยทั้ง 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย

ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย	ต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อยที่อายุต่างๆ ที่ถูกถ่ายทอดโดยแมลงพาหะเพศเมีย					
	30 วัน		60 วัน		90 วัน	
ใบขาวอ้อย	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%
น้อย	0/20	0	0/20	0	0/20	0
ปานกลาง	0/20	0	0/20	0	0/20	0
มาก	0/16	0	0/17	0	2/15	13.33

ตารางที่ 22 จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย (copies/ μ l ของ genomic DNA อ้อย) ในยอดอ้อยจากต้นที่ถูกถ่ายทอดเชื้อหลังจากการถ่ายทอด 30 วัน โดยแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* เพศเมีย (F1) ที่เพาะเลี้ยงจากรุ่นพ่อแม่ที่ได้จากแปลงอ้อยทั้ง 3 พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค ใบขาวอ้อย

ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย	จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาเฉลี่ย (copies/ μ l ของ genomic DNA อ้อย) ในยอดอ้อย ^{1/}			
	เพศเมีย		เพศผู้	
ใบขาวอ้อย	จำนวนเชื้อ	พิสัย	จำนวนเชื้อ	พิสัย
น้อย	71.3 $\times 10^3$ a ^{2/}	1.80 $\times 10^4$ -2.57 $\times 10^5$	5.46 $\times 10^3$ b	4.45 $\times 10^2$ -1.69 $\times 10^4$
ปานกลาง	70.6 $\times 10^3$ a	1.40 $\times 10^4$ -2.12 $\times 10^5$	42.93 $\times 10^3$ ab	8.19 $\times 10^2$ -4.76 $\times 10^5$
มาก	74.7 $\times 10^3$ a	1.90 $\times 10^4$ -2.21 $\times 10^5$	52.83 $\times 10^3$ a	2.13 $\times 10^3$ -4.37 $\times 10^5$

^{1/} จำนวนแมลงพาหะเฉลี่ยถูกตัดแปลงข้อมูล (Transform data) ในรูป $\sqrt{x}$

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี DMRT (P $\leq$ 0.05)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

โรคใบขาวอ้อยเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นพวก obligated parasites โดยต้องอยู่อาศัยในเซลล์ที่มีชีวิตในทั้งพืชอาศัยและแมลงพาหะ และมีการแพร่กระจายเชื้อโรคออกไปโดยการติดไปกับท่อนพันธุ์และแมลงพาหะนำพาเชื้อ การแพร่ระบาดโดยทางท่อนพันธุ์ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปอย่างรวดเร็ว และแพร่ขยายไปในพื้นที่ที่กว้างได้ แต่การใช้ท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคไปปลูกก็สามารถลดการระบาดของโรคได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นการในการลดการระบาดของโรคใบขาวจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงแมลงพาหะด้วยเช่นกัน โดยจำเป็นต้องลดหรือหลีกเลี่ยงความเสี่ยงจากแมลงพาหะซึ่งสามารถรับ-ถ่ายทอดเชื้อและนำแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุของโรคได้ ในโครงการการศึกษานี้เพื่อต้องการทราบว่าปัจจัยของแมลงพาหะมีผลต่อการแพร่กระจายโรคใบขาวเพื่อนำมาสู่แนวทางในการลดการเกิดโรคใบขาวอ้อย ซึ่งจากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้

1. แมลงพาหะทั้งเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura เป็นแมลงพาหะที่พบในแปลงปลูกอ้อย ซึ่งจำนวนประชากรของเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลเป็นแมลงพาหะหลัก พบประชากรประมาณ 90% ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเพลี้ยจักจั่นหลังขาว และเพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาลมีประชากรมากในช่วงต้นฝน มิถุนายน- กรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงแรกของการเจริญเติบโตหรืออยู่ในระหว่างย่างปล้อง ส่วนเพลี้ยจักจั่นหลังขาวมีจำนวนประชากร ในช่วงอ้อยเจริญเติบโตเต็มที่จนถึงเก็บเกี่ยว โดยมีประชากรมากในช่วงเดือน กันยายน ดังนั้นการหลีกเลี่ยงหรือจัดการช่วงเวลาปลูกอ้อยโดยไม่ปลูกในช่วงต้นฝนอาจสามารถลดความเสี่ยงจากการดูดกินและถ่ายทอดเชื้อของแมลงพาหะได้
2. แมลงพาหะมีการรับเชื้อ และเพิ่มปริมาณในตัว แต่มีปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคต่อตัวแมลงพาหะไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ แต่จำนวนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวมีปริมาณมากในแมลงพาหะเพศเมียมากกว่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกพื้นที่ และ สัดส่วนเพศของแมลง (แมลงเพศเมียมากกว่าเพศผู้) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงในการเกิดโรค
3. จำนวนแมลงพาหะ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดโรคใบขาว โดยระดับความรุนแรงในการเกิดโรคใบขาวอ้อยขึ้นอยู่กับจำนวนแมลงพาหะที่อาศัยอยู่ในแปลงอ้อย และแมลงพาหะเพศเมียมีความสำคัญต่อการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย พื้นที่ปลูกอ้อยทั้งสองพื้นที่ในจังหวัดอุดรธานี มีการระบาดของโรคใบขาวและจำนวนแมลงพาหะมากกว่าในพื้นที่ปลูกอ้อยในจังหวัดขอนแก่น
4. ความรุนแรงของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงที่มาจากพื้นที่ต่างๆทั้ง 3 พื้นที่ เมื่อนำมาทดสอบถ่ายทอดเชื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ในการทำให้เกิดโรคต่อต้นอ้อย
5. จากการสำรวจโรคใบขาวในสภาพไร่ และจากการถ่ายทอดเชื้อโรคแมลงพาหะในห้องปฏิบัติการ

พบว่าต้นอ้อยที่ได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงพาหะ ต้นอ้อยมีเชื้อสาเหตุของโรคอยู่แต่ไม่แสดงอาการของโรคออกมาได้น้อย ดังนั้นต้นอ้อยจึงเป็นพวกที่มีเชื้อแอบแฝง ไม่แสดงอาการใบขาวออกมา และเมื่อนำไปเป็นท่อนพันธุ์ปลูกอาจแสดงอาการใบขาวปรากฏออกมาได้ อนึ่งในต้นอ้อยที่มีเชื้อแอบแฝงนี้พบว่าเมื่อเกษตรกรมีการดูแลแปลงอย่างต่อเนื่องและใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง (ระยะก่อนปลูกและแตกกอ) และกำจัดวัชพืชอย่างสม่ำเสมอ ทำให้ต้นที่แสดงอาการโรคใบขาวอ้อยปรากฏออกมามีไม่มากนัก

เอกสารอ้างอิง

- ประสิทธิ์ ใจศิลป์. 2558. เอกสารประกอบการฝึกอบรม โครงการจัดทำต้นทุนผลผลิตและถ่ายทอดความรู้เพื่อลดต้นทุนการผลิตอ้อยปีการเพาะปลูก 2557/58 10 มกราคม 2557. KU HOME มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. กรุงเทพมหานคร.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย. บริษัท ขอนแก่นฟิมพ์พัฒนา จำกัด. ขอนแก่น.
- ยุพา ปานแก้ว. 2519. ลักษณะอาการ โครงสร้างจุลภาคและการป้องกันกำจัดโรคใบขาวของอ้อยในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต เกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ยุพา หาญบุญทรง, วรรณภา ฤทธิ์สนธิ์ และชุตินันท์ ชูสาย. 2548. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในแปลงจักจั่นและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวกล. วารสารวิจัย มข. 10 (1) หน้า 13-20..
- ยุพา หาญบุญทรง. 2558. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการ รวบรวมสังเคราะห์และเผยแพร่องค์ความรู้ต่างๆ ในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยอย่างยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- รณยุทธ สัตยานิคม. 2550. พันธุ์อ้อยและการคัดเลือกพันธุ์อ้อยให้เหมาะสมกับพื้นที่ปลูกอ้อย (cited 27 Nov2015) Available from:URL:http://www.ocsb.go.th/udon/Udon8/490622_2.htm
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, อีรุฒิ วงศ์วรรณ์, สุนี ศรีสิงห์ และ ปิยะดา อีร์กุลพิสุทธิ์. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. แก่นเกษตร. 40(3): 231-240.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. 2558. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อย ปีการผลิต 2557/2558. (cited 17 Nov 2015) from: [URL:http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9810.pdf](http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9810.pdf)
- Bertamini, M., and N. Nedunchezian, 2001. Effect of phytoplasma [stolbur-subgroup (Bois

- noir-BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica* 39(1): 119-122.
- Brathwaite, K.S., B.J. Croft, and R.C. Magarey. 2007. Progress in identifying cause of ramu stunt disease of sugarcane. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.* 29: 7.
- Casu, R.E., Selivanova, A., Perroux, J.M., 2012. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR. *Plant Cell Reports* 31(1), 167-177.
- Chen, C.T. 1974. Sugarcane white leaf disease in Thailand and Taiwan. *Sug. Path. News.* 11 (12): p. 23
- Christensen, N.M., Axelsen K.B., and Nicolaisen M. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10(11): 526-535.
- Davis, R.E., and Sinclair, W.A. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88: 1372-1376.
- FAOSTAT. 2014. Sugarcane. (cited 19 April 2014). Available from: URL: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Folmer, O., Black M., Hoeh W., Lutz R., and Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Hanboonsong Y.; Choosai C.; Panyim S. and Damak S. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) . *Insect Molecular Biology* 11 (1): 97-104.
- Hanboonsong, Y.; Ritthison W.; Choosai C.; Sirithorn P. 2006 Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura, a new leafhopper vector. *J. Economic Entomology* 99 (5): 1531-1537.
- Hoat, T.X., L.T.T. Nhung, D.V.T. Thanh, N.G. Bon, C.A. Duong, T.N. Ha, and N. C. Kumasinghe. 2013. Molecular detection and identification of sugarcane white leaf in Vietnam. *International sugar journal* vol. 115(1357): 505-511
- Kaewmanee, C. 2013. Investigation of optimal conditions to minimize the incidence of

- sugarcane white leaf disease. Doctor of Philosophy Thesis in Entomology, Graduate School, Khon Kaen University.
- Kaewmanee, C., Boonrod K., and Hanboonsong Y. 2015. Quantification of sugarcane white leaf phytoplasma in leafhopper vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* and sugarcane by quantitative real-time PCR. (อยู่ระหว่างตีพิมพ์)
- Lee, I.M., Davis, R.E., and Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu.Rev.Microbiol.* 54:221-255.
- Leu, L.S. 1974. An insectary method for testing sugarcane varieties for resistance to white leaf disease. *Proc. ISSCT* 15: 266-274.
- Lin, W., R.Y. Wu, H.W. Li, and P.N. Chu. 1969. Influence of white leaf disease of sugarcane on the chloroplast development and chlorophyll biosynthesis. *Botanical Bulletin Of Academia Sinica (taipei)* 10(1): 23-28.
- Matsumoto, T., Lee, C.S., and Teng, W.S. 1968. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan with special reference to transmission by a leafhopper, *Epitettix hiroglyphicus* Mats. *Pro. Soc. Sugarcane Tech.* 13: 1090-1099.
- Marcone, C., 2002. Phytoplasma disease in sugarcane. *Sugar Tech* 4: 79-85.
- Rishi, N., and Chen, C.T. 1989. Grassy shoot and white leaf disease. In *Diseases of sugarcane major diseases*. pp. 289-300. B.C., Ricaud, and B.T., Egan, eds. Amsterdam: Elsevier Publisher.
- Shikata, E., T. Wang-sheng, and T.Matsumoto. 1969. Mycoplasma or PLT like microorganisms detected in leaves of sugarcane plants infected white-leaf disease and the suppression of the disease symptoms by antibiotics of tetracycline group. *Jour. Facul.Agr., Hokkaido Univ., Sapporo* 56(2): 79-90.
- Thein, M., T. Tasanee, K. Youichi, and Y. Hanboonsong 2012. Dispersal of the leafhoppers *Matsumuratettix hiroglyphicus* and *Yamatotettix flavovittatus* (Homoptera: Cicadellidae), 4 vectors of sugarcane white leaf disease. *ApplEntomol Zool.* 47:255-262.
- Wongkaew, P., Hanboonsong, Y., Sirithorn,P., Choosai, C.,Boonkrong, S., Tinnangwattana, T., Kitchareonpanya, R., and Damak, S. 1997. Differentiation of phytoplasmas associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. *Theor. Appl. Genet.* 5(4): 660-663

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 พิกัดแปลงอ้อย พื้นที่ของความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อยที่ศึกษาในฤดูกาลที่ 1
(กรกฎาคม – พฤศจิกายน พ.ศ.2557)

แปลงที่		พิกัด	UTM	ระดับความสูงจาก น้ำทะเล (เมตร)	
อ.เมือง จ.ขอนแก่น	อ้อยปลูก 1.1	N 16°35.949′	48Q 0260697	±3	199
		E 102°45.422′	UTM 1836557		
	อ้อยปลูก 1.2	N 16°35.947′	48Q 0260719	±3	200
		E 102°45.434′	UTM 1836546		
	อ้อยปลูก 1.3	N 16°35.941′	48Q 0260749	±3	197
		E 102°45.451′	UTM 1836535		
	อ้อยต่อ	N 16°35.965′	48Q 0260704	±3	197
		E 102°45.425′	UTM 1836580		
อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น	อ้อยปลูก 2.1	N 16°52.797′	48Q 0264919	±3	203
		E 102°47.601′	UTM 1867589		
	อ้อยปลูก 2.2	N 16°52.792′	48Q 0264940	±3	206
		E 102°47.612′	UTM 1867580		
	อ้อยปลูก 2.3	N 16°52.808′	48Q 0264931	±3	198
		E 102°47.607′	UTM 1867609		
	อ้อยต่อ	N 16°52.812′	48Q 0264823	±3	204
		E 102°47.546′	UTM 1867619		
อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี	อ้อยปลูก 3.1	N 17°05.056′	48Q 0301295	±3	213
		E 103°07.961′	UTM 1889829		
	อ้อยปลูก 3.2	N 17°05.054′	48Q 0301314	±3	213
		E 103°07.971′	UTM 1889825		
	อ้อยปลูก 3.3	N 17°05.053′	48Q 0301335	±3	214
		E 103°07.982′	UTM 1889824		
	อ้อยต่อ	N 17°05.030′	48Q 0301237	±3	205
		E 103°07.928′	UTM 1889781		

ตารางภาคผนวกที่ 2 พิกัดแปลงอ้อย พื้นที่ของความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาวอ้อยที่ศึกษาในฤดูกาลที่ 2
(ธันวาคม พ.ศ.2557 – ธันวาคม พ.ศ.2558)

แปลงที่		พิกัด	UTM	ระดับความสูงจาก น้ำทะเล (เมตร)	
อ.เมือง จ.ขอนแก่น	อ้อยปลูก 1.1	N 16°35.910′	48Q 0261222	±3	204
		E 102°45.716′	UTM 1836473		
	อ้อยปลูก 1.2	N 16°35.915′	48Q 0261201	±3	205
		E 102°45.710′	UTM 1836482		
	อ้อยปลูก 1.3	N 16°35.918′	48Q 0261201	±3	205
		E 102°45.705′	UTM 1836488		
	อ้อยต่อ	N 16°35.941′	48Q 0260783	±3	198
		E 102°45.459′	UTM 1836536		
อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น	อ้อยปลูก 2.1	N 16°52.827′	48Q 0264780	±3	204
		E 102°47.522′	UTM 1867647		
	อ้อยปลูก 2.2	N 16°52.824′	48Q 0264752	±3	203
		E 102°47.506′	UTM 1867641		
	อ้อยปลูก 2.3	N 16°52.835′	48Q 0264769	±3	204
		E 102°47.516′	UTM 1867662		
	อ้อยต่อ	N 16°52.786′	48Q 0264920	±3	203
		E 102°47.601′	UTM 1867568		
อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี	อ้อยปลูก 3.1	N 17°05.050′	48Q 0300949	±3	208
		E 103°07.766′	UTM 1889820		
	อ้อยปลูก 3.2	N 17°05.039′	48Q 0300942	±3	209
		E 103°07.761′	UTM 1889800		
	อ้อยปลูก 3.3	N 17°05.030′	48Q 0300942	±3	211
		E 103°07.761′	UTM 1889783		
	อ้อยต่อ	N 17°05.067′	48Q 0301274	±3	211
		E 103°07.948′	UTM 1889850		

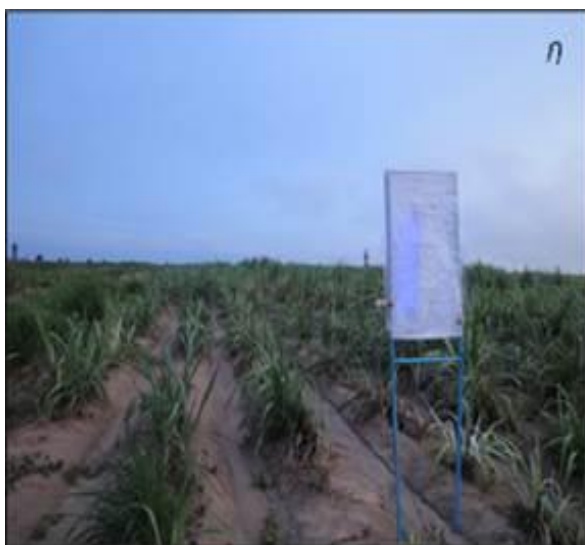
ภาพภาคผนวกที่ 1 ลักษณะของแปลงอ้อยที่ใช้ศึกษา ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย
ระหว่างเดือน กรกฎาคม – พฤศจิกายน พ.ศ. 2557 (ฤดูกาลที่ 1)

อ้อยปลูก	อ้อยโต	ติดแปลงมันสำปะหลัง	
แปลงอ้อยระดับความรุนแรงของโรคน้อย (อ.เมือง จ.ขอนแก่น)			
แปลงอ้อยระดับความรุนแรงของโรคปานกลาง (อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น)			
แปลงอ้อยระดับความรุนแรงของโรคมาก (อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี)			

ภาพภาคผนวกที่ 2 ลักษณะของแปลงอ้อยที่ใช้ศึกษา ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย

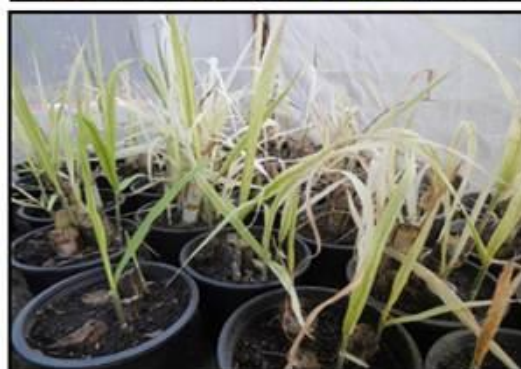
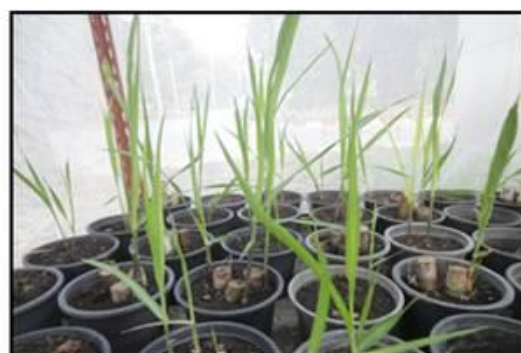
ระหว่างเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2557 – ธันวาคม พ.ศ.2558 (ฤดูกาลที่ 2)

อ้อยปลูก	อ้อยโต	ติดแปลงมันสำปะหลัง
แปลงอ้อยระดับความรุนแรงของโรคน้อย (อ.เมือง จ.ขอนแก่น) 		
แปลงอ้อยระดับความรุนแรงของโรคปานกลาง (อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น) 		
แปลงอ้อยระดับความรุนแรงของโรคมก (อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี) 		



ภาพผนวกที่ 3 กัดักจับแมลงพาหะในแปลงอ้อย

ภาพภาคผนวกที่ 3 ก. กัดักกาวเหนียวร่วมกับกัดักแสงไฟ ข. กัดักแสงไฟ 3 ขาดัง



ภาพภาคผนวกที่ 4 การเตรียมต้นอ้อยและเลี้ยงเพิ่มจำนวนแมลงเพื่อใช้ในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา

ตารางภาคผนวกที่ 1 จำนวนแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* ทั้งหมดในแต่ละพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย
ระหว่างเดือนกรกฎาคม – พฤศจิกายน พ.ศ. 2557 (ฤดูกาลที่ 1)

เดือน	เพศเมีย									เพศผู้								
	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค									พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค								
	น้อย			ปานกลาง			มาก			น้อย			ปานกลาง			มาก		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
ก.ค.	24	435	162	332	389	285	366	463	335	13	174	93	170	190	201	206	158	198
ส.ค.	7	4	6	28	77	116	25	139	63	6	3	3	19	33	40	9	57	30
ก.ย.	120	137	81	15	48	63	7	20	25	74	91	55	8	37	46	7	16	24
ต.ค.	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
พ.ย.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
รวม	152	576	249	375	514	464	398	626	423	93	268	151	197	260	288	222	231	252
รวม ทั้งหมด	977			1,353			1,447			512			745			705		

ตารางภาคผนวกที่ 2 จำนวนแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* ทั้งหมดในแต่ละพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย
ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 – ธันวาคม พ.ศ. 2558 (ฤดูกาลที่ 2)

เดือน	เพศเมีย									เพศผู้								
	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค									พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค								
	น้อย			ปานกลาง			มาก			น้อย			ปานกลาง			มาก		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
ธ.ค.2557	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ม.ค.2558	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ก.พ.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
มี.ค.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
เม.ย.	0	0	0	0	0	0	13	21	7	0	0	0	0	0	0	4	19	16
พ.ค.	23	11	4	18	32	0	12	18	21	33	18	6	76	129	0	4	23	15
มิ.ย.	76	62	137	119	160	294	164	179	173	186	112	325	163	334	792	178	226	119
ก.ค.	27	37	30	66	70	70	84	132	141	44	59	24	124	98	141	98	106	148
ส.ค.	119	145	120	703	689	453	178	190	237	82	87	68	510	201	356	111	132	162
ก.ย.	81	13	55	198	81	101	4	7	4	34	7	68	125	99	100	4	4	5
ต.ค.	5	7	5	10	8	8	3	1	4	3	1	2	4	6	14	0	0	1
พ.ย.	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	1	0
ธ.ค.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
รวม	332	275	354	1,114	1,040	926	458	548	587	382	284	496	1,002	867	1,404	399	511	466
รวม ทั้งหมด	961			3,080			1,593			1,162			3,273			1,376		

ตารางภาคผนวกที่ 3 จำนวนแมลงพาหะ *Yamatotettix flavovittatus* ทั้งหมดในแต่ละพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย
ระหว่างเดือนกรกฎาคม – พฤศจิกายน พ.ศ. 2557 (ฤดูกาลที่ 1)

เดือน	เพศเมีย									เพศผู้								
	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค									พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค								
	น้อย			ปานกลาง			มาก			น้อย			ปานกลาง			มาก		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
ก.ค.	0	0	3	1	0	0	4	5	1	0	0	6	0	0	0	1	3	2
ส.ค.	9	9	15	6	3	5	6	7	5	5	7	6	3	1	4	2	1	2
ก.ย.	42	45	47	9	18	27	11	30	15	26	23	39	5	9	20	4	14	8
ต.ค.	5	17	45	3	9	6	2	4	3	2	9	23	0	2	2	0	0	0
พ.ย.	24	2	9	3	1	6	8	12	13	8	0	4	0	0	0	2	2	6
รวม	81	73	119	22	31	44	31	58	37	41	39	78	8	12	26	9	20	18
รวม ทั้งหมด	273			97			126			158			46			47		

ตารางภาคผนวกที่ 4 จำนวนแมลงพาหะ *Yamatotettix flavovittatus* ทั้งหมดในแต่ละพื้นที่ทั้ง 3 ระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย
ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557 – ธันวาคม พ.ศ. 2558 (ฤดูกาลที่ 2)

เดือน	เพศเมีย									เพศผู้								
	พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค									พื้นที่ระดับความรุนแรงของโรค								
	น้อย			ปานกลาง			มาก			น้อย			ปานกลาง			มาก		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
ธ.ค.2557	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ม.ค.2558	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ก.พ.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
มี.ค.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
เม.ย.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
พ.ค.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
มิ.ย.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ก.ค.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
ส.ค.	0	2	3	3	2	4	3	2	3	0	1	3	5	1	2	2	3	1
ก.ย.	2	1	8	54	57	45	1	4	9	4	2	17	83	93	79	1	11	11
ต.ค.	5	18	14	12	15	16	4	8	13	4	5	10	20	27	25	11	16	14
พ.ย.	2	0	8	14	25	42	2	0	0	1	0	5	11	19	70	2	1	2
ธ.ค.	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	1
รวม	10	21	33	83	99	109	10	14	25	9	28	35	119	142	181	16	31	29
รวม ทั้งหมด	64			282			49			72			442			76		

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการย่อยที่ 2

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง : การคัดเลือกชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัยจากแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย

: Screening of the cultivable bacteria symbionts from insect vectors of sugarcane white leaf disease

ชื่อผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล.....ดร. จุรีมาศ วังคีรี

ชื่อ-สกุล.....Dr. Jureemart Wangkeeree

คุณวุฒิ..... ปรัญญาศุภวิบัณฑิต (กัญญาวิทยา)

ตำแหน่ง.....อาจารย์

หน่วยงานภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ที่อยู่เลขที่ 99 ถนน พหลโยธิน ตำบล คลองหนึ่ง อำเภอ คลองหลวงจังหวัด ปทุมธานี 12121

โทรศัพท์...02 564 4488 /โทรสาร.....02 5644525

E-mailtookta.wang@yahoo.com

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แมลงมีเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยที่อยู่ภายใน แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทแรกเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า bacteriocyte ความสัมพันธ์เป็นแบบให้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกได้ จุลินทรีย์ประเภทนี้ไม่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกได้ ส่วนอีกประเภทหนึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ต่อม น้ำลาย ทางเดินอาหาร hemolymph รังไข่ มีทั้งให้ประโยชน์และโทษแก่แมลงอาศัย บางชนิดสามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกได้ แนวทางการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์อาศัยร่วมในแมลงพาหะ โดยคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์อาศัยร่วมในแมลงชนิดที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ เป็นชนิดที่มีบทบาทและสำคัญต่อการอยู่รอดและการเจริญของแมลงอาศัย นำมาประยุกต์ใช้ทำให้แมลงมีอัตราการเจริญและการสืบพันธุ์น้อยกว่าปกติ รวมทั้งการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคกับแมลงโดยตรงในการป้องกันและกำจัดตัวแมลง

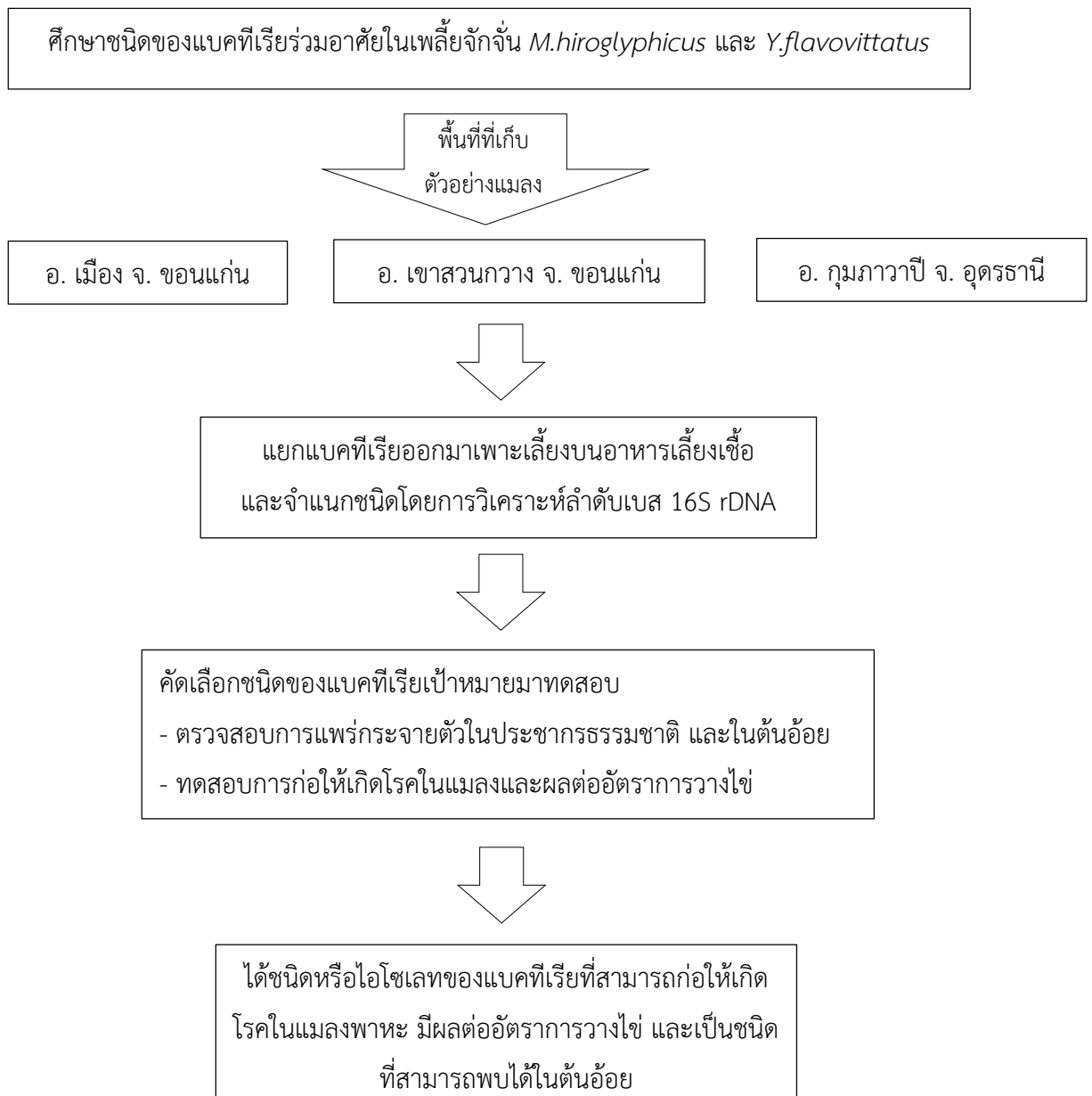
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์คัดเลือกชนิดของแบคทีเรียอาศัยร่วมในแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย ทั้งสองชนิดคือ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะ

และของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค โดยการคัดเลือกชนิดแบคทีเรียอาศัยร่วมในแมลงพาหะที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ และสามารถแพร่กระจายตัวภายในประชากรของแมลงพาหะ

1.2 วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* และ *Y.flavovittatus* แมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยด้วยการแยกออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะและในต้นอ้อย

1.3 ขอบเขตการวิจัย



1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

รายละเอียดของวิธีการดำเนินการวิจัยอยู่ในบทที่ 3

2. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

2.1 ชนิดของแบคทีเรียที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงจากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovitatus*

แมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น พบแบคทีเรียในอันดับ Bacillales มากที่สุด ชนิดที่พบเช่น *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis* และ *B. firmus* รองลงมาคือ อันดับ Actinomycetale เช่น *Microbacterium testaceum*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brachybacterium saurashtrense*, *Tsukamurella inchoensis* เป็นต้น แมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี อันดับที่พบมากที่สุด คือ Actinomycetales เช่น *A. nicotianae*, *Brachybacterium saurashtrense*, *M. testaceum* เป็นต้น และแบคทีเรียในอันดับ Bacillales พบมากเป็นอันดับสองรองลงมา เช่น *B. licheniformis*, *B. endophyticus* และ *B. megaterium* เป็นต้น และแมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.เมือง อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น แบคทีเรียในอันดับ Actinomycetale พบมากที่สุด เช่น *M. testaceum*, *A. phenanthrenivorans*, *A. ureafaciens*, *Tsukamurella pulmonis* และอันดับ Bacillales ชนิดแบคทีเรียที่พบ เช่น *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* เป็นต้น

เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovitatus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น แบคทีเรียที่พบมากคืออันดับ Bacillales เช่น *B. megaterium*, *Staphylococcus sciuri*, *S. epidermidis* เป็นต้น และอันดับ Actinomycetale ชนิดที่พบเช่น *A. woluwensis*, *Leifsonia lichenia* และ *L. lichenia* เป็นต้น

2.2 การกระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในประชากรของเพลี้ยจักจั่น

คัดเลือกแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท คือ *M. testaceum*, *A. woluwensis*, *A. nicotianae*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* เพื่อนำมาศึกษาถึงศักยภาพความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ควบคุมแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* การตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทในประชากรธรรมชาติของแมลง สามารถพบแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ทั้งแมลงเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งในระยะไข่ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร

คัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovitatus* คือ *A. woluwensis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* ซึ่งสามารถตรวจพบในประชากรแมลงในธรรมชาติทุกระยะการเจริญเช่นเดียวกัน

2.3 การก่อให้เกิดโรคและผลต่ออัตราการวางไข่

แบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกสามารถก่อให้เกิดโรคมกในเพลี้ยจักจั่นทั้งสองชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ที่ประมาณ 10-30% และแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ยกเว้น *A. nicotinae*) ผลทำให้อัตราการวางไข่เฉลี่ยของแมลงเพศเมียลดลงมากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.4 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *M.hiroglyphicus* ด้วยเทคนิค Metagenomic ananlysis

พบแบคทีเรีย phylum Bacteroidetes และ Proteobacteria ในอัตราส่วนที่ค่อนข้างมาก โดยพบแบคทีเรีย 2 ชนิดที่พบในอัตราส่วนที่มากในแมลงส่วนใหญ่ คือ *Sulcia muelleri* และ BAMH (Bacterial Associated with *M.hiroglyphicus*) ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภทปฐมภูมิ (Primary endosymbiont) ที่อยู่ในส่วนแบคทีริโอม (Bacteriome) ของเพลี้ยจักจั่น

ข้อเสนอแนะ

1. การคัดแยกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้และคัดเลือกชนิดที่คาดว่าจะมีศักยภาพนำมาควบคุมแมลงพาหะ หรือลดการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อย ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ถึงวิธีการที่เหมาะสมนำแบคทีเรียมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะ โดยผ่านทางการดูดกินท่อน้ำอาหารของแมลง
2. เนื่องจากชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงและได้คัดเลือกมานั้น บางส่วนจัดว่าเป็นเอนไฟท์ในพืช และบางชนิดมีรายงานว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ดังนั้นแนวทางของความเป็นไปได้ คือ เลือกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในต้นอ้อย ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช และส่งผลต่อแมลงพาหะ
3. แบคทีเรียที่คัดเลือก เช่น *Microbacterium testaceum* มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้น ไอโซเลทที่คัดเลือกนี้ จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาศึกษาต่อถึงผลของแบคทีเรียกับเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อย หรือผลของแบคทีเรียต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลงพาหะ

บทคัดย่อ

โรคใบขาวจัดเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของอ้อย สาเหตุเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาและมีเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ 2 ชนิด คือ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovitatus*) การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคต้องใช้การจัดการหลายด้านร่วมกัน ซึ่งการป้องกันกำจัดแมลงพาหะ ถือเป็นอีกด้านหนึ่งที่สำคัญมากในการจัดการเพื่อลดการแพร่ระบาดของโรค จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นแมลงพาหะทั้งสองชนิด โดยวิธีการแยกออกมาเพาะเลี้ยง และคัดเลือกชนิดที่มีศักยภาพที่คาดว่าจะสามารถนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวได้ และศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ด้วย Metagenomics analysis

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยการแยกออกมาเพาะเลี้ยงและจำแนกชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยเก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* จากแปลงอ้อย 3 สถานที่ ผลการศึกษาแบคทีเรียที่จำแนกได้ดังนี้ แมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น จากการวิเคราะห์แบคทีเรียจำนวน 38 โคโลนี พบแบคทีเรีย 9 อันดับ 17 สกุล จำนวน 27 ชนิด โดยอันดับ Bacillales มากที่สุด ชนิดที่พบ เช่น *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis* และ *B. firmus* รองลงมาคือ อันดับ Actinomycetale เช่น *Microbacterium testaceum*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brachybacterium saurashtrense* และ *Tsukamurella inchonensis* แมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี แยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและนำไปวิเคราะห์จำนวน 40 โคโลนี พบแบคทีเรีย 3 อันดับ 10 สกุล 17 ชนิด อันดับที่พบมากที่สุด คือ Actinomycetales เช่น *A. nicotianae*, *Brachybacterium saurashtrense*, *M. testaceum* เป็นต้น อันดับ Bacillales พบมารองลงมา ชนิดที่พบ เช่น *B. licheniformis*, *B. endophyticus* และ *B. megaterium* เป็นต้น และแมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.เมือง อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น จากการวิเคราะห์แบคทีเรียจำนวน 39 โคโลนี พบแบคทีเรีย 2 อันดับ 7 สกุล 15 ชนิด แบคทีเรียอันดับ Actinomycetale ชนิดที่พบ เช่น *M. testaceum*, *A. phenanthrenivorans*, *A. ureafaciens* และ *Tsukamurella pulmonis* และในอันดับ Bacillales ชนิดแบคทีเรียที่พบ เช่น *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* และ *B. licheniformis* เป็นต้น

จากจำนวนที่พบนี้ ได้คัดเลือกแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท คือ *M. testaceum*, *A. woluwensis*, *A. nicotianae*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* เพื่อนำมาศึกษาถึงศักยภาพความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ควบคุมแมลงพาหะ โดยตรวจสอบการแพร่กระจายตัวในประชากรธรรมชาติของแมลง ในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร และศึกษาการก่อให้เกิดโรคในแมลงและผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus*

การตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทในประชากรธรรมชาติของแมลง *M. hiroglyphicus* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถพบแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดในแมลงพาหะ ทั้งแมลงเพศผู้และเพศเมีย และพบทั้งที่

เก็บตัวอย่างมาจากสามแปลงทดลอง รวมทั้งตรวจพบในระยะไข่ ตัวอ่อนตั้งแต่วัย 1 ถึง 5 ของแมลงด้วย นอกจากนี้ แบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าว สามารถตรวจพบในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอาศัยอยู่ทั้งในแมลงและในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร

จากการทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียในแมลงพาหะ โดยให้แมลงดูดกินแบคทีเรียผสมกับการให้ระบบอาหารเทียม (artificial diet) ในปริมาณความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร พบว่าเมื่อเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ดูดกินแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรีย *M. testaceum*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *A. woluwensis* และ *A. nicotineae* ทำให้แมลงตาย 10% 20% 30% 30% 10% และ 20% ตามลำดับ แบคทีเรียดังกล่าวยังมีผลต่ออัตราการวางไข่ของแมลงพาหะด้วย ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเกือบทุกไอโซเลทมีผลทำให้อัตราการวางไข่เฉลี่ยของแมลงเพศเมียลดลงมากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นแบคทีเรีย *A. nicotineae* ที่มีจำนวนไข่เฉลี่ยต่อตัวใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

สำหรับเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น พบแบคทีเรียทั้งหมด 6 อันดับ 12 สกุล 20 ชนิด โดยอันดับที่พบมาก คือ Bacillales เช่น *B. megaterium*, *Staphylococcus sciuri*, *S. epidermidis* เป็นต้น และอันดับ Actinomycetales ชนิดที่พบเช่น *A. woluwensis*, *Leifsonia lichenia* และ *L. lichenia* เป็นต้น และจากชนิดของแบคทีเรียที่พบนี้ ได้คัดเลือก 3 ไอโซเลท คือ *A. woluwensis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* เพื่อนำมาศึกษาการแพร่กระจายตัวและทดสอบการเกิดโรคในแมลงพาหะชนิดนี้ ผลการศึกษา พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกดังกล่าวสามารถตรวจพบในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะ ทั้งในระยะตัวเต็มวัย ตัวอ่อนวัย 1 ถึงวัย 5 และระยะไข่ ของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* พบว่าหลังจากแมลงดูดกินสารละลายแบคทีเรีย *A. woluwensis*, *B. megaterium* และ *B. subtilis* ที่ในปริมาณความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่าทำให้แมลงตาย 26.67% 26.67% และ 13.67% ตามลำดับ

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ด้วยเทคนิค Metagenomic analysis โดยใช้แมลง 6 ตัวอย่าง ผลการศึกษาการจำแนกพบแบคทีเรีย phylum Bacteroidetes และ Proteobacteria ในอัตราส่วนที่ค่อนข้างมากจากแมลงทุกตัวอย่าง และเมื่อศึกษาการจำแนกในระดับ สกุลและชนิด พบว่ามี 2 ชนิดที่พบในอัตราส่วนที่มากในแมลงส่วนใหญ่ คือ *Sulcia muelleri* และ BAMH (Bacterial Associated with *M. hiroglyphicus*) ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภทปฐมภูมิ (Primary endosymbiont) ที่อยู่ในส่วนแบคทีริโอม (Bacteriome) ของเพลี้ยจักจั่น

Abstract

The white leaf disease is the most serious disease of sugarcane. It caused by pathogenic phytoplasma and transmitted by 2 species of the leafhopper vector those are *Matsumuratettix hiroglyphicus* and *Yamatotettix flavovitatus*. The management of this disease is necessary to integrate various methods and one of these is the controlling of leafhopper vectors, which is important strategy to reduce the disease distribution. The purpose of this study was to identify the bacteria by isolate and culture from these 2 leafhopper species. Also, the candidate bacteria will be selected to evaluate their potential as a biological control agents to control the vectors. Moreover, the Metagenomics analysis the bacteria abundance in the leafhopper *M. hiroglyphicus* has been investigated.

The leafhoppers *M. hiroglyphicus* in this experiments were collected from 3 sugarcane fields and the bacteria were isolated, cultured and identified with 16S rDNA analysis. For the specimens that collected from Kaosuankwang district, Khon Kaen province had 38 bacteria colony analyzed, those were found 9 order, 17 genus and 27 species. The order Bacillales is the most abundance found with such as species *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis* and *B. firmus*. Followed by bacteria in order Actinomycetale, such as *Microbacterium testaceum*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brachybacterium saurashtrense* and *Tsukamurella inchoensis*. The leafhopper which collected from Kumpawapi district, Udonthani province had 40 bacteria colony for analysis. The result show that bacteria 3 order, 10 genus and 17 species were found. The order Actinomycetales is the largest group, the example species are *A. nicotianae*, *Brachybacterium saurashtrense*, *M. testaceum*. Also the order Bacillales such as *B. licheniformis*, *B. endophyticus* and *B. megaterium*. Another one leafhopper which collected from Muang district, Khon Kaen province had 39 bacteria colony for analysis. The 2 order, 7 genus and 15 species were identified, the order Actinomycetale (such as *M. testaceum*, *A. phenanthrenivorans*, *A. ureafaciens* and *Tsukamurella pulmonis*) and the order Bacillales (such as *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*)

Among various bacteria those found in this experiment, 6 isolated were selected including *M. testaceum*, *A. woluwensis*, *A. nicotianae*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *B. megaterium* to evaluate their potential as a control agent of the leafhopper *M. hiroglyphicus*. For this part, they were detected their prevalence in natural population of the leafhopper

and in the sugarcane host plants. Also evaluated the pathogenic causing in the leafhopper and its effect on the eggs laid of female.

The 6 bacterial isolates were detected in natural population of *M. hiroglyphicus* by using PCR technique. All those bacteria could be found in the leafhopper both male and female. Besides, the selected bacteria were prevalence in egg and nymphs stage of the leafhopper. Moreover, these could be detected in the sugarcane plants that collected from those mentioned three fields. These finding indicate that those bacteria can be present / occupy in both the leafhopper and their food source which is sugarcane plants. Subsequently, the pathogenic testing of the bacteria on the insect were evaluated. The bacteria solution were mixed with artificial diet and feed the leafhopper as a concentration 1×10^8 cells/ml. After 7 days treatment, the mortality caused by *M. testaceum*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *A. woluwensis* and *A. nicotinae* were shown as 10% 20% 30% 30% 10% and 20 %, respectively. Furthermore, the effect of bacteria on number of eggs laid was examined.

Almost bacteria isolates (except *A. nicotinae*) has effect on ratio number of eggs laid per female that were reduce 50% lower than control group.

For the leafhopper *Y. flavovittatus* also was studied its cultivable bacteria. The result show that 6 order, 12 genus and 20 species were found. The order Actinomycetale and Bacillale were the most abundance. The 3 bacterial isolates those are *A. woluwensis*, *B. subtilis* and *B. megaterium* were selected to test their distribution in insects and their efficacy. These bacteria could be detected in natural population of *Y. flavovittatus* also present in eggs and 1-5 nymphs stages. The pathogenic test of these bacteria on this species were tested by feed the leafhopper with bacterial solution *A. woluwensis*, *B. megaterium* and *B. subtilis* as a concentration 1×10^8 cells/ml. The results reveals that after 7 days the leafhopper cause mortality as 26.67% 26.67% and 13.67 % from those bacteria respectively.

The bacteria diversity in the main vector *M. hiroglyphicus* also was determined by Metagenomics analysis. This experiment was done with 6 individual leafhopper and the 2 dominant bacterial species were found these are *Sulcia muelleri* in phylum Bacteridted and BAMH (Bacterial Associated with *M. hiroglyphicus*) in Proteobacteria phylum. These two species have been reported for the Primary endosymbiont located in the Bacteriome of the leafhopper.

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	16
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	41

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคใบขาวอ้อย (sugarcane white leaf disease) เป็นโรคที่มีความสำคัญสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในระบบการผลิตอ้อยและน้ำตาลปีละกว่า 1,000 ล้านบาท (Hanboonsong et al., 2002 ; กลุ่มพัฒนาสื่อส่งเสริมเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร) โดยสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา โรคใบขาวอ้อยแพร่ระบาดได้ 2 ทางหลักคือ การขนย้ายอ้อยที่เป็นโรคไปปลูกในพื้นที่อื่นและการแพร่กระจายโดยมีแมลงพาหะ 2 ชนิด คือ เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovitatus*) แมลงศัตรูที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อย และถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากต้นอ้อยที่เป็นโรคไปสู่ต้นอ้อยปกติ โดย *M. hiroglyphicus* มีประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อได้ดีกว่า *Y. flavovitatus* คิดเป็นร้อยละ 55 และ 45 ตามลำดับ (วรรณภา, 2547; Hanboonsong et al., 2006) พบปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่นมากตั้งแต่ช่วงเดือนเมษายนจนถึงเดือนกันยายน โดยปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิดนี้มีทิศทางตรงข้ามกัน หากมีปริมาณ *Y. flavovitatus* มากขึ้นจะมี *M. hiroglyphicus* ลดน้อยลง (ยุพา, 2552) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ต้นอ้อยและผลผลิตอ้อยเป็นบริเวณกว้างโดยเฉพาะพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ผลผลิตของอ้อยลดลงมากกว่า 50% (แฉล้ม, 2551)

การศึกษาของ Hanboonsong et al. (2002) ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ด้วยวิธีการ nested-PCR พบเชื้อไฟโตพลาสมาในทั้ง 3 ระยะ แสดงให้เห็นว่าเชื้อไฟโตพลาสมาสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นผ่านทางไข่ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไฟโตพลาสมาในประชากรแมลง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการป้องกันเพื่อลดการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงพาหะ ซึ่งการป้องกันกำจัดแมลงแบบชีววิธีเป็นวิธีการที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมแมลง เนื่องจากแมลงมีเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัย (Insect symbiosis) แบ่งเป็น 2 ประเภทคือจุลินทรีย์ร่วมอาศัยปฐมภูมิ (primary symbiont) เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรค อาศัยอยู่ในโครงสร้างเฉพาะที่เรียกว่า 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 อีกประเภทหนึ่งคือ จุลินทรีย์ร่วมอาศัยทุติยภูมิ

(secondary symbiont) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ต่อมน้ำลาย ทางเดินอาหาร เลือด (hemolymph) รังไข่ มีทั้งให้ประโยชน์และโทษแก่แมลงอาศัย บางชนิดสามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงภายนอก เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter agglomerans* และ *Klebsiella oxytoca* ที่แยกจากทางเดินอาหารของแมลงวันผลไม้ *Rhagoletis pomonella* มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ให้สมบูรณ์ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีหน้าที่สร้างแหล่งไนโตรเจนให้แก่แมลง โดยทำหน้าที่ย่อยสลายพิวรีน (purines) และอนุพันธ์ของพิวรีน (purine derivatives) ให้กลายเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญเพื่อให้แมลงนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Lauzon et al., 2000) แบคทีเรีย *Acyrtosiphon pisum* ในเพลี้ยอ่อนทำให้แมลงสามารถเพิ่มความต้านทานต่อแมลงเบียน (Montllor et al., 2002) แบคทีเรีย *Hamiltonella* ในแมลงหริ่งขาว มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศของแมลง (Su et al., 2013)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยและการทดสอบการก่อให้เกิดโรคในแมลงศัตรูพืช เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแก่แมลงอาศัยมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวควบคุมแบบชีววิธี แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการควบคุมแมลงต้องไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียที่คัดแยกจากแมลงนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืชประเภทปากแบบเจาะดูด (piercing sucking) เช่น การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแมลงหริ่งขาว (*Bemisia tabaci*) นำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรกับตัวอ่อน คือ *Erwinia persicinus* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 52% (Ateyyat et al., 2009) แบคทีเรียที่คัดแยกจากเพลี้ยอ่อน (*Toxoptera aurantii*) 5 ชนิด ทดสอบการก่อให้เกิดโรกับตัวอ่อนของเพลี้ยอ่อนโดยให้ดูดกินแบคทีเรียเป็นเวลานาน 4 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescen* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 50% (Sevim et al., 2012) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย คือ *E. aphidicola* ทดสอบการก่อให้เกิดโรกับเพลี้ยอ่อน (*A. pisum*) หลังจากการทดสอบ พบว่า *E. aphidicola* ทำให้เพลี้ยอ่อนมีอัตราการตาย 81-100% (Harada and Ishikawa, 1997)

ในเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*M. hiroglyphicus*) ได้มีรายงานการศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภท primary symbiont คือ Bacteria Associated with *M. hiroglyphicus* (BAMH) พบอยู่ในส่วนของ bacteriome เป็นชนิดที่พบมากในประชากรของแมลงในธรรมชาติพบทุกระยะการเจริญ ตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อน ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้มีความจำเพาะและมีบทบาทสำคัญกับแมลงพาหะชนิดนี้ (Wangkeeree et al., 2012) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิหรือแบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเลี้ยงได้ ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภททุติยภูมิ เพื่อคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบการก่อให้เกิดโรครวมทั้งประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ อาจเป็นแนวทางในการนำเชื้อแบคทีเรียไปใช้ในการควบคุมแมลงพาหะ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* และ *Y.flavovittatus* แมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยด้วยการแยกออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะและในต้นอ้อย

- ศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* และ *Y.flavovittatus* แมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยด้วยการแยกออกมาเพาะเลี้ยง
- ตรวจสอบการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียร่วมอาศัยที่คัดเลือกในประชากรของแมลงพาหะทั้งสองชนิดในธรรมชาติ ทุกระยะการเจริญ และตรวจสอบในต้นอ้อย
- ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกลำบากไปใช้ในการควบคุมแมลงพาหะ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ได้ข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้จากแมลงพาหะ *M.hiroglyphicus* และ *Y.flavovittatus*
- ชนิดของแบคทีเรียเป้าหมายที่คาดว่าจะมีศักยภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงพาหะ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญทางเศรษฐกิจของอ้อยและความเสียหายจากโรคใบขาว

อ้อย (Sugarcane : *Saccharum officinarum*) เป็นพืชตระกูลหญ้าวงศ์ Poaceae ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและอุตสาหกรรมการผลิตอื่นๆ เช่น การผลิตเอทานอล พบว่าประเทศบราซิลเป็นที่มีการผลิตและส่งออกน้ำตาลมากเป็นอันดับ 1 ของโลก โดยในปี 2549/50 มีการผลิตน้ำตาล 31.6 ล้านตัน รองมาคือ อินเดีย มีปริมาณการผลิตน้ำตาลในประเทศมากถึง 27 ล้านตัน ส่วนประเทศไทยมีผู้ปลูกอ้อยมากเป็นอันดับ 4-5 ของโลกและส่งออกน้ำตาลทรายเป็นอันดับ 3 ของโลก การผลิตน้ำตาลของไทยในแต่ละปีมีปริมาณไม่มากแต่ปริมาณการบริโภคในประเทศอยู่ในระดับต่ำประมาณ 2 ล้านตัน จึงทำให้มีปริมาณน้ำตาลเหลือเพื่อการส่งออก มูลค่าการจำหน่ายน้ำตาลทรายทั้งในประเทศและส่งออกได้ปีละ 180,000 ล้านบาท ล่าสุดในปีการผลิต 2557/58 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกอ้อยทั้งหมด 105.3 ล้านไร่ โดยมีพื้นที่เพิ่มขึ้นจากปีการผลิต 2556/57 จำนวน 455,784 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 4.52 ซึ่งมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากที่สุดอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 4.56 ล้านไร่ ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออก 2.99 2.41 0.58 ล้านไร่ ตามลำดับและจากการเปรียบเทียบพื้นที่ปลูกอ้อยในปี 2549/50-2557/58 พบว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกอ้อยเพิ่มขึ้นสูงกว่าภาคอื่นจาก 2.66 เป็น 4.56 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 41.66 ประสิทธิภาพการผลิตอ้อยและน้ำตาลทรายในประเทศไทยประจำปีการผลิต 2557/58 อยู่ที่ 11.30 ล้านตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2558) แม้ว่าประเทศไทยจะมีพื้นที่ปลูกอ้อยและผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น แต่ยังมีรายงานการเกิดโรคใบขาวอ้อยที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของอ้อยบางพื้นที่ 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 อำเภอเขาสนวนกวาง และอำเภอน้ำพอง ถูกประกาศให้เป็นเขตภัยพิบัติโรคใบขาวอ้อย ซึ่งมีพื้นที่ได้รับความเสียหายประมาณ 70,000 ไร่ จากพื้นที่ทั้งหมดกว่า 600,000 ไร่ และในเวลาเดียวกันก็พบว่าการลุกลามของโรคใบขาวไปยังพื้นที่ภาคกลางบางส่วน ในปี 2551 พื้นที่อำเภอเมืองจังหวัดขอนแก่นก็ยังพบการระบาดของโรคใบขาวอยู่เป็นจำนวนมาก และพบว่าการระบาดของโรคไปยัง

พื้นที่จังหวัดมหาสารคามจังหวัดใกล้เคียง พื้นที่พบการระบาดราวๆ 30,000 ไร่ จากพื้นที่ปลูกอ้อยกว่า 100,000 ไร่ มูลค่าความเสียหายกว่า 14 ล้านบาท และมีรายงานว่า 3 จังหวัดที่พบการระบาดของโรคใบขาวเป็นบริเวณกว้าง ได้แก่ อุดรธานี ขอนแก่น และมหาสารคาม คิดเป็นร้อยละ 1.06 ของพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด ทำให้ผลผลิตได้รับความเสียหายลดลงมากกว่า 50% (แฉล้ม, 2551) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคใบขาวอ้อยในต่างประเทศเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไต้หวัน พบการระบาดของโรคอย่างรุนแรงที่เมืองไทชานและเกาสู และแพร่ระบาดลุกลามไปยังจังหวัดใกล้เคียง และพื้นที่อื่นๆ ทั่วประเทศ จนมีการเลิกปลูกอ้อยในประเทศไต้หวัน ในประเทศบังคลาเทศก็พบว่าโรคใบขาวอ้อยส่งผลกระทบต่อให้เกิดความเสียหายในอ้อยปลูก 20% และ 100% ในอ้อยต่อ มีรายงานการพบโรคใบขาวในประเทศญี่ปุ่นเช่นกันแต่ไม่มีความรุนแรง ในปัจจุบันก็ยังพบการระบาดของโรคใบขาวทั้งในประเทศอินเดีย พม่า ศรีลังกา ชูแดน และไทย (พรทิพย์, 2542)

โรคใบขาวอ้อย (sugarcane white leaf disease) เป็นโรคที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นเชื้อสาเหตุ โดยเชื้อไฟโตพลาสมาจะอาศัยอยู่ในท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ต้นอ้อยที่เป็นโรคจะแสดงลักษณะอาการในส่วนของลำต้นและใบ โดยลำต้นจะมีขนาดเล็กกว่าต้นอ้อยปกติ หากเกิดโรคอย่างรุนแรงจะแสดงอาการแตกตาข้างและมีหน่อมากกว่าปกติ ส่วนของใบจะมีขนาดเล็ก สั้นกว่าปกติ ใบแคบและแตกเป็นฝอย เกิดเป็นสีขาวทั้งใบหรือมีสีเขียวปนขาวเนื่องจากคลอโรฟิลล์ภายในใบถูกทำลาย (พรทิพย์, 2542) โรคใบขาวอ้อยพบได้ตั้งแต่ระยะงอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ส่วนมากอ้อยต่อหรืออ้อยที่งอกจากท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบขาวอย่างรุนแรงมากกว่าอ้อยปลูก โดยแสดงอาการให้เห็นชัดเจน เป็นใบแคบ สีขาว ใบมีขนาดเล็ก ต้นแคระแกร็น ตั้งแต่เริ่มงอกจากท่อนพันธุ์ (ยุพา, 2547) อ้อยบางกออาจมีอาการแฝงของโรคคือ มีการติดเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ไม่แสดงอาการเป็นใบขาวออกมา ใบมีสีเขียวปกติ การเจริญเติบโตของต้นอ้อยอาการแฝงเหมือนกับต้นอ้อยปกติทุกประการ แต่เมื่อตรวจดูอย่างละเอียดจะพบว่าต้นอ้อยมีอาการเป็นโรคอยู่บริเวณรอบในของต้นอ้อย หน่ออ้อยที่จะแตกออกมาใหม่จากตาของลำต้นเดิม มักจะเกิดเป็นอ้อยแสดงอาการของโรคใบขาวออกมา ความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆหลายปัจจัย ได้แก่ อายุอ้อย พันธุ์อ้อย ความแข็งแรงของต้นอ้อย คุณภาพของท่อนพันธุ์ที่นำไปปลูก ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อย และสภาพภูมิอากาศภายในแปลงปลูก (พรทิพย์, 2542)

การแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในพื้นที่ใกล้เคียงและแพร่ระบาดไปทั่วภูมิภาคของประเทศไทยนั้น เกิดขึ้นจากการนำท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคใบขาวไปปลูกในพื้นที่อื่น เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่อาศัยอยู่ในส่วนท่อลำเลียงของลำต้นอ้อยเมื่อนำไปปลูกต่อเชื้อไฟโตพลาสมาที่อาศัยอยู่ในลำต้นเดิมจะแสดงอาการให้เห็นเมื่อตาข้างของท่อนพันธุ์เดิมงอกออกมา บางท่อนพันธุ์อาจไม่แสดงอาการของโรคใบขาวออกมาเปรียบเสมือนว่าต้นอ้อยเป็นปกติ ไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งเป็นอาการแฝงของโรค เมื่อเกษตรกรนำไปเป็นท่อนพันธุ์เพื่อปลูกขยายพันธุ์จึงทำให้โรคใบขาวอ้อยแพร่ระบาดเป็นพื้นที่บริเวณกว้างได้อย่างรวดเร็ว (พรทิพย์, 2542) ส่วนการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยอีกทางหนึ่ง คือ การแพร่ระบาดจากแมลงพาหะ ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น 2 ชนิด คือเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว

Y. flavovittatus เป็นแมลงศัตรูที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อย และสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากต้นอ้อยที่เป็นโรคไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ พบปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่นมากตั้งแต่ช่วงเดือนเมษายนจนถึงเดือนกันยายน โดยปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิดนี้มีทิศทางตรงข้ามกัน หากมีปริมาณ *Y. flavovittatus* มากขึ้นจะมี *M. hiroglyphicus* ลดน้อยลง พบมากในช่วงฤดูฝน เนื่องจากความชื้นอากาศสูง ต้นอ้อยเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์ของเพลี้ยจักจั่น (ยุพา, 2552)

2 เชื้อไฟโตพลาสมาและแมลงพาหะนำโรค

เชื้อไฟโตพลาสมา เป็นจุลินทรีย์คล้ายกับแบคทีเรียแต่ไม่มีผนังเซลล์ จึงทำให้เซลล์มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน มีลักษณะกลมจนถึงรี ขนาด 80-800 นาโนเมตร มีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อและการแบ่งตัวไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารสังเคราะห์ (พรทิพย์, 2542) ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมามีการดำรงชีวิตแบบปรสิต (obligate parasites) ต้องอาศัยอยู่ภายในสิ่งมีชีวิตอื่น แหล่งอาศัยที่พบ ได้แก่ พืชและแมลง สำหรับการอาศัยอยู่ในต้นพืชของเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าอาศัยอยู่ในท่อลำเลียงอาหารของต้นพืช (Garnier et al., 2001) และก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย พืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาจะแสดงอาการหลายอย่าง เช่น การเกิดดอกเป็นสีเขียว ดอกเป็นหมัน แตกพุ่ม ปล้องยืดยาวผิดปกติ และอาการแฉะแกร็น (Bertaccini and Duduk, 2009) เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะในวงศ์ Cicadellidae (เพลี้ยจักจั่น), Cixidae (เพลี้ยกระโดด), Psyllidae (เพลี้ยไก่อ๊ไฟ), Delphacidae (เพลี้ยกระโดด) and 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 แต่ยังไม่มียารายงานถึงการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะ (พิสุทธิ, 2553) เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคเหลืองขององุ่น โดยมีแมลง *Scaphoideus titanus* เป็นพาหะนำโรค (Alma et al., 1997) โรคแฉะแกร็นของต้นหม่อนแมลงพาหะ คือ *Hishimonoides sellatifomis* (Kawakita et al., 2000) โรคใบขาวอ้อยโดยมีเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus* เป็นแมลงพาหะ (Hanboonsong et al., 2002)

กระบวนการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของแมลงพาหะ เริ่มต้นจากการได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาในขณะดูดกินน้ำเลี้ยงจากท่ออาหารของพืช ช่วงเวลาที่ดูดกินน้ำเลี้ยงแมลงจะได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาเข้ามาเรียกว่า ระยะเวลาในการดูดรับการเชื้อ (Acquisition Access Period ; AAP) อาจใช้เวลาเป็นนาทีหรือชั่วโมง โอกาสได้รับเชื้อปริมาณมากขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการรับและปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่อยู่ในต้นพืช หลังจากที่ได้รับเชื้อแล้ว ไฟโตพลาสมาจะมีการเพิ่มปริมาณในตัวแมลง จนมีปริมาณมากพอที่จะถูกถ่ายทอดจากตัวแมลงไปสู่ต้นพืชและก่อให้เกิดโรคได้ เรียกว่า ระยะบ่มเชื้อ (Latent Period ; LP) ในระยะนี้เชื้อไฟ

โตพลาสมามีการเคลื่อนย้ายและจำลองตัวเองในอวัยวะของแมลงพาหะ โดยเชื้อจะผ่านเข้าไปในชั้นเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้และจำลองตัวเองภายใน vesicle และเคลื่อนย้ายเข้าสู่ระบบเลือด (haemolymph) จากนั้นจะเข้าสู่เนื้อเยื่ออื่น เช่น อวัยวะขับถ่าย (malpighian tube) ไชมันและสมอง แล้วจึงวนกลับเข้าสู่ระบบเลือดและต่อมน้ำลาย (salivary glands) ระยะเวลาในการบ่มเชื้อขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ อาจระยะเวลาเพียงนาทีกหรือจนถึง 80 วัน เชื้อไฟโตพลาสมามีการสะสมในต่อมน้ำลายปริมาณมากและถ่ายทอดออกไปสู่ต้นพืชจากดูดกินน้ำเลี้ยงบนพืชต้นอื่น (Weintraub and Beanland, 2006) หลังจากที่ดินพืชได้รับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงพาหะ เชื้อไฟโตพลาสมาย่อยอาศัยและเพิ่มปริมาณภายในเซลล์พืชจนต้นพืชแสดงอาการอ่อนแอออกมา เรียกว่า ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (Inoculation Access Period ; IAP) โดยต้นพืชจะแสดงอาการอ่อนแอหรือเป็นโรคร้ายหรือเร็วขึ้นขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่พืชได้รับ

2.3 เพลี้ยจักจั่นแมลงพาหะนำโรคใบขาว

เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* จัดอยู่ในอันดับ Hemiptera วงศ์ Cicadellidae เป็นแมลงพาหะนำเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาว สามารถพบเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้ได้ตามพื้นที่ปลูกอ้อยหรือพืชอาศัยชนิดอื่น ได้แก่ อ้อยป่า หญ้าแพรก น้านมราชสีห์ และแห้วหมู (ชุดินันท์, 2541) ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงต้นอ้อยเป็นอาหาร วางไข่ภายในดิน ซึ่งดินที่ค่อนข้างเป็นดินทรายมีความชื้นในดินประมาณ 10% และอุณหภูมิ 30-35 °C เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่น หลังจากที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วเพศเมียสามารถวางไข่ได้ 198.4 ฟองต่อตัว วงจรชีวิตของเพลี้ยจักจั่นที่ได้มีการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่า ระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้แบ่งออกเป็น 5 วัย โดยเริ่มจากระยะการเป็นไข่ฟักเป็นตัวอ่อนวัยที่ 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 ซึ่งพร้อมที่จะผสมพันธุ์และวางไข่ต่อไปได้ โดยเพลี้ยจักจั่นเพศผู้มีวงจรชีวิต 40.9 วัน และเพศเมีย 43.8 วัน ในสภาพแปลงอ้อยปกติพบว่าเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้สามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี แต่ไม่ได้มีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นตลอดไป เนื่องจากมีปัจจัยสภาพแวดล้อมเป็นตัวควบคุมการเพิ่มปริมาณของแมลง (ยุพา, 2552)

เพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Y. flavovittatus* จัดอยู่ในอันดับและวงศ์เดียวกันกับ *M. hiroglyphicus* จากการศึกษาวงจรชีวิตภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าระยะไข่ 7-9 วัน ระยะตัวอ่อนมี 5 วัย มีระยะเวลา 15-17 วัน ตัวอ่อนในระยะแรกมีสีขาวเหลือง และมีจุดสีดำ 4 จุดที่ด้านบนของปล้องท้อง ตัวอ่อนวัยสุดท้ายลำตัวด้านบนสันหลังมีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่ว ระยะตัวเต็มวัยมีอายุ 35-45 วัน (ยุพา, 2552)

การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Y. flavovittatus* เมื่อแมลงดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นอ้อยที่เป็นโรค เชื้อไฟโตพลาสมาย่อยจะผ่านเข้าไปในทางเดินอาหารของแมลงและเพิ่มจำนวนในอวัยวะต่างๆของแมลง จากนั้นก็จะเดินทางเข้าสู่ลำไส้และช่องว่างภายใน

ตัวแล้ววนกลับเข้าสู่ลำไส้ เลือด และต่อมน้ำลาย เมื่อแมลงเจาะดูดน้ำเลี้ยงของต้นพืชอีกครั้งทำให้เชื้อไฟโตพลาสมาที่อยู่บริเวณต่อมน้ำลายออกสู่ต้นพืช เชื้อไฟโตพลาสมามีระยะเวลาในการบ่มเชื้ออยู่ภายในตัวแมลง 3-4 สัปดาห์ แมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีที่อุณหภูมิ 25 °C และสามารถถ่ายทอดเชื้อได้จนกระทั่งตาย ในการศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยวิธีการจากต้นอ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติของแมลงพาหะ ทั้ง 2 ชนิด พบว่า *M. hiroglyphicus* ใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมงในการดูดรับเชื้อและถ่ายทอดไปยังต้นปกติ 10-55% ส่วน *Y. flavovittatus* ใช้เวลาในการรับเชื้ออย่างน้อย 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ในการถ่ายทอด 5-45% แสดงให้เห็นว่า *M. hiroglyphicus* มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีกว่า *Y. flavovittatus* (ยุพาและคณะ, 2547)

2.4 จุลินทรีย์ร่วมอาศัยในแมลง

แมลงมีเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัย (Insect symbiosis) แบ่งเป็น 2 ประเภทคือจุลินทรีย์ร่วมอาศัยปฐมภูมิ(primary symbiont) เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรค อาศัยอยู่ในโครงสร้างเฉพาะที่เรียกว่า mycetome หรือ bacteriome อยู่บริเวณส่วนท้องของแมลง ส่วนใหญ่จัดเป็นแบคทีเรีย มีความสัมพันธ์เป็นแบบให้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ ไปยังรุ่นลูกได้ แต่ไม่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงนอกตัวแมลงอาศัยได้ เช่น แบคทีเรีย *B. aphidicola* ในเพลี้ยอ่อนมีบทบาทในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นให้กับเพลี้ยอ่อน แบคทีเรีย *W. glossinidia* อยู่ในโครงสร้างของ bacteriome ของแมลงวัน Tsetse ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์วิตามินบี (Douglas, 1989; Wernegreen, 2002) จุลินทรีย์ร่วมอาศัยประเภทนี้มีความจำเป็นต่อการการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของแมลง ส่วนอีกประเภทหนึ่ง คือ จุลินทรีย์ร่วมอาศัยทุติยภูมิ (secondary symbiont) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ต่อมน้ำลายทางเดินอาหาร เลือด (hemolymph) รังไข่ มีทั้งให้ประโยชน์และโทษแก่แมลงอาศัย บางชนิดสามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงภายนอก เช่น เชื้อแบคทีเรีย *E. agglomerans* และ *K. oxytoca* ที่แยกจากทางเดินอาหารของแมลงวันผลไม้ *R. pomonella* มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนางจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ให้สมบูรณ์ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีหน้าที่สร้างแหล่งไนโตรเจนให้แก่แมลง โดยทำหน้าที่ย่อยสลายพิวรีน (purines) และอนุพันธ์ของพิวรีน (purine derivatives) ให้กลายเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญเพื่อให้แมลงนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Lauzon et al., 2000) แบคทีเรีย *A. pisum* ในเพลี้ยอ่อน ทำให้แมลงสามารถเพิ่มความต้านทานต่อแมลงเบียน (Montllor et al., 2002) แบคทีเรีย *Hamiltonella* ในแมลงหิวขาว มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศของแมลง (Su et al., 2013)

2.5 การใช้จุลินทรีย์ร่วมอาศัยในการควบคุมแมลง

เชื้อแบคทีเรียที่ให้โทษแก่แมลงอาศัย เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ซึ่งชนิดของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการควบคุมแมลงนั้นจะต้องเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย

ต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างการใช้แบคทีเรียที่แยกจากตัวแมลงนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืชที่เป็นแมลงปากแบบเจาะดูด เช่น การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแมลงหวี่ขาว (*B. tabaci*) สามารถคัดแยกได้ 11 ชนิด ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาว โดยให้ตัวอ่อนดูดกินแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/ml เป็นเวลานาน 5 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 17-52% ได้แก่ *E. persicinus* 52%, *E. acetylicum* 43%, *Bacillus pumilus* 40%, *E. undae* 33%, *Staphylococcus 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*) 5 ชนิด ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับตัวอ่อนของเพลี้ยอ่อนโดยให้ดูดกินแบคทีเรียเป็นเวลานาน 4 วัน พบว่าเชื้อ *P. fluorescen* ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตาย 50% *Rahnella aquatilis* 20%, *B. tequilensis* และ *Staphylococcus sp.* 10%, *Chryseobacterium stagni* 8% (Sevim et al., 2012) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *E. aphidicola* และ *Escherichia coli* ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับเพลี้ยอ่อนความเข้มข้นของแบคทีเรีย 1×10^5 CFU/ml นาน 1 วัน (*A. pisum*) พบว่า *E. aphidicola* ทำให้เพลี้ยอ่อนมีอัตราการตาย 81-100% แต่ *E. coli* ไม่ก่อให้เกิดโรคกับเพลี้ยอ่อน (Harada and Ishikawa, 1997) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้แบคทีเรียในการควบคุมแมลงชนิดอื่นๆ เช่น แบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก *Cyclocephala signaticollis* คือ *B. thuringiensis* และ *Arthrobacter sp.* เมื่อนำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรคพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ทำให้ตัวหนอนมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง 100% และ 90% ตามลำดับ ภายหลังจากการให้ตัวหนอนได้รับเชื้อเพียง 4 วัน (Consolo et al., 2010) การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวหนอนของ *Cydia pomonella* พบว่าแยกแบคทีเรียออกมาได้ 8 ชนิด ได้แก่ *Proteus rettgeri*, *Escherichia coli*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *B. laterosporus*, *Micrococcus sp.*, *P. vulgaris* และ *Deinococcus sp.* เมื่อทดสอบการก่อให้เกิดโรคพบว่า *B. laterosporus* ทำให้ตัวหนอนของ *C. pomonella* มีอัตราการตายสูงที่สุด 65% ภายหลังจากได้รับเชื้อ 8 วัน ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นทำให้ตัวอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ที่ 17-60% (Erturk and Demirbag, 2006)

2.6 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 (*B.*

tabaci) 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 สูงกว่า แมลง 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 และย้ายแมลงไปยังต้นฝ้ายปกติ เพื่อบ่มเชื้อภายในตัวแมลงเป็นเวลา 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 วันตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไวรัส พบว่ามีเชื้อไวรัสภายในต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง H^+ สูงกว่า H^- อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง H^+ 1, 5 และ 10 ตัว มีเชื้อไวรัส 60, 100 และ 100% ตามลำดับ และการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในใบมะเขือเทศหลังจากที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลงหวี่ขาวนาน 10-20 วัน ด้วย q-PCR พบว่าปริมาณไวรัสในใบมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง H^+ และ H^- ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใบที่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง H^+ เพศเมียมีปริมาณเชื้อไวรัสสูงสุด รองมาคือ H^+ เพศผู้ ส่วนใบที่ได้รับการถ่ายเชื้อจาก H^- เพศผู้และเพศเมียมีปริมาณน้อยสุดและไม่แตกต่างกัน จากการทดลองดังกล่าวนี้ ทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Hamiltonella* มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศของแมลงหวี่ขาว

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การแยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovitatus*

1.1 พื้นที่ที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างแมลง

แปลงอ้อยที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย 3 พื้นที่ คือ เขตพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีประวัติการระบาดของโรคใบขาวมาก และอำเภอเขาสวนกวางและอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีระดับการระบาดของโรคน้อยกว่า (ภาพที่ 1)

เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อยโดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลงและหลอติดดูลแมลง ในช่วงเวลา 19.00-20.00 น. ในช่วงที่มีการระบาดของแมลงพาหะเดือนกรกฎาคม เพื่อนำมาศึกษาโดยแยกเก็บตัวอย่างเป็นแปลงอ้อยปลูก และอ้อยต่อของแต่ละพื้นที่ เก็บตัวอย่างแมลงใส่ในกรงพลาสติกที่มีต้นอ้อยอยู่ เลี้ยงแมลงในโรงเรือนปฏิบัติการเพื่อนำตัวอย่างแมลงที่มีชีวิตอยู่มาศึกษาทดลอง



พื้นที่แปลง อ. เมือง จ. ขอนแก่น



พื้นที่แปลง อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น



พื้นที่แปลง อ. กุมภวาปี จ. อุดรธานี



การตั้งกับดักแสงไฟ

ภาพที่ 1 แปลงอ้อยที่เก็บตัวอย่างแมลงพาหะ

1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัยจากตัวอย่างแมลง

ตัวอย่างเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ที่ใช้ในการศึกษาจาก 3 พื้นที่แปลงละ 20 ตัว (แปลงอ้อยปลูก เพศเมีย 5 ตัว และเพศผู้ 5 ตัว แปลงอ้อยต่อ เพศเมีย 5 ตัว และเพศผู้ 5 ตัว) การทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปได้ คือ Nutrient Agar (NA) Tryptic Soy Agar (TSA) และ Brain Heart Infusion agar (BHI) ก่อนการแยกแบคทีเรียออกมาเพาะเลี้ยง ต้องทำความสะอาดตัวแมลงก่อนเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปะปนอยู่ภายนอกตัวแมลง โดยใช้อุปกรณ์และเทคนิคที่ปลอดภัย ทำการล้างแมลงใน 75% ethanol และ 6% sodium hypochloride นานอย่างละ 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ส่วนเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ที่ใช้ในการศึกษาทดลองนี้มีจำนวนน้อยกว่า เนื่องจากการแพร่ระบาดของแมลงพาหะในชนิดนี้ในสภาพธรรมชาติมีน้อย

โดยแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยเฉพาะในส่วนบริเวณส่วนท้องของแมลง นำตัวอย่างส่วนท้องที่ตัดแยกแล้วมาบดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงแบคทีเรียอยู่ 100 ไมโครลิตร (หนึ่งชิ้นส่วนที่แยกต่อหนึ่งหลอด) เจือจางความเข้มข้นลงโดยแบ่ง 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารใหม่ 100 ไมโครลิตร แล้วดูดจากหลอดที่เจือแล้ว 20 ไมโครลิตร spread ลงบน plate อาหารแข็ง จากนั้นบ่มตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลาประมาณ 24-48 วัน ให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโต (ภาพที่ 2)



ทำความสะอาดภายนอกตัวแมลง



บดส่วนท้องแมลงในอาหารเหลว



Spread บนอาหารแข็งและบ่มที่ 30 °C

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการแยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากตัวอย่างแมลง

1.3 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

นำโคลนเดี่ยวของแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเซลล์ในอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยแยกเซลล์แบคทีเรียจากอาหารเหลวด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 2 นาที เติมน้ำ TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA) ปริมาตร 460 ไมโครลิตร สารละลาย 10% SDS 30 ไมโครลิตร และเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 5 mg/ml 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชม. สกัดด้วยการเติมน้ำ phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่และเติมน้ำ phenol-chloroform (24:1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ย้ายสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติมน้ำ 3M

Sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรสารในหลอด และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด วางทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที และละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

1.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงโดยนำดีเอ็นเอที่สกัดมาทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อวิเคราะห์ในส่วนของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์ (Universal primer) 25F และ 1513R มีส่วนประกอบคือ dNTP 0.2 mM, ไพรเมอร์ 0.3 μ M (25F: 5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3, 1513R: 5-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3), Taq DNA polymerase 1 U, MgCl₂ 2.5 mM, 1X buffer ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 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 และเปรียบเทียบกับยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล NCBI

2. การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในแมลงพาหะ และในตัวอย่างอ้อย

ตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ในประชากรแมลงพาหะ เพื่อยืนยันว่าชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนมาก รวมทั้งชนิดที่เป็น endophyte พืช และชนิดที่เป็นสาเหตุโรคแมลง สามารถพบได้ในประชากรแมลงพาหะ

2.1 พื้นที่ที่ศึกษา การเก็บตัวอย่างแมลงและต้นอ้อย

แปลงอ้อยที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย 3 พื้นที่ คือ เขตพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี อำเภอเขาสวนกวางและอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อยโดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลงและหลอดดูดแมลง ในช่วงเวลา 19.00-20.00 น. ในช่วงที่มีการระบาดของแมลงพาหะเดือนกรกฎาคมเพื่อนำมาศึกษาโดยแยกเก็บตัวอย่างเป็นแปลงอ้อยปลูก และอ้อยต่อของแต่ละพื้นที่

2.2 การสกัดดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น

นำเพลี้ยจักจั่นมาบดให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ (1M Tris pH 8.0, 0.5M EDTA, 1M NaCl, 10% SDS, Proteinase 2 mg/ml) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยการเติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ย้าย

สารละลายใส่ส่วนบนใส่ในหลอดใหม่และเดิม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ย้ายสารละลายใส่ส่วนบนใส่ในหลอดใหม่เติม 3M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรสารในหลอดผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 30 นาทีและตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ที่ผสม RNase 2 mg/ml ผสมอยู่ในอัตราส่วน 200:1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 6-24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

2.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อย

เก็บตัวอย่างต้นอ้อยปกติจากสถานที่ละ 30 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ไนโตรเจนเหลวบดให้ละเอียดเป็นผง นำตัวอย่างอ้อยที่บดแล้วใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2% CTAB บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย chloroform-isoamyl alcohol (24:1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายใส่ส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตรเท่ากับสารที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากัน จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ที่ผสม RNase 2 mg/ml ผสมอยู่ในอัตราส่วน 200:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 6-24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

2.4 การตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายโดยการวิธีการ PCR

การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียเป้าหมายโดยนำดีเอ็นเอของแมลงที่สกัดมาทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อวิเคราะห์ในส่วนขงยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์ของแบคทีเรียเป้าหมายมีส่วนประกอบคือ dNTP 0.2 mM, ไพรเมอร์ 0.3 μ M , Taq DNA polymerase 1 U, MgCl₂ 2.5 mM, 1X buffer ดีเอ็นเอของแมลง 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

3. การศึกษาแนวทางความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงพาหะ

3.1 การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียกับแมลงพาหะ

เตรียมแบคทีเรียจากโคโลนีเดียวของแบคทีเรียที่คัดเลือก นำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วย Haemocytometer และปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5%

ทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับแมลงพาหะทั้งสองชนิด โดยการให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย โดยนำแมลงพาหะใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิเมตร หลอดละ 1 ตัว เพศเมียและเพศผู้อย่างละ 5 ตัว ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มที่ยึดให้มีความบางประมาณ 4 เท่า จากนั้นหยดสารละลาย กับ TE buffer ผสมซูโครส 5% ร่วมกับแบคทีเรียลงบนพาราฟิล์มปริมาณ 50 ไมโครลิตร และปิดด้วยพาราฟิล์มอีกครั้งหนึ่ง กลุ่มควบคุมให้แมลงดูดกินสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ร่วมกับอาหารเหลว นำไปติดไว้ที่ใต้ใบอ้อยเพื่อล่อให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย บันทึกการตายของแมลงเป็นเวลานาน 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD สิ่งทดลองคือแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.2 การศึกษาผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus*

เตรียมแบคทีเรียจากโคโลนีเดียวของแบคทีเรียที่คัดเลือก นำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วย Haemocytometer และปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียด้วยสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^8 cell/ml

นำแมลงพาหะที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์เพศเมียและเพศผู้อย่างละ 10 ตัวต่อสิ่งทดลอง ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิเมตร หลอดละ 1 ตัว ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มที่ยึดให้มีความบางประมาณ 4 เท่า จากนั้นหยดสารละลาย TE buffer ประกอบด้วยซูโครส 5% ที่ผสมแบคทีเรียและวัดค่าความหนาแน่นของแบคทีเรียแล้วลงไปในพาราฟิล์มปริมาณ 50 ไมโครลิตร และปิดด้วยพาราฟิล์มอีกครั้ง นำหลอดที่ใส่แมลงแล้วไปติดไว้ที่ใต้ใบอ้อยเพื่อล่อให้แมลงดูดกินแบคทีเรีย เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง จากนั้นจับคู่แมลงเพศผู้และเมียเมื่อยังไม่ผสมพันธุ์ที่มีต้นอ้อยอยู่ กรองละ 1 คู่ หลังจากจับคู่ผสม 1 สัปดาห์ ตรวจนับจำนวนไข่ของแมลง และตรวจนับทุกๆ 4 วัน กลุ่มควบคุมให้แมลงดูดกินเฉพาะสารละลาย TE buffer ผสมซูโครส 5% วางแผนการทดลองแบบ CRD สิ่งทดลองละ 5 ซ้ำ

4. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ด้วยวิธีการ Metagenomic analysis

ตัวอย่างแมลงที่นำมาศึกษามี 6 ตัวอย่าง คือ แมลงเพศเมีย 3 ตัวอย่าง และแมลงเพศผู้ 3 ตัวอย่าง ศึกษาโดยการวิเคราะห์ในส่วนของยีน 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ V1-V3

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การแยกเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovitatus*

1.1 การแยกเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus*

จากผลการศึกษาพบว่าการแยกส่วนของทางเดินอาหารและต่อมน้ำลายของแมลงพาหะเพื่อนำมาแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พบว่าไม่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งอาหาร Nutrient Broth and Agar, Tryptic Soy Broth and Agar และ Brain Heart Infusion Broth and Agar และจากแมลงทั้งเพศผู้และแมลงเพศเมีย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าบริเวณดังกล่าวไม่มีเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้อาศัยอยู่ หรือมีจำนวนแบคทีเรียอาศัยอยู่น้อยมาก จนเซลล์แบคทีเรียไม่สามารถเจริญบนอาหาร พบว่าการแยกและเพาะเลี้ยงพบว่าส่วนหัวของทั้งเพศผู้และแมลงเพศเมีย จากทุกพื้นที่เก็บตัวอย่างมา พบว่าไม่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 อาหารเลี้ยงเชื้อ แต่จากการแยกเพาะเลี้ยงจากบริเวณส่วนท้องของแมลงพาหะ พบว่ามีแมลงส่วนใหญ่มีแบคทีเรียเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะแมลงพาหะเพศเมีย ส่วนแมลงเพศผู้จำนวนตัวที่มีแบคทีเรียขึ้นน้อยมากหรือไม่เลย

แมลงเพศเมีย 1 ตัว มีโคโลนีแบคทีเรียเจริญขึ้นเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันเพื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดโดยวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรีย จากการศึกษาและเก็บข้อมูลเบื้องต้น คือการบันทึกลักษณะพื้นฐานของโคโลนีแบคทีเรีย การย้อมแกรม และการบันทึกลักษณะเซลล์แบคทีเรีย

ผลการศึกษาจำนวนตัวและเพศของแมลงที่พบแบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้สรุปดังในตารางที่ 1 พบว่า พื้นที่ อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแมลงบนอาหาร NA และ BHI แมลงเพศเมียที่ใช้ในการศึกษาทดลองสำหรับสูตรอาหารจำนวนละ 10 ตัว มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 100% และได้คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกันจำนวน 14 โคโลนีจากสูตรอาหาร NA และจำนวน 13 โคโลนี สำหรับอาหาร BHI ส่วนบนอาหาร TSA จำนวนแมลงที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 90% และได้คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกันจำนวน 10 โคโลนี แต่ในเพศผู้นั้นทุกอาหารศึกษาไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การบันทึกลักษณะพื้นฐานของโคโลนีแบคทีเรีย การย้อมแกรม และลักษณะเซลล์แบคทีเรียของแต่ละโคโลนีสรุปในตารางที่ 1 ภาคผนวก ดังนั้นในพื้นที่นี้จึงมีโคโลนีของแบคทีเรียที่นำไปจำแนกชนิดทั้งหมด 37 โคโลนี จากแมลงเพศเมียเท่านั้น

ในพื้นที่ อ. เมือง จ.ขอนแก่น แมลงเพศเมียที่ใช้ในการศึกษาทดลอง สำหรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนสูตรละ 8 ตัว อาหาร NA จำนวนแมลงเพศเมีย ที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 75%

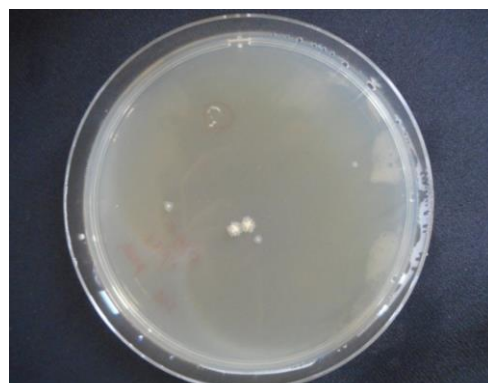
คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกัน 10 โคโลนี บนอาหาร TSA แผลงเพศเมียที่พบโคโลนีของแบคทีเรียคิดเป็น 87.5% คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกันจำนวน 16 โคโลนี และจากสูตรอาหาร BHI แผลงเพศเมียที่พบโคโลนีของแบคทีเรียคิดเป็น 100% คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกันจำนวน 13 โคโลนี แผลงเพศผู้ที่ใช้ในการศึกษาทดลองบนสูตรอาหารละ 10 ตัว บนอาหาร NA และ BHI ไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่มีจำนวนแผลงที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 10% คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย 1 โคโลนี และจากการลักษณะพื้นฐานของโคโลนีแบคทีเรีย การย้อมแกรม และการบันทึกลักษณะเซลล์แบคทีเรียของแต่ละโคโลนี ดังนั้นในพื้นที่นี้จึงมีโคโลนีของแบคทีเรียที่นำไปจำแนกชนิดทั้งหมด 40 โคโลนี

ผลการศึกษาจำนวนตัวและเพศของแผลงที่พบแบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ในพื้นที่ อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี แผลงเพศเมียที่ใช้ในการศึกษาทดลองบนอาหารสูตรละ 10 ตัว เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแผลงบนอาหารสูตร NA จำนวนแผลงที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 80% คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกันจำนวน 14 โคโลนี สูตรอาหาร TSA จำนวนแผลงที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 70% คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกันจำนวน 12 โคโลนี และบนสูตรอาหาร BHI จำนวนแผลงที่มีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 90% ได้คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากลักษณะภายนอกที่คล้ายกันจำนวน 14 โคโลนี แต่ในเพศผู้นั้นทุกอาหารศึกษาไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการลักษณะพื้นฐานของโคโลนีแบคทีเรีย การย้อมแกรม และการบันทึกลักษณะเซลล์แบคทีเรีย ของแต่ละโคโลนี ดังนั้นในพื้นที่นี้จึงมีโคโลนีของแบคทีเรียที่นำไปจำแนกชนิดทั้งหมด 40 โคโลนี

สรุปจากจำนวนเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 พื้นที่ ในการศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยแยกออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สูตร ใช้เพศเมียจำนวน 84 ตัว ใช้เพศผู้จำนวน 84 ตัว ผลคือแผลงเพศเมียที่พบว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียคิดเป็น 85.7% ของจำนวนตัว ในขณะที่แผลงเพศผู้พบว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียคิดเป็น 1.2% ของจำนวนตัวเท่านั้น และจากการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียเพื่อนำไปจำแนกชนิดทั้งหมด 120 โคโลนี ในจำนวนนี้ 99% เป็นแบคทีเรียที่แยกได้มาจากเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* เพศเมีย



แปลงอ้อยปลูก/TSA/F3/กค/อ.เมือง จ.ขอนแก่น



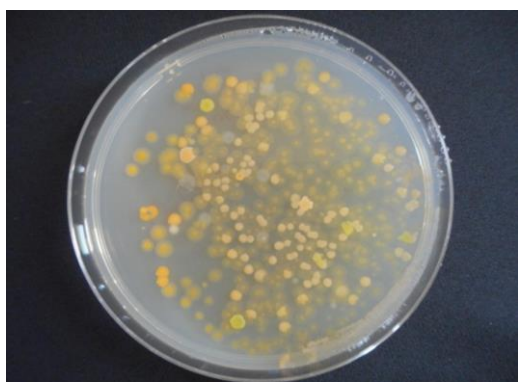
แปลงอ้อยปลูก/BHI/F3/กค/อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น



แปลงอ้อยปลูก/TSA/F1/กค/อ.เมือง จ.ขอนแก่น



แปลงอ้อยปลูก/BHI/F3/กค/อ.เมือง จ.ขอนแก่น



แปลงอ้อยต่อ/NA/F3/กค/อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น



แปลงอ้อยต่อ/BHI/F2/กค/อ.เมือง จ.ขอนแก่น

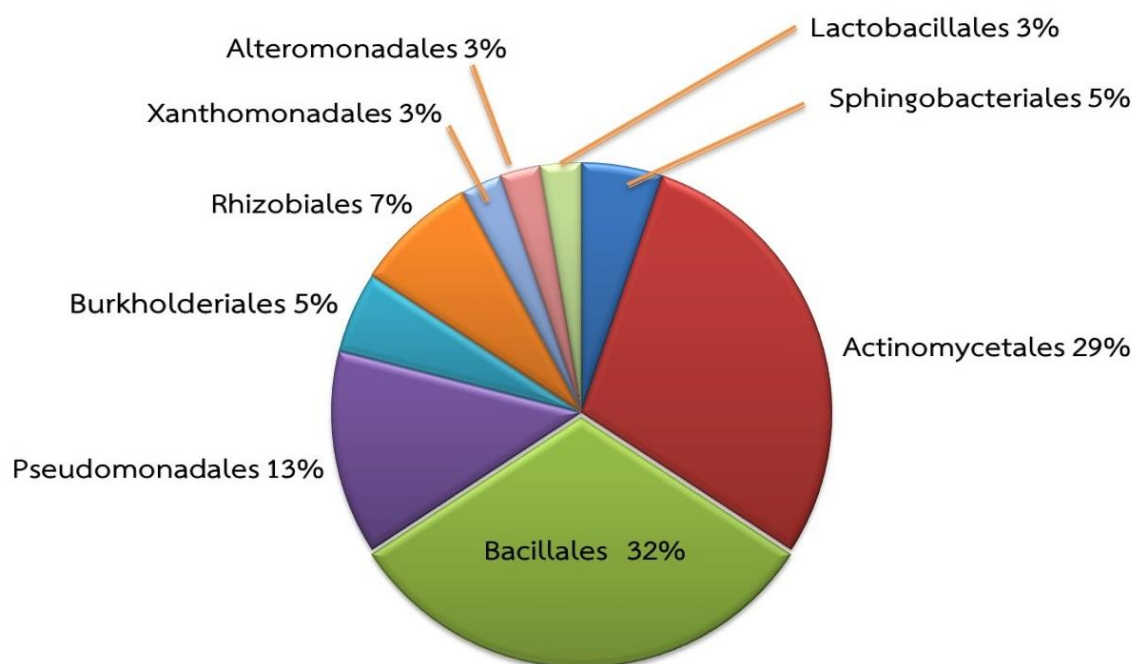
ภาพที่ 3 ตัวอย่างของลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากแมลงพาหะ *M. hioglyphicus*

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวและเพศของแมลง *M.hiroglyphicus* ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรีย จำนวนตัวของแมลงที่สามารถแยกเชื้อได้ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อนำไปจำแนกชนิด

พื้นที่	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เพศแมลง	จำนวนแมลงที่ใช้/แมลงที่มีโคโลนี แบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ที่นำไปวิเคราะห์
อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น	NA	เมีย	10/10	14
		ผู้	10/0	0
	TSA	เมีย	10/9	10
		ผู้	10/0	0
	BHI	เมีย	10/10	14
		ผู้	10/0	0
อ. เมือง จ. ขอนแก่น	NA	เมีย	8/6	10
		ผู้	10/0	0
	TSA	เมีย	8/7	16
		ผู้	10/1	1
	BHI	เมีย	8/8	13
		ผู้	10/0	0
อ. กุมภาวปี จ. อุดรธานี	NA	เมีย	10/8	14
		ผู้	10/0	0
	TSA	เมีย	10/7	12
		ผู้	10/0	0
	BHI	เมีย	10/7	14
		ผู้	10/0	0

1.2 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกจากเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16 rDNA

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16 rDNA ผลการศึกษาพบว่าพื้นที่ อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น ผลการจำแนกชนิดทั้งหมด 38 โคโลนี พบแบคทีเรีย 9 อันดับ 17 สกุล จำนวน 27 ชนิด โดยพบแบคทีเรียในอันดับ Bacillales มากที่สุด รองลงมาคือ Actinomycetales และ Pseudomonadales (ภาพที่ 4) ในแต่ละอันดับพบชนิดของแบคทีเรียและจำนวนโคโลนีที่นำมาวิเคราะห์ ดังที่แสดงในตารางที่ 2 แบคทีเรียที่จัดอยู่ในอันดับ Bacillales พบมากที่สุด คิดเป็นอัตราส่วน 32% ของแบคทีเรียทั้งหมด มี 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis* และ *B. firmus* ส่วนในอันดับ Actinomycetales พบชนิดของแบคทีเรียมากเป็นอันดับสอง คิดเป็นสัดส่วน 29% ของแบคทีเรียทั้งหมด ชนิดที่พบได้แก่ ได้แก่ *Microbacterium testaceum*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brachybacterium saurashtrense*, *Tsukamurella inchonensis*, *M. arabinogalactanolyticum*, *Tsukamurella paurometabola*, *A. phenanthrenivorans*, และ *A. niigatensis* เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียในอันดับอื่นๆ ได้แก่ Pseudomonadales, Rhizobiales, Burkholderiales, Sphingobacteriales, Xanthomonadales, Alteromonadales และ Lactobacillales

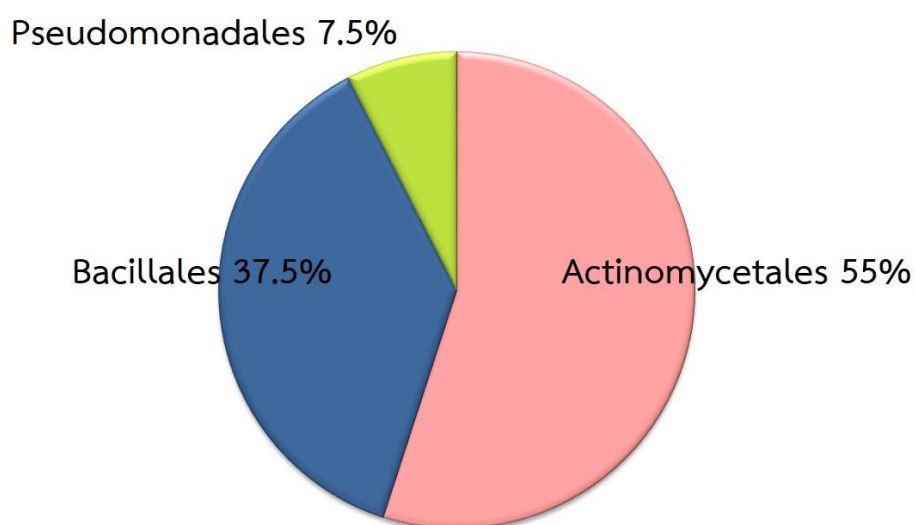


ภาพที่ 4 การจัดจำแนกอันดับของแบคทีเรียที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก พื้นที่ อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น

ตารางที่ 2 ผลการจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกออกมา
เพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก พื้นที่ อ.เขาสวนกวาง จ.
ขอนแก่น

อันดับของแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย (จำนวนโคโลนีที่นำมาวิเคราะห์)	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล
Bacillales	<i>Bacillus cereus</i> (5)	97.5
	<i>Bacillus licheniformis</i> (2)	98
	<i>Bacillus subtilis</i> (2)	99
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (2)	97
	<i>Bacillus firmus</i> (1)	98
Actinomycetales	<i>Microbacterium testaceum</i> (2)	99
	<i>Arthrobacter woluwensis</i> (2)	98
	<i>Brachybacterium saurashtrense</i> (2)	98
	<i>Tsukamurella inchoensis</i> (1)	99
	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> (1)	96
	<i>Tsukamurella paurometabola</i> (1)	97
	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> (1)	96
	<i>Arthrobacter niigatensis</i> (1)	97
Pseudomonadales	<i>Acinetobacter pittii</i> (2)	97
	<i>Acinetobacter soli</i> (1)	98
	<i>Acinetobacter junii</i> (1)	98
	<i>Pseudomonas denitrificans</i> (1)	97
Rhizobiales	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (1)	97
	<i>Ochrobactrum cytisi</i> (1)	99
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (1)	97
Burkholderiales	<i>Achromobacter marplatensis</i> (1)	98
	<i>Achromobacter insolitus</i> (1)	98
Sphingobacteriales	<i>Sphingobacterium detergens</i> (1)	98
	<i>Olivibacter jilunii</i> (1)	97
Xanthomonadales	<i>Oceanimonas doudoroffii</i> (1)	98
Alteromonadales	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> (1)	97
Lactobacillales	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (1)	96

ส่วนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นที่เก็บตัวอย่างมาจาก อ.กุมภวาปี จ. อุตรธานี ผลการวิเคราะห์จากจำนวนแบคทีเรีย 40 โคโลนี พบแบคทีเรีย 3 อันดับ 10 สกุล 17 ชนิด (ภาพที่ 5) อันดับที่พบมากที่สุด คือ Actinomycetales คิดเป็นสัดส่วน 55% ของแบคทีเรียที่พบทั้งหมด โดยพบว่ามีแบคทีเรีย 10 ชนิด เช่น *A. nicotianae*, *Brachybacterium saurashtrense*, *M. testaceum* อันดับ Bacillales พบมากเป็นอันดับสองรองลงมา คิดเป็นสัดส่วน 37.5% แบคทีเรียที่พบ 7 ชนิด เช่น *B. licheniformis*, *B. endophyticus*, *B. megaterium* และ อันดับ Pseudomonadales พบแบคทีเรีย 1 ชนิด คือ *Acinetobacter junii* โดยชนิดของแบคทีเรียที่พบทั้งหมดและจำนวนโคโลนีที่นำไปวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3

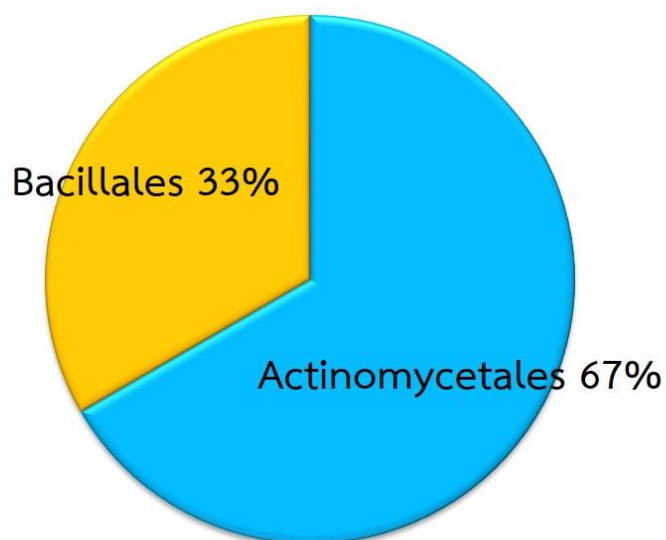


ภาพที่ 5 การจัดจำแนกอันดับของแบคทีเรียที่แยกออกมาเฉพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก พื้นที่ อ.กุมภวาปี จ. อุตรธานี

ตารางที่ 3 ผลการจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกออกมา
เพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก พื้นที่ อ.กุ่มกาว จ. อุตรธานี

อันดับของแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย (จำนวนโคโลนีที่นำมาวิเคราะห์)	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล
Actinomycetale	<i>Arthrobacter nicotianae</i> (8)	98
	<i>Brachybacterium saurashtrense</i> (4)	97
	<i>Microbacterium testaceum</i> (3)	99
	<i>Microbacterium insulae</i> (1)	99
	<i>Rhodococcus triatoma</i> (1)	99
	<i>Mycobacterium mageritense</i> (1)	97
	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i> (1)	98
	<i>Brevibacterium epidermidis</i> (1)	96
	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> (1)	96
	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i> (1)	97
Bacillale	<i>Bacillus licheniformis</i> (8)	96.5
	<i>Bacillus endophyticus</i> (2)	96
	<i>Bacillus megaterium</i> (1)	98
	<i>Bacillus cereus</i> (1)	99
	<i>Bacillus subtilis</i> (1)	99
	<i>Bacillus safensis</i> (1)	90
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (1)	95
Pseudomonadales	<i>Acinetobacter junii</i> (3)	96.5

สำหรับเพลี้ยจักจั่นที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ อ. เมือง จ. ขอนแก่น จากการวิเคราะห์แบคทีเรียจำนวน 40 โคโลนี พบแบคทีเรีย 2 อันดับ 7 สกุล 15 ชนิด (ภาพที่ 6) คือในแบคทีเรียอันดับ Actinomycetale พบมากเป็น 67% มีแบคทีเรีย 10 ชนิด เช่น *M. testaceum*, *A. phenanthrenivorans*, *A. ureafaciens*, *Tsukamurella pulmonis* และอันดับ Bacillales พบแบคทีเรีย 5 ชนิด เช่น *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* (ตารางที่ 4)



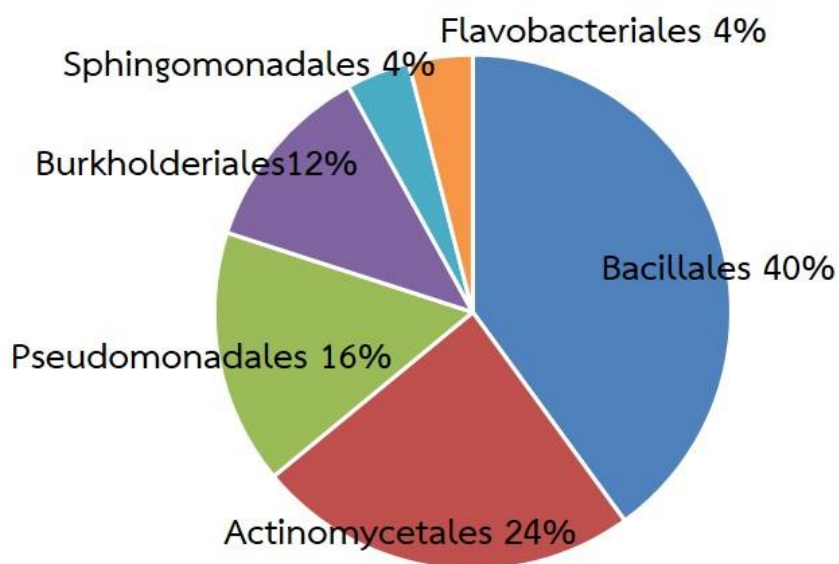
ภาพที่ 6 การจัดจำแนกอันดับของแบคทีเรียที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก พื้นที่ อ. เมือง จ. ขอนแก่น

ตารางที่ 4 ผลการจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก พื้นที่ อ. เมือง จ. ขอนแก่น

อันดับของแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย (จำนวนโคลนที่นำมาวิเคราะห์)	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล
Actinomycetale	<i>Microbacterium testaceum</i> (11)	98
	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> (4)	99
	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> (2)	97
	<i>Tsukamurella pulmonis</i> (2)	97
	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> (2)	98
	<i>Microbacterium arthrosphaerae</i> (1)	98
	<i>Arthrobacter woluwensis</i> (1)	97
	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (1)	96
	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i> (1)	96
	<i>Curtobacterium luteum</i> (1)	97
Bacillale	<i>Bacillus cereus</i> (8)	99
	<i>Bacillus megaterium</i> (2)	98
	<i>Bacillus subtilis</i> (1)	99
	<i>Bacillus licheniformis</i> (1)	99
	<i>Bacillus drentensis</i> (1)	97

1.3 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกจากเพลี้ยจักจั่น *Y.flavovittatus* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16 rRNA

การคัดแยกแบคทีเรียจากแมลงพาหะพื้นที่จังหวัดขอนแก่น จากแมลงทั้งหมด 60 ตัว คัดเลือกตัวอย่างโคโลนีที่เพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงพาหะคัดเลือกได้จำนวน 25 โคโลนี พบว่าเป็นโคโลนีที่เจริญบนอาหารจาก BHI TSA NA เป็น 6 5 และ 14 โคโลนี ตามลำดับจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแมลงเพลี้ยและเพลี้ยมีปริมาณไม่แตกต่างกัน ซึ่งมีความแตกต่างจากการทดลองการคัดแยกแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลที่พบว่า ไม่มีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเมื่อคัดแยกแบคทีเรียจากแมลงเพลี้ยมาเพาะเลี้ยง เมื่อนำแบคทีเรียไปสกัดดีเอ็นเอและจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียจาก 6 อันดับ 12 สกุล 20 ชนิด (ภาพที่ 7) อันดับ Bacillales พบมากที่สุดคิดเป็น 40 % (10 species) ชนิดที่พบ เช่น *B. megaterium*, *S. sciuri*, *S.epidermidis*, *B. thuringiensis* และ *B. subtilis* เป็นต้น รองลงมาคือแบคทีเรียที่อยู่ในอันดับ Actinomycetales (6 species) ชนิดที่พบ เช่น *A. Woluwensis*, *Leifsonia lichenia*, *Curtobacterium herbarum* เป็นต้น และแบคทีเรียที่พบในอันดับอื่นๆ ได้แก่ Pseudomonadales (4 species) Burkholderiales (3 species) Sphingobacteriales (1 species) Flavobacteriales (1 species) (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 7 การจัดจำแนกอันดับของแบคทีเรียที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงจากเพลี้ยจักจั่น *Y.flavovittatus* ที่เก็บตัวอย่างจาก พื้นที่ อ.เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนขงยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* จากจังหวัดขอนแก่นกับฐานข้อมูล NCBI

อันดับของแบคทีเรีย	ชนิดของแบคทีเรีย (จำนวนโคลนที่นำมาวิเคราะห์)	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล
Bacillales	<i>Bacillus megaterium</i> (2)	99
	<i>Staphylococcus sciuri</i> (2)	99
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (2)	98
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (1)	99
	<i>Bacillus subtilis</i> (1)	99
	<i>Bacillus subterraneus</i> (1)	99
	<i>Staphylococcus cohnii</i> (1)	99
Actinomycetales	<i>Arthrobacter woluwensis</i> (2)	92.5
	<i>Leifsonia lichenia</i> (1)	98
	<i>Leifsonia soli</i> (1)	98
	<i>Curtobacterium herbarum</i> (1)	97
	<i>Cellulosimicrobium terreum</i> (1)	97
Pseudomonadales	<i>Moraxella osloensis</i> (2)	98.5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	99
	<i>Pseudomonas entomophila</i> (1)	96
Burkholderiales	<i>Massilia haematophila</i> (1)	99
	<i>Burkholderia plantarii</i> (1)	98
	<i>Massilia lutea</i> (1)	97
Sphingomonadales	<i>Novosphingobium soli</i> (1)	98
Flavobacteriales	<i>Chryseobacterium rhizoplanae</i> (1)	97

1.4 การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้เพื่อนำไปศึกษาการแพร่กระจายตัวและบทบาทของแบคทีเรียกับเพลี้ยจักจั่น

เมื่อศึกษาในภาพรวมของชนิดของแบคทีเรียที่พบทั้งหมดจากตัวอย่างแมลงพาหะ *M.hiroglyphicus* ที่เก็บจากทั้งสามแปลงทดลอง และแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น พบว่าแบคทีเรีย 2 อันดับที่พบมาก คือ อันดับ Actinomycetale และ Bacillale และจากข้อมูลชนิดของแบคทีเรียที่จำแนกนี้กับข้อมูลที่มีรายงาน พบว่าเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในสภาพแวดล้อม จึงได้มีการจัดกลุ่มแบคทีเรียที่พบจากการศึกษาทดลองนี้เป็น 3 กลุ่มคือ

1) แบคทีเรียที่เป็นเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรค เช่น

- *M. testaceum* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในพืชไร่ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ถั่วเหลือง โดยที่ไม่ได้ก่อให้เกิดโรค (Zinniel et al. 2002)

- แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp ที่พบจากการทดลองนี้ เช่น *B. licheniformis*, *B.endophyticus*, *B.subtilis* และ *B. megaterium* มีรายงานว่าพบในดินบริเวณรากพืช และพบในพืช โดยเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (plant growth-promoting rhizobacteria or PGPR) (Garcia et al. 2004) (Beneduzi et al. 2012)

- *C. luteum* เป็นแบคทีเรียที่พบในอ้อย (Mangani et al. 2010)

2) แบคทีเรียที่พบในแมลงและบางชนิดก่อให้เกิดโรค เช่น

- *B. subtilis* และ *B. licheniformis* พบว่าคัดแยกได้จากแมลงหริ่งขาว และเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงชนิดนี้ (Ateyyat et al., 2009)

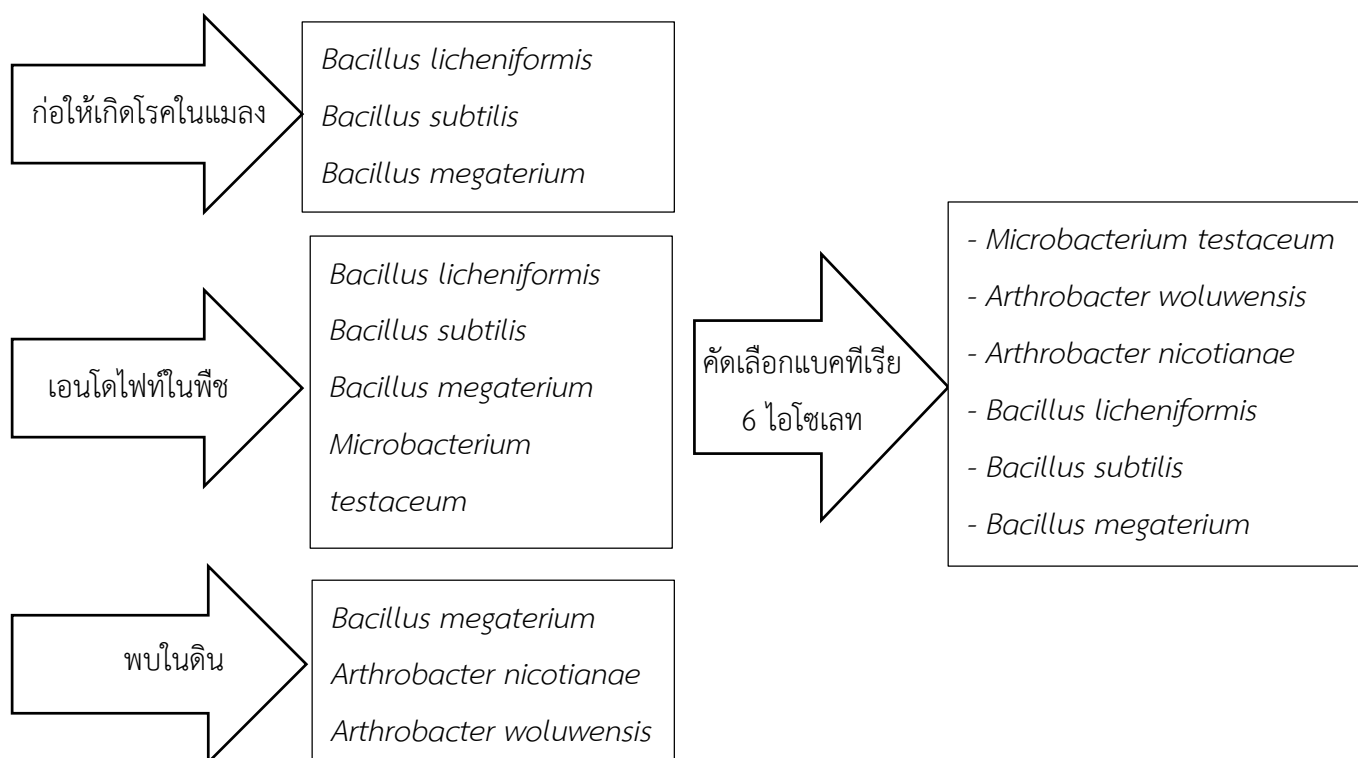
3) แบคทีเรียกลุ่มที่พบอาศัยอยู่ในดิน เช่น *Bacillus* sp., *A. nicotianae*, *A.*

phenanthrenivorans, *B.subtilis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *Acinetobacter soli* และ *Lysinibacillus fusiformis* เป็นต้น

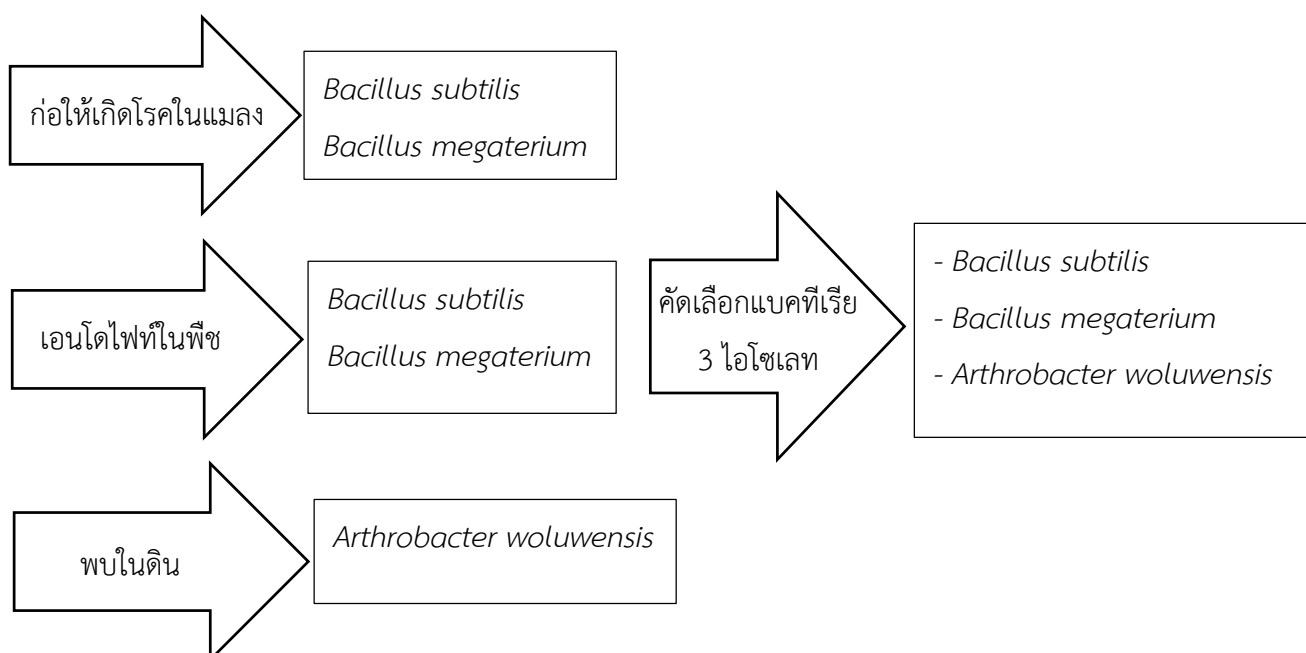
ดังนั้นในการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่คาดว่าจะมีศักยภาพนำมาควบคุมแมลงพาหะ จึงคัดเลือกจากแบคทีเรียที่มีรายงานว่าพบในแมลงและสามารถก่อให้เกิดโรค เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืช โดยที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เพราะการที่แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืชเป็นแหล่งอาหารของแมลงนั้น จะทำให้แบคทีเรีย เข้าสู่ตัวแมลงได้ และเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานว่าพบในดิน ซึ่งเป็นแหล่งของสภาพแวดล้อมที่มีความสัมพันธ์ กัน ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับแมลงโดยสามารถก่อให้เกิดโรค และในการศึกษาถึงศักยภาพของแบคทีเรียนั้น ได้มีการศึกษาถึงการแพร่กระจายตัวของแบคทีเรียชนิดที่คัดเลือกในประชากรในธรรมชาติของแมลงพาหะทั้งในตัว เต็มวัย ระยะไข่ และตัวอ่อน และการตรวจหาแบคทีเรียเป้าหมายในอ้อยที่เป็นพืชอาหาร นอกจากนี้ยังทดสอบ การก่อให้เกิดโรคในแมลง และทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของแมลง

ในการศึกษารั้งนี้เนื่องจากว่าแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* จัดเป็นแมลงพาหะหลักของเชื้อไฟ โทพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว เนื่องจากมีปริมาณการแพร่ระบาดมากกว่าแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* และ พบมากในช่วงตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงที่อายุของต้นอ้อยประมาณ 1-3 เดือน จึงมีความ อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของแมลงและเชื้อโรคมมากกว่า ที่สำคัญคือแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* เป็นแหล่ง พาหะอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมาอีกด้วย ดังนั้นในการทดลองในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่การศึกษาในแมลงพาหะชนิด นี้มากกว่า โดยสรุปแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อสรุปดังภาพที่ 8

ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อสำหรับเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus*



ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อสำหรับเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*



ภาพที่ 8 สรุปการคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียเพื่อนำไปศึกษาต่อของเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* และ *Y.flavovittatus*

2. แนวทางความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียที่สามารถแยกเพาะเลี้ยงได้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเพลี้ยจักจั่นพาหะ

2.1 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus*

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกมาสามารถพบในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะหรือไม่ รวมทั้งตรวจสอบในระยะไข่และตัวอ่อนวัยต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกทุกชนิดสามารถตรวจพบในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างมาจากทั้ง 3 แปลงตัวอย่าง คือ แบคทีเรีย *M. testaceum* ตรวจพบในแมลงพาหะเพศเมียและเพศผู้ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกันตั้งแต่ 80-95% แบคทีเรีย *A. woluwensis* ตรวจพบในแมลงตั้งแต่ 90-100% แบคทีเรีย *A. nicotinae* ตรวจพบในแมลงพาหะในอัตราส่วนตั้งแต่ 80-100 % แบคทีเรีย *B. megaterium* ตรวจพบในแมลงพาหะในอัตราส่วนค่อนข้างต่ำ คือ 25-70% แบคทีเรีย และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ตรวจพบในแมลง 50-75% แบคทีเรีย *B. licheniformis* ตรวจพบในแมลงพาหะ 55-95% (ตารางที่ 6)

จากผลการตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายทั้ง 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกมานั้น สามารถตรวจพบในแมลงพาหะที่เก็บจากทั้ง 3 แปลงตัวอย่างและพบทั้งแมลงเพศผู้และเพศเมีย แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่ในแมลงธรรมชาติอยู่แล้ว ซึ่งในแมลงเพศผู้ไม่พบแบคทีเรียจากการแยกออกมาเพาะเลี้ยง แต่สามารถตรวจพบโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งจะสามารถตรวจพบแบคทีเรียได้ถึงแม้ว่ามีในปริมาณที่น้อยมาก

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกด้วยเทคนิค PCR ในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างๆ

ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือก	จำนวนแมลงที่ตรวจทั้งหมดและแมลงที่พบเชื้อ (เพศเมีย) , (เพศผู้)		
	อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น	อ. เมือง จ. ขอนแก่น	อ. กุมภวาปี จ. อุดรธานี
<i>Microbacterium testaceum</i>	(20/18) , (20/19)	(20/16), (20/17)	(20/20), (20/19)
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	(20/20), (20/20)	(20/18) , (20/19)	(20/19), (20/20)
<i>Arthrobacter nicotinae</i>	(20/20), (20/20)	(20/16), (20/18)	(20/20), (20/20)
<i>Bacillus megaterium</i>	(20/5), (20/14)	(20/14), (20/13)	(20/11), (20/12)
<i>Bacillus subtilis</i>	(20/10), (20/16)	(20/11), (20/10)	(20/15), (20/13)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(20/11), (20/13)	(20/14), (20/13)	(20/10), (20/19)

การตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกมาในระยะไข่และตัวอ่อนวัยต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า สามารถพบได้ในทุกระยะการเจริญตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อนทุกระยะ ตั้งแต่วัย 1 ถึง วัย 5 โดยสัดส่วนการตรวจพบแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในระยะการเจริญต่างๆเรียงตามลำดับตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1 ถึงวัย 5 ดังนี้ *M. testaceum* ตรวจพบ 90% 75% 65% 70% 75% และ 85% ตามลำดับ แบคทีเรีย *A. woluwensis* ตรวจพบ 90% 100% 100% 95% 90% และ 100% สัดส่วนของการตรวจพบแบคทีเรีย *A. nicotinae* คือ 100% 100% 95% 95% 100% และ 100% สัดส่วนของการตรวจพบแบคทีเรีย *B. megaterium* คือ 75% 65%

20% 60% 70% และ 60% แบคทีเรีย *B. subtilis* คือ 75% 80% 85% 85% 90% และ 90% แบคทีเรีย *B. licheniformis* ตรวจพบ 90% 50% 60% 70% 85% และ 85% ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากผลการตรวจสอบแบคทีเรียเป้าหมายทั้ง 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกกระยะการเจริญต่าง ๆ นั้น สามารถพบได้ทุกระยะการเจริญ คือตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อนทุกวัย แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวอาจมีการถ่ายทอดจากแมลงรุ่นหนึ่งไปอีกรุ่นหนึ่งโดยผ่านทางไข่ และสามารถอาศัยอยู่ได้ในตัวอ่อน หรือในระยะตัวอ่อน อาจได้มากจากการดูดกินแหล่งอาหาร ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาจมีความสัมพันธ์หรือมีบทบาทสำคัญอย่างใดอย่างหนึ่งแต่แมลงพาหะ เช่น เป็นแบคทีเรียก่อโรคในแมลง เป็นแบคทีเรียที่ให้ประโยชน์กับแมลง (เช่น การสังเคราะห์สารอาหาร) หรืออาจเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีความสัมพันธ์ใดๆกับแมลงพาหะเลย

โดยสัดส่วนการตรวจพบของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในระยะไข่และตัวอ่อนนั้นสอดคล้องกับสัดส่วนที่พบในแมลงพาหะตัวเต็มวัย เช่น แบคทีเรีย *A. nicotinae* ที่ตรวจพบในระยะตัวเต็มวัยในสัดส่วนที่ค่อนข้างมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ คือ พบ 80-100 % ในระยะไข่และตัวอ่อนพบในสัดส่วน 95-100%

ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกด้วยเทคนิค PCR ในระยะการเจริญต่างๆของแมลงพาหะ *M.hiroglyphicus*

ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือก	จำนวนแมลงในระยะการเจริญต่างๆ ที่ตรวจทั้งหมดและแมลงที่พบเชื้อ					
	ไข่	ตัวอ่อนวัย 1	ตัวอ่อนวัย 2	ตัวอ่อนวัย 3	ตัวอ่อนวัย 4	ตัวอ่อนวัย 5
<i>Microbacterium testaceum</i>	(20/18)	(20/15)	(20/13)	(20/14)	(20/15)	(20/17)
<i>Arthrobacter woluensis</i>	(20/18)	(20/20)	(20/20)	(20/19)	(20/18)	(20/20)
<i>Arthrobacter nicotinae</i>	(20/20)	(20/20)	(20/19)	(20/19)	(20/20)	(20/20)
<i>Bacillus megaterium</i>	(20/15)	(20/13)	(20/4)	(20/12)	(20/14)	(20/12)
<i>Bacillus subtilis</i>	(20/15)	(20/16)	(20/17) 85	(20/17)	(20/18)	(20/18)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(20/18)	(20/10)	(20/12)	(20/14)	(20/17)	(20/17)

2.2 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในแมลงพาหะ *Y. flavovittatus*

เนื่องจากปริมาณการแพร่ระบาดของแมลงพาหะชนิดนี้มีน้อยในธรรมชาติ จึงได้ทำการตรวจเฉพาะแมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น เท่านั้น ซึ่งผลการศึกษาพบว่าการตรวจสอบในแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* ในระยะตัวเต็มวัยนั้น แบคทีเรียที่คัดเลือก 3 ไอโซเลท คือ *A. woluensis*, *B. megaterium* และ *B. subtilis* ตามผลของการจำแนกแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *A. woluensis* พบในแมลงพาหะ 100% ทั้งในแมลงเพศเมียและเพศผู้ ตามลำดับ แบคทีเรีย *B. megaterium* พบ 85 และ 45% ส่วนแบคทีเรีย *B. subtilis* พบที่ 95 และ 65% ในเพศเมีย และเพศผู้ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกด้วยเทคนิค PCR ในประชากรธรรมชาติของแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น

ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือก	จำนวนแมลงที่ตรวจทั้งหมดและแมลงที่พบเชื้อ (เพศเมีย) , (เพศผู้)
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	(20/20) , (20/20)
<i>Bacillus megaterium</i>	(20/15) , (20/9)
<i>Bacillus subtilis</i>	(20/19) , (20/13)

ผลของการตรวจแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทในระยะไข่และตัวอ่อนของแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* โดยสัดส่วนการพบในระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1 ถึงวัย 5 เรียงตามลำดับดังนี้ *A. woluwensis* ตรวจพบ 100% 100% 95% 100% 100% และ 100% ตามลำดับ *B. megaterium* 85% 65% 50% 45% 60% และ 40% ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรีย *B. subtilis* พบ 100% 100% 100% 100% 100% 85% และ 75% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

เช่นเดียวกันกับเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* คือแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกนั้นสามารถตรวจพบได้ทั้งในระยะตัวเต็มวัย เพศผู้และเพศเมียและในระยะไข่ ตัวอ่อนทุกระยะ ของแมลงพาหะ *Y. flavovittatus*

ตารางที่ 9 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกด้วยเทคนิค PCR ในระยะการเจริญต่างๆของแมลงพาหะ *Y. flavovittatus*

ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือก	จำนวนแมลงในระยะการเจริญต่างๆ ที่ตรวจทั้งหมดและแมลงที่พบเชื้อ					
	ไข่	ตัวอ่อนวัย 1	ตัวอ่อนวัย 2	ตัวอ่อนวัย 3	ตัวอ่อนวัย 4	ตัวอ่อนวัย 5
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	(20/20)	(20/20)	(20/19)	(20/20)	(20/20)	(20/20)
<i>Bacillus megaterium</i>	(20/17)	(20/13)	(20/10)	(20/9)	(20/12)	(20/8)
<i>Bacillus subtilis</i>	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/17)	(20/15)

การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดเป้าหมายในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดเลือกมาสามารถพบในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหารหรือไม่ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าแมลงพาหะเมื่อเพลี้ยจักจั่นดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อย จะได้รับแบคทีเรียไปด้วย เพราะแบคทีเรียชนิดที่คัดเลือกนั้นมีรายงานว่า เป็นเอนโดไฟท์ในต้นพืชรวมทั้งอ้อยด้วย ดังนั้นจึงมีการตรวจแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ที่คัดเลือกมาด้วยเทคนิค PCR ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกทุกชนิดสามารถตรวจพบในตัวอย่างอ้อยที่เก็บมาจากทั้งสามแปลงทดลอง โดยสัดส่วนการตรวจพบ แบคทีเรีย *M. testaceum* ตรวจพบในตัวอย่างอ้อย 100% จากทั้งสามแปลงทดลอง เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *A. woluwensis* และแบคทีเรีย *B.*

subtilis แบคทีเรีย *A. nicotineae* ตรวจพบประมาณ 70-85% *B. megaterium* ตรวจพบประมาณ 40-85% และแบคทีเรีย *B. licheniformis* ตรวจพบในตัวอย่างอ้อยประมาณ 85-100% (ตารางที่ 10)

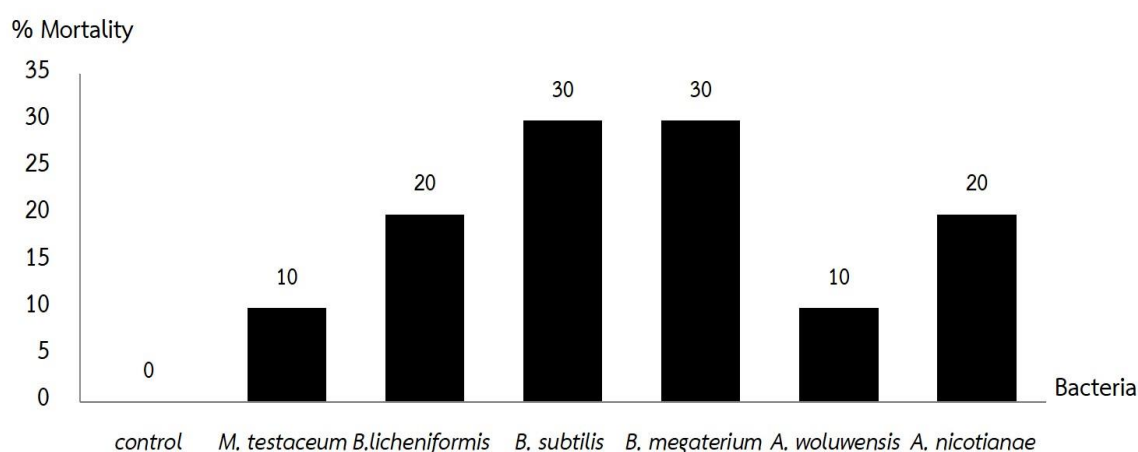
จากผลการศึกษาในส่วนนี้ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวอาศัยอยู่ในต้นอ้อย และมีความเป็นไปได้ว่าสามารถเข้าสู่ตัวแมลงได้โดยผ่านทาง การดูดกินอาหารของแมลง

ตารางที่ 10 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกด้วยเทคนิค PCR ในตัวอย่างต้นอ้อยจากสถานที่ต่างๆ

ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือก	จำนวนต้นอ้อยที่ตรวจทั้งหมดและอ้อยที่พบเชื้อ		
	อ. เขาสวนกวาง จ. ขอนแก่น	อ. เมือง จ. ขอนแก่น	อ. กุมภวาปี จ. อุดรธานี
<i>Microbacterium testaceum</i>	(30/30)	(30/30)	(30/30)
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	(30/30)	(30/30)	(30/30)
<i>Arthrobacter nicotineae</i>	(30/23)	(30/21)	(30/26)
<i>Bacillus megaterium</i>	(30/17)	(30/12)	(30/25)
<i>Bacillus subtilis</i>	(30/30)	(30/30)	(30/30)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(30/29)	(30/26)	(30/30)

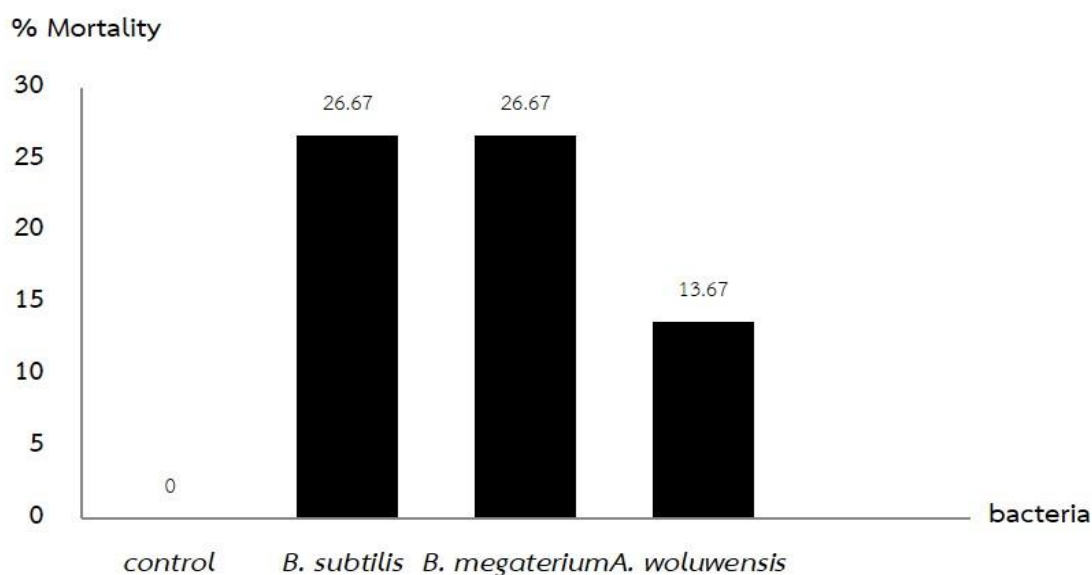
2.3 การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียในเพลี้ยจักจั่น

สำหรับผลการทดลองการก่อให้เกิดโรคในแมลงพาหะ *M.hroglyphicus* ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท ที่คัดเลือก พบว่าแบคทีเรีย *M. testaceum*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *A. woluwensis* และ *A. nicotineae* ทำให้แมลงตาย 10% 20% 30% 30% 10% และ 20% ตามลำดับ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยจักจั่น *M.hroglyphicus* หลังจากดูดกินแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับแมลงพาหะ *Y. flavovittatus* ได้มีการทดสอบการก่อให้เกิดโรคเช่นเดียวกัน แต่ไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดเลือก 3 ชนิด คือ *A. woluwensis*, *B. megaterium* และ *B. subtilis* พบว่าทำให้แมลงตาย 26.67% 26.67% และ 13.67% ตามลำดับ (ภาพที่ 13)

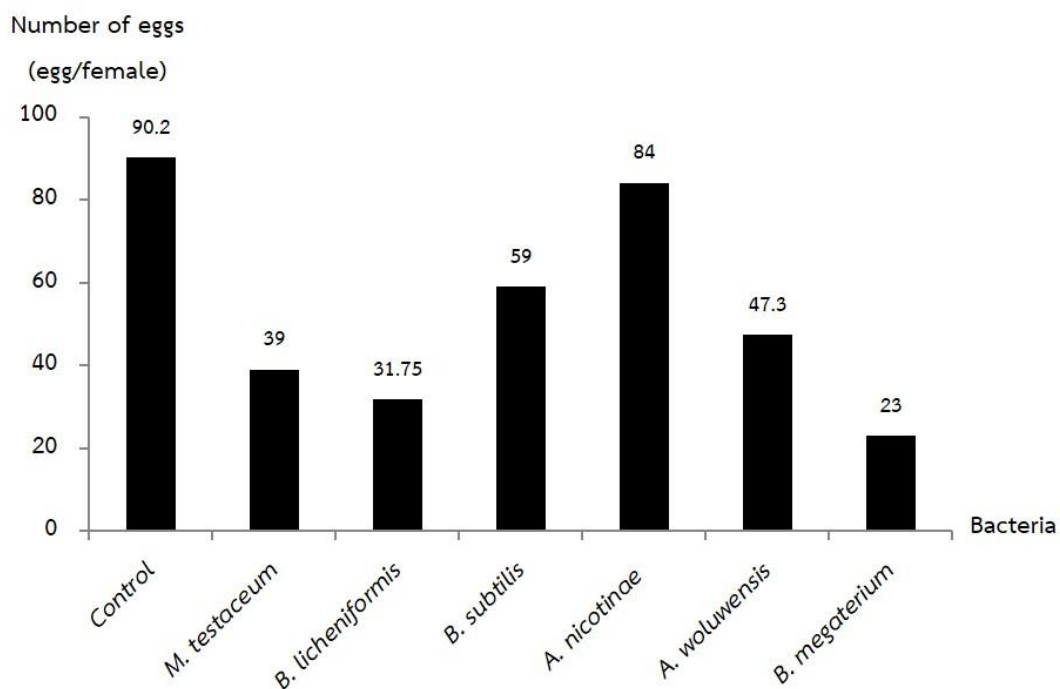


ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* หลังจากดูดกินแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน

2.4 การทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของเพลี้ยจักจั่น

นอกจากการก่อให้เกิดโรคในแมลงแล้ว สำหรับเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ซึ่งเป็นแมลงพาหะหลัก ได้มีการทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตราการวางไข่ของแมลงเพศเมีย โดยให้แมลงดูดกินแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท จับคู่ผสมพันธุ์และบันทึกจำนวนไข่ เปรียบเทียบกับแมลงที่ไม่ได้ดูดกินแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีผลทำให้อัตราการวางไข่เฉลี่ยของแมลงเพศเมียลดลง ดังนี้ จำนวนไข่เฉลี่ยต่อตัวเมื่อแมลงดูดกินเชื้อแบคทีเรีย *M. testaceum*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *A. nicotineae*, *A. woluwensis* และ *B. megaterium* คือ 39.0, 31.5, 59.0, 84.0, 47.3, และ 23.0 ฟอง ตามลำดับ ส่วนจำนวนไข่ของเพลี้ยจักจั่นกลุ่มที่ไม่ได้ดูดกินแบคทีเรียมีจำนวนไข่เฉลี่ย 90.2 ฟองต่อตัว

ดังนั้นจึงสรุปว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ มีผลทำให้จำนวนไข่เฉลี่ยของแมลงลดลงมากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ยกเว้นแบคทีเรีย *A. nicotineae* ที่มีจำนวนไข่เฉลี่ยต่อตัวใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม) (ภาพที่ 14)

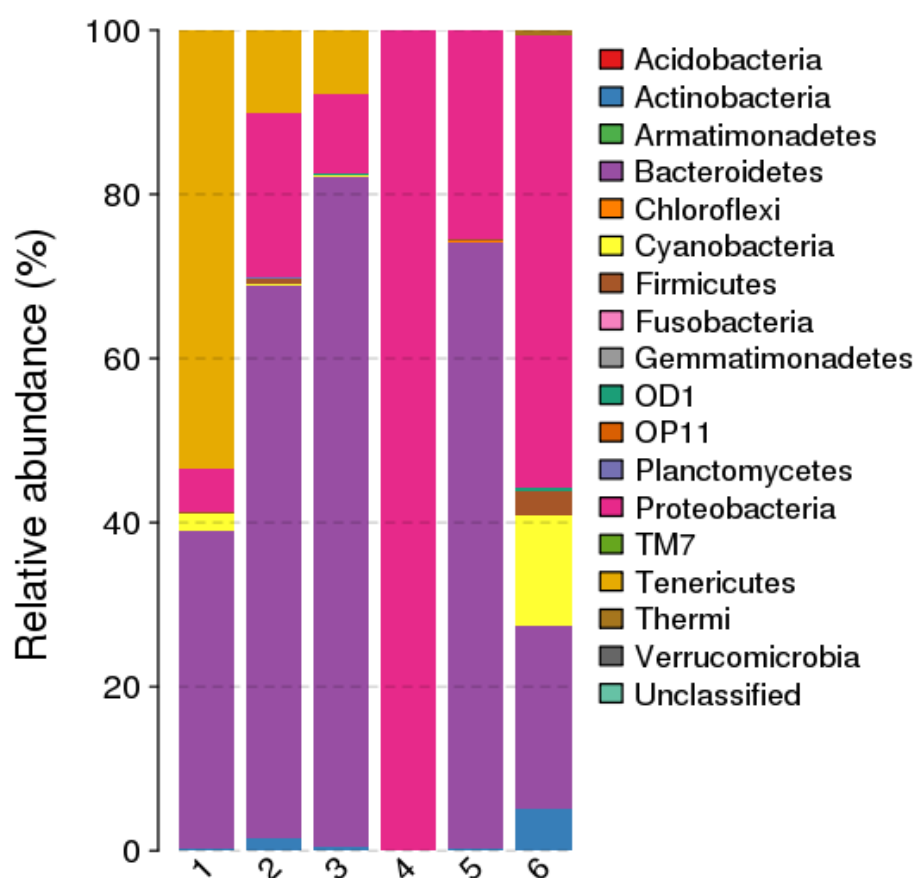


ภาพที่ 14 จำนวนไข่เฉลี่ยของเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* เมื่อดูตกินแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆที่ความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน แล้วจับคู่ผสมพันธุ์และเลี้ยงบนต้นอ้อยปกติ

3. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ด้วยวิธีการ Metagenomic analysis

การจำแนกความหลากหลายในระดับ Phylum

จากผลการวิเคราะห์ทั้ง 6 ตัวอย่างพบว่า ส่วนใหญ่แบคทีเรียที่พบจัดอยู่ใน phylum Bacteroidetes และ Proteobacteria ส่วนใน phylum อื่นๆที่พบ เช่น Tenericutes แต่พบเฉพาะในตัวอย่างที่ 1-3 Actinobacteria Cyanobacteria Firmicutes โดยพบในอัตราส่วนแตกต่างกันไป ซึ่งน้อยกว่า 1 % ถึง ประมาณ 15% ของจำนวน phylum ที่พบทั้งหมด (ภาพที่ 9) (ตารางที่ 11)



ภาพที่ 9 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (Relative abundance) ของแบคทีเรียในระดับ Phylum ที่จำแนกจากเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ตัวอย่างที่ 1- 6

ตารางที่ 11 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (Relative abundance) ของแบคทีเรียในระดับ Phylum ที่จำแนกจากเฟลียจักจั่น *M.hiroglyphicus*

Bacteria Phylum / ตัวอย่างที่	เปอร์เซ็นต์แต่ละของ phylum ของแบคทีเรียที่พบ					
	1	2	3	4	5	6
Bacteroidetes	38.8	67.4	81.8	0.1	73.9	22.2
Proteobacteria	5.2	20.1	9.8	99.9	25.3	55.2
Tenericutes	53.5	10.0	7.8	0.0	0.0	0.0
Acidobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Actinobacteria	0.2	1.5	0.4	0.0	0.3	5.1
Armatimonadetes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Chloroflexi	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
Cyanobacteria	2.1	0.3	0.2	0.0	0.1	13.5
Firmicutes	0.1	0.5	0.0	0.0	0.2	3.0
Fusobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gemmatimonadetes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OD1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2
OP11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Planctomycetes	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.1
TM7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Thermi	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6
Verrucomicrobia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
Unclassified	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

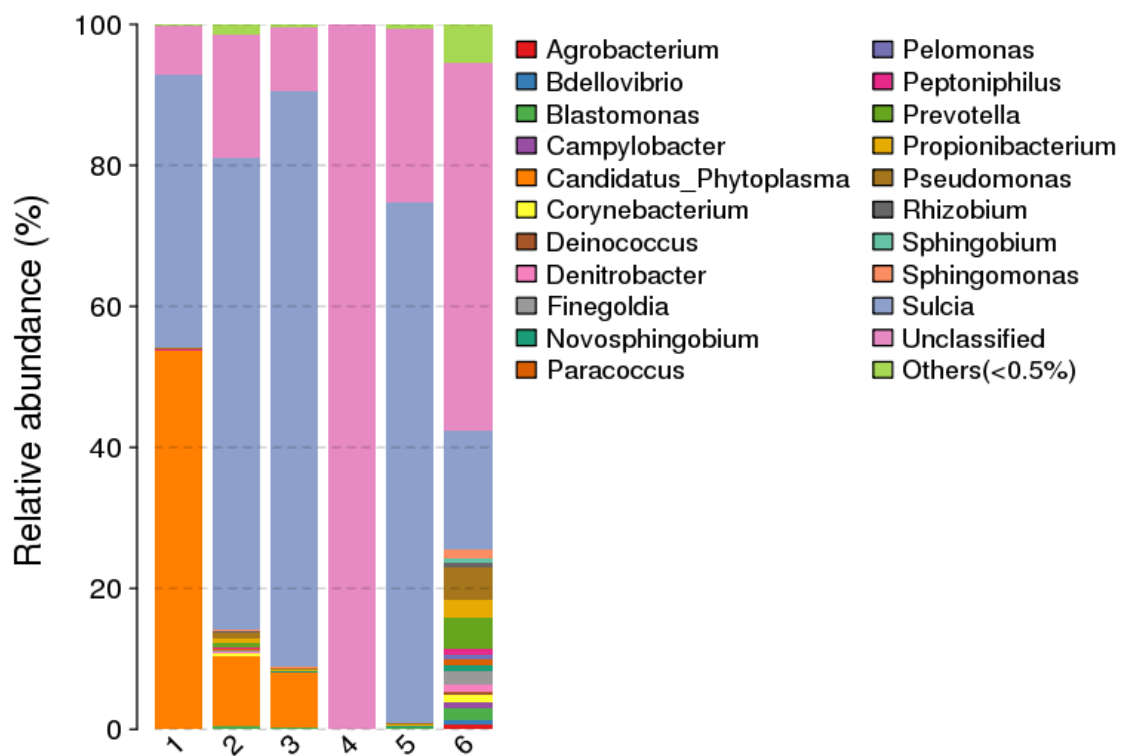
การจำแนกความหลากหลายในระดับสกุล (Genus) และชนิด (species)

เมื่อศึกษาผลของการจำแนกแบคทีเรียในระดับ สกุล (Genus) จากแมลงทั้ง 6 ตัวอย่าง พบแบคทีเรีย 22 genus ซึ่ง genus ที่พบในสัดส่วนที่ค่อนข้างมากในตัวอย่างส่วนใหญ่ คือแบคทีเรีย *Sulcia* โดยพบในอัตราส่วนประมาณ 15-80% คือในแมลงตัวที่ 1-6 พบในสัดส่วน 3.8% 66.7% 81.8% 0.1% 73.7% และ 16.8% ตามลำดับ (ภาพที่ 10) (ตารางที่ 11)

เช่นเดียวกับการจำแนกแบคทีเรียในระดับชนิด แบคทีเรียชนิด *Sulcia muelleri* พบในอัตราส่วนที่ค่อนข้างมากในแมลงส่วนใหญ่ คือ ในแมลงตัวที่ 1-6 พบในสัดส่วน 38.70% 66.75% 81.81% 0.07% 73.69% และ 16.80% ตามลำดับ (ภาพที่ 11) (ตารางที่ 12)

ซึ่งแบคทีเรีย *S. muelleri* นี้มีรายงานว่าแบคทีเรียประเภทปฐมภูมิ (primary endosymbiont) อาศัยอยู่ในส่วนแบคทีริโอม (Bacteriome) ของแมลงในวงศ์ (Family Cicadellidae) เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด โดยเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ทำหน้าที่สังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นให้กับแมลงอาศัย และพบว่าแบคทีเรีย *S. muelleri* นี้อาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งเสมอในแบคทีริโอม เช่น ในแบคทีริโอมของเพลี้ยกระโดด *Clastoptera arizonana* มีแบคทีเรีย *S. Muelleri* อาศัยอยู่กับแบคทีเรีย *Zinderia insetticola* ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดต่างก็ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นให้กับแมลงอาศัย เช่นเดียวกัน หรือในแบคทีริโอมของเพลี้ยจักจั่น *Homalodisca coagulata* มีแบคทีเรีย *S. Muelleri* และ *Baumannia cicadellincola* (McCutcheon et al. 2010) เช่นเดียวกับแมลงพาหะ *M.hiroglyphicus* ที่มีรายงานว่าในแบคทีริโอมมีแบคทีเรียสองชนิดอาศัยอยู่ คือ *S. Muelleri* และ BAMH (Bacterial Associated with *M.hiroglyphicus*) (Wangkeeree et al. 2012)

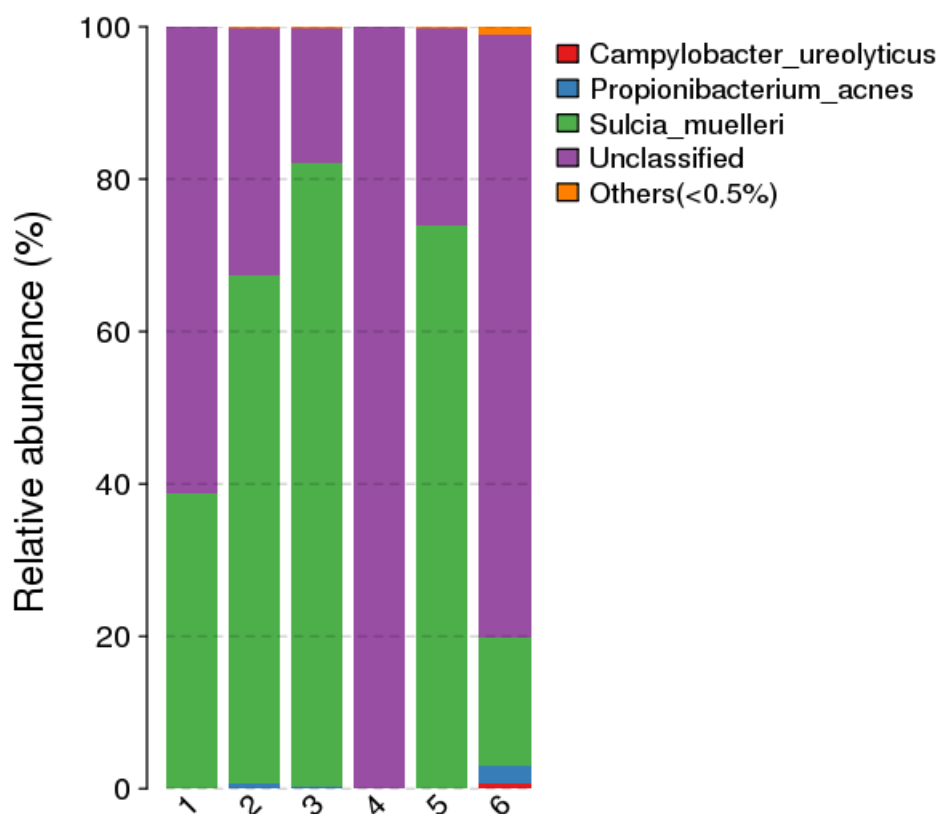
จากผลการศึกษาของ Metagenomic นี้ แบคทีเรียสกุลและชนิดที่พบมากรองลงมา คือ Unclassified พบในอัตราส่วน 7-99% คือตัวอย่างแมลงลำดับที่ 1-6 พบในสัดส่วน 6.8% 17.5% 9.1% 99.9% 24.6% และ 52.2% ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวจึงสรุปว่าแบคทีเรียที่เป็นกลุ่ม Unclassified เป็นแบคทีเรีย BAMH ที่อยู่ร่วมกับ *Sulcia* ในแบคทีริโอมของเพลี้ยจักจั่น ซึ่งได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้



ภาพที่ 10 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (Relative abundance) ของแบคทีเรียในระดับสกุล (Genus) ที่จำแนกจากเฟลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ตัวอย่างที่ 1- 6

ตารางที่ 12 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (Relative abundance) ของแบคทีเรียในระดับสกุล (Genus) ที่จำแนกจากเฟลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus*

Bacteria Phylum / ตัวอย่างที่	เปอร์เซ็นต์แต่ละของสกุล (Genus) ของแบคทีเรียที่พบ					
	1	2	3	4	5	6
Agrobacterium	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.7
Bdellovibrio	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.6
Blastomonas	0.1	0.3	0.2	0.0	0.2	1.7
Campylobacter	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
Candidatus_Phytoplasma	53.5	10.0	7.8	0.0	0.0	0.0
Corynebacterium	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	1.0
Deinococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6
Denitrobacter	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	1.1
Finegoldia	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	1.9
Novosphingobium	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.8
Paracoccus	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.8
Pelomonas	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.6
Peptoniphilus	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.7
Prevotella	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0	4.4
Propionibacterium	0.1	0.7	0.2	0.0	0.1	2.6
Pseudomonas	0.1	0.9	0.2	0.0	0.2	4.7
Rhizobium	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.6
Sphingobium	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6
Sphingomonas	0.0	0.3	0.1	0.0	0.1	1.3
Sulcia	38.7	66.7	81.8	0.1	73.7	16.8
Unclassified	6.8	17.5	9.1	99.9	24.6	52.2
Others (<0.5%)	0.3	1.5	0.3	0.0	0.7	5.4



ภาพที่ 11 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (Relative abundance) ของแบคทีเรียในระดับชนิด (Species) ที่จำแนกจากเฟลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* ตัวอย่างที่ 1- 6

ตารางที่ 12 สัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของความหลากหลาย (Relative abundance) ของแบคทีเรียในระดับสกุล (Genus) ที่จำแนกจากเฟลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus*

Bacteria Phylum / ตัวอย่างที่	เปอร์เซ็นต์แต่ละของชนิด (Species) ของแบคทีเรียที่พบ					
	1	2	3	4	5	6
Campylobacter_ureolyticus	0.02	0.03	0.00	0.00	0.01	0.78
Propionibacterium_acnes	0.07	0.69	0.24	0.00	0.14	2.28
Sulcia_muelleri	38.70	66.75	81.81	0.07	73.69	16.80
Unclassified	61.14	32.23	17.84	99.93	25.99	79.01
Others (<0.5%)	0.07	0.29	0.11	0.00	0.17	1.13

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลงานวิจัย

1.1 ชนิดของแบคทีเรียที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงจากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovitatus*

แมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น พบแบคทีเรียในอันดับ Bacillales มากที่สุด ชนิดที่พบเช่น *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus fusiformis* และ *B. firmus* รองลงมาคือ อันดับ Actinomycetale เช่น *Microbacterium testaceum*, *Arthrobacter woluwensis*, *Brachybacterium saurashtrense*, *Tsukamurella inchoensis* เป็นต้น แมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี อันดับที่พบมากที่สุด คือ Actinomycetales เช่น *A. nicotianae*, *Brachybacterium saurashtrense*, *M. testaceum* เป็นต้น และแบคทีเรียในอันดับ Bacillales พบมากเป็นอันดับสองรองลงมา เช่น *B. licheniformis*, *B. endophyticus* และ *B. megaterium* เป็นต้น และแมลงพาหะที่เก็บตัวอย่างจาก อ.เมือง อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น แบคทีเรียอันดับ Actinomycetale พบมากที่สุด เช่น *M. testaceum*, *A. phenanthrenivorans*, *A. ureafaciens*, *Tsukamurella pulmonis* และอันดับ Bacillales ชนิดแบคทีเรียที่พบ เช่น *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* เป็นต้น

เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovitatus* ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น แบคทีเรียที่พบมากคืออันดับ Bacillales เช่น *B. megaterium*, *Staphylococcus sciuri*, *S. epidermidis* เป็นต้น และอันดับ Actinomycetale ชนิดที่พบเช่น *A. woluwensis*, *Leifsonia lichenia* และ *L. lichenia* เป็นต้น

1.2 การกระจายตัวของแบคทีเรียที่คัดเลือกในประชากรของเพลี้ยจักจั่น

คัดเลือกแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท คือ *M. testaceum*, *A. woluwensis*, *A. nicotianae*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* เพื่อนำมาศึกษาถึงศักยภาพความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ควบคุมแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* การตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทในประชากรธรรมชาติของแมลง สามารถพบแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ทั้งแมลงเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งในระยะไข่ นอกจากนี้สามารถตรวจพบในต้นอ้อยที่เป็นพืชอาหาร

คัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovitatus* คือ *A. woluwensis*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* ซึ่งสามารถตรวจพบในประชากรแมลงในธรรมชาติทุกระยะการเจริญเช่นเดียวกัน

1.3 การก่อให้เกิดโรคและผลต่ออัตราการวางไข่

แบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกสามารถก่อให้เกิดโรคกับในเพลี้ยจักจั่นทั้งสองชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ที่ประมาณ 10-30% และแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ยกเว้น *A. nicotinae*) ผลทำให้อัตราการวางไข่เฉลี่ยของแมลงเพศเมียลดลงมากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

1.4 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในแมลงพาหะ *M.hiroglyphicus* ด้วยเทคนิค Metagenomic ananlysis

พบแบคทีเรีย phylum Bacteroidetes และ Proteobacteria ในอัตราส่วนที่ค่อนข้างมาก โดยพบแบคทีเรีย 2 ชนิดที่พบในอัตราส่วนที่มากในแมลงส่วนใหญ่ คือ *Sulcia muelleri* และ BAMH (Bacterial Associated with *M.hiroglyphicus*) ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภทปฐมภูมิ (Primary endosymbiont) ที่อยู่ในส่วนแบคทีริโอม (Bacteriome) ของเพลี้ยจักจั่น

ข้อเสนอแนะ

1. การคัดแยกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้และคัดเลือกชนิดที่คาดว่าจะมีศักยภาพนำมาควบคุมแมลงพาหะ หรือลดการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อย ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ถึงวิธีการที่เหมาะสมนำแบคทีเรียมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงพาหะ โดยผ่านทางการดูดกินท่อน้ำอาหารของแมลง
2. เนื่องจากชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงและได้คัดเลือกมานั้น บางส่วนจัดว่าเป็นเอนไฟท์ในพืช และบางชนิดมีรายงานว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ดังนั้นแนวทางของความเป็นไปได้ คือ เลือกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในต้นอ้อย ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช และส่งผลต่อแมลงพาหะ
3. แบคทีเรียที่คัดเลือก เช่น *Microbacterium testaceum* มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ดังนั้น ไอโซเลทที่คัดเลือกนี้ จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาศึกษาต่อถึงผลของแบคทีเรียกับเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อย หรือผลของแบคทีเรียต่อการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลงพาหะ

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มพัฒนาสื่อส่งเสริมเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร. แปลงพันธุ์สะอาด ป้องกันโรคใบขาวอ้อยโดยชุมชน. http://agri-media.com/home/news_detail/102. ค้นเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน 2558.
- แนล้ม มาศวรรณ และ สุพัตรา ดลโสมณ. 2551. “โรคใบขาวอ้อย การระบาดที่เรื้อรังและรุนแรง”. กสิกร. 81 (3): 45-54.
- ชุตินันท์ ชูสาย. 2541. การตรวจสอบและแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในอ้อยและแมลงพาหะโดยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. 500 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น. T&R CELECA PRODUCTS LTD., PART. 80 หน้า.
- พิสุทธิ์ เอกอำนวย. 2553. โรคและแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ. พิมพ์ครั้งที่ 3. เชียงใหม่สวนสัตว์แมลงสยาม. 591 หน้า.
- ยุพา หาญบุญทรง พิศาล ศิริธร และชุตินันท์ ชูสาย. 2547. การตรวจชนิดแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยและความสามารถในการถ่ายทอดโรคสู่อ้อย. สาขาวิชาชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ยุพา หาญบุญทรง. 2552. การศึกษาสภาพนิเวศวิทยา พฤติกรรม ประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคของแมลงพาหะชนิดใหม่นำโรคใบขาวอ้อยและแนวทางการป้องกันกำจัด. สาขาวิชาชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วรรณภา ฤทธิสนธิ. 2547. การตรวจสอบแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยและการถ่ายทอดโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2558. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยประจำปีการผลิต 2557/58.
- อนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2534. โครงการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อย จังหวัดอุดรธานี. เอกสารรายงานผลการป้องกันกำจัดโรคใบขาว. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทรายกระทรวงอุตสาหกรรม.
- 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 Molecular Biology. 6(2): 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 Journal of Biological Sciences. 3(2): 139 – 144.

- Bertaccini, A. and Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355–378.
- 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.
- Consolo, V. F., Mucci, V., Salerno, G. L. and Bero, C. M. 2010. Pathogenicity of bacterial isolates to *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*. 20(5): 475-482.
- Douglas AE. 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 64(4): 409–434.
- Erturk, O. and Demirbag, Z. 2006. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Biotechnology*. 5(22): 2081-2085.
- 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 Sciences*. 324: 923–928.
- Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S. and Damak, S. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*. 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. *Journal of Economic Entomology*. 99(5): 1531-1537.
- Harada, H. and Ishikawa, H. 1997. Experimental pathogenicity of *Erwinia aphidicola* to pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 43: 363-367.
- 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.
- Lauzon, C. R., Sjogren, R. E., Prokopy, R. J. 2000. Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: a postulated role in attraction. *Journal of Chemical Ecology*. 26: 953-967.
- Montllor, C. B., Maxmen, A. and Purcell, A. H. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomol*. 27: 189–195.

- 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(2): 397- 404.
- 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: 1367.
- Wangkeeree, J., Miller, T. A. and Hanboonsong, Y. 2012. Candidates for Symbiotic Control of Sugarcane White Leaf Disease. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(19): 6804.
- Weintraub, P. G. and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* . 51: 91–111.
- Wernegreen, J. J. 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*. 3(11): 850–861.