

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น
Yamatotettix flavovittatus พาหะนำโรคใบขาวอ้อย
Identification of the Bacterial Symbionts in
the Leafhopper *Yamatotettix flavovittatus*
the Vector of SCWL Disease

พนิดา เทวรักษ์ และจเรีมาศ วังคีรี*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ยุพา หาญบุญทรง

สาขาชีววิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Panida Tewaruxsa and Jureemart Wangkeeree*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

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

Yupa Hanboonsong

Entomology Division, Department of Plant Science and Agricultural Resources,

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

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Yamatotettix flavovittatus* (Matsumura) พาหะนำโรคใบขาวอ้อย เพื่อเป็นตัวเลือกในการใช้ควบคุมประชากรของแมลง ผลการศึกษาบริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย พบแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* 2 ชนิด คือ *Candidatus Sulcia muelleri* เป็นแบคทีเรียชนิดปฐมภูมิที่พบในส่วน bacteriome ของแมลงที่อยู่ในอันดับย่อย (suborder) Auchenorrhyncha ส่วนแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบจัดอยู่ใน class Gammaproteobacteria เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลมาก่อน จึงตั้งชื่อว่า “unknown bacteria in *Y. flavovittatus* (UBYF)” การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยทั้ง 2 ชนิด ในประชากรธรรมชาติของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ตรวจพบแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* และแบคทีเรีย UBYF ประมาณ 80-100 % และตรวจพบจากทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง นอกจากนี้สามารถตรวจพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ผล

*ผู้รับผิดชอบบทความ : jureemart@yahoo.com

การศึกษาดังกล่าวคาดว่าแบคทีเรีย UBYF อาจเป็นแบคทีเรียชนิดปฐมภูมิชนิดใหม่ที่อาศัยร่วมกับแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* ในส่วน bacteriome และมีบทบาทหรือความสัมพันธ์กับเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

คำสำคัญ : เพลี้ยจักจั่น; *Y. flavovittatus*; แบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดปฐมภูมิ; โรคใบขาวอ้อย

Abstract

The purpose of this study was to identify bacterial symbionts in the leafhopper *Yamatotettix flavovittatus* (Matsumura) vector SCWL disease for possible use in the insect population control. The result from 16S rRNA bacterial gene analysis was found two types of bacteria include *Candidatus Sulcia muelleri* which is primary symbiont that live in Bacteriome of suborder Auchenorrhyncha insect. Another type found belongs to *Gammaproteobacteria* which did not closely match with any sequences in the database and it was named “Unknown bacteria in *Y. flavovittatus* (UBYF)”. The *Ca. Sulcia muelleri* and UBYF are detected in natural population of the leafhopper at 80-100 % and found in all sampling sugarcane fields. Moreover, both of these bacteria found in all developmental stages including eggs, nymphs, and adults. We speculate UBYF is new type of primary symbiont that co-localize in Bacteriome with *Ca. Sulcia muelleri* and may be mutualistic relation with leafhopper *Y. flavovittatus*.

Keywords: leafhopper; *Y. flavovittatus*; primary symbiont; sugarcane white leaf disease

1. บทนำ

แบคทีเรียร่วมอาศัยในแมลง หมายถึง แบคทีเรียที่อยู่ภายในตัวแมลง สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยใช้ตำแหน่งที่อยู่อาศัย ความสัมพันธ์หรือบทบาทที่มีต่อแมลงอาศัย ได้แก่ (1) แบคทีเรียร่วมอาศัยปฐมภูมิ (primary symbiont) เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค มีความสัมพันธ์กับแมลงแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualism) และอาศัยอยู่ในส่วน bacteriome ของแมลง ซึ่งแมลงจำเป็นต้องใช้สารอาหารบางอย่างที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นมาในการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ เช่น แบคทีเรีย *Buchnera aphidicola* ในเพลี้ยอ่อนมีบทบาทในการช่วยสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็น [1] แบคทีเรีย *Wigglesworthia glossinidia* ในแมลงวันเซทซีมี

หน้าที่สังเคราะห์สารอาหารพวกวิตามินที่ไม่มีในเลือดที่แมลงดูดกิน [2] ดังนั้นถ้าแบคทีเรียชนิดนี้ถูกทำลายจะทำให้แมลงมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ นอกจากนี้เพลี้ยจักจั่นบางชนิดมีแบคทีเรียสองชนิดอาศัยอยู่และมีบทบาทต่างกัน เช่น เพลี้ยจักจั่น *Homalodisca coagulata* มีแบคทีเรีย *Candidatus Sulcia muelleri* ช่วยสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดที่จำเป็นและมีแบคทีเรีย *Baumannia cicadellinicola* ช่วยสังเคราะห์วิตามินบางชนิด [3] แบคทีเรียชนิดดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกได้ (vertical transmission) แต่ไม่สามารถแยกมาเพาะเลี้ยงนอกตัวแมลงได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยในแมลงเท่านั้น (2) แบคทีเรียร่วมอาศัยทุติยภูมิ (secondary symbiont) เป็นแบคทีเรียที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ

ของแมลง เช่น ทางเดินอาหาร ต่อมน้ำลาย รั้งไข่ ฯลฯ สามารถถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ไปยังรุ่นลูกได้หรือถ่ายโอนระหว่างแมลงต่างชนิดได้ (horizontal transmission) [4] บางชนิดอาจมีบทบาทเป็นโพรไบโอติกหรือเป็นประโยชน์กับแมลง เช่น แบคทีเรีย *Hamiltonella defensa* ในเพลี้ยอ่อนสามารถเพิ่มความต้านทานต่อแมลงเบียนได้ [5] และแบคทีเรีย *Serratia symbiotica* สามารถช่วยเพลี้ยอ่อนให้ปรับตัวได้เมื่ออยู่ในสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น [6] แบคทีเรีย *Enterobacter agglomerans* และ *Klebsiella oxytoca* จะอาศัยอยู่บริเวณทางเดินอาหารของแมลงวันผลไม้ *Rhagoletis pomonella* และมีบทบาทต่อการพัฒนางจรีวิต รวมถึงมีหน้าที่สร้างแหล่งไนโตรเจนให้แก่แมลง [7] นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอาศัยร่วมที่เป็นปรสิตทางการสืบพันธุ์หรือสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติทางการสืบพันธุ์ในแมลงอาศัยได้ เช่น แบคทีเรีย *Wolbachia*, *Spiroplasma* และ *Cardinium* ปัจจุบันมีการศึกษาการนำแบคทีเรียร่วมอาศัยมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรู โดยใช้ลักษณะความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่มีต่อแมลงอาศัยชนิดนั้น ๆ เรียกว่าวิธีการนี้ว่า symbiotic control เช่น การดัดแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียร่วมอาศัยเพื่อควบคุมการถ่ายทอดโรคของแมลงพาหะ โดยใช้แบคทีเรียที่สามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงได้ ขั้นตอน คือ คัดแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยออกมาเพาะเลี้ยง แล้วดัดแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค จากนั้นนำกลับเข้าสู่แมลงพาหะเพื่อให้ยีนนั้นแสดงออกอยู่ในตัวแมลงพาหะได้ [8] นอกจากนี้การกำจัดแบคทีเรียชนิดปฏิกิริยาจะส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของแมลง เนื่องจากแบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีความสัมพันธ์ในลักษณะที่ให้ประโยชน์ คือ ช่วยสังเคราะห์

กรดอะมิโนจำเป็นให้กับแมลงอาศัย ดังนั้นการศึกษาชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัยจึงมีความสำคัญ เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้ด้านความสัมพันธ์ของแบคทีเรียกับแมลงอาศัย และให้วิธีการดังกล่าวเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่น่ามาใช้ควบคุมแมลงศัตรู เพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Y. flavovittatus* เป็นหนึ่งในแมลงพาหะที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย โดยมีประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อ 45 % [9,10]

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* และศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA รวมถึงการตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยในประชากรธรรมชาติและการถ่ายทอดผ่านทางไข่ เพื่อเป็นองค์ความรู้สู่แนวทางการนำแบคทีเรียร่วมอาศัยไปใช้ในการควบคุมเพลี้ยจักจั่นพาหะนำโรคใบขาวอ้อยในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* จากแปลงอ้อยในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร และอำเภอโนนสะอาด จังหวัดอุดรธานี ในเขตภาคกลาง คือ อำเภอท่าหลวง จังหวัดลพบุรี และอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้กับดักแสงไฟและหลอดดูดแมลง จากนั้นเก็บรักษาในเอทานอล 99 % ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยนำเพลี้ยจักจั่นแต่ละตัวใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เติมน้ำละลายบัฟเฟอร์ (1M Tris pH 8.0, 0.5M EDTA, 1M NaCl, 10 % SDS, proteinase K 5mg/ml) และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดแมลง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอด้วย phenol:chloroform:

isoamyl alcohol ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3 M sodium acetate และ isopropanol ล้างตะกอน ดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 75 % และละลายดีเอ็นเอด้วย TE-RNase จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

2.2 การตรวจหาแบคทีเรียร่วมอาศัยปฐมภูมิในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ด้วยเทคนิค PCR การโคลนยีน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship)

ใช้ปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดปฐมภูมิในดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นที่เตรียมไว้ โดยใช้ไพรเมอร์ในส่วนของยีน 16S rRNA คือ 25F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1513R (5'-ACGGYTACCTT GTTACGACTT-3') สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาด 1,500 คู่เบส ปฏิกิริยา PCR ของ 16S rRNA universal bacteria มีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 µl ประกอบด้วย dNTPs 0.2 mM, primer ชนิดละ 0.3 µM, *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) 1U, 1x PCR buffer, MgCl₂ 2.5 mM, ดีเอ็นเอของแมลง 2 µl และเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 25 µl โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ initial denaturation 95 °C 5 นาที และ 30 รอบ denaturation 95 °C 1 นาที annealing 55 °C 1 นาที extension 72 °C 2 นาที และ final extension 72 °C 10 นาที [11] จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR จากแมลงเพศผู้ แมลงเพศเมีย และตัวอ่อนวัยที่ 5 อย่างละ 2 ตัวอย่างเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ โดยใช้ชุดของ TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) คัดเลือกโคลนจำนวน 10 โคลน/ตัวอย่าง นำมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป HiYield plasmid minikit (RBC Bioscience) เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 ในการตรวจสอบหา

ลำดับเบส นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีน 16S rRNA มาจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่พบในแมลงชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยเรียงเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW และวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA version 7 ด้วยวิธี neighbor-joining และใช้ Kimura 2 parameter model วิเคราะห์หาค่า bootstraps จำนวน 1,000 ซ้ำ

2.3 การตรวจหาแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ในธรรมชาติด้วยเทคนิค PCR

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลพบแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* โดยใช้ไพรเมอร์ 16S rRNA bacteroidetes คือ 10CFBFF (5'-AGAGTTTGATCA TGGCTCAGGATG-3') และ 1515R (5'-GTACGGCTA CCTTGTTACGACTTAG-3') ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาด 1,400 คู่เบส [12] แบคทีเรียอีกชนิดที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม Primer-Blast ของฐานข้อมูล NCBI โดยไพรเมอร์ คือ YFF (5'-GCGCAC GTAGGTGGTTAGAT-3') และ YFR (5'-ACTTCTGGT GCAACCCACTC-3') สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาด 862 คู่เบส สำหรับตรวจแบคทีเรีย UBYF การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR มีช่วงเวลาและอุณหภูมิปฏิกิริยาเช่นเดียวกับคู่ 16S rRNA universal bacteria ส่วนการตรวจสอบ UBYF จะเปลี่ยนอุณหภูมิช่วง annealing เป็น 60 °C

2.4 การตรวจสอบการถ่ายทอดผ่านทางไข่ของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

แบ่งแมลงส่วนหนึ่งเลี้ยงในกรงพลาสติกที่มีต้นอ้อย เลี้ยงให้ไ้ระยะไข่และระยะตัวอ่อนวัยที่ 1-5 อย่างละ 20 ตัวอย่าง จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างใน เอทานอล 99 % ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol: chloroform: isoamyl alcohol และใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหาแบคทีเรียร่วมอาศัย โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะในส่วนของยีน 16S rRNA ทั้ง 2 คู่ เช่นเดียวกับการตรวจสอบในเพลี้ยจักจั่นตัวเต็มวัย

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

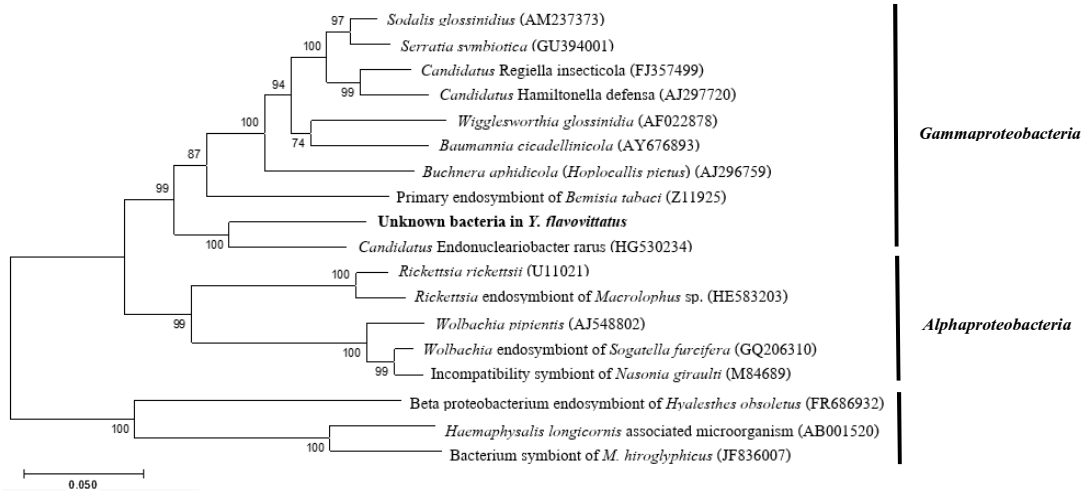
3.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* จำนวน 60

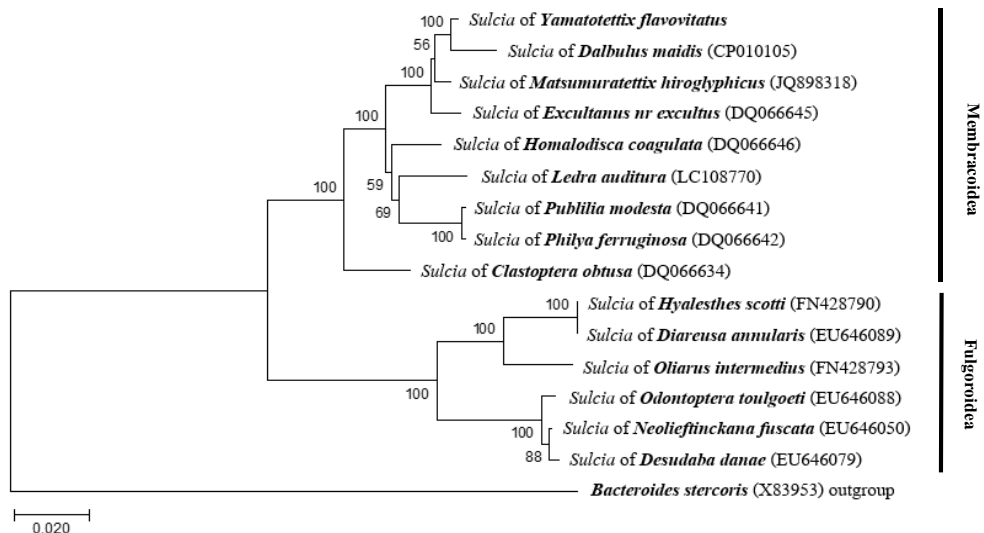
ตัวอย่าง กับฐานข้อมูล พบว่า 25 ตัวอย่าง จากเพศผู้ 11 ตัวอย่าง เพศเมีย 14 ตัวอย่าง มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 87 % กับแบคทีเรีย *Ca. Endonucleariobacter rarus* ที่พบในอะมีบา *Nuclearia* sp. ซึ่งมีค่าความเหมือนค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับชนิดของแบคทีเรียในฐานข้อมูล ดังนั้นแบคทีเรียที่พบน่าจะเป็นชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลมาก่อน ตั้งชื่อใหม่ว่า “Unknown bacteria in *Y. flavovittatus* (UBYF)” และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวไปจัดเรียงด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 99-100 % นอกจากนี้ 35 ตัวอย่าง จากเพศผู้ 9 ตัวอย่าง เพศเมีย 6 ตัวอย่าง และตัวอ่อนวัยที่ 5 จำนวน 20 ตัวอย่าง มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99 % กับแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* ที่พบในเพลี้ยจักจั่น *Dalbulus maidis* เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวไปจัดเรียงด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 99-100 % (ตารางที่ 1) จากการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับลำดับ

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจากเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* กับฐานข้อมูล NCBI

ตัวอย่าง	ชนิดของแบคทีเรียในฐานข้อมูล	จำนวนโคลนี	ค่าความเหมือน (%)
เพศผู้ 1	<i>Ca. Sulcia muelleri</i> strain ML (CP010105)	1	99
	<i>Ca. Endonucleariobacter rarus</i> (HG530234)	9	87
เพศผู้ 2	<i>Ca. Sulcia muelleri</i> strain ML (CP010105)	8	99
	<i>Ca. Endonucleariobacter rarus</i> (HG530234)	2	87
เพศเมีย 1	<i>Ca. Sulcia muelleri</i> strain ML (CP010105)	1	99
	<i>Ca. Endonucleariobacter rarus</i> (HG530234)	9	87
เพศเมีย 2	<i>Ca. Sulcia muelleri</i> strain ML (CP010105)	5	99
	<i>Ca. Endonucleariobacter rarus</i> (HG530234)	5	87
ตัวอ่อนวัย 5 1	<i>Ca. Sulcia muelleri</i> strain ML (CP010105)	10	99
ตัวอ่อนวัย 5 2	<i>Ca. Sulcia muelleri</i> strain ML (CP010105)	10	99



รูปที่ 1 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิด UBYF กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ใน class Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria และ Betaproteobacteria



รูปที่ 2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิด Ca. Sulcia muelleri ในเพลี้ยจักจั่น Y. flavovittatus กับแมลงชนิดอื่น ๆ โดยใช้ Bacteroides stercoris เป็น outgroup

นิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบว่า UBYF เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม class Gammaproteobacteria (รูปที่ 1) ส่วนแบคทีเรีย Ca. Sulcia muelleri

ในเพลี้ยจักจั่น Y. flavovittatus มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย Ca. Sulcia muelleri ที่อยู่ในเพลี้ยจักจั่น D. maidis โดยให้ค่า bootstraps เท่ากับ 100 % (รูปที่ 2)

แบคทีเรียชนิด *Ca. Sulcia muelleri* จัดเป็นแบคทีเรียชนิดปฐมภูมิที่อาศัยอยู่ในส่วนของโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า bacteriome พบได้ในแมลงที่อยู่ในอันดับย่อย Auchenorrhyncha โดยมีหน้าที่ในการสังเคราะห์สารอาหารหรือกรดอะมิโนจำเป็นให้กับแมลง [3,13] เนื่องจากแมลงกินของเหลวภายในท่อลำเลียงน้ำและอาหารของพืชเป็นหลัก คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ที่อยู่ในพืชจะอยู่ในรูปน้ำตาลซูโครสไม่มีไขมันและโปรตีน ซึ่งไขมันส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์ได้จาก คาร์โบไฮเดรต แต่โปรตีนไม่สามารถสังเคราะห์ได้ เพราะขาดสารตั้งต้นพวกกรดอะมิโนจำเป็น ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้จึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของแมลง [14] โดยปกติเพลี้ยจักจั่น (family cicadellidae) จะมีแบคทีเรีย 2 ชนิดอาศัยอยู่บริเวณ bacteriome และมีบทบาทต่อแมลงแตกต่างกัน เช่น บริเวณ Bacteriome ของเพลี้ยจักจั่น *Homalodisca coagulata* มีแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* ที่ช่วยสังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็นบางตัวให้แก่เพลี้ยจักจั่น และมีแบคทีเรีย *Baumannia cicadellinicola* ช่วยสังเคราะห์วิตามินบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต [10] จักจั่น *Diceroprocta semicincta* มีแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* ที่ช่วยสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็น และแบคทีเรีย *Ca. Hodgkinia cicadicola* ช่วยสังเคราะห์วิตามิน [15] ส่วนเพลี้ยกระโดด *Clastoptera arizonana* มีแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* และแบคทีเรีย *Ca. Zinderia insetticola* ที่ช่วยสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นให้แก่แมลง [13] นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบแบคทีเรียชนิดปฐมภูมิในเพลี้ยกระโดด *Hyalesthes obsoletus* คือ แบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* และแบคทีเรีย *Ca. Vidania fulgoroideae* [16] และเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* มีแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* และ BAMH (bacteria asso-

ciated with *M. hiroglyphicus*) อาศัยอยู่บริเวณ bacteriome แต่ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดต่อแมลงอาศัย [11] ดังนั้นแบคทีเรีย UBYF ที่พบจากการศึกษานี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรียปฐมภูมิชนิดใหม่ที่พบร่วมกับแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* ใน Bacteriome ของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

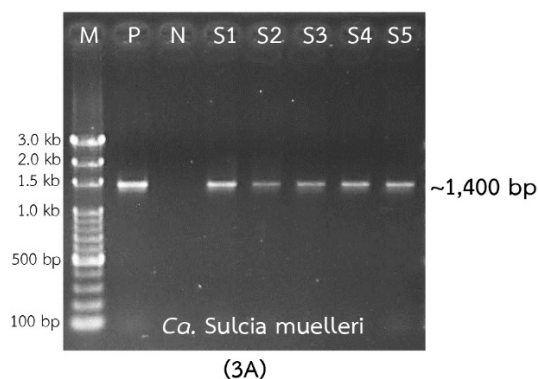
3.2 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยในประชากรธรรมชาติและระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

การตรวจหาแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะในส่วนของยีน 16S rRNA ในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ที่เก็บจากจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางด้วยเทคนิค PCR ผลจากการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis แสดงดังรูปที่ 3 พบว่าเพลี้ยจักจั่นเพศผู้และเพศเมียที่เก็บจากจังหวัดขอนแก่นและจังหวัดกาฬสินธุ์ ตรวจพบแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* และ UBYF สูงถึง 100 % ส่วนจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดลพบุรีตรวจพบแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* 92.5 % และ UBYF 85 % (ตารางที่ 2) เมื่อตรวจหาแบคทีเรียร่วมอาศัยในระยะไข่และตัวอ่อนแต่ละวัย พบว่าตรวจพบแบคทีเรีย *Ca. Sulcia muelleri* และ UBYF ในทุกระยะการเจริญเติบโตและมีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบ 90-100 % (ตารางที่ 3) แบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดปฐมภูมิจะมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของแมลงอาศัย เนื่องจากมีต้นกำเนิดและวิวัฒนาการร่วมกันมาอย่างยาวนาน นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่รุ่นลูกได้ โดยส่วนใหญ่จะเป็นการถ่ายทอดผ่านทางไข่ (trans-ovarial transmission) ดังนั้นแมลงที่พบแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดปฐมภูมิจะพบทุกระยะการเจริญเติบโตของแมลงตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัย [17]

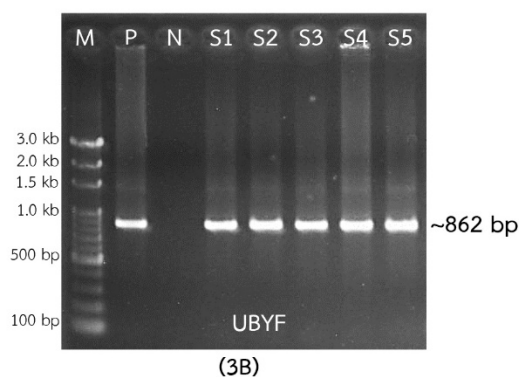
การตรวจหาแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดปฐมภูมิในประชากรธรรมชาติและระยะการเจริญเติบโต

ต่าง ๆ ของแมลงอาศัย ควรตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ 100 % เพราะแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภทนี้พบในส่วนของ bacteriome ซึ่งจะพบในแมลงทุก ๆ ตัว ถ้าเป็นแมลงชนิดที่มี bacteriome อยู่ การศึกษาแบคทีเรียชนิดดังกล่าวในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* พบว่ามี

บางพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างและระยะไข่ของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* มีการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ไม่ถึง 100 % ซึ่งอาจเกิดจากคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ เพราะเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* มีขนาดเล็ก โดยเฉพาะระยะไข่และตัวอ่อน



(3A)



(3B)

รูปที่ 3 ผลของการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหาแบคทีเรียร่วมอาศัย *Ca. Sulcia muelleri* (3A) และ UBYF (3B) (M: molecular size standards, P: positive control, N: negative control, S1-S5: sample)

ตารางที่ 2 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยในระยะตัวเต็มวัยของเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus*

พื้นที่	เพศ	จำนวน	จำนวนเพลี้ยจักจั่นที่ตรวจพบ (%)	
			16S rRNA <i>Ca. Sulcia muelleri</i>	16S rRNA UBYF
จังหวัดขอนแก่น	ผู้	20	20 (100)	20 (100)
	เมีย	20	20 (100)	20 (100)
จังหวัดอุดรธานี	ผู้	20	19 (95)	18 (90)
	เมีย	20	18 (90)	16 (80)
จังหวัดลพบุรี	ผู้	20	18 (90)	17 (85)
	เมีย	20	19 (95)	17 (85)
จังหวัดกาญจนบุรี	ผู้	20	20 (100)	20 (100)
	เมีย	20	20 (100)	20 (100)

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* พาหะนำโรคใบขาวอ้อย ตรวจพบ

แบคทีเรียที่ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลมาก่อน จึงตั้งชื่อว่า “Unknown bacteria in *Y. flavovittatus* (UBYF)” และพบ *Ca. Sulcia muelleri* ซึ่งมีรายงาน

ว่าจัดเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดปฐมภูมิที่อาศัยอยู่ในแมลงในอันดับย่อย Auchenorrhyncha มีหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็น แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดตรวจพบในประชากรธรรมชาติจากทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างและตรวจพบทุกระยะการเจริญเติบโต จึงมีความเป็นไปได้ว่า UBYF ที่พบใหม่นี้อาจเป็นแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดปฐมภูมิเช่นเดียวกับกับ *Ca. Sulcia*

muelleri อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของแหล่งอาศัยของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด นี้ในบริเวณ bacteriome รวมถึงศึกษาบทบาทของแบคทีเรียดังกล่าวต่อเพลี้ยจักจั่น ซึ่งอาจเป็นตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาและประยุกต์ใช้สำหรับควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยในอนาคต

ตารางที่ 3 การตรวจสอบแบคทีเรียร่วมอาศัยในเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ที่เก็บจากจังหวัดขอนแก่น ในระยะไข่และตัวอ่อนแต่ละวัย

ระยะ	จำนวน	จำนวนเพลี้ยจักจั่นที่ตรวจพบ (%)	
		16S rRNA <i>Ca. Sulcia muelleri</i>	16S rRNA UBYF
ไข่	20	18 (90)	18 (90)
ตัวอ่อนวัย 1	20	20 (100)	20 (100)
ตัวอ่อนวัย 2	20	20 (100)	20 (100)
ตัวอ่อนวัย 3	20	20 (100)	20 (100)
ตัวอ่อนวัย 4	20	20 (100)	20 (100)
ตัวอ่อนวัย 5	20	20 (100)	20 (100)

5. รายการอ้างอิง

- [1] Douglas, A.E., 1998, Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Bunchnera*, Annu. Rev. Entomol. 43: 17-37.
- [2] Aksoy, S., 1995, *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies, Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 848-851.
- [3] Wu, D., Daugherty, S.C., Van A.S.E., Pai, G.H., Dunbar, H.E. and Tran, P.L., 2006, Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooter, PLoS. Biol. 4: 1079-1086.
- [4] Dale, C. and Moran, N.A., 2006, Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts, Cell 126: 453-465.
- [5] 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.
- [6] Russell, J.A. and Moran, N.A., 2006, Costs and benefits of symbiont infection in

- aphids: Variation among symbionts and across temperatures, *Proc. R. Soc. B.* 273: 603-610.
- [7] Lauzon, C.R., Sjogren, R.E. and Prokopy, R.J., 2000, Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: A postulated role in attraction, *J. Chem. Ecol.* 26: 953-967.
- [8] Beard, C.B., Mason, P.W., Aksoy, S., Tesh, R.B. and Richards, F.F., 1992, Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 195-200.
- [9] Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S. and Damak, S., 2002, Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsamura), *Insect. Mol. Biol.* 11: 97-103.
- [10] วรณภา ฤทธิสนธิ์, 2547, การตรวจสอบแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- [11] Wangkeeree, J., Miller, T.A. and Hanboonsong, Y., 2012, Candidates for symbiotic control of sugarcane white leaf disease, *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6804-6811.
- [12] Moran, N.A., Tran, P. and Gerardo, N.M., 2005, Symbiosis and insect diversification: An ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum bacteroidetes, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8802-8810.
- [13] McCutcheon, J.P. and Moran, N.A., 2010, Functional convergence in reduced genomes of bacterial symbionts spanning 200 my of evolution, *Genome Biol. Evol.* 2: 708-718.
- [14] Noda, H., Watanabe, K., Kawai, S., Yukuhiro, F., Miyoshi, T. and Tomizawa, M., 2012, Bacteriome-associated endosymbionts of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae), *Appl. Entomol. Zool.* 47: 217-225.
- [15] McCutcheon, J.P., McDonald, B.R. and Moran, N.A., 2009, Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont, *PLoS Genet.* 5: 1-11.
- [16] Gonella, E., Negri, I., Marzorati, M., Sacchi, M.L., Pajoro, M. and Daffonchio, D., 2011, Bacterial endosymbiont localization in *Hyalesthes obsoletus*, the insect vector of bois noir in *Vitis vinifera*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1423-1435.
- [17] Baumann, P., 2005, Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insect, *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 155-189.