การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่น และการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Molecular Detection and Transmission of Sugarcane White Leaf Phytoplasma in Leafhoppers

ยุพา หาญบุญทรง (Yupa Hanboonsong)[1]
วรรณภา ฤทธิสนธิ์ (Wanapa Ritthison)[2]
ชุตินันท์ ชูสาย (Chutinan Choosai)[3]

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวเพลี้ยจักจั่นชนิดต่าง ๆ ที่เก็บมาจากแปลงปลูกอ้อย ในจังหวัดอุดรธานี ด้วยวิธีการ Nested PCR สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาดนิวคลีโอไทด์ 210 คู่เบส (base pair) ในเพลี้ยจักจั่น จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Exitianus indicus*, *Yamatotettix flavovittatus*, *Recilia* sp., *Recilia distinctus*, *Balclutha* sp., *Xestocephalus* sp., *Bhatia olivacea*, *Recilia dorsalis*, *Macrosteles striifrons*, *Thaia oryzivora* และ *Balclutha rubrostriata* เมื่อทำการทดสอบการเป็นแมลงพาหะและประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติโดยเพลี้ยจักจั่น จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus*, *E. indicus* และ *Y. flavovittatus* พบว่ามีเพียงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus* เป็นแมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ ส่วนเพลี้ยจักจั่น *E. indicus* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้ โดยเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ระยะเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมงที่ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและแสดงการถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นปกติได้ 10-55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ใช้เวลาดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากต้นอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่ระยะเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อตั้งแต่ 5-45 เปอร์เซ็นต์

Abstract

Leafhopper species in sugarcane fields at Udon Thani province were investigated for sugarcane white leaf phytoplasma using Nested PCR. A 210 base pair amplified DNA fragment of phytoplasma associated with sugarcane white leaf disease was detected from twelve species of leafhoppers (*Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Exitianus indicus*, *Yamatotettix flavovittatus*, *Recilia* sp., *Recilia distinctus*, *Balclutha* sp., *Xestocephalus* sp., *Bhatia olivacea*, *Recilia dorsalis*, *Macrosteles striifrons*, *Thaia oryzivora* and *Balclutha rubrostriata*). To determine the vectors status, the mechanism of disease transmission of phytoplasma from sugarcane white leaf plant to healthy plants was investigated by using three leafhoppers species (*M. hiroglyphicus*, *E. indicus* and *Y. flavovittatus*). The result showed that both leahoppers *M. hiroglyphicus* and *Y. flavovittatus*, but not *E. indicus*, can transmit sugarcane white leaf phytoplasma to healthy sugarcane plants. The transmission efficiency of *M. hiroglyphicus* was 10-55% with an acquisition period at least 3 h while percentage of disease transmission in *Y. flavovittatus* was 5-45% with at least 24 h acquisition period.

คำสำคัญ: เชื้อไฟโตพลาสมา เพลี้ยจักจั่น โรคใบขาวอ้อย

Keywords: phytoplasma, leafhopper, sugarcane white leaf disease

[1]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*นักวิชาการ ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

โรคใบขาวอ้อยเป็นโรคที่มีความสำคัญและทำความเสียหายรุนแรงต่อการปลูกอ้อยในประเทศไทย ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา (Nakashima et al., 1994; Wongkaew et al., 1997) จัดอยู่ในเชื้อไฟโตพลาสมากลุ่มย่อย 16 SrXI-B ที่ทำให้พืชแสดงอาการใบขาวซีดเนื่องจากการสูญเสียคลอโรฟิลด์ และใบพืชมีขนาดเล็กสั้นแตกเป็นกอ (Cronje et al., 1998; Lee et al., 1998) เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยนี้ต้องอาศัยเซลสิ่งมีชีวิตในการเจริญเติบโต ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไม่สามารถศึกษาหาคุณสมบัติต่าง ๆ ของตัวเชื้อได้ ซึ่งปัจจุบันนี้ยังไม่มีวิธีการใดในการกำจัดเชื้อนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพนอกจากการขุดถอนต้นพืชที่แสดงอาการเป็นโรคทิ้งเพื่อลดแหล่งเพาะเชื้อของโรค (พรทิพย์, 2542) ดังนั้นการค้นหาพืชอาศัยหรือแหล่งพักอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมานี้จึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่งต่อการควบคุมโรคใบขาวนี้ พืชตระกูลหญ้าต่าง ๆ ที่แสดงอาการใบขาวที่พบในแปลงปลูกอ้อย เช่น หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) หญ้าข้อ (*Brachiaria distachya* (L.) Stapf.) และหญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Beauv.) นั้น เดิมเข้าใจว่าเป็นแหล่งพืชอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยแต่ปัจจุบันได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาคนละสายพันธุ์กับเชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวอ้อย (Marcone et al., 1997; Wongkaew et al., 1997) เชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวอ้อยสามารถถูกถ่ายทอดเชื้อจากต้นอ้อยเป็นโรคไปสู่ต้นอ้อยปกติได้โดยมีแมลงเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) เป็นแมลงพาหะ (Chen, 1973; 1978) ซึ่งกลไกการถ่ายทอดโรคของแมลงพาหะจากต้นอ้อยเป็นโรคไปยังต้นอ้อยปกตินั้นมีส่วนสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคนี้ พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวอ้อยมีการเพิ่มปริมาณภายในตัวแมลงพาหะและสามารถถ่ายทอดเชื้อจากรุ่นพ่อแม่ไปยังแมลงรุ่นต่อ ๆไปโดยผ่านทางไข่ได้อีกด้วย (Hanboonsong et al., 2002) ดังนั้นจึงทำให้ตัวแมลงพาหะเองเป็นแหล่งเพาะอาศัยของเชื้อได้เช่นกัน ในบริเวณแปลงปลูกอ้อยนอกจากจะพบแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ของโรคใบขาวอ้อยแล้วยังพบว่ามีเพลี้ยจักจั่นอีกหลายชนิดอาศัยอยู่เช่นกัน (พรทิพย์, 2542; ยุพาและคณะ, 2543) แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาสถานะภาพการเป็นแมลงพาหะและความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติ Nault (1989) ได้ประมาณว่ามีเพลี้ยจักจั่นประมาณ 60 ชนิด ในวงศ์ Cicadellidae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ที่เป็นแมลงพาหะนำโรคไวรัสและ เชื้อไฟโตพลาสมาแก่พืชหลายชนิด นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืชชนิดเดียวกันสามารถถ่ายทอดได้โดยมีแมลงพาหะได้หลายชนิด (Flecther et al., 1998; Lee et al., 2000) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่ต้องการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในแมลงเพลี้ยจักจั่นชนิดต่าง ๆ ที่พบในแปลงอ้อย และตรวจสอบสถานะภาพการเป็นแมลงพาหะในการสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดการและควบคุมโรคใบขาวอ้อยได้ต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเก็บแมลงเพลี้ยจักจั่น

เก็บแมลงเพลี้ยจักจั่นชนิดต่าง ๆ ในอันดับ Homoptera จากแปลงปลูกอ้อยที่แสดงอาการใบขาว ในอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี เดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2545 ถึงเดือนธันวาคม 2546 โดยใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ตั้งกับดักตั้งแต่เวลา 18.30-20.30 น. เก็บรวบรวมแมลงเพลี้ยจักจั่นโดยใช้หลอดดูดแมลง (mouth aspirator) และใส่ลงในกระบอกพลาสติกใส จากนั้นนำแมลงที่ดักจับได้มาแยกชนิดและเก็บรักษาไว้ใน 100% เอทธานอล และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อสำหรับสกัดดีเอ็นเอและตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยจะทำการตรวจหาเชื้อในแมลงเพลี้ยจักจั่นเป็น

ประจำทุกเดือนที่ได้ดักจับแมลง ด้วยการสุ่มตรวจหาเชื้อในแมลงเพลี้ยจักจั่นทุกชนิด ชนิดละ 5 ตัวอย่าง

การเตรียมต้นอ้อย

ต้นอ้อยปกติ เตรียมต้นอ้อยสำหรับใช้ทดสอบการถ่ายทอดโรค โดยนำส่วนตาที่ส่วนหัวและท้ายของแต่ละท่อนของอ้อยพันธุ์มาร์กอสมาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธี Nested PCR จากนั้นนำท่อนพันธุ์อ้อยที่ปลอดเชื้อมาตัดแบ่งเป็นข้อปล้อง แต่ละข้อปล้องมี 1 ตา แล้วนำไปปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 นิ้ว ปลูกอ้อย 1 ตาต่อกระถาง เก็บไว้ในเรือนทดลองที่มีตาข่ายละเอียดกันแมลง จนกระทั่งต้นอ้อยมีอายุประมาณ 20 วัน จึงนำมาทดสอบการถ่ายทอดโรค

ต้นอ้อยโรคใบขาว เตรียมต้นอ้อยใบขาวพันธุ์มาร์กอสโดยนำท่อนพันธุ์ซึ่งแสดงอาการใบขาวมาทำการปลูกเช่นเดียวกับการเตรียมท่อนพันธุ์อ้อยปกติ เมื่อต้นอ้อยงอกจากท่อนพันธุ์ที่แสดงอาการใบขาวทำการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวโดยวิธี Nested PCR เพื่อเป็นการยืนยันว่าอ้อยมีเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว

การสกัดดีเอ็นเอของแมลง

นำแมลงเพลี้ยจักจั่นที่เก็บมาจากแปลงปลูกอ้อยและเก็บรักษาไว้ใน 100% เอทธานอล มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ต่อแมลงจำนวน 1 ตัว เติมสารละลายบัพเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอแมลงตามวิธีการของ ยุพาและคณะ (2543) บดแมลงให้ละเอียดและบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นสกัดและทำความสะอาดดีเอ็นเอด้วยสารละลายผสมของฟีนอล คลอโรฟอร์ม และไอโซเอมีล ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย isopropanol ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % เอทธานอล เทเอทธานอลออกและทำให้ตะกอนแห้งโดยคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู จากนั้นเติมสารละลาย TE ที่มีเอนไซม์ RNase ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในแมลงโดยวิธี Nested PCR

ตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่นชนิดต่าง ๆด้วยวิธี Nested PCR โดยใช้ชุด primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อยจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในส่วนของยีน 16S rRNA และ intergenic spacer region ที่มีต่อส่วนของยีน 23S rRNA จำนวน 2 ชุด ชุดแรกคือชุด primer MLO-X: 5-GTTAGGTTAAGTCCTAAAA CGAGC-3 และ MLO-Y: 5-GTGCCAAGGCAT CCACTGTATGCC-3 และชุดที่สองคือ ชุด primer P1: 5-GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGG-3 และ P2: 5-GGTGGGCCTAAATGGACTT GAACC-3 ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นจำนวน 20-25 นาโนกรัม dNTP (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) 2 มิลลิโมลาร์ primer ชนิดละ 2.5 ไมโครโมลาร์ Taq DNA polymerase (Promega) จำนวน 1 ยูนิต แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง PCR thermal cycle ซึ่งใช้ปฏิกิริยาครั้งแรก 35 รอบด้วย primer ชุดแรก MLO-X /MLO-Yโดยในแต่ละรอบ ประกอบด้วยช่วง denaturation เป็นเวลา 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส ช่วง annealing เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และช่วง extension เป็นเวลา 90 วินาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลที่ได้จากปฏิกิริยารอบแรกมาทำปฏิกิริยา Nested PCR โดยใช้ชุด primer P1/P2 ใช้ปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบโดยในแต่ละรอบประกอบด้วยช่วง denaturation เป็นเวลา 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส ช่วง annealing เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส และช่วง extension เป็นเวลา 90 วินาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากเพลี้ยจักจั่นไปสู่ต้นอ้อยปกติ

ทำการทดสอบการถ่ายทอดโรคโดยแมลงเพลี้ยจักจั่นจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Exitianus indicus*

และ *Yamatotettix flavovittatus* (รูปที่ 1) โดยทำการอดอาหารเพลี้ยจักจั่นโดยไม่ให้ดูดน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อยเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเพลี้ยจักจั่นที่อดอาหารไปดูดน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวเพื่อให้ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยที่ระยะเวลา 1, 3, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเพลี้ยจักจั่นที่ผ่านการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นอ้อยที่เป็นโรคใบขาวไปดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นอ้อยปกติที่ครอบด้วยกรงพลาสติกใสจำนวน 5 ตัวต่อต้นอ้อยปกติที่ปลอดเชื้อ 1 ต้น ใช้ต้นอ้อยทดสอบจำนวน 20 ต้น เลี้ยงเพลี้ยจักจั่นบนต้นอ้อยปกติเพื่อให้แมลงถ่ายทอดเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นดูดเพลี้ยจักจั่นออกจากต้นอ้อยและฉีดยาฆ่าแมลงบนต้นอ้อยเพื่อให้แน่ใจว่าต้นอ้อยปราศจากเพลี้ยจักจั่น นำต้นอ้อยทดสอบไปเก็บในเรือนทดลองที่มีตาข่ายละเอียดกันแมลงเป็นเวลา 45 วัน จากนั้นตัดต้นอ้อยบริเวณโคนต้นซึ่งมีรายงานว่าพบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยมากที่สุดในท่ออาหารบริเวณส่วนที่เป็นลำต้นโดยเฉพาะส่วนที่ค่อนไปทางโคนต้น (Nakashima et al., 1994) มาทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยวิธี Nested PCR

การสกัดดีเอ็นเอต้นอ้อย

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากต้นอ้อยโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kollar และคณะ (1990) โดยนำตัวอย่างบริเวณโคนต้นอ้อยมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในโกร่งบด เติมไนโตรเจนเหลวลงไปและบดให้ละเอียดเป็นผง เติมสารละลายบัพเฟอร์ CTAB 2 % นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายคลอโรฟอร์มและไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ จากนั้นนำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมสารละลาย isopropanol ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล เทเอทธานอลทิ้งปล่อยให้ตะกอนแห้งโดยคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชูที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE ที่มี RNase ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ −20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในต้นอ้อยโดยวิธี Nested PCR

ทำการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต้นอ้อยทดสอบที่สกัดดีเอ็นเอจากบริเวณส่วนโคนต้น โดยวิธี Nested PCR เช่นเดียวกับการตรวจหาเชื้อในแมลง

ผลการทดลอง

จากการเก็บแมลงเพลี้ยจักจั่นต่าง ๆ ในแปลงปลูกอ้อย พบแมลงปากดูดทั้งสิ้นจำนวน 69 ชนิด ในวงศ์ Cicadellidae และเมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวเพลี้ยจักจั่นด้วยวิธี Nested PCR สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาดนิวคลีโอไทด์ 210 คู่เบส ในเพลี้ยจักจั่นจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *Balclutha* sp., *Bhatia olivacea*, *Exitianus indicus*, *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Recilia* sp., *Recilia distinctus*, *Recilia dorsalis*, *Yamatotettix flavovittatus*, *Macrosteles striifrons*, *Xestocephalus* sp., *Thaia oryzivora* และ *Balclutha rubrostriata* โดยมีเปอร์เซนต์การตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวแมลงชนิดต่าง ๆระหว่าง 6-35 % (ตารางที่ 1)

เมื่อทดสอบสถานะภาพการเป็นแมลงพาหะและความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติ โดยระยะแรกใช้แมลงเพลี้ยจักจั่นที่สามารถตรวจพบเชื้อในตัวและมีปริมาณประชากรมาก พบสม่ำเสมอ รวมทั้งมีพลวัตการเปลี่ยนแปลงของประชากรแมลงในช่วงเดียวกับการเกิดการระบาดของโรคใบขาวอ้อยในแปลงปลูกอ้อย จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Exitianus indicus* และ*Yamatotettix flavovittatus* ได้ผลดังนี้

เพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยทดสอบได้ โดยตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาด 210 คู่เบส ด้วยเทคนิค Nested PCR ในต้นอ้อยทดสอบหลังจากที่ได้รับเชื้อจากเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ที่ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวที่เวลา 3, 24 และ 48 ชั่วโมง คิดเป็น 10, 10 และ 55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาที่เพลี้ยจักจั่นดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยที่เวลา 1 และ 12 ชั่วโมง ตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2 ก)

เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยทดสอบได้ โดยตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาด 210 คู่เบส ในต้นอ้อยทดสอบหลังจากได้รับเชื้อจากเพลี้ยจักจั่นที่ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต้นอ้อยเป็นโรคที่เวลา 24 และ48 ชั่วโมง คิดเป็น 5 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาที่เพลี้ยจักจั่นได้รับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยที่เวลา 1,3 และ 12 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 2 ข)

เพลี้ยจักจั่น *E. indicus* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยทดสอบ ในทุกระยะเวลาที่ให้แมลงดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากต้นอ้อยเป็นโรค โดยตรวจไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต้นอ้อยทดสอบ (ตารางที่ 2)

สรุปและวิจารณ์

จากการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวเพลี้ยจักจั่นที่เก็บมาจากแปลงปลูกอ้อยในจังหวัดอุดรธานี ด้วยวิธีการ Nested PCR สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาดนิวคลีโอไทด์ 210 คู่เบส ในเพลี้ยจักจั่นจำนวน 12 ชนิด ในวงศ์ Cicadellidae ได้แก่ *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Exitianus indicus*, *Yamatotettix flavovittatus*, *Recilia* sp., *Recilia distinctus*, *Balclutha* sp., *Xestocephalus* sp., *Bhatia olivacea*, *Recilia dorsalis*, *Macrosteles striifrons*, *Thaia oryzivora* และ *Balclutha rubrostriata* จากการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวเพลี้ยจักจั่นชนิดอื่น ๆ นอกจาก *M. hiroglyphicus* ซึ่งมีรายงานแล้วว่าเป็นแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย แสดงให้เห็นว่าเพลี้ยจักจั่นจำนวนดังกล่าวสามารถรับเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าไปในตัวของแมลงได้ ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าอาจมีเพลี้ยจักจั่นอื่นที่สามารถเป็นแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยได้เช่นกัน และเมื่อทำการทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากเพลี้ยจักจั่นไปสู่ต้นอ้อยปกติโดยใช้เพลี้ยจักจั่นจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *M. hiroglyphicus*, *E. indicus* และ *Y. flavovittatus* พบว่ามีเพียงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus* ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ ส่วนเพลี้ยจักจั่น *E. indicus* ไม่สามารถเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ปิยวิทย์ (2547) ที่รายงานว่าแมลง *E. indicus* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติได้เช่นกัน แต่แมลง *E. indicus* สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาวไปยังหญ้าแพรกปกติได้ จากการที่เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ ทำให้สรุปในเบื้องต้นได้ว่าเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยนอกจากมีแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปสู่ต้นอ้อยปกติได้แล้ว ยังมีเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติได้เช่นกัน ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรกที่ทำให้ทราบว่ามีแมลงพาหะหลายชนิดที่

สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อระหว่างเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus* พบว่า *M. hiroglyphicus* ซึ่งเป็นแมลงพาหะของโรคใบขาวอ้อยที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อดีกว่า *Y. flavovittatus* เพราะใช้ระยะเวลาในการดูดรับเชื้อจากต้นอ้อยเป็นโรคใบขาวสั้นกว่า ก็สามารถถ่ายทอดเชื้อไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ โดยแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ใช้ระยะเวลาในการดูดรับเชื้อที่อย่างน้อย 3 ชั่วโมงก่อนการถ่ายทอดเชื้อ ในขณะที่เพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ที่ระยะเวลาในการดูดรับเชื้อเดียวกัน แต่ต้องใช้ระยะเวลานานอย่างน้อย 24 ชั่วโมงในการดูดรับเชื้อจึงจะสามารถถ่ายทอดเชื้อไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ นอกจากชนิดแมลงแล้ว เพศแมลงจัดเป็นปัจจัยที่ส่งต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อของแมลงพาหะ มีรายงานว่าแมลงพาหะเพศเมียนั้นสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ดีกว่าแมลงพาหะเพศผู้ (Alma et al., 1997; Hanboonsong et al., 2002) ดังนั้นควรมีการศึกษาเรื่องดังกล่าวนี้ต่อไป พร้อมทั้งศึกษากลไกการถ่ายทอดโรคตลอดจนสถานะภาพของการเป็นแมลงพาหะในแมลงตัวอื่น ๆ อีกที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวอ้อย ในตัวการทราบข้อมูลต่าง ๆ ของแมลงนี้จะเป็นประโยชน์ในการจัดการประชากรของแมลงพาหะต่าง ๆ ที่นำเชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวอ้อยซึ่งใช้เป็นปัจจัยช่วยอย่างหนึ่งในจัดการและควบคุมโรคใบขาวของอ้อยได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้การสนับสนุนจากธนาคารพัฒนาแห่งเอเชีย (Asian Development Bank) และรัฐบาลไทย

เอกสารอ้างอิง

ปียวิทย์ โทธรรม. 2547. การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวโดยแมลงพาหะ (*Exitianus indicus* Distant) ไปสู่ต้นอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) และหญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา.

ยุพา หาญบุญทรง สกล พันธุ์ยิ้ม ชุตินันท์ ชูสาย พรทิพย์ วงศ์แก้ว พิศาล ศิริธร และ ธวัช ตินนังวัฒนะ. 2543. การตรวจสอบทางอณูชีววิทยาของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในแมลงพาหะ (*Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) และแมลงพาหะที่มีแนวโน้มชนิดอื่น. รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ ครั้งที่ 4. วันที่ 15-17 สิงหาคม 2543. ณ โรงแรมสีมาธานี. นครราชสีมา.

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: 115-121.

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

Chen, C.T. 1978. Vector pathogen relationships of sugarcane white leaf disease. **Taiwan Sugar J.** 25: 50-54.

Cronje, C.P.R., Tymon, A.M., Jones, P. and Bailey, R.A. 1998. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. **Annal. Appl. Biology.** 133: 177-186.

Fletcher, F., Wayadande, A., Melcher U. and Ye, F. 1998. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. **Phytopathology.** 88: 1351-1358.

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: 97-103.

Kolla, A., Seemuller, E., Bonnet, F., Sailard, C. and Bove, J.M. 1990. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasmalike organisms from infected plants. **Phytopathology.** 80: 233-237.

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

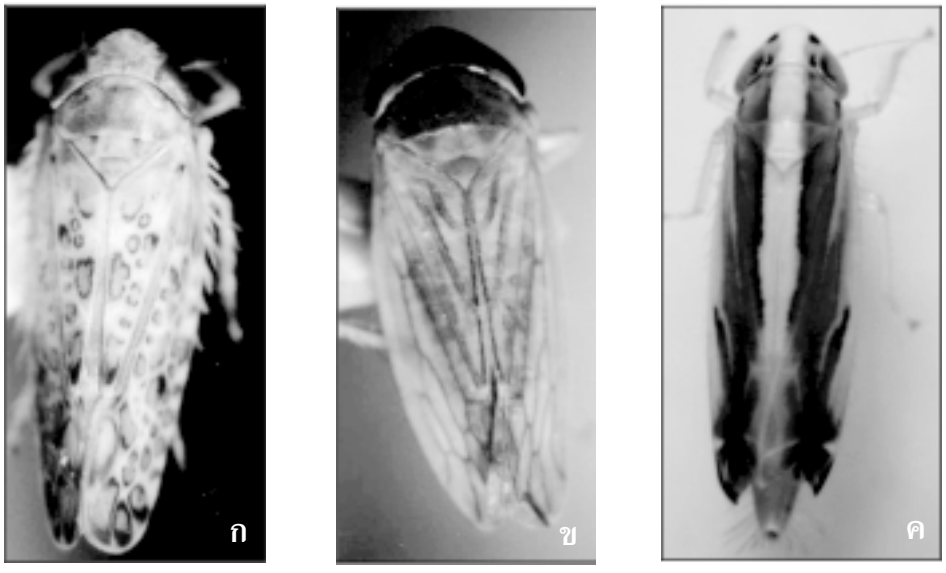
Lee, I.M., Davis,R.E. and Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annu. Rev. Microbiology.** 54: 221-255.

Marcone, C., Ragozzino, A. and Seemuller, E. 1997. Detection of bermuda grass white leaf disease in Italy and characterization of the associated phytoplasma by RFLP analysis. **Plant Disease.** 81: 862-866.

Nakashima, K., Chaleeprom, W., Wongkaew, P. and Sirithon, P. 1994. Detection of mycoplasma organism associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probs. **JIRCAS. J.** 1: 57-67.

Nault, L.R. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. **Annaul Review Entomology** 34: 503-529.

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.** 95: 660-663.



รูปที่ 1 แมลงเพลี้ยจักจั่นที่ใช้ทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติ

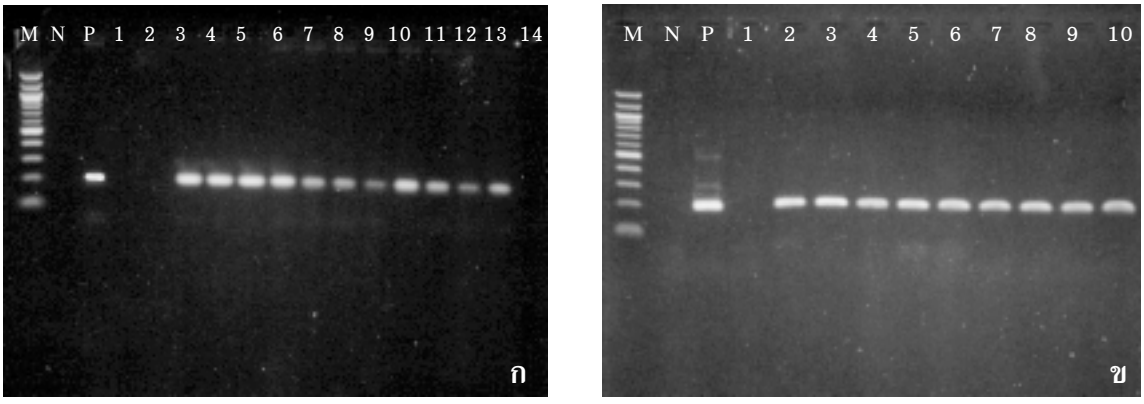
ก. Matsumuratettix hiroglyphicus (Matsumura)

ข. Exitianus indicus Distant

ค. Yamatotettix flavovittatus Matsumura

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยวิธี Nested PCR ในเพลี้ยจักจั่นจำนวน 12 ชนิด

ชนิดเพลี้ยจักจั่น	สัดส่วนแมลงที่พบเชื้อต่อแมลงทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ
Xestocephalus sp.	9/26	34.62
Balclutha rubrostriata	4/13	30.76
Thaia oryzivora	6/20	30.00
Matsumuratettix hiroglyphicus	18/71	25.35
Balclutha sp.	14/59	23.73
Yamatotettix flavovittatus	8/51	15.68
Recilia distinctus	7/53	13.21
Recilia dorsalis	7/54	12.96
Exitianus indicus	8/65	12.31
Recilia sp.	4/40	10.00
Macrosteles striifrons	2/21	9.52
Bhatia olivacea	2/37	5.41



รูปที่ 2 แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ขนาด 210 คู่เบส ที่ตรวจพบในต้นอ้อยที่ใช้ทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* และ *Yamatotettix flavovittatus* ที่ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูป ก และรูป ข ตามลำดับ) โดยวิธี Nested PCR แถบ M คือ 100 คู่เบส ladder marker แถบ N คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมในปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control) แถบ P คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมในปฏิกิริยามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (positive control) แถบที่ 3-13 (รูป ก) และแถบที่ 2-10 (รูป ข) คือ ต้นอ้อยทดสอบที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ตารางที่ 2 การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยใช้แมลงเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Exitianus indicus* และ *Yamatotettix flavovittatus* ซึ่งดูดรับเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ ไปยังต้นอ้อยปกติ

ระยะเวลาดูดรับเชื้อ (ชม.)	สัดส่วนต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคต่อต้นอ้อยที่ใช้ทดสอบ (% การเกิดโรค)		
	Matsumuratettix hiroglyphicus	*Exitianus indicus*	*Yamatotettix flavovittatus*
1	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
3	2/20 (10%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
12	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
24	2/20 (10%)	0/20 (0%)	1/20 (5%)
48	11/20 (55%)	0/20 (0%)	9/20 (45%)