การศึกษาแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดทุติยภูมิของเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* พาหะนำโรคใบขาวอ้อย

Studies of the Secondary Bacterial Symbionts in the Leafhopper *Matsumuratettix hiroglyphicus* the Vector of Sugarcane White Leaf Disease

กมลวรรณ เจริญพานิชสันติ (Kamonwan Jaroenpanichsanti)* ดร.จุรีมาศ วังคีรี (Dr.Jureemart Wangkeeree)**
ดร.ยุพา หาญบุญทรง (Dr.Yupa Hanboonsong)***

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาชนิดของแบคทีเรียทุติยภูมิ (secondary symbiont) ของเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* แมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย ด้วยวิธีการแยกออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16 rRNA ผลการศึกษาจากแมลงทั้งหมด 58 ตัว พบโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกจากแมลงเพศเมีย ไม่พบโคโลนีแบคทีเรียจากแมลงเพศผู้ ซึ่งแบคทีเรียจำนวน 38 โคโลนี นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่าเป็นแบคทีเรีย 12 สกุล 20 ชนิด ได้แก่สกุล *Microbacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter, Brachybacterium*, *Pedobacter*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium, Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* และ *Mycobacterium* ในจำนวนนี้แบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Microbacterium* และ *Arthrobacter* พบในแมลงจากทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง จึงจัดว่าเป็น แบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดทุติยภูมิ ในเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus*

ABSTRACT

The objective for this research was to identify these secondary bacterial symbionts of *Matsumuratettix hiroglyphicus* vector of sugarcane white leaf disease by isolation, culturing and analysis of the 16S rRNA bacterial gene. The result from a total of 58 tested leafhoppers, only female showed the bacteria colonies while male did not produce any bacteria on media agar. The 38 bacteria colonies were sequenced and analyzed using National Center for Biotechnology Information (NCBI). A total of 12 genus and 20 species were identified, including *Microbacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter, Brachybacterium*, *Pedobacter*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* and *Mycobacterium.* Among these, three genera of *Bacillus*, *Microbacterium* and *Arthrobacter* were found in the leafhoppers from all collected sugarcane fields, so, they are proposed as the secondary bacteria symbionts for this leafhopper vector.

คำสำคัญ: แบคทีเรียร่วมอาศัย เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล(*Matsumuratettix hiroglyphicus*) โรคใบขาวอ้อย

Key Words: Secondary symbiont, Leafhopper (*Matsumuratettix hiroglyphicus*), Sugarcane white leaf disease

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*
*** อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*
**** รองศาสตราจารย์ สาขาวิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

แมลงมีเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัย (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) จุลินทรีย์ร่วมอาศัยประเภทนี้มีความจำเป็นต่อการการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของแมลง ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ จุลินทรีย์ร่วมอาศัยทุติยภูมิ (secondary symbiont) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ร่วมอาศัยที่พบในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ต่อมน้ำลาย ทางเดินอาหาร เลือด (hemolymph) รังไข่ มีทั้งให้ประโยชน์และโทษแก่แมลงอาศัย บางชนิดสามารถแยกออกมาเพาะเลี้ยงภายนอก เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter agglomerans* และ *Klebsiella oxytoca* ที่แยกจากทางเดินอาหารของแมลงวันผลไม้ *Rhagoletispomonella* มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ให้สมบูรณ์ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีหน้าที่สร้างแหล่งไนโตรเจนให้แก่แมลง โดยทำหน้าที่ย่อยสลายพิวรีน (purines) และอนุพันธ์ของพิวรีน (purine derivatives) ให้กลายเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญเพื่อให้แมลงนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Lauzon et al., 2000) แบคทีเรีย *Acyrthosiphon pisum* ในเพลี้ยอ่อน ทำให้แมลงสามารถเพิ่มความต้านทานต่อแมลงเบียน (Montllor et al., 2002) แบคทีเรีย *Hamiltonella* ในแมลงหวี่ขาว มีบทบาทส่งเสริมการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศของแมลง (Su et al., 2013)

เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) เป็นแมลงพาหะนำเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย ซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญมากที่สุด สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในระบบการผลิตอ้อยและน้ำตาลปีละกว่า 1,000 ล้านบาท (Hanboonsong et al., 2002) มีรายงานถึงชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภท primary symbiont คือ Bacteria Associated with *M. hiroglyphicus* (BAMH) พบอยู่ในส่วนของ bacteriome เป็นชนิดที่พบมากในประชากรของแมลงในธรรมชาติพบทุกระยะการเจริญตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อน ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย และสามารถถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นได้มีความจำเพาะและมีบทบาทสำคัญกับแมลงพาหะชนิดนี้ (Wangkeeree et al., 2012) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภท secondary symbiont ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภทนี้ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาถึงบทบาทของแบคทีเรียต่อแมลงอาศัยและนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดแมลงต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภท secondary symbiont ในแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย *M. hiroglyphicus* ด้วยวิธีการแยกออกมาเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16 rRNA

วิธีการศึกษา

พื้นที่ที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างแมลง

แปลงอ้อยที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย 3 พื้นที่ คือ เขตพื้นที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี อำเภอเขาสวนกวาง และอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

เก็บตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นจากแปลงอ้อยโดยใช้กับดักแสงไฟล่อแมลงและหลอดดูดแมลง ในช่วงเวลา

19.00-20.00 น. ในช่วงที่มีการระบาดของแมลงพาหะเดือนกรกฎาคมเพื่อนำมาศึกษาโดยแยกเก็บตัวอย่างเป็นแปลงอ้อยปลูก และอ้อยตอของแต่ละพื้นที่ เก็บตัวอย่างแมลงใส่ในกรงพลาสติกที่มีต้นอ้อยอยู่ เลี้ยงแมลงในโรงเรือนปฏิบัติการเพื่อนำตัวอย่างแมลงที่มีชีวิตอยู่มาศึกษาทดลอง

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัยจากเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus*

ตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นที่ใช้ในการศึกษาจาก 3 พื้นที่แปลงละ 20 ตัว (แปลงอ้อยปลูก เพศเมีย 5 ตัว และเพศผู้ 5 ตัว แปลงอ้อยตอ เพศเมีย 5 ตัว และเพศผู้ 5 ตัว) การทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปได้ คือ Nutrient Broth and Agar ก่อนการแยกแบคทีเรียออกมาเพาะเลี้ยง ต้องทำความสะอาดตัวแมลงก่อนเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปะปนอยู่ภายนอกตัวแมลง โดยใช้อุปกรณ์และเทคนิคที่ปลอดเชื้อ ทำการล้างแมลงใน 75% ethanol และ 6% sodium hypochloride นานอย่างละ 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

โดยแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยเฉพาะในส่วนบริเวณส่วนท้องของแมลง นำตัวอย่างส่วนท้องที่ตัดแยกแล้วมาบดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงแบคทีเรียอยู่ 100 ไมโครลิตร (หนึ่งชิ้นส่วนที่แยกต่อหนึ่งหลอด) เจือจางความเข้มข้นลงโดยแบ่ง50 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารใหม่ 100 ไมโครลิตร แล้วดูดจากหลอดที่เจือแล้ว 20 ไมโครลิตร spread ลงบน plate อาหารแข็ง จากนั้นบ่มตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลาประมาณ 1-3 วัน ให้เซลล์แบคทีเรียเจริญ

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่เจริญขึ้นมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเซลล์ในอาหารเหลวปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยแยกเซลล์แบคทีเรียจากอาหารเหลวด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 2 นาที เติม TE buffer (10 mMTris, 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. สกัดด้วยการเติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่และเติม phenol-chloroform (24:1) เท่ากับปริมาตรของสารที่อยู่ในหลอด vortex เพื่อผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ย้ายสารสะลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม3M 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 นาน5 นาที และละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ส่วนของยีน 16S rRNA

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงโดยนำดีเอ็นเอที่สกัดมาทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อวิเคราะห์ในส่วนของยีน16s rRNA ของแบคทีเรียด้วยคู่ไพรเมอร์ (Universal primer) 25F และ 1513R มีส่วนประกอบคือ dNTP 0.2 mM,ไพรเมอร์ 0.3 µM (25F: 5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3, 1513R: 5-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3, Taq DNA polymerase 1 U, $MgCl_2$ 2.5 mM, 1X buffer ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 2 ไมโครลิตร ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยมีช่วงเวลาและอุณหภูมิของปฏิกิริยาคือ 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 เพื่อ

ตรวจสอบผลและขนาดของยีนที่ได้ จากนั้นนำส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ที่เพิ่มปริมาณแล้วมาทำการ purify ด้วย PCR Clean-Up Kit เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สถาบัน ATIbiotech และเปรียบเทียบกับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล NCBI

ผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่าในแมลงเพศเมียสามารถแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยออกมาเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งใน อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น สามารถนำออกมาเพาะเลี้ยงได้ถึง 100% ส่วน อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานีและ อ.เมือง จ. ขอนแก่น เป็น 80% และ 75% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่ในเพศผู้นั้นทุกพื้นที่ศึกษาไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* ทั้ง 3 พื้นที่การศึกษา

พื้นที่	เพศแมลง	จำนวนแมลงที่ใช้/แมลงที่มีโคโลนีแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี
อ. เขาสวนกวาง	เมีย	10/10	14
จ. ขอนแก่น	ผู้	10/0	0
อ. กุมภวาปี	เมีย	10/8	14
จ. อุดรธานี	ผู้	10/0	0
อ.เมือง	เมีย	8/6	10
จ. ขอนแก่น	ผู้	10/0	0

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16 rRNA ผลการศึกษาพบว่าพื้นที่ อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น วิเคราะห์จำนวน 14 โคโลนี พบแบคทีเรีย 9 สกุล จำนวน11 ชนิด ได้แก่สกุล *Microbacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Pedobacter*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium* และ *Stenotrophomonas*

พื้นที่ อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี จากการวิเคราะห์จำนวน 14 โคโลนี พบแบคทีเรีย 7 สกุล จำนวน 9 ชนิด ได้แก่สกุล *Bacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Brachybacterium*, *Rhodococcus* และ *Mycobacterium*

พื้นที่ อ.เมือง จ.ขอนแก่นจากการวิเคราะห์จำนวน 10โคโลนี พบแบคทีเรีย 4 สกุลจำนวน 8 ชนิด ได้แก่สกุล *Bacillus, Microbacterium*, *Arthrobacter* และ *Rhodococcus* (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16 rRNA ของแบคทีเรียที่แยกเพาะเลี้ยงจากแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* กับฐานข้อมูล NCBI

พื้นที่	ชนิดของแบคทีเรีย	% ความเหมือน	จำนวนโคโลนี
อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น	*Arthrobacter defluvii*	98	2
	Brachybacterium phenoliresistens	98	2
	Microbacterium testaceum	99	2
	Microbacterium arabinogalactanolyticum	91	1
	Achromobacter mucicolens	98	1
	Bacillus subtilis	99	1
	Bacillus licheniformis	98	1
	Pedobacter terricola	90	1
	Sphingobacterium pakistanense	98	1
	Stenotrophomonas maltophilia	97	1
	Ochrobactrum haematophilum	97	1
อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี	*Bacillus licheniformis*	99	3
	Arthrobacter arilaitensis	99	2
	Acinetobacter junii	97	2
	Microbacterium testaceum	98	2
	Bacillus subtilis	98	1
	Brachybacterium phenoliresistens	97	1
	Bacillus endophyticus	98	1
	Rhodococcus corynebacterioides	98	1
	Mycobacterium wolinskyi	99	1
อ.เมือง จ.ขอนแก่น	*Arthrobacter defluvii*	99	2
	Microbacterium testaceum	99	2
	Bacillus subtilis	99	1
	Bacillus megaterium	99	1
	Rhodococcus corynebacterioides	99	1
	Bacillus cereus	99	1
	Microbacterium maritypicum	95	1
	Bacillus drentensis	90	1

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้ศึกษาชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัยประเภท secondary symbiont ในแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย *M. hiroglyphicus* จากการศึกษาพบว่าแมลงเพศเมียสามารถแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยออกมาเพาะเลี้ยงได้ 75-100% แต่แมลงเพศผู้ไม่สามารถแยกแบคทีเรียออกมาเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเพศผู้มีขนาดเล็กกว่า จึงมีปริมาณของแบคทีเรียน้อยและไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

การจัดว่าชนิดใดเป็นแบคทีเรีย secondary symbiont ของแมลงนั้น คือต้องเป็นชนิดที่พบมากในประชากรแมลง ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า แบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Microbacterium* และ *Arthrobacter* พบในแมลงจากทั้งสามพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างเหมือนกัน ซึ่งพบ *Bacillus* มากที่สุด (11โคโลนี) และรองลงมาคือ *Microbacterium* (8โคโลนี) มีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สกุลนี้ เป็น secondary symbiont ในเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Microbacterium* รายงานว่าเป็น endophytes ที่สามารถแยกได้จากพืช (Zinnielet al., 2002) สกุล *Arthrobacter* เป็นแบคทีเรียที่พบในดิน (Dorothy and Ronald, 2006) ซึ่งต้องมีการศึกษาวิจัยถึงบทบาทของแบคทีเรีย secondary symbiont ว่าสำคัญอย่างไรต่อแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus*

เอกสารอ้างอิง

Dorothy J, Ronald MK. 2006. The Genus Arthrobacter. The Prokaryotes. p. 945-960.

Douglas AE. 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. 64(4): 409–434.

Hanboonsong Y, Choosai C, Panyim S, Damak S. 2002. Transovarial transmission of Sugarcane White Leaf phytoplasma in vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). Insect Molecular Biology. 11: 97-103.

Lauzon CR, Sjogren RE, Prokopy RJ. 2000. Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: a postulated role in attraction. Journal of Chemical Ecology. 26: 953-967.

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids Acyrthosiphon pisum under heat stress. Ecol Entomol. 27: 189– 195.

Su Q, Huipeng Pan, Baiming Liu, Dong Chu, Wen Xie, Qingjun Wu, Shaoli Wang, Baoyun Xu, Youjun Zhang. 2013. Insect symbiont facilitates vector acquisition, retention, and transmission of plant virus. Scientific reports. 3: 1367.

Wangkeeree J, Miller TA, Hanboonsong Y. 2012. Candidates for Symbiotic Control of Sugarcane White Leaf Disease. Appl. Environ. Microbiol. 78(19): 6804.

Wernegreen JJ. 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. Nature Reviews Genetics. 3(11): 850–861.

Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z. et al 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2198-2208.