

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญตาราง	ฐ
สารบัญภาพ	ฅ
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
ความสำคัญของอ้อย	3
เชื้อไฟโตพลาสมา	3
โรคใบขาวของอ้อย	4
ชีวประวัติเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล <i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i> (Matsumura)	5
วงจรชีวิต	5
พืชอาศัย	6
ศัตรูธรรมชาติ	6
การแพร่ระบาด	7
การตรวจและจำแนกชั้นของเชื้อไฟโตพลาสมา	7
การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	7
การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์	8
การตรวจโดยอาศัยลักษณะทางชีววิทยา	8
การตรวจโดยใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยา	9
การตรวจโดยวิธีดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ	10
การตรวจโดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง	11
การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยการวิเคราะห์รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
อุปกรณ์และวิธีการ	15
การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย	15
การเตรียมตัวอย่างพืชและแมลงที่ใช้ในการทดลอง	15
การสกัดดีเอ็นเอ	15
การคัดเลือก primer	25
ปรับความเหมาะสมของระดับความเข้มข้นของสารละลาย แมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในหลอดทดลอง	27
ปรับโปรแกรมที่เหมาะสมในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในหลอดทดลองสำหรับการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา	28
การตรวจชนิดของพืชอาศัยและแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค ใบขาวของอ้อย โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง	28
การตรวจพืช	28
การตรวจแมลงพาหะ	28
การศึกษานิตและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะ	29
ศึกษานิตและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย และพืชอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ	29
ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะ โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์	30
ผลและวิจารณ์การทดลอง	37
การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย	37
การคัดเลือก primer	37
ระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยา PCR	40

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR	45
การตรวจพืชอาศัยและแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยโดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง	48
การตรวจพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา	48
การตรวจแมลงพาหะ	55
การศึกษานิตและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพืชอื่นๆ และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น	57
ศึกษานิตและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและพืชอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ	57
ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์	66
สรุปผลและข้อเสนอแนะ	72
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	87
ประวัติผู้เขียน	114

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ	16
ตารางที่ 2 ผลปฏิกิริยา PCR ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ตรวจโดยใช้ชุด universal primer และชุด specific primer MLO 1, MLO 3	50

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา	18
ภาพที่ 1.1 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา	19
ภาพที่ 1.2 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา	20
ภาพที่ 1.3 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา	21
ภาพที่ 2 กับดักแสงไฟที่ใช้ดักจับแมลงเพลี้ยจักจั่นในแปลงปลูกอ้อย	22
ภาพที่ 3 แมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น <i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i> (Matsumura)	23
ภาพที่ 4 แผนที่แสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย	26
ภาพที่ 5 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer ที่มีอุณหภูมิในช่วง annealing ที่ 42 และ 60 องศาเซลเซียส และมีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน	41
ภาพที่ 6 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน	43
ภาพที่ 7 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน	44
ภาพที่ 8 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer P 1, P 2 ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน	46
ภาพที่ 9 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดต่างๆที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer	49
ภาพที่ 10 แถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 11	แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆ ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 7	54
ภาพที่ 12	แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer U 1, MLO 7 สำหรับการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และชุด primer MLO 1, MLO 3 สำหรับการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง	56
ภาพที่ 13	แถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y สำหรับการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในครั้งแรก และชุด primer MLO 1, MLO 3 สำหรับการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในครั้งที่สอง	58
ภาพที่ 14	รูปแบบของแถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Dra</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> H I และ <i>Eco</i> R I หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer	59
ภาพที่ 14.1	รูปแบบของแถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Rsa</i> I, <i>Hpa</i> I, <i>Msp</i> I และ <i>Hpa</i> II หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer	60
ภาพที่ 14.2	รูปแบบของแถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Taq</i> I หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer	62
ภาพที่ 15	รูปแบบของแถบขึ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Rsa</i> I, <i>Alu</i> I, <i>Xba</i> I และ <i>Hpa</i> II หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 15.1	รูปแบบของแถบชั้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Kpn</i> I, <i>Eco</i> RI และ <i>Acc</i> I หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3	65
ภาพที่ 16	แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้ อ้อยแสดงอาการกอดะไ้ อ้อย หญ้าขี้ หญาแพรก และหญ้าปากควาย แสดงอาการใบขาว	67
ภาพที่ 17	แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ละกลุ่ม ในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น <i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i> (Matsumura)	69
ภาพที่ 18	แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่ แสดงอาการกอดะไ้ อ้อย หญ้าขี้ หญาแพรก และหญ้าปากควายที่ แสดงอาการใบขาว และในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น <i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i> (Matsumura)	71