คำนำ

โรคใบขาวของอ้อยเป็นโรคที่เกิดขึ้นอย่างกว้างขวาง ในพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อยและเป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างหนักให้กับอ้อย มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) โดยเชื้อไฟโตพลาสมานี้สามารถถ่ายทอดผ่านทางท่อนพันธุ์ และมีเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) เป็นแมลงพาหะ จึงทำให้เกิดการระบาดของโรคใบขาวเป็นอย่างมาก เชื้อไฟโตพลาสมามีพืชอาศัยมากมาย โดยทำให้พืชที่เป็นโรคแสดงอาการใบขาว อาการแตกพุ่มแจ้ และอาการหงิกงอ เป็นต้น นอกจากนี้ในบริเวณแปลงที่ปลูกอ้อยทั่วๆไป ยังพบหญ้าต่างๆ แสดงอาการใบขาวและแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ดังนั้นการตรวจและแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอาศัย และแมลงพาหะ จึงมีความจำเป็นที่ทำให้ทราบแหล่งเพาะเชื้อ และการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวของอ้อยอย่างแท้จริง เพื่อใช้ประโยชน์ในการจัดการและควบคุมโรคใบขาวของอ้อย

การตรวจและจำแนกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาทำได้ยาก เนื่องจากยังไม่ประสบผลสำเร็จในการเลี้ยงเชื้อไฟโตพลาสมาบนอาหารสังเคราะห์ จึงได้มีการใช้วิธีต่างๆในการตรวจและแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมา เช่น การตรวจทางอ้อมโดยอาศัยลักษณะทางชีววิทยา โดยดูความเฉพาะเจาะจงของแมลงในการเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อโรคของพืช จำนวนชนิดของพืชที่อ่อนแอต่อการถูกทำลาย และอาการของพืชที่ถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย ซึ่งการตรวจโดยอาศัยลักษณะทางชีววิทยาจะใช้เวลานานและไม่สามารถใช้แยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ นอกจากนี้ยังมีการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธีนี้ใช้เวลาตรวจนานและต้องใช้ค่าใช้จ่ายในการตรวจสูง ส่วนการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาทางตรง โดยการตรวจโปรตีนและการตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เช่น การผลิตแอนติบอดีสำหรับเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อใช้ในการตรวจด้วยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และการโคลนโมเลกุลของเชื้อไฟโตพลาสมาหรือชิ้นส่วนโครโมโซมของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาและจากแมลงพาหะ เพื่อมาทำดีเอ็นเอตัวตรวจไฮบริไดเซชั่น (hybridization probe) ก็สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลงได้ แต่วิธีนี้ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอมากและมีความเฉพาะเจาะจงน้อย เมื่อเทียบกับวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) และเทคนิค PCR นี้ยังสามารถใช้หาลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลงได้ โดยการนำผลิตภัณฑ์ PCR มา

ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อแยกความแตกต่างและความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคในพืชชนิดต่างๆและแมลงพาหะได้ ตลอดจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ของการทดลองดังนี้

1. พัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย ในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะ

2. ตรวจหาพืชอาศัย และแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยโดยเทคนิค PCR

3. ศึกษาชนิด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะ

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของอ้อย

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเขตร้อนที่มีถิ่นกำเนิดทางแถบหมู่เกาะนิวกินีตอนเหนือของทวีปออสเตรเลียและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลกที่สามารถให้น้ำตาลมากที่สุดในกลุ่มของพืชที่ให้น้ำตาลด้วยกัน อ้อยปลูกกันมากในประเทศบราซิล คิวบา อินเดีย อาฟริกาใต้ ออสเตรเลีย อินโดนีเซีย ไต้หวันและประเทศไทย (สุรชัย, 2535) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยรวม 6.03 ล้านไร่ ซึ่งส่วนใหญ่ปลูกกันมากในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเป็นอ้อยปลูกใหม่ 2.83 ล้านไร่ คิดเป็น 46.93 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด (ศูนย์สถิติทางการเกษตร, 2538) อ้อยนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถนำมาแปรรูปเป็นน้ำตาลดิบและน้ำตาลทรายส่งเป็นสินค้าออกเป็นอันดับสองรองจากข้าว โดยเป็นสินค้าออกที่มีมูลค่าถึง 32,081.4 ล้านบาทในปี 2539 (ศูนย์สถิติการพานิชย์, 2540) ส่วนเหลือใช้และผลผลิตจากอ้อยยังสามารถนำมาใช้ทำประโยชน์อื่นๆอีก ได้แก่ การทำเยื่อกระดาษจากกากอ้อย และการทำอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ โดยใช้กากตะกอนน้ำตาล เป็นต้น (กองวิเคราะห์โครงการและประเมินผล, ม.ป.ป.)

2. เชื้อไฟโตพลาสมา

เชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) จัดอยู่ในวงศ์ Mycoplasmataceae อันดับ Mycoplasmatales ชั้น Mollicutes เดิมมีชื่อเรียกว่า mycoplasma like organism (MLO) ซึ่งเป็นชื่อสามัญที่ใช้ในการเรียกเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุของโรคพืชที่ยังไม่สามารถเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ได้ เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็ก ที่มีลักษณะคล้ายแบคทีเรีย แต่ไม่มี cell wall เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นสาเหตุทำให้พืชหลายชนิดเป็นโรค โดยในเอเชียตะวันตกและตะวันออกมีพืชตระกูลหญ้าที่สำคัญทางเศรษฐกิจเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา เช่น โรคเหลืองแคระของข้าว (rice yellow dwarf) และโรคใบขาวของอ้อย (sugarcane white leaf) ซึ่งทำให้เกิดอาการใบด่างขาว (McCoy และคณะ, 1989; Nakashima และ Murata, 1993) เช่นเดียวกับในประเทศไทย เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรครุนแรงกับพืชหลายชนิด และส่งผลทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก โดยมีการค้นพบโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาครั้งแรกในปี พ.ศ. 2516 ในต้นลำไยที่แสดงอาการเป็นโรคพุ่มไม้กวาด (witches'broom) และในงาที่แสดงอาการโรคยอดฝอย (phyllody) โดยต้นงาที่เป็นโรคจะมีการผลิตดอกที่มีกลีบดอกสีเขียวซึ่งมีลักษณะคล้ายใบแตกเป็นกระจุกและไม่ติดฝัก ต่อมาในปี พ.ศ. 2519 ได้พบเชื้อไฟโตพลาสมา

ในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว (ธีระ, 2532) จากนั้นก็พบพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อนี้หลายชนิด เช่น หญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาว ข้าวแสดงอาการใบสีแสด ปอเทืองแสดงอาการพุ่มไม้กวาด และปอกระเจาแสดงอาการยอดฝอย (นงลักษณ์, 2538) ในอ้อยที่ได้รับเชื้อไฟโตพลาสมานั้นไม่เพียงแต่จะแสดงอาการเป็นโรคใบขาว แต่ยังแสดงอาการเป็นโรคกอตะไคร้อีกด้วย โดยพบอาการอ้อยกอตะไคร้นี้ในภาคกลางของประเทศไทย และเรียกชื่อว่า grassy shoot (Chona และคณะ, 1960) โรคนี้คล้ายคลึงกับโรคใบขาวของอ้อย แต่โรคกอตะไคร้มีอาการที่แตกต่างและหลากหลายกว่าโรคใบขาวอ้อยคือ อ้อยจะแสดงอาการแคระแกรน ใบขนาดเล็กแตกเป็นฝอยคล้ายกอตะไคร้ และมีการแตกกอด้านข้างจำนวนมาก (Chona และคณะ, 1960; Sarosh และคณะ, 1986; Rishi และ Chen, 1989; อัปสร และคณะ, 2538)

3. โรคใบขาวของอ้อย

โรคใบขาว (white leaf) จัดเป็นโรคร้ายแรงชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นกับอ้อย พบในประเทศต่างๆ ทางแถบเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (อนุสรณ์, 2534; Nakashima และ Murata, 1993; Nakashima และ Hayashi, 1995) ในประเทศไทยโรคใบขาวของอ้อยเป็นโรคที่สำคัญ ทำให้ผลผลิตลดลงหรือถ้ามีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง จะทำให้ไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ โรคนี้ระบาดในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อยเกือบทั้งหมด โดยมีรายงานพบความเสียหายจากโรคนี้เป็นครั้งแรกในจังหวัดลำปาง ต่อมาพบโรคนี้ที่จังหวัดอุตรดิตถ์ และมีการแพร่ระบาดในเขตจังหวัดชลบุรี เพชรบุรี ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ กำแพงเพชร และอุดรธานี (ลักษณ์ และคณะ, 2528) ปัจจุบันโรคใบขาวได้แพร่ระบาดทั่วทุกจังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกอ้อยของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งในแต่ละปีโรคใบขาวของอ้อยเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายกับอ้อยเป็นเนื้อที่กว่าหมื่นไร่ คิดเป็นมูลค่า 100 ล้านบาทในปี 2519 (ธนาคร และคณะ, 2526) และทำความเสียหายไม่น้อยกว่า 225 ล้านบาทในปี 2532 (อนุสรณ์, 2534) โรคใบขาวพบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของอ้อย โดยอ้อยที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบขาวหรือขาวปนเหลือง เริ่มสังเกตอาการได้ตั้งแต่อ้อยงอกโผล่พ้นดิน โดยใบอ้อยที่แตกออกมาจะแคบเรียวเล็กกว่าปกติ อ้อยที่เป็นโรคไม่รุนแรง จะสร้างหน่อสีเขียวหรือขาวที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ซึ่งหน่อเหล่านี้จะเจริญเป็นลำต่อไปได้ แต่ลำจะเล็กกว่าต้นปกติ ส่วนอ้อยที่เป็นโรคใบขาวรุนแรง จะแตกกอมากผิดปกติ และสร้างหน่อสีขาวเล็กๆมากมายดูเป็นพุ่มคล้ายกอตะไคร้ ซึ่งกอจะแห้งและตายไปในที่สุด (วันทนีย์ และคณะ, 2522; ลักษณ์ และคณะ, 2528) อ้อยจะแสดงอาการใบขาวชัดเจนถ้าอุณหภูมิในสภาพแวดล้อมอยู่ในช่วง 23 ถึง 35 องศาเซลเซียส และอ้อยที่ปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง จะมีการเจริญเติบโตเร็วและ

แข็งแรง จึงทำให้การแสดงอาการของโรคใบขาวของอ้อยที่ปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงมีน้อยกว่าอ้อยที่ปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (Pan และ Yang, 1971; Leu, 1974)

โรคใบขาวของอ้อยมีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา โดยทั่วไปเป็นพวกที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมรี มีขนาดประมาณ 60 ถึง 1,000 นาโนเมตร ภายในประกอบด้วยสายของกรดนิวคลีอิคและไรโบโซม เชื้อไฟโตพลาสมานี้สามารถพบได้ในท่อลำเลียงอาหารของอ้อยที่เป็นโรค โดยจะเข้าไปเจริญอยู่ภายในเซลของท่อลำเลียงอาหารของอ้อยตลอดทั้งต้น (Ling, 1963; Lin และ Lee, 1968; ธีระ และคณะ, 2519) ซึ่งในพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อยพบมีพืชตระกูลหญ้าหลายชนิดเจริญอยู่ เช่น หญ้าข้อ หญ้าปากควาย และหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาว อันมีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมาเช่นเดียวกัน และคาดว่าพืชตระกูลหญ้าเหล่านี้อาจจะเป็นแหล่งสำรองของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อย ซึ่งสามารถกลับมาติดเชื้อได้อีกครั้ง (Sarindu และ Clark, 1993)

เชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวอ้อย สามารถถ่ายทอดได้โดยติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นหรือตอที่เป็นโรค และสามารถถ่ายทอดได้โดยมีแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่น *Epitettix hiroglyphicus* Matsumura เป็นพาหะ ภายหลังแมลงชนิดนี้เปลี่ยนชื่อเป็น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) (Matsumoto และคณะ, 1968; Maramorosch และคณะ, 1975; Agnihotri, 1983; Rishi และ Chen, 1989) แมลงพาหะชนิดนี้สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ถึง 29 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของเชื้อในตัวแมลงพาหะ และอัตราการเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาหะจะลดลงถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส (Leu, 1974)

4. ชีวประวัติเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura)

เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *M. hiroglyphicus* (Matsumura) จัดอยู่ในวงศ์ Cicadellidae อันดับ Homoptera เป็นแมลงพวกปากดูดที่เป็นพาหะที่สำคัญของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย (Chen, 1979) นอกจากนี้ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ยังเป็นแมลงศัตรูสำคัญที่ดูดกินน้ำเลี้ยงของต้นอ้อย โดยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งปลูกอ้อยของประเทศไทยและประเทศไต้หวัน (Chen, 1974)

4.1 วงจรชีวิต

Yang และ Pan (1969) พบว่า ตัวเต็มวัยเพศผู้และตัวเต็มวัยเพศเมียของ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) มีวงจรชีวิตนาน 40.9 และ 43.8 วัน ตามลำดับ โดยเมื่อตัวเต็มวัยเพศเมียที่ได้รับการผสมแล้ว จะวางไข่โดยเฉลี่ย 19 ฟองต่อตัว ภายในระยะเวลา 3 ถึง 5 วัน หลังจากนั้น 5 ถึง 7 วัน ไข่จึงจะฟักออกเป็นตัวอ่อน ระยะตัวอ่อนใช้เวลาประมาณ 12 ถึง 15

วัน โดยแบ่งออกเป็น 5 วัย (ทรงยศ และคณะ, 2532) ซึ่งจำนวนไข่ที่ได้จะมากหรือน้อยเป็นผลเนื่องจาก ความเหมาะสมของชนิดดิน ความชื้นของดิน และพืชอาศัย โดย Yang (1972) พบว่าดินทรายที่มีความชื้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้จำนวนไข่มากที่สุด และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการวางไข่ของตัวเต็มวัยเพศเมีย คือ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส และมักพบไข่ของ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ได้บนผิวดินในบริเวณใกล้กับต้นอ้อย

4.2 พืชอาศัย

พืชอาศัยของเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) พบมีอยู่จำกัด โดยแมลง *M. hiroglyphicus* (Matsumura) สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้บนพืชบางชนิด ได้แก่ อ้อยป่า, อ้อยพันธุ์ที่ใช้เพาะปลูกทั่วไป, หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon*), น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) และแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) โดย Yang และ Pan (1970) พบว่า ตัวอ่อนวัย 5 ของแมลง *M. hiroglyphicus* (Matsumura) สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 13.2, 3.7 และ 1.4 เปอร์เซ็นต์ บนหญ้าแพรก, น้ำนมราชสีห์ และแห้วหมู ตามลำดับ ส่วนตัวอ่อนวัย 4 ของแมลง *M. hiroglyphicus* (Matsumura) สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ 1.3 เปอร์เซ็นต์ บนหญ้าแพรก ซึ่ง Chen และคณะ (1974) และ Rishi และ Chen (1989) พบว่า เพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้บนหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาวได้ดีกว่าหญ้าแพรกปกติ นอกจากนี้จะเห็นว่า ส่วนใหญ่แมลงจะดูดน้ำเลี้ยงจากพืชได้มากกว่าหนึ่งชนิดและในบริเวณแปลงอ้อยพบมีวัชพืชอยู่หลายชนิด จึงเป็นไปได้ว่า วัชพืชต่างๆที่พบในแปลงอ้อยนี้อาจเป็นพืชอาศัยของเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ที่เป็นแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยได้ (Lee และคณะ, 1994)

4.3 ศัตรูธรรมชาติ

Yang และ Pan (1977) ศึกษาพบว่า ในแปลงอ้อยมีตัวเบียนของ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) อยู่ 3 ชนิดได้แก่ ไร *Callidasoma matsumuratettix*, *Pipunculus* sp., และ Drynid (Drynidae) ซึ่งตัวเบียนทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นตัวเบียนของเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ในระยะตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัย โดยในจำนวนแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยทั้งหมดที่จับได้จากอ้อยป่า ถูกไร *Callidasoma matsumuratettix* เบียนเป็นจำนวน 7.8 และ 21.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *Pipunculus* sp. มีเปอร์เซ็นต์การเบียนแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ในระยะตัวอ่อน คิดเป็น 8 ถึง 18.3 เปอร์เซ็นต์ และการเบียนของ Drynid (Drynidae) บนเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ตัวอ่อน มี

เพียง 1 ถึง 2.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการที่ปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ในแปลงอ้อยจะลดลง อาจมีสาเหตุอย่างหนึ่งเนื่องมาจากการเบียนของตัวเบียนทั้ง 3 ชนิดนี้ที่ช่วยควบคุมปริมาณประชากรของเพลี้ยจักจั่นในธรรมชาติ (Yang และ Pan, 1977; Agnihotri, 1983)

4.4 การแพร่ระบาด

ฤดูการระบาดของแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* มีการศึกษาโดย วันทนีย์ และคณะ (2536) ที่ทำการศึกษาในไร่อ้อยเขตจังหวัดชลบุรี และจังหวัดระยอง พบว่า ช่วงการระบาดของแมลงในระยะเวลา 2 ปี เป็นรูปแบบเดียวกัน โดยจะพบแมลงพาหะมากในฤดูฝน ระหว่างปลายเดือนพฤษภาคมถึงต้นเดือนพฤศจิกายน และพบน้อยในฤดูแล้ง ระหว่างปลายเดือนพฤศจิกายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม นอกจากนี้จะพบแมลงชนิดนี้มาก ในคืนเดือนมืด ลมสงบ และพบมากในแปลงอ้อยที่มีอาการโรคใบขาวมากกว่าแปลงอ้อยปกติ (ทรงยศ และคณะ, 2532) โดยคาดว่าใบที่มีสีขาวของต้นอ้อยที่เป็นโรคอาจจะมีส่วนดึงดูดแมลงพาหะ ดังนั้นในบริเวณแปลงที่มีอ้อยใบขาวมากจึงมักพบแมลงพาหะมากเสมอ ในทางตรงกันข้าม หากบริเวณแปลงอ้อยมีอ้อยเป็นโรคใบขาวน้อย ก็จะพบแมลงพาหะน้อยด้วย (Chen, 1974) ยิ่งกว่านั้นชนิดของดิน ก็มีผลต่อปริมาณแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ในพื้นที่ด้วย เนื่องจากเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ชอบวางไข่ในดินทรายมากกว่าดินเหนียว จึงพบแมลงชนิดนี้ในพื้นที่ที่เป็นดินทรายมากกว่าดินเหนียว (Pan และ Yang, 1971)

5. การตรวจและจำแนกชั้นของเชื้อไฟโตพลาสมา

การศึกษาในด้านต่างๆ ตลอดจนการจัดจำแนกและแยกชนิดเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมานี้ค่อนข้างเป็นเรื่องยาก เนื่องจากยังไม่ประสบผลสำเร็จในการเลี้ยงเชื้อไฟโตพลาสมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (McCoy และคณะ, 1989; Namba และคณะ, 1993; Nakashima และคณะ, 1995; Nakashima และ Hayashi, 1995) ปัจจุบันการตรวจและศึกษาเชื้อไฟโตพลาสมานั้น มีหลายวิธีการได้แก่

5.1 การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในเบื้องต้น อาศัยหลักพื้นฐานการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานานและมีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยากในการตรวจ รวมทั้งมีค่าใช้จ่ายสูง แต่วิธีนี้สามารถบอกได้ถึงตำแหน่งหรือบริเวณในส่วนของเนื้อเยื่อที่มีการพบเชื้อ

ไฟโตพลาสมา โดย Joseph และคณะ (1975) ได้ทำการตรวจหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบเหลืองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารของหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบเหลือง แต่ไม่พบเชื้อนี้ในเนื้อเยื่อของหญ้าแพรกปกติ โดยเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบมีผนังชั้นเดียว ประกอบด้วยเม็ดที่คล้ายไรโบโซม และมีสายที่คาดว่าเป็นกรดนิวคลีอิค มีทั้งรูปร่างทรงกระบอก วงกลม และรูปร่างยาว ซึ่งชนิดที่มีรูปร่างทรงกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200 ถึง 500 นาโนเมตร ส่วนชนิดที่มีรูปร่างยาว มีความกว้างประมาณ 80 ถึง 150 นาโนเมตร และชนิดที่มีรูปร่างทรงกระบอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100 ถึง 150 นาโนเมตร

5.2 การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ง่ายและมีความรวดเร็วในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื่อเยื่อของพืช แต่วิธีนี้ไม่สามารถบอกได้ถึงชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมา (Dale, 1988) ซึ่ง Wongkaew และคณะ (1995) ได้ทำการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาว โดยย้อมเนื้อเยื่อของส่วนท่อลำเลียงน้ำและอาหารของอ้อยปกติและอ้อยที่แสดงอาการใบขาวด้วยสารละลาย 4, 6 - duanudubi - 2 - phenylindole-2-HCl (DAPI) และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ พบความแตกต่างของส่วนท่อลำเลียงของอ้อยปกติและอ้อยที่แสดงอาการใบขาว โดยบริเวณภายนอกของท่อลำเลียงน้ำของอ้อยปกติ มีการเรืองของแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นจุดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป ในขณะที่อ้อยที่แสดงอาการใบขาว จะพบการเรืองของแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นสีน้ำตาลทั้งภายในและภายนอกของส่วนท่อลำเลียงอาหาร ซึ่งแสดงว่าอ้อยที่แสดงอาการใบขาว มีการติดเชื้อโดยคาดว่าเป็นเชื้อไฟโตพลาสมา

5.3 การตรวจโดยอาศัยลักษณะทางชีววิทยา

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยลักษณะทางชีววิทยา เช่น ความเฉพาะเจาะจงของแมลงในการเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อโรคของพืช จำนวนชนิดของพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการติดเชื้อ และลักษณะอาการตามธรรมชาติที่พบในพืชที่ติดเชื้อ (Chiykowski, 1973)

การตรวจและจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยความเฉพาะเจาะจงของแมลงในการเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อโรคของพืช มีตัวอย่างเช่น แมลงเพลี้ยจักจั่นเขียวข้าว *Nephotettix cincticeps* Uhler, *Nephotettix virescens* Distant, และ *Nephotettix nigropictus* Stal. สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบสีแสดของข้าวได้ (Nasu และคณะ, 1967; Ou, 1985) ส่วนเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคยอดฝอยของงา (phyllody) ที่พบในประเทศอินเดีย สามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยจักจั่น *Orocius albicinctus* (Prasad และ Sahambi, 1982;

Nakashima และคณะ, 1995) ในขณะที่ประเทศอิหร่าน โรคยอดฝอยของงาสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาได้โดยเพลี้ยจักจั่น *Neoaliturus baematoceps* (Salehi และ Izadpanah, 1992; Nakashima และคณะ, 1995) นอกจากนี้ Shiomi และ Sugiura (1984) ได้อาศัยจำนวนชนิดของพืชอาศัยที่ต่างกัน เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาสายพันธุ์ที่มีการถ่ายทอดได้โดยแมลงเพลี้ยจักจั่น *Macrosteles orientalis* Virvaste

ส่วนการจำแนกโดยดูลักษณะอาการตามธรรมชาติที่พบในพืชนั้น ดูได้จากอาการที่ปรากฏในพืชที่เป็นโรค (Shiomi,1988)เช่นอาการของพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา มักจะแสดงอาการใบขาวหรืออาการแตกพุ่มฝอย ส่วนพืชที่เป็นโรคที่แสดงอาการใบด่าง มักจะมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส (ธีระ, 2532) ซึ่งการวินิจฉัยโดยดูจากลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรคและการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ มีข้อจำกัดเนื่องจาก ระยะเวลาของการบ่มเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาห่ะ และในต้นพืชจะใช้เวลานานมาก จึงทำให้ไม่นิยมใช้วิธีนี้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา (Nakashima และคณะ, 1991)

5.4 การตรวจโดยใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยา

การตรวจและวินิจฉัยทางโมเลกุลโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) มีประโยชน์มากสำหรับการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา (Kirkpatrick และคณะ, 1987) ดังเช่นการศึกษาของ Clark และคณะ (1989) ที่มีการผลิตโพลีโคลนอล แอนติเซรั่ม (polyclonal antiserum) และโมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) สำหรับใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในพืชที่เป็นโรค โดยประสบผลสำเร็จในการผลิตแอนติเซรั่มที่เจาะจงกับแอนติเจนที่เป็นเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยและโรคใบขาวของหญ้าแพรก ซึ่งแอนติเซรั่มที่ผลิตได้จากหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว แต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพืชอื่นที่นำมาทดสอบ รวมทั้งกับอ้อยที่แสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้ ในทำนองเดียวกัน แอนติเซรั่มที่ผลิตได้จากอ้อยที่เป็นโรคใบขาว สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวและอ้อยที่เป็นโรคกอตะไคร้ได้เท่านั้น นอกจากนี้ Sarindu และ Clark (1993) ได้ทำการผลิตแอนติบอดี เพื่อใช้จำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวของอ้อยและหญ้าแพรก โดยวิธีอีไลซา (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) โดยสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบขาวในอ้อย หญ้าแพรก รวมทั้งพืชตระกูลหญ้าชนิดอื่นๆที่แสดงอาการใบขาวได้

5.5 การตรวจโดยวิธีดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe)

การตรวจโดยวิธีดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ และให้ผลไวมากในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาทั้งในพืชและแมลงพาหะ (Davis และคณะ, 1988; Kirkpatrick และคณะ, 1990; Lee และคณะ, 1991; Harrison และคณะ, 1992; Harrison และคณะ, 1994) ทั้งยังใช้แยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมา (Kuske และคณะ, 1991) และจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ (Lee และ Davis, 1988; Chen และคณะ, 1992) วิธีนี้ทำโดยการโคลนโมเลกุลของเชื้อไฟโตพลาสมาหรือชิ้นส่วนโครโมโซมของดีเอ็นเอ ซึ่งสกัดจากพืชหรือแมลงที่มีการติดเชื้อไฟโตพลาสมา (Kirkpatrick และคณะ, 1987; Kollar และคณะ, 1990) แล้วนำมาทำดีเอ็นเอตัวตรวจปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น ซึ่งดีเอ็นเอตัวตรวจที่ผ่านการโคลนแล้ว ต้องมีเบสเป็นคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิค (genomic) หรือ extrachromosomal DNA ของตัวอย่างที่จะนำมาตรวจ (Firrao และคณะ, 1993)

Nakashima และคณะ (1994) และ Wongkaew และคณะ (1995) ได้มีการค้นพบ extrachromosomal DNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคใบขาวของอ้อย ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อนี้ที่ถูกโคลนแล้ว สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยเป็นโรคใบขาว และเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆที่ทำให้พืชตระกูล gramineae แสดงอาการใบขาว ซึ่งดีเอ็นเอตัวตรวจนี้สามารถทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อยที่เป็นโรคด้วย

และจากการตรวจโดยวิธีดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ทำให้ทราบว่า extrachromosomal DNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย, เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบสีแสดงของข้าว และเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆที่ทำให้เกิดอาการขาวหรือเหลืองกับพืชตระกูล gramineae มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันร่วมกันอยู่ ซึ่งต่างจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคยอดฝอยของงาและเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคเหลืองของแอสเตอร์ (Klinkong และ Seemuller, 1993; Nakashima และคณะ, 1994; Nakashima และ Hayashi, 1995) แต่ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจมีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีอยู่ปริมาณน้อยในพืชอาศัย หรือไม่สามารถตรวจพืชอาศัยที่มีการเข้าทำลายของเชื้อไฟโตพลาสมาหลายชนิดในพืชอาศัยต้นเดียวกันได้ (Ahrens และ Seemuller, 1992)

5.6 การตรวจโดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรืออีกชื่อว่า In vitro enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (Template DNA), เอนไซม์ DNA Polymerase, Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ deoxyadenosine triphosphate (dATP), deoxycytidine triphosphate (dCTP), deoxyguanosine triphosphate (dGTP) และ deoxythymidine triphosphate (dTTP), primer และสารละลายบัฟเฟอร์ โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ (วีระพงศ์, 2536)

ปฏิกิริยาของ PCR ในแต่ละรอบมี 3 ขั้นตอน ได้แก่ Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส, Annealing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ primer เกาะจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม โดยลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส และ Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก primer ในทิศทางจากปลาย 5' ไป 3' ซึ่งอุณหภูมิในขั้นนี้อยู่ในช่วง 70 ถึง 75 องศาเซลเซียส (Innis และ Gelfand, 1990)

ในการทำ PCR อาจเกิดความผิดพลาดต่างๆอันเนื่องมาจากหลายสาเหตุด้วยกัน สาเหตุแรกคือ การเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งเกิดจากอุณหภูมิในช่วง annealing ต่ำไป, ปริมาณแมกนีเซียมและเอนไซม์ DNA polymerase ไม่เหมาะสม เป็นต้น อีกสาเหตุหนึ่งคือ ไม่สามารถเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ สาเหตุนี้เกิดเนื่องจาก ความไม่เหมาะสมของปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียม, โปรแกรมอุณหภูมิในปฏิกิริยา, เวลาในแต่ละช่วงของปฏิกิริยา, primer รวมทั้งเกิดจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มขยายมีขนาดความยาวมากเกินไป (Innis และ Gelfand, 1990)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคของพืชอย่างกว้างขวาง โดยสามารถใช้ตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรีย รวมทั้ง mollicute ซึ่งมีกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมารวมอยู่ด้วย (Ahrens และ Seemuller, 1992) เทคนิค PCR ไม่เพียงแต่มีความไวและง่ายในการตรวจสูงแล้ว ยังสามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีอยู่ปริมาณน้อยในพืชอาศัยและแมลงพาหะได้ โดย Vega และคณะ (1993) ได้ทำการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีปริมาณต่ำในเพลี้ยจักจั่น ซึ่งดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้เทคนิค PCR ได้

การนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมามาเพิ่มปริมาณ โดยใช้ชุด primer ต่างๆ ที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ไม่ได้เฉพาะเจาะจงกับยีนส่วนใดส่วนหนึ่ง (Jarausch และคณะ, 1994; Smart และคณะ, 1996) หรือใช้ primer ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาภายในยีน 16s rRNA สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ (Lee และคณะ, 1993) และถ้าใช้ primer ที่มีความเจาะจงในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ละกลุ่ม จะสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ละกลุ่มได้ (Deng และ Hiruki, 1991; Goodwin และคณะ, 1994; Lorenz และคณะ, 1995)

อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมามีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะออกแบบชุด primer เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้สำหรับการจำแนกกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เจาะจงได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาชุด primer ที่มาจากยีนส่วน Intergenic spacer (IGS) ที่มีตำแหน่งอยู่ระหว่างยีน 16s และ 23s rRNA ในส่วนของ rRNA operon ซึ่งโดยทั่วไป ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน IGS มีความแปรปรวนสูงกว่าในยีนส่วน 16s (Barry และคณะ, 1991) เนื่องจากส่วน intergenic spacer เป็นส่วนที่ไม่มีการถอดรหัสของยีน (noncoding segment) โดยพบระดับความแปรปรวนของยีนสูงมาก ในขณะที่ส่วน 16s rRNA เป็นส่วนที่มีการถอดรหัสของยีน (coding segment) ซึ่งยีนจะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง (Hoy, 1994) ดังนั้นการใช้ primer ที่พัฒนามาจากยีนส่วน Intergenic spacer จึงเหมาะสมต่อการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ยิ่งกว่านั้นยีนส่วน Intergenic spacer ยังมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นกว่ายีนส่วน 16s rRNA มาก จึงเป็นการง่ายในการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (Barry และคณะ, 1991; Smart และคณะ, 1996) นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิค PCR ที่เรียกว่า nested PCR (Davies และคณะ, 1994; Berges และคณะ, 1997) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่พิเศษ โดยสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการที่มีอยู่ปริมาณน้อยให้ได้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น และลดจำนวนผลผลิตของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายให้เหลือน้อยที่สุด ทำให้ได้วิธีการที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคของพืช ซึ่งเทคนิค nested PCR เกิดจากการทำปฏิกิริยา PCR เป็น 2 ขั้นตอน โดยใช้ primer 2 คู่ ซึ่งในปฏิกิริยาขั้นแรกจะใช้ primer ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 20 ถึง 25 รอบ ส่วนในปฏิกิริยาขั้นที่สอง จะใช้ผลผลิต PCR จากปฏิกิริยาขั้นแรกเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และใช้ primer ที่มีตำแหน่งอยู่ถัดเข้ามาทางด้านในของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาขั้นแรก แล้วนำมาทำปฏิกิริยา PCR เป็นจำนวน 25 ถึง 30 รอบ จะได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูง และมีจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น (วัชรี, 2537) Alma และ

คณะ (1997) ได้ทำการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยของแมลง *Scophoideus titanus* ที่เลี้ยงบนต้นถั่ว *Vicia faba* ปกติที่ปราศจากเชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ primer ที่พัฒนามาจากยีนส่วน 16s rRNA พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาได้ในไข่ ตัวอ่อนที่ฟักออกมาใหม่ๆ ตัวอ่อนวัย 4 ตัวอ่อนวัย 5 และตัวเต็มวัยได้ ในขณะที่การตรวจโดยใช้วิธี PCR ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาได้

5.7 การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยการวิเคราะห์รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลงพาหะ โดยเทคนิค PCR มีหลายกรณีที่ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้จากการใช้ primer ที่พัฒนามาจากยีนส่วน 16s rRNA ไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับพืชออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆได้ ดังนั้นการแยกกลุ่มและความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาจึงต้องอาศัยการวิเคราะห์ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Lee และคณะ, 1991; Ahrens และ Seemuller, 1992) หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) (สุรินทร์, 2536)

การวิเคราะห์ RFLP เป็นวิธีที่ใช้ในการจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคกับพืช ซึ่ง Davis และ Lee (1993) และ Ahrens และ Seemuller (1992) ได้วินิจฉัยและจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยทำการวิเคราะห์ RFLP ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในยีนส่วน 16s rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ นอกจากนี้การวิเคราะห์ RFLP สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ ดังเช่นการศึกษาของ Schneider และคณะ (1993) ที่ทำการวิเคราะห์ RFLP ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของหญ้าแพรกและอ้อย โดยพบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของหญ้าแพรกมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lorenz และคณะ (1995) ที่ใช้การวิเคราะห์ RFLP แยกความสัมพันธ์และความเหมือนกันของสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบม้วนของแอปเปิล และแพร์ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Rsa* I ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณจากยีนส่วน rRNA ซึ่งพบว่าทุกสายพันธุ์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบม้วนกับแอปเปิลและแพร์ แสดงรูปแบบการตัดของแต่ละเอนไซม์เหมือนกัน ซึ่งยืนยันว่า เชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในแอปเปิลและแพร์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

ในปัจจุบันมีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจโดยวิธีไฮบริไดเซชั่นร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ RFLP จากผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจโดยวิธีไฮบริไดเซชั่นสามารถใช้สำหรับการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสายพันธุ์ต่างๆที่มีความสัมพันธ์กันออกเป็นกลุ่มใหญ่ และการวิเคราะห์ RFLP ของผลิตภัณฑ์ PCR ใช้สำหรับการแยกความแตกต่างและจัดจำแนกภายในกลุ่มของสายพันธุ์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Lee และคณะ, 1991)