ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) **ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย**

หลังจากเก็บตัวอย่างพืชชนิดต่างๆ และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ในแปลงอ้อย มาทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง พบว่า ทั้งดีเอ็นเอของพืชและแมลงอยู่ในสภาพสมบูรณ์ไม่แตกหักหรือขาด โดยดีเอ็นเอของพืชชนิดต่างๆที่สกัดได้ มีสีขาวหรือขาวออกเหลือง ดีเอ็นเอมีลักษณะเหนียวเล็กน้อย ส่วนดีเอ็นเอของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ที่สกัดได้มีสีขาว หลังจากทำการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชและแมลงแล้ว จึงได้ทำการปรับสภาพของปฏิกิริยา PCR ให้มีความเหมาะสมเพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้แก่ ระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR ซึ่งจากการพัฒนาสภาพของปฏิกิริยา PCR เพื่อให้เหมาะสมกับ primer แต่ละตัวที่ใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลง พบว่า สภาพของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมมีดังนี้

1.1 **การคัดเลือก** primer

1.1.1 การใช้ primer ชุดต่างๆ สำหรับการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างพืชชนิดต่างๆนั้น พบว่า ทุกชุดของ primer ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันดังนี้

1. Universal primer (U 1, U 2) เป็น primer ที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาและเชื้อโรคพืชชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่เชื้อไฟโตพลาสมาได้ โดยเป็น primer ที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ U1 : 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ U2 : 5'-3' AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ universal primer นี้มีขนาด 1.35 kb

2. Specific MLO primer เป็น primer ที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวและเชื้อไฟโตพลาสมาจากพืชชนิดอื่นๆได้ ซึ่ง specific MLO primer ที่ใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืช มี 2 ชุดคือ ชุดที่ 1 primer MLO 1, MLO 3 เป็น primer ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s

rRNA และ Intergenic spacer region โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ MLO 1 : 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO 3 : 5'-3' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ primer MLO 1 และ MLO 3 มีขนาด 654 bp ส่วนชุดที่ 2 คือ primer MLO 1, MLO 7 เป็น primer ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ MLO 1 : 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO 7 : 5'-3' CGT CCT TCA TCG GCT CTT ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ primer MLO 1 และ MLO 7 นี้มีขนาด 810 bp

1.1.2 primer ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่น โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ต้องใช้ specific MLO primer เนื่องจากต้องการตรวจการเป็นพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวของอ้อยในแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) และจากการใช้ primer ที่สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวได้ คือ ชุด primer U 1, U 2 ชุด primer MLO 1, MLO 3 และชุด primer MLO 1, MLO 7 มาทำการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่น พบว่า primer ทุกชุดที่ใช้ ไม่สามารถตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงได้โดยตรง จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่น โดยใช้เทคนิค nested PCR ซึ่งเทคนิคนี้สามารถลดจำนวนผลผลิตของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายให้เหลือน้อยที่สุด เนื่องจากใช้ผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งที่สอง (วัชรี, 2536) และได้มีการใช้เทคนิค nested PCR สำหรับตรวจเชื้อที่พบมีปริมาณน้อยในตัวอย่างของพืชหรือแมลง ดังเช่น การศึกษาของ Marcone และคณะ (1996) ที่สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในพืช *Spatium junceum* ที่แสดงอาการยอดฝอย โดยใช้เทคนิค nested PCR เช่นเดียวกับการศึกษาของ Alma และคณะ (1997) ที่สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาได้ในตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของเพลี้ยจักจั่น *Scaphoideus titanus* ด้วยเทคนิค nested PCR โดยใช้ primer ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน 16s rRNA

ในการทดลองนี้ มี primer ที่ใช้สำหรับตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่น 2 ชุด ได้แก่

1. ชุด primer U 1, MLO 7 ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งที่สองด้วยชุด primer MLO 1, MLO 3 โดย ชุด primer U 1, MLO 7 เป็น primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ U1 : 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ MLO 7 : 5'-3' CGT CCT TCA TCG GCT CTT และชุด primer MLO 1, MLO 3 เป็น primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ Intergenic spacer region โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ MLO1 : 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO3 : 5'-3' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่นที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยา nested PCR จากการใช้ชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 3 มีขนาด 654 bp

2. ชุด primer MLO X, MLO Y ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งที่สองด้วยชุด primer P 1, P 2 โดย ชุด primer MLO X, MLO Y เป็น primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไท์คือ MLO X : 5'-3' GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC และ MLO Y : 5'-3' GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC และชุด primer P1, P2 เป็น primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไท์คือ P1 : 5'-3' GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG และ P2 : 5'-3' GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่นที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยา nested PCR จากการใช้ชุด primer MLO X, MLO Y และชุด primer P 1, P 2 มีขนาด 218 bp

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่น โดยปฏิกิริยา nested PCR ด้วยชุด primer MLO X. MLO Y และชุด primer P 1, P 2 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง ได้ง่ายกว่าการใช้ชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1,

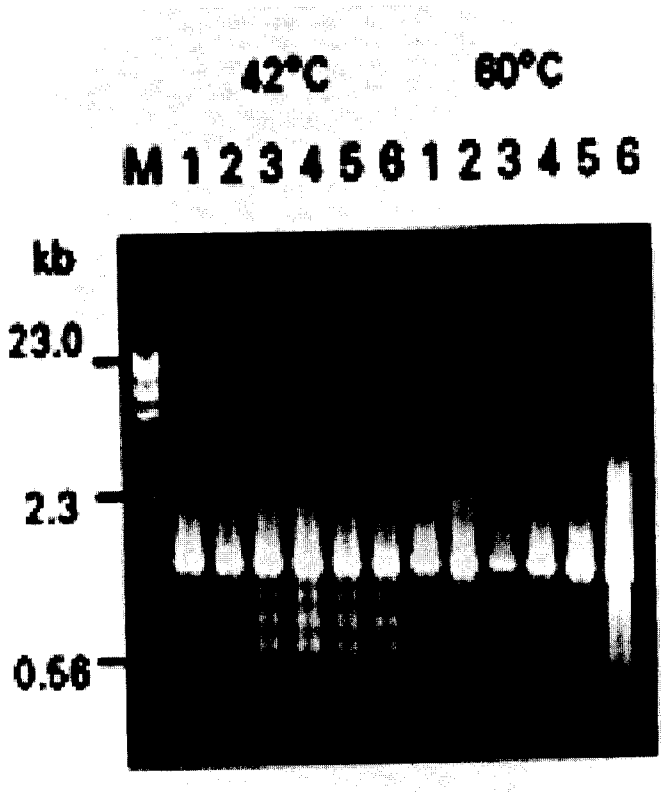
MLO 3 เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยา nested PCR จากการใช้ชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 3 มีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เพิ่มปริมาณได้ในปฏิกิริยา nested PCR จากการใช้ชุด primer MLO X, MLO Y และชุด primer P 1, P 2 ซึ่งมีผลเนื่องมาจากในการสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอน Primer extension นั้น นิวคลีโอไทด์ที่สร้างใหม่จะเกาะกับนิวคลีโอไทด์เดิมที่เป็นคู่สม ซึ่งเชื่อมด้วยพันธะที่อาศัยเอนไซม์ Taq polymerase เป็นตัวช่วย ถ้าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง primer ทั้งสองที่เข้าไปจับมาก เอนไซม์ Taq polymerase จะไม่พอใช้สำหรับการสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้มีน้อยตามไปด้วย (Innis และ Gelfand, 1990)

1.2 **ระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์** (magnesium chloride) **ในปฏิกิริยา** PCR

ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ เป็นปัจจัยสำคัญที่ควรปรับให้เหมาะสมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ถ้าความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ไม่เหมาะสม อาจทำให้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย หรือ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ (Innis และ Gelfand, 1990) ในการทดลองได้ปรับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมกับ primer แต่ละชุดที่ใช้ โดยใช้ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5-4 มิลลิโมลาร์ ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในแต่ละ primer คือ

1.2.1 Universal primer (U 1, U 2) มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลงคือ 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยแสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่างชัดเจน (ภาพที่ 5) ส่วนผลของความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ เช่นเดียวกับสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์แต่มีแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (non specific amplification) เกิดขึ้น

1.2.2 Specific MLO primer (MLO 1, MLO 3) มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา



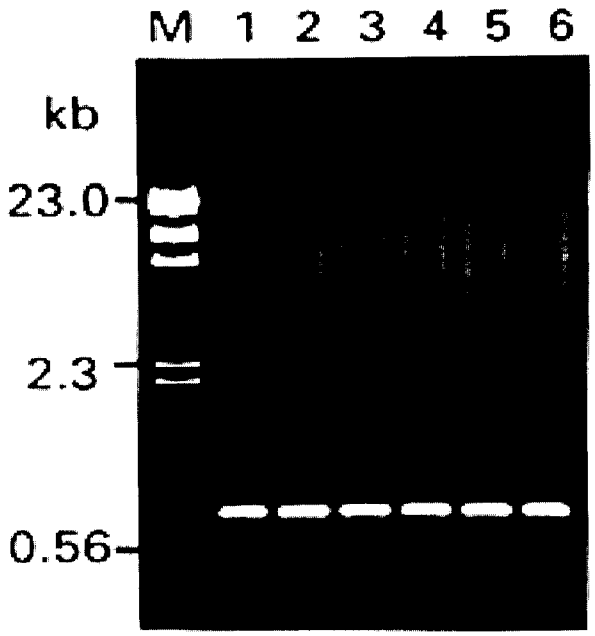
ภาพที่ 5 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer (U 1 : 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ U 2 : 5'-3' AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC) ที่มีอุณหภูมิ ในช่วง annealing ที่ 42 และ 60 องศาเซลเซียส และมีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 0.8% agarose gel แถบ 1-6 แสดงความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และแถบ M คือ λ *Hind* III marker

สำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลง ตั้งแต่ 1.5-4 มิลลิโมลาร์ โดยทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่างชัดเจน (ภาพที่ 6) ซึ่งในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลงในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5 มิลลิโมลาร์

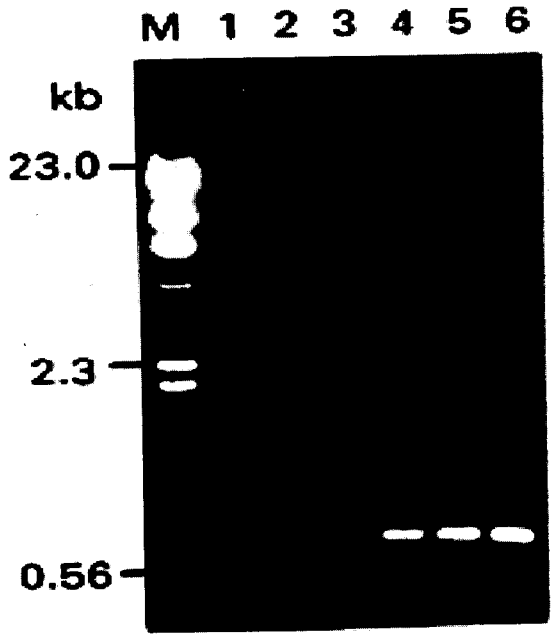
1.2.3 Specific MLO primer (U 1, MLO 7 และ MLO 1, MLO 7) มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลง ตั้งแต่ 1.5-4 มิลลิโมลาร์ โดยทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่างชัดเจน ซึ่งในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลง ในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ ชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 7 จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5 มิลลิโมลาร์

1.2.4 Specific MLO primer (MLO X, MLO Y) ที่ใช้มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง ตั้งแต่ 3-4 มิลลิโมลาร์ โดยทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่างชัดเจน แต่ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 4 มิลลิโมลาร์ จะแสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 7) ส่วนสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ ดังนั้นในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง ในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ชุด primer MLO X, MLO Y จะใช้สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 4 มิลลิโมลาร์

1.2.5 Specific MLO primer (P1, P2) มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสำหรับใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง ตั้งแต่ 1.5-4 มิลลิโมลาร์ โดยทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่าง



ภาพที่ 6 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 (MLO 1 : 5'- 3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO 3 : 5'-3' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC) ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1% agarose gel แถบ 1-6 แสดงความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แถบ M คือ λ *Hind* III marker



ภาพที่ 7 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y (MLO X : 5'-3' GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC และ MLO Y : 5'- 3' GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC) ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1% agarose gel แถบ 1-6 แสดงความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แถบ M คือ λ *Hind* III marker

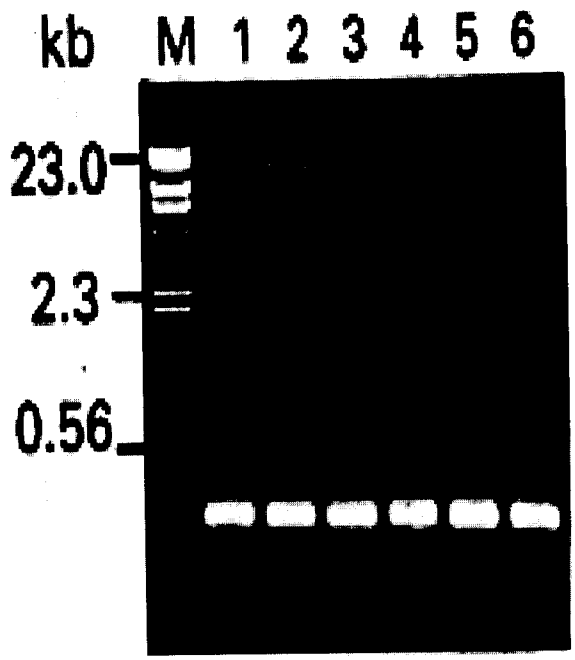
ชัดเจน (ภาพที่ 8) ซึ่งในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงในปฏิกิริยา PCR จากการใช้ชุด primer P 1, P 2 จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5 มิลลิโมลาร์

1.3 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR

โปรแกรมต่างๆของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ อุณหภูมิของช่วง annealing และจำนวนรอบของปฏิกิริยา มีความสำคัญในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยา PCR โดยอุณหภูมิของช่วง annealing ช่วยทำให้ primer จับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยทั่วไปอุณหภูมิของ annealing ในช่วง 55 ถึง 72 องศาเซลเซียส จะให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาดีที่สุด และอุณหภูมิ annealing ที่สูง จะสามารถป้องกันความผิดพลาดในการเกาะจับของ primer กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ทั้งยังลดความผิดพลาดในการสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของ primer ในช่วง extension ได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำ (Mullis และคณะ, 1986; Mullis และ Faloona, 1987) ส่วนจำนวนรอบที่จะใช้ในปฏิกิริยา PCR ขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายเมื่อปัจจัยอื่นๆเหมาะสม ถ้าจำนวนรอบของปฏิกิริยาน้อยเกินไป ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ก็มีน้อยตาม Mullis และคณะ (1986) ทำการศึกษาพบว่า การใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR เกิน 40 รอบ ทำให้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์ PCR สอดคล้องกับการศึกษาของ Ahrens และ Seemuller (1992) ที่พบว่า การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primer เป็นจำนวน 40 รอบ ทำให้เกิดแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายในตัวอย่างของพืชปกติ

ในการทดลอง พบว่า อุณหภูมิของช่วง annealing และจำนวนรอบของปฏิกิริยา ที่มีความเหมาะสมกับ primer แต่ละชนิดคือ

1.3.1 Universal primer (U 1, U 2) และ specific MLO primer 3 ชุด คือ ชุด primer MLO 1, MLO 3 ชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 7 มีโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืช โดยแสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวชัดเจน (ภาพที่ 5 และ 6) คือเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นจำนวน 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีในรอบแรก ในรอบต่อๆไปใช้เวลา 60 วินาที, ช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และในรอบสุดท้าย เพิ่มเวลาเป็น 10 นาที



ภาพที่ 8 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer P 1, P 2 (P 1 : 5'-3' GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG และ P 2 : 5'-3' GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC) ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ต่างกัน ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1% agarose gel แถบ 1-6 แสดงความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ แถบ M คือ λ *Hind* III marker

นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืช โดยปฏิกิริยา PCR จากการใช้ชุด universal primer (U 1, U 2) โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง annealing เป็น 42 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ แต่ตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาไม่ชัดเจน และเกิดแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (non specific amplification) เกิดขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืช โดยปฏิกิริยา PCR จากการใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง annealing เป็น 50 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 50 และ 55 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ชัดเจน แต่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดขึ้นน้อยกว่า ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

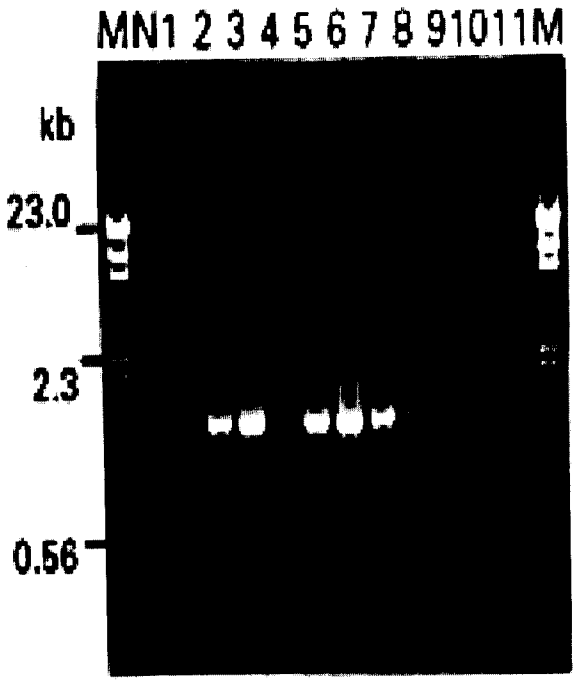
1.3.2 Specific MLO primer (MLO X, MLO Y) มีโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง โดยแสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่างชัดเจน (ภาพที่ 7) คือ เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นจำนวน 37 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย ช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีในรอบแรก รอบต่อๆไปใช้เวลา 60 วินาที, ช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และในรอบสุดท้าย เพิ่มเวลาเป็น 10 นาที นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง โดยปรับเปลี่ยนจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรกในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y เป็นจำนวน 30 รอบ และนำผลิตภัณฑ์ PCR ในครั้งแรกนี้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ของเชื้อไฟโตพลาสมาสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สองในปฏิกิริยา nested PCR ด้วยชุด primer P 1, P 2 พบว่า ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ แต่เมื่อเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยาเป็นจำนวน 37 รอบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก สามารถเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ในปฏิกิริยา nested PCR ด้วยชุด primer P 1, P 2 ได้ โดยแสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่างชัดเจน

1.3.3 Specific MLO primer (P 1, P 2) มีโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง โดยแสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวอย่างชัดเจน (ภาพที่ 8) คือเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นจำนวน 40 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย ช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีในรอบแรก รอบต่อๆไปใช้เวลา 60 วินาที, ช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และในรอบสุดท้าย เพิ่มเวลาเป็น 10 นาที นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง annealing เป็น 60 และ 65 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 60 และ 65 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ แต่มีแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (non specific amplification) เกิดขึ้นมาก ส่วนการปรับเปลี่ยนจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer P 1, P 2 เป็นจำนวน 30 และ 35 รอบ หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก โดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y เป็นจำนวน 37 รอบ พบว่า สามารถเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงได้ แต่แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจนเท่ากับการใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาเป็นจำนวน 40 รอบ

2. การตรวจพืชอาศัย และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR)

2.1 การตรวจพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา

จากการตรวจพืชที่เก็บจากสถานที่ต่างๆตามตารางที่ 1 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุด universal primer จากส่วนของยีน 16s rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่า ชุด universal primer สามารถใช้ตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาได้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (ภาพที่ 9) คือ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย หญ้ามาเลเซีย หญ้าเจ้าชู้ หญ้าขน ผักปราบและตะไคร้หอมที่แสดงอาการใบขาว และอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ โดยพืชที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer จะแสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีขนาด 1.35 kb ส่วนในอ้อยปกติและพืชที่แสดงอาการใบด่างอันเนื่องมาจากเชื้อไวรัส คือ อ้อยที่แสดงอาการใบด่างและเซ่งใบมนที่แสดงอาการใบด่าง ไม่แสดงแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา (ภาพที่ 9 และตารางที่ 2) สอดคล้องกับการศึกษาของ



ภาพที่ 9 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดต่างๆที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer (U 1: 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ U 2 : 5'-3' AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC) ที่แสดง โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 0.8% agarose gel แถบ 1-11 ได้แก่ แถบ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยปกติ, แถบ 2 อ้อยที่แสดงอาการใบขาว แถบ 3 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ แถบ 4 อ้อยแสดงอาการใบด่าง แถบ 5 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 6 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว แถบ 7 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว แถบ 8 หญ้ามาเลเซียแสดงอาการใบเหลือง แถบ 9 หญ้าเจ้าชู้แสดงอาการใบเหลือง แถบ 10 ผักปราบแสดงอาการใบเหลือง และ แถบ 11 ตะไคร้หอมแสดงอาการใบเหลือง ตามลำดับ แถบ M และ N คือ λ *Hind* III marker และ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลปฏิกิริยา PCR ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ที่ตรวจโดยใช้ชุด universal primer และชุด specific primer MLO 1, MLO 3

ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะอาการ	ผลปฏิกิริยา PCR	
			universal	MLO1,3
อ้อย	*Saccharum officinarum*	-แสดงอาการใบขาวแตกกอมากกว่าปกติ ลำต้นแคระแกรน	+	+
		-แตกกอมาก มีลักษณะเหมือนกอตะไคร้ทั้งที่ใบยังมีสีเขียวปกติ	+	+
		-อาการด่างเหลืองเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบ	-	-
		-อ้อยปกติที่ไม่แสดงอาการเป็นโรค	-	-
หญ้าข้อ	*Brachiaria distachya* (Linn.) Stapf.	-อาการใบขาวทั้งส่วนใบและลำต้น ข้อและช่อดอกสั้นกว่าปกติหรือไม่ออกดอก	+	+
หญ้าแพรก	*Cynodon dactylon* (Linn.) Pers.	-อาการใบขาวทั้งใบและลำต้น	+	+
หญ้าปากควาย	*Dactyloctenium aegyptium* (Linn.) Beauv.	-อาการใบขาวทั้งใบและลำต้น	+	+
หญ้ามาเลเซีย	*Axonopus compressus* (Swartz) Beauv.	-อาการเหลืองถึงขาวทั้งใบและลำต้น	+	+

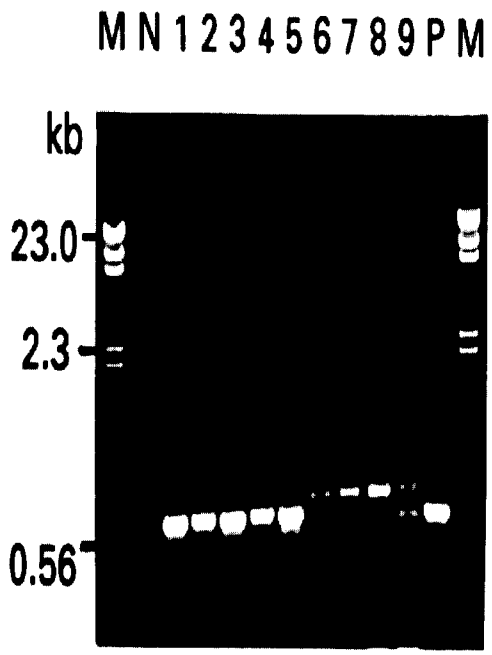
หมายเหตุ : + สามารถเกิดปฏิกิริยา - ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 2 ผลปฏิกิริยา PCR ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ที่ตรวจโดยใช้ชุด universal primer และชุด specific primer MLO 1, MLO 3 (ต่อ)

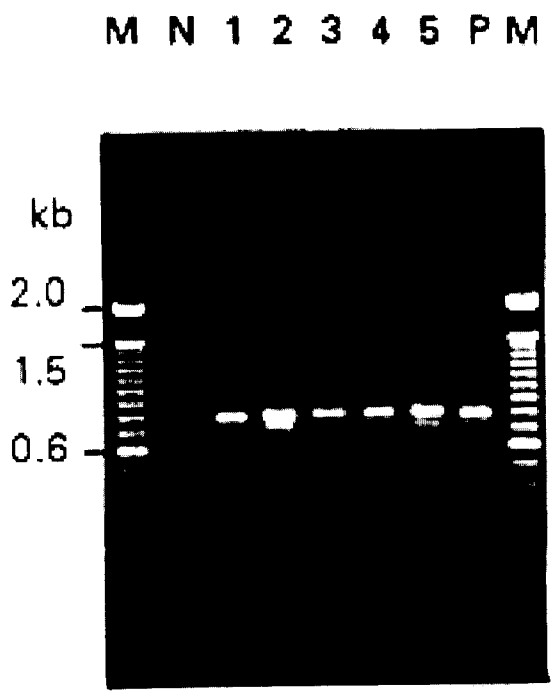
ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะอาการ	ผลปฏิกิริยา PCR	
			universal	MLO1,3
หญ้าเจ้าชู้	*Chrysopogon aciculatus* (Retz.) Trin.	-อาการเหลืองซีดทั้งใบและลำต้น	+	+
หญ้าขน	*Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf.	-อาการเหลืองซีดทั้งใบและลำต้น	+	+
ผักปราบ	*Cyanotis axillaris* R.&S.	-อาการเหลืองทั้งใบและลำต้น	+	+
ตะไคร้หอม	*Cymbopogon nardus* Rendle	-อาการใบเหลืองถึงขาวที่ส่วนใบและก้านใบ	+	+
เซ่งใบมน	*Melochia corchorifolia* Linn.	-อาการด่างเหลืองที่ส่วนใบ	-	-

หมายเหตุ : + สามารถเกิดปฏิกิริยา - ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา

Nakashima และคณะ (1996), Wongkaew และคณะ (1996), Marcone และคณะ (1997 (a), 1997 (b)) และ Wongkaew และคณะ (1997) ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาภายในยีน 16s rRNA ของพืชชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า อ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย และหญ้าเจ้าชู้ ที่แสดงอาการใบขาว มีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา เช่นเดียวกับการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ผลิตจาก extrachromosomal DNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา พบปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นได้ในตัวอย่างของอ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย และหญ้าเจ้าชู้ ที่แสดงอาการใบขาว (Klinkong และ Seemuller, 1993; Nakashima และคณะ, 1994; Nakashima และ Hayashi, 1995; Nakashima และคณะ, 1995; Wongkaew และคณะ, 1996) ส่วนการใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 ในปฏิกิริยา PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พบว่า ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเกิดขึ้นในพืชบางชนิด โดยสามารถตรวจพบแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีขนาด 654 bp ได้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือ อ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว ส่วนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่นๆที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ หญ้าเจ้าชู้ ผักปราบ หญ้ามาเลเซีย ตะไคร้หอม และหญ้าขน สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 654 bp และ 720 bp (ภาพที่ 10 และตารางที่ 2) เนื่องจากชุด primer MLO 1, MLO 3 เป็นชุด primer ที่มีความเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย เป็นไปได้ว่า หญ้าเจ้าชู้ ผักปราบ หญ้ามาเลเซีย ตะไคร้หอม และหญ้าขน มีเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลายมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งรวมเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วย สนับสนุนได้จากการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆ โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ผลิตจาก extrachromosomal DNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวกับอ้อย พบปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นได้ในตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย แต่ไม่พบปฏิกิริยาในตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบเหลืองและอาการแตกยอดฝอย (Nakashima และคณะ, 1994; Nakashima และ Hayashi, 1995) ส่วนการใช้ชุด primer MLO 1, MLO 7 ในปฏิกิริยา PCR สำหรับการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พบว่า สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีขนาด 810 bp ได้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว และอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ (ภาพที่ 11) เช่นเดียวกับการใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3



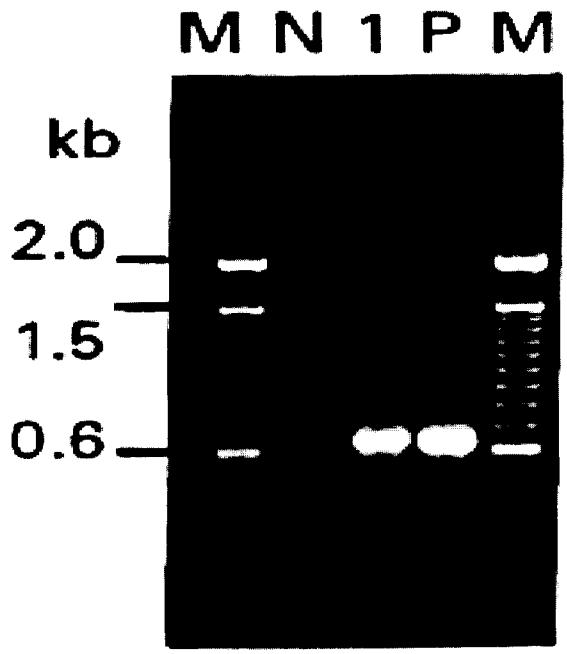
ภาพที่ 10 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆที่มีการเพิ่มปริมาณ ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 (MLO 1 : 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO 3 : 5'-3' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC) ที่แสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 0.8% agarose gel แถบ 1-9 ได้แก่ แถบ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แถบ 2 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ แถบ 3 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 4 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว แถบ 5 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว แถบ 6 หญ้าเจ้าชู้แสดงอาการใบเหลือง แถบ 7 หญ้ามาเลเซียแสดงอาการใบเหลือง แถบ 8 ผักปราบแสดงอาการใบเหลือง และแถบ 9 ตะไคร้หอมที่แสดงอาการใบเหลือง ตามลำดับ แถบ M N และ P คือ λ *Hind* III marker, ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control) และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (positive control) ตามลำดับ



ภาพที่ 11 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆที่มีการเพิ่มปริมาณ ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 7 (MLO 1: 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO 7: 5'-3' CGT CCT TCA TCG GCT CTT) ที่แสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 0.8% agarose gel แถบ 1-5 ได้แก่ แถบ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แถบ 2 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 3 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว แถบ 4 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว และแถบ 5 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ ตามลำดับ แถบ M N และ P คือ 100 bp ladder, ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control) และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (positive control) ตามลำดับ

2.2 **การตรวจแมลงพาหะ**

การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ที่พบในแปลงอ้อย โดยเทคนิค PCR จะให้ผลในการตรวจไม่ชัดเจน เมื่อเทียบกับการตรวจในพืชที่เป็นโรคเนื่องจากเพลี้ยจักจั่นมีปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยอยู่ในตัวน้อยมาก จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจ เพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวของแมลงได้อย่างชัดเจนและมีประสิทธิภาพขึ้น โดยทำการตรวจด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ชุด primer U 1, MLO 7 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรกและใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ซึ่งการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงทั้งสองครั้งนี้ ใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5 mM โดยสามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีขนาด 654 bp ได้ (ภาพที่ 12) สอดคล้องกับการศึกษาของ Nakashima และคณะ (1994) ที่ได้ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจไฮบริไดเซชั่นของ extrachromosomal DNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา แต่การตรวจโดยวิธีนี้ต้องใช้แมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) จำนวนมาก ไม่เหมือนกับวิธี nested PCR ที่สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาได้โดยใช้แมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) เพียงตัวเดียวเท่านั้น และเนื่องจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 3 ทำได้ยากเพราะขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีผลเนื่องมาจากในการสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอน Primer extension นั้น นิวคลีโอไทด์ที่สร้างใหม่จะเกาะกับนิวคลีโอไทด์เดิมที่เป็นคู่สม ซึ่งเชื่อมด้วยพันธะที่อาศัยเอนไซม์ Taq polymerase เป็นตัวช่วย ถ้าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง primer ทั้งสองที่เข้าไปจับมาก เอนไซม์ Taq polymerase จะไม่พอใช้สำหรับการสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้มีน้อยตามไปด้วย (Innis และ Gelfand, 1990) จึงได้มีการพัฒนาการตรวจด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และชุด primer P 1, P 2 สำหรับการเพิ่มปริมาณ



ภาพที่ 12 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงที่มีการเพิ่มปริมาณ ในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer U 1, MLO 7 (U 1 : 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ MLO 7 : 5'-3' CGT CCT TCA TCG GCT CTT) สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และชุด primer MLO 1, MLO 3 (MLO 1 : 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO 3 : 5'-3' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC) สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ที่แสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 0.8% agarose gel แถบ 1 ได้แก่ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) แถบ M N และ P คือ λ *Hind* III marker, ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control) และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (positive control) ตามลำดับ

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสำหรับครั้งแรกและครั้งที่สองที่ระดับ 4 และ 1.5 mM ตามลำดับ จากผลการตรวจโดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y และชุด primer P 1, P 2 ในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีขนาด 218 bp ได้ในทุกตัวที่นำมาตรวจ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13)

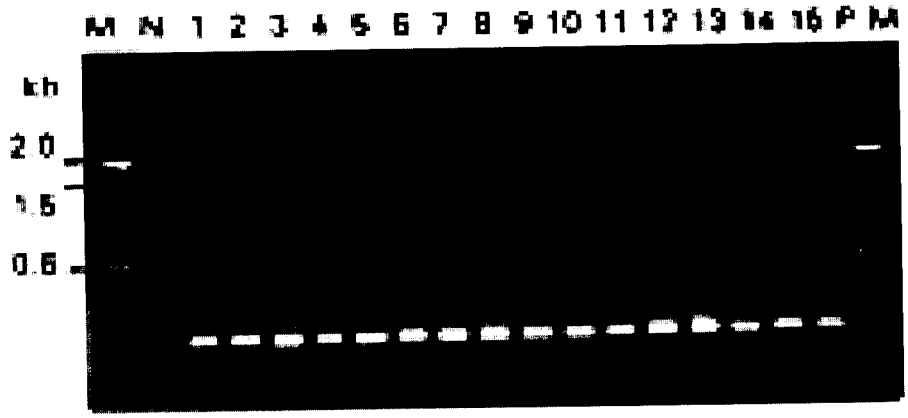
3. การศึกษาชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น

3.1 ศึกษาชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและพืชอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

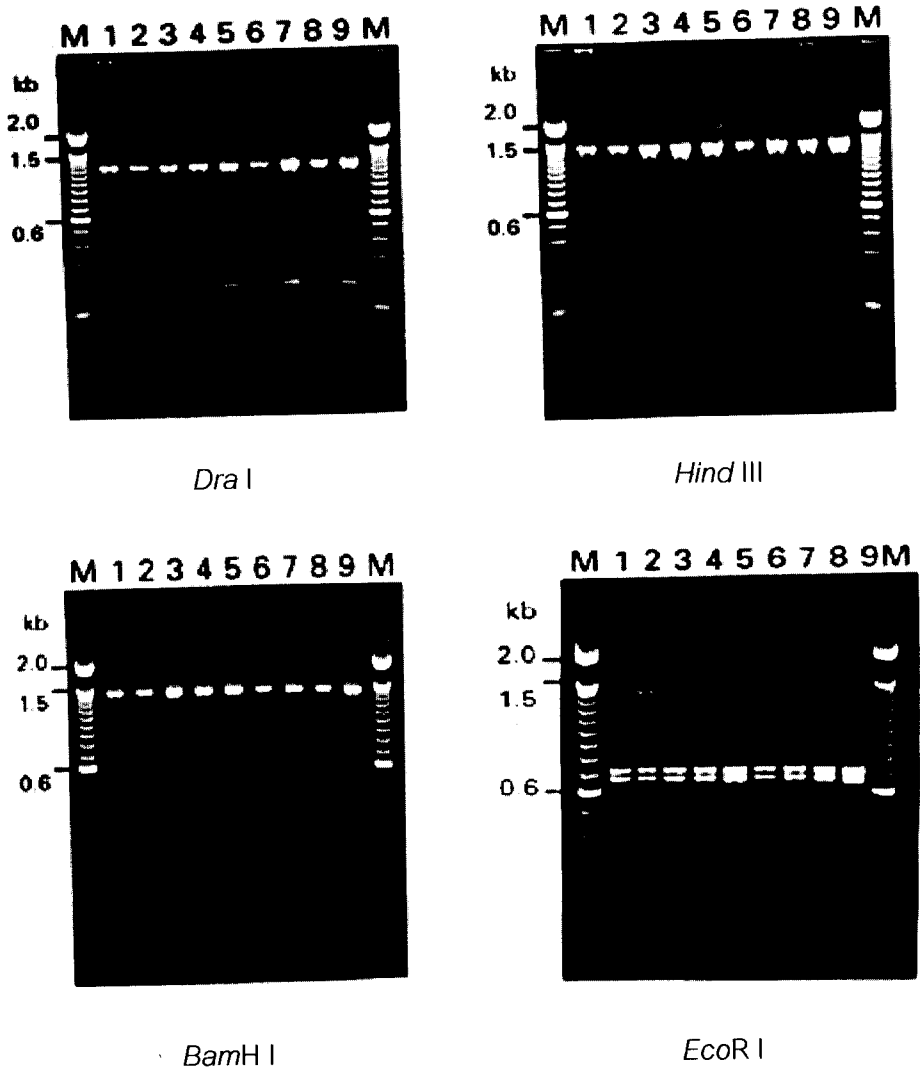
ตรวจชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและพืชอื่นๆ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ *Msp* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Acc* I, *Hpa* I, *Hpa* II, *Dra* I, *Xba* I, *Bgl* I, *EcoR* I, *Kpn* I, *Sal* I, *BamH* I, *Hind* III และ *Taq* I ตัดกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ และพืชที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย และตะไคร้หอม ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer และชุด specific MLO primer เพื่อตรวจรูปแบบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากพืชต่างๆ ดังกล่าว ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) ซึ่งได้ผลดังนี้

3.1.1 ชุด universal primer

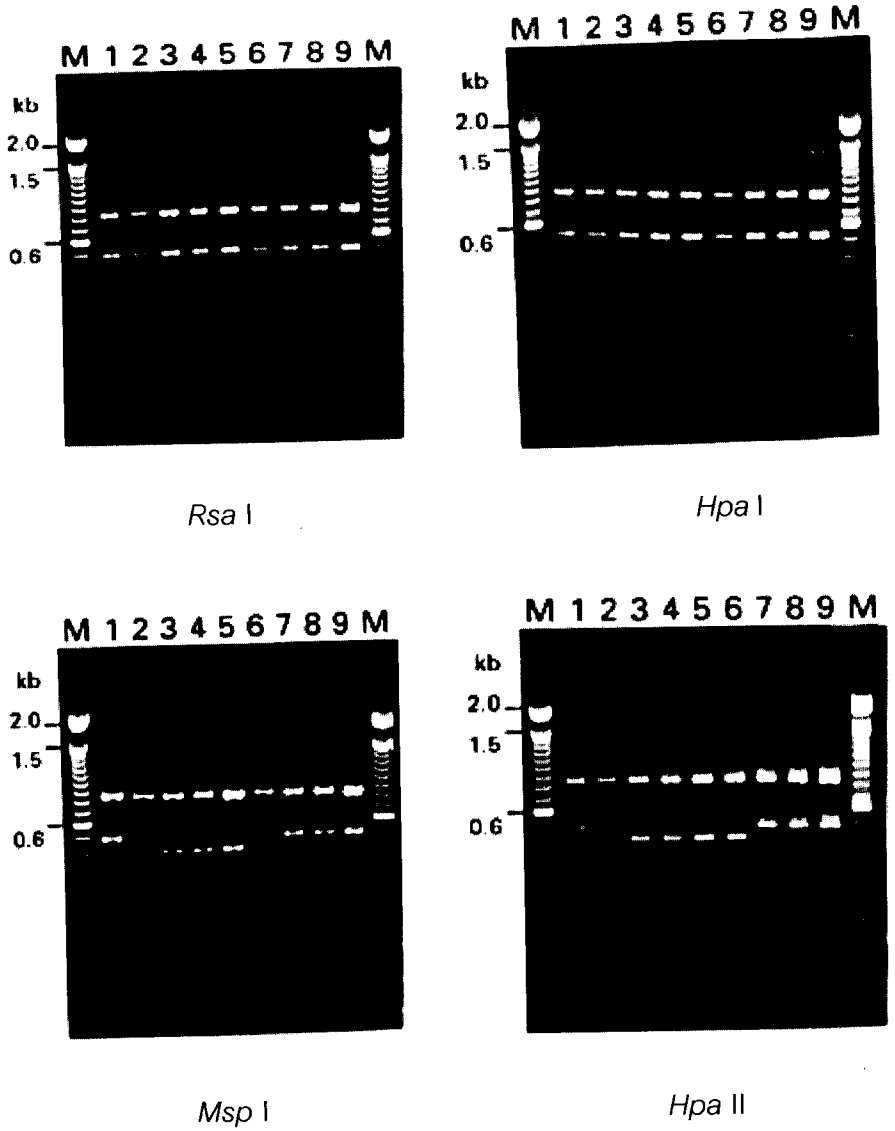
จากการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้และพืชที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย ขนาด 1.35 kb ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer ที่ได้จากส่วนของยีน 16s rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น พบว่า รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยชุด universal primer ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาว และอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I, *Hpa* I, *Dra* I, *Hind* III, *Bam*H I, และ *Eco*R I มีรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ไม่แตกต่างกันในแต่ละเอนไซม์ (ภาพที่ 14 และ 14.1) สนับสนุนได้จากการศึกษาของ



ภาพที่ 13 แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer MLO X, MLO Y (MLO X : 5'-3' GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC และ MLO Y : 5'- 3' GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC) สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรกและชุด primer P 1, P 2 (P1: 5'- 3' GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG และ P 2: 5'- 3' GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC) สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1.5% agarose gel แถบ 1-15 ได้แก่ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) แถบ M N และ P คือ 100 bp ladder, ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control) และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (positive control) ตามลำดับ



ภาพที่ 14 รูปแบบของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I, *Hind* III, *Bam*H I และ *Eco*R I หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer (U 1 : 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ U 2 : 5'-3' AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC) ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1.5% agarose gel แถบ 1-9 ได้แก่ แถบ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แถบ 2-6 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้จาก 5 สถานที่ แถบ 7 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 8 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว และแถบ 9 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว ตามลำดับ แถบ M คือ 100 bp ladder



ภาพที่ 14.1 รูปแบบของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I, *Hpa* I, *Msp* I และ *Hpa* II หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer (U 1 : 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ U 2 : 5'-3' AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC) ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1.5% agarose gel แถบ 1-9 ได้แก่ แถบ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แถบ 2-6 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้จาก 5 สถานที่ แถบ 7 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 8 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว และแถบ 9 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว ตามลำดับ แถบ M คือ 100 bp ladder

Viswanathan (1997) โดยแอนติเซรั่มที่ผลิตจากเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยที่แสดงอาการใบขาว สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ได้ แต่จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II และ *Msp* I นั้น พบว่า ทั้งเอนไซม์ *Hpa* II และ *Msp* I สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและหญ้าชนิดต่างๆ ที่แสดงอาการใบขาว ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer ได้ 2 แถบโดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 850 bp และ 500 bp ซึ่งต่างจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ ที่ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เป็น 2 แถบที่มีขนาด 850 bp และ 400 bp (ภาพที่ 14.1)

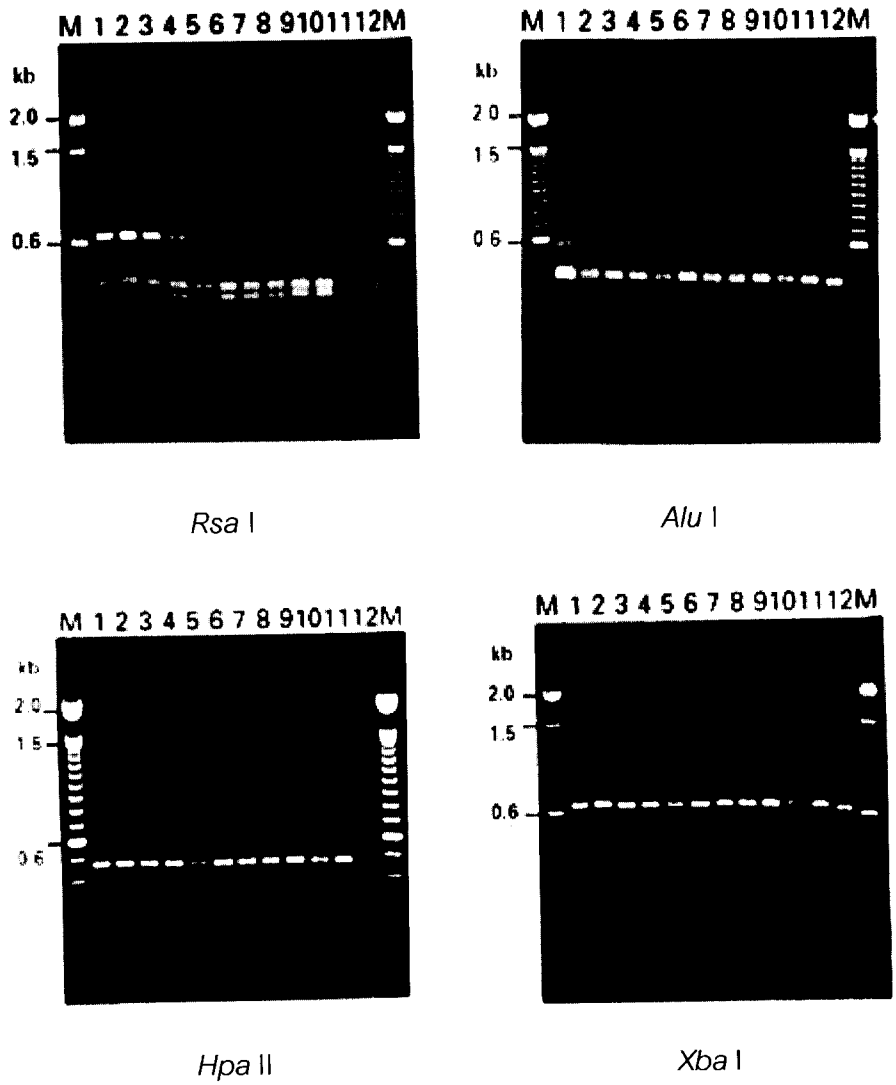
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและหญ้าที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่า รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยและหญ้าที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิดที่กล่าวข้างต้น ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละเอนไซม์ ยกเว้นเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Taq* I (ภาพที่ 14.2) โดยเอนไซม์ *Taq* I ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของหญ้าที่แสดงอาการใบขาว ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 แถบซึ่งมีขนาด 800 bp, 400 bp และ 150 bp ตามลำดับ ในขณะที่รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยที่แสดงอาการใบขาว ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Taq* I แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 900 bp และ 400 bp ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Marcone และคณะ (1997 b) ที่พบว่า รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ส่วนของยีน 16s rRNA ในปฏิกิริยา PCR มีความแตกต่างจากรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาว เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเอนไซม์ *Alu* I, *Sau* 3AI, *Mse* I, *Taq* I, *Hin* fI, และ *Hae* III ซึ่งความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดอาการใบขาวในอ้อยกับหญ้าชนิดต่างๆ ได้แก่ หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nakashima และคณะ (1996) ที่พบความแตกต่างระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและหญ้าชนิดต่างๆ เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชดังกล่าวที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ส่วนของยีน 16s rRNA ในปฏิกิริยา PCR ด้วยเอนไซม์ *Taq* I และ *Acc* I และในทำนองเดียวกันการตรวจโดยวิธีเซรุ่มวิทยาสามารถยืนยันความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยกับหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาวได้

ภาพที่ 14.2 รูปแบบของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด universal primer (U 1 : 5'-3' GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ U 2 : 5'-3' AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC) ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1.5% agarose gel แถบ 1-12 ได้แก่ แถบ 1-2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาวจาก 2 สถานที่ แถบ 3-9 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้จาก 7 สถานที่ แถบ 10 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 11 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว และแถบ 12 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว ตามลำดับ แถบ M คือ 100 bp ladder

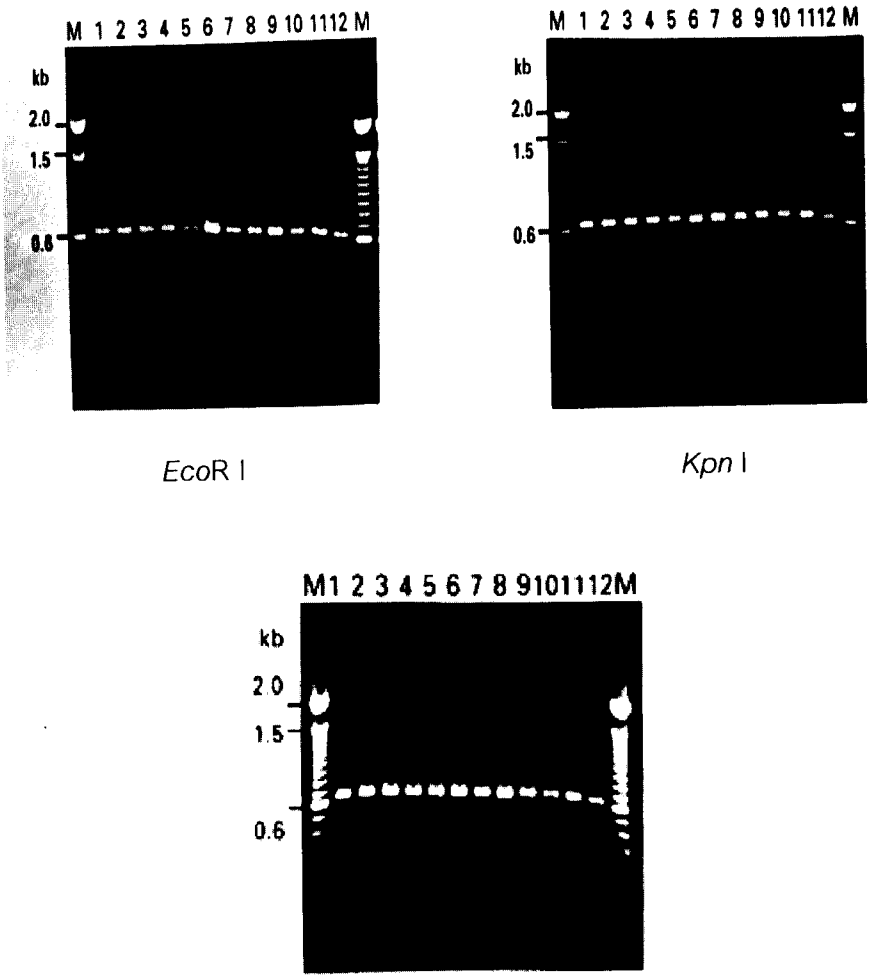
โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาของหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาวและอ้อยที่แสดงอาการใบขาว (Sarindu และ Clark, 1993)

3.1.2 ชุด specific MLO primer

จากการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้และพืชที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย และตะไคร้หอม ขนาด 654 bp ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด specific primer MLO 1, MLO 3 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ Intergenic spacer region มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ *Msp* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Acc* I, *Hpa* I, *Hpa* II, *Dra* I, *Xba* I, *Bgl* I, *Eco*R I, *Kpn* I, *Sal* I, *Bam*H I, *Hind* III และ *Taq* I พบว่า รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้และพืชที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย และตะไคร้หอม ที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยชุด primer MLO 1, MLO 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I และ *Alu* I มีรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ถูกตัดเหมือนกัน โดยเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I จะแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 350 bp และ 300 bp และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I จะแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 400 bp และ 200 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 15) ในขณะที่เอนไซม์ *Kpn* I, *Xba* I, *Bam* H I, *Eco*R I, *Hind* III และ *Acc* I ไม่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย และตะไคร้หอมที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 ได้ (ภาพที่ 15 และ 15.1) นอกจากนี้รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากตะไคร้หอมที่แสดงอาการใบขาวที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยชุด primer MLO 1, MLO 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hpa* II จะต่างจากรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่ แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในตะไคร้หอมที่แสดงอาการใบขาว จะแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 300 bp และ 150 bp ในขณะที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาว อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้และหญ้าที่แสดงอาการใบขาว ซึ่งได้แก่ หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย จะแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 480 bp และ 170 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 15) จะเห็นได้ว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดอาการกอตะไคร้ในอ้อย และ



ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I, *Alu* I, *Xba* I และ *Hpa* II หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 (MLO 1 : 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO3 : 5'-3' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC) ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน 1.5% agarose gel แถบ 1-12 ได้แก่ แถบ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แถบ 2-8 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้จาก 7 กอ แถบ 9 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 10 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว แถบ 11 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว และแถบ 12 ตะไคร้หอมแสดงอาการใบขาว ตามลำดับ แถบ M คือ 100 bp ladder



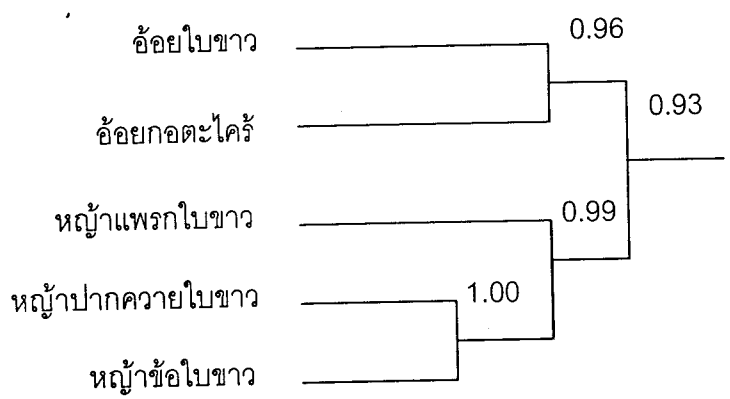
ภาพที่ 15.1 รูปแบบของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn* I, *Eco*R I และ *Acc* I หลังจากที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 (MLO 1: 5'-3' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ MLO 3 : 5'-3' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC) ซึ่งแสดงโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใน1.5% agarose gel แถบ 1-12 ได้แก่ แถบ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แถบ 2-8 อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้จาก 7 กอ แถบ 9 หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว แถบ 10 หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว แถบ 11 หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว และแถบ 12 ตะไคร้หอมแสดงอาการใบขาว ตามลำดับ แถบ M คือ 100 bp ladder

อาการใบขาวในพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 ซึ่งเป็นชุด primer ที่เจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวในอ้อยหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิดดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชดังกล่าว เพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชดังกล่าวนี้ต่อไป

3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่น ๆ และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

3.2.1 พืช

จากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงกอตะไคร้ อ้อย และหญ้าชนิดต่างๆ ที่แสดงอาการใบขาวที่เพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1 และ MLO 7 ที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16 s rDNA และ 23s rDNA มาตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ 759 bp ซึ่งประกอบด้วย 560 bp จากส่วนปลาย 3' ของยีน 16s r RNA ,62 bp ของส่วน intergenic spacer ซึ่งอยู่ระหว่างส่วน tRNA (I le) และ 16s rRNA และ 137 bp ที่อยู่ระหว่างส่วน tRNA (I le) และ 23s RNA ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว พบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาว อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว และหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาวมีความแตกต่างกัน โดยจาก dendrogram ในภาพที่ 16 พบว่า ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรกและหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว และอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้ ส่วนกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว สอดคล้องกับการศึกษาของ Wongkaew และคณะ (1997) ที่ตรวจและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้และพืชชนิดต่างๆแสดงอาการใบขาว ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และส่วน intergenic spacer พบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้อยู่ในกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเดียวกัน แต่อยู่ต่างกลุ่มกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดอาการใบขาวในหญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย และจาก dendrogram ในภาพที่ 16 นี้ยังแสดงว่า เชื้อ

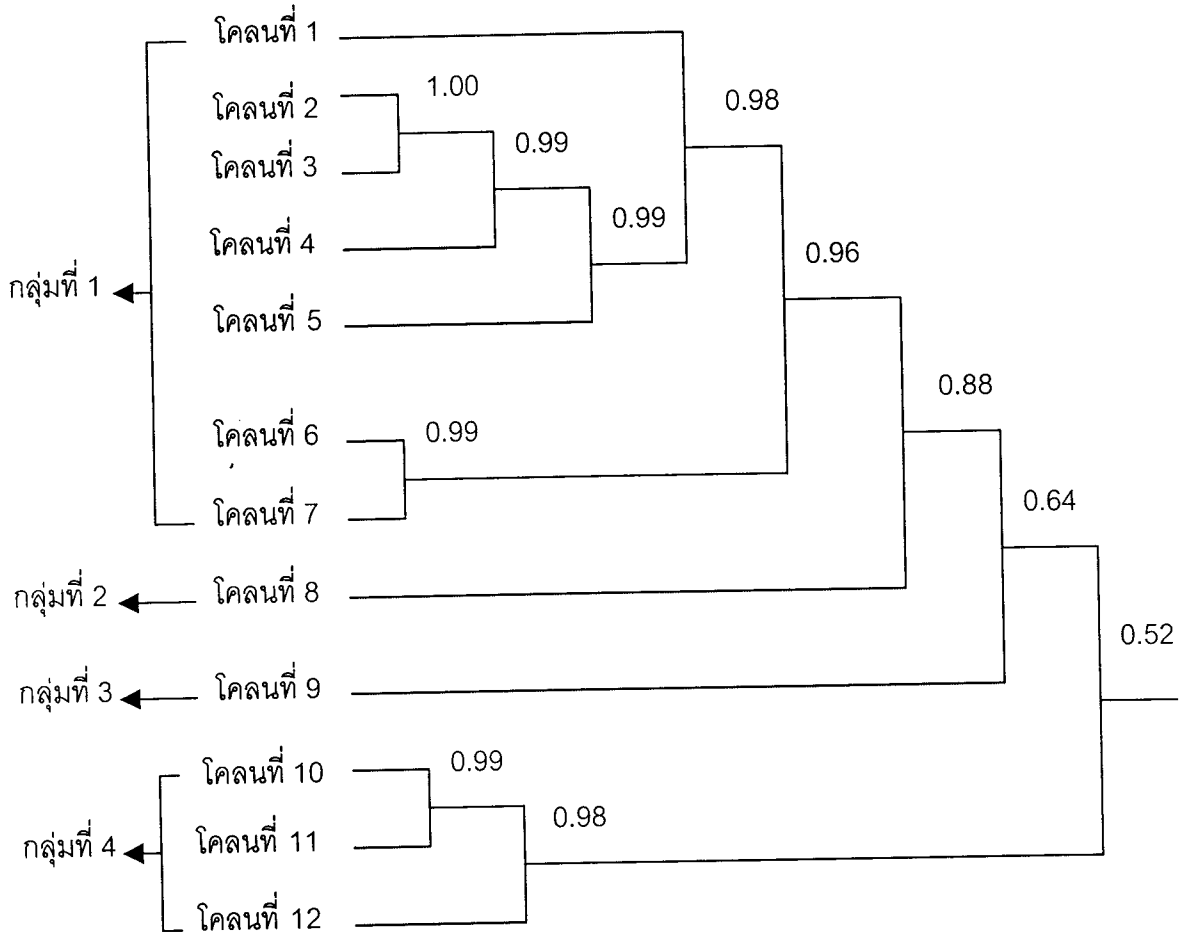


ภาพที่ 16 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว โดยพัฒนามาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 810 bp ที่เพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 7 ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA และ 23s rRNA

ไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน ส่วนเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าข้อและหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาวเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีความแตกต่างจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาวเพียงเล็กน้อย สอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา สามารถพบความแตกต่างระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าข้อและหญ้าแพรกแสดงอาการใบขาวได้ โดยแอนติบอดีที่ผลิตจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาว แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าข้อที่แสดงอาการใบขาว (Sarindu และ Clark, 1993)

3.2.2 แมลง

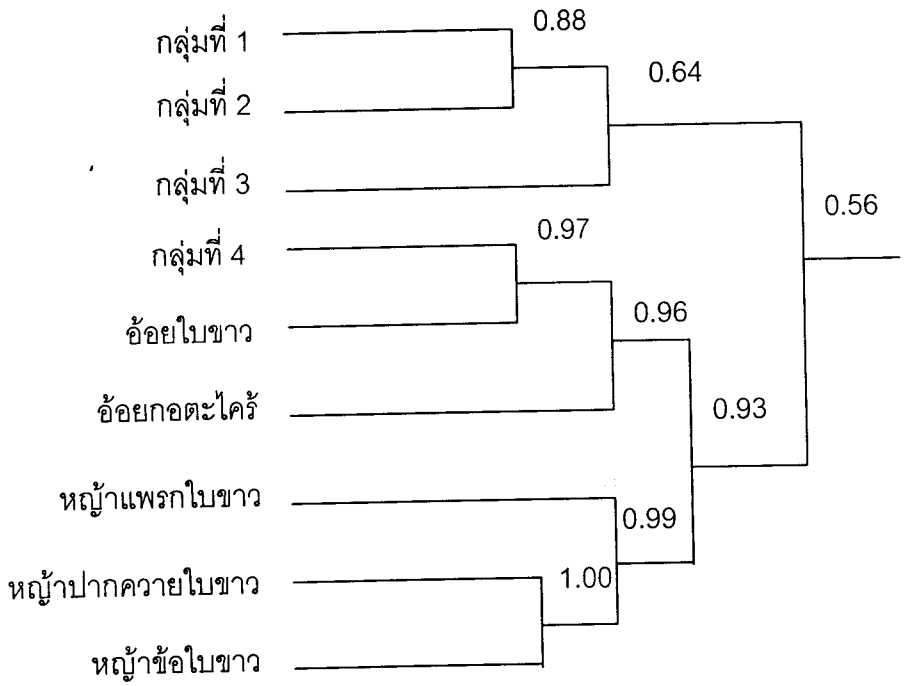
จากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในแมลงเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ที่เพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer U 1, MLO 7 ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA และ 23s rRNA สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA และส่วน intergenic spacer สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง มาตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถทราบลำดับเบส 644 bp ซึ่งประกอบด้วย 560 bp จากส่วนปลาย 3' ของยีน 16s r RNA และ 84 bp ของยีนส่วน intergenic spacer ที่อยู่ระหว่างยีนส่วน tRNA (I Ie) และ 16s rRNA ไปจนถึงส่วน tRNA (I Ie) จาก dendrogram ในภาพที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) โดยคัดเลือกโคลนของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ที่ผ่านการถ่ายเข้าสู่เชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* เป็นจำนวน 12 โคลน พบเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) เป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่วิเคราะห์มาจากโคลนหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 กลุ่มที่ 2 และ 3 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่วิเคราะห์มาจากโคลนหมายเลข 8 และ 9 ตามลำดับ และในกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่วิเคราะห์มาจากโคลนหมายเลข 10, 11 และ 12 ซึ่งเป็นไปได้ว่า แมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) สามารถเป็นแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาได้หลายชนิด เช่นเดียวกับแมลงเพลี้ยจักจั่น



ภาพที่ 17 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาแต่ละกลุ่มในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) โดยพัฒนามาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาด 640 bp ที่เพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา nested PCR โดยใช้ชุด primer U 1, MLO 7 ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA และ 23s rRNA สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรก และใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA และส่วน intergenic spacer สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งที่สอง

Macrosteles fascifrons (*orientalis*) ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับพืช ในประเทศญี่ปุ่น เช่น เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคเหลืองของแอสเตอร์ เป็นต้น (Shiomi และ Sugiura, 1984 (a), 1984 (b)) เนื่องจากจะสังเกตได้ว่า ในบริเวณแปลงปลูกอ้อยมีพืชหลายชนิดที่เป็นโรคซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา

นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาในแต่ละกลุ่มที่ติดเชื้อในแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว ดัง dendrogram ในภาพที่ 18 ซึ่งพบว่า มีเพียงเชื้อไฟโตพลาสมากลุ่มที่ 4 ที่ติดเชื้อในแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) เท่านั้น ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว และอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่สุดกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาว ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเป็นจำนวน 4 bp เท่านั้น



ภาพที่ 18 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวและในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) โดยพัฒนามาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากภาพที่ 19 และ 20