สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในอ้อย, พืชชนิดต่างๆ และในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) โดยใช้ primer ชนิดต่างๆ พบว่า สภาพของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา คือ ชุด universal primer, ชุด primer MLO 1, MLO 3, และชุด primer MLO 1, MLO 7 ใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในปฏิกิริยา PCR ที่ระดับ 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยเพิ่มปริมาณเป็นจำนวน 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีในรอบแรก รอบต่อๆไปใช้เวลา 60 วินาที, ช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาเป็น 10 นาที

ส่วนสภาพของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) โดยใช้ปฏิกิริยา nested PCR ซึ่งชุดที่ 1 คือ ชุด primer U 1, MLO 7 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และชุด primer MLO 1, MLO 3 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ซึ่งชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 3 ใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยเพิ่มปริมาณเป็นจำนวน 37 และ 40 รอบ สำหรับชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 3 ตามลำดับ แต่ละรอบประกอบด้วยช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีในรอบแรก รอบต่อๆไปใช้เวลา 60 วินาที, ช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาเป็น 10 นาที ส่วนชุดที่ 2 คือ ชุด primer MLO X, MLO Y สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และชุด primer P 1, P 2 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ที่ระดับ 4 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยเพิ่มปริมาณเป็นจำนวน 37 และ 40 รอบ ตามลำดับ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยช่วง denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีในรอบแรก รอบต่อๆไปใช้เวลา 60 วินาที, ช่วง annealing ที่

อุณหภูมิ 60 และ 68 องศาเซลเซียส สำหรับชุด primer MLO X, MLO Y และชุด primer P 1, P 2 ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และในรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาเป็น 10 นาที

ส่วนการศึกษาการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) และในพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ อ้อยปกติ อ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อยที่แสดงอาการด่าง และอ้อยที่แสดงอาการใบขาว หญ้าข้อแสดงอาการใบขาว หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาว หญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว หญ้ามาเลเซียแสดงอาการใบเหลือง หญ้าเจ้าชู้แสดงอาการใบเหลือง หญ้าขนแสดงอาการใบเหลือง ผักปราบแสดงอาการใบขาว ตะไคร้หอมแสดงอาการใบเหลืองถึงขาว และกระเพราผีแสดงอาการใบด่าง โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) พบว่า universal primer สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาและเชื้อโรคพืชอื่นๆที่ไม่ใช่เชื้อไฟโตพลาสมา โดยพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาขนาด 1.35 kb ในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้ หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว หญ้ามาเลเซีย หญ้าเจ้าชู้ หญ้าขน ผักปราบ และตะไคร้หอมที่แสดงอาการใบเหลืองถึงขาว และเมื่อนำพืชชนิดต่างๆที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมานี้มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ primer MLO 1, MLO 3 ซึ่งเป็น primer ที่มีความเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย และเชื้อไฟโตพลาสมาจากพืชชนิดอื่นๆ โดยหญ้าเจ้าชู้ ผักปราบ หญ้ามาเลเซีย ตะไคร้หอม และหญ้าขนที่แสดงอาการใบเหลือง แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็น 2 แถบที่มีขนาด 654 bp และ 720 bp ในขณะที่อ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว แสดงแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแถบเดียวชัดเจนขนาด 654 bp เช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer MLO 1, MLO 7 ซึ่งเป็น primer ที่มีความเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ส่วนการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาขนาด 654 bp โดยปฏิกิริยา nested PCR ได้ เมื่อใช้ชุด primer U 1, MLO 7 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และชุด primer MLO 1, MLO 3 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง แต่การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ

ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ทำได้ยากเนื่องจากขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงได้พัฒนาชุด primer เพื่อให้ง่ายในการตรวจ คือใช้ชุด primer MLO X, MLO Y สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก และชุด primer P 1, P 2 สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง โดยพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาขนาด 218 bp

ส่วนการศึกษาชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและพืชชนิดต่างๆ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 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 ตัดกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด universal primer และชุด specific primer MLO 1, MLO 3 เพื่อตรวจรูปแบบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) พบว่า รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยชุด universal primer ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและหญ้าชนิดต่างๆที่แสดงอาการใบขาวมีความแตกต่างจากรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp* I และ *Hpa* II ส่วนรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แตกต่างจากรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาของหญ้าชนิดต่างๆที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I ในขณะที่รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรกและหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว ที่มีการเพิ่มปริมาณ ในปฏิกิริยา PCR โดยชุด specific primer MLO 1, MLO 3 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 15 ชนิดที่กล่าวข้างต้น ไม่แตกต่างกัน

ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา ในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้และพืชชนิดต่างๆที่แสดงอาการใบขาว ได้แก่ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย รวมทั้งในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) โดยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) จากผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อไฟโตพลาสมาต่างๆเหล่านั้น โดยใช้ primer MLO 1, MLO 7 ที่สังเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s

rRNA และ 23s rRNA มาตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดต่างๆนี้ มีความแตกต่างกัน โดยเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่อยู่ต่างกลุ่มกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว โดยเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าข้อและหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาวเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีความแตกต่างจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้หญ้าแพรกแสดงอาการใบขาวเล็กน้อย ส่วนการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ที่เพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา nested PCR โดยชุด primer U 1, MLO 7 และชุด primer MLO 1, MLO 3 พบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม โดยมีเพียงเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่มที่ 4 ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายแสดงอาการใบขาว และอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ แต่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดที่สุดกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาว

ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดดีเอ็นเอควรเป็นตัวอย่างสด ซึ่งจะให้ปริมาณดีเอ็นเอที่ดีไม่แตกหักและมีปริมาณมาก แต่ถ้าตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดดีเอ็นเอมีจำนวนมากและไม่สามารถทำการสกัดดีเอ็นเอของพืชให้เสร็จทันได้ ควรล้างทำความสะอาดตัวอย่างพืชนั้นและนำไปรักษาสภาพที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

2. การจำแนกชนิดของแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ควรระวังเป็นพิเศษ มิฉะนั้นจะเกิดความผิดพลาดของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในแมลงได้ เนื่องจากในบริเวณแปลงปลูกอ้อยมีแมลงเพลี้ยจักจั่นอยู่หลายชนิด และบางชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกับแมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura)

3. ควรมีการนำแมลงเพลี้ยจักจั่น ที่พบเป็นจำนวนหลายชนิดในบริเวณแปลงปลูกอ้อยหรือพืชชนิดต่างๆ อีกหลายชนิดที่แสดงอาการซึ่งคาดว่ามีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ยังไม่ได้ทำการตรวจในการศึกษานี้ มาทำการศึกษาเพิ่มเติมและควรทำการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มพืชที่แสดงอาการใบขาวและแมลงเพลี้ยจักจั่นที่คาดว่าเป็นแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาจากยีนส่วนอื่นๆ นอกเหนือจากที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

เพื่อหาพืชอาศัยที่เป็นแหล่งเพาะเชื้อและแมลงพาหะชนิดอื่นๆของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัดต่อไป

4. จากการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา ในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) กับเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาว ทำให้ทราบว่า แมลงเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) เป็นแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย ดังนั้นควรมีการป้องกันและกำจัดแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้ เช่น ทำการเขตกรรมโดยการไถพรวนบริเวณแปลงปลูกอ้อย และรอบๆ ต้นอ้อย เนื่องจากไข่ของแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้ อยู่บริเวณผิวดิน ถ้าไข่ได้รับการกระทบกระเทือน ไข่จะฝ่อและไม่ฟักออกมาเป็นตัว นอกจากนี้สามารถนำเอาเทคนิค PCR นี้ไปใช้ในการตรวจเช็คเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่ใช้เป็นท่อนพันธุ์ เพื่อจะได้ผลิตท่อนพันธุ์อ้อยที่ปราศจากเชื้อ