



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤษศรธุรกิจ)

ปริญญา

พฤษศรธุรกิจ

สายวิชาวิทยาศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคใบขาวอย่างรวดเร็และมีประสิทธิภาพ

Development of the Rapid and Efficient Method for Sugarcane White Leaf
Disease Detection

นามผู้วิจัย นางสาวสุปราณี บุญโนนแต่

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สิริภัทร์ พราหมณ์ย์, Ph.D.)

หัวหน้าสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนาพร พานิชพัฒน์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

Development of the Rapid and Efficient Method for Sugarcane White Leaf Disease Detection

โดย

นางสาวสุปราณี บุญโนนแต่

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษ์เศรษฐกิจ)

พ.ศ. 2553

สุปราณี บุญโนนแต่ 2553: การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พฤษศรเศรษฐกิจ) สาขาพฤษศรเศรษฐกิจ สายวิชาวิทยาศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ สิริภัทร พรหมณีย์, Ph.D. 95 หน้า

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยการพัฒนาตัวตรวจที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โคลน PCR product จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ใช้ primer ที่ออกแบบจากยีน 16S rRNA ที่จำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อย จำนวน 4 ชุด และคัดเลือกโคลนที่มีความเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพ โดยการทดสอบกับตัวอย่างใบอ้อย และตัวอย่างแมลง ด้วยวิธีการตัดเฉพาะส่วน inserted DNA จาก recombinant clone ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* ติดฉลากด้วยสาร dioxigenin นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี dot blot hybridization พบว่า โคลนจาก primer A1A2 ให้สัญญาณที่ชัดเจนมากที่สุด และพบสัญญาณบนตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคแต่ไม่พบบนอ้อยปกติ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ การสกัดดีเอ็นเอที่ใช้เวลาสั้นขึ้นมีความจำเป็น การทดลองนี้จึงได้ดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนด้วยสารเคมีตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) วิธีของ Kang *et al.* (1998) และวิธี Kristi *et al.* (2002) เปรียบเทียบการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวและผงซิลิกา พบว่าการใช้สารเคมีตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) และการใช้ในไนโตรเจนเหลวในการบดตัวอย่างให้ผลที่มีประสิทธิภาพ และในการลดขั้นตอน การทดลองโดยใช้ส่วนน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เป็นวิธีที่ให้สัญญาณในการตรวจสอบที่มีความเข้มมากกว่าการใช้ส่วนน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และการใช้ส่วนน้ำใส (crude extract) ดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้สามารถใช้ทำปฏิกิริยา PCR และให้ PCR product กับตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการใบขาวเท่านั้น

Supranee Boonnontae 2010: Development of the Rapid and Efficient Method for Sugarcane White Leaf Disease Detection. Master of Science (Economic Botany), Major Field: Economic Botany, Division of Science. Thesis Advisor: Associate Professor Siripatr Prammanee, Ph.D. 95 pages.

The aim of this research is developing the rapid and efficient method for sugarcane white leaf disease detection. The specific probe for sugarcane phytoplasma white leaf disease was screened. PCR products from polymerase chain reaction (PCR) using four primer sets design from 16S rRNA which specific to phytoplasma of sugarcane white leaf disease were cloned. These clones were selected by testing on sugarcane leaf and insects samples. The inserted DNA of recombinant clones were cut by restriction enzyme *NotI* and labelled with dioxigenin. The samples were detected by dot blot hybridization method. The result showed that clone from primer A1A2 gave the best signal and the signal present only on the white leaf disease but absent on the healthy samples. However, the rapid and efficient detection, the shorter procedure of sample extraction are required. The modified DNA extraction using the extraction buffer following by Dellaporta *et al.*(1983), Kang *et al.*(1998) and Kristi *et a.*(2002) were used. The comparison between liquid nitrogen and silica powder to grind the tissue samples were studied. The efficient result was the method using extraction buffer following by Dellaporta *et al.*(1983) and grinding the sample by liquid nitrogen. In the short procedure experiment of crude extract which was incubated at -80 °C for 1 hour showed stronger signal detection than incubated at room temperature for 10 minute and crude extract without incubation. DNA extraction by this method could be able to amplify by PCR reaction and the result showed PCR product only in white leaf disease sample.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สิริภัทร พรหมณีย์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำอบรมชี้แนะ ให้ความรู้และคำแนะนำ
ในการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.ลักขณา กันทะมา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธิ
ที่กรุณาให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอด
เทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับทุนสนับสนุน
คุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2550 ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

และท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้องๆ ที่ให้กำลังใจในการศึกษาเล่าเรียน
และการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

สุปราณี บุญโนนแต่้

มิถุนายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	31
อุปกรณ์	31
วิธีการ	34
ผลและวิจารณ์	47
ผลการทดลอง	47
วิจารณ์ผลการทดลอง	75
สรุปและข้อเสนอแนะ	81
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	83
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	95

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกไฟโตรพลาสมาโดยอาศัยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) จากส่วนยีน 16S rRNA และลำดับโปรตีนของ Ribosomal	8
2	ตารางเปรียบเทียบขั้นตอนสกัดตัวอย่างอ้อยแบบลดขั้นตอนและการสกัดแบบปกติ	78

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	อ้อยแสดงอาการใบขาวที่พบในแปลงปลูกอ้อย	14
2	ตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ	43
2	วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อย บน 1% Agarose gel	48
3	วิเคราะห์ PCR product บน 1.5% Agarose gel	50
4	การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน A1A2 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not I</i> บน 1% Agarose gel	52
5	การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน A2A3 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not I</i> บน 1% Agarose gel	53
6	การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน AF2/AR2 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not I</i> บน 1% Agarose gel	54
7	การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน AF4/AR4 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not I</i> บน 1% Agarose gel	55
8	ผลการไฮบริไดเซชันที่ใช้ PCR product จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ คัดลอกด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I	57
9	ผลการไฮบริไดเซชันที่ใช้ดีเอ็นเอจากโคลน 4 โคลน เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ คัดลอกด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I	60
10	ผลการไฮบริไดเซชันตัวอย่างแมลงที่ใช้ดีเอ็นเอจากโคลน A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ คัดลอกด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I	62
11	ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบอ้อยโดยวิธีลดขั้นตอน 3 วิธี และการใช้สารสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ในโตรเจนเหลวและผงซิลิกาบดตัวอย่างใบอ้อย ซึ่งแสดงโดยการทำ gel electrophoresis บน 1% Agarose gel	65
12	ผลการไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบอ้อยโดยวิธีลดขั้นตอน 3 วิธี และการใช้สารสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ในโตรเจนเหลวและผงซิลิกาบดตัวอย่างใบอ้อย ใช้โคลน A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ คัดลอกด้วย DIG-High Prime	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
	DNA Labeling and Detection Starter Kit I	
13	ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบอ้อยตามสถานที่ต่างๆ แบบลดขั้นตอน 3 วิธี ด้วยสารสกัดตามวิธีของ Dellaporta และคณะ (1983) บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว ซึ่งแสดงโดยการทำ gel electrophoresis บน 1% Agarose gel	70
14	ผลการไฮบริดเซชันดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบอ้อย แบบลดขั้นตอน 3 วิธี ด้วยสารสกัดตามวิธีของ Dellaporta และคณะ (1983) บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว ใช้โคลน A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ คัดลอกด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I	72
15	วิเคราะห์ PCR product ของตัวอย่างอ้อยจากสถานที่ต่างๆ บน 1.5% Agarose gel	74

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

Development of the Rapid and Efficient Method for Sugarcane White Leaf Disease Detection

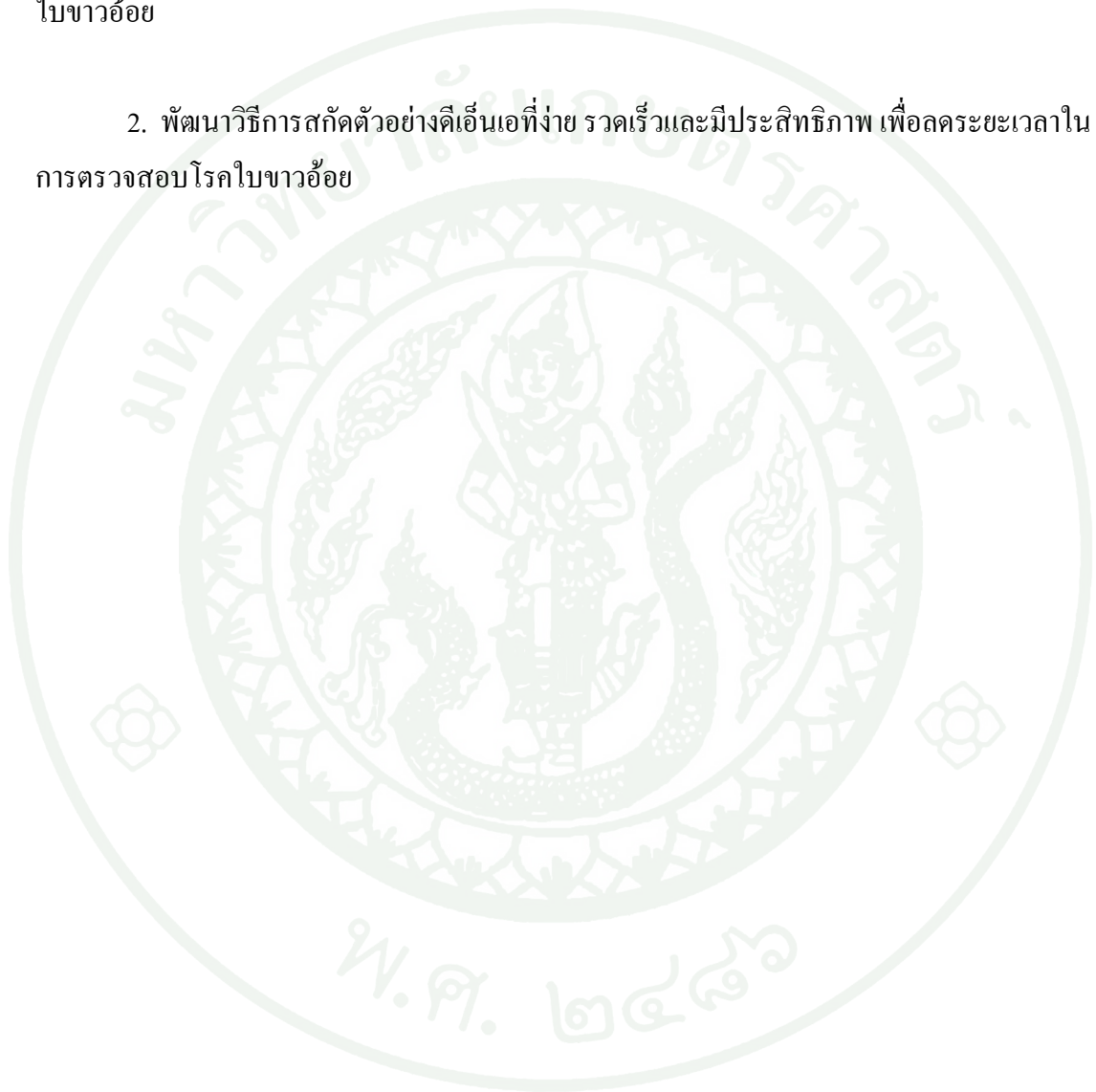
คำนำ

โรคใบขาวอ้อย (Sugarcane White leaf disease) เกิดจากเชื้อสาเหตุไฟโตพลาสมา (phytoplasma) เดิมเรียก มายโคพลาสมา (mycoplasma) หรือ mycoplasma like organism (MLOs) ซึ่งปัจจุบันได้เปลี่ยนชื่อเป็นไฟโตพลาสมาเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มโปรคาริโอต (Prokaryote) ซึ่งถูกจัดระบบจำแนกอยู่ในชั้นโมลิกูเตส (Class Mollicutes) พบว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคในพืชมากกว่า 600 ชนิด ทำให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจอย่างสูง โรคใบขาวอ้อยเป็นโรคที่มีความสำคัญทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงหรือถ้ามีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง จะไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ซึ่งโรคใบขาวอ้อยพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของอ้อย โรคใบขาวในอ้อยเป็นโรคที่พบครั้งแรกในประเทศไทยตั้งแต่ พ.ศ. 2498 ที่จังหวัดลำปาง โรคใบขาวอ้อยระบาดรุนแรงมากในปี พ.ศ.2505 จนกระทั่งไม่มีอ้อยเข้าหีบ และยังคงระบาดสร้างความเสียหายในหลายช่วงปี เช่น ปี พ.ศ. 2517, 2525, 2534 จนกระทั่งปี พ.ศ. 2551 การระบาดของโรคใบขาวอ้อยก็กลับทวีความรุนแรง กระจายแพร่ไปในทุกพื้นที่ทั่วประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบขาวอ้อย ได้สร้างความเสียหายและแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งพบเห็นได้ในเกือบทุกแปลงอ้อย สร้างความเสียหายมากน้อยแตกต่างกันไป

ในการวิจัยครั้งนี้ต้องการที่จะโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมา ที่เป็นสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย และพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ง่าย รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย ให้สามารถตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว ตรวจสอบตัวอย่างในปริมาณที่มาก โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถใช้กับพืช และสัตว์หลาย ๆ ชนิดที่ใช้ได้ผลดี

วัตถุประสงค์

1. โคลนดีเอ็นเอตัวตรวจที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมา ที่เป็นสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย
2. พัฒนารูปแบบการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ง่าย รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย



การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของอ้อย

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเขตร้อนที่มีถิ่นกำเนิดทางแถบหมู่เกาะนิวกีนิเหนือของทวีปออสเตรเลีย โดยมีลำดับอนุกรมวิธานทางวิทยาศาสตร์ดังนี้

Kingdom	Plantae
Division	Magnoliophyta
Class	Liliopsida
Order	Poales
Family	Poaceae
Genus	Saccharum

และแยกออกเป็น 6 ชนิด คือ *Saccharum barberi*, *Saccharum edule*, *Saccharum officinarum*, *Saccharum robustum*, *Saccharum sinense* และ *Saccharum spontaneum* (Barnes, 1964)

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก เป็นพืชที่ให้น้ำตาลมากที่สุดในกลุ่มของพืชที่ให้น้ำตาลด้วยกัน เช่น ตาลโคנד จาก มะพร้าว ข้าวโพดหวาน และหัวบีท (ผักกาดหวาน) โดยเป็นพืชที่ให้น้ำตาลต่อไร่ต่อปีมากที่สุด รองลงไปคือหัวบีท อ้อยปลูกกันมากในประเทศบราซิล คิวบา อินเดีย แอฟริกาใต้ ออสเตรเลีย อินโดนีเซีย ใต้หวันและประเทศไทย (เกษมและคณะ, 2521; สุรชัย, 2535) จากการดำเนินการศึกษาสำรวจพื้นที่ปลูกอ้อยในปีการผลิต 2550 - 2551 โดยอาศัยข้อมูลจากดาวเทียมประกอบการเก็บรายละเอียดข้อมูลทางภาคพื้นดิน เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลว่าด้วยพื้นที่ปลูกอ้อยโดยรวมทั้งประเทศ จำนวน 6,516,376 ไร่ พื้นที่อ้อยส่งโรงงาน 6,228,498 ไร่ ส่วนใหญ่ปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง อ้อยนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถนำมาแปรรูปเป็นน้ำตาลดิบและน้ำตาลทรายส่งเป็นสินค้าออกเป็นอันดับสองรองจากข้าว ประเทศไทยส่งออกน้ำตาลมากเป็นอันดับ 2 ของโลก การส่งออกน้ำตาลดิบในปี 2552 ส่งออก 2,338,103 ตัน มีมูลค่า 26,082 ล้านบาท และการส่งออกน้ำตาลทราย ในปี 2552

ส่งออก 2,694,467 ตัน มีมูลค่า 35,503 ล้านบาท (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2552) ส่วนเหลือใช้และผลผลิตจากอ้อยยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์อื่นๆ อีก เช่น การทำเชื้อกระดาษจากกากอ้อย และการทำอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์โดยใช้ตะกอนน้ำตาล เป็นต้น และปัจจุบันมีการนำกากอ้อยมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลที่ใช้ในการผลิตน้ำมันรถยนต์ชนิดแก๊สโซฮอล์ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2548)

อ้อยเป็นพืชที่มีโรคและศัตรูพืชหลายชนิด ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตที่ลดลง โรคพืชในอ้อยที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย คือ เชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งจะให้อ้อยแสดงอาการการเป็นโรคใบขาวและโรคกอตะไคร้ (ธีระ, 2532) สองโรคนี้จะมีความคล้ายคลึงกัน แต่โรคกอตะไคร้มีอาการที่แตกต่างและหลากหลายกว่าโรคใบขาวของอ้อย คือ อ้อยจะแสดงอาการแคะแกระ็น ใบขนาดเล็กแตกเป็นฝอยคล้ายตะไคร้ และมีอาการแตกกอด้านข้างจำนวนมาก (Chona *et al.*, 1960; อัสพร และคณะ, 2538) อาการใบขาวจะเกิดกับอ้อยทุกช่วงอายุ ใบจะมีสีขาวซีดหรือแถบขาวสลับเขียว แตกกอมากผิดปกติ และดูเป็นพุ่มเตี้ยคล้ายกอหญ้า อ้อยอาจแห้งตายทั้งกอหรือแคะแกระ็น หน่ออ้อยจะโตเป็นลำบาง แต่จำนวนลำจะน้อยกว่ากอปกติ ผลผลิตลดลงมากจนอาจเก็บเกี่ยวไม่ได้ (อนุสรณ์, 2523)

2. เชื้อมอลลิคิวท์ที่ทำให้เกิดโรคในพืช

เชื้อมอลลิคิวท์ที่จัดว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติหรือเกิดเป็นโรคเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่อาศัยและแพร่พันธุ์ภายในต้นพืชได้แก่ เชื้อจำพวกสไปโรพลาสมา และไฟโตพลาสมา ซึ่งเดิมเรียกว่า mycoplasma like organism (MLOs) เนื่องจากยังไม่สามารถแยกเชื้อออกมาเพาะเลี้ยงได้ และยังไม่สามารถทราบถึงคุณสมบัติทางชีววิทยาที่แน่นอน จากรายงานการเกิดโรคจนถึงปัจจุบันพบว่าพืชจำนวนหลายร้อยชนิดแสดงอาการเป็นโรคขึ้น โดยมีสาเหตุจากเชื้อสไปโรพลาสมาและไฟโตพลาสมา และในจำนวนนี้มีมากกว่า 300 ชนิด ที่ได้รับการพิสูจน์และยืนยันการแสดงผลแล้ว (Seemuller *et al.*, 1998)

Bove and Garnier (1998) ได้จัดจำแนกเชื้อมอลลิคิวท์เป็น 5 กลุ่ม จากการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และยีนกำกับการสร้าง tryptophan (Trp) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 กลุ่มของเชื้อ *Spiroplasma*, *mesoplasma*, *Entomoplasma* และ *Mycoplasma mycoides*

กลุ่มที่ 2 กลุ่มของเชื้อ *Ureaplasma* และ *Mycoplasma pneumoniae*

กลุ่มที่ 3 กลุ่มของเชื้อ *Mycoplasma hominis* และ *Mycoplasma salvi*

กลุ่มที่ 4 กลุ่มของเชื้อ *Phytoplasma*, *Acholeplasma* และ *Anaeroplasmata*

กลุ่มที่ 5 กลุ่มของเชื้อ *Asteroleplasma*

เชื้อ MLOs ในปัจจุบันได้เปลี่ยนชื่อเชื้อเป็นไฟโตพลาสมา โดย International Committee of Systematic Bacteriology (ICSB, 1995) เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มโปรคาริโอต (prokaryote) จากการศึกษาในด้านกรดนิวคลีอิกและเอนไซม์วิทยา เชื้อไฟโตพลาสมาไม่มีผนังเซลล์และมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ชนิดอื่น (ประสาทร, 2527; Freundt, 1981) เชื้อไฟโตพลาสมาได้รับการจัดให้อยู่ในกลุ่มเชื้อจำพวกมอลลิคิวท์โดยใช้ลักษณะและคุณสมบัติเท่าที่จำเป็นที่สุดสำหรับการจัดหมวดหมู่ของเชื้อในอาณาจักรโปรคาริโอต มีการกำหนดสถานะการเรียกชื่อขึ้นต้นเป็น Candidatus แล้วตามด้วยคำที่เสนอเป็นชื่อสกุลและชนิดของเชื้อที่ค้นพบ เนื่องจากไม่สามารถศึกษาลักษณะและคุณสมบัติได้อย่างครบถ้วนนอกจากข้อมูลการวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Murray and Stackebrandt, 1995) มีการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อไฟโตพลาสมาดังนี้

Kingdom	Bacteria
Division	Tenericutes
Class	Mollicutes
Order	Acholeplasmatales
Family	Acholeplasmataceae
Genus	<i>Candidatus Phytoplasma</i>

เชื้อไฟโตพลาสมาส่วนใหญ่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อไมโครพลาสมาและสำหรับคุณสมบัติทางชีวโมเลกุลมีความใกล้เคียงมากกับ *Acholeplasma* โดยมีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คล้ายกันมากกว่าเชื้อมอลลิคิวท์กลุ่มอื่นๆ และยังมีคุณสมบัติการใช้ UGA เป็น stop codon ไม่ใช่ Tryptophane codon เช่นเดียวกัน ซึ่งต่างจากมอลลิคิวท์กลุ่มอื่นๆ ลักษณะของเชื้อพบว่าเป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) และไม่สามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นสำหรับสร้างผนังเซลล์ องค์ประกอบของเซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เพียง

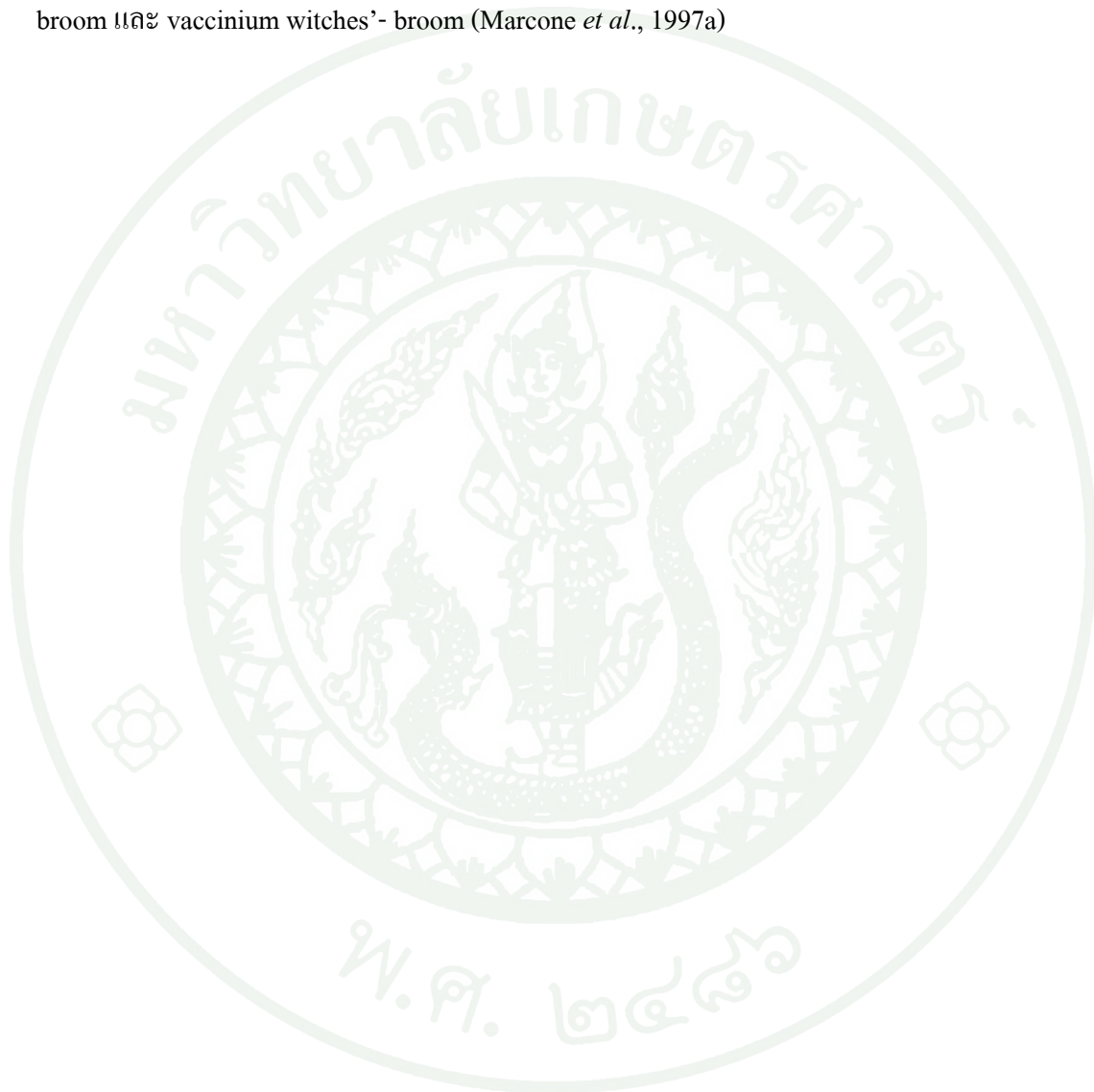
อย่างเดียวยังองค์ประกอบหลักที่มีอยู่ภายในเซลล์ ได้แก่ ไโซโตพลาสซึม ไรโบโซม และดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน (polymorphic) เช่น กลม รี เป็นแท่งยาว เป็นเกลียว เป็นเส้นยาวๆ หรืออาจมีรูปร่างคล้ายผลฝรั่ง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 – 1.0 ไมโครเมตร จนกระทั่งเป็นเส้นสายยาวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ไมโครเมตร ขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) และการแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง (Binary fission) (McCoy, 1984; สุวณิ, 2532; พรทิพย์, 2533) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะพวกเพนิซิลลิน แต่ไวต่อเตตราซัยคลิน (พรทิพย์, 2533; Basu and Giri, 1993) เชื้อไฟโตพลาสมาส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในอาหารสังเคราะห์ได้ ยกเว้น *Spiroplasma citri* สาเหตุโรค citrus stubborn ลักษณะของโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์มีรูปร่างคล้ายไขดาวหรือเป็นเกล็ด (granular) เซลล์เคลื่อนที่ได้โดยการหมุนเป็นเกลียว (สุพัฒน์, 2528)

โครงสร้างพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมามีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือ จีโนม (genome) มีส่วนประกอบของ guanine และ cytosine (G + C content) ค่อนข้างต่ำ อยู่ระหว่าง 23 - 41 % ขนาดจีโนมที่เล็กที่สุดจนถึงใหญ่ที่สุดอยู่ระหว่าง 600 - 2200 กิโลเบส ส่วนการเรียงตัวของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน คือ ribosomal RNA (rRNA) เป็นลำดับเช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียทั่วไปคือ 70S ribosomal มีการจัดเรียงตัวเป็น 16S - 23S - 5S และเชื้อไฟโตพลาสมายีน transfer RNA (tRNA) อยู่ระหว่าง 16S - 23S (Razin, 1985; Kirkpatrick *et al.*, 1994)

Lee *et al.* (1994) ได้ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะสัณฐานวิทยา กลไกการเกิดโรคและปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อต่อพืชอาศัย การตรวจสอบโรคโดยเทคนิคด้านชีววิทยา ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน และการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อจัดจำแนกและแบ่งกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งแบ่งได้เป็น 14 กลุ่ม จากการวิเคราะห์รูปแบบของ RFLP ของ 16S rRNA และลำดับโปรตีนของ Ribosomal จากพืชที่เป็นโรค

ลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรคเนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย จะแสดงอาการให้เห็นในพืชอาศัยที่แตกต่างกันไป โดยที่เชื้อไฟโตพลาสมาจะอาศัยอยู่ในท่อลำเลียง โดยเฉพาะที่เซลล์ท่ออาหารของพืช (phloem) มีการถ่ายทอดเชื้อไปยังพืชต้นใหม่โดยการต่อกิ่ง พืชกาฝากและแมลงจำพวกปากดูด ทำให้เกิดโรคกับพืชที่แสดงอาการใบเหลืองหรือใบซีดขาว (yellow type) อาการแตกยอดและใบอ่อนแทนที่การผลิดอกออกผลตามปกติ (phyllody) และอาการเหี่ยวกิ่งก้านและใบร่วมกับการแตกกอฝอยและต้นเตี้ยแคระ (witches'-broom) หรือตายจากยอดลงมา (decline)

(Doi *et al.*, 1967) การตั้งชื่อและการเรียกชื่อ ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยชื่อสามัญของพืชอาศัยและลักษณะอาการที่ถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย เช่น grassy shoot disease (Rishi and Chen, 1989) periwinkle little leaf, chrysanthemum yellowa, tomato big bud, western aster yellows (Lee *et al.*, 1992) sugarcane white leaf, faba bean phyllody, bermuda grass white leaf, sunhemp witches'-broom และ vaccinium witches'-broom (Marcone *et al.*, 1997a)



ตารางที่ 1 การจัดจำแนกไฟโตพลาสมาโดยอาศัยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) จากส่วนยีน 16S rRNA และลำดับโปรตีนของ Ribosomal

Phytoplasma group and subgroup	Disease (s)	Geographical distribution
Aster yellow group (16SrI)		
16SrI-B, 16SrI-B (rp-B)	Aster yellow (in China aster), lettuce yellow, periwinkle little leaf, tomato big bud (Arkansas), gladiolus virescence (Italy), purple coneflower yellows (Winsconsin), erigeron yellows (USA), and dogwood stunt (USA)	North America, Europe
16SrI-B, 16SrI-B (rp-B)	Aster yellows (in celery, carrot, potato, clover), cabbage witches'-broom, onion virescence (yellow), lettuce yellows (Italy), hydrangea phyllody (Italy, France), chrysanthemum yellows (Italy), marguerite yellows (Japan), broccoli phyllody (Italy), kale phyllody (Italy), tomato big bud (Italy), cyclamen virescence (Germany), mulberry dwarf, poplar witches'-broom (france), eggplant dwarf, , turnip virescence (Italy), oenothera virescence (Michigan), cactus virescence (UK), primula yellows (UK) and dogfennel yellows (Florida)	Worldwide
16SrI-B, 16Sr-B (rp-K)	Hydrangea phyllody	Italy
16SrI-B, 16Sr-B (rp-L)	Maize bushy stunt	North, Central and South America
16SrI-C	Clover phyllody, strawberry green petal, ranunculus phyllody, anemone virescence and olive witches'-broom	North America, Erope, Italy

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Phytoplasma group and subgroup	Disease (s)	Geographical distribution
16SrI-D	Paulownia witches'-broom	Asia
16SrI-E	Blueberry stunt	North America
16SrI-F	Apricot chlorotic leaf roll	Spain
16SrI-K	Strawberry multiplier	North America
Peanut witches'-broom group (16SrIII)		
16SrII-A	Peanut witches'-broom, sweet potato witches'- broom (Taiwan) and Sunn hemp witches'- broom	Asia
16SrII-B (Candidatus <i>Phytoplasma aurantifolia</i>)	Lime witches'-broom	Arabian peninsula
16SrII-C	Faba bean phyllody, soybean phyllody, cotton phyllody	Africa, Asia
16SrII-D	Sweet potato little leaf	Australia
16SrII-E (Candidatus <i>Phytoplasma aurantifolia</i>)	Papaya yellow crinkle, papaya mosaic, tomato big bud	Australia
X-disease group (16SrIII)		
16SrIII-A	Peach, cherry X-disease	North America
16SrIII-B	Clover yellow edge (Canada), gentian witches'- broom (Japan), tsuwabuki witches'-broom (Japan) and Italian clover phyllody	America, Asia, Europe
16SrIII-C	Pecan bunch	USA
16SrIII-D	Golden rod yellows	USA
16SrIII-E	Spirea stunt	USA
16SrIII-F	Milkweed yellows (USA, Canada)	North America
16SrIII-G	Walnut witches'-broom	USA

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Phytoplasma group and subgroup	Disease (s)	Geographical distribution
16SrIII-H Coconut lethal yellows group (16SrIV)	Poinsettia branching inducing	Worldwide
16SrIV-A	Coconut lethal yellows	Florida, Caribbean region
16SrIV-B Elm yellows group (16SrV)	Tanzanian coconut lethal decline	Africa
16SrV-A, 16SrV-A (rp-A)	Elm yellows, elm witches'-broom, rubus stunt, alder yellows	North America, Europe
16SrV-B, 16SrV-B (rp-B)	Cherry lethal yellows	China
16SrV-B, 16SrV-B (rp-C)	Jujube witches'-broom	Asia
16SrV-B, 16SrV-B (rp-D) Clover proliferation group (16SrVI)	Flavescence doree (grapevine)	Europe
16SrVI-A	Clover proliferation, tomato big bud (California), potato witches'-broom, alfalfa witches'-broom	North America
16SrVI-B	Strawberry multiplier (Canada, Florida)	North America
Unclassified	Willow witches'-broom (USA), brinjal little leaf (India)	North America, India
Ash yellows group (16SrVII)		
16SrVII-A (Candidatus <i>Phytoplasma fraxini</i>)	Ash yellows, lilac witches'-broom	North America
Loofah witches'-broom group (16SrVIII)		

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Phytoplasma group and subgroup	Disease (s)	Geographical distribution
16SrVIII A Pigeon pea witches'-broom group (16SrIX)	SrXI-BLoofah witches'-broom	Taiwan
16SrIX-A	Pigeon pea witches'-broom	North America
	Echium vulgare yellows, crepis phyllody, picris phyllody, knaunia phyllody, gliricidia little leaf	Italy, Central America
16SrIX-B Apple proliferation group (16SrX)		
16SrX-A	Apple proliferation, hazel decline, bindweed yellows	Europe
16SrX-B	Apricot leptonecrosis, European stone fruit yellows	Europe
16SrX-C	Pear decline, peach yellow leaf roll	Europe, North America
Rice yellow dwarf group (16SrXI)	Rice yellow dwarf	Asia
16SrXI-A	Sugarcane white leaf, grassy shoot	Asia
Unclassified	Leafhopper-bone (BVK)	Germany
Stolbur group (16SrXII)		
16SrXII-A	Stolbur (pepper, tomato), celery yellow (Italy), grapevine yellow (bois noir), carrot (Spain)	Europe, Italy, Spain
16SrXII-B (Candidatus <i>Phytoplasma australiense</i>)	Australian grapevine yellows, phormium yellow leaf, papaya dieback	Australia, New Zealand
Candidatus <i>Phytoplasma japonicum</i>	Japanese hydrangea phyllody	Japan

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Phytoplasma group and subgroup	Disease (s)	Geographical distribution
Mexican periwinkle virescence group (16SrXIII)		
16SrXIII-A	Mexican periwinkle virescence	Mexico
16SrXIII-B	Strawberry green petal	Florida
Bermuda grass white leaf group (16SrXIV)		
16SrXIV-A	Bermuda grass white leaf, annual blue grass white leaf (Italy)	Asia, Italy
Other undesignated groups		
Italian bindweed stolbur group	Italian bindweed stolbur	Italy
Buckthorn witches'-broom group	Buckthorn witches'-broom	Germany
Spartium witches'-broom group	Spartium witches'-broom	Italy
Italian alfalfa witches'- broom group	Italian alfalfa witches'-broom	Italy
Cirsium phyllody group	Cirsium phyllody	Germany

ที่มา: Lee *et al.* (1994)

3. โรคใบขาว อ้อย

โรคใบขาวอ้อย (Sugarcane White leaf) เป็นโรคที่ทำความเสียหายและมีการแพร่ระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกอ้อย ได้แก่ ประเทศต่าง ๆ แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยโรคใบขาวอ้อยเป็นโรคที่มีความสำคัญทำให้ผลผลิตลดลงหรือถ้ามีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง เมื่อเป็นโรคจะไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2497 ที่อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง เกิดกับอ้อยพันธุ์ Co421 โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี ระยอง อุดรธานี อุดรดิตถ์ และลำปาง ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นอยู่กับการแพร่ระบาดรุนแรงของโรคในแต่ละปีและพันธุ์อ้อยที่กสิกรใช้ปลูกในแต่ละท้องถิ่น (มณฑล และคณะ, 2519) และในปัจจุบันการระบาดของโรคใบขาวอ้อยก็พบอยู่ทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของอ้อย โดยอ้อยที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบขาวหรือใบขาวปนเหลือง เริ่มสังเกตอาการได้ตั้งแต่อ้อยงอกโผล่พ้นดิน ใบอ้อยที่แตกออกมาจะแคบเรียวกว่าปกติ อ้อยที่ไม่เป็นโรครุนแรงจะสร้างหน่อสีเขียวหรือขาวที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ซึ่งหน่อเหล่านี้จะเจริญเป็นลำต่อได้ แต่ลำจะเล็กกว่าต้นปกติ และสร้างหน่อสีขาวเล็กๆ มากมาย คูเป็นพุ่มคล้ายกอตะไคร้ ซึ่งกอจะแห้งและตายในที่สุด (วันทนิย์ และคณะ, 2522) อ้อยจะแสดงอาการใบขาวชัดเจนถ้าสภาพแวดล้อมมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 23 – 35 องศาเซลเซียส อ้อยที่ปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงจะมีการเจริญเติบโตและมีความแข็งแรงจึงทำให้การแสดงอาการโรคใบขาวอ้อยที่ปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงมีการแสดงอาการน้อยกว่าอ้อยที่ปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (Leu, 1974) ในปีการผลิต 2550/2551 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 6.5 ล้านไร่ โดยมีผลผลิตอ้อยเข้าหีบประมาณ 73.23 ล้านตัน โดยมีผลผลิตต่อไร่ไม่เกิน 10 ตัน/ไร่ ซึ่งจัดอยู่ในระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆ ที่มีการผลิตอ้อยเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ปัญหาผลผลิตอ้อยตกต่ำเกิดมาจากหลายสาเหตุ ในจำนวนนี้มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 2 แสนไร่ ที่ประสบปัญหาอ้อยเป็นโรคใบขาว คิดเป็นมูลค่าความเสียหายไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาท (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2552)

โรคใบขาวอ้อยมีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา โดยทั่วไปเป็นพวกที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมรีมีขนาด 60 – 1000 นาโนเมตร ภายในประกอบด้วยสายของกรดนิวคลีอิกและไรโบโซม เชื้อไฟโตพลาสมานี้สามารถพบได้ในท่อลำเลียงอาหาร (sieve tube member และ companion cell) ของอ้อยที่เป็นโรค โดยจะเข้าไปเจริญในเซลล์ของท่อลำเลียงอาหารของอ้อยตลอดทั้งต้น (ธีระ, 2519) โดยพบการระบาดในทวีปเอเชียในพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อย และมีพืชตระกูลหญ้าหลายชนิด เช่น

หญ้าข้าว หญ้าปากควาย และหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาว คาดว่าพืชเหล่านี้ อาจจะเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งอ้อยจะสามารถกลับมาติดเชื้อได้อีกครั้ง (Sarindu and Clark, 1993)



ภาพที่ 1 อ้อยแสดงอาการใบขาวที่พบในแปลงปลูกอ้อย

และเชื้อไฟโตพลาสมาสามารถถ่ายทอดได้โดยติดไปกับท่อนพันธุ์จากดินหรือตอที่เป็นโรค และสามารถถ่ายทอดได้โดยมีแมลงปากดูดจำพวกเพลี้ยจักจั่น *Matsumura (Matsumuratetrix hiroglyphicus)* เป็นพาหะ (Rishi and Chen, 1989) และการจัดจำแนกแบบแผน RFLP ของ 16S rRNA พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวอ้อยจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrXI (Rice yellow dwarf) กลุ่มย่อย 16SrXI-B ที่ทำให้พืชแสดงอาการใบขาวซีด เนื่องจากสูญเสียคลอโรฟิลล์และใบพืชมีขนาดเล็กสั้นแตกเป็นกอ ซึ่งก่อให้เกิดโรคใบขาวอ้อยและโรคกอตะไคร้ (Lee *et al.*, 1994)

โรคใบขาวอ้อยมีแนวทางป้องกันกำจัดและควบคุมได้หลายวิธี เช่น การใช้มาตรการทางกฎหมายควบคุมการนำเข้าอ้อยจากต่างประเทศที่มีประวัติการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อย การเผยแพร่ความรู้เรื่องโรคใบขาวอ้อยให้กับชาวไร่อ้อย การส่งเสริมให้ชาวไร่อ้อยปลูกอ้อยด้วยท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค เช่น การแช่ท่อนพันธุ์ในสารละลายเตตราซัยคลินไฮโดรคลอไรด์ 250 ส่วนในน้ำล้านส่วน ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 60 นาที ให้ผลในการป้องกันโรคใบขาวอ้อยได้ถึงอ้อยตอสอง แต่วิธีนี้อาจจะไม่เหมาะกับชาวไร่ เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง วิธีการที่ชาวไร่อ้อย

สามารถทำได้คือ การปลูกอ้อยไว้ทำพันธุ์เอง โดยมีการคัดเลือกอ้อยที่มีลักษณะดีไม่เป็นโรคใบขาว อ้อยไว้ทำพันธุ์อ้อย เตรียมท่อนพันธุ์โดยคัดเลือกจากพื้นที่ที่ไม่มีการระบาด โดยการป้องกันและ การกำจัดโรคใบขาวอ้อย แบ่งเป็นระยะดังนี้ ระยะที่ 1 เมื่อพบการระบาด ให้ทำลายต้นที่เป็นโรค โดยการขุดออกแล้ว เผาทิ้งหรือฉีดยาฆ่าหญ้า (ไกลโฟเสท 1%) เตรียมคัหาพันธุ์ที่ทนทาน ต่อโรค เตรียมแปลงพันธุ์ที่จะมาขยายปลูกโดยใช้พันธุ์ที่ทนทานและแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ก่อนปลูก ใช้เตรียมเป็นแปลงพันธุ์ และเมื่อเก็บเกี่ยวแล้ว ควรรีดแปลงทิ้ง เพื่อปลูกใหม่ ระยะที่ 2 ระยะหลังการเก็บเกี่ยว ให้ทำการไถดินคราดตอเก่าออก ทำลายให้หมด และปรับปรุงดินโดยใช้ปุ๋ยบำรุงดิน จัดฤดูปลูกให้เหมาะสม (เดือนมีนาคม – สิงหาคม ในภาคตะวันตก และเดือนตุลาคม - ธันวาคม ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) เพื่อลดการติดเชื้อโดยแมลงพาหะ และการเตรียมท่อนพันธุ์โดยคัดจากพื้นที่ที่ไม่มีการระบาด เช่น พื้นที่ในเขตชลประทานที่เป็นดินเหนียวหรือพื้นที่ปลอดโรค ใช้ท่อนพันธุ์ที่มีคุณภาพปราศจากโรคจากแปลงพันธุ์ที่ได้เตรียมไว้ (ธนากร และคณะ, 2524)

โรคใบขาวอ้อยเป็นโรคที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจสูง นักวิจัยได้อาศัยเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ พันธุวิศวกรรม และวิทยาการด้านอื่นๆ เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการ ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา การพิสูจน์คุณสมบัติที่แท้จริงของเชื้อไฟโตพลาสมา เพื่อหาวิธีป้องกันหรือ กำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาไม่ให้เกิดการระบาด ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจและศึกษา โรคใบขาวอ้อย ได้แก่

Prammanee *et al.* (1996) ได้ศึกษาเกี่ยวกับโรคกอตะไคร้และใบขาว ด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ที่เข้าทำลายถั่ว faba ด้วย universal primer จากส่วนยีน 16S rRNA และใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจในการทำ dot blot hybridization พบว่ามีความสัมพันธ์กับเชื้อ สาเหตุของโรคกอตะไคร้

สุภาพร และคณะ (2540) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา ที่พบในโรคพืช 8 ชนิด คือโรคใบขาวอ้อย หญ้าแพรก หญ้า Brachiaria โรคเหลืองเตี้ยของข้าว โรค แดกพุ่มฝอยของงา ปอเทือง ผักเสี้ยนผีและโรคดอกเขียวของแพงพวย โดยปฏิกิริยา PCR ในการ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA บางส่วนของเชื้อ ไฟโตพลาสมา และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพืชที่เป็นโรคเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าสามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้จากตัวอย่างโรคแดกพุ่มฝอยของงา นำ PCR product ที่ได้ติดฉลากด้วย

สารไดคอกซิเจนินเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับการวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค dot blot hybridization และ southern blot hybridization พบว่าเกิดสัญญาณกับดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพืชที่เป็นโรคทุกชนิดและ PCR product ขนาด 1.2 กิโลเบส ที่เพิ่มปริมาณจากทุกตัวอย่างโรค เปรียบเทียบลักษณะแบบแผนของ RFLP ของดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบสจากทุกโรค พบว่าแบบแผน RFLP ของดีเอ็นเอที่มีความคล้ายคลึงกัน ได้แก่ กลุ่มโรคใบขาวของหญ้าแพรก และหญ้า Brachiaria กลุ่มโรคแตกพุ่มฝอยของงาและปอเทือง กลุ่มโรคใบขาวอ้อยและโรคเหลืองเตี้ยของข้าว ส่วนโรคแตกพุ่มฝอยของผักเสี้ยนผี และโรคดอกเขียวของแพงพวยมีแบบแผน RFLP ที่เฉพาะตัว

รุ่งโรจน์ (2543) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและหญ้าบางชนิดในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างอ้อยและหญ้าที่พบในแปลงอ้อยที่มีอาการใบขาวจากแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน 16S rRNA บางส่วนของเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบส เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบลักษณะแบบแผนของ RFLP และพบว่าแบบแผนของ RFLP ของดีเอ็นเอมีความคล้ายคลึงกันมากในแต่ละชนิดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้งในอ้อยและหญ้า เมื่อนำข้อมูลแบบแผนดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม UPGMA (Dice's coefficient) และสร้างเป็น dendrogram พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายอ้อยและหญ้าบางชนิดในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ หากใช้ค่า similarity 0.85 ไม่สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในอ้อยและหญ้า และที่ค่า similarity 0.95 สามารถแบ่งเชื้อไฟโตพลาสมาออกเป็น 4 กลุ่ม

เรนศ (2545) ได้ศึกษาการจำแนกเชื้อสาเหตุของโรคกอดะไคร้ อ้อยเปรียบเทียบกับโรคใบขาวอ้อย และโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆ ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primer ที่สร้างขึ้นจากยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าเชื้อสาเหตุโรคกอดะไคร้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและโรคอื่นๆ ให้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ ดีเอ็นเอ GGS1 มีขนาดนิวคลีโอไทด์ 1,174 เบส ดีเอ็นเอ GGS2 มีขนาดนิวคลีโอไทด์ 827 เบส และดีเอ็นเอ GGS3 มีขนาดนิวคลีโอไทด์ 556 เบส การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่าดีเอ็นเอ GGS1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับดีเอ็นเอขนาด 1,174 เบส ของใบขาว faba bean phyllody และ clover proliferation การโคลนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากโรคกอดะไคร้ GGS1 GGS2 และ GGS3 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (GenBank database) พบว่าลำดับเบสของ GGS1 มีความ

เหมือนกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว เท่ากับ 93.8% และมีความสัมพันธ์กับเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆ 78.6 - 100% ส่วน GGS2 และ GGS3 มีความสัมพันธ์ 7.3% และ 59.6 - 81.5% ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ สรุปว่าเชื้อสาเหตุของโรคยอดไหม้ คือ เชื้อไฟโตพลาสมาและมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อสาเหตุของโรคใบขาว

วรรณภา และคณะ (2548) ได้สำรวจชนิดและปริมาณของเพลี้ยจักจั่นในพื้นที่ปลูกอ้อย อ.กุ่มกาวปี จ.อุดรธานี ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2545 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2546 โดยใช้กับดักแสงไฟ พบแมลงเพลี้ยจักจั่นจำนวน 69 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์ Cicadellidae โดยส่วนใหญ่มีปริมาณมากในช่วงฤดูฝน แต่ช่วงเวลาของการพบปริมาณประชากรแมลงมากที่สุดของเพลี้ยจักจั่นแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในตัวเพลี้ยจักจั่นด้วยปฏิกิริยา Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) สามารถตรวจพบ PCR product ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยมีขนาดนิวคลีโอไทด์ 210 คู่เบส ในเพลี้ยจักจั่นจำนวน 12 ชนิด โดยเพลี้ยจักจั่น *Xestocephalus* sp. ตรวจพบเชื้อสูงที่สุด 34.62% ผลการสำรวจอ้อยที่พบโรคใบขาวอ้อยในแปลงปลูกอ้อยและพบเปอร์เซ็นต์อ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวมีมากในระยะย่างปล่องมากกว่าระยะออกดอกและระยะเก็บเกี่ยว และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อจากต้นอ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาไปสู่ต้นอ้อยที่มีอาการปกติโดยเพลี้ยจักจั่น *Exitianus indicus* และ *Matsumuratettix hiroglyphicus* พบว่ามีเพียง *M. hiroglyphicus* ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ โดยตรวจพบ PCR product ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย มีขนาดนิวคลีโอไทด์ 210 คู่เบส ในต้นอ้อยปกติที่รับเชื้อจากการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นระยะเวลา 3, 24 และ 168 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ 10, 20 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ยุพา และคณะ (2548) ได้ศึกษาการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่นชนิดต่างๆ ที่เก็บมาจากแปลงปลูกอ้อย ในจังหวัดอุดรธานี ด้วยปฏิกิริยา Nested PCR สามารถตรวจพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยขนาดนิวคลีโอไทด์ 210 คู่เบส (base pair) ในเพลี้ยจักจั่นจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Exitianus indicus*, *Yamatotettix flavovittatus*, *Recilia* sp., *Recilia distinctus*, *Balclutha* sp., *Xestocephalus* sp., *Bhatia olivacea*, *Recilia dorsalis*, *Macrosteles striifrons*, *Thaia oryzivora* และ *Balclutha rubrostriata* เมื่อทำการตรวจสอบการเป็นแมลงพาหะและประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติโดยเพลี้ยจักจั่น จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus*, *E. indicus* และ *Y. flavovittatus* พบว่ามีเพียงเพลี้ยจักจั่น

M. hiroglyphicus และ *Y. flavovittatus* เป็นแมลงพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ ส่วนเพลี้ยจักจั่น *E. indicus* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยไปสู่ต้นอ้อยปกติได้ โดยเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* ระยะเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ที่ดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและแสดงการถ่ายทอดเชื้อสู่ต้นปกติได้ 10 - 55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเพลี้ยจักจั่น *Y. flavovittatus* ใช้เวลาดูดรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากต้นอ้อยที่แสดงอาการใบขาวที่ระยะเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อตั้งแต่ 5 - 45 เปอร์เซ็นต์

รณรงค์ และคณะ (2548) ได้ศึกษาและผลิตต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวอ้อยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของอ้อย 5 สายพันธุ์ คือ K84 - 200, K92 - 213, K92 - 80, กพส94 - 13 และ กพส 98 - 2 - 009 แคลลัสที่ได้ในแต่ละสายพันธุ์ ผ่านการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธี dot blot hybridization คัดเลือกแคลลัสที่ปลอดโรคใบขาวอ้อยมาขยายเพิ่มปริมาณและชักนำให้เกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียว เพื่อการผลิตต้นกล้าปลอดโรคจำนวนมากขึ้น ต้นกล้าอ้อยปลอดโรคที่เตรียมได้สามารถย้ายปลูกในแปลงผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคต่อไปได้

ชนิษฐา และคณะ (2551) ได้พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้มา Cross-absorbed กับน้ำคั้นพืชปกติ จากนั้นนำมาแยกเฉพาะ Immunoglobulin G (IgG) และเตรียม F(ab')₂ แล้วทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมด้วยวิธี F(ab')₂ indirect ELISA กับน้ำคั้นของอ้อยใบขาวและอ้อยปกติ ปรากฏว่าแอนติบอดีจากการเจาะเลือดกระต่ายครั้งที่ 1-3 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย และพบว่าเอ็นไซม์ horseradish peroxidase-labelled protein A มีประสิทธิภาพสูงกว่าเอ็นไซม์ alkaline phosphatase antirabbit IgG และพบว่า polysorp plate ของ Nunc เหมาะสำหรับนำมาใช้ชุดตรวจสอบ จากการทดสอบโดยวิธี ELISA พบว่าบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้เป็น coating buffer คือ 0.05 M Sodium carbonate pH 9.6 และ conjugate buffer คือ phosphate buffer saline-tween 20 + 2% polyvinylpyrrolidone + 0.2% ovabumin ผลการตรวจสอบตัวอย่างโรคใบขาวอ้อย ด้วยชุดตรวจสอบได้ผลดี โดยค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของอ้อยเป็นโรคมียค่าแตกต่างจากอ้อยปกติอย่างชัดเจน แต่ถ้าอ้อยแสดงอาการใบขาวปนเขียวหรือสีเขียวอ่อน ค่าที่อ่านได้ค่อนข้างต่ำ แต่ยังสูงกว่าค่าของใบอ้อยปกติ

Clark *et al.* (1989) มีการผลิตโพลีโคลนอล แอนติเซรัม (polyclonal antiserum) และ

โมโนโคลนอล แอนติเซรัม (monoclonal antiserum) สำหรับใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในพืชที่เป็นโรคโดยประสบความสำเร็จในการผลิตแอนติเซรัมเจาะจงกับแอนติเจนที่เป็นเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและโรคใบขาวของหญ้าแพรก ซึ่งแอนติเซรัมที่ผลิตได้จากหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว แต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพืชอื่นที่นำมาทดสอบ รวมทั้งกับอ้อยที่แสดงอาการใบขาวและอาการกอดะไคร้ ในทำนองเดียวกันแอนติเซรัมที่ผลิตได้จากอ้อยที่เป็นโรคใบขาว สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวและอ้อยที่เป็นโรคกอดะไคร้เท่านั้น

Nakashima *et al.* (1994) ได้มีการค้นพบ extrachromosomal DNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคใบขาวอ้อย ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อนี้ที่ถูกโคลนแล้ว สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาว และเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆ ที่ทำให้พืชตระกูล gramineae แสดงอาการใบขาว ซึ่งดีเอ็นเอตัวตรวจนี้สามารถทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อยเป็นโรค และพืชตระกูล gramineae ที่แสดงอาการใบขาว

Klinkong and Seemuller (1997) ได้สกัดดีเอ็นเอจากอ้อยที่เป็นโรคใบขาวอ้อยโดยวิธี CsCl-bisbenzimidazole density gradient พบเกิดแถบ extrachosomal DNA (E-DNA) จำนวน 6 แถบ เหมือนกับการทำ gel electrophoresis ซึ่งมีแถบจำนวน 3 แถบ โดยแถบที่ 1 มีขนาด 2.5 กิโลเบส เมื่อแยกด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ได้ดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงและทดลองโคลนชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าสู่ *Escherichia coli* ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้จากชิ้นส่วนที่แทรกสอดด้วยวิธีถ่ายยีนที่เกิดจากแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ของดีเอ็นเอโรคใบขาวอ้อยที่ไม่ได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เป็น homologous กับชิ้นส่วนที่เป็น nick และ supercoil ของ Recombinant plasmid ที่ได้จากโคลนชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย การตรวจตัวอย่างด้วยวิธีไฮบริดเซชันจำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ที่แตกต่างกันของประเทศไทย พบว่าให้ผลเป็นโรคใบขาวกับตัวอย่าง E-DNA ของ หญ้าแพรกและหญ้า brachiaria และไม่เกิดผลเป็นโรคใบขาวกับตัวอย่างพืชอีก 18 ชนิด

Wongkaew *et al.* (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โรคกอดะไคร้อ้อย และโรคใบขาวในหญ้าบางชนิด ซึ่งพบในแปลงที่ปลูกอ้อยโดยใช้เทคนิค RFLP และการหาลำดับเบส ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rRNA

ด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ PCR product ขนาด 1.35 กิโลเบส แล้วนำมาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด ในส่วนของการหาลำดับเบสใช้ PCR product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งเป็นส่วน 3' ของ 16S rRNA และส่วนช่องว่าง (spacer region) ระหว่าง 16S rRNA และ tRNA จากการวิเคราะห์แบบแผน RFLP และการหาลำดับเบสแสดงให้เห็นว่าโรคใบขาวอ้อยและโรคกอดะไคร์ของอ้อยมีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาต่างชนิดกัน สำหรับการหาลำดับเบสดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในวัชพืชทั้ง 3 ชนิด ซึ่งแสดงอาการใบขาวนั้นไม่ประสบความสำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในหญ้าทั้ง 3 ชนิด มีความใกล้ชิดกันมากจนเกือบไม่ต่างกัน

Morcone *et al.* (1997b) ได้ทำการศึกษาหญ้าแพรกใบขาวในอิตาลีและลักษณะสำคัญที่เกี่ยวข้องกับเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้เทคนิค RFLP หญ้าแพรกที่แสดงอาการของโรคใบขาวจะสังเกตได้ในแปลงซึ่งปลูกผักและผลไม้ตลอดจนพื้นที่ที่ไม่ได้เพาะปลูกในตอนกลางและตอนใต้ของอิตาลี โดยใช้เทคนิคทางด้าน PCR เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงจากส่วนยีน 16S rRNA พบในหญ้าที่แสดงอาการใบขาวที่นำมาทดสอบทั้งหมดให้ผลบวก ส่วนหญ้าปกติไม่ได้แถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยา PCR จากนั้นได้นำเทคนิค RFLP มาใช้ในการวิเคราะห์บางส่วนของ rRNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR รูปแบบที่ได้แสดงให้เห็นว่าเป็นแบบเดียวกัน ซึ่งคล้ายกับไฟโตพลาสมาในโรคใบขาวอ้อย จากการศึกษาทำให้บอกได้ว่าสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าแพรกใบขาวมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวอ้อย

Seneviratne *et al.* (2004) ได้ศึกษาโรคใบขาวอ้อยในประเทศศรีลังกาด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SPP1/SPP2 ขนาด 18 bp และ PCR product ที่ได้มีขนาดนิวคลีโอไทด์ 321 คู่เบส ที่ออกเบสจากจากส่วนยีน 16S rRNA เพื่อตรวจสอบการเกิดโรคในอ้อยที่ได้จากวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าสามารถตรวจสอบผลได้แม่นยำและเชื่อถือได้ แม้ความเข้มข้นของ template DNA มีค่าความเข้มข้นเพียง 0.04 นาโนกรัม

4. การตรวจวินิจฉัยและการจำแนกเชื้อของไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช

การศึกษาในด้านต่าง ๆ ตลอดจนการจัดจำแนกและแยกชนิดเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมานี้ค่อนข้างเป็นเรื่องยาก เนื่องจากยังไม่ประสบผลสำเร็จในการ

เลี้ยงเชื้อไฟโตพลาสมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีเพียงกลุ่มเชื้อสกุล *spiroplasma* ที่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมได้ และมีขนาดใหญ่กว่าเชื้อมอลลิคิวท์ชนิดอื่นๆ ทำให้สามารถจำแนกได้โดยกาตรวจรูปร่างลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nakashima *et al.*, 1995; Nakashima and Hayashi, 1995) ปัจจุบันการตรวจและศึกษาเชื้อไฟโตพลาสมานั้น มีหลายวิธี ได้แก่

4.1 การตรวจโดยอาศัยลักษณะทางชีววิทยา มีวิธีตรวจสอบได้หลายวิธี คือ

4.1.1 การตรวจและจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยความเฉพาะเจาะจงของแมลงในการเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อโรคของพืช มีตัวอย่างเช่น แมลงเพลี้ยจักจั่นเขียวขำ *Nephotettix cincticeps* Uhler., *Nephotettix virescens* Distant. และ *Nephotettix nigropictus* Stal. สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบสีแสดของข้าวได้ (Nasu *et al.*, 1967; Ou, 1985) ส่วนเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคฝอยของงา (phyllody) ที่พบในประเทศอินเดีย สามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยจักจั่น *Orocilus albicinctus* (Prasad and Sahambi, 1982; Nakashima *et al.*, 1995) ในขณะที่ประเทศอิหร่าน พบว่าโรคยอดฝอยของงาสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมา ได้โดยเพลี้ยจักจั่น *Neolaliturus baematoceps* (Nakashima *et al.*, 1995) นอกจากนี้ Shiomi and Sugiura (1984) ได้อาศัยจำนวนชนิดของพืชอาศัยที่ต่างกัน เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาสายพันธุ์ที่มีการถ่ายทอดได้โดยแมลงเพลี้ยจักจั่น *Macrosteles orientalis* Virvaste

4.1.2 การจำแนกโดยคุณลักษณะอาการตามธรรมชาติที่พบในพืชนั้น ดูได้จากอาการที่ปรากฏในพืชที่เป็นโรค (Shiomi, 1988) เช่น อาการของพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมามักจะแสดงอาการใบขาวหรืออาการแตกพุ่มฝอย ส่วนพืชที่เป็นโรคแสดงอาการใบด่าง มักจะมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส (ธีระ, 2532) ซึ่งการวินิจฉัยโดยดูจากลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรคและการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ มีข้อจำกัดเนื่องจากระยะเวลาของการบ่มเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวแมลงพาหะและในต้นพืชใช้เวลานานมาก จึงไม่นิยมใช้วิธีนี้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา (Nakashima *et al.*, 1991)

4.2 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope)

มีการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาครั้งแรกโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในปี ค.ศ.1967 โดย Doi *et al.* (1967) พบว่าความผิดปกติของพืช เช่น อาการเหลือง เตี้ย แคระและการ

แตกกอ ไม่ได้มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส แต่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างคล้ายกับเชื้อมายโค-พลาสมาที่เป็นสาเหตุโรคปอดอักเสบในคนและสัตว์ โดยสามารถตรวจพบเชื้อภายในบริเวณท่อลำเลียงอาหารของพืชที่เป็นโรคและมีอาการดังกล่าว

Joseph *et al.* (1975) ได้ทำการตรวจหญาแพรกที่เป็นโรคใบเหลืองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารของหญาแพรกที่แสดงอาการใบเหลือง แต่ไม่พบเชื้อนี้ในเนื้อเยื่อของหญาแพรกปกติ โดยเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบไม่มีผนังเซลล์ มีผนังชั้นเดียวเป็นเยื่อบางล้อมรอบไซโทพลาสซึมและองค์ประกอบภายในเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยเม็ดที่คล้ายไรโบโซม และมีสายที่คาดว่าเป็นกรดนิวคลีอิก มีทั้งรูปร่างทรงกระบอกวงกลม และรูปร่างยาว ซึ่งชนิดที่มีรูปร่างทรงกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200 ถึง 500 นาโนเมตร ส่วนชนิดที่มีรูปร่างยาว มีความกว้างประมาณ 80 ถึง 150 นาโนเมตร และชนิดที่มีรูปร่างทรงกระบอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100 ถึง 150 นาโนเมตร

พรทิพย์ (2544) พบว่าการตรวจสอบเชื้อมอลลิคิวต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งต้องการทักษะหรือความเชี่ยวชาญสูงในการตรวจสอบ และแม้สามารถตรวจพบการมีเชื้อมอลลิคิวต์อยู่ภายในเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ แต่ก็ยังไม่สามารถช่วยในการระบุชนิดของเชื้อมอลลิคิวต์ได้ทันที เนื่องจากเชื้อมอลลิคิวต์ทุกชนิดมีรูปร่างลักษณะที่คล้ายกัน แต่สามารถใช้ประกอบเพื่อยืนยันการเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ มีงานวิจัยที่ทำการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยกล้องจุลทรรศน์ในอ้อย เช่น การตรวจสอบโรค primula yellow, tomato big bud และโรค bermuda grass white leaf โดยการทำ pre - embed immunogold labeling และ post - embed immunogold labeling แล้วตรวจสอบบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Milne *et al.*, 1995) และมี การตรวจสอบบริเวณเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชจำพวก periwinkle เพื่อการกระจายตัวของเชื้อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ transmission (Lherminier *et al.*, 1999) เป็นต้น

4.3 การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent microscope)

การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ง่ายและมีความรวดเร็วในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อของพืช แต่วิธีนี้ไม่สามารถบอกได้ถึงชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมา (Dale, 1988) จากหลักการที่พบว่าเชื้อมอลลิคิวต์เกือบทั้งหมดมีการเจริญและอยู่

อาศัยแพร่พันธุ์ภายในท่อลำเลียงอาหารของพืช คือ sieve tube member และ companion cell ซึ่งเป็นเซลล์กลวงที่ปราศจากนิวเคลียสหรือแทบไม่มีดีเอ็นเอของพืชอยู่เลย และหากจะมีก็จะมีเพียงบางเซลล์ และมีเพียงจำนวนน้อยมาก ดังนั้นหากมีการติดสีเรืองแสงเกิดขึ้นภายในท่อลำเลียงดังกล่าว จึงน่าจะเป็นดีเอ็นเอจากแหล่งอื่น Wongkaew *et al.* (1995) ได้ทำการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาว โดยย้อมเนื้อเยื่อของส่วนท่อลำเลียงน้ำและอาหารของอ้อยปกติและอ้อยที่แสดงอาการใบขาวด้วยสารละลาย 4, 6 - diamidino - 2 - phenylindole (DAPI) และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบความแตกต่างของส่วนท่อลำเลียงน้ำของอ้อยปกติ มีการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนซ์เป็นจุดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป ในขณะที่อ้อยที่แสดงอาการใบขาวจะพบการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนซ์เป็นสีน้ำตาลทั้งภายในและภายนอกของส่วนท่อลำเลียงอาหาร ซึ่งแสดงว่าอ้อยที่แสดงอาการใบขาวเป็นการติดเชื้อโดยคาดน่าจะเป็นเชื้อไฟโตพลาสมา แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดใด (Harison *et al.*, 1996)

4.4 การตรวจโดยใช้วิธี ELISA (Enzyme - linked Immunosorbent Assay)

การตรวจและวินิจฉัยทางโมเลกุลโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies) หรือโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibodies) มีประโยชน์มากสำหรับการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา (Kirkpatrick *et al.*, 1987) ดังเช่นการศึกษาของ Clark *et al.* (1989) ที่มีการผลิตโพลีโคลนอล แอนติเซรัม (Polyclonal antiserum) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) สำหรับใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในพืชที่เป็นโรค โดยประสบผลสำเร็จในการผลิตแอนติเซรัมที่เฉพาะเจาะจงกับแอนติเจนที่เป็นเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยและโรคใบขาวของหญ้าแพรก ซึ่งแอนติเซรัมที่ผลิตได้จากหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อในหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว แต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพืชอื่นที่นำมาทดสอบ รวมทั้งกับอ้อยที่แสดงอาการใบขาวและอาการกอดะไคร้ ในทำนองเดียวกันแอนติเซรัมที่ผลิตได้จากอ้อยที่เป็นโรคใบขาวสามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวและอ้อยที่เป็นโรคกอดะไคร้

ส่วนวิธี ELISA ซึ่งเป็นที่นิยมคือ วิธีแบบอ้อม (indirect - ELISA) เนื่องจากมีความไวและให้ระดับความเชื่อถือได้สูงกว่าวิธี ELISA แบบตรง (direct - ELISA) ซึ่งแอนติบอดีตัวตรวจมีการจับเข้ากับแอนติเจนโดยตรง โดยมีขั้นตอนการตรวจเชื้อซึ่งไม่ยุ่งยากและสามารถทราบผลในเวลา 2 - 3 วัน (พรทิพย์, 2542) มีงานวิจัยที่ทำการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี ELISA

ในอ้อย เช่น Loi *et al.* (2002) ได้การศึกษาเกี่ยวกับการผลิต Monoclonal antibody เพื่อตรวจสอบการเกิดโรค apple proliferate ในทวีปยุโรป โดยเทคนิค ELISA และเทคนิค Immunofluorescence โดยตรวจสอบการติดเชื้อใน periwinkle และต้น apple ในประเทศอิตาลีและสโลวาเนีย เปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธี direct - ELISA และเทคนิค Immunofluorescence กับวิธีการย้อมด้วยสี DAPI และปฏิกิริยา PCR ผลการทดลองพบว่าเทคนิค ELISA มีความไวของการทำปฏิกิริยาเท่ากับผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR แต่เทคนิค ELISA มีความรวดเร็วและการปฏิบัติงานสะดวกมากกว่าปฏิกิริยา PCR โดยสามารถตรวจสอบผลของโรค apple proliferate phytoplasma ทั้งในส่วนของราก ลำต้น และใบของแอปเปิ้ลได้

นงลักษณ์ และกลล (2536) ได้ทดลองนำท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคใบขาวและหญ้าแพรกใบขาวในธรรมชาติ ไปปลูกในโรงเรือนไม้ทดลอง และใช้อ้อยและหญ้าแพรกที่เป็นโรคดังกล่าวเป็นแหล่งของโรคใช้แยกโปรตีนของมายโคพลาสมาหรือแอนติเจน เพื่อผลิตแอนติซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาสาเหตุของโรคแต่ละชนิด เมื่อทดสอบปฏิกิริยากับแอนติเจนหรือน้ำคั้นจากใบอ้อยที่เป็นโรคด้วยวิธี F(ab')₂ Indirect Enzyme - linked Immunosorbent Assay ปรากฏว่าแอนติซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาที่แยกจากโรคใบขาวอ้อยจะทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับน้ำคั้นจากอ้อยที่เป็นโรคใบขาว และแอนติซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาที่แยกจากโรคใบขาวหญ้าแพรกจะทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับน้ำคั้นจากหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว แอนติซีรัมทั้งสองชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนต่างชนิด เมื่อใช้โปรตีนของมายโคพลาสมาจากอ้อยใบขาวและจากหญ้าแพรกใบขาวมาแยกโดยวิธี Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) และ western blot ปรากฏว่ามายโคพลาสมาแต่ละชนิดจะมีโปรตีนที่สำคัญหนึ่งชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน คือ 21 kd สำหรับอ้อยใบขาว และ 19 kd สำหรับหญ้าแพรกใบขาว โปรตีนของมายโคพลาสมาแต่ละชนิดจะทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับแอนติบอดีของโปรตีนนั้นๆ เท่านั้น จากปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงของวิธี ELISA, western blot และจากระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนใน SDS - PAGE แสดงว่าเชื้อมายโคพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและโรคใบขาวของหญ้าแพรกเป็นเชื้อต่างชนิด

4.5 การตรวจโดยวิธีดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe)

การตรวจสอบโดยวิธีดีเอ็นเอตัวตรวจจะดูผลจากปฏิกิริยา DNA hybridization คือ

การจับคู่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นตัวตรวจกับดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงกว่าวิธี ELISA (Seemuller and Kirkpatrick, 1996) การคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวตรวจ อาจทำได้หลายวิธี เช่น วิธี random cloned DNA, ribosomal RNA gene ในส่วนของ 16S rRNA gene หรือ 16S - 23S rRNA gene หรือวิธี specific - specific DNA probe (พรทิพย์, 2542) ซึ่งวิธีการตรวจสอบเชื้อแบ่งเป็น 2 วิธี คือ dot blot hybridization และ southern blot hybridization ตามลักษณะการใช้ประโยชน์ คือ

4.5.1 วิธี dot blot hybridization เหมาะสมกับการตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมากและมีขั้นตอนการปฏิบัติที่ไม่ยุ่งยาก (Seemuller and Kirkpatrick, 1996) ซึ่งสามารถนำน้ำคั้นที่ได้จากการบดเนื้อเยื่อของพืชที่ติดเชื้อและไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ หรือใช้น้ำที่ไหลจากรอยตัดสดของกิ่งก้านหรือเส้นใยพืชโดยตรง นำมาหยดลงบนแผ่น nylon หรือ nitrocellulose ทันที แล้วทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันตามขั้นตอนปกติ ก็สามารถที่จะตรวจสอบการติดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ ซึ่งเป็นการลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ โดยผลที่ได้มีประสิทธิภาพเทียบได้กับการตรวจด้วยการสกัดดีเอ็นเอได้ (พรทิพย์ และคณะ, 2541)

4.5.2 วิธี southern blot hybridization ตรวจสอบปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน ด้วยการตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย restriction enzyme ย้ายดีเอ็นเอเป้าหมายจากแผ่น agarose gel ไปสู่แผ่น nylon หรือ nitrocellulose และตรึงดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตหรือความร้อน แล้วทำการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน (Seemuller and Kirkpatrick, 1996)

การเพิ่มความชัดเจนของปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน โดยการติดฉลากดีเอ็นเอ อาจทำได้ทั้งวิธีติดฉลากสารรังสี (radioactive) และสารปกติที่ไม่มีรังสี (nonradioactive) แต่เป็น เอ็นไซม์ หรือสารให้สีหรือสารเรืองแสงธรรมชาติ เช่น ^{32}P autoradiography หรือเอ็นไซม์ alkaline phosphatase และ horse radish peroxidase หรือสารเรืองแสง digoxigenin และ biotin ซึ่งมีความปลอดภัยต่อการปฏิบัติงาน ได้มีการนำเทคนิคดีเอ็นเอตัวตรวจมาใช้ในการตรวจสอบพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชต่างๆ เช่น Nakashima *et al.* (1993) ได้ตรวจสอบการเกิดโรค Rice Yellow Dwarf จากเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวน 10 สายพันธุ์ จากประเทศญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และประเทศไทย โดยการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้จากโครโมโซมจำนวน 4 probe และดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้จาก Extrachromosomal DNA จำนวน 6 probe ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรค Rice Yellow Dwarf โดยเปรียบเทียบระหว่าง

เทคนิค dot blot hybridization และ southern blot hybridization พบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งเทคนิค dot blot hybridization จะใช้เวลาที่สั้นและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากและมีราคาแพง

Lherninier *et al.* (1999) ได้ใช้เทคนิค Oligodeoxynucleotides เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจในการทำปฏิกิริยา *in situ* hybridization (ISH) เพื่อตรวจสอบบริเวณที่มีการแพร่กระจายของเชื้อไฟโตพลาสมาใน Periwinkle ด้วย Transmission electron microscopy โดยการติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจด้วยสารไดคอกซิเจนินหรือสารไบโอติน พบว่าสามารถตรวจสอบบริเวณที่มีการแพร่กระจายของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ในระดับเนื้อเยื่อ

Webb *et al.* (1999) ได้ตรวจสอบโรค Italian clover phyllody (ICPh) ในพืชชนิด *Chrysanthemum carinatum* และเพลี้ยจักจั่นชนิด *Euscelidius variegates* ด้วยเทคนิค ISH ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ที่ติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจด้วยสารไดคอกซิเจนินหรือสารไบโอติน พบว่าสามารถตรวจสอบผลได้ทั้งในเนื้อเยื่อพืชและเนื้อเยื่อของเพลี้ยจักจั่น

4.6 การตรวจโดยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณมากขึ้นโดยวิธีปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคในคน สัตว์และพืช ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาสั้นและผลที่ได้มีความจำเพาะสูง เหมาะสมกับเชื้อที่ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียม ก่อนที่จะนำไปทำการทดสอบกับวิธีตรวจสอบอื่นๆ โดยเฉพาะการตรวจสอบเชื้อมายโคพลาสมาในต้นพืชและแมลงที่เกี่ยวข้อง (พรทิพย์, 2544) ปฏิกิริยาที่ใช้ตรวจสอบเชื้อมายโคพลาสมาที่ได้รับการดัดแปลงและพัฒนาให้เหมาะสมในการตรวจเชื้อในปัจจุบัน คือ

4.6.1 วิธีปฏิกิริยา PCR แบบมาตรฐาน คือ การใช้ DNA primer คู่เดียว ซึ่งอาจจะเป็นไพรเมอร์ ที่ออกแบบมาจากส่วนของ 16S rRNA gene หรือ 16S – 23S rRNA gene

4.6.2 วิธีปฏิกิริยา PCR แบบ Nested PCR ซึ่งดัดแปลงให้เหมาะสมกับการตรวจเชื้อที่มีปริมาณน้อยโดยการใช้ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด ในการทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งไพรเมอร์ชุดแรกจะมีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างกว้าง เรียกว่า outer primer หรือ universal

primer และไพรเมอร์ชุดที่ 2 ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อจีโนมเป้าหมายสูง เรียกว่า inner primer หรือ specific primer จะช่วยเพิ่มปริมาณจีโนมในส่วน of 16S -23S rRNA gene

มีงานวิจัยที่ทำการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยปฏิกิริยา PCR ในอ้อย เช่น การจำแนก ระดับชีววิทยาโมเลกุล เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อสาเหตุโรคกอตะไคร้และ โรคใบขาวของอ้อย โดยการทำปฏิกิริยา PCR และการนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับจีโนมบน ฐานข้อมูล (GenBank database) มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างชิ้นส่วนที่ได้จากการโคลน ชิ้นส่วนปฏิกิริยา PCR และใบขาว (Accession no. X76432) 93.8% (ธนศ., 2545) การตรวจสอบเชื้อ ไฟโตพลาสมาในอ้อยที่ทำให้เกิดโรค grassy shoot disease ที่ประเทศศรีลังกา โดยการออกแบบ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA (Seneviratne *et al.*, 2004) หรือนำปฏิกิริยา PCR มา ศึกษาจีโนมของเชื้อไฟโตพลาสมาและการทำแผนที่ยีนเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทาง พันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา (Gaicia - Chapa *et al.*, 2004) เป็นต้น

5. การพัฒนาวิธีการสกัดจีโนมจากพืชที่มีประสิทธิภาพ

การตรวจสอบโรคในพืชต่างๆ ไป มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันก่อนทำการปลูกพืชหรือการ กำจัดโรคระหว่างการปลูกพืช สามารถสังเกตจากอาการของพืชที่เป็นโรค ซึ่งบางโรคมีอาการที่ ใกล้เคียงกัน เช่น การเกิดใบขาวในอ้อยอาจเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา การเข้าทำลายของเชื้อไวรัส หรือการขาดธาตุอาหารที่จำเป็น เป็นต้น ทำให้ยากในการวินิจฉัย ซึ่งหากมีการนำวิธีการใช้จีโนมเ ต้าตรวจ (DNA probe) ซึ่งมีข้อดี คือ มีความน่าเชื่อถือมากและตรวจได้ในปริมาณที่มาก เป็นวิธี ตรวจที่สามารถบอกได้ถึงอาการของโรคในระดับเนื้อเยื่อ (พรทิพย์, 2544) และปัจจัยที่สำคัญในการ ตรวจสอบโรคพืชโดยเทคนิคไฮบริโดเซชัน คือ ดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงและดีเอ็นเอที่มี ปริมาณและคุณภาพดีเพื่อนำมาตรวจสอบโรค ซึ่งวิธีการสกัดจีโนมที่ใช้ในปัจจุบัน มีผู้พัฒนาและ คิดค้นวิธีการในการสกัดขึ้นมากมาย แต่ละวิธีมีความแตกต่างกันในการใช้สารเคมี และขั้นตอนการ สกัดที่แตกต่างกันโดยให้มีความเหมาะสมกับตัวอย่างและชนิดของพืชที่ต้องการศึกษา และการนำ ตัวอย่างไปทดลองในขั้นต่อไป เช่น การทำ genomic library construction, southern analysis, long - PCR และการทดลองอื่น ๆ

ตัวอย่างวิธีการสกัดจีโนมพืช

Wagner *et al.* (1987) รายงานว่าวิธีการสกัดแบบ CTAB ของ Murray and Thompson (1980) วิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Dellaporta *et al.* (1983) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายแต่ใช้ เวลาในการสกัดดีเอ็นเอที่นานและไม่เหมาะกับตัวอย่างพืชที่มี polysaccharide หรือ polyphenol ใน ปริมาณที่สูง เนื่องจากสารเคมีที่ใช้เป็น extraction buffer จากวิธีสกัดทั้ง 2 วิธี มีความสามารถในการกำจัดสารกลุ่ม polysaccharide หรือ polyphenol ในปริมาณที่ต่ำ

Lodhi *et al.* (1994) ได้พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากองุ่น โดยดัดแปลงมาจากวิธีการสกัด ดีเอ็นเอของ Doyly and Doyly (1990) เป็นการสกัดแบบใช้ CTAB และดัดแปลงใช้ NaCl เพื่อกำจัด สารกลุ่ม Polysaccharide และใช้ PVP เพื่อกำจัดสาร polyphenol ซึ่งสารทั้งสองมีมากในองุ่น วิธีนี้ ให้คุณภาพดีเอ็นเอในปริมาณที่สูงคือ มีปริมาณมากกว่า 1 mg/1 g ของใบพืช และสามารถนำ ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และนำไปทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งให้ผลดีเท่ากับการ สกัดดีเอ็นเอขององุ่นด้วยวิธีของ Bourquin *et al.* (1991) (5 - 20 µg/nuclear DNA/1 g) ซึ่งเป็น วิธีที่นิยมใช้ในการใช้สกัดองุ่น

Kang *et al.* (1998) ได้ทดลองสกัดเมล็ดพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น เมล็ดข้าว เมล็ดถั่ว เมล็ด พักทอง เมล็ดแตงกวา เมล็ดพริกไทย เป็นต้น ซึ่งเป็นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *bar* ซึ่งสามารถ ต้านทาน herbicide bialaphos ใช้ extraction buffer ที่ประกอบด้วย 200 mM Tris - HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS (v/v), 1% PVP (v/v) และ 2% CTAB (w/v) ได้ปริมาณ ดีเอ็นเอ 1.5 - 2 µg/ 1 endosperm โดยการตรวจสอบผลการสกัดด้วยปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์แบบ random primer และ RFLP ที่ออกแบบไพรเมอร์มาจาก *bar* gene พบว่าผลที่ได้เหมือนกับการสกัด ตัวอย่างจากใบพืช โดยวิธีนี้สามารถที่จะคัดแยก genotype ในตัวอย่างที่มี 200 ตัวอย่าง ให้เสร็จใน หนึ่งวันได้

Chen and Ronald (1999) ได้พัฒนาวิธีในการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวและพืชอีกหลายๆ ชนิด โดยการสกัดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และใช้ trip ช่วยในการบดตัวอย่าง ในระยะเวลา 1 วัน สามารถที่จะสกัดตัวอย่างพืชได้มากกว่า 120 ตัวอย่าง ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 2.3 - 5.2 µg / 25 - 50 mg ใบพืชสด นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *MseI* และ *PstI* แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิค RFLP และปฏิกิริยา PCR พบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีปกติทั่วไป

Dilworth and Frey (2000) มีการนำ glass bead ซึ่งเป็นซิลิกาชนิดหนึ่งช่วยในการสกัดดีเอ็นเอจากใบแอปเปิ้ลได้อย่างรวดเร็ว เพื่อตรวจสอบการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Venturia inaequalis* ที่ทำให้เกิดโรค scab และเชื้อ *Podosphaera leucotricha* ที่ทำให้เกิดโรค powder mildew โดยการทำปฏิกิริยา PCR

Kristi *et al.* (2002) ได้ทดลองใช้ extraction buffer ที่ประกอบด้วย 0.25 M NaOH และ 0.1M Tris - HCl, pH 8.0 สกัดดีเอ็นเอในเมล็ดข้าวสาลีที่กำลังงอก ได้ปริมาณดีเอ็นเอ 1 µg/10 mg ของพืชสด ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และการตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Microsatellite เพื่อตรวจสอบยีนต่างๆ ของข้าว ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกับการสกัดด้วยวิธีอื่นและสามารถสกัดดีเอ็นเอได้เกือบ 1,000 ตัวอย่างในหนึ่งวัน และสามารถเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน

Rogstad (2003) มีการนำผงซิลิกาช่วยสกัดพืชที่มีขนาดมวลโมเลกุลของจีโนมสูง โดยการสกัดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และสารสกัดประกอบด้วย 10 g CTAB, 140 ml. NaCl, 25 ml. 1 M Tris - HCl pH8.0, 20 ml. 0.5 M EDTA pH8.0 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 2 - 4 µg / 250 mg ใบพืชสด และขั้นตอนการสกัดแบบลดขั้นตอน โดยใช้ส่วนของน้ำสบู่รวมกับ 0.6 เท่า ของ Isopropanol ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงและล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR พบว่าผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้ในโตรเจนเหลวบดตัวอย่างพืชและเป็นวิธีการที่ลดการใช้ CTAB และ guanidine thiocyanate ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีราคาแพง

Kasajima *et al.* (2004) ได้นำสารสกัดจากวิธีของ Edwards *et al.* (1991) ได้แก่ 200 mM Tris - HCl pH7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA และ 0.5% SDS บดตัวอย่าง *Arabidopsis thaliana* ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้แท่งพลาสติกช่วยในการบดตัวอย่างปริมาณ 3 – 5 mg ในสารสกัดปริมาตร 200 µl นำตัวอย่างที่บดปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ดูดส่วนใสและนำมาเจือจาง 10 เท่า ใน TE buffer ทดลองตัวอย่างที่สกัดได้กับปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 23 ชุด พบว่าได้ผล 96% เมื่อเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีปกติ โดยใช้เวลาในการบดตัวอย่าง 1 นาที/ตัวอย่าง และให้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 120 µg/ 1 mg ตัวอย่าง สามารถเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ได้นาน 1 เดือน โดยยังมีประสิทธิภาพดีเมื่อนำมาทดสอบด้วยปฏิกิริยา PCR

ในแต่ละงานวิจัยต้องการที่จะพัฒนาวิธีในการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ระยะเวลาสั้นและลดการใช้สารเคมีที่อันตรายหรือมีราคาแพง โดยการลดขั้นตอนเพื่อลดระยะเวลาที่ใช้ในการทำการทดลองขั้นต่อไป แต่คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ต้องมีคุณภาพดี คือ เมื่อนำไปทำการทดลอง เช่น การทำปฏิกิริยา PCR, เทคนิค RFLP, เทคนิคไฮบริโดเซชัน เป็นต้น ผลที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างกับการสกัดด้วยวิธีมาตรฐานทั่วไป



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

อ้อยพันธุ์อุ้มทอง 2 ตัวอย่าง คือ อ้อยปกติ อ้อยเป็นโรคใบขาว ได้รับตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสุพรรณบุรี นำตัวอย่างมาทำความสะอาดโดยการล้างน้ำ ผึ่งให้แห้งและเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลอง

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- Centrifuge J2 – MC (Beckman)
- Centrifuge GS – 15R (Beckman)
- Water bath (Mettler)
- Fume Hood (Crumair)
- Laminar air flow (Holten)
- Thermal cycle Model 2400 (Perkin Elmer)
- Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech)
- Horizontal electrophoresis GNA 200 (Pharmacia Biotech)
- Power supply Power pac 300 (BIO-RAD)
- Spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)
- Fluor – STM Multilmager (BIO - RAD)
- Incubator (EHRET)
- Midi – pump suction Model 1132E (Thomas)
- Minitron Incubator Shaker (Infors)
- Hybridization oven / Shaker SI 20H (Stuart scientific)
- Gel box mini UV transilluminator (BIO - RAD)
- UV crosslinker stratalinker[®] 1800 (Stratalinker gene)

- pH meter 50 pH Mete (Beckman)
- Balance 40SM - 200A (Precise)
- Balance BL610 (Sartorius)
- Water bath RTE - 100 (endocal)
- Magnetic stirrer (Bec Thai)
- Vortex (Vibromix)
- Automatic pipette (Gilson)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีทั่วไป

- Ethylenediamine - tetraacetic acid (EDTA) (Merck)
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Merck)
- Sodium Chloride (NaCl) (Merck)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Merck)
- 2 – Mercaptoethanol (SIGMA)
- Disodium Salt, dehydrate (Bio Basic Inc.)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-base) (Merck)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Merck)
- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Merck)
- Potassium acetate (KCH_3CO_2) (Ajax)
- Bromophenol blue (J.T Baker)
- Xylene cyanol (J.T Baker)
- Glycerol (Pharmacia Biotech)
- Sodium acetate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) (Ajax)
- Isopropanol (BDH)
- Ethanol (BDH)
- Agarose (Vivantis)
- DEPC – treated water (Bio 101)

- Ampicilin
- X - Gal (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - galactoside) (Bio 101)
- IPTG (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranoside) (Bio 101)
- Yeast extract powder (Himedia)
- Bacto TM tryptone (Himedia)
- Agar (Ajax)

3.2 เอนไซม์และอื่นๆ

- DynAzyme II DNA Polymerase (FINNZYMES)
- Rnase A (Promega)
- JM 109 Competent Cells (Promega)
- 100 bp DNA marker (Bio 101)
- Lambda *Hind*III (Bio 101)
- X174 DNA *Hae* III (Bio 101)
- pGEM - T[®] Easy Vector (Promega)
- *Not* I (BioLabs)
- GeneClean[®] Kit II (Bio 101)
- DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)
- Nylon Membranes, positively charged (Roche)

3.3 ไพรมเมอร์

- ไพรมเมอร์ A1 5' GGTGCGTAGGCGGTTTAATA 3'
- ไพรมเมอร์ A2 5' GCCTGTGGTGTTCCTCCATA 3'
- ไพรมเมอร์ A3 5' AATAAGCCCCGGCAAACATA 3'
- ไพรมเมอร์ AF2 5' TTGCTCGGTCAGAGTTTCCT 3'
- ไพรมเมอร์ AR2 5' GGGCTTGCGTCACATTAGTT 3'
- ไพรมเมอร์ AF3 5' TACAGGTGGTGCATGGTTGT 3'
- ไพรมเมอร์ AR3 5' GTGATCCTCACCTTCCTCCA 3'

- ไพรเมอร์ AF4 5' GCAAATAGCGACAAGGTTTG 3'
- ไพรเมอร์ AR4 5' TGCATGACCGTTGATGATCT 3'

3.4 โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการประมวลผล

- โปรแกรม Primer 3 version 0.4.0 (<http://www.Frodo.ri.mit.edu>.)

วิธีการ

1. โคลนดีเอ็นเอตัวตรวจสอบที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาวด้วยวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) บดตัวอย่างพืช 0.1 กรัม ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด นำตัวอย่างที่บดได้ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม Extraction buffer (100 mM Tris - HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 10 mM 2 - mercaptoethanol) และ 100 μ l ของ 20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม 50 μ l ของ 5 M Potassium acetate บ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (GS – 15R, Beckman) ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และนำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 75 % Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 mM Tris – HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA) ปริมาตร 50 μ l เมื่อตะกอนละลายให้นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3M Sodium acetate และ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอน

ด้วย 75 % Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 mM Tris – HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA) ปริมาตร 50 μ l แยกดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอด้วย 1 mg / ml RNase A (Promega) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

1.2 การวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอ

วัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาว โดยการวัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) และวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอบน 1% Agarose gel ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech) ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 50 นาที

1.3 การทำปฏิกิริยาและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับโรคใบขาวอ้อยส่วน 16S rRNA (small subunit) ของโรคใบขาว strain SCWL ขนาด 1518 bp (Seemuller *et al.*, 1994) Accession No.X76432 ได้แก่ ไพรเมอร์ A1, A2, A3, AF2, AR2, AF และ AR3 และ Phytoplasma sp. Strain Khon Kaen Plasmid pPSE, complete sequence ขนาด 2645 bp (Nakashima and Hayashi, 1997) Accession No.Nc_002100 ได้แก่ ไพรเมอร์ AF4 และ AR4 ด้วยชุด DynAzyme II DNA Polymerase (FINNZYMES) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 μ l ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer (10 mM Tris - HCl pH 8.8, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X - 100), 25 mM $MgCl_2$, 200 μ M Deoxynucleotide triphosphate, 10 pmol/ μ l forward primer, 10 pmol/ μ l reverse primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ ปริมาตรตามที่ต้องการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างอ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาวความเข้มข้น 500 นาโนกรัม นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle Model 2400 (Perkin Elmer) ดังนี้ Pre - Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ และ Denature ที่

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิแตกต่างกันตามชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ (ไพรเมอร์ A1A2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, ไพรเมอร์ A2A3 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, ไพรเมอร์ AF2/AR2 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส, ไพรเมอร์ AF3/AR3 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์ AF4/AR4 อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส) นาน 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วิเคราะห์ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech) โดยการทำ gel electrophoresis บน 1.5% Agarose gel กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 50 นาที

1.4 การโคลนชิ้น PCR product

1.4.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR

เตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR จากการทดลองที่ 1.3 โดยตัดแถบของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษาจากเจล นำมาแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุด Geneclean® Kit II (Bio 101) ตามขั้นตอนดังนี้ ชั่งแถบของดีเอ็นเอเป้าหมาย เติม 2.5 เท่าของ NaI นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม 15 μ l ของ grassmilk บ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วย NEW buffer ปริมาตร 500 μ l โดยนำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดส่วนในใสให้หมด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.4.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM – T[®] Easy Vector (Promega) โดยนำตัวอย่างจากการทดลองที่ 1.4.1 ปริมาตร 3 μ l เติม 2X Rapid Ligation Buffer 5 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l และ pGEM – T[®] Easy Vector 1 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

1.4.3 การถ่าย Recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

ใช้เทคนิค heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) เพื่อส่งถ่าย recombinant plasmid เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 (Promega) โดยนำส่วนผสมจากปฏิกิริยาจากการทดลอง 1.4.2 ปริมาตร 5 μ l บ่มรวมกับ competent cell ปริมาตร 50 μ l ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์เดิม อาหารเหลว SOC (Tryptone 2% (W/V), Yeast extract 0.5% (W/V), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, $MgSO_4$ 10 mM และ Glucose 20 mM) ปริมาตร 800 μ l นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่อง Minitron Incubator Shaker (Infors, Switzerland) ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง นำเชื้อไปเลี้ยงโดย spread plate บนอาหารแข็ง LB (Tryptone 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม NaCl 5 กรัม และ Agar 15 กรัม) ที่เติมแอมพิซิลิน 100 μ g/ μ l, 2% X-gal (v/v) (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - galactoside) ใน dimethylformamide 40 μ l และ 100 mM IPTG (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranoside) ปริมาตร 20 μ l นำไปบ่มใน Incubator (EHRET) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง และคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวไว้ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายต่อไป

1.5 การคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

คัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ โคโลนีสีขาวที่สามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน สกัดพลาสมิดที่ได้จากการโคลนดีเอ็นเอด้วยวิธี Mini - prep (Alkaline lysis, Birnboim and Doly, 1979) ตามขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงโคโลนีที่ต้องการในอาหารเหลว LB (Tryptone 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม และ NaCl 5 กรัม) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ผสมแอมพิซิลิน 1 μ l/ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่อง Minitron Incubator Shaker (Infors, switzerland) ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 16 - 18 ชั่วโมง คูลสารละลายเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยนำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำมาละลายตะกอนด้วยการเติม Solution I (0.4% Lysozyme (w/v), 50 mM Glucose, 25 mM tris - HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติม Solution II (0.2 M NaOH และ 1% SDS) ปริมาตร 200 μ l แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วเติม Solution III (3 M

Potassium acetate และ 0.2 M Glacial acetic acid) ปริมาตร 150 μ l แช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที คัดส่วนใสในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร ของ 75% Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนของพลาสมิดด้วย TE buffer ปริมาตร 50 μ l แยกดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอโดยเติม 1 mg/ml ของ Rnase A (Promega) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้ โดยการวิเคราะห์บน gel electrophoresis และตรวจสอบว่า recombinant plasmid มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายสอดแทรกอยู่ โดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I (Bio Labs) ในสารละลายประกอบด้วยพลาสมิดที่ต้องการศึกษาในปริมาณ 0.5 - 1 μ g, 10X buffer 3 μ l *Not* I ปริมาตร 1 μ l และเอ็นไซม์ *Not* I ปริมาตร 0.125 μ l และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเพื่อให้ได้ปริมาตร 10 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I โดยการวิเคราะห์บน gel electrophoresis

2. การคัดเลือกโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อย

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจจาก PCR product

ตัดชิ้น PCR product ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR จากข้อ 1.3 จากเจล นำมาแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุด GeneClean® Kit II (Bio 101) ตามการทดลองที่ 1.4.1 นำดีเอ็นเอที่ได้มาติดฉลากเพื่อสร้างดีเอ็นเอตัวตรวจ ด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) โดยเติม 12 μ l Template DNA และน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 16 μ l นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และบ่มในน้ำแข็งทันที แล้วผสม DIG - High Prime 4 μ l และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M EDTA และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2 การทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน

นำตัวอย่าง recombinant plasmid จากข้อ 1.5 ความเข้มข้น $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ มาหยดบนกระดาษ nylon membrane ที่แช่ใน 10X SSC ก่อนที่จะหยดตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วบ่มใน UV stratalinker[®] 1800 (Stratalinker gene) ที่ค่าพลังงาน 1200 KJ นาน 10 นาที แล้วนำ membrane ใส่ในถุงร้อนเดิม Pre - hybridization ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในเครื่อง Hybridization oven / Shaker SI 20H (Stuart scientific) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อใกล้ครบเวลา นำดีเอ็นเอตัวตรวจจากข้อ 2.1 ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แช่ในน้ำแข็งทันที คัดสารละลายใส่ใน 10 มิลลิลิตร ของ Hybridization granule แล้วเติมใส่ในถุงร้อนแทน Pre – hybridization ที่เทออก บ่มในเครื่อง Hybridization oven / Shaker SI 20H (Stuart scientific) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง แล้วล้างแผ่น membrane ด้วยสารละลาย Post – hybridization solution I (2X SSC และ 0.1% SDS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และ สารละลาย Post – hybridization solution II (0.5X SSC และ 0.1% SDS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ล้างแผ่น membrane ด้วย Washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl pH 7.5 และ 0.3% (v/v) Tween 20) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลาย Blocking solution (10 X blocking solution : Maleic acid buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl pH 7.5) = 1: 10) ปริมาณ 3.5 มิลลิลิตรต่อ membrane ขนาด 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เท Blocking solution ออก แล้วเติม Antibody solution (Anti – Digoxigenin – AP (150 mU/ml) : blocking solution = 1:5000) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างแผ่น membrane ด้วย Washing buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทำ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที และเติม Detection solution (0.1 M tris – HCl และ 0.1 M NaCl pH 9.5) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลไฮบริไดเซชันด้วย Color - substrate solution (NBT/BCIP stock solution : Detection buffer = 200 μl :10 ml) เก็บไว้ในที่มีจนกว่าสีจะปรากฏที่ อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสัญญาณแถบสีม่วงน้ำเงิน หยุด ปฏิกิริยา โดยแช่แผ่น membrane ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องและผึ่งให้แห้งบนกระดาษ กรอง บันทึกรูปโดยการ scan ภาพ

2.3 การคัดเลือคดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงโรคใบขาวอ้อยโดยการตรวจสอบกับตัวอย่างอ้อย

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของอ้อยปกติและอ้อยเป็นโรคใบขาว มาทดสอบด้วยวิธีไฮบริด-เซชัน โดยการเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) จากโคลนที่คัดเลือกได้ จากการทดลองที่ 2.2 ตัดฉลากตัวตรวจตามวิธีการทดลองที่ 2.1 ตัวอย่างดีเอ็นเออ้อยปกติและอ้อยเป็นโรคใบขาวมีความเข้มข้น 2 µg/µl มาหยดบนกระดาษ nylon membrane และทำตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.2

2.4 การทดสอบตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อยกับตัวอย่างแมลง

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิด คือ *Matsumuratettix hiroglyphicus* และ *Yamatotettix flavovittatus* ที่สกัดด้วยวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) มาทดสอบด้วยวิธีไฮบริด-เซชัน โดยการเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) จากโคลนที่คัดเลือกได้ จากการทดลองที่ 2.2 ตัดฉลากตัวตรวจตามวิธีการทดลองที่ 2.1 ตัวอย่างดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น มีความเข้มข้น 2 µg/µl มาหยดบนกระดาษ nylon membrane และทำตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.2

3. พัฒนวิธีการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอโดยการลดขั้นตอน เพื่อนำมาทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชัน เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยที่มีประสิทธิภาพ

3.1 เปรียบเทียบวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างอ้อยแบบลดขั้นตอน

เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยปกติและอ้อยเป็นโรคใบขาว

ก) เปรียบเทียบการบดตัวอย่างโดยใช้ในโตรเจนเหลวและใช้ผงซิลิกา คือ การทดลองที่ 1 ชั่งตัวอย่างอ้อย 2 ตัวอย่างคือ อ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาว ตัวอย่างละ 0.1 กรัม จำนวน 3 ครั้ง บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดใส่ตัวอย่างในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และการทดลองที่ 2 ชั่งตัวอย่างอ้อย 2 ตัวอย่างคือ อ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาวตัวอย่างละ 0.1 กรัม จำนวน 3 ครั้ง บดตัวอย่างด้วยผงซิลิกาให้ละเอียดใส่ตัวอย่างในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ข) เปรียบเทียบการใช้สารสกัดตามวิธีการสกัด 3 วิธี คือ สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ประกอบด้วย 100 mM Tris - HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 10 mM 2 - mercaptoethanol สารสกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) ประกอบด้วย 200 mM Tris - HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 1% PVP และ 2% CTAB (w/v) และสารสกัดตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002) ประกอบด้วย 0.25 M NaOH และ 0.1 M Tris - HCl, pH 8.0

ค) เปรียบเทียบวิธีการลดขั้นตอน 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 คัดส่วนใสที่บดตัวอย่างมาใช้ (crude extract) วิธีที่ 2 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และวิธีที่ 3 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

ในการทดลองนี้ใช้วิธีการสกัดของ Dellaporta *et al.* (1983) วิธีปกติเป็นตัวเปรียบเทียบ (Control)

การทดลองที่ 1 ซึ่งตัวอย่างอ้อย 2 ตัวอย่างคือ อ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาว ตัวอย่างละ 0.1 กรัม จำนวน 3 ครั้ง บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดใส่ตัวอย่างในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารสกัด 3 แบบ คือ สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) สารสกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) และสารสกัดตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002) ปริมาตร 100 μ l นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที คัดส่วนใสใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1 ใช้ส่วนของน้ำใส (crude extract) นำมาใช้ทดลองในขั้นต่อไป หลอดที่ 2 ใช้ส่วนของน้ำใส เติม 1 เท่าของ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer และหลอดที่ 3 ใช้ส่วนของน้ำใส เติม 1 เท่าของ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer

การทดลองที่ 2 ซึ่งตัวอย่างอ้อย 2 ตัวอย่างคือ อ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาว ตัวอย่างละ 0.1 กรัม จำนวน 3 ครั้ง บดตัวอย่างด้วยผงซิลิกาให้ละเอียดใส่ตัวอย่างในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำสกัด 3 แบบ คือ สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) สารสกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) และสารสกัดตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002) ปริมาตร 100 μ l นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที คัดส่วนใสใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดที่ 1 ใช้ส่วนของน้ำใส (crude extract) นำมาใช้ทดลองในขั้นต่อไป หลอดที่ 2 ใช้ส่วนของน้ำใสเดิม 1 เท่าของ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer และหลอดที่ 3 ใช้ส่วนของน้ำใส เติมน้ำ 1 เท่าของ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและ ละลาย ตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

วิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดการทดลองที่ 3.1 บน 1% Agarose gel กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาที ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 200 (Pharmacia Biotech)

3.3 การเปรียบเทียบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ โดยการใช้ตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยด้วยการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดการทดลองที่ 3.1 ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันโดยใช้ชุด Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I และใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจโรคใบขาวอ้อยที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2.3 ตามขั้นตอนจากการทดลองที่ 2.2

4. การทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อยกับวิธีสกัดแบบลดขั้นตอน โดยใช้ตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ

4.1 ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการตรวจสอบ

เก็บตัวอย่างอ้อยจำนวน 18 ตัวอย่าง จาก 3 จังหวัด คือ จังหวัดชัยภูมิจำนวน 9 ตัวอย่าง จังหวัดนครราชสีมาจำนวน 6 ตัวอย่าง และจังหวัดขอนแก่นจำนวน 3 ตัวอย่าง นำมาทดสอบวิธีการในการสกัดดีเอ็นเออ้อยแบบลดขั้นตอน ที่เลือกได้จากการทดลองที่ 3

ภาพที่ 2 ตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ ลำดับที่ 1-5 เก็บตัวอย่างอ้อยจาก อ.เมือง จ.ชัยภูมิ แสดงอาการ (1) ใบสีเขียว (2) ใบสีเขียวนเหลือง เป็นริ้วเหลืองที่ขอบใบ (3) ใบสีเขียวนเหลือง ขนาดใบแคบเรียว (4) ใบสีเขียว ขนาดใหญ่ (5) ใบมีสีเขียวนเหลือง ขนาดใบแคบและเรียวยาว ลำดับที่ 6-11 เก็บตัวอย่างอ้อยจาก อ.แก้งสนามนาง จ.นครราชสีมา แสดงอาการ (6) ใบมีสีเขียว (7) ใบมีสีเขียว ขอบใบเป็นสีเหลืองขนาดใบแคบและเรียวยาว (8) ใบมีสีเขียวและมีจุดสีน้ำตาลกระจายเป็นหย่อมๆขนาดใบแคบและเรียวยาว (9) ใบอ้อยที่แตกออกมาจะแคบเรียวเล็กกว่าปกติ และสร้างหน่อสีขาวเล็ก ๆ ลำต้นมีขนาดเล็ก (10) ใบสีเขียวนเหลือง ขนาดใบเรียวเล็ก (11) ใบมีน้ำตาล มีสีเขียวนเล็กน้อย ลำดับที่ 12-14 เก็บตัวอย่างอ้อยจาก กิ่ง อ.โคกโพธิ์ชัย จ.ขอนแก่น แสดงอาการ (12) ใบมีสีเขียว ขนาดใบเรียวเล็กเป็นพุ่ม (13) ใบมีสีเขียว (14) ใบมีสีเขียว จำนวนใบต่อกอหน่อย ลำดับที่ 15-18 เก็บตัวอย่างอ้อยจาก อ.คอนสวรรค์ จ.ชัยภูมิ แสดงอาการ (15) ใบมีสีเขียว (16) ใบมีสีเขียวนเหลือง (17) ใบสีเขียวนเหลืองเล็กน้อย ขนาดใบเรียวเล็กเป็นพุ่ม (18) ใบมีสีเขียว แตกเป็นพุ่ม



(1)



(2)



(3)



(4)



(5)



(6)



(7)



(8)



(9)



(10)



(11)



(12)



(13)



(14)



(15)



(16)



(17)



(18)

4.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน

4.2.1 วิธีที่ 1 คัดส่วนของน้ำใส่ที่บดตัวอย่างมาใช้ (crude extract)

4.2.2 วิธีที่ 2 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

4.2.3 วิธีที่ 3 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

วิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธี บน 1% Agarose gel กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาทีด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 200 (Pharmacia Biotech)

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอตัวตรวจกับตัวอย่างอ้อยที่สกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนด้วยการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากจากการทดลองที่ 4.2 ทั้ง 3 วิธี ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันโดยใช้ชุด Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I และใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจโรคใบขาวอ้อยที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 2.3 ตามขั้นตอนจากการทดลองที่ 2.2

4.3 การทำปฏิกิริยาและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยจากสถานที่ต่างๆที่สกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างอ้อยที่สกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน โดยใช้ไพรเมอร์ A1 และไพรเมอร์ A2 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 μ l ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer (10 mM Tris - HCl pH 8.8, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl และ 0.1% Triton X-100), 25 mM $MgCl_2$, 200 μ M Deoxynucleotide triphosphate, 10 pmol/ μ l forward primer, 10 pmol/ μ l reverse primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) เติมน้ำกลั่นนิ่งมาเจือจางปริมาณตามที่ต้องการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 500 นาโนกรัม นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle Model 2400 (Perkin Elmer) ดังนี้ Pre - Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ และ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วิเคราะห์ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 200 (Pharmacia Biotech) โดยการทำให้ gel electrophoresis บน 1.5% Agarose gel กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาที

ผลและวิจารณ์

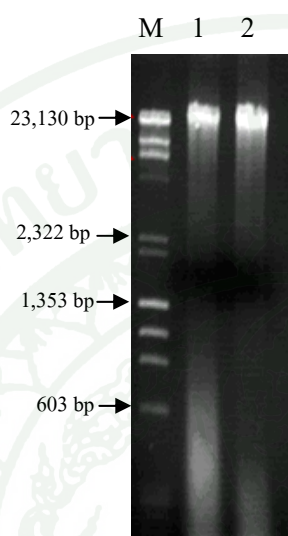
ผลการทดลอง

1. การโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย

1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของอ้อยปกติ และอ้อยเป็นโรคใบขาว ด้วยวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) ดังอธิบายวิธีการในการทดลองข้อ 1.1 สามารถสกัดดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นและมีคุณภาพในระดับที่ดี โดยการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี gel electrophoresis (ภาพที่ 3) และวัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างค่า A260 และ A280 ของอ้อยปกติและอ้อยเป็นโรคใบขาวเท่ากับ 1.776 และ 1.794 ตามลำดับ มีค่าใกล้เคียงกับคุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เหมาะสม คือ 1.8 - 2.0 (สุรินทร์, 2539) และนำค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มาคำนวณปริมาณดีเอ็นเอได้ความเข้มข้นของอ้อยปกติและอ้อยเป็นโรคใบขาวเท่ากับ 3.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และ 3.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ตามลำดับ

พบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยทั้ง 2 ตัวอย่าง มีคุณภาพดีมีความบริสุทธิ์ และไม่เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอมาก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR ได้เป็นอย่างดี ดังแสดงในภาพที่ 4



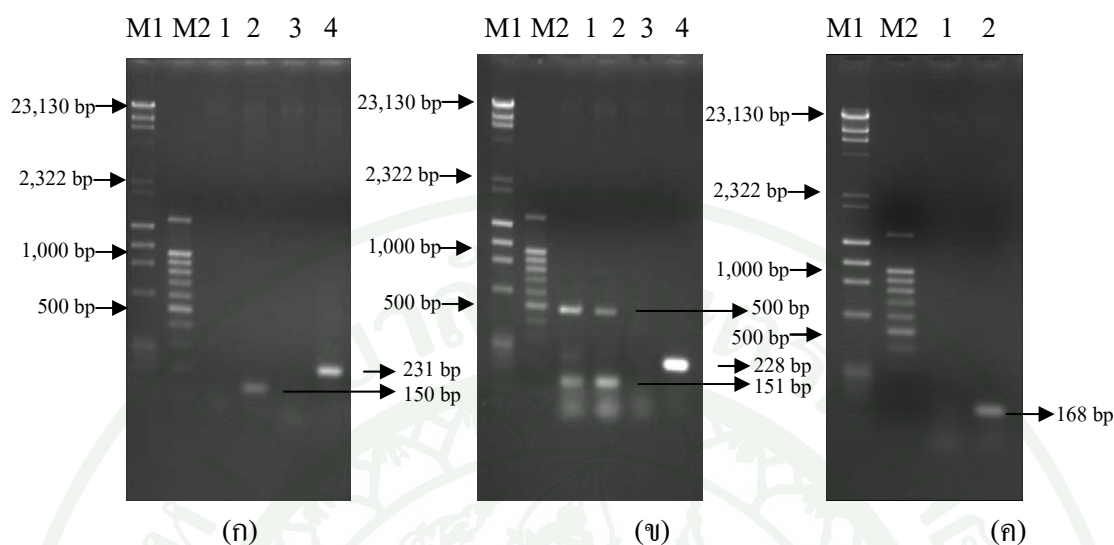
ภาพที่ 3 วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อย บน 1% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis โดยที่ M = Standard Mix of Lamda *Hind* III and X174DNA *Hae* III, 1 = อ้อยปกติ, 2 = อ้อยเป็นโรคใบขาว

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังที่อธิบายตามวิธีการในการทดลองข้อ 1.3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากชิ้นส่วน 16S rRNA (small subunit) ของโรคใบขาว strain SCWL ขนาด 1518 bp (Seemuller *et al.*, 1994) Accession No.X76432 ได้แก่ ไพรเมอร์ A1, A2, A3, AF2, AR2, AF และ AR3 และ Phytoplasma sp. Strain Khon Kaen Plasmid pPSE, complete sequence ขนาด 2645 bp (Nakashima and Hayashi, 1997) Accession No.Nc_002100 ได้แก่ ไพรเมอร์ AF4 และ AR4 ด้วยชุด DynAzyme II DNA Polymerase (FINNZYMES)

จากการทำปฏิกิริยา PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอกับอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากอ้อยปกติ ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นดังนี้ ไพรเมอร์ A1A2 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 150 เบส (ภาพที่ 4ก) ไพรเมอร์ A2A3 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 231 เบส (ภาพที่ 4ก) ไพรเมอร์ AF2/AR2 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 168 เบส (ภาพที่ 4ค) และไพรเมอร์ AF4/AR4 แถบดีเอ็นเอขนาด 228 เบส (ภาพที่ 4ข) ส่วนไพรเมอร์ AF3/AR3 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 151 เบส และ 500 เบส (ภาพที่ 4ข) สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากทั้งอ้อยอาการปกติและอ้อยอาการใบขาว



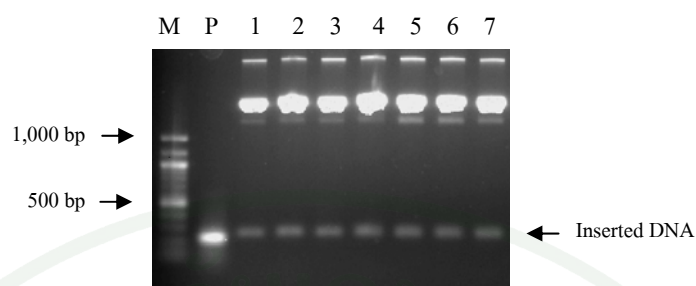
ภาพที่ 4 วิเคราะห์ PCR product บน 1.5% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis (ก) PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ A1A2 (1= อ้อยปกติ, 2= อ้อยเป็นโรคใบขาว) และไพรเมอร์ A2A3 (3= อ้อยปกติ, 4= อ้อยเป็นโรคใบขาว) (ข) PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ AF3/AR3 (1= อ้อยปกติ, 2= อ้อยเป็นโรคใบขาว) และไพรเมอร์ AF4/AR4 (3= อ้อยปกติ, 4= อ้อยเป็นโรคใบขาว) (ค) PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ AF2/AR2 (1= อ้อยปกติ, 2= อ้อยเป็นโรคใบขาว) โดยที่ M1 = *Lamda Hind III*, M2 = 100 bp

1.2 การโคลนดีเอ็นเอจาก PCR product และการคัดเลือก positive clone ที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

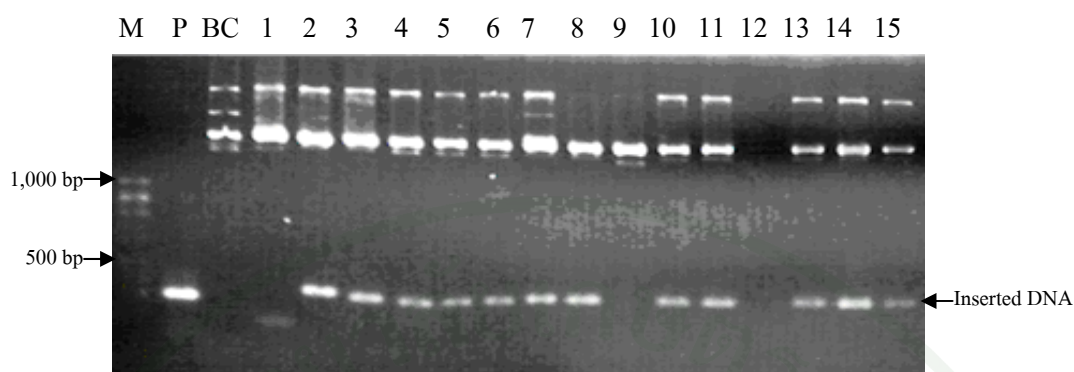
นำชิ้น PCR product ที่บริสุทธิ์ที่นำมาแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุด Geneclean® Kit II (Bio 101) มาทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM – T® Easy Vector (Promega) ส่งถ่าย Recombinant plasmid เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 (Promega) โดยใช้เทคนิค heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) และสกัดพลาสมิดที่ได้จากการโคลนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Mini-prep (Alkaline lysis) และนำจีโนมที่สกัดได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* (BioLabs)

วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* (BioLabs) ซึ่งแสดงโดยการวิเคราะห์บน 1% Agarose gel พบว่าโคลน A1A2 มีจำนวน 7 โคลน (ภาพที่ 5) และขนาดของพลาสมิดที่ตัดได้มีขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ A1A2 โดยสามารถตัดพลาสมิดลำดับได้หมดทุกลำดับ A2A3 มีจำนวน 15 โคลน (ภาพที่ 6) และขนาดของพลาสมิดที่ตัดได้มีขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ A2A3 โดยสามารถตัดพลาสมิดลำดับที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 และ 15 แต่ไม่สามารถตัดพลาสมิดลำดับที่ 9 และ 12 โคลน AF2/AR2 มีจำนวน 7 โคลน (ภาพที่ 7) และขนาดของพลาสมิดที่ตัดได้มีขนาดใกล้เคียง PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ AF2/AR2 โดยสามารถตัดพลาสมิดได้หมดทุกลำดับ โคลน AF4/AR4 มีจำนวน 10 โคลน (ภาพที่ 8) และขนาดของพลาสมิดที่ตัดได้มีขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ AF4/AR4 โดยสามารถตัดพลาสมิดลำดับที่ 1, 2, 3, 5, 6, 7 และ 8 ส่วนพลาสมิดลำดับที่ 4, 9 และ 10 สามารถตัดพลาสมิดได้ แต่ปริมาณมีความเข้มข้นน้อย



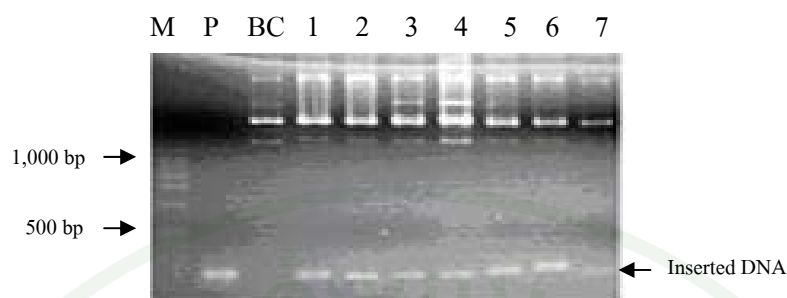
ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน A1A2 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* บน 1% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis โดยที่ M = X174 DNA *Hae III*, P = PCR product ของอ้อยเป็นโรคใบขาวจากไพรเมอร์ A1A2 และ 1 - 7 Recombinant plasmid ลำดับที่ 1 - 7 ที่ตำแหน่งลูกศรชี้ คือ ดีเอ็นเอที่สอดใส่ในการโคลน (Inserted DNA)



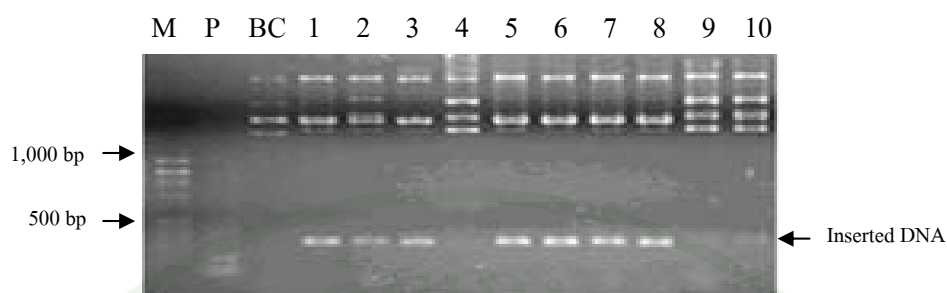
ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน A2A3 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* บน 1% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis โดยที่ M = X174DNA *Hae III*, P = PCR product ของอ้อยเป็น โรคใบขาวจากไพรมอร์ A2A3, BC = Blue colony และ 1 - 15 = Recombinant plasmid ลำดับที่ 1 - 15 ที่ตำแหน่งลูกศรชี้ คือ ดีเอ็นเอที่สอดใส่ในการโคลน (Inserted DNA)



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน AF2/AR2 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* บน 1% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 50 นาที โดยที่ M = X174 DNA *HaeIII*, P = PCR product ของอ้อยเป็นโรคใบขาวจากไพรเมอร์ AF2/AR2, BC = Blue colony และ 1 - 7 = Recombinant plasmid ลำดับที่ 1 - 7 ที่ตำแหน่งลูกศรชี้ คือ ดีเอ็นเอที่สอดใส่ในการโคลน (Inserted DNA)



ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากโคลน AF4/AR4 ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* บน 1% Agarose gel

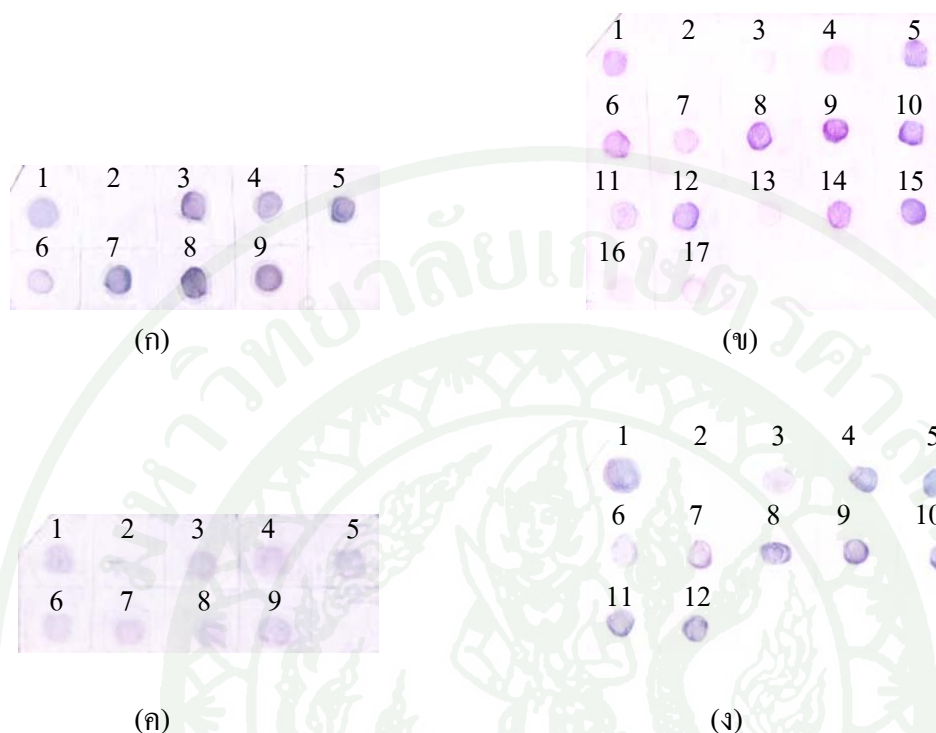
หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis โดยที่ M = X174 DNA *HaeIII*, P = PCR product ของอ้อยเป็นโรคใบขาวจากไพรเมอร์ AF4/AR4, BC = Blue colony และ 1 - 10 = Recombinant plasmid ลำดับที่ 1 - 10 ที่ตำแหน่งลูกศรชี้ คือ ดีเอ็นเอที่สอดใส่ในการโคลน (Inserted DNA)

2. การคัดเลือกโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อย

2.1 การคัดเลือกดีเอ็นเอตัวตรวจจาก PCR product

นำพลาสมิดที่สกัดได้จากแต่ละโคลนมาทดสอบด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน ด้วยการติดฉลาก PCR product ของอ้อยที่เป็นโรคใบขาวจากแต่ละไพรเมอร์ด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ตามวิธีการในการทดลองข้อ 2.1 - 2.2 นำพลาสมิดที่สกัดได้ตามวิธี Mini – prep (Alkaline lysis) ที่มีความเข้มข้น 2 µg/µl มาหยดบนกระดาษ nylon membrane และตรวจสอบโดยการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจที่เป็น PCR product ที่ใช้ในการโคลนเพื่อคัดเลือกโคลนดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อตัวตรวจ เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อย

ผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตัวตรวจจาก PCR product ของไพรเมอร์ A1A2 พบว่าสามารถเกิดสัญญาณกับ Recombinant plasmid แต่มีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกัน โดย Recombinant plasmid ลำดับที่ 4 เกิดสัญญาณน้อยที่สุด และได้คัดเลือก Recombinant plasmid ลำดับที่ 2 ใช้เป็นโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจ (ภาพที่ 9ก) ใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจจาก PCR product ของไพรเมอร์ A2A3 พบว่าสามารถเกิดสัญญาณกับ Recombinant plasmid แต่มีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกัน โดย Recombinant plasmid ลำดับที่ 1 เกิดสัญญาณความเข้มน้อยที่สุดและได้คัดเลือก Recombinant plasmid ลำดับที่ 7 ใช้เป็นโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจ (ภาพที่ 9ข) ใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจจาก PCR product ของไพรเมอร์ AF2/AR2 พบว่าสามารถเกิดสัญญาณกับ Recombinant plasmid และได้คัดเลือก Recombinant plasmid ลำดับที่ 7 ใช้เป็นโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจ (ภาพที่ 9ค) ใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจจาก PCR product ของไพรเมอร์ AF4/AR4 พบว่าสามารถเกิดสัญญาณกับ Recombinant plasmid ในทุกลำดับ แต่มีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกัน ได้คัดเลือก Recombinant plasmid ลำดับที่ 8 ใช้เป็นโคลนดีเอ็นเอตัวตรวจ (ภาพที่ 9ง) โดยผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตัวตรวจจากไพรเมอร์ทุกไพรเมอร์ไม่เกิดสัญญาณกับน้ำกลั่นที่ใช้เป็น negative control แต่เกิดสัญญาณกับ PCR product ของอ้อยที่เป็นโรคใบขาวจากแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้เป็น positive control



ภาพที่ 9 ผลการไฮบริไดเซชันที่ใช้ PCR product จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR เป็น ดีเอ็นเอตัวตรวจ ติดฉลากด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I

หมายเหตุ (ก) ผลการไฮบริไดเซชันจากไพรเมอร์ A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ โดยที่ 1 = PCR product ของไพรเมอร์ A1A2, 2 = น้ำกลั่น, 3 – 9 = โคลนลำดับที่ 1 – 7 (ข) ผลการไฮบริไดเซชันจากไพรเมอร์ A2A3 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ โดยที่ 1 = PCR product ของไพรเมอร์ A2A3, 2 = น้ำกลั่น, 3 = น้ำกลั่น, 4 – 18 = โคลนลำดับที่ 1 – 15 (ค) ผลการไฮบริไดเซชันจากไพรเมอร์ AF2/AR2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ โดยที่ 1 = PCR product ของไพรเมอร์ AF2/AR2, 2 = น้ำกลั่น, 3 - 9 = โคลนลำดับที่ 1 – 7 (ง) ผลการไฮบริไดเซชันจากไพรเมอร์ AF4/AR4 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ โดยที่ 1 = PCR product ของไพรเมอร์ AF4/AR4, 2 = น้ำกลั่น, 3 – 12 = โคลนลำดับที่ 1 – 10

1.2 การคัดเลือกดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงโรคใบขาวอ้อยโดยการตรวจสอบกับตัวอย่างอ้อย

นำโคลนที่คัดเลือกจากแต่ละไพรเมอร์ข้างต้น ตรวจสอบกับตัวอย่างอ้อยด้วยวิธีไฮบริโดเซชันนำมาติดคลากโคลนแต่ละโคลนด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I นำตัวอย่างของดีเอ็นเอจากอ้อยปกติและอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่สกัดด้วยวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ที่มีความเข้มข้น 2 µg/µl มาหยดบนกระดาษ nylon membrane และทำตามวิธีการในการทดลองข้อ 2.1 - 2.2 เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงกับโรคใบขาวอ้อย

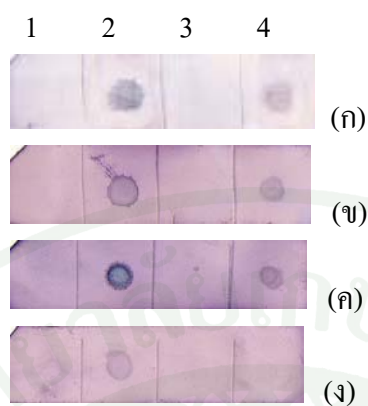
ผลการไฮบริโดเซชันกับดีเอ็นเอตัวตรวจจากโคลน A1A2 (ภาพที่ 10ก) โคลน A2A3 (ภาพที่ 10ข) โคลน AF2/AR2 (ภาพที่ 10ค) และโคลน AF4/AR4 (ภาพที่ 10ง) โดยที่ 1 = น้ำกลั่น, 2 = โคลน, 3 = ตัวอย่างอ้อยปกติ และ 4 = อ้อยเป็นโรคใบขาว พบว่าผลการไฮบริโดเซชันกับดีเอ็นเอตัวตรวจจากโคลนทุกโคลนเกิดสัญญาณกับอ้อยที่เป็นโรคใบขาวและเกิดสัญญาณกับแต่ละโคลนที่ใช้เป็น positive control แต่ไม่เกิดสัญญาณกับอ้อยปกติและน้ำกลั่นที่ใช้เป็น negative control สัญญาณของดีเอ็นเอตัวตรวจจากโคลน A1A2, A2A3 และโคลน AF2/AR2 มีสัญญาณความเข้มของการไฮบริโดซ์เท่ากัน แต่ระยะเวลาที่ดีเอ็นเอตัวตรวจจากโคลน A2A3 และโคลน AF2/AR2 ใช้ในขั้นตอน Color development ใช้ระยะเวลานานกว่าดีเอ็นเอตัวตรวจจากโคลน A1A2 ทำให้เกิด background มาก และดีเอ็นเอตัวตรวจจากโคลน AF4/AR4 ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจเมื่อนำมาไฮบริโดซ์กับดีเอ็นเอโรคใบขาวอ้อยให้สัญญาณความเข้มน้อยที่สุด

จากขั้นตอนการโคลนพบว่า เมื่อนำแถบดีเอ็นเอของอ้อยที่เป็นโรคใบขาวจากแต่ละไพรเมอร์เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ แล้วถ่าย Recombinant plasmid เข้าสู่ *E. Coli* (JM109) เพื่อให้เพิ่มปริมาณ Recombinant DNA และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* พบว่าพลาสมิดที่ถูกตัดมีขนาดขึ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหรือบางพลาสมิดไม่สามารถตัดด้วยเอ็นไซม์ได้ เนื่องจากลำดับของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์อาจมีตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ *NotI* หลายตำแหน่ง

ผลการคัดเลือกดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงกับโรคใบขาวอ้อย คือ ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้จากโคลน A1A2 (ภาพที่ 10ก) เพราะเกิดสัญญาณกับอ้อยที่เป็นโรคใบขาวและ Recombinant plasmid ของโคลนที่ใช้เป็น positive control แต่ไม่เกิดสัญญาณกับ negative control

และระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอน Color development ใช้เวลาน้อยที่สุดและทำให้เกิด background น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้จากโคลนอื่นๆ





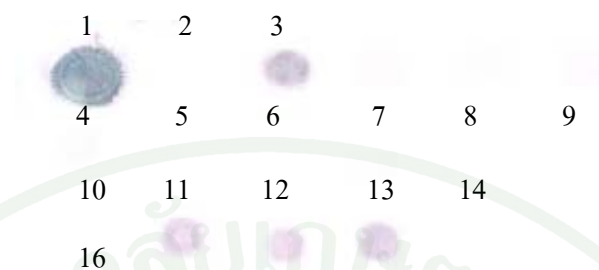
ภาพที่ 10 ผลการไฮบริไดเซชันที่ใช้ดีเอ็นเอจากโคลน 4 โคลน เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ คัดผลากด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I

หมายเหตุ (ก) ผลการไฮบริไดเซชันจากโคลน A1A2 1 (ข) ผลการไฮบริไดเซชันจากโคลน A2A3 (ค) ผลการไฮบริไดเซชันจากโคลน AF2/AR2 (ง) ผลการไฮบริไดเซชันจากโคลน AF4/AR4 โดยที่ 1 = น้ำกลั่น, 2 = โคลน, 3 = Healthy (อ้อยปกติ), 4 = Disease (อ้อยเป็นโรคใบขาว)

2.3 การทดสอบตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อยกับตัวอย่างแมลง

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิด คือ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus* ที่สกัดด้วยวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) มาทดสอบด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน โดยการเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) จากโคลนที่คัดเลือกได้ จากการทดลองที่ 2.2 คัดลอกตัวตรวจตามวิธีการทดลองที่ 2.1 ตัวอย่างดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น มีความเข้มข้น 2 µg/µl มาหยดบนกระดาษ nylon membrane และทำตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.2

ผลการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตัวตรวจจากโคลน A1A2 (ภาพที่ 11) โดยที่ 1 = โคลน A1A2, 2 = Healthy (อ้อยปกติ) และ 3 = Disease (อ้อยเป็นโรคใบขาว) พบว่าผลการไฮบริไดเซชันเกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นในลำดับที่ 11 คือ เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *Y. flavovittatus* (สุโขทัย) ดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นในลำดับที่ 12 คือ เพลี้ยจักจั่นตัวผู้ *M. hiroglyphicus* (สุโขทัย) และ ดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นในลำดับที่ 13 คือ เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *M. hiroglyphicus* (สุโขทัย) โดยที่โคลน A1A2 และดีเอ็นเอจากอ้อยที่เป็นโรคใบขาว ที่ใช้เป็น Positive control เกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์ แต่ไม่เกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของอ้อยปกติ



ภาพที่ 11 ผลการไฮบริไดเซชันตัวอย่างแมลงที่ใช้ดีเอ็นเอจากโคลน A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ ติด
ฉลากด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I

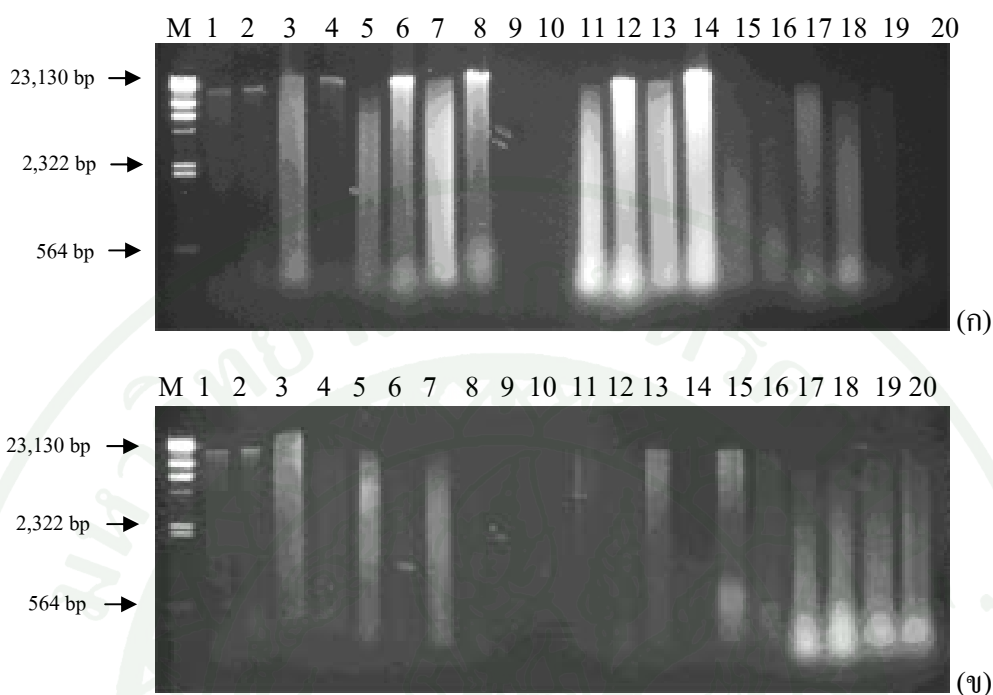
หมายเหตุ โดยที่ 1 = โคลน A1A2, 2 = Healthy (อ้อยปกติ), 3 = Disease (อ้อยเป็นโรคใบขาว), 4 =
เพลี้ยจักจั่นตัวผู้ *Y. flavovittatus* (ราชบุรี), 5 = เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *Y. flavovittatus*
(ราชบุรี), 6 = เพลี้ยจักจั่น ตัวผู้ *M. hiroglyphicus* (ราชบุรี), 7 = เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย
M. hiroglyphicus (ราชบุรี), 8 = เพลี้ยจักจั่นตัวผู้ *Y. flavovittatus* (นครสวรรค์), 9 =
เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *Y. flavovittatus* (นครสวรรค์), 10 = เพลี้ยจักจั่นตัวผู้ *Y. flavovittatus*
(สุโขทัย), 11 = เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *Y. flavovittatus* (สุโขทัย), 12 = เพลี้ยจักจั่นตัวผู้ *M.*
hiroglyphicus (สุโขทัย), 13 = เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *M. hiroglyphicus* (สุโขทัย), 14 = เพลี้ย-
จักจั่นตัวผู้ *Y. flavovittatus* (อุตรธานี), 15 = เพลี้ยจักจั่นตัวผู้ *M. hiroglyphicus* (อุตรธานี),
16 = เพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *M. hiroglyphicus* (อุตรธานี)

3.1 หาวิธีการในการสกัดดีเอ็นเอพืชอย่างง่ายและรวดเร็ว (แบบลดขั้นตอน)

จากการทดลองเพื่อหาวิธีการในการสกัดดีเอ็นเอพืชอย่างง่ายและรวดเร็วโดยเลือกวิธีการบดตัวอย่างพืช 2 วิธี คือ ใช้ในโตรเจนเหลว และใช้ผงซิลิกา เลือกสารสกัดที่ใช้ในการสกัด 3 วิธี คือ สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983), สารสกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) และ สารสกัดตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002) อุณหภูมิและเวลาที่ใช้บดตัวอย่าง 3 วิธี คือ คูดส่วนของน้ำ ใสที่บดตัวอย่างมาใช้ (crude extract) บ่มส่วนของน้ำใสที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และบ่ม ส่วนของน้ำใสที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธีมา ตรวจสอบผลโดยการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 12) โดย เปรียบเทียบผลการสกัดแบบลดขั้นตอนกับการสกัดด้วยวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยใช้ในโตรเจนเหลวบดตัวอย่าง (รูปที่ 12ก) ให้คุณภาพของ ดีเอ็นเอดีกว่าการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยใช้ผงซิลิกาบดตัวอย่าง (รูปที่ 12ข) และวิธีการ สกัดแบบลดขั้นตอนที่ใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ในทุกเงื่อนไขของอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้บดตัวอย่างทั้ง 3 วิธี ให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีกว่าการใช้สารสกัดตามวิธี ของ Kang *et al.* (1998) และวิธีของ Kristi *et al.* (2002)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธีมาการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี Spectrophotometer โดยเปรียบเทียบผลกับการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนกับการสกัดด้วยวิธีปกติ ของ Dellaporta *et al.* (1983) พบว่าดีเอ็นเอจากวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) มีค่าอัตราส่วน ระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.721 และ 1.717 (อ้อยปกติ และอ้อยใบขาวตามลำดับ) และดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน 3 วิธี ที่ใช้ ในโตรเจนเหลวบดตัวอย่างและใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) มีค่าอัตราส่วน ระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.257 - 1.829 และมีปริมาณ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.35 - 2.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลด ขั้นตอน 3 วิธี ที่ใช้ในโตรเจนเหลวบดตัวอย่างและใช้สารสกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) มีค่า อัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.064 - 1.684 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.3 - 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอ แบบลดขั้นตอน 3 วิธี ที่ใช้ในโตรเจนเหลวบดตัวอย่างและใช้สารสกัดตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002) มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.003 - 1.551 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.78 - 3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน 3 วิธี ที่ใช้ผงซิลิกาบดตัวอย่าง และใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 0.982 - 1.889 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.21 - 2.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน 3 วิธี ที่ใช้ผงซิลิกาบดตัวอย่าง และใช้สารสกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.075 - 2.000 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.20 - 3.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน 3 วิธี ที่ใช้ผงซิลิกาบดตัวอย่าง และใช้สารสกัดตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002) มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.061 - 1.364 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.73 - 4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$



ภาพที่ 12 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบอ้อยโดยวิธีลดขั้นตอน 3 วิธี และการใช้สารสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ในโครเจนเหลวและผงซิลิกาบดตัวอย่างใบอ้อย ซึ่งแสดงโดยการทำ gel electrophoresis บน 1% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาที (ก) บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว (ข) บดตัวอย่างด้วยผงซิลิกา โดยที่ M = Lambda *hind* III, 1 = Dellaportta-H (positive control), 2 = Dellaportta-D (negative control), 3 = Dellaportta-H/crude, 4 = Dellaportta-D /crude, 5 = Dellaportta-H /RT, 6 = Dellaportta-D /RT, 7 = Dellaportta-H /-80 °C, 8 = Dellaportta-D /-80 °C, 9 = Kang-H / crude, 10 = Kang-D / crude, 11 = Kang-H / RT, 12 = Kang-D / RT, 13 = Kang-H / -80 °C, 14 = Kang-D / -80 °C, 15 = Kristi -H / crude, 16 = Kristi -D / crude, 17 = Kristi -H / RT, 18 = Kristi -D / RT, 19 = Kristi -H/-80 °C, 20 = Kristi -D /-80 °C

3.2 การเปรียบเทียบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ โดยใช้ตรวจโรคใบขาวอ้อยด้วยการทำปฏิกิริยาไฮบริโดเซชัน

ผลการไฮบริโดเซชันดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธี (ภาพที่ 13) โดยใช้โคลน A1A2 เป็น ดีเอ็นเอตัวตรวจ คัดลอกด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I นำ ตัวอย่างของดีเอ็นเอจากอ้อยปกติและอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่สกัดได้จากวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) ที่มีความเข้มข้น 2 µg/µl เป็น positive และ negative control มาหยดบนกระดาษ nylon membrane และทำตามขั้นตอนการทดลอง 2.2 ดีเอ็นเอลำดับที่ 1 – 18 คือ ตัวอย่างที่บดด้วย ในโตรเจนเหลว (ดีเอ็นเอลำดับที่ 1 – 6 ใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ดีเอ็นเอ ลำดับที่ 7 - 12 ใช้สารสกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) และดีเอ็นเอลำดับที่ 13 - 18 ใช้สารสกัด ตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002)) ดีเอ็นเอลำดับที่ 19 - 36 คือ ตัวอย่างที่บดด้วยผงซิลิกา (ดีเอ็นเอ ลำดับที่ 19 - 24 ใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ดีเอ็นเอลำดับที่ 25 - 30 ใช้สาร สกัดตามวิธีของ Kang *et al.* (1998) และดีเอ็นเอลำดับที่ 31 - 36 ใช้สารสกัดตามวิธีของ Kristi *et al.* (2002)) โดยที่ C = โคลน A1A2, H = ตัวอย่างดีเอ็นเอของอ้อยปกติที่สกัดด้วยวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) และ D = ตัวอย่างดีเอ็นเอของอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่สกัดด้วยวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) จากการทดลองพบว่า C และ D ให้สัญญาณชัดเจน แสดงผลเป็นบวก (positive result) และ 2, 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 26, 28, 30, 34 และ 36 ตัวอย่างโรคใบขาวให้ สัญญาณชัดเจน ผลเป็นบวก แต่ไม่มีสัญญาณในตัวอย่างอ้อยปกติคือ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 และ 35 และพบว่าวิธีที่สามารถตรวจสอบผลได้ชัดเจน คือ วิธีการ สกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนที่ใช้สารสกัดตามวิธี Dellaporta *et al.* (1983) และ Kang *et al.* (1998) โดยเปรียบเทียบจากสัญญาณจากการไฮบริโดเซชันที่มีความเข้มของสัญญาณจากมากไปหาน้อย คือ ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่ อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และ ส่วนของน้ำใส (crude extract) ตามลำดับ

C	H	D			
1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36

ภาพที่ 13 ผลการไฮบริดเชนซ์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างไบออยโดยวิธีลดขั้นตอน 3 วิธี และ การใช้สารสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธี โดยใช้ในโตรเจนเหลวและผงซิลิกาบดตัวอย่างไบออยใช้โคลน A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ ติดฉลากด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I

หมายเหตุ โดยที่ลำดับที่ 1 – 18 = บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว ลำดับที่ 19 - 36 บดตัวอย่างด้วยผงซิลิกา C = โคลน, H = Dellaportta / H, D = Dellaportta / D, 1 = Dellaportta-H / crude, 2 = Dellaportta-D / crude, 3 = Dellaportta-H/RT, 4 = Dellaportta-D/RT, 5 = Dellaportta-H/-80 °C, 6 = Dellaportta-D/-80 °C, 7 = Kang-H/ crude, 8 = Kang-D/ crude, 9 = Kang-H/ RT, 10 = Kang-D/ RT, 11 = Kang-H/ -80 °C, 12 = Kang-D/ -80 °C, 13 = Kristi -H/ crude, 14 = Kristi - D/ crude, 15 = Kristi -H/ RT, 16 = Kristi - D/ RT, 17 = Kristi -H/-80 °C, 18 = Kristi -D/-80 °C, 19 = Dellaportta-H/crude, 20 = Dellaportta-D/crude, 21 = Dellaportta-H/RT, 22 = Dellaportta-D/RT, 23 = Dellaportta-H/-80 °C, 24 = Dellaportta-D/-80 °C, 25 = Kang-H/ crude, 26 = Kang-D/ crude, 27 = Kang-H/ RT, 28 = Kang-D/ RT, 29 = Kang-H/ -80 °C, 30 = Kang-D/ -80 °C, 31 = Kristi -H/ crude, 32 = Kristi - D/ crude, 33 = Kristi -H/ RT, 34 = Kristi - D/ RT, 35 = Kristi -H/-80 °C, 36 = Kristi -D/-80 °C

4. การทดสอบประสิทธิภาพของตัวตรวจที่เฉพาะเจาะจงต่อโรคใบขาวอ้อยกับวิธีสกัดแบบลดขั้นตอน โดยใช้ตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ

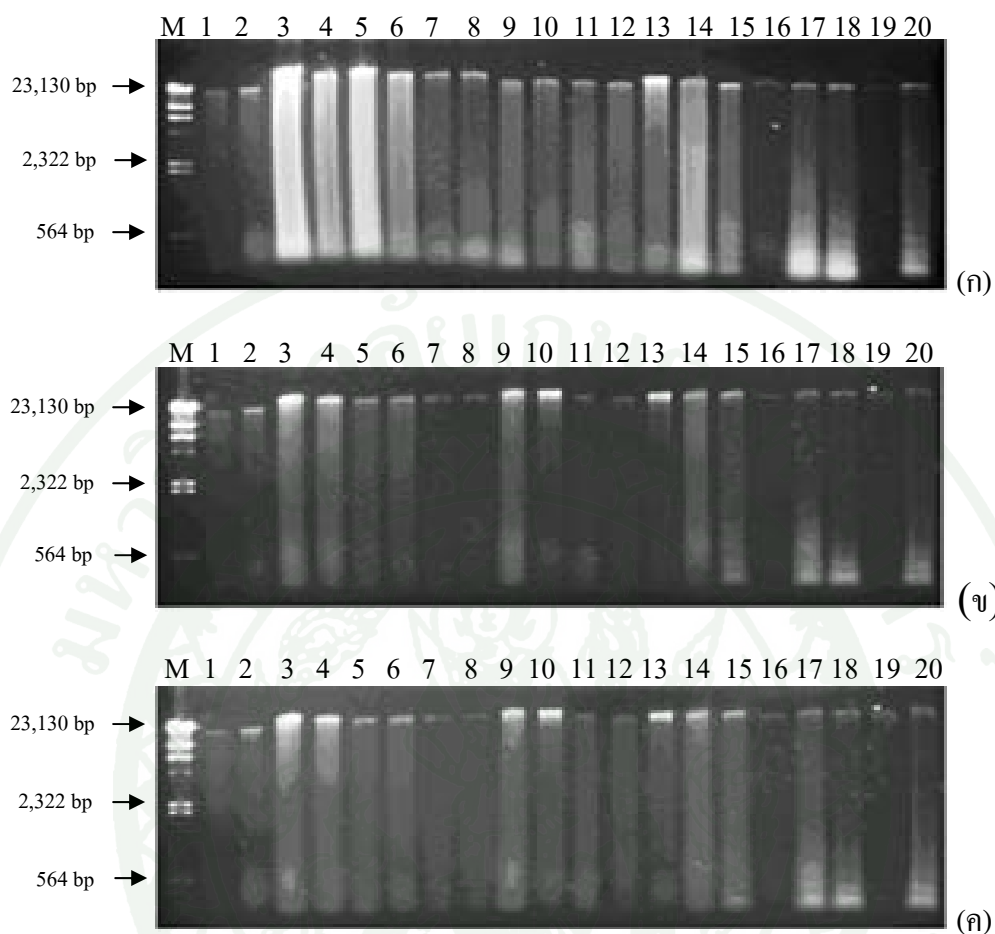
4.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน

จากการทดลองที่ 3.1 พบว่าวิธีลดขั้นตอนที่ใช้สารสกัดตามวิธี Dellaporta *et al.* (1983) และบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว เมื่อนำมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน พบว่าเกิดสัญญาณกับดีเอ็นเอตัวตรวจโรคใบขาวอ้อยที่มีความเข้มข้นตามลำดับ คือ ใช้ส่วนของน้ำใสม่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ใช้ส่วนของน้ำใสม่ตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และ ส่วนของน้ำใส (crude extract) ดังนั้นจึงนำวิธีการดังกล่าวมาตรวจสอบผลกับตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ จำนวน 18 ตัวอย่าง จาก 3 จังหวัด คือ จังหวัดชัยภูมิจำนวน 9 ตัวอย่าง จังหวัดนครราชสีมาจำนวน 6 ตัวอย่าง และจังหวัดขอนแก่นจำนวน 3 ตัวอย่าง เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธีมาตรวจสอบผลโดยการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 14) โดยเปรียบเทียบผลกับการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนกับการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) พบว่าคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดแบบลดขั้นตอนมีคุณภาพดีที่สุดตามลำดับ คือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยใช้ส่วนของน้ำใสม่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 14ก) วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยใช้ส่วนของน้ำใสม่ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (ภาพที่ 14ข) และ ส่วนของน้ำใส (crude extract) (ภาพที่ 14ค)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกวิธีมาการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี Spectrophotometer โดยเปรียบเทียบผลกับการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนกับการสกัดด้วยวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) พบว่าดีเอ็นเอจากวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.721 และ 1.717 (อ้อยปกติและอ้อยใบขาวตามลำดับ) และดีเอ็นเอที่ได้จากการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวที่ใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ที่ใช้ส่วนของน้ำใสม่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.059 - 1.207 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 1.2 - 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ใช้ส่วนของน้ำใสม่ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280

นาโนเมตร มีค่า 1.073 - 1.467 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.36 - 9.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ และ ส่วนของน้ำใส (crude extract) มีอัตราส่วนระหว่างค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ที่ค่า 1.085 - 1.736 และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 0.10 - 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$



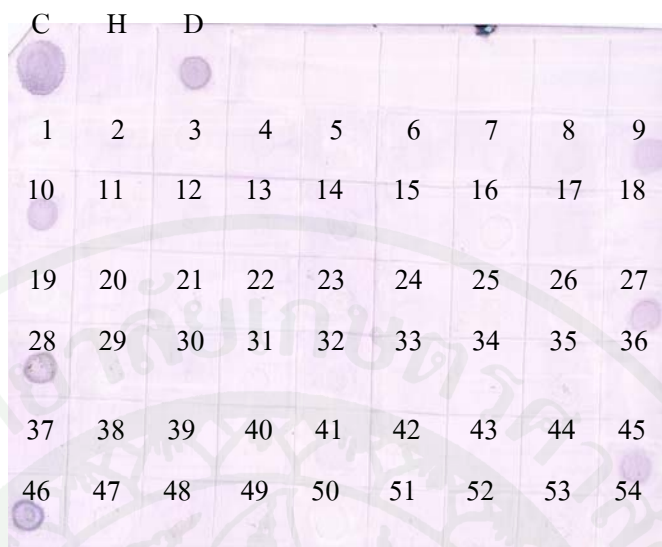


ภาพที่ 14 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบอ้อยตามสถานที่ต่างๆ แบบลดขั้นตอน 3 วิธี ด้วยสารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว ซึ่งแสดงโดยการทำ gel electrophoresis บน 1% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาที (ก) ส่วนของน้ำใส (crude extraction) (ข) ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (ค) ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยที่ M = Lambda *hind* III, 1 = Dellaporta / Healthy, 2 = Dellaporta / Disease, 3 = ตัวอย่าง 1, 4 = ตัวอย่าง 2, 5 = ตัวอย่าง 3, 6 = ตัวอย่าง 4, 7 = ตัวอย่าง 5, 8 = ตัวอย่าง 6, 9 = ตัวอย่าง 7, 10 = ตัวอย่าง 8, 11 = ตัวอย่าง 9, 12 = ตัวอย่าง 10, 13 = ตัวอย่าง 11, 14 = ตัวอย่าง 12, 15 = ตัวอย่าง 13, 16 = ตัวอย่าง 14, 17 = ตัวอย่าง 15, 18 = ตัวอย่าง 16, 19 = ตัวอย่าง 17, 20 = ตัวอย่าง 18

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอตัวตรวจกับตัวอย่างอ้อยที่สกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนด้วยการทำปฏิกิริยาไฮบริโดเซชัน

ผลการไฮบริโดเซชันดีเอ็นเอที่สกัดได้ได้จากการบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว และใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ที่โคลน A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ (ภาพที่ 15) คัดลอกด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I โดยนำตัวอย่างของดีเอ็นเอจากการสกัดอ้อยจากสถานที่ต่างๆ ที่มีความเข้มข้น 2 µg/µl มาหยดบนกระดาษ nylon membrane และทำตามขั้นตอนการทดลองที่ 2.2 โดยที่ดีเอ็นเอลำดับที่ 1 – 18 คือ ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ดีเอ็นเอลำดับที่ 19 – 36 คือ ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และดีเอ็นเอลำดับที่ 37 - 54 คือ ส่วนของน้ำใส (crude extract) พบว่า C และ D ให้สัญญาณชัดเจนแสดงผลเป็นบวก (positive result) แต่ไม่เกิดสัญญาณกับ H (negative control) และไม่เกิดสัญญาณกับอ้อยตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ของ อ.เมือง จังหวัดชัยภูมิ อ้อยตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 6 ของ อ.แก่งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา อ้อยตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 ของ กิ่ง อ.โคกโพธิ์ชัย จังหวัดขอนแก่นและอ้อยตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 ของ อ.คอนสวรรค์ จังหวัดชัยภูมิ แต่เกิดสัญญาณกับอ้อยตัวอย่างที่ 4 และ 5 จาก อ.แก่งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา (ตัวอย่างที่ 4 จาก อ.แก่งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา มีอาการใบอ้อยที่แตกออกมาจะมีใบแคบเรียวเล็กกว่าปกติ และสร้างหน่อสีขาวเล็ก ๆ ลำต้นมีขนาดเล็ก ตัวอย่างที่ 5 จาก อ.แก่งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา มีใบแคบเรียวเล็กและใบมีสีขาวหรือสีใบขาวปนเหลือง) โดยให้สัญญาณตัวตรวจมีความเข้มมากตามลำดับดังนี้ วิธีที่ 3 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ตัวอย่างลำดับที่ 45 และ 46) วิธีที่ 2 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (ตัวอย่างลำดับที่ 27 และ 28) และวิธีที่ 1 ส่วนของน้ำใส (ตัวอย่างลำดับที่ 9 และ 10)

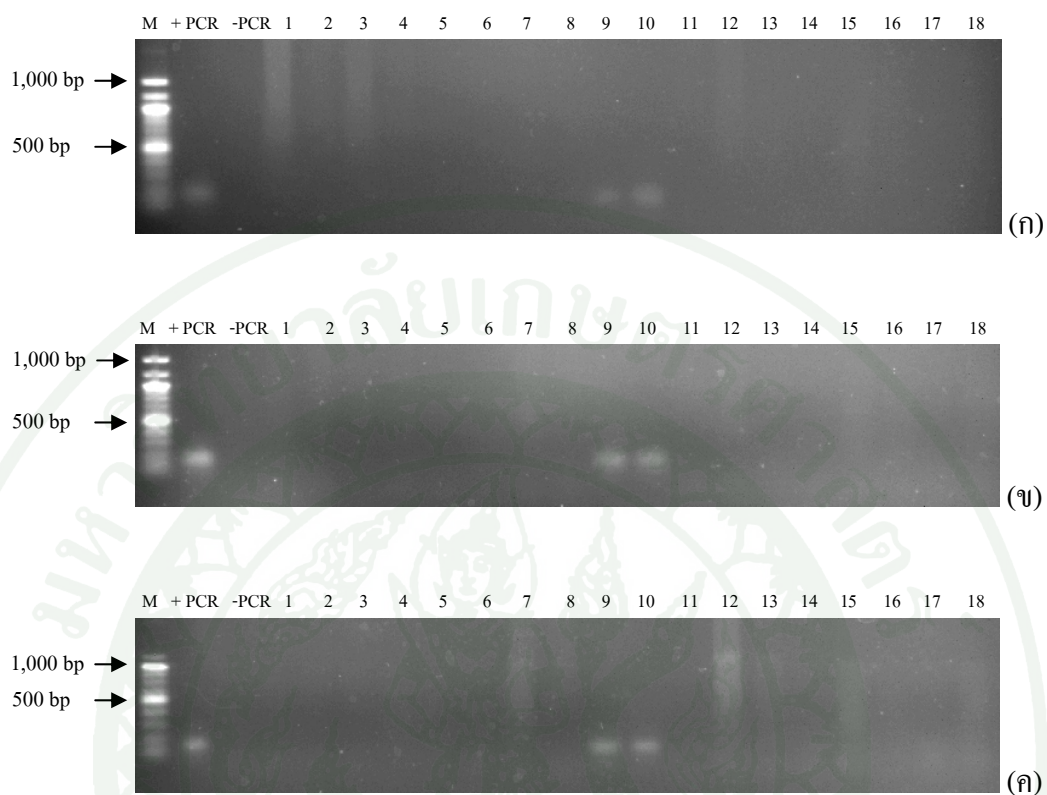


ภาพที่ 15 ผลการไฮบริดเซชันดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบอ้อย แบบลดขั้นตอน 3 วิธี ด้วยสารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว ใช้โคลน A1A2 เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ ติดฉลากด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I

หมายเหตุ วิธีที่ 1 ส่วนของน้ำใส (crude extract) (ลำดับที่ 1 - 18), วิธีที่ 2 ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (ลำดับที่ 19 - 36) และวิธีที่ 3 ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง (ลำดับที่ 36 - 54) โดยที่ C = โคลน, H = Dellaporta / Healthy, D = Dellaporta / Disease

4.4 การทำปฏิกิริยาและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยจากสถานที่ต่างๆ ที่สกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างอ้อยจากสถานที่ต่างๆ ที่สกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอน โดยใช้ไพรเมอร์ A1 และไพรเมอร์ A2 วิเคราะห์ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 200 (Pharmacia Biotech) โดยการทำ gel electrophoresis สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอกับ ตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการใบขาว คือ อ้อยตัวอย่างที่ 4 และ 5 จาก อ.แก้งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา (ตัวอย่างที่ 4 จาก อ.แก้งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา มีอาการใบอ้อยที่แตกออกมาจะมีใบแคบเรียวเล็กกว่าปกติ และสร้างหน่อสีขาวเล็ก ๆ ลำต้นมีขนาดเล็ก ตัวอย่างที่ 5 จาก อ.แก้งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา มีใบแคบเรียวเล็กและใบมีสีขาวหรือสีใบขาวปนเหลือง) แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยปกติ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาวและอ้อยปกติ สกัดด้วยวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 150 เบส (ภาพที่ 16) เกิด PCR product กับตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการใบขาว ที่สกัดแบบลดขั้นตอนทั้ง 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 ดูดส่วนของน้ำใส่ที่บดตัวอย่างมาใช้ (crude extract) (ภาพที่ 16ก) วิธีที่ 2 ใช้ส่วนของน้ำใส่บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (ภาพที่ 16ข) และวิธีที่ 3 ใช้ส่วนของน้ำใส่บ่มที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 16ค)



ภาพที่ 16 วิเคราะห์ PCR product ของตัวอย่างอ้อยจากสถานที่ต่างๆ บน 1.5% Agarose gel

หมายเหตุ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 90 นาที โดยที่ M = 100 bp, +PCR = PCR product ที่เกิดอ้อยเป็นโรคใบขาว, -PCR = PCR product ที่เกิดจากอ้อยปกติ และ 1 – 18 = ตัวอย่างอ้อยตัวอย่างที่ 1 – 18 (ก) วิธีที่ 1 ดูดส่วนไส้ที่บดตัวอย่างมาใช้ (crude extract) (ข) วิธีที่ 2 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (ค) วิธีที่ 3 ใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ได้คัดเลือกดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจจะศึกษาในส่วนของยีนอนุรักษ์ คือ 16S rRNA ซึ่งมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำคัญต่างๆ ของเชื้อไฟโตพลาสมา ไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบมาจากส่วนยีน 16S rRNA ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการด้วยปฏิกิริยา PCR พบแถบดีเอ็นเอของโรคใบขาวอ้อยจาก 4 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ A1A2 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 150 เบส ไพรเมอร์ A2A3 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 231 เบส ไพรเมอร์ AF2/AR2 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 168 เบส และไพรเมอร์ AF4/AR4 แถบดีเอ็นเอขนาด 228 เบส แต่ไพรเมอร์ AF3/AR3 พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอจากทั้งดีเอ็นเอของอ้อยปกติและอ้อยที่เป็นโรคใบขาว เกิดแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาด 500 เบส และ 151 เบส ซึ่งอาจเกิดจากการที่ไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่เฉพาะเจาะจงต่อส่วนยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา ในการตรวจสอบโรคพืชทั่ว ๆ สามารถที่จะคัดเลือกดีเอ็นเอที่สนใจได้จากส่วนยีนอื่น ๆ นอกเหนือจากยีน 16S rRNA เช่น ยีน rRNA ในส่วนอื่นที่ต่อเนื่องกัน คือ ส่วน 5S หรือ 23S จากการศึกษาพบว่ายีน rRNA แบ่งส่วนได้เป็น 5S - 16S - 23S โดยที่ 5S มีขนาด 104 - 112 คู่เบส ส่วน 16S มีขนาด 1,550 คู่เบส และ 23S มีขนาด 2,900 คู่เบส และส่วนต่อระหว่าง 16S และ 23S มีขนาด 300 คู่เบส ซึ่ง 5S มีขนาดสั้นไปและ 23S มีขนาดยาวไป ขนาดที่พอเหมาะที่นำมาศึกษาจึงเป็นส่วนของ 16S ที่ไม่ยาวเกินไปและสามารถปฏิบัติงานวิเคราะห์ได้ไม่ยาก (Schneider *et al.*, 1995) มีงานวิจัยที่นำยีนส่วน 16S rRNA เพื่อใช้ศึกษาและตรวจสอบคุณสมบัติด้านต่างๆ ของเชื้อไฟโตพลาสมา เช่น วรรณภา และยุพา (2545) นำแมลงเพลี้ยจักจั่นจำนวน 23 ชนิด มาทดสอบการเป็นแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อย โดยวิธี Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงที่ส่วนยีน 16S rRNA และ Intergenic spacer region ของส่วนยีน 23S rRNA พบเชื้อไฟโตพลาสมาในเพลี้ยจักจั่นจำนวน 16 ชนิด โดยพบว่าเพลี้ยจักจั่น *M.hiroglyphicus* มีเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อมากที่สุด คือ 45.7% Seemuller *et al.* (1994) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ MLOs 17 ชนิด ด้วยเทคนิค RFLP ในส่วนยีน 16S rRNA สามารถแบ่งกลุ่มของ MLOs เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 aster yellow กลุ่มที่ 2 apple proliferation กลุ่มที่ 3 western - X disease กลุ่มที่ 4 sugarcane white leaf และกลุ่มที่ 5 aim yellow

โคลนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแถบดีเอ็นเอของอ้อยที่เป็นโรคใบขาวทั้ง 4 ไพรเมอร์ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับโรคใบขาวอ้อย ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาไฮบริโดเซชันกับตัวอย่างอ้อยปกติและอ้อยที่เป็นโรคใบขาว ซึ่งการโคลนยีนเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้

ปริมาณมากเพื่อนำไปศึกษาหรือวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ การสร้างตัวตรวจดีเอ็นเอ เป็นต้น แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนนั่นจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ คือ ดีเอ็นเอที่เป็นพาหะหรือเวกเตอร์ (สุรินทร์, 2539) ในการผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจเพื่อใช้เป็นตัวตรวจในปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วทำการโคลนแถบดีเอ็นเอกับการใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เป็นตัวตั้งต้นผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ พบว่าวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ การใช้โคลนในการผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ เนื่องจากมีปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจในปริมาณที่มาก และมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจที่คัดเลือกได้โดยใช้โคลนแถบดีเอ็นเอเป็นตัวตั้งต้นผลิต เช่น Nakashima *et al.* (1993) ได้ศึกษาการพัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรค Rice yellow dwarf ในข้าว จำนวน 10 สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น ประเทศฟิลิปปินส์และประเทศไทย โดยเปรียบเทียบการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้จาก Extrachromosomal DNA กับ Chromosome DNA พบว่ามีประสิทธิภาพดีเท่ากันในการใช้เป็นตัวตรวจโรค Rice yellow dwarf ในข้าว Chen and Lee (1997) ได้ผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจจากการโคลนยีนของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุของโรค peanut witches'-broom (PNWB) ด้วยการโคลนยีนที่ได้ใน pGEM-3Zf(+) นำโคลนที่ได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ติดฉลากด้วยสารไดออกซิเจนิน และใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับโรค peanut witches'-broom (PNWB) ในพืชหลายๆชนิด

วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่นิยมใช้ทั่วไป เช่น วิธีใช้ CTAB ตามวิธีของ Murray and Thompson (1980) และการสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) เป็นต้น เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอซึ่งให้คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอในปริมาณที่สูง แต่ใช้ระยะเวลาและขั้นตอนการสกัดนาน จึงมีนักวิจัยหลายๆ กลุ่มพยายามที่จะพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้สารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม ลดระยะเวลาในการสกัดตัวอย่าง โดยยังคงคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองทางชีวโมเลกุลในขั้นตอนต่อไป ซึ่งผลการทดลองที่ได้ต้องไม่มีความแตกต่างกับการใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบปกติทั่วไป เช่น Kasajima *et al.* (2004) ได้นำสารสกัดจากวิธีของ Edwards *et al.* (1991) เป็นสารสกัดใช้บดตัวอย่าง *Arabidopsis thaliana* ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้แท่งพลาสติกช่วยในการบดตัวอย่าง และสามารถเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ได้นาน 1 เดือน โดยยังมีประสิทธิภาพดีเมื่อนำทดสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 23 ชุด พบว่าได้ผล 96% เมื่อเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีปกติ โดยใช้เวลาในการบดตัวอย่าง 1 นาที/ตัวอย่าง Chen and Ronald (1999) ได้พัฒนาวิธีในการสกัด

ดีเอ็นเอจากข้าวและพืชอีกหลายๆชนิด โดยการสกัดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และใช้ trip ช่วยในการบดตัวอย่าง ในระยะเวลา 1 วัน สามารถที่จะสกัดตัวอย่างพืชได้มากกว่า 120 ตัวอย่าง น้ำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *EcoRI*, *EcoR V*, *HindIII*, *MseI* และ *PstI* แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วย เทคนิค RFLP และปฏิกิริยา PCR พบว่าให้ผลที่ไม่แตกต่างจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีปกติทั่วไป

จากการทดลองการเพื่อพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ง่าย รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย พบว่าขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนทั้ง 3 วิธี โดยใช้สารสกัดของ Dellaportta *et al.* (1983) และบดตัวอย่างด้วยในโตรเจนเหลว มีความเหมาะสมเมื่อนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยเพื่อใช้ตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน และเปรียบเทียบผลกับวิธีปกติของ Dellaportta *et al.* (1983) พบว่าให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน แต่เวลาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนจะใช้เวลาน้อยกว่าการสกัดดีเอ็นเอแบบปกติ โดยในการลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จะใช้เวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง การใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จะใช้เวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง และการใช้ส่วนของน้ำใส (crude extract) จะใช้เวลาน้อยกว่า 30 นาทีต่อตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบขั้นตอนการสกัดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางเปรียบเทียบขั้นตอนสกัดตัวอย่างอ้อยแบบลดขั้นตอนและการสกัดแบบวิธีปกติ

ขั้นตอน /วิธีการสกัด	Dellaporta <i>et al.</i> 1983	วิธีการสกัดแบบลดขั้นตอน		
		Dellaporta <i>et al.</i> (1983)	Kang <i>et al.</i> (1998)	Kristi <i>et al.</i> (2002)
1. ขั้นตอน การสกัด	1. เดิมสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 2. เดิม 50 μ l ของ 5 M KCH_3CO_2 บ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที 3. ปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 4. คัดส่วนใสให้หมด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	1. เดิมสารสกัด 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที 2. ปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 3. คัดส่วนใสให้หมด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร		
2. การ ตกตะกอน ดีเอ็นเอ	1. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1 เท่าของ Isopropanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 2. ปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 3. ล้างตะกอนด้วย 75 % Ethanol ปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที 4. ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE 50 μ l	1. หลอดที่ 1 ส่วนใส (crude extract) ปริมาตร 80 μ l นำมาใช้ทดลองในขั้นต่อไป 2. หลอดที่ 2 เดิม 1 เท่าของ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และหลอดที่ 3 เดิม 1 เท่าของ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 3. ปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที		

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ขั้นตอน /วิธีการสกัด	Dellaporta <i>et al</i> , 1983	วิธีการสกัดแบบลดขั้นตอน		
		Dellaporta <i>et al.</i> (1983)	Kang <i>et al.</i> (1998)	Kristi <i>et al.</i> (2002)
2. การ ตกตะกอนดี เอ็นเอ	5. เมื่อตะกอนละลาย ปั่นในเครื่อง หมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว รอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศา- เซลเซียส นาน 5 นาที	4. ล้างตะกอนด้วย 75 % Ethanol ปั่นใน เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว รอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที		
	6. ดูดส่วนใสใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และตกตะกอนดี เอ็นเอด้วย 3M $C_2H_3NaO_2$			
	7. เติมน้ำของ Isopropanol ปั่นที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง			
	8. ปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว สูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที			
3. การ ละลาย ตะกอนดี เอ็นเอ	9. ล้างตะกอนด้วย 75 % Ethanol ปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	1. ตากตะกอนให้แห้งและละลาย ตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 50 μ l ด้วย TE buffer ปริมาตร 40 μ l 2. แยกดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอป่ม ด้วย 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร RNase A (Promega) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซล- เซียส นาน 1 ชั่วโมง 3. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศา- เซลเซียส นาน 10 นาที		

มีงานวิจัยหลายชิ้นที่มีความพยายามในการพัฒนาและลดขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยหรือตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR, RFLP หรือเทคนิค hybridization เช่น จากการศึกษาเพื่อหาวิธีในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย พบว่าสามารถลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจ คือ ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอออกไปได้ หากน้ำคั้นที่ได้จากการบดเนื้อเยื่อพืชติดเชื่อมีความสะอาดปราศจากสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ หรือใช้น้ำที่ไหลออกมาจากรอยตัดลงบนแผ่น nylon หรือแผ่น nitrocellulose แทนที่ แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันตามขั้นตอนปกติต่อไป แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น มีโอกาสเกิด false positive เนื่องจากการปนเปื้อนของน้ำคั้นหรือน้ำที่ไหลจากรอยตัดของพืชที่ใช้ตรวจสอบ และการใช้ crude extract เมื่อตรวจสอบผลการ hybridization พบว่าเกิด background (พรทิพย์ และคณะ 2541) ดังนั้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยการใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือการใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และการล้างตะกอนด้วย 75% Ethanol จะช่วยกำจัดสิ่งปนเปื้อน ลดการเกิด background และ false positive

มีการนำเทคนิควิธีการด้านเซรุ่มวิทยาทั้งโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Errampalli and Fletcher, 1993) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Shen and Lin, 1993) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเชื้อไฟโตพลาสมาในรูปแบบของ ELISA แต่มักประสบปัญหาในการแยกเชื้อไฟโตพลาสมาให้บริสุทธิ์ และมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการฉีดสัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดี และมีงานวิจัยที่พัฒนาการตรวจโรคพืชด้วยชุดตรวจสอบการใช้แอนติบอดีตรวจโปรตีนของโรค แต่ข้อเสียคือถ้าใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบจะมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีต่ำ เนื่องจากประกอบด้วยแอนติบอดีหลายชนิดที่ทำปฏิกิริยาต่อ epitope ที่แตกต่างกันบนโมเลกุลของแอนติเจน แต่การตรวจสอบด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน เป็นการจับคู่ของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันจึงมีความจำเพาะสูงกว่าวิธีอื่นๆ

สรุปและข้อเสนอแนะ

การหาดีเอ็นเอตัวตรวจที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมา ที่เป็นสาเหตุของโรคใบขาวอ้อย โดยการใช้ปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16S rRNA จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ คือ A1A2, A2A3, AF2/AR2 และไพรเมอร์ AF4/AR4 พบว่าปฏิกิริยา PCR ของทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาว แต่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่างอ้อยปกติ นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของทั้ง 4 ไพรเมอร์โคลนดีเอ็นเอเป่าหายด้วยเทคนิค heat shock transformation ซึ่งโคลน A1A2 มีจำนวน 7 โคลน โคลน A2A3 มีจำนวน 15 โคลน โคลน AF2/AR2 มีจำนวน 7 โคลน และโคลน AF4/AR4 มีจำนวน 10 โคลน นำมาตัดพลาสมิดที่ได้ด้วยเอนไซม์ *Not I* เพื่อการคัดเลือกดีเอ็นเอตัวตรวจที่เหมาะสมต่อการตรวจโรคใบขาวอ้อย โดยการตัดคลากดีเอ็นเอตัวตรวจโคลนต่างๆจากพลาสมิดที่ได้จากทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ ด้วย DIG - High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I พบว่าพลาสมิดลำดับที่ 2 ของโคลน A1A2 มีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิด คือ *M. hiroglyphicus* และ *Y. flavovittatus* ที่สกัดด้วยวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) มาทดสอบด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน พบว่าผลการไฮบริไดเซชันเกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *Y. flavovittatus* (สุโขทัย) ดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นตัวผู้ *M. hiroglyphicus* (สุโขทัย) และดีเอ็นเอของเพลี้ยจักจั่นตัวเมีย *M. hiroglyphicus* (สุโขทัย) โดยที่โคลน A1A2 และดีเอ็นเอจากอ้อยที่เป็นโรคใบขาว ที่ใช้เป็น Positive control เกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์ แต่ไม่เกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของอ้อยปกติ

การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ง่าย รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยใช้ในโตรเจนเหลว บดตัวอย่างให้คุณภาพของดีเอ็นเอดีกว่าการใช้ผงซิลิกาบดตัวอย่าง และวิธีลดขั้นตอนที่ใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ทุกวิธีให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณที่ดีกว่าการใช้สารสกัดจากวิธีอื่นๆ เมื่อนำมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันกับตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาว พบว่าเกิดสัญญาณกับตัวตรวจดีเอ็นเอโรคใบขาวอ้อยที่มีความเข้ม ตามลำดับ คือ การใช้ส่วนของ

น้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง การใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และ ส่วนของน้ำใส (crude extract)

นำวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยใช้ในโครเจนเหลวบดตัวอย่างและใช้สารสกัดตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) มาตรวจสอบผลกับตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ ที่มีอาการแตกต่างกัน จำนวน 18 ตัวอย่าง จาก 3 จังหวัด คือ จังหวัดชัยภูมิจำนวน 9 ตัวอย่าง จังหวัดนครราชสีมาจำนวน 6 ตัวอย่าง และจังหวัดขอนแก่นจำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่าตัวเปรียบเทียบ control ที่ใช้ในการทดลอง คือ โคลน A1A2 และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโรคนาขาวอ้อย ให้สัญญาณชัดเจนแสดงผลเป็นบวก (positive result) และเกิดสัญญาณกับอ้อยตัวอย่างที่ 4 และ 5 จากจังหวัดนครราชสีมา ให้สัญญาณตัวตรวจมีความเข้มข้นมากตามลำดับดังนี้ วิธีที่ 3 การใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (ตัวอย่างลำดับที่ 45 และ 46) วิธีที่ 2 การใช้ส่วนของน้ำใสบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (ตัวอย่างลำดับที่ 27 และ 28) และวิธีที่ 1 ส่วนของน้ำใส (crude extract) (ตัวอย่างลำดับที่ 9 และ 10) ซึ่งอ้อยตัวอย่างที่ 4 และ 5 จากจังหวัดนครราชสีมา มีการแสดงอาการนาขาว และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีลดขั้นตอนทำปฏิกิริยา PCR ได้ PCR product มีขนาด 150 bp โดยสามารถทำปฏิกิริยา PCR ได้กับดีเอ็นเอของตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการนาขาว จากการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนทั้ง 3 วิธี

วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบลดขั้นตอนโดยการบดตัวอย่างด้วยในโครเจนเหลวและใช้สารสกัดจากวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) มีความเหมาะสมต่อการสกัดตัวอย่างอ้อย โดยให้ผลการทดลองที่ชัดเจนไม่แตกต่างจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีปกติของ Dellaporta *et al.* (1983) ซึ่งการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอโดย การพัฒนาวิธีการลดขั้นตอนนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจโรคนาขาวอ้อยด้วยเทคนิค dot blot hybridization ซึ่งมีประสิทธิภาพและให้ผลรวดเร็วมากขึ้น และเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ลดการใช้สารเคมีที่ไม่จำเป็น สามารถเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างจำนวนมากได้พร้อมกัน และระยะเวลาในการสกัดต่อหนึ่งตัวอย่างไม่เกิน 2 ชั่วโมง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกษม สุขสถาน, อัมพร สุวรรณเมฆ, ถวิล กรุฑกุล, ไพโรจน์ จ้างพานิช, อุดม พลุเกษ, อิศรา สุขสถาน, โกศล เจริญสม, นิพนธ์ ทวีชัย, สวาท รัตนวรพันธ์ และพรชัย เหลืองอากาศ. 2521. **หลักการทำไร้อ้อย**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, เขียวภา ตันติวานิช และสิทธิศักดิ์ แสไพศาล. 2551. **พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย**. รายงานเรื่องเต็มผลงานวิจัยประจำปีงบประมาณ 2550 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- นงลักษณ์ ศรีนทุ และ เอ็ม เอฟ คลาค. 2536. **การวินิจฉัยความแตกต่างระหว่างเชื้อมายโคพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยกับหญ้าแพรง ด้วยวิธี ELISA และ SDS – PAGE**. วารสารกรมวิชาการเกษตร ปีที่ 11 ฉบับที่ 3.
- ธีระ สูตะบุตร. 2519. **โรคไวรัสและมายโคพลาสมาของพืชที่สำคัญในประเทศไทยและข้อเสนอแนะในการป้องกันกำจัด**. ม.ป.ท.
- ธีระ สูตะบุตร. 2532. **โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย**. ม.ป.ท.
- ชนาคร จารุพัฒน์, นิพนธ์ ทวีชัย, ธีระ สูตะบุตร และวิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล. 2524. **การป้องกันกำจัดโรคใบขาวของอ้อยที่ควรดำเนินการในปัจจุบัน**, น.74-81. ใน **รายงานการประชุมสามัญประจำปี 2524 ขมรมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ธเนศ คาวรุ่งโรจน์. 2545. **การจำแนกระดับชีววิทยาโมเลกุลเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อสาเหตุโรคกอตะไคร้และใบขาวของอ้อย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสาทร สมิตมาน. 2527. โรคพืชวิทยา. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่, เชียงใหม่.

พรทิพย์ วังแก้ว. 2533. โรคพืชวิทยาขั้นสูง. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ยุพา หาญบุญทรง, พิศาล ศศิธร, สมคิด บุญครอง และชูดินันท์ ชูสาย. 2541.
การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระดับไร้โดยวิธี
DNA probe, น. 51-60. ใน รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ ครั้งที่ 3.
สมาคมวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทยร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและ
น้ำตาลทราย, กรุงเทพมหานคร.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการ
วิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น. บริษัทขอนแก่นพิมพ์พัฒนาจำกัด, ขอนแก่น.

พรทิพย์ วังแก้ว. 2544. มออลลิควัทสาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

มณเฑียร โสมภีร์, อนุสรณ์ อัดตปัญโญ และโอชา ประจวบเหมาะ. 2519. การปลูกอ้อย.
โครงการค้นคว้าวิจัยอ้อย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,
กรุงเทพมหานคร.

ยุพา หาญบุญทรง, วรรณภา ฤทธิสน และ ชูดินันท์ ชูสาย. 2548. การตรวจสอบเชื้อไฟโต-
พลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่นและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเล-
กุล. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับที่ 10 หน้า 13- 21.

รกรอง หอมหวล, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, ศิริวรรณ บุรีคำ, สุภาพร กลิ่นคง และเรวัต เลิศโยธิน.
2548. การพัฒนาวิธีการผลิตต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ.
วารสารข่าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

รุ่งโรจน์ อุทสัน. 2543. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบขาวอ้อยและหญ้าบางชนิดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันทนีย์ อุ่วานิชย์, วันชัย โตวิริยะเวช และอนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2522. โรคอ้อยที่สำคัญในประเทศไทย. การอบรมทางวิชาการเรื่องอ้อยและน้ำตาล. ฝ่ายป้องกันและกำจัดศัตรูอ้อย กรมส่งเสริมทางการเกษตร, กรุงเทพมหานคร.

วรรณภา ฤทธสนธิ์, ยูพา หาญบุญทรง, ชุตินันท์ ชูสาย และพิศาล ศิริธร. 2548. การตรวจสอบแมลงพาหะนำโรคใบขาวอ้อยและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. งานสัมมนาวิชาการด้านเกษตรศาสตร์ประจำปี 2548 มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2548. ความก้าวหน้าการดำเนินการวิจัยและพัฒนาทางด้านอ้อย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2528. โรคพืชที่เกิดจากไวรัส. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุวณี สุกเวช. 2532. มัยโคพลาสมา. น. 169 – 475. ใน นริกุล สุพัฒน์, จันทรเพ็ญ วิวัฒน์, ปรีชา พุทธาวุฒิไกร, สุวณี สุกเวช และประมวล เทพชัยศรี (ผู้รวบรวม). จุลชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: กรุงเทพมหานคร.

สุภาพร กลิ่นคง, พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ, สุพัฒน์ อรรถธรรม และรุ่งโรจน์ อุทสัน. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืชบางชนิดที่พบในประเทศไทย, น. 418 - 425. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตรอุตสาหกรรมเกษตร วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุรัช มัจฉาชีพ. 2535. พืชเศรษฐกิจในประเทศไทย. แพร์พิตา, กรุงเทพมหานคร.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2539. **พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2551. **ผลการสำรวจพื้นที่ปลูกอ้อยประจำปีการผลิต 2550 - 2551**. กระทรวงอุตสาหกรรม. สืบค้นจาก <http://www.ocsb.go.th> เมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553

อนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2523. **อ้อย**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร.

อัปสร เปลี่ยนสินไชย, นงลักษณ์ ศรีนทุ และสิริภัทร พรหมณีย์. 2538. **โรคยอดไหม้ของอ้อย และผลของโรคต่อผลผลิตและคุณภาพ**. รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติ ครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 2 - 3 พฤษภาคม 2538. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร.

Barnes, A.C. 1964. **The Sugarcane**. Interscience pub. Inc., New York.

Basu, A.N. and B.K. Giri. 1993. **The Essential of Viruses, Vectors and Plant Disease**. Wiley Eastern Limited, New Delhi.

Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA**. Nucleic Acids Research 7(6): 1513–1523.

Bove, J.M. and M. Garnier. 1998. **Walled and wall-less eubacteria from plants: sievetube restricted plant pathogens**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 7-16.

Chen, M.F., and C.P. Lee. 1997. **DNA probe and PCR primers for the detection of phytoplasma associated with peanut witches'-broom**. European Journal of Plant Pathology 103: 137-145.

- Chen, D.H. and P.C. Ronald. 1999. **A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications.** Plant Molecular biology reporter 17: 53 - 57.
- Chona, BL., S.P. Capoo, P.M. Varma and M.L. Seth. 1960. **Grassy shoot disease of sugarcane.** Indian Phytopathology 13: 37 - 47.
- Clark, M.F., A. Morton, S.L. Buss. 1989. **Preparation of mycoplasma immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLOs-associated antigens.** Annual Apply Biololy 144: 111-124.
- Dale, J.L.. 1988. **Rapid compression technique for detecting mycoplasma-like organisms in leaf midrib sieve tubes by fluorescence microscopy.** Phytopathology 78: 118-120.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. **A plant minipreparation: version II.** Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
- Dilworth, E. and J. E. Frey. 2000. **A rapid method for high throughput DNA extraction from plant material for PCR amplification.** Plant Molecular Biology Reporter 18: 61-64.
- Doi, Y., M. Teranaka and H. Asuyana. 1967. **Mycoplasma or PLT group – like microorganism found in the phloem element of plant infected with mulberry, dwarf, potato witches’broom.** Annual Phytopathology Society of Japan 33: 259-266.
- Errampalli, D. and J. Fletcher. 1993. **Production of monospecific polyclonal antibodies against aster yellow mycoplasma-like organism associated antigen.** Phytoplasma Pathology 83: 1279-1282.
- Freundt, E.A. 1981. Isolation, characterization and identification of spiroplasma and MLOs,

pp.1-34. In K. Maramorosch and S.P. Raychaudhuri (eds.). **Mycoplasma Disease of Tree and Shrubs**. Academic Press Inc., New York.

Garcia - Chapa, M., A. Battle, D. Rekab, M.R. Rosquete and G. Firrao. 2004. **PCR - mediated whole genome amplification of phytoplasmas**. Journal of Microbiological Methods 56: 231-242.

Griffin, D.W., C.A. Kellogg, K.K. Peak and E.A. Shin. 2002. **A rapid and efficient for extracting DNA from fungi**. Letters in Applied Microbiology 34: 210-214.

Harrison, N.A., P.A. Richardson, J.H. Tsai, M.A. Ebbert and J.B. Kramer. 1996. **PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease**. Plant Disease 80: 263-269.

International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. 1995. **Minutes of the interim meeting 17 and 26 July 1994**. Bordeaux, France Int. Journal of Systematic Bacteriology 45: 415-417.

Joseph, M.B., A. Zelcer and G. Loebenstein. 1975. **Association of mycoplasma-like organism of burmuda grass yellow leaf**. Phytopathology 65: 640-641.

Kang H. W., Cho Y. G., Yoon U. H. and Moo. 1998. **A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed**. Plant Molecular Biology Reporter 16: 1-9.

Kasajima, I., I. Yoko, O. Naoko, H. Hiroaki, Y. Tadakatsu and F. Toru. 2004. **A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis**. Plant Molecular Biology Reporter 22: 49-52.

Klinkong, S. and E. Seemuller. 1997. **Detection and Differentiation of the Mycoplasma-like**

Organism Association with Sugarcane White leaf Disease using Cloned Extrachromosomal DNA Probe. วิทยาศาสตร์เกษตร 27: 98-103.

Kirkpatrick, B.C., D.C. Stenger, T.J. Morris and A.H. Purcell. 1987. **Cloning and detection of DNA from nonculture plant pathogenic mycoplasma like organism.** Science 238: 197-200.

Kirkpatrick, B.C., C. Smart, S. Gardner, J. L. Gao, U. Ahrens, R. Maurer, B. Schneider, K. H. Lorenz, E. Seemuller, N. Harrison, S. Namba and X. Daire. 1994. **Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences.** IOM Letter 3: 228-229.

Kristi L., H. Ambronz, L. Gina, G. Brown and P. Fellers. 2002. **Modified rapid DNA extraction protocol for high throughput microsatellite analysis.** Crop Science 42: 2088-2091.

Lee I.M., R. E. Davis, T.A. Chen, L.N. Chiykowski, J. Fletcher, C. Hiruki and D.A. Schff. 1992. **A genotype-base system for identification and classification of mycoplasma-like organism (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster.** Phytopathology 82: 977-986.

Lee I.M., D.E. Gundersen, R.W. Hammond, R.E. Davis. 1994. **Use of mycoplasma organism (MLO) group - specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant.** Phytopathology 84: 559-566.

Lemarchand, K., F. Berthiaume, C. Marynard., J. Harel, P. Payment, P. Bayardelle, L. Massom and R. Brousseau. 2005. **Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater sample for downstream pathogen detection by microarrays.** Journal of Microbiological methods 63: 115-126.

- Leu, L.S. 1974. **An insectory method for testing sugarcane varieties for resistance to white leaf disease.** Proc. ISSCT 15: 266-274.
- Lherminier, J., R.G. Bonfiglioli, X. Daire and R.H. Symons. 1999. **Oligonucleotide as a probes for *in situ* hybridization with transmission electron microscopy to specifically localiza phytoplasma in plant cells.** Molecular and cellular probe 13: 41-47.
- Lodhi, M., Y. Guang-Ning, F. Norman and R. Bruce. 1994. **A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* secies and *Ampelopsis*.** Plant Molecular Biology Reporter 12 (1): 6-13.
- Loi, N., E. Paolo, L. Cararo, R. Osler and A. Chen. 2002. **Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection.** European Jornal of Plant Pathology 108: 81-86.
- Marechal – Drouard, L. and P. Guillemaut. 1995. **A powerful but simple technique to prepare polysaccharide-free DNA quickly and without phenol extraction.** Plant Molecular Biology Reporter 13: 26-30.
- Milne, R.G., E. Romasso, R. Lenzi, V. Masenga, N. Sarindu and M.F. Clark. 1995. **Pre-embedding and Post-embedding immunogold labeling and electron microscopy in plant host tissue of three antigenetically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big bud and burmuda grass white leaf.** Europe of Journal plant Pathology 101: 57-67.
- McCoy, R. E. 1984. Myceoplasma-like organisms of plant and invertebrate, p.792-793. In B. Tansill (ed.) **Bergey's Manual of Systermatic Bacteriology Vol.1 2nd ed.** Williams and Wilking, Baltimore.
- Morcone, C., A. Ragozzino and E. Seemuller. 1997a. **Detection and identificatrion of phytoplasma in yellow – disease weeds in Italy.** Plant Pathplogy 46: 530-537.

- Morcone, C., A. Ragozzino and E. Seemuller. 1997b. **Detection of Bermuda grass white leaf disease in Italy and characterization of the associated phytoplasma by RFLP analysis.** Plant Disease 81: 862-866.
- Murray ad Stackebrandt. 1995. Murray, R. G. E. and E. Stackebrandt. 1995. **Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes.** International Journal of Systematic Bacteriology 45: 186–187.
- Nakashima, H., S. Kato, s. Iwanami and N. Murata. 1991. **Cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA from mycoplasmalike organisms that cause yellow dwarf disease of rice.** Apply Environmental Microbiology 57: 3570-3575.
- Nakashima, H., S. Kato, S. Iwanami and N. Murata. 1993. **DNA probe reveal relatedness of rice yellow dearf mycoplasma –like organisms (MLOs) and distinguish them from other MLOs.** Applied and Environmental Microbiology 1206-1212.
- Nakashima, K., W. Chaleeprom, P. Wongkaew and P. Sirithorn. 1994. **Detection of mycoplasmalike organism associated and white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probes.** JIRCAS Journal 1: 57-67.
- Nakashima, K., and T. Hayashi. 1995. **Extrachromosomal DNAs of rice yellow dwarf and sugarcane white leaf phytoplasmas.** Annual Phytopathology of Society Japan 61(5): 456-462.
- Nakashima, K., T. Hayashi, W. Chaleepron, P. Wongkaew and P. Siritorn . 1995. **Detection of DNA of phytoplasmas associated with phyllody disease of sesame in Thailand.** Annual Phytopathology of Society Japan 61: 519-528.
- Nasu, S., M. Sugiura, S. Wakimoto and T. Iida. 1967. **On the etiologic agent of rice yellow dwarf.** Annual Phytopathology of Society Japan 33: 343-344.

- Ou, S.H. 1985. **Virus and MLO diseases**. Commonwealth Mycological, United Kingdom.
- Prammanee, S., N. Surinthu and U. Pliansinchai. 1996. **Nucleotide sequence analysis of PCR amplification from MLO infected periwinkle is the effectively specific DNA probe to detect MLOs-diseases and genetic related to palm yellow necrotic and sugarcane grassy shoot diseases**. Proceeding of the 8th Annual Meeting of the National Center for Genetic engineering and Biotechnology on biotechnology Prospects for the future, November 14-15, 1996. Prachuap khiri Khan, Thailand.
- Prasad, S.M., and H.S. Sahambi. 1982. **Sesame phyllody some new host records**. Indian phytopathology 35: 159-160.
- Razin, S. 1985. **Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes)**. Microbiology Review 49: 419-455.
- Rishi, N. and C. T. Chen. 1989. Grassy shoot and white leaf disease. Pp. 289-300. In C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie, Jr. and C. G. Hughes (eds.). **Disease of Sugarcane: Major Disease**. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Rogstad, S.H. 2003. **Plant DNA Extraction Using Silica**. Plant Molecular Biology Reporter 21: 463a-463.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual vol. I**. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarindu, N. and M. F. Clark. 1993. **Antibody production and identity of MLOs associated with sugarcane white leaf disease and burmuda – grassy white leaf disease from Thailand**. Plant Pathology 42: 396-402.
- Schneider, B., U. Ahrens, B.C. Kirkpatrick and E. seemuller. 1995. **Classification of plant**

pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction site analysis of PCR amplified 16S rRNA. Journal of Genetic Microbiology 139: 519-527.

Seemuller, E., B. Schneider, R. Maurer, U. Ahrens, X. Daire, H. Kison, K.H. Lorenz, G. Firrao, L. Avinent, B.B. Sears. 1994. **Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA.** International Journal of Systematic Bacteriology 44 (3): 440-446.

Seemuller, E., and B.C. Kirkpatrick. 1996. Detection of phytoplasma infection in plants. *In* Tully, J.G., and Razin, S., (eds.). **Molecular and diagnostic Procedures in Mycoplasma, Vol II.** Pp. 293-331. San Diego, Academic Press, Inc.

Seemuller, E., C. Marcone, U. Lauer, A. Ragozzino and A. Goschl. 1998. **Current status of molecular classification of phytoplasmas.** Journal plant Pathology 80: 3-26.

Seneviratne, J., J. Bandara, D. Ahangama and L. Huaping. 2004. **Rapid detection of sugarcane by PCR amplification using specific primers.** Tropical Agricultural Research 6: 61-70.

Shen, W.C. and C.P. Lin. 1993. **Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches'-broom.** Phytopathology 83: 671-675.

Shiomi, T., and M. Sugiura. 1984. **Grouping of mycoplasma-like organisms transmitted by the leafhopper vector, *Macrostelus orientalis* Vivaste, based on host range.** Annual Phytopathology of Society Japan 50: 149 -157.

Shiomi, T. 1988. **Host range of gentian witches' broom MLO and transmission by *Sclerorhynchus flavipictus*.** Plant Protein Society 30: 31-36.

Smith, G.R., M.L. Clark, V. Van de Velde, and J.L. Dale. 1994. **Chemiluminescent**

detection of Fiji disease virus with biotinylated DNA probes. Arch Virology 136: 325-334.

Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-Marooof, S.M. Williams, B.P. Dancik and R.W. Allard.

1987. **Chloroplast DNA polymorphisms in Lodgepole and Jack pines and their hybrids.** Procedure Natural Academic Science United State of America 84: 2097-2100.

Webb, D.R., R.G. Bonfiglioli, L. Carraro, R. Osler and R.H. Symons. 1999. **Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and Insect vectors.** Phytopathology 89: 894-901.

Wongkaew, P., P. Sirithorn, W. Chaleepron, K. Nakashima, T. Hayashi and M. Koizumi.

1995. **Detection of sugarcane white leaf mycoplasma-like organism in flied grown plants and tissue culture by DNA probe.** Proceeding of the 2nd National Cane and Sugar conference 2-3 May, 1995. Thailand society of sugarcane technologists, Bangkok.

Wongkaew, P., Y. Hanboonsong, P. sirithorn, C. Choosai, S. Boonkrong, T. Tinnangwattana, R. kitcharconpanya and S. Damak. 1997. **Differentiation of phytoplasma associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing.** Theoretical Apply Genetic 95: 660-663.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสุปราณี บุญโนนदै
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 มีนาคม พ.ศ. 2519
สถานที่เกิด	ตำบลบ้านโสก อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550