ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบและแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในอ้อยและแมลงพาหะ โดยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาวชุตินันท์ ชูสาย

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพา หาญบุญทรง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ วงศ์แก้ว)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิศาล ศิริธร)

บทคัดย่อ

การใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย พืชอื่นๆและในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) จากการใช้ primer ที่สังเคราะห์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา 3 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย primer ที่สังเคราะห์จากส่วนของยีน 16s rRNA ได้แก่ universal primer (U 1, U 2), specific primer (MLO 1, MLO X, P 1) primer ที่เจาะจงในส่วนของยีน 23s rRNA ได้แก่ specific primer MLO 7, MLO Y, P 2 และ primer ที่ส่วน intergenic spacer ได้แก่ specific primer MLO 3 ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา คือ 4 มิลลิโมลาร์ สำหรับชุด primer MLO X, MLO Y และ 1.5 มิลลิโมลาร์สำหรับ primer อื่น แต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วยช่วง denaturation เป็นเวลา 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสใน primer อื่น ยกเว้น primer MLO X, MLO Y และ P 1, P 2 ใช้ที่ 92 องศาเซลเซียส ช่วง annealing เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสใน primer อื่น ยกเว้น primer P 1, P 2 ใช้ที่ 68 องศาเซลเซียส และในช่วง extension เป็นเวลา 90 วินาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสในทุก primer ส่วนจำนวนรอบ

ของปฏิกิริยาสำหรับตรวจพืชอยู่ที่ 30 รอบและการตรวจแมลงพาหะใช้ 37 หรือ 40 รอบ ขึ้นอยู่กับชุด primer ที่ใช้

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวในอ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควาย อาการใบเหลืองในหญ้ามาเลเซีย หญ้าเจ้าชู้ หญ้าขน ผักปราบ ตะไคร้หอม อาการใบด่างในอ้อยและเซ่งใบมน และอาการกอตะไคร้ในอ้อย โดยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาขนาด 1.35 kb จากอ้อยที่แสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้ และพืชอื่นๆที่แสดงอาการใบขาวและอาการใบเหลือง แต่ไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากอ้อยปกติ อ้อยและเซ่งใบมนที่แสดงอาการใบด่าง และเมื่อตรวจโดยใช้ specific primer MLO 1, MLO 3 พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็น 2 แถบขนาด 654 และ 720 bp จากหญ้ามาเลเซีย หญ้าเจ้าชู้ ผักปราบ และหญ้าขนที่แสดงอาการใบเหลือง แต่ในอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ และอ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 654 bp ส่วนการใช้ primer MLO 1, MLO 7 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ และอ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 810 bp และผลจากการตรวจในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) โดยใช้เทคนิค nested PCR พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 654 และ 218 bp จากการใช้ชุด primer U 1, MLO 7 กับ MLO 1, MLO 3 และ MLO X, MLO Y กับ P 1, P 2 ตามลำดับ

การศึกษารูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) ในอ้อยและพืชอื่นๆ โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณจากการใช้ universal primer มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 15 ชนิด ได้แก่ *Msp* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Acc* I, *Hpa* I, *Hpa* II, *Dra* I, *Xba* I, *Bgl* I, *Eco*R I, *Kpn* I, *Sal* I, *Bam*H I, *Hind* III และ *Taq* I พบว่า รูปแบบ RFLPของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว แตกต่างจากอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิด *Msp* I และ *Hpa* II รูปแบบ RFLP ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แตกต่างจากหญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิด *Taq* I ส่วนรูปแบบ RFLP ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและพืชอื่นๆที่แสดงอาการใบขาว และอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ ที่เพิ่มปริมาณจากการใช้ specific primer MLO 1, MLO 3 ไม่แตกต่างกัน

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก หญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว และแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus*

(Matsumura) โดยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA ในพืช กับ 16s rRNA และ intergenic spacer ในแมลงพาหะ พบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาว และอาการกอตะไคร้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน แต่เชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าข้าว หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวจัดอยู่อีกกลุ่มหนึ่ง ส่วนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดอาการใบขาวในอ้อย