บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. กระถางปลูกต้นไม้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร
2. กรงเลี้ยงแมลงเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร
3. สารเคมี
   - 3.1 Ethanol absolute
   - 3.2 Isoamyl alcohol
   - 3.3 Isopropanol
   - 3.4 Chloroform
   - 3.5 Ethidium bromide
   - 3.6 สารเคมีที่ใช้เตรียม Phytoplasma grinding buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
     - 3.6.1 K_2HPO_4-$3H_2O$
     - 3.6.2 KH_2PO_4
     - 3.6.3 Sucrose
     - 3.6.4 Polyvinylpyrrolidone (PVP - 10)
     - 3.6.5 Ascorbic acid
     - 3.6.6 Bovine serum albumin
   - 3.7 สารเคมีที่ใช้เตรียม CTAB buffer
     - 3.7.1 NaCl
     - 3.7.2 Tris base
     - 3.7.3 EDTA
     - 3.7.4 PVP-40
     - 3.7.5 Mercaptoethanol

3.8 สารเคมีที่ใช้เตรียม TBE Buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

3.8.1 Tris-Cl

3.8.2 Boric acid

3.8.3 EDTA

3.9 สารเคมีที่ใช้เตรียม Loading dye (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

3.9.1 glycerol

3.9.2 EDTA

3.9.3 bromophenol

3.9.4 xylene cyanol

3.10 สารเคมีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reagent mixture)

3.10.1 Sterile deionized water

3.10.2 Taq polymerase buffer

3.10.3 Mg Cl_2

3.10.4 dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

3.10.5 Primer (P1-P7)

3.10.6 Taq polymerase

3.10.7 Mineral oil

3.11 สารเคมีที่ใช้เตรียม Polyacrylamide gel (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

3.11.1 TBE buffer

3.11.2 Acrylamide และ Bis

3.11.3 Tetramethylethylenediamine (TEMED)

3.11.4 Ammonium persulfate

3.11.5 Sterile deionized water

3.12 สารเคมีที่ใช้เตรียม Agarose gel (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

3.12.1 Agarose (DNA grade)

3.12.2 0.5 เท่า TBE buffer

4. แมลงที่ใช้ในการทดลอง

ดักจับแมลงปากเจาะดูดพวกเพลี้ยจักจั่นต่างๆ ในอันดับ Homoptera โดยใช้สวิงโฉบมาจากบริเวณหญ้าแพรกที่แสดงอาการของโรคใบขาวที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยทำการจับในช่วงเวลา 18.00 ถึง 19.00 นาฬิกา จากนั้นนำแมลงที่จับได้มาแยกชนิด และคัดเลือกเอาเฉพาะตัวเต็มวัยของเพลี้ยจักจั่น *E. indicus* (ภาพที่ 1) เพื่อใช้ในงานทดลองต่อไป

5. พืชที่ใช้ในการทดลอง

5.1 พืชทดสอบ

5.1.1 หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon*) ที่ใช้เป็นพืชทดสอบในการรับการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาจากแมลงพาหะ เป็นต้นหญ้าปกติที่เก็บมาจากธรรมชาติ และนำมาปลูกเลี้ยงในเรือนกระจกปลอดแมลง และผ่านการตรวจเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ว่าเป็นพืชปกติ

5.1.2 อ้อย (*Saccharum officinarum*) ที่ใช้เป็นพืชทดสอบเป็นพันธุ์อู่ทอง 1 ปลูกจากต้นพันธุ์ที่นำมาจากจังหวัดขอนแก่น นำมาปลูกเลี้ยงในเรือนกระจกปลอดแมลง และผ่านการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค พีซีอาร์ว่าเป็นพืชปกติ

5.2 พืชติดเชื้อที่ใช้เป็นแหล่งของเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาว

5.2.1 หญ้าแพรกเป็นโรคใบขาวเก็บจากธรรมชาติ (ภาพที่ 2ก) ในบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเทคนิคพีซีอาร์ นำมาปลูกเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลง (ภาพที่ 2ข) เพื่อเป็นแหล่งของเชื้อในการถ่ายทอดโรค

5.2.2 อ้อยใบขาวปลูกจากท่อนพันธุ์ซึ่งต้นแม่แสดงอาการใบขาว (ภาพที่ 3ก) พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์อู่ทอง 1 จากจังหวัดขอนแก่น ต้นอ้อยที่งอกจากท่อนพันธุ์ซึ่งแสดงอาการใบขาว และตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเทคนิคพีซีอาร์ นำไปปลูกเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลง (ภาพที่ 3ข) เพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อในการถ่ายทอดโรค

ภาพที่ 1 ตัวเต็มวัยของแมลง *Exitianus indicus* จับจากต้นหญ้าแพรกซึ่งขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ (กำลังขยาย 30 เท่า)

ก. ด้านบน

ข. ด้านล่าง

ภาพที่ 2 หญ้าแพรกเป็นโรคใบขาว

ก. หญ้าแพรกใบขาวพบตามธรรมชาติบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ข. หญ้าแพรกเป็นโรคจากข้อ ก. ปลูกในกรงเลี้ยงแมลงเพื่อใช้เป็นแหล่งของไฟโตพลาสมาในการทดลอง

ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของโรคใบขาวของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1 ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา

ก. โรคใบขาวของอ้อยในแปลงปลูก จังหวัดขอนแก่น

ข. โรคใบขาวของต้นอ้อยเจริญจากท่อนพันธุ์เป็นโรคจากข้อ ก. ซึ่งใช้เป็นแหล่งของเชื้อไฟโตพลาสมาในการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง (microfuge)
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (MSE coolspin2)
3. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
4. หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
5. หลอดสำหรับพีซีอาร์ (PCR tube)ขนาด 500 ไมโครลิตร
6. ปิเปตต์ทิป (pipettes tip) ขนาด 2, 200 และ1000ไมโครลิตร
7. Pasteur pipette
8. หม้อนึ่งความดัน
9. ตู้เย็น
10. ตู้แช่แข็ง – 20 องศาเซลเซียส
11. เครื่อง PCR thermocycler
12. เครื่อง อิเลคโตรโฟรีซีส (Electrophoresis)
13. เครื่อง UV transilluminatior
14. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)
15. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
16. กล้องโพลารอยด์
17. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
18. ไมโครเวฟ (microwave)
19. โกร่ง (mortar) สำหรับบดตัวอย่างพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
20. อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี

เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

1. เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาว

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแมลง

การสกัดดีเอ็นเอจากแมลงได้ดัดแปลงจาก ภรณี (2543) โดยนำตัวอย่างแมลงที่ทำการสุ่มจับมาบดใน CTAB buffer ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ต่อแมลงจำนวน 1 ตัว เมื่อบดแมลงละเอียดแล้วเติม CTAB buffer ลงไปอีก 0.75 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีระหว่างนั้นนำออกมาเขย่าทุกๆ 3 นาที จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol ในปริมาณ 1 เท่าของสารที่มีอยู่เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ในเครื่อง microfuge จากนั้นดูดเอาของเหลวส่วนบน (epiphase) มาบรรจุลงในหลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ซึ่งแช่เย็นในปริมาณที่เท่ากัน เขย่าให้เข้ากัน 10 ครั้ง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ใน microfuge เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนลอย (supernatant) ทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (ethanol 70%) นำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง microfuge อีกครั้งโดยใช้เวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใส่ในเดซิกเคเตอร์ (desiccator) ที่เป็นสูญญากาศใช้เวลาประมาณ 20 นาที ละลายตะกอนด้วย sterile deionized water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่เยือกแข็งมีอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากพืช

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชได้ดัดแปลงจาก Dellaporta และคณะ (1983) โดยนำตัวอย่างพืชมาล้างทำความสะอาด จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนของเส้นกลางใบแล้วหั่นเป็นชิ้นละเอียดใส่ตัวอย่างเส้นกลางใบหนัก 1-2 กรัม ลงในโกร่งที่แช่เย็น เติมสารละลาย grinding buffer ที่เย็น 7 มิลลิลิตรทิ้งไว้ในถาดน้ำแข็ง 20 นาที บดตัวอย่างให้ละเอียด (เติมเศษแก้วลงไปเล็กน้อยเพื่อช่วยในการบด) จากนั้นเติมสารละลาย grinding buffer อีก 6 มิลลิลิตร บดตัวอย่างอีกครั้ง จากนั้นดูดเอาของเหลวใส่ในหลอด นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดเอาของเหลวมาบรรจุลงในหลอดพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที ละลายตะกอน (pellet) ด้วย CTAB buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol ในปริมาณที่เท่ากันของสารที่มีอยู่ เขย่าสารให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนมาบรรจุลงในหลอดใหม่แล้ว เติม isopropanol ซึ่งแช่เย็นไว้ 1 เท่าต่อของเหลวที่มีอยู่เขย่าสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทเอาของเหลวทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (ethanol 70 %) โดยนำไปหมุนเหวี่ยงใน เครื่อง microfuge อีกครั้งโดยใช้เวลา 5 นาที

หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยใส่ในเดซิกเคเตอร์ ที่เป็นสูญญากาศใช้เวลาประมาณ 20 นาที ละลายตะกอนด้วย sterile deionized water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่มีอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป

2. วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวโดยการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวโดยปฏิกริยา PCR

ทำการผสม PCR reagent ซึ่งประกอบด้วย 10x Taq polymerase buffer, 50 mM $MgCl_2$, 10mM dNTP mixture, 0.5μM Primer (P1/P7) ซึ่งมีความจำเพาะต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (16S rRNA gene + 16S/23S intergenic spacer region) ของไฟโตพลาสมาที่มีขนาด 1800 bp (Sdoodee *et al.*, 1999), 2.5 u Taq polymerase ปริมาตรทั้งสิ้น 48 ไมโครลิตร เข้ากับดีเอ็นเอซึ่งสกัดได้จากแมลงหรือจากต้นพืช 2 ไมโครลิตรรวมปริมาตรรวมทั้งสิ้น 50 ไมโครลิตรลงในหลอดพีซีอาร์ (thin wall tube) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งมี mineral oil 10 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงนานประมาณ 10 วินาที เพื่อให้ mineral oil ขึ้นไปอยู่ข้างบนผิวหน้า นำไปเข้าเครื่อง PCR thermocycler ทำการปรับอุณหภูมิดังนี้เริ่มด้วย innitial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วยอุณหภูมิของปฏิกิริยาพีซีอาร์ 35 รอบซึ่งในแต่ละรอบประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีและขั้นตอน extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที (Sdoodee *et al.*, 1999) เมื่อครบจำนวน 35 รอบแล้วทำการตรวจหาผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเทคนิค Electrophoresis

2.2 การตรวจหาผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวจากปฏิกริยา PCR โดยเทคนิค Electrophoresis

ทำการตรวจหาผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งได้จากปฏิกิริยา พีซีอาร์ในเจล (agarose gel) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ agarose 0.3 กรัม ละลายใน 0.5 เท่า TBE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วหลอมละลายด้วยความร้อนโดยใช้เตาไมโครเวฟ (microwave) นานประมาณ 1 นาที โดยใช้ความร้อนในระดับปานกลางหลังจากนั้นเติม ethidium bromide ปริมาตร 3 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เทลงในถาดเจลที่ประกอบแล้วตั้งทิ้งไว้ 45-60 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว นำเจลใส่ในเครื่อง Electrophoresis (BioRad Mini Submarine) เติม 0.5 เท่าของ TBE bufferปริมาตร 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผสม Loading buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเข้ากับ ผลผลิตดีเอ็นเอปริมาตร 4 ไมโครลิตรลงใน microtube แล้วนำไป centrifuge นานประมาณ 5 วินาที จากนั้นนำมาหยอดลงในเจลตามลำดับ โดยช่องแรกของเจลจะใส่ 1 Kb DNA Labber (Gibco BRL)เป็นตัวเทียบขนาดมาตรฐาน ทำการ run gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 90 โวลต์ ประมาณ 45 นาทีหลังจากนั้นตรวจหาผลผลิตดีเอ็นเอในเจลบนเครื่อง UV transilluminator โดยใช้ความยาวคลื่นแสง 300 นาโนเมตร แล้วถ่ายภาพการเรืองแสงของผลผลิตดีเอ็นเอด้วยกล้องโพลารอยด์ (Polaroid DS-34)

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบการรับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของหญ้าแพรกและของอ้อยของแมลง *Exitianus indicus* ผ่านการดูดกินพืชที่เป็นโรค

1.1 ตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวจากแมลง *E. indicus* ซึ่งจับจากหญ้าแพรกใบขาวที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการตรวจหาเชื้อใช้แมลง 1 ตัวต่อตัวอย่าง ดำเนินการตรวจทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง จากตัวอย่างแมลงที่ดักจับในระหว่างเดือนมีนาคม 2545 – กุมภาพันธ์ 2547

1.2 ตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวจากแมลง *E. indicus* ซึ่งจับจากธรรมชาติแล้วนำไปดูดกินหญ้าแพรกเป็นโรคใบขาวเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ดำเนินการตรวจเชื้อในแมลง 40 ตัวอย่างโดยใช้แมลง 1 ตัวต่อตัวอย่าง แยกเป็นแมลงดูดกินเชื้อ 1 สัปดาห์ 20 ตัวอย่างและแมลงดูดกินเชื้อ 2 สัปดาห์ 20 ตัวอย่าง

1.3 ตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวจากแมลง *E. indicus* ซึ่งจับจากธรรมชาติ แล้วนำไปดูดกินอ้อยเป็นโรคใบขาวเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ดำเนินการตรวจเชื้อในแมลง 40 ตัวอย่างโดยใช้แมลง 1 ตัวต่อตัวอย่าง แยกเป็นแมลงดูดกินเชื้อ 1 สัปดาห์ 20 ตัวอย่างและแมลงดูดกินเชื้อ 2 สัปดาห์ 20 ตัวอย่าง

2. การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวโดยแมลง *E. indicus* ข้ามระหว่างอ้อย และหญ้าแพรก

2.1 การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลง *E. indicus* ซึ่งจับจากธรรมชาติ

จับแมลง *E. indicus* จากหญ้าแพรกเป็นโรคใบขาวที่ขึ้นตามธรรมชาติแล้วนำมาปล่อยให้ดูดกินพืชทดสอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (inoculation period)

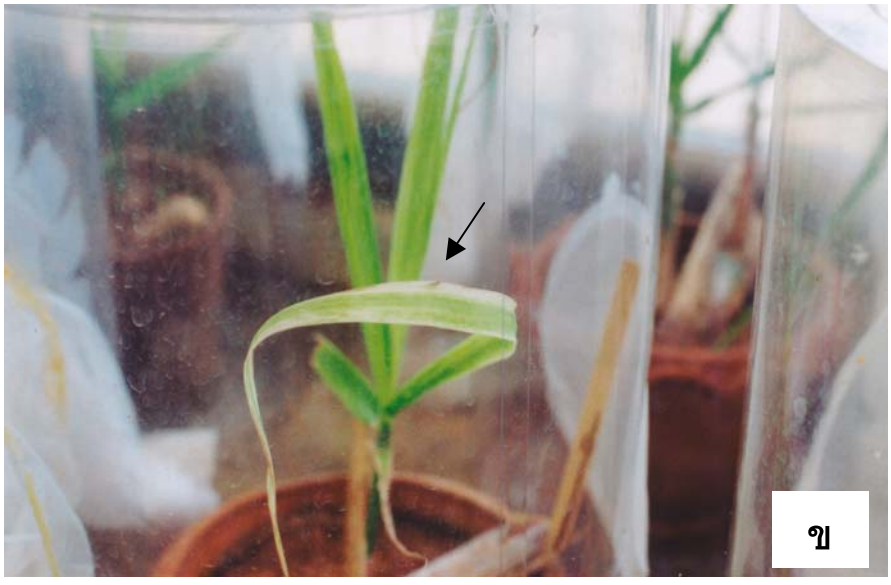
2.2 การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวของหญ้าแพรกโดยแมลง *E. indicus*

จับแมลง *E. indicus* จากหญ้าแพรกซึ่งขึ้นตามธรรมชาตินำมาปล่อยให้ดูดกินหญ้าแพรกเป็นโรคใบขาวในกรงแมลงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 4ก) เพื่อรับเชื้อ (acquisition period) แล้วย้ายแมลงไปดูดกินพืชทดสอบต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (inoculation period)

2.3 การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวของอ้อยโดยแมลง *E. indicus*

จับแมลง *E. indicus* จากหญ้าซึ่งขึ้นตามธรรมชาตินำมาปล่อยให้ดูดกินอ้อยเป็นโรคใบขาวในกรงแมลงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 4ข) เพื่อรับเชื้อแล้วย้ายแมลงไปดูดกินพืชทดสอบต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ในการทดลองข้อที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 ใช้แมลง 5 ตัว ต่อต้นของพืชทดสอบแต่ละชนิด ใช้พืชทดสอบซึ่งเป็นพืชปกติ 2 ชนิดคือ หญ้าแพรกและต้นกล้าอ้อยทำ 20 ซ้ำในแต่ละการทดลอง โดยมีหญ้าแพรกและต้นอ้อยปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายเชื้อจากแมลง และเลี้ยงดูในสภาพเดียวกันเป็นชุดควบคุม ติดตามสังเกตความเปลี่ยนแปลงหรืออาการที่ปรากฏขึ้นในพืชทดสอบที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อเป็นเวลา 3-6 เดือน และยืนยันผลการถ่ายทอดเชื้อโดยเทคนิคพีซีอาร์



ภาพที่ 4 แมลงพาหะ *Exitianus indicus* ดูดกินพืชเป็นโรค (ลูกศร) เพื่อรับเชื้อไฟโตพลาสมาก่อนนำไปถ่ายทอดยังพืชทดสอบปกติ

ก. ดูดกินหญ้าแพรกใบขาว

ข. ดูดกินอ้อยใบขาว

3. การจำแนกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวซึ่งถ่ายทอดโดยแมลง *E. indicus* โดยการวิเคราะห์แบบแผน RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ของรหัสพันธุกรรม 16S rRNA gene

นำผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวจากแมลงหรือจากพืชที่เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tru9I* โดยใช้ส่วนผสมดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรต่อเอนไซม์ 1 ไมโครลิตร แล้วนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจดูชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ดังกล่าวโดยวิธีการอิเลคโตรโพลีซีสใน 8 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำ (deionized water) ตรวจชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (แบบแผน RFLP) ที่ปรากฏอยู่บนเจลด้านบนเครื่อง UV transilluminator โดยใช้ความยาวคลื่นแสง 300 นาโนเมตร แล้วถ่ายภาพรูปแบบแผน RFLP ด้วยกล้องโพลารอยด์

ทำการวิเคราะห์แบบแผน RFLP ซึ่งได้จากการย่อยดีเอ็นเอ (16S rRNA gene) ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tru9I* โดยการนับจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอที่ถูกย่อย และวัดขนาดของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นโดยการคำนวณเทียบจากระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอใน polyacrylamide gel เข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst Software V 1.4.1 (Bio-RAD, Molecular Bioscience Group, Hercules, CA, USA) จากนั้นดำเนินการจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาว โดยการเปรียบเทียบแบบแผน RFLP ของเชื้อที่พบในแมลง *E. indicus* จับจากธรรมชาติ เชื้อในแมลงที่ผ่านการดูดกินหญ้าแพรกใบขาวหรืออ้อยใบขาว เชื้อที่พบในพืชทดสอบ (หญ้าแพรก และอ้อย) ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากแมลง *E. indicus* เชื้อที่ตรวจพบในหญ้าแพรกใบขาวซึ่งขึ้นอยู่ธรรมชาติ และเชื้อในอ้อยเป็นโรคใบขาวจากแปลงปลูกจังหวัดขอนแก่น