

## ภาคผนวก

### 1. สูตรการเตรียม Phytoplasma grinding buffer ปริมาตร 1 ลิตร

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  21.7 กรัม (anhydrous = 16.7 กรัม)

$KH_2PO_4$  4.1 กรัม

Sucrose 100 กรัม

Polyvinylpyrrolidone (Mr10,000) 20 กรัม

ก่อนนำไปใช้เติม ascorbic acid เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (0.20 มิลลิลิตรต่อ 20 มิลลิลิตร grinding buffer) และ BSA (Bovine serum albumin) ในอัตรา 0.03 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตร grinding buffer แล้วปรับ pH เป็น 7.6

### 2. สูตรการเตรียม CTAB buffer

CTAB (Hexadecyl – trimethyl – ammonium bromide) 2%

NaCl 1.4 M

Tris base 100 mM

EDTA 20 mM

Polyvinylpyrrolidone (Mr40,000) 1%

Mercaptoethanol 0.2%

### 3. สูตรการเตรียม TBE 5 เท่า pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base (0.45M) 54 กรัม

Boric acid (0.45M) 27.5 กรัม

EDTA pH 8.0 (0.01M) 20 มิลลิลิตร (ของ 0.5M EDTA)

### 4. สูตรการเตรียม Loading dye (10 มิลลิลิตร)

Glycerol 5 มิลลิลิตร

EDTA (1mM) 40 ไมโครลิตร (ของ 0.2M EDTA)

Bromophenol (0.25%) 0.04 กรัม

Xylene cyanol (0.25%) 0.04 กรัม

## 5. ส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reagent mixture) 50 ไมโครลิตร

dNTP mixture (10 uM)	0.4 ไมโครลิตร
Primer set (for phytoplasma 16S rRNA gene,P1-P7)	25 ไมโครลิตร
Taq polymerase (5U/ul)	0.25 ไมโครลิตร
PCR polymerase buffer (20 m Tris-Hcl, 0.1 m EDTA,1Mmddt,50%glycrol)	5 ไมโครลิตร
Mg Cl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5 ไมโครลิตร
PCR water	38.35 ไมโครลิตร
DNA	2 ไมโครลิตร

## 6. สารเคมีที่ใช้เตรียม Polyacrylamide gel 8%

TBE buffer (5 x stock)	9 มิลลิลิตร
Acrylamide : Bis (30% stock)	12 มิลลิลิตร
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	25 ไมโครลิตร
Ammonium persulfate (10% stock)	286 ไมโครลิตร
Sterile deionized water	24 มิลลิลิตร

## 7. สูตรการเตรียม Agarose gel 1%

Agarose (DNA grade)	0.3 กรัม
0.5 เท่า TBE buffer	30 มิลลิลิตร

ก่อนนำไปใช้นำไปหลอมละลายในเตาไมโครเวฟจนเจลดละลายหมดและเติม Ethidium bromide ลงไป 3 ไมโครลิตรคนให้เข้ากันแล้วเทลงแผ่นรองรับเจลทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

ตารางผนวกที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวในแมลง *Exitanus indicus* จับจากหญ้า  
แพรงใบขาวที่ขึ้นตามธรรมชาติ

วัน เดือน ปี ทำการทดลอง	จำนวนแมลงพาหะ <i>E.indicus</i>	ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเทคนิค PCR
24/3/45	6	2/6
29/3/45	4	1/4
13/5/45	6	0/6
20/5/45	6	1/6
21/5/45	6	0/6
28/5/45	5	0/5
5/6/45	4	0/4
7/6/45	5	0/5
21/6/45	4	0/4
27/6/45	6	3/6
31/10/45	6	1/6
30/1/46	4	0/4
21/6/46	4	0/4
22/9/46	3	0/3
25/9/46	4	0/4
30/9/46	1	0/1
23/10/46	1	0/1
28/10/46	2	0/2
2/10/46	4	0/4
9/12/46	5	0/5
4/2/47	6	2/6
17/2/47	3	2/3
18/2/47	5	3/5
รวม	100	15/100

**ตารางผนวกที่ 2** ผลการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง *Exitanus indicus* ภายหลังให้แมลงดูดกินหญ้าแพรกใบขาวเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

วัน เดือน ปี ทำการทดลอง	จำนวนแมลงพาหะ <i>E.indicus</i>	ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเทคนิค PCR
30/9/46	2	0/2
9/10/46	3	2/3
14/10/46	1	0/1
5/11/46	1	0/1
20/11/46	3	2/3
9/12/46	2	0/2
13/1/47	2	0/2
15/1/47	1	1/1
5/2/47	2	0/1
9/2/47	4	3/4
รวม	20	8/20

**ตารางผนวกที่ 3** ผลการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง *Exitanus indicus* ภายหลังให้แมลงดูดกินหญ้าแพรกใบขาวเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

วัน เดือน ปี ทำการทดลอง	จำนวนแมลงพาหะ <i>E.indicus</i>	ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเทคนิค PCR
10/7/46	4	2/4
15/10/46	4	3/4
30/10/46	1	0/1
20/11/46	3	2/3
2/12/46	1	0/1
9/12/46	2	2/2
17/12/46	2	1/2
19/1/47	2	2/2
5/2/47	1	0/1
รวม	20	12/20

**ตารางผนวกที่ 4** ผลการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง *Exitianus indicus* ภายหลังจากให้แมลงดูดกินอ้อยใบขาวเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

วัน เดือน ปี ทำการทดลอง	จำนวนแมลงพาหะ <i>E.indicus</i>	ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเทคนิค PCR
28/10/46	2	1/2
7/11/46	2	1/2
22/3/47	2	1/2
26/3/47	1	0/1
9/4/47	2	1/2
12/4/47	2	0/2
10/5/47	2	0/2
11/5/47	2	0/2
17/5/47	2	0/2
22/5/47	2	0/2
30/5/47	1	0/1
<b>รวม</b>	<b>20</b>	<b>4/20</b>

**ตารางผนวกที่ 5** ผลการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลง *Exitianus indicus* ภายหลังจากให้แมลงดูดกินอ้อยใบขาวเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

วัน เดือน ปี ทำการทดลอง	จำนวนแมลงพาหะ <i>E.indicus</i>	ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเทคนิค PCR
17/6/46	3	2/3
18/6/46	1	1/1
5/11/46	2	1/2
10/3/47	2	0/2
25/3/47	2	1/2
29/3/47	2	0/2
7/4/47	1	1/1
26/4/47	4	1/4
28/4/47	2	1/2
19/5/47	1	0/1
<b>รวม</b>	<b>20</b>	<b>8/20</b>

ตารางผนวกที่ 6 การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลงพาหะ *Exitianus indicus* จับจาก  
ธรรมชาติไปยังพืชทดสอบ (หญ้าแพรกและอ้อยปกติ)

การทดลองที่	วัน เดือน ปี การทดลอง	ผลการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปยังพืชทดสอบ			
		หญ้าแพรก		อ้อย	
		แสดงอาการ ใบขาว	ผลการตรวจเชื้อ (PCR)	แสดงอาการ ใบขาว	ผลการตรวจเชื้อ (PCR)
1	23/9/46	-	-	-	-
2	24/9/46	-	-	-	-
3	1/10/46	-	-	-	-
4	3/10/46	-	-	-	-
5	6/10/46	+	+	-	-
6	8/10/46	-	-	-	-
7	14/10/46	-	-	-	-
8	15/10/46	+	+	-	-
9	16/10/46	+	+	-	-
10	20/10/46	-	-	-	-
11	22/10/46	-	-	-	-
12	25/10/46	-	-	-	-
13	26/10/46	-	-	-	-
14	27/10/46	-	-	-	-
15	31/10/46	-	+	-	-
16	2/11/46	+	-	-	-
17	6/11/46	-	+	-	-
18	9/11/46	-	-	-	-
19	17/11/46	-	-	-	-
20	13/12/46	-	-	-	-
รวม		4/20	5/20 (25%)	0/20	0/20 (0%)

ตารางผนวกที่ 7 การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวของหญ้าแพรกโดยใช้แมลง *Exitanus indicus* ซึ่งผ่านการคัดกินเชื้อเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ไปยังพืชทดสอบ (หญ้าแพรกและอ้อยปกติ)

การทดลองที่	วัน เดือน ปี การทดลอง	ผลการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปยังพืชทดสอบ			
		หญ้าแพรก		อ้อย	
		แสดงอาการ ใบขาว	ผลการตรวจเชื้อ (PCR)	แสดงอาการ ใบขาว	ผลการตรวจเชื้อ (PCR)
1	7/7/46	+	+	-	-
2	1/8/46	-	-	-	-
3	3/10/46	-	-	-	-
4	10/10/46	-	-	-	-
5	16/10/46	-	-	-	-
6	22/10/46	+	+	-	-
7	28/10/46	-	-	-	-
8	11/11/46	+	+	-	-
9	20/11/46	-	-	-	-
10	24/11/46	+	+	-	-
11	29/11/46	+	+	-	-
12	11/12/46	+	+	-	-
13	18/12/46	-	-	-	-
14	29/12/46	+	+	-	-
15	4/1/47	+	+	-	-
16	30/1/47	-	-	-	-
17	18/3/47	-	-	-	-
18	23/3/47	-	-	-	-
19	10/4/47	-	-	-	-
20	11/4/47	-	-	-	-
รวม		8/20	8/20 (40%)	0/20	0/20 (0%)

**ตารางผนวกที่ 8** การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวของอ้อยโดยใช้แมลงพาหะ *Exitanus indicus* ซึ่งผ่านการคัดเลือกเชื้อเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ไปยังพืชทดสอบ (หญ้าแพรกและอ้อยปกติ)

การทดลองที่	วัน เดือน ปี การทดลอง	ผลการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปยังพืชทดสอบ			
		หญ้าแพรก		อ้อย	
		แสดงอาการ ใบขาว	ผลการตรวจเชื้อ (PCR)	แสดงอาการ ใบขาว	ผลการตรวจเชื้อ (PCR)
1	7/1/46	+	+	-	-
2	26/1/46	-	-	-	-
3	2/2/46	-	-	-	-
4	10/2/46	-	-	-	-
5	17/2/46	-	-	-	-
6	2/6/46	-	-	-	-
7	9/6/46	-	-	-	-
8	27/6/46	-	-	-	-
9	11/8/46	-	-	-	-
10	12/8/46	-	-	-	-
11	18/11/46	-	-	-	-
12	8/3/47	-	-	-	-
13	25/3/47	-	-	-	-
14	7/4/47	-	-	-	-
15	26/4/47	-	-	-	-
16	28/4/47	-	-	-	-
17	26/5/47	-	-	-	-
18	2/6/47	-	-	-	-
19	6/6/47	-	-	-	-
20	14/6/47	-	-	-	-
รวม		1/20	1/20 (5%)	0/20	0/20 (0%)