ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	17	ลิตร

2. Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Water	1	ลิตร

3. Potato Dextrose Agar (PCA)

Potato	200	กรัม
Carrot	20	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Water	1	ลิตร

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. 2X CTAB

- 2% CTAB
- 100 mM Tris (pH 8.0)
- 20 mM EDTA (pH 8.0)
- 1.4 M NaCl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

นำ 2% CTAB 2 กรัม , 100 mM Tris (pH 8.0) 10 มิลลิลิตร , 20 mM EDTA (pH 8.0) 4 มิลลิลิตร และ 1.4 M NaCl 28 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

2. TE buffer

- 1.0 mM Tris (pH 8.0)
- 0.1 mM EDTA (pH 8.0)

นำ 1.0 mM Tris (pH 8.0) 0.05 มิลลิลิตร และ 0.1 mM EDTA 0.01 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. standard PCR buffer (10X)

- 100 mM Tris-HCl (pH 8.3, 25 องศาเซลเซียส)
- 500 mM KCl
- 15 mM $MgCl_2$
- 1% Twin-20
- 0.1% NP-40

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. chloroform/iso-amy alcohol (อัตรา 24:1)

ผสม chloroform 240 มิลลิลิตร และ iso-amyl alcohol 10 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันการระเหย

5. 1M Tris (pH 8.0)

ชั่งสาร Tris 121.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. 5 M NaCl

ชั่งสาร NaCl 292.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ชั่งสาร Disodium Ethylene Diamine Tetraacetate .$2H_2O$ 136.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ด้วย NaOH จนได้ pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

8. 50X Tris-acetate buffer (50X TAE buffer)

- Tris base	242	กรัม
- Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
- 0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

9. ethidium bromide (10 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)

ชั่งสาร ethidium bromide 1 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายหมดแล้วนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสารนี้จะต้องใส่ถุงมือและระวังไม่หายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagent

10. loading buffer

- Bromophenol bule	0.25 %
- Xylene cyanol	0.25 %
- สารละลาย sucrose	40 %

ผสมสารทั้ง 3 เข้าด้วยกัน นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

11. 5X Tris-borate buffer (5X TBE buffer)

- Tris base	54	กรัม
- boric acid	20	มิลลิลิตร
- 0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

12. 10% ammonium persulfate (10% APS) (10 มิลลิกรัม / 100 ไมโครลิตร)

ชั่งสาร ammonium persulfate 0.03 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร เมื่อสารละลานหมดแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนจะนำไปใช้

13. 4.5% polyacrylamide gel

* การเตรียม 4.5% polyacrylamide gel stock solution

- acrylamide 76 กรัม
- bisacrylamide 4 กรัม

ละลายโดยปั่นบน hot plate แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 ml. นำใส่ขวดสีชาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

* การเตรียม denaturing 4.5% polyacrylamide gel

- 4.5% polyacrylamide stock	5.625	มิลลิลิตร
- 10X TBE	5	มิลลิลิตร
- Urea	21	กรัม
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
- 10% Ammonium persulfate	300	ไมโครลิตร
- TEMED	100	ไมโครลิตร

14. Silver staining

- $AgNO_3$	1	กรัม
- dH_2O	1	ลิตร
- Formaldehyde	1.5	มิลลิลิตร

15. Developer

-Sodium carbonate	30	กรัม
- Sodium thiosulphate	0.01	กรัม
- Formaldehyde	1.5	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

16. Sequencing dye

- 98% formaldehyde
- 10 mM EDTA (pH=8.0)
- 0.3% xylene f.f.
- 0.3% bromephenol blue

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูล AFLP data จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeospoeioides* ด้วย primer *Eco*RI-A/*Mse*I –CAG แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 48 polymorphic band

สตรอเบอรี่1	สตรอเบอรี่2	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สตรอเบอรี่1	สตรอเบอรี่2	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า	ถ่าไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูล AFLP data จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeospoeioides* ด้วย primer *Eco*RI-A/*Mse*I –CAC แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 27 polymorphic band

สตรอเบอรี่1	สตรอเบอรี่2	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 3 ข้อมูล AFLP data จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum gloeospoeioides* ด้วย primer *Eco*RI-A/*Mse*I-CAT แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 50 polymorphic band

สตรอเบอรี่1	สตรอเบอรี่2	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

สตรอเบอรี่1	สตรอเบอรี่2	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 4 ข้อมูล AFLP data จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum. gloeospoeioides* ด้วย primer *Eco*RI-AC/*Mse*I -C แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 29 polymorphic band

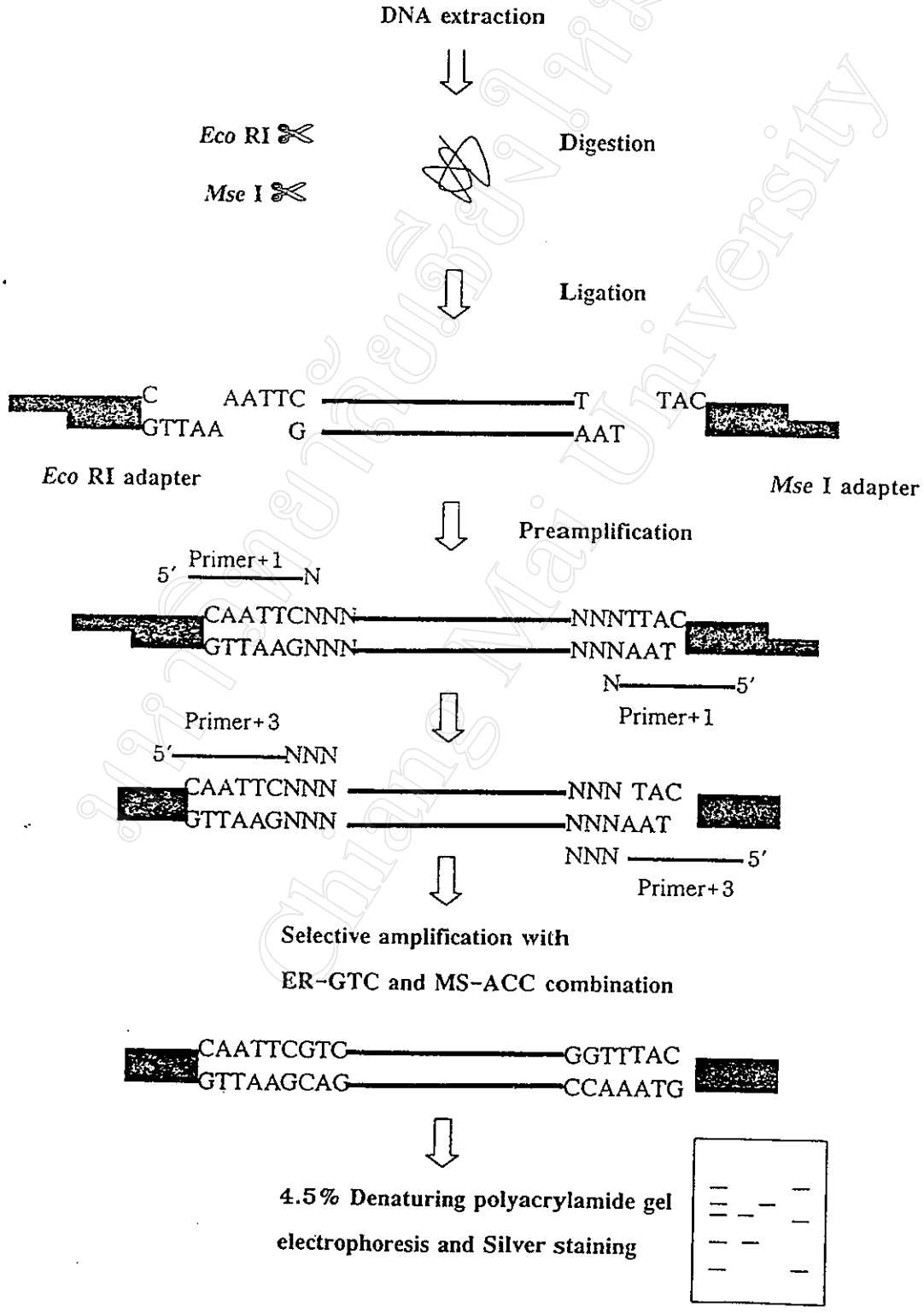
สตรอเบอรี่1	สตรอเบอรี่2	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

สตรอเบอรี่1	สตรอเบอรี่2	ทับทิม	ส้ม1	ส้ม2	ฝรั่ง	กล้วยหอม	กล้วยน้ำว้า	ลำไย	พลับ	กาแฟ	กล้วยไม้	ข้าวฟ่าง	มะนาว	พริก
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาพผนวกที่ 1 แผนภาพเทคนิค AFLP



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	เอมอร พงศ์สารารักษ์
วัน เดือน ปี เกิด	26 พฤษภาคม 2520
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมตอนปลายที่โรงเรียน เฉลิมขวัญสตรี ปีการศึกษา 2538
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (โรคพืช) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2542

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University