บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชชนิดต่างๆ ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยนำส่วนต่างๆ ของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้เพื่อใช้เป็น stock culture ต่อไป นำเชื้อราแต่ละ isolates ที่เก็บได้มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน วัดอัตราการเจริญเติบโตและบันทึกลักษณะโคโลนี ศึกษาขนาดและลักษณะ conidia และ appresorium โดยทำ slide culture บนอาหาร Potato Carrot Agar (PCA) ตามวิธีการของ Sutton (1980)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 3 พืชอาศัยและส่วนของพืชเป็นโรคซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่นำมาใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	ไอโซเลท	พืชอาศัย	ส่วนของพืชเป็นโรค
1	สตรอเบอรี่ 1	*Fragaria chicoensis*	ไหล
2	สตรอเบอรี่ 2	*Fragaria chicoensis*	ไหล
3	ทับทิม	*Punica gracnatum*	ใบ
4	ส้ม 1	*Citrus reticulata*	ใบ
5	ส้ม 2	*Citrus reticulata*	ใบ
6	ฝรั่ง	*Psidium guajava*	ผล
7	กล้วยหอม	*Musa sapientum*	ผล
8	กล้วยน้ำว้า	*Musa sapientum*	ผล
9	ลำไย	*Euphoria longana*	ใบ
10	พลับ	*Diospyros kaki*	ใบ
11	กาแฟ	*Coffea arabica*	ใบ
12	กล้วยไม้	*Orchid* sp.	ใบ
13	ข้าวฟ่าง	*Sorghum bicolor*	ใบ
14	มะนาว	*Citrus aurantifola*	ใบ
15	พริก	*Capsicum* sp.	ใบ

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราและการตรวจสอบคุณภาพ

2.1 การเลี้ยงเส้นใย

นำเชื้อราแต่ละ isolates ที่เก็บไว้มาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Both (PDB) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1-2 วัน ทำการเก็บเส้นใยของเชื้อรากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยใช้ buncher funnel และ vaccum pump ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าเส้นใยสะอาดไม่มีอาหารปะปนอยู่ ทิ้งไว้จนเส้นใยแห้ง ใช้ forceps คีบเส้นใยมาบดในโกร่งเพื่อสกัดดีเอ็นเอทันทีหรือเก็บใส่ถุงพลาสติก แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป (อาจเก็บได้ประมาณ 1 เดือน)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา

นำเส้นใยของเชื้อราที่เก็บไว้มาชั่ง ให้มีน้ำหนักประมาณ 0.08-0.3 กรัม ทำการบันทึกน้ำหนัก นำเส้นใยที่ชั่งน้ำหนักแล้วใส่ลงในโกร่งที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปในโกร่งเพื่อทำให้เส้นใยแข็งตัว ทำการบดเส้นใยจนละเอียดเป็นผง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนตัวอย่างเริ่มหลอมละลาย เติม 2X CTAB ปริมาตร 10 เท่า คนให้เส้นใยและสารละลายเข้ากัน ดูดของเหลวถ่ายใส่หลอดใส่สารขนาดเล็ก (eppendrof tube) ความจุ 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge) ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนถ่ายใส่หลอดใส่สารขนาดเล็กอันใหม่ เติม 10% CTAB ปริมาตร 0.1 เท่า นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม chloroform/iso-amyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า นำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง refrigerated centrifuge ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนถ่ายหลอดใส่สารขนาดเล็กอันใหม่ ทำการตกตะกอน DNA โดยการเติม isopropanol (เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง refrigerated centrifuge ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้ตะกอน DNA อยู่ด้านล่างหลอด ค่อยๆ เทของเหลวทิ้งไป (ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดไปกับของเหลว) ล้างตะกอนด้วย 70 % ethyalcohol (เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 1 เท่า นำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง refrigerated centrifuge

ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง คว่ำปากหลอดลง ทิ้งไว้ข้ามคืน เติม TE buffer ปริมาตร 1 เท่า เพื่อละลายตะกอน ถ้าตะกอนละลายยาก หลังจากเติม TE buffer แล้ว นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนจะละลาย (ดัดแปลงจาก Rogers และ Bendich, 1988)

2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ โดยใช้ Lamda DNA marker ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอผสมกับ loading buffer แล้วหยอดลงใน 1.0 % agarose gel electrophoresis อยู่ใน 1X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 V. เป็นเวลา 30 นาที หรือเมื่อสีของ loading buffer เคลื่อนมาอยู่เกือบปลายสุดของเจล นำแผ่น agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide ประมาณ 30 นาที นำไปแช่ในน้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จึงนำแผ่นเจลไปตรวจดูภายใต้แสงอุตราไวโอเล็ต

3. การวิเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิค AFLP

3.1 Restriction and ligation of DNA

นำ DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร มาเติม restriction buffer 35 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย เอนไซม์ *Eco*RI (5 unit) และ *Mse*I (5 unit) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ 10X buffer A 4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม ligation buffer 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 5 pmol *Eco*RI adapter และ 20 pmol *Mse*I adapter อย่างละ 1 ไมโครลิตร ลำดับ nucleotide ของ adapter ดังแสดงในตารางที่ 4 T4 DNA ligation (1 unit) 1 ไมโครลิตร 1mM ATP 1 ไมโครลิตร และ 10X buffer A 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำ DNA ที่ผ่านการ digest และ ligate แล้วมาทำเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป (Vos และคณะ, 1995)

ตารางที่ 4 ลำดับ nucleotide ของ adapter ที่ใช้ในการ ligation

Adapter	ลำดับ nucleotide
***Eco*RI adapter**	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-5'
***Mse*I adapter**	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'

3.2 PCR reaction

ทำ PCR ครั้งแรก (pre-amplification) นำ DNA template 5 ไมโครลิตร มาเติม reaction mix 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 5 ไมโครลิตร dNTP mix (1mM) 10 ไมโครลิตร primer *Eco*RI (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) และ primer *Mse*I (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 unit) 0.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ทั้ง 2 ชนิด จะมีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3' อยู่ 1 เบส คือ *Eco*RI-A /*Mse*I-C ลำดับ nucleotide ของ primer ดังแสดงในตารางที่ 5 ทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (PCR™ MJ Research, Inc.) จำนวน 30 รอบ โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้

denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
polymerizing ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

ปฏิกิริยา PCR ครั้งที่สอง (selcetive amplification) นำผลผลิต PCR product ที่ได้จากครั้งที่หนึ่ง นำมาทำเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและใช้เป็น template โดยนำ DNA template 5 ไมโครลิตร มาเติม reaction mix 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 5 ไมโครลิตร dNTP mix (1mM) 10 ไมโครลิตร primer *Eco*RI (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) และ primer *Mse*I (75 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 unit) 0.2 ไมโครลิตร โดยในปฏิกิริยา PCR ครั้งที่สอง จะใช้ primer 4 คู่ ซึ่งมีลำดับเบสเหมือน primer คู่แรกที่ใช้ใน PCR ครั้งที่ 1 แต่มีความยาวเพิ่มขึ้น 1-2

ตารางที่ 5 ลำดับ nucleotide ของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

primer	ลำดับการเรียงตัวของ nucleotide
PCR ครั้งที่หนึ่ง	
*Eco*RI-A/*Mse*I-C	***Eco*RI primer** 5'- GACTGCGTACC AATTC A-3'
	***Mse* I primer** 5'- GATGAGTCCTGAG TAA C-3'
PCR ครั้งที่สอง	
*Ece*RI-A/*Mes*I-CAG	***Eco*RI primer** 5'-GACTGCGTACC AATTC A-3'
	***Mse*I primer** 5'-GATGAGTCCTGAG TAA CAG-3'
*Eco*RI-A/*Mes*I-CAC	***Eco*RI primer** 5'-GACTGCGTACC AATTC A-3'
	***Mse*I primer** 5'-GATGAGTCCTGAG TAA CAC-3'
*Eco*RI-A/*Mes*I-CAT	***Eco*RI primer** 5'-GACTGCGTACC AATTC A-3'
	***Mse*I primer** 5'-GATGAGTCCTGAG TAA CAT-3'
*Eco*RI-AC/*Mes*I-C	***Eco*RI primer** 5'-GACTGCGTACC AATTC AC-3'
	***Mse*I primer** 5'-GATGAGTCCTGAG TAA C-3'

เบส คือ *Eco*RI-A/*Mes*I-CAG, *Eco*RI-A/*Mes*I-CAC, *Eco*RI-A/*Mes*I-CAT, *Eco*RI-AC/*Mes*I-C โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิ ในรอบที่1 ดังนี้

denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

polymerizing ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

จากนั้นปรับให้ annealing temperature ลดลง 1 องศาเซลเซียสในทุกๆ รอบจนอุณหภูมิลดลง เหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วทำต่ออีก 25 รอบ (Vos และคณะ, 1995) นำผลผลิต

จาก PCR ในครั้งที่สองไปตรวจสอบหาแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมสีดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Silver strain

3.3 Gel electrophoresis

3.3.1 การเตรียมกระจก

เช็ดทำความสะอาดกระจกที่ใช้เตรียมเจล โดยใช้กระจก 2 แผ่นประกบกัน (กระจกแผ่นหนึ่งจะมีขนาดเล็กกว่าอีกแผ่นหนึ่ง) จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้ง เตรียมกระจกแผ่นเล็กโดยใช้ 95 % alcohol เช็ดทั่วกระจก 3 ครั้ง จากนั้นใส่ clear view เช็ดด้วยกระดาษคิมไวท์ให้ทั่ว เตรียมกระจกแผ่นใหญ่โดยใช้ 95 % alcohol เช็ดให้ทั่ว จากนั้นเช็ดด้วย Bind Saline 2 ครั้ง ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้กระดาษคิมไวท์ และเช็ดด้วย 95 % alcohol วางกระจกทั้งสองแผ่นใช้ spacer หนา 0.3 มิลลิเมตร กั้นด้านข้างทั้งสองด้าน ใช้ที่หนีบกระดาษ หนีบด้านข้างไว้ทั้งสองด้าน เพื่อรอการเทเจลต่อไป

3.3.2 การเตรียมเจล

ตวง 4.5 % acrylamide 50 มิลลิลิตร เทลงในขวดสำหรับผสมเจล เติม 10% ammonium persulphate (APS) 300 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม TEMED 100 มิลลิลิตรเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเทลงในกระจากที่เตรียมไว้ โดยค่อยๆ เทให้เจลเข้าไปในกระจกอย่าให้ขาดตอน ถ้าเจลไหลลงไม่เท่ากันค่อยๆ ใช้มือเคาะกระจกเพื่อให้เจลไหลลงมาพร้อมกันจนเจลไหลไปถึงด้านล่างของกระจก เสียบหวีใส่ด้านบนของกระจก โดยใช้ด้านเรียบเสียบลงไป ใช้ตัวหนีบหนีบกระจกทั้งด้านบนและล่าง ทิ้งไว้ให้แข็งตัว ประมาณ 2 ชั่วโมง

3.3.3 การ run gel (electrophoresis)

นำกระจกที่เตรียมไว้มาประกอบลงบนเครื่อง Sequencing gel electrophoresis (giBco BRL Sequencing System) เติม 1X TBE buffer ต่อขั้วไฟฟ้าและเปิดสวิตซ์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) ปรับ main adjust จาก 0 (ต่ำสุด) ไปที่ 50 ใช้ current rang 0-150 MA ปรับ mode constant ไปที่ power ใช้กระแสไฟ 0-2500 V. pre-run เป็นเวลา 30 นาที เพื่อไล่สารที่ไม่ต้องการออกไป (pre-run) ปิดเครื่องเมื่อครบกำหนดเวลา จากนั้นนำ PCR product มาเติม formamide loding buffer 10 ไมโครลิตร นำไป denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 3 นาที จากนั้นมา load ลงบนกระจก โดยใช้ 100 bp. marker เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ใช้กำลังไฟ 45 วัตต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วย sliver staining

3.4 Silver staining

นำเจลที่ติดอยู่กับกระจกใหญ่มแช่ใน 10% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ย้อมสีด้วย silver staining เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที โดยนำมาล้างผ่านน้ำ 1 ครั้ง แล้วเติม developer 1 ลิตร เขย่าจนกระทั่งปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid และล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 2 นาที โดยเขย่าบน rotary shaker ทุกขั้นตอน

4. วิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน AFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy system (NTSYS) version 2.0 เปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (similarity for qualitative data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group method by arithmatic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม SAHN (sequential, agglomerative, hierachical and nested clustering method) และวิเคราะห์ค่า Bootstrap (1000 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

5. สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยาในระดับโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการ Endocrinology ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. ห้องปฏิบัติการเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม