ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200 g.
Dextrose	20 g.
Agar	17 g.

2. Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato	200 g.
Dextrose	20 g.
Water	1 litre.

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. 2X CTAB

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

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 g.
bisacrylamide	4 g.

ละลายโดยปั่นบน hot plate แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 ml. นำใส่ขวดสีชาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม denaturing 4.5% polyacrylamide gel

4.5% polyacrylamide stock	5.625 ml.
10X TBE	5 ml.
Urea	21 g.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	50 ml.
10% Ammonium persulfate	300 ul.
TEMED	100 ul.

14. Silver staining

$AgNO_3$	1 g.
dH_2O	1 litre
Formaldehyde	1.5 ml.

15. Developer

Sodium carbonate	30 g.
Sodium thiosulphate	0.01 g
Formaldehyde	1.5 ml.

16. Sequencing dye

98% formaldehyde

10 mM EDTA (pH=8.0)

0.3% xylene f.f.

0.3%

bromephenol blue

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูล AFLP จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วย primers ER-A/MS-CAC

code	ER-A/MS-CAC																																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
F1	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	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F2	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	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F3	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F4	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F5	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
F6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
F7	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
F8	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
F9	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
F10	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F11	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
F12	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
F13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
F14	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
F15	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F16	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	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F17	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางภาคผนวกที่ 2 ข้อมูล AFLP จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วย primers ER-A/MS-CAG

code	ER-A/MS-CAG																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
F1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
F2	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
F3	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
F5	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F6	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F7	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F8	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F9	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
F10	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
F11	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
F12	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
F14	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
F15	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
F17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1

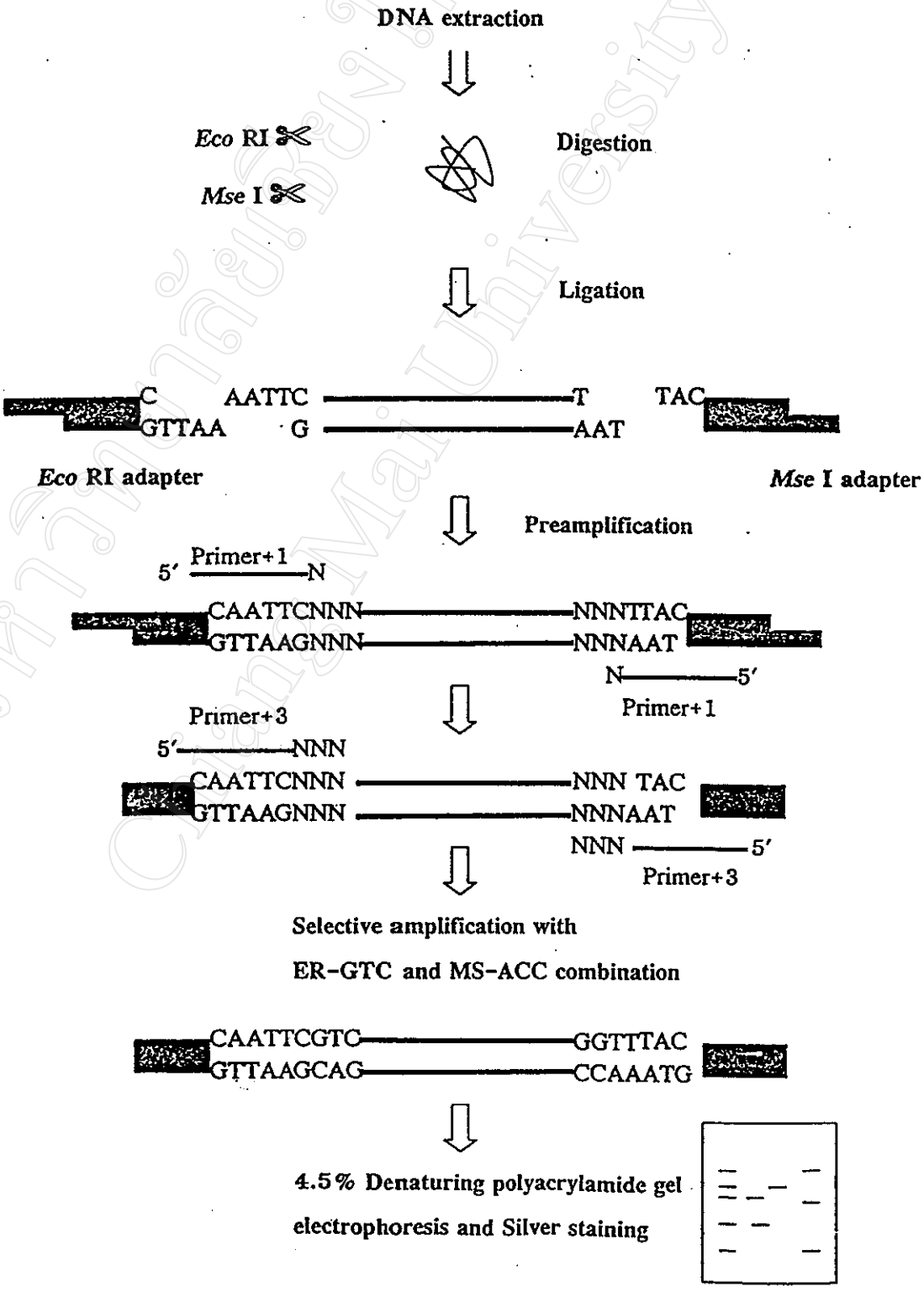
ตารางภาคผนวกที่ 3 ข้อมูล AFLP จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วย primers ER-A/MS-CAT

code	ER-A/MS-CAT																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
F1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
F2	0	1	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	0	0	0	0	0	0	0
F3	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
F4	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
F5	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
F6	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	0	0
F7	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
F8	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
F9	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
F10	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
F11	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
F12	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
F13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
F14	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
F15	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
F16	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0

ตารางภาคผนวกที่ 4 ข้อมูล AFLP จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales ด้วย primers ER-AC/MS-C

code	ER-AC/MS-C																																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
F1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1
F2	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	0	0	0	0
F3	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
F4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
F5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F6	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	0	0	0	0
F7	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
F8	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F10	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F11	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F13	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F14	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F16	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
F17	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0

ภาพผนวกที่ 1 แผนภาพเทคนิค AFLP



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	จีรนันท์ ชัยวาฤทธิ์
วัน เดือน ปี เกิด	23 มีนาคม 2520
ประวัติการศึกษา	
- ระดับมัธยมต้น	โรงเรียนเรยีนาเซลีวิทยาลัย ปีการศึกษา 2534
- ระดับมัธยมปลาย	โรงเรียนปรินส์รอยแยลล์วิทยาลัย ปีการศึกษา 2537
- ปริญญาตรี	ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University