บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้

สำรวจและสุ่มเก็บใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ จากพื้นที่เพาะปลูก มันฝรั่งของเกษตรกรในเขต จ.เชียงใหม่ และตาก ระหว่างปี พ.ศ. 2549-2552 โดยเลือกเก็บเฉพาะกิ่งที่ใบเริ่มเป็นโรคใบไหม้ ซึ่งสังเกตเห็น sporangia และเส้นใยสีขาวของเชื้อ บริเวณใต้ท้องใบ จากนั้นทำการสุ่มเก็บ ตัวอย่างแปลงละ 10 จุด แต่ละจุดห่างกันอย่างน้อย 8-10 เมตร และนำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่เก็บได้ในแต่ละจุดจัดเก็บในถุงพลาสติกเพื่อนำไปทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อและการเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์จากมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้

การแยกเชื้อทำได้โดยการนำใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้มาวางบนกระดาษชื้นที่บรรจุในกล่องพลาสติก โดยจัดวางให้ด้านท้องใบหงายขึ้น (ภาพ 3ก.) แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (ภาพ 3ข.) ที่ อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลานาน 1 วัน เพื่อ กระตุ้นให้เชื้อสร้าง sporangia จากนั้นย้าย sporangia ที่สร้างขึ้นใหม่นี้ลงบนอาหาร Rye A ที่ผสมสารปฏิชีวนะ และทำการเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร Rye A ที่ผสมสารปฏิชีวนะอีก 3-4 ครั้ง จนได้เชื้อ ที่บริสุทธิ์จากนั้นย้ายเชื้อที่บริสุทธิ์นี้ไปเลี้ยงบนอาหาร Rye A ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3 การบ่มตัวอย่างใบมันฝรั่งที่เป็นโรค เพื่อกระตุ้นให้เชื้อ *Phytophthora infestans* สร้าง sporangia

ก. ใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ที่นำไปกระตุ้นให้เชื้อสร้าง sporangia
ข. การบ่มใบมันฝรั่งที่เป็นโรคใบไหม้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การวิเคราะห์ mating type

การระบุ mating type ของเชื้อ *P. infestans* แต่ละไอโซเลทสามารถทำได้โดยการวางชิ้นอาหารที่มีการเจริญของเชื้อ (culture strip) แต่ละไอโซเลท ขนาด 0.5 x 5.0 เซนติเมตร บนอาหาร Rye A โดยวางห่าง 2 เซนติเมตร ขนานกับเชื้อมาตรฐาน mating type A1 คือ ไอโซเลท NM16F2 และ A2 คือ ไอโซเลท E13 (ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. Howard Judelson, Department of Plant pathology, University of California, CA, USA) หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมความชื้นที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 7 วัน จึงนำมาเช็คผล (ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำจะทำที่ต่างเวลากัน) การแปลผลมีดังนี้คือถ้าหากเชื้อที่แยกได้มี

- mating type A2 จะตรวจพบ oospores ตรงกลางระหว่างเชื้อที่แยกได้กับเชื้อมาตรฐานที่มี mating type A1 และจะตรวจพบ sporangia ตรงกลางระหว่างเชื้อที่แยกได้กับเชื้อมาตรฐานที่มี mating type A2
- mating type A1 จะตรวจพบ oospores ตรงกลางระหว่างเชื้อที่แยกได้กับเชื้อมาตรฐานที่มี mating type A2 และจะตรวจพบ sporangia ตรงกลางระหว่างเชื้อที่แยกได้กับเชื้อมาตรฐานที่มี mating type A1

4. ทดสอบความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl

นำเชื้อ *P.infestans* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้ มาทดสอบความความต้านทานต่อสารเคมี metalaxyl โดยการนำชิ้นอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rye A ที่ผสมสารเคมี metalaxyl ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 5 และ100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำ 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมความชื้นที่อุณภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลานาน 10 วัน บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

ต้านทาน (Resistant)	โคโลนีของเชื้อเจริญได้ดีที่ความเข้มข้น 5 และ100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)
ต้านทานปานกลาง (Intermediate)	โคโลนีของเชื้อเจริญได้ดีที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม) แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
อ่อนแอ (Sensitive)	โคโลนีของเชื้อเจริญได้ไม่ดีทั้ง 5 และ100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การวิเคราะห์ mitochondrial DNA (mtDNA) haphotypes

นำเชื้อ *P. infestans* ทั้งหมด 117 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมได้ในปี พ.ศ. 2552 จำนวน 21 ไอโซเลทและเก็บรวบรวมได้ในปี พ.ศ. 2549-2550 จำนวน 81 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร Rye A ที่คลุมด้วย polycarbonate membrane แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมความชื้น ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลานาน 10 วัน หลังจากนั้น เก็บเส้นใยของเชื้อโดยการขุดเอาเส้นใยของเชื้อออกจาก polycarbonate membrane แล้วนำไปทำการสกัด DNA ในขั้นตอนต่อไป

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยของเชื้อมาบดในโกร่งที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปเพื่อให้เส้นใยแข็งตัว จากนั้นจึงทำการบดเส้นใยให้ละเอียดจนกลายเป็นผง แล้วจึงย้ายลงในหลอดใส่สารขนาดเล็ก (eppendorf tube) หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในเอกสารที่แนบมากับชุด kit ของ Nucleospin (บริษัท MACHEREY-NAGEL Inc. PA 18042 จากประเทศสหรัฐอเมริกา)

5.2 การทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase chain reaction)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในไมโตครอนเดรียล (mtDNA) 2 บริเวณ คือ บริเวณส่วน P2 และ P4 โดยใช้ primer 2 คู่ ได้แก่ คู่ primer P2 และ P4 ตามลำดับ (Griffth and Shaw, 1998) โดยมีรายละเอียดดังนี้

คู่ primer P2 ประกอบด้วย	F2 (5'- TCCCTTTGTCCTCTACCGAT -3')
	R2 (5' - TTACGGCGGTTTAGCACATACA -3')
คู่ primer P4 ประกอบด้วย	F4 (5' - TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT -3')
	R4 (5'- CCGATACCGATACCAGCACCAA -3')

เตรียมสารละลายผสมปริมาตรรวม (reaction mix) 25 ไมโครลิตร สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คู่ primer P2 ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
(25 mM) $MgCl_2$	1.4	2.75 mM
(10X) PCR buffer	2.5	1X
(1 mM) dNTP's	0.5	200 μM
(5 μM) forward Primer	0.08	0.325 μM
(5 μM) reverse Primer	0.08	0.325 μM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(5U/μl) Taq DNA polymerase		0.2	1 unit
(10 mg/ml) BSA		0.4	160 μg/ml
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	18.84		-
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1		-

เตรียมสารละลายผสมปริมาตรรวม (reaction mix) 25 ไมโครลิตร สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คู่ primer P4 ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
(25 mM) $MgCl_2$	1.4	2.75 mM
(10X) PCR buffer	2.5	1X
(1 mM) dNTP's	0.5	200 μM
(5 μM) forward Primer	0.08	0.325 μM
(5 μM) reverse Primer	0.08	0.325 μM
(5U/μl) Taq DNA polymerase	0.2	1 unit
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	19.24	-
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	-

จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำมาทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Griffth and Shaw, 1998) (ใช้เครื่อง Perkin elmer GeneAmp® PCR System 2400)

- ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ คู่ primer P2

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วินาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 40 วินาที	จำนวน 40 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วินาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 นาท	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ คู่ primer P4

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วินาที	
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 40 วินาที	จำนวน 40 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วินาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 นาที	

5.3 การย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restrition enzyme digestion)

นำผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II และ *Eco*RI โดยนำผลผลิต PCR ในส่วนของ P2 มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Hpa*II ซึ่งจะจำแนก mtDNA haphotype ในกลุ่ม Ia ออกจาก IIa หรือ Ib ออกจาก IIb ส่วนผลผลิต PCR ในส่วนของ P4 จะย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI ซึ่งจะจำแนก mtDNA haphotype ในกลุ่ม I กับ II ออกจากกัน

เตรียมสารละลายผสมปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร สำหรับการย่อยด้วย เอ็นไซม์ *Hpa*II

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
(10U/μl) Restriction enzyme (*Hpa*II)	0.5	5 unit
(10X) Restriction buffer	2	1X
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	7.5	-
PCR product P2	10	

เตรียมสารละลายผสมปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร สำหรับการย่อยด้วย เอ็นไซม์ *Eco*RI

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
(50U/μl) Restriction enzyme (*Eco*RI)	0.02	5 unit
(10X) Restriction buffer	2	1X
(100X) BSA	0.2	1X
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	7.78	-
PCR product P2	10	

จากนั้นผสมให้เข้ากันในหลอดใส่สารขนาดเล็ก แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจหาผลผลิตที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction products) โดยนำ restriction products 20 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye 3 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 2% agarose gel electrophoresis ใน 1 X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลท์ เป็นระยะเวลานาน 60 นาที จากนั้นจึงตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้ แสงอัลตราไวโอเลตแล้วบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved