บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จำนวน 15 formae speciales สำหรับ *F. moniloforme* และ *F.solani* นั้น นำมาใช้เป็น outer group ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในการทดลองนี้ เชื้อราทั้งหมดเป็น stock culture ซึ่งผ่านการทำ single spore isolation ได้รับมาจากมหาวิทยาลัยคินกิ ประเทศญี่ปุ่น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 Formae speciales ต่างๆ ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* ที่ใช้ในการทดลอง

Pathogen	Host plant	Family
Fusarium oxyoporum f.sp. *adzukicola*	ถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis*)	Fabaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *apii*	ขึ้นฉ่าย (*Apium graveolens*)	Apiaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *asparagi*	หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*)	Liliaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *cepae*	หอมใหญ่ (*Allium cepa*)	Liliaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *conglutinans*	กระหล่ำปลี (*Brassica oleracea*)	Brassicaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *cucumerinum*	แตงกวา (*Cucumis sativus*)	Cucurbitaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *fragariae*	สตรอเบอรี่ (*Fragaria chiloensis*)	Rosaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *lagenariae*	น้ำเต้า (*Lagenaria siceraria*)	Cucurbitaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *lini*	Flax (*Linum usititatissimum*)	Linaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *luffae*	บวบ (*Luffa acutangula*)	Cucurbitaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *melonis*	แตงแคนตาลูป (*Cucumis melo*)	Cucurbitaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *narcissi*	Daffodil (*Narcissus* sp.)	Liliaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *pini*	Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*)	Pinaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *phaseoli*	ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris.*)	Fabaceae
Fusarium oxyoporum f.sp. *vasinfectum*	ฝ้าย (*Gossypium hirsutum*)	Malvaceae
Outer group		
Fusarium moniliforme	ข้าว (*Oryza sativa*)	Poaceae
Fusarium solani	มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*)	Solanaceae

1. สัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales

1.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA

นำเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีไปวางตรงกลางจานอาหาร PDA แต่ละการทดลองทำ 10 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดการเจริญเติบโตทุกวัน จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบอัตราการเจริญเฉลี่ยต่อวันของเชื้อทั้ง 15 formae speciales จากนั้นทำการบันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อทั้ง 15 formae speciales

1.2 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ทั้ง 15 formae speciales จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จึงนำไปทำ slide culture บ่มไว้เป็นเวลา 3-5 วัน โดยนำไปวางภายใต้แสง NUV (near ultraviolet) เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้าง macroconidia จากนั้นนำไปย้อมด้วยสี cotton blue ตรวจสอบลักษณะ mycelium, conidia และ conidiophore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งวัดขนาดโดยใช้ ocular และ stage micrometer ที่กำลังขยาย 100 เท่า แต่ละ forma specialis ทำการวัด 50 ซ้ำ

2. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 15 formae speciales

2.1 การเตรียมเส้นใยบริสุทธิ์

นำเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ทั้ง 15 formae speciales จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเส้นใยของเชื้อรานำไปเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แต่ละ forma specialis ทำ 5 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นรวบรวมเส้นใยโดยใช้ buncher funnel และ vacuum pump โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เส้นใยที่รวบรวมได้สามารถนำไปสกัด DNA ได้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปสกัด DNA ในขั้นต่อไป

2.2 การสกัด DNA จากเส้นใยของเชื้อรา

การสกัด DNA ในการทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Rogers และ Bendich (1988) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักเส้นใยที่ได้จากวิธีการข้างต้น ประมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดเป็นผงในโกร่งที่แช่เย็นจัดด้วย liquid N_2
2. เมื่อผงเชื้อราเริ่มละลายจึงเติม 2 X CTAB buffer 10 vol. จากนั้นนำถ่ายตัวอย่างเชื้อราดังกล่าวลงใน microfuge tube นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. เติม chloroform/iso-amyl alcohol (24:1) ในสัดส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รวบรวมของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 10% CTAB 0.1 vol. นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. เติม chloroform/iso-amyl alcohol (24:1) ในสัดส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รวบรวมของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol (-20 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากัน
7. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส DNA จะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด เทของเหลวส่วนบนทิ้ง และทำการล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethylalcohol (-20 องศาเซลเซียส)
8. นำเข้าเครื่อง centrifuge หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที DNA จะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด เทของเหลวส่วนบนทิ้งและนำหลอดไปคว่ำบนกระดาษทิชชู ทิ้งให้ตะกอนแห้ง
9. เติม TE buffer 0.1 ml.เพื่อละลายตะกอน หากตะกอนไม่ละลายหรือละลายยากให้นำไปอุ่นที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophresis

2.3.1 การเตรียม Agarose Gel

เตรียม Agarose ความเข้มข้น 1.0% ใน Tris-acetate / EDTA electrophoresis buffer (TAE buffer) โดยชั่งผง Agarose 0.5 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติม TAE buffer 50 มิลลิลิตร นำไปอุ่นใน microwave เพื่อให้ Agarose ละลายเข้ากับ TAE buffer ตั้งทิ้งไว้จนเย็นจึงเทลงในแม่พิมพ์ เสียบหวีลงใน Agarose Gel เพื่อให้เกิดเป็นหลุมเล็กๆ (well) ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีออก

2.3.2 การ run Agarose Gel Electrophoresis

เท TAE buffer ลงในถาดสำหรับ Electrophoresis นำ gel จากวิธีข้างต้นวางลงในถาด จากนั้นผสม loading buffer กับสารละลาย DNA ตัวอย่างให้เข้ากัน แล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุม ปิดฝาถาดและเปิดสวิตช์ ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้แรงดันไฟฟ้า 50 โวลท์ เมื่อสีของ loading buffer เคลื่อนไปถึงปลายแผ่นเจล จึงปิดเครื่อง (เปรียบเทียบความเข้มข้นของ DNA กับ lambda DNA) นำแผ่น Agarose Gel ไปตรวจดูแถบ DNA โดยใช้ UV transilluminator

3. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP (แผนภาพเทคนิค AFLP แสดงไว้ในภาพผนวกที่ 1)

3.1 Restriction and Ligation of DNA

นำ DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร มาเติม reaction buffer 35 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ *Eco*RI (5 units) *Mse*I (5 units) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ 10X buffer แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม ligation buffer 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 5 pmole *Eco*RI adaptor, 20 pmole *Mse*I adaptor, T4 DNA ligase (1 unit), 1 mM ATP, 10X buffer A แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป สำหรับ adapter ที่ใช้ในการทดลองนี้มีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Eco RI adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC

CATCTGACGCATGGTTAA-5'

Mse I adapter 5'-GACGATGAGTCCTGAG

TACTCAGGACTCAT-5'

3.2 PCR reaction

ในการศึกษา AFLP นั้นจะทำ PCR 2 ครั้ง ครั้งแรก (pre-amplification) จะทำโดยการใช้ primer 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3' อยู่ 1 เบส คือ *Eco*RI-A / *Mse*I-C ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ โดย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที PCR product ที่ได้จะนำมาเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR ขั้นที่สอง (selective amplification) โดยการใช้ primer 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเหมือน primer คู่ที่ใช้ใน PCR ครั้งแรก แต่มีความยาวเพิ่มขึ้น 1-2 เบส คือ *Eco*RI-A / *Mse*I-CAG; *Eco*RI-A / *Mse*I-CAC; *Eco*RI-A / *Mse* I-CAT และ *Eco*RI-AC / *Mse*I-C ปฏิกิริยา PCR จะเริ่มต้นที่ 1 รอบของ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ polymerizing ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจะปรับให้ annealing temperature ลดลง 1 องศาเซลเซียส ในทุกๆ รอบจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วทำต่ออีก 25 รอบ สำหรับ primer ที่ใช้มีดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 คือ

Eco RI primer 5'-GACTGCGTACC AATTC A-3'

Mse I primer 5'-GATGAGTCCTGAG TAA CAC-3'

ชุดที่ 2 คือ

Eco RI primer 5'-GACTGCGTACC AATTC A-3'

Mse I primer 5'-GATGAGTCCTGAG TAA CAG-3'

ชุดที่ 3 คือ

Eco RI primer 5'-GACTGCGTACC AATTC A-3'

Mse I primer 5'-GATGAGTCCTGAG TAA CAT-3'

ชุดที่ 4 คือ

Eco RI primer 5'-GACTGCGTACC AATTC AC-3'

Mse I primer 5'-GATGAGTCCTGAG TAA C-3'

3.3 Gel electrophoresis

นำ PCR product มาเติม formamide loading buffer 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 98% formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1% bromophenol blue และ 0.1% xylene cyanol แล้วนำไป denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาตรวจผลโดยนำไปทำ electrophoresis บน 4.5% denaturing polyacrylamide gel ที่ 45 วัตต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมสีด้วยวิธี silver staining

3.4 Silver staining

นำ gel มา fix ด้วย 10% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำมาย้อมด้วย silver ($AgNO_3$ 1 กรัม ; formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 1 ลิตร) ล้างผ่านน้ำ 1 ครั้ง แล้วนำมาเติม developer 1 ลิตร (sodium carbonate 30 กรัม ; sodium thiosulphate 0.01 กรัม ; formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 1 ลิตร) จนกระทั่งแถบ DNA ปรากฏ หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid และ ล้างด้วยน้ำ 2 นาที โดยเขย่าบน rotary shaker ทุกขั้นตอน

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ DNA ที่ปรากฏบน AFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละแถบ DNA (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบ DNA ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และ มีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบ DNA ที่ตำแหน่งนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy system (STSYS) version 2.0 (Rohlf,

1993) โดยเปลี่ยนเป็น 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)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University