บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ

เก็บรวบรวมพืชบางชนิดที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส จากในเขตจังหวัดเชียงใหม่ แล้วนำมาตรวจสอบเชื้อสาเหตุ อาจตรวจสอบโดยวิธี free hand section หรือหากมีกลุ่มของ conidia สีส้มขึ้นที่แผล สามารถเขี่ยมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะสังเกตเห็น setae ลักษณะคล้ายหนาม สีดำ มีผนังกั้น หรือ conidia เซลล์เดียว อาจมีรูปร่างแบบท่อนตรงสั้น หรือโค้งงอก็ได้

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

2.1 การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

การแยกเชื้อมี 2 วิธีการ โดยวิธีแรกเป็นการแยกเชื้อที่เกิดบนผิวใบ เริ่มจากตัดชิ้นพืชเป็นสี่เหลี่ยมขนาด 3x3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 1% sodium hypochlorite (10% Cholox) นาน 3-4 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 5 นาที ใช้กระดาษกรองซับชิ้นพืชให้แห้ง วางบนอาหาร PDA สำหรับวิธีที่สอง เป็นการแยกเชื้อบนผล โดยนำผลที่เป็นโรคมาบ่มไว้ภายในกล่องที่เพิ่มความชื้น (moist chamber) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3-5 วัน จนเกิด mass ลักษณะเป็นหยดสีส้มขึ้นบนแผล จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้จากทั้งสองวิธี มาทำการแยกให้ได้สปอร์เดี่ยว (single spore isolation) โดยใช้ loop ฆ่าเชื้อ แตะ mass แล้ว streak plate ลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) เมื่อเส้นใยเจริญตัดปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เพื่อนำเชื้อไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

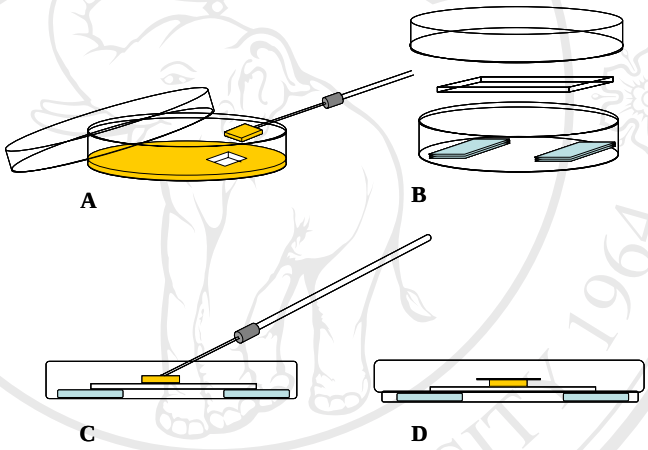
2.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี

ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้ (จากขั้นตอนที่ 1) วางลงบนอาหาร PDA จำนวน 5 ซ้ำ บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อทุก 3, 5 และ 7 วัน โดยบันทึกทั้งในแกน x และแกน y แล้วหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของเชื้อ และทำการบันทึกภาพลักษณะโคโลนีของเชื้อรา นอกจากนี้เขี่ย acervulus มีลักษณะเป็นเม็ดสีดำขนาดเล็ก มาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจการสร้าง setae บนอาหาร PDA และตรวจสอบการสร้าง sclerotia ได้จากการพบเม็ดสีดำขนาดเท่าเม็ดผักกาดขึ้นอยู่บนโคโลนี (อาจใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ถึงจะมีการสร้าง sclerotia)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การวัดขนาดและรูปร่างของ conidia และ appressoria

การวัดขนาดและรูปร่างของ conidia และ appressoria โดยอาศัยเทคนิค slide culture เตรียมชุดอุปกรณ์โดยวางแผ่นสไลด์และ cover slide บนกระดาษชำระขนาดใหญ่ แบบเหนียว นำไปอบฆ่าเชื้อ จากนั้นเทอาหาร PDA ลงบนจานอาหารให้บางมากๆ (ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร) ตัดให้เป็นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร วางอาหารบนสไลด์ เขี่ยเส้นใยเชื้อราหรือกลุ่มโคนิเดีย (mass) ป้ายที่ขอบของอาหาร PDA ทั้ง 4 ด้าน ปิดทับด้วย cover slide (ภาพ 3) แล้วฉีดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงบนกระดาษชำระเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน นำแผ่น cover slide มาย้อมด้วย phenol cotton blue ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มเลือก conidia และ appressoria อย่างละ 30 อัน (ใช้กำลังขยาย 1000 เท่า) บันทึกขนาดและรูปร่าง



ภาพ 3 วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ slide culture

3. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

3.1 การเตรียมเส้นใยเชื้อรา

ตัดส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วยหลอดพลาสติกฆ่าเชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร) วางเชื้อจำนวน 3-5 ชิ้นในอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน เส้นใยจะขึ้นเป็นแผ่นลอยอยู่ที่ผิวอาหารเหลว จากนั้นกรองเส้นใยผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-5 ครั้งหรือจนกว่าเส้นใยจะสะอาด แล้วใช้กระดาษชำระแผ่นใหญ่ (แบบเหนียว) ที่อบฆ่าเชื้อแล้วซับน้ำออกจากเส้นใยให้หมด ฉีกเส้นใยให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยคีมคีบ (forcep) ลนไฟฆ่าเชื้อ บรรจุเส้นใยนั้นใส่ไว้ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ให้ได้ประมาณ 2/3 ของหลอด แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม

เลือกวิธีการสกัดดีเอ็นเอจาก 6 วิธี ดังนี้

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Goodwin *et al.* (1992)

บดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่ง แล้วตักผงละเอียดที่บดได้ 30-35 มิลลิกรัม ใส่ Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดูด extraction buffer (ภาคผนวก) 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงไป กลับหลอดไปมา ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม 5M potassium acetate 333 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในเกล็ดน้ำแข็งอีก 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ Eppendorf tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol 1 เท่า ลงไปเพื่อตกตะกอน กลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดไปเก็บที่ 4องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทสารละลายส่วนใส (supernatant) ทิ้ง และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนอีกครั้งโดยเติม 3M sodium acetate 0.1 เท่า และ 100% ethanol 2 เท่าของปริมาตร กลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Roger and Bendich (1988)

ชั่งเส้นใยเชื้อราประมาณ 80-300 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่งที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปบดให้เป็นผงละเอียด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเริ่มละลาย เติม 2XCTAB buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 10 เท่า คนให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า แล้วปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดของเหลวใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol (เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 1 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่ด้านล่างหลอด ค่อยๆ เทของเหลวทิ้งไป (ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดไปกับของเหลว) ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol (เก็บใน -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 1 เท่า นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทของเหลวทิ้ง ตากตะกอนไว้ให้แห้ง แล้วเติม TE buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตร 1 เท่า เพื่อละลายตะกอน (ถ้าตะกอนละลายยากหลังจากเติม TE buffer แล้ว ให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนจะละลาย)

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของพัชรา (2543)

บดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ตักใส่ Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด เติม extraction buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม ice-cold absolute alcohol ปริมาตร 2 เท่า (แช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที) ลงไปตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 2-3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง และเติม TE buffer เพื่อละลายตะกอน

3.2.4 การสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย

ชั่งเส้นใย 100-200 มิลลิกรัม ของเส้นใย (อาจมี agar media ปนมา) บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว ตักเส้นใยที่บดแล้วใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 0.5M NaOH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 6 นาที ดูดของเหลวใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 100 mM Tris-HCl เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.5 การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Akira Masunaka

บดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลว ตักใส่ Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (ภาคผนวก) 1 มิลลิลิตร แล้ว Vortex จนผงเส้นใยกับ buffer เข้ากันดี บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม TE-saturated phenol ปริมาตร 1 เท่า กลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสบนใส่หลอดใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 100% chloroform ปริมาตร 1 เท่า กลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ใหม่ เติม 3M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่า และ 100% ethanol ปริมาตร 2.5 เท่า (ถ้าปริมาณของตัวอย่างเกิน 400 ไมโครลิตร ให้แบ่งเป็น 2 หลอด) กลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง (แต่ไม่ต้องแห้งมาก เพราะจะทำให้ตะกอนไม่ละลาย) จากนั้นเติม TE buffer 800 ไมโครลิตร(ถ้ามี 2 หลอด ให้เติมหลอดละ 400 ไมโครลิตร) เติม 2.5M NaCl ที่มี 20% PEG 8000 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา แล้ววางหลอดไว้ในน้ำแข็งประมาณ 1 ชั่วโมง หรือแช่ไว้ในตู้เย็นข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง เติม 70% ethanol 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทของเหลวทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง เติม TE buffer หรือน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100-200 ไมโครลิตร

3.2.6 การสกัดดีเอ็นเอด้วย Nuclospin Plant Kit

ชั่งเส้นใยมา 0.1-0.2 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลว ตักใส่ Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม C1 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้ว Vortex ให้เข้ากันดี เติม chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร Vortex อีก 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ บ่มไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม C4 buffer 300 ไมโครลิตร และ 100% ethanol 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา จากนั้นประกอบชุด kit ดูดของเหลวใส่ใน column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง เติม CW buffer 400 ไมโครลิตร ใน column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติม C5 buffer 700 ไมโครลิตร ใน column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติม C5 buffer อีก 200 ไมโครลิตร ใน column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วเติม CE elution buffer (อุ่นที่ 70 องศาเซลเซียส มาก่อน) 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เก็บไว้ที่ 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสในอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซนต์ โดยชั่ง อะกาโรส 1 กรัม เติม running buffer (1xTBE buffer) 100 มิลลิลิตร หลอมเจลให้ละลายด้วยไมโครเวฟ ค่อยๆ เทใส่ถาด ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงให้เจลแข็ง ค่อยๆ ดึงหวีออก แกะถาดเจลใส่ลงไปในเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส เท 1xTBE

buffer ลงไปพอท่วมเจล จากนั้นดูดดีเอ็นเอมาผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 2 : 1 หยอดลงไปใน well และเปรียบเทียบกับ 100 นาโนกรัมมาตรฐาน ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 10 นาที จึงปิดสวิทช์ นำเจลไปแช่ในเอทธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำอีก 20 นาที ส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGENE; Gene Genius Bio Imaging System) จากนั้นทำการลดความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้อยู่ในระดับ 10-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003) เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการนำไปทำ PCR ในการทดลองต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค ISSR

4.1 การคัดเลือกไพรเมอร์

คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็น microsatellite จำนวน 12 ไพรเมอร์ (ตาราง 1) โดยเป็นไพรเมอร์ที่สุ่มเลือก 5 ไพรเมอร์ (ลำดับที่ 1-5) และเป็นไพรเมอร์ที่มีรายงานมาก่อนอีก 7 ไพรเมอร์ (ลำดับที่ 6-12) โดยคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่จะเลือกใช้ต้องให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และสามารถบอกความเหมือนภายในกลุ่มและแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มออกมาได้

ตาราง 1 ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบ microsatellite ทั้งหมดที่นำมาคัดเลือก

ลำดับที่	ลำดับเบสย่อ	ลำดับเบส	อ้างอิง
1	$(GCC)_5$	5’-GCCGCCGCCGCCGCC-3’	-
2	$(CA)_8CT$	5’-CACACACACACACACACT-3’	-
3	$(CA)_8G$	5’-CACACACACACACACAG-3’	-
4	$(GGAT)_4$	5’-GGATGGATGGATGGAT-3’	-
5	$(GTG)_5$	5’-GTGGTGGTGGTGGTG-3’	-
6	$(GACA)_4$	5’-GACAGACAGACAGACA-3’	Weising *et al.*, 1989 Freeman and Shabi, 1996 Freeman *et al.*, 2000 Freeman *et al.*, 2001a Ureña-Padilla, 2002 Afanador-Kafuri *et al.*, 2003 Abang, 2006

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบ microsatellite ทั้งหมดที่นำมาคัดเลือก (ต่อ)

ลำดับที่	ลำดับเบสย่อ	ลำดับเบส	อ้างอิง
7	$(ACTG)_4$	5'-ACTGACTGACTGACTG-3'	Freeman and Rodriguez, 1995 Freeman *et al.*, 2000 Ureña-Padilla, 2002
8	$(CAG)_5$	5'-CAGCAGCAGCAGCAG-3'	Rodriguez and Yoder, 1991 Freeman and Shabi, 1996 Förster and Adaskaveg, 1999 Freeman *et al.*, 2000 Freeman *et al.*, 2001a Talhinhas *et al.*, 2002 Afanador-Kafuri *et al.*, 2003 Talhinhas *et al.*, 2005
9	$(GAC)_5$	5'-GACGACGACGACGAC-3'	Talhinhas *et al.*, 2005
10	$(GACAC)_3$	5'-GACACGACACGACAC GACACGACAC-3'	Gupta and Filner, 1991 Freeman *et al.*, 1993 Freeman and Shabi, 1996 Freeman *et al.*, 2000 Freeman *et al.*, 2001a Talhinhas *et al.*, 2002 Afanador-Kafuri *et al.*, 2003
11	$(TCC)_5$	5'-TCCTCCTCCTCCTCC-3'	Ureña-Padilla, 2002 Talhinhas *et al.*, 2002 Talhinhas *et al.*, 2005
12	$(TGTC)_4$	5'-TGTCTGTCTGTCTGTC-3'	Freeman *et al.*, 1993 Freeman and Rodriquez, 1995 Freeman and Shabi, 1996 Freeman *et al.*, 2000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR

ทำการผสมสารละลายต่างๆ ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของอรวรรณ (2547) แสดงใน ตาราง 2 โดยมีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100^{TM} thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA)

ตาราง 2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR

สารประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x PCR buffer	1x	1.0
10 mM dNTP	0.2 µM	0.2
500U *Taq* DNA Polymerase	5 unit/µL	0.1
50 mM MgCl2	2.5 mM	1.0
20 µM primer	1.0 µM	0.5
DNA template	10-100 ng	1.0
distilled water		6.2
ปริมาตรรวม		10

4.3 สภาวะในการทำ PCR

การทำ PCR ในครั้งนี้ เลือกใช้วิธีการ touchdown-PCR เริ่มจากการหาค่า Tm จาก GC content โดยนำผลรวมของเบส G และ C ในสายไพรเมอร์ หารด้วยจำนวนเบสทั้งหมดของไพรเมอร์ แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับจำนวนเบสทั้งหมดของไพรเมอร์ในตารางหาค่า Tm (ภาคผนวก) จะได้ค่า Tm ของขั้น annealing ออกมา

สำหรับสภาวะการทำ PCR เริ่มต้นขั้น initial denaturation โดยใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นขั้น denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที ต่อด้วยอุณหภูมิที่หาได้จากค่า GC content + 4 องศาเซลเซียส 1 นาที ในขั้น annealing และขั้น extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส อีก 1 นาที จากนั้นทำซ้ำตั้งแต่ขั้น denaturation จนถึงขั้น extension อีก 9 รอบ โดยลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 0.5 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิในรอบที่ 10 จะอยู่ที่อุณหภูมิที่หาได้จากค่า GC content – 1 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำในรอบนี้อีก 30 รอบ และในขั้น final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วคงสภาพดีเอ็นเอไว้โดยใช้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (ตาราง 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 สภาวะในการทำ PCR แบบ touchdown-PCR

รอบที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
	Initial denaturation	95	5	
1	Denaturation	95	1	1
	Annealing	Tm + 4	1	
	Extension	72	1	
2	Denaturation	95	1	1
	Annealing	(Tm + 4) – 0.5	1	
	Extension	72	1	
3	Denaturation	95	1	1
	Annealing	(Tm + 4) – 1	1	
	Extension	72	1	
4	↓	↓	↓	1
↓	↓	↓	↓	
10	Denaturation	95	1	30
	Annealing	Tm – 1	1	
	Extension	72	1	
	Final Extension	72	15	
	Hold	15	-	

4.4 การตรวจสอบผล PCR

ตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในอะกาโรส 1.5 เปอร์เซนต์ (ขนาด 10x15 เซนติเมตร) ซึ่งผสม ethidium bromide ลงไปในอัตราส่วน 7 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรเจล 100 มิลลิลิตร ใช้ running buffer เป็น 0.5x TBE buffer ผสม loading dye ลงไปในดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตรและใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb ladder (SibEnzyme, Russia) เพื่อเทียบขนาดดีเอ็นเอ โดยผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 3 : 1 จากนั้นต่อเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGENE; Gene Genius Bio Imaging System)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์ มาเปลี่ยนให้เป็นข้อมูลแบบ Binary matrix โดยตรงตำแหน่งใดมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นให้ค่าเป็น '1' ส่วนตำแหน่งใดไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นให้ค่าเป็น '0' จากนั้นหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยใช้ชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Phylip และสร้าง dendrogram เพื่อแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี Neighbour-joining

6. สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

6.1 ห้องปฏิบัติการงานวิจัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6.2 ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยาระดับโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5.3 ห้องปฏิบัติการกลาง โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

7. ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 ถึงเดือนสิงหาคม 2549

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved