ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) (Shimizu *et al*., 2000)

glucose	5.0	กรัม
soluble starch	5.0	กรัม
beef extract	1.0	กรัม
yeast extract	1.00	กรัม
NZ-case (enzyme hydrolyzed casein)	2.00	กรัม
NaCl	2.00	กรัม
$CaCO_3$	1.00	กรัม
agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน ที่อุณหภูมิ 121 ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. ISP medium 2 : Yeast extract-malt extract agar (Pridham *et al*., 1956-57)

yeast extract	4.00	กรัม
malt extract	10.00	กรัม
dextrose	4.00	กรัม
agar	20.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 7.3 จากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. Potato dextrose agar

glucose	20.00	กรัม
potato	300.00	กรัม
agar	15.00	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

4.1 TE (10:1) (100 มิลลิลิตร)

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	0.2	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน กับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 ºC

4.2 sucrose 10% (100 มิลลิลิตร)

ละลาย sucrose 10 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร และจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.3 SDS 10% (100 มิลลิลิตร)

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร และจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.4 5M Potassium acetate (100 มิลลิลิตร)

ละลายสาร potassium acetate 49.1 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 70 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4.5 70% ethanol (100 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย ethanol 70 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 ºC

4.6 100% isopropanol

เทสารละลาย isopropanol ใส่ขวดเก็บไว้ที่ 4 ºC

4.7 3M sodium acetate (100 มิลลิลิตร)

ละลาย sodium acetate 24.609 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer ปรับ pH เป็น 5.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (50 ไมโครลิตร)

10X PCR buffer	5	ไมโครลิตร
150 µM dNTPs mixture	3	ไมโครลิตร
F1 primer	2	ไมโครลิตร
R5 primer	2	ไมโครลิตร
2 mM $MgCl_2$	2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.2	ไมโครลิตร

ปริมาตรของ DNA template 2 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติม PCR buffer ในปริมาตรข้างต้น เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา RFLP (20 ไมโครลิตร)

ผลผลิตของ PCR	10	ไมโครลิตร
buffer	2	ไมโครลิตร
10X BSA	2	ไมโครลิตร
enzyme	1	ไมโครลิตร

นำสารเคมีในปริมาตรข้างต้นมาผสมให้เข้ากันจากนั้นปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 20 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ต่างๆ

7. สารเคมีสำหรับทำ electrophoresis gel

7.1 5X TBE

tris base	54.0	กรัม
boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8)	20.0	มิลลิลิตร

ละลาย tris base 54.0 กรัม กับ boric acid 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 800 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน เติม EDTA 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

7.2 Loading dye

deionized formamide	95%	
bromophenol blue	0.1%	
EDTA (pH 8)	10	มิลลิโมลาร์

ผสมสารทั้งสามเข้าด้วยกัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ºC

7.3 Ethidium bromide (EtBr) (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายสาร ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ใส่ในภาชนะทึบแสง หรือใช้แผ่น aluminium foil หุ้มภาชนะปิดให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC ในการเตรียมสารนี้ต้องใส่ถุงมือและระวังไม่หายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีส ที่ได้จากการวิเคราะห์ PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด

ไอโซเลท	เอนไซม์ตัดจำเพาะ		
	*Eco*RV	*Kpn*I	*Pst*I
Potato1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
Potato2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
CAU1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
CAU2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 1 0 0 0
CAU3	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
KAL1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
KAL2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
KAL3	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
KAL4	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
KAL5	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
KAL6	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
KAL7	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
KAL8	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
KAL-L1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
KAL-L2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
KAL-L3	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 0 1 0 0
CH-MUS1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
CH-MUS2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
CH-MUS3	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
CH-MUS4	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
CH-MUS5	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
IN-MUS1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
IN-MUS2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
IN-MUS3	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	เอนไซม์ตัดจำเพาะ		
	*Eco*RV	*Kpn*I	*Pst*I
IN-MUS4	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
IN-MUS5	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D3	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D4	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 1 0 0 0
PAI-D5	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D6	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D7	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 0 1 0 0
PAI-D8	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D9	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D10	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D11	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 1 0 0 0
PAI-D12	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D13	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D14	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D15	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D16	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D17	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D18	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D19	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D20	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D21	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D22	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D23	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 0 1 0 0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	เอนไซม์ตัดจำเพาะ		
	*Eco*RV	*Kpn*I	*Pst*I
PAI-D24	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D25	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D26	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D27	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D28	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D29	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0
PAI-D30	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D31	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-D32	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-L1	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-L2	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-L3	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1
PAI-L4	0 0 0 1 1 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 1 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ผลการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และเชื้อรา *Cercospora* sp. และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอคติโนมัยซีสทั้ง 60 ไอโซเลท ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดทั้ง 2 ไอโซเลท

ไอโซเลท	เชื้อราสาเหตุโรคพืช			
	Alternaria brassicicola		*Cercospora* sp.	
	อัตราการเจริญ	%การยับยั้ง	อัตราการเจริญ	%การยับยั้ง
KAL-L1	2.30	48.89	4.48	24.66
KAL-L2	1.35	70.00	4.08	31.46
KAL-L3	2.10	53.33	4.55	23.43
KAL1	2.15	52.22	-	-
KAL2	1.60	64.44	4.25	28.53
KAL3	2.05	54.45	3.68	38.16
KAL4	2.08	53.89	-	-
KAL5	1.88	58.33	-	-
KAL6	1.95	56.67	-	-
KAL7	1.78	60.55	-	-
KAL8	1.33	70.55	3.90	34.38
CAU1	1.30	71.11	3.75	36.76
CAU2	1.70	62.22	3.80	36.11
CAU3	1.68	62.77	3.50	41.16
PAI-L1	1.43	68.33	0.83	35.77
PAI-L2	1.65	63.33	0.93	28.00
PAI-L3	1.90	57.78	1.03	25.03
PAI-L4	1.95	56.67	0.97	26.13
PAI-D1	1.23	72.77	0.70	54.05
PAI-D2	1.65	63.33	1.28	17.92

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	เชื้อราสาเหตุโรคพืช			
	Alternaria brassicicola		*Cercospora* sp.	
	อัตราการเจริญ	%การยับยั้ง	อัตราการเจริญ	%การยับยั้ง
PAI-D3	1.70	62.22	0.75	50.98
PAI-D4	1.70	62.22	0.85	43.56
PAI-D5	1.45	67.78	0.75	50.98
PAI-D6	1.33	70.55	0.75	50.98
PAI-D7	1.60	64.44	1.00	33.93
PAI-D8	1.48	67.22	0.90	40.50
PAI-D9	1.50	66.67	0.85	44.85
PAI-D10	1.68	62.77	0.90	41.78
PAI-D11	1.83	59.44	1.00	34.36
PAI-D12	2.08	53.89	1.14	24.36
PAI-D13	1.60	64.44	1.15	24.73
PAI-D14	1.73	61.66	1.10	27.37
PAI-D15	2.03	55.00	1.11	27.80
PAI-D16	2.08	53.89	1.05	31.29
PAI-D17	1.95	56.67	1.11	27.80
PAI-D18	1.83	59.44	0.95	37.43
PAI-D19	2.08	53.89	1.00	34.36
PAI-D20	2.00	55.56	1.10	28.23
PAI-D21	1.68	65.55	0.90	41.42
PAI-D22	1.55	62.78	0.90	41.42
PAI-D23	1.40	65.56	0.85	43.56

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	เชื้อราสาเหตุโรคพืช			
	Alternaria brassicicola		*Cercospora* sp.	
	อัตราการเจริญ	%การยับยั้ง	อัตราการเจริญ	%การยับยั้ง
PAI-D24	1.78	68.89	0.90	40.92
PAI-D25	1.78	60.55	0.69	53.95
PAI-D26	1.88	58.33	0.70	54.00
PAI-D27	2.30	48.89	0.69	53.80
PAI-D28	2.25	50.00	1.08	27.88
PAI-D29	1.93	57.22	0.98	37.33
PAI-D30	2.25	50.00	1.00	34.06
PAI-D31	2.60	42.22	1.44	16.95
PAI-D32	2.28	49.44	1.48	16.02
IN-MUS1	2.02	72.12	0.95	28.05
IN-MUS2	2.24	68.87	0.78	42.14
IN-MUS3	2.34	67.50	1.03	26.18
IN-MUS4	2.12	70.50	1.11	20.81
IN-MUS5	5.40	24.78	1.05	21.62
CH-MUS1	0.98	70.86	0.70	46.15
CH-MUS2	1.18	67.41	0.97	25.22
CH-MUS3	1.08	70.11	0.83	37.02
CH-MUS4	1.03	70.49	0.93	28.17
CH-MUS5	4.85	36.33	1.17	16.93

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวไพลิน ถาใจ
วัน เดือน ปีเกิด	12 มิถุนายน 2525
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาจากชั้นประถมศึกษา จากโรงเรียนคำเที่ยงอนุสสรณ์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาจากชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนเทพบดินทร์วิทยา อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาจากชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนวชิรวิทย์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วิทยาศาสตรบัณฑิต) ปีการศึกษา 2547 จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	10/4 หมู่ 4 ต.สันกลาง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ 50130

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved