บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาโรค พื้นที่การปลูก และการใช้สารเคมีในสวนกุหลาบ

ศึกษาโรค ที่พบในพื้นที่ปลูกกุหลาบ และการใช้สารเคมี จากสวนกุหลาบบริเวณพื้นที่ราบ ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง และ อ. เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่ และบริเวณพื้นที่สูง ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

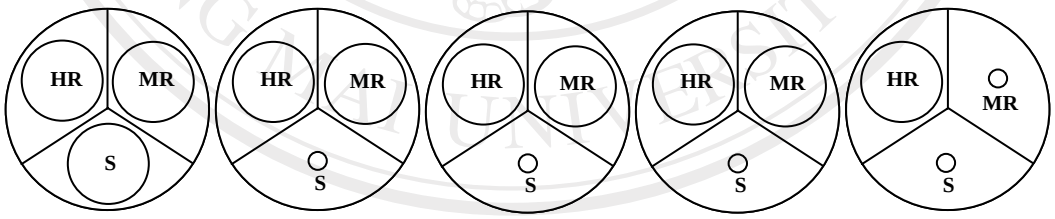
2. การศึกษาลักษณะอาการและแยกของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกุหลาบ

ศึกษากุหลาบที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสที่พบจากแปลงปลูกกุหลาบบริเวณพื้นที่ราบ ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง และ อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่ และพื้นที่สูง ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างโรคมาตรวจสอบที่ห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำมาตรวจหาเส้นใยและลักษณะสปอร์ของเชื้อราที่บริเวณแผลด้วยวิธี Free hand sectioning technique และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยตัดเอาส่วนของเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร มาฆ่าเชื้อที่ผิวใบโดยแช่ใน clorox 1% นาน 3-5 นาที จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นใบกุหลาบไปแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1-2 นาที ย้ายชิ้นพืชไปวางบนแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับชิ้นกุหลาบให้แห้ง ย้ายชิ้นพืชที่แห้งดีแล้วมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin (PALD) 200 mg/L โดยวางจานละ 1 แผลกำหนดให้เป็น 1 ไอโซเลท (isolate) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีเส้นใยของเชื้อรางอกออกจากชิ้นพืชบนอาหาร PDA บันทึกการเปลี่ยนแปลง และใช้เข็มเขี่ยปลายเส้นใยนำมาตรวจหาเชื้อรา โดยดูลักษณะต่างๆ ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) เพื่อวิเคราะห์ชนิดของเชื้อสาเหตุ จากนั้นใช้เข็ม เขี่ยปลายเส้นใยบริเวณโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากชิ้นส่วนของพืช นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7-14 วัน จนกระทั่งเชื้อราสร้าง mass จึงทำการแยกให้ได้สปอร์เดี่ยว (single spore isolation) โดยใช้ loop แตะที่ mass แล้วทำการ streak plate ลงบนอาหาร Quarter Potato Dextrose Agar (¼ PDA) เมื่อเส้นใยเจริญจึงตัดปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เพื่อทำการเก็บเชื้อบน slant ในหลอดทดลอง และนำไปใช้เป็น stock สำหรับการศึกษาด้านต่างๆ ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบความสามารถของสารคาร์เบนดาซิมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2. ทุกไอโซเลท จำนวน 93 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกุหลาบ กับสารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 ppm อัตราแนะนำคือ 500 ppm โดยเตรียมสารป้องกันกำจัดเชื้อราใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ จากนั้นนำสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด (ภาคผนวก) ไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ให้ได้ 6 จาน ทำจนครบทุกความเข้มข้น ใช้ cork borer ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อายุ 7 วัน นำไปวางบนจานอาหารที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่เตรียมไว้ โดยวางเชื้อรา 4 จุด จุดละ 1 ไอโซเลท บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน และกำหนดให้ เชื้อราที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm คือเชื้อราที่มีความต้านทานสูง (highly resistance; HR) ส่วนเชื้อราที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 1 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 ppm คือเชื้อราที่มีความต้านทานในระดับปานกลาง (moderately resistance; MR) และเชื้อราที่เจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ppm คือเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารเคมี (sensitive; S) (ภาพ 1) ทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สังเกตการเจริญของเส้นใยและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อที่อายุ 3 วัน



ภาพ 1 การทดสอบการต้านทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชคาร์เบนดาซิม

HR = Highly resistance isolate (เจริญได้ที่ความเข้มข้น > 100 ppm)

MR = Moderately resistance isolate (เจริญได้ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-100 ppm)

S = Sensitive isolate (เจริญได้ที่ความเข้มข้น < 1 ppm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

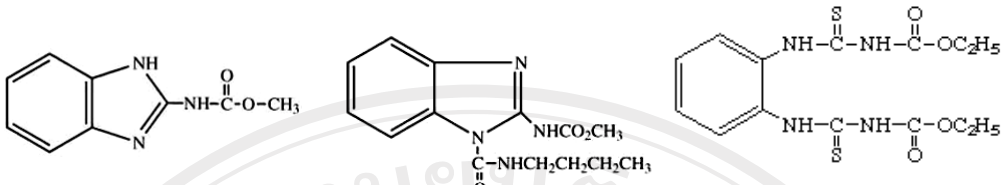
ทำการคัดเลือกตัวแทนของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จาก อ.สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ที่เก็บรวบรวมไว้ในข้อ 2. จำนวน 12 ไอโซเลท มาศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของสารเคมีในกลุ่มอื่นๆ เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยเริ่มจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญของเชื้อราที่อายุ 3, 5 และ 7 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีในลักษณะแกน X และ Y แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต ตรวจดูลักษณะของสี การสร้างเส้นใย และทำการบันทึกภาพลักษณะของโคโลนีที่อายุ 7 วัน จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของสปอร์และแอพเพรสซอเรียมโดยการเลี้ยงราแบบ slide culture บนอาหาร ¼ PDA ที่อายุ 7 วัน

5. การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มต่างๆ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

5.1 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มเบนซิมิดาโซลในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

ทำการทดสอบความสามารถของสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazlole) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยนำตัวแทนของเชื้อราที่ได้ทำการคัดเลือกไว้แล้วจากข้อ 4. มาทดสอบกับสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล ได้แก่สารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) สารบีโนมิล (benomyl) และสาร ไทโอฟาเนต เมทธิล (thiophanate methyl) (ภาพ 2) โดยสารกลุ่มเบนซิมิดาโซลจัดอยู่ในกลุ่มของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) เป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะจุด ซึ่งจะไปรบกวนขบวนการแบ่งเซลล์ของเชื้อรา และได้มีรายงานการเกิดความเสี่ยงสูงสำหรับการเกิดความต้านทานและการเกิดความต้านทานข้ามในสารเคมีกลุ่มนี้ (Damicone, http://www.osufacts.okstate.edu) การทดสอบสารเคมีที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 ppm อัตราแนะนำคือ 500 ppm โดยเตรียมสารป้องกันกำจัดเชื้อราใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ จากนั้นนำสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ที่อบฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 6 จาน ทำจนครบทุกความเข้มข้น ใช้ cork borer ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อายุ 7 วัน นำไปวางบนจานอาหารที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่เตรียมไว้ โดยวางเชื้อรา 4 จุด จุดละ 1 ไอโซเลท บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน (จำนวน 3 ซ้ำ) ทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อที่อายุ 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



carbendazim benomyl thiophanate methyl

ก **ข** **ค**

ภาพ 2 สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่มเบนซิมิดาโซล

ก. สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

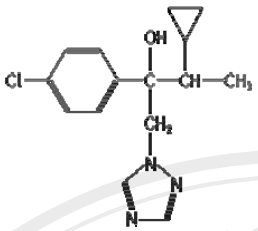
ข. สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราบีโนมิล

ค. สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราไทโอฟาเนต เมทธิล

5.2 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มไตรอะโซลในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

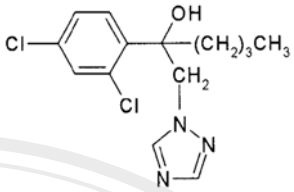
ทำการทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มไตรอะโซล (triazole) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยนำตัวแทนของเชื้อราจากข้อ 4. มาทดสอบกับสารไซโปรโคนาโซล (cyproconazole) (ภาพ 3ก) และสารเฮกซะโคนาโซล (hexaconazole) (ภาพ 3ข) โดยสารกลุ่มไตรอะโซลจัดอยู่ในกลุ่มของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) เป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะจุดซึ่งจะไปทำลายการสังเคราะห์ sterols ที่เป็นส่วนประกอบที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อรา และมีรายงานความเสี่ยงปานกลางในการเกิดความต้านทานและการเกิดการต้านทานข้ามในสารกลุ่มนี้ (Damicone, http://www.osufacts.okstate.edu) ทดสอบสารไซโปรโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10 และ 25 (อัตราแนะนำ 25 ppm) และเฮกซะโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 25 และ 50 ppm (อัตราแนะนำ 50 ppm) ทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อที่อายุ 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



cyproconazole

ก



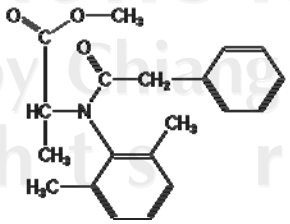
hexaconazole

ข

ภาพ 3 สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่มไตรอะโซล
ก. สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราไซโปรโคนาโซล
ข. สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราเฮกซะโคนาโซล

5.3 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มอะคริลามายด์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

ทำการทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มอะคริลามายด์ (acrylamind) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยนำตัวแทนของเชื้อราจากข้อ 4. มาทดสอบกับสารกลุ่มอะคริลามายด์ ได้แก่สารเบนาแล็กซิล (benalaxyl) (ภาพ 4) ซึ่งสารกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) โดยสารเคมีจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยจะไปรบกวนขบวนการสังเคราะห์ RNA ในเชื้อรา ซึ่งมีรายงานพบความเสี่ยงสูงในการเกิดความต้านทานและพบการเกิดการต้านทานข้ามในสารเคมีกลุ่มนี้ (Damicone,http://www.osufacts.okstate.edu)โดยได้ทำการทดสอบสารเบนาแล็กซิลที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 250 และ 500 ppm (อัตราแนะนำ 350 ppm) ทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อที่อายุ 3 วัน



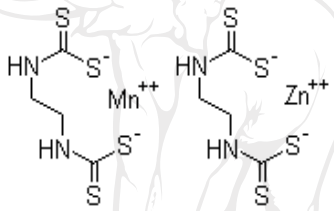
benalaxyl

ภาพ 4 สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนาแล็กซิล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มไดไทโอคาร์บาเมตในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

ทำการทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มไดไทโอคาร์บาเมต (dithiocarbamate) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยนำตัวแทนของเชื้อราจากข้อ 4. มาทดสอบกับสารกลุ่มไดไทโอคาร์บาเมต ได้แก่สารแมนโคเซ็บ (mancozeb) (ภาพ 5) ซึ่งสารกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดสัมผัส (contact fungicide) โดยสารเคมีจะมีฤทธิ์ยับยั้งหลายตำแหน่ง ซึ่งไม่พบรายงานความเสี่ยงของการต้านทานและไม่พบรายงานการเกิดความต้านทานข้ามกับสารเคมีกลุ่มนี้ (Damicone, http://www.osufacts.okstate.edu)โดยทำการทดสอบสารแมนโคเซ็บที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 500, 1000 และ 2000 ppm (อัตราแนะนำ 2000 ppm) ทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อที่อายุ 3 วัน



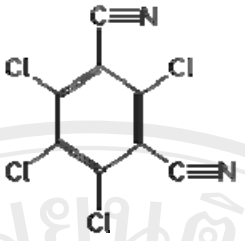
mancozeb

ภาพ 5 สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราแมนโคเซ็บ

5.5 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มฟาโลไนไตร์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

ทำการทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มฟาโลไนไตร์ (phthalonitrile) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยนำตัวแทนของเชื้อราจากข้อ 4. มาทดสอบกับสารกลุ่มฟาโลไนไตร์ ได้แก่สารคลอโรธาโรนิล (chlorohalonil) (ภาพ 6) ซึ่งสารกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดสัมผัส (contact fungicide) โดยสารเคมีจะมีฤทธิ์ยับยั้งหลายตำแหน่ง ซึ่งไม่พบรายงานความเสี่ยงของการต้านทานและการเกิดความต้านทานข้ามกับสารเคมีกลุ่มนี้เช่นกัน (Damicone, http://www.osufacts.okstate.edu) โดยทำการทดสอบสารคลอโรธาโรนิล ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 250, 500 และ 1000 ppm (อัตราแนะนำ 750 ppm) ทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อที่อายุ 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

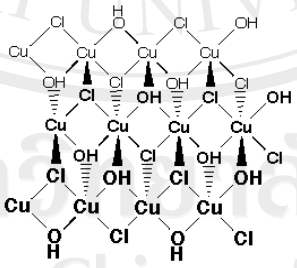


chlorothalonil

ภาพ 6 สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราคลอโรธาโรนิล

5.6 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มอินออร์แกนิคในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

ทำการทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มอินออร์แกนิค (inorganic) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยนำตัวแทนของเชื้อราจากข้อ 4. มาทดสอบกับสารกลุ่มอินออร์แกนิค ได้แก่สารคอปเปอร์ ออกซีคลอไรด์ (copper oxychloride) (ภาพ 7) ซึ่งสารกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดสัมผัส (contact fungicide) โดยสารเคมีจะมีฤทธิ์ยับยั้งหลายตำแหน่งและไม่พบรายงานความเสี่ยงของการต้านทานและการเกิดการต้านทานข้ามกับสารกลุ่มนี้ (Damicone, http://www.osufacts.okstate.edu)โดยได้ทดสอบสารที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 1000, 2000 และ 3500 ppm (อัตราแนะนำ 3400 ppm) ทุกขั้นตอนทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สังเกตและเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อที่อายุ 3 วัน



copper oxychloride

ภาพ 7 สูตรโครงสร้างสารป้องกันกำจัดเชื้อราคอปเปอร์ ออกซีคลอไรด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับยีนของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่มีผลต่อการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนซิมิดาโซล

นำเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แสดงการต้านทานและอ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่มเบนซิมิดาโซล ซึ่งได้แก่ คาร์เบนดาซิม บีโนมิล และไทโอฟาเนต เมทธิล มาแยกสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาลักษณะพันธุกรรมของเชื้อราที่มีผลต่อการต้านทานสารเคมี

6.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา

6.1.1 การเตรียมเส้นใยของเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri disc) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB (malt extract broth) เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นเก็บรวมรวมเส้นใยเชื้อราโดยตักเอาเส้นใยของเชื้อรามาซับให้แห้งบนกระดาษทิชชู (tissue) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใช้ปากคีบ (forcep) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บรวบรวมเส้นใยเชื้อราใส่ในกระดาษ foil ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้เส้นใยมากพอสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ทันที หรืออาจเก็บเส้นใยที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส ได้นานจนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

6.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

6.1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอวิธีที่ 1 ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของพัชรา (2543)

ชั่งน้ำหนักของเส้นใยประมาณ 1.0 กรัม และนำไปใส่ในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที บดเส้นใยให้ละเอียด เติม extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 850 mM NaCl (pH 8.0), 100 mM EDTA, 1% SDS) (ภาคผนวก) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และถ่ายใส่หลอด centrifuge นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant)ใส่ลงในหลอดใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 1:1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ extract ด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 1:1 ส่วน และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (ขั้นตอนนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ และนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม ice-cold absolute alcohol (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่าง แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที และนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 70% ETOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เวลา 2 นาที (ขั้นตอนนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทของเหลวส่วนบนทิ้งและผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยการคว่ำหลอด centrifuge บนกระดาษทิชชู (tissue) เมื่อแห้งดีแล้วนำตะกอนดีเอ็นเอไปละลายใน TE buffer (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจสอบคุณภาพในขั้นต่อไป

6.1.2.2 การสกัดดีเอ็นเอวิธีที่ 2 ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของศรัญญา (2544)

ชั่งน้ำหนักของเส้นใยเชื้อราประมาณ 1.0 กรัม และนำไปใส่ในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที บดเส้นใยให้ละเอียด เติม buffer 2X CTAB (1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0) (ภาคผนวก) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและถ่ายใส่หลอด centrifuge นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1:1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติม 10% CTAB buffer ปริมาตร 1:1 ส่วน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1:1 ส่วน ผสมให้เข้ากันและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanal (อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 เท่า และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง และเติม 70% ETOH (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทของเหลวส่วนบนทิ้ง และผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยการคว่ำหลอด centrifuge บนกระดาษทิชชู (tissue) เมื่อแห้งดีแล้วนำตะกอนดีเอ็นเอไปละลายใน high salt TE buffer (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจสอบในขั้นต่อไป

6.1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel 1% โดยชั่ง agarose 0.3 กรัม ละลายให้เข้ากันกับ 1X TBE buffer (tris borate buffer) 30 มิลลิลิตร ลงในขวดที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปหลอมให้เข้ากันในไมโครเวฟ หลังจากนั้นรอให้เจล (gel) อุ่นพอมือจับได้ แล้วจึงเทเจลลงในถาดเจล (gel tray) ที่เตรียมไว้ เสียบหวี (comb) ที่มีจำนวนช่องตามต้องการลงไปในเจล เพื่อให้เกิดเป็นหลุมเล็ก (well)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รอจนเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง จากนั้นนำเจลที่ได้วางลงใน electrophoresis gel tank และเท 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ผสม loading buffer 1 ไมโครลิตร กับสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุม (well) ปิดฝาและเปิดสวิตซ์ electrophoresis gel tank ให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 20 นาที แล้วจึงปิดสวิตซ์ จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide 0.5-1 µg/ml ที่เตรียมไว้เป็นเวลาประมาณ 20 นาที และย้ายเจลมาล้างในน้ำสะอาดเป็นเวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบ ดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง beta-tubulin (TBU2) gene ด้วย forward primer CTBF (5'-TCCAAGATCCGTGAGG-3') โดยจะ prime ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,150 ถึง 1,165 และ reverse primer CTBR (5'-AAGAAGTGGAGACGGG-3') จะ prime ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1,475 ถึง 1,490 ของ beta-tubulin (TBU2) gene *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138) ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank (ภาคผนวก)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (dH_2O)	35	-
10 mM dNTPs (2.5 mM each)	5	0.25 mM
10X PCR buffer	5	1X
Primer CTBF (50 µM)	1	1 µM
Primer CTBR (50 µM)	1	1 µM
25 mM $MgCl_2$	1	0.5 mM
Tag DNA polymerase (5Unit/µl)	1	0.1 Unit
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	10-100 ng

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง programmable thermal controller, PTC-100™ (MJ Research) โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.	initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที	
2.	denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	จำนวน 40 รอบ
	annealing	ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
	extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
3.	final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที	

จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ด้วยเครื่อง electrophoresis gel tank โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide ที่เตรียมไว้เป็นเวลาประมาณ 20 นาที และย้ายเจลมาล้างในน้ำสะอาดเป็นเวลาประมาณ 5 นาที และนำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imaging System)

6.3 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

ทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ beta-tubulin (TBU2) gene จากผลผลิตของ PCR ข้างต้น โดยใช้ความเข้มข้นของ PCR product ในแต่ละตัวอย่างประมาณ 20 นาโนกรัมต่อ 25 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของ primer CTBF และ CTBR อย่างละ 3.2 ไมโครโมล ต่อ 1 ไมโครลิตร และใช้ ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit และอ่านด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

6.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลลำดับเบสของ beta-tubulin (TBU2) gene ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GeneBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA ด้วยโปรแกรม BLAST โดยเข้าไปที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank และเข้าไปในส่วนของ BLAST นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์วางลงไปในโปรแกรม เลือก nucleotide blast เลือก nucleotide collection (nr/nt) และทำการ sequence alignment โดยเลือกที่ BLAST ขั้นตอนนี้จะได้ข้อมูลสำหรับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ออกมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นทำการเลือกให้แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเลือก Reformat these Results เลือก CDS feature เลือก view report จะได้ข้อมูลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมกับการเปรียบเทียบกรดอะมิโนควบคู่กัน นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ORF Findrer (Open Reading Frame Finder) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) และนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโน ที่ทำการแปรรหัสได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GeneBank ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST ได้อีกเช่นกัน

7. สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

7.1 ห้องปฏิบัติการวิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

7.2 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษา และวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

8. ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือนสิงหาคม 2548 – กรกฎาคม 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved