อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเลี้ยงเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์

การเลี้ยงเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยแบ่งเป็น 3 ส่วน ตามระยะเวลาการเจริญของเชื้อ แบ่งเป็น การเจริญในระยะ teliospore, เส้นใย (mycelium) และ sporidia สำหรับใช้ในการทดลองในขั้นต่อ ๆ ไปโดยวิธีการดังนี้

1.1 การเตรียม teliospore

เก็บรวบรวม teliospore ของเชื้อรา *U. scitaminea* จากอ้อยที่เป็นโรคโดยการตัดส่วนของแส้ นำมาผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเคาะ teliospore ออก ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 mesh

1.2 การเตรียมเส้นใย

นำ teliospore ของเชื้อ *U. scitaminea* มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ อัตราส่วน 1 : 10 ใน ไมโครทิวป์ (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที โดยทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปทำ dilution plate บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ผสม streptomycin ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้น 3 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อไปบนอาหาร PDA ให้เชื้อเจริญเป็นเส้นใย

1.3 การเตรียม sporidia

เตรียม sporidia โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 2 สัปดาห์ ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ใน flask ขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่านาน 3 วัน นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ได้ sporidia นำไปใช้ต่อไป

2. <u>ศึกษาวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค</u>

2.1 พันธุ์อ้อยทดสอบ

ใช้อ้อยทดสอบ 4 พันธุ์ ที่มีลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคแส้ดำต่างกัน ได้แก่ อู่ทอง 1, H59-3775, K84-200 และกำแพงแสน 94-13 ขนาดท่อนพันธุ์ 1 ท่อนต่อ 1 ตา ทำการฆ่าเชื้อโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์โดยการจุ่มท่อนพันธุ์ในน้ำอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำท่อนพันธุ์ไปปลูกเชื้อตามกรรมวิธีการต่าง ๆ โดยในแต่ละกรรมวิธีทดสอบใช้ท่อนพันธุ์ 20 ท่อนต่อพันธุ์

2.2 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

ใช้เชื้อไอโซเลท NP-KPS 30 ที่เก็บจากแปลงทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในระยะการเจริญของ teliospore และ sporidia ที่แยกและเพิ่มปริมาณได้ดังวิธีการในข้อ 1.1 ถึง 1.3 โดยเตรียม spore suspension ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.3 วิธีการปลูกเชื้อสาเหตุ

ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

1. แช่ท่อนพันธุ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)

2. ทำแผลท่อนพันธุ์ด้วยการใช้เข็มปลายตรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทงบริเวณรอบตาอ้อย ความลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร จำนวน 5 แผล แล้วแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension ความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ทำแผลท่อนพันธุ์ด้วยการใช้เข็มปลายตรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทงบริเวณรอบตาอ้อย ความลึกประมาณ 2 มิลิเมตร จำนวน 5 แผล แล้วแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension ความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นบ่มไว้ใน moist chamber เป็นเวลา 1 คืน

4. ปลูกเชื้อด้วยการฉีด spore suspension ความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาในต้นอ้อยอายุ 2 สัปดาห์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตรวจสอบลักษณะอาการของต้นอ้อยในกรรมวิธีการปลูกเชื้อต่าง ๆ และตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยตรวจนับจำนวนต้นที่มีการสร้างแส้ดำหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน

3. <u>การตรวจสอบการเกิดโรคแส้ดำอ้อยด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)</u>

3.1 การตรวจสอบเชื้อในระยะการเจริญต่าง ๆ ด้วยเทคนิค PCR

3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา

นำส่วนของ teliospore, เส้นใย และ sporidia ที่สามารถเตรียมได้ดังวิธีการข้อ 1.1 ถึง 1.3 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Dnaeasy plant mini kit (Qiagen®) ซึ่งประกอบด้วย การบดส่วนของเชื้อด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นย้ายส่วนที่ได้ไปยังหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม AP1 buffer 400 ไมโครลิตร และ RNase A 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม AP2 buffer 130 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน QIAshredder Mini Spin Column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดไมโครทิวป์ เติม 1.5 เท่า AP3/E buffer ผสมเบา ๆ โดยการดูดขึ้นลงด้วยปิเปต จากนั้นนำใส่ใน DNeasy Mini Spin Column แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ย้าย DNeasy Mini Spin Column ใส่ใน collection tube และเติม AW buffer 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที จากนั้นเติม AW buffer 500 ไมโครลิตร ใน DNeasy Mini Spin Column อีกครั้ง นำหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ย้ายส่วนของ DNeasy Mini Spin Column ใส่ในไมโครทิวป์ ใหม่ เติม AE buffer (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ทำซ้ำโดยการเติม AE buffer (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ได้ดีเอ็นเอ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป

3.1.2 การทำปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้อ *U. scitaminea* ที่สกัดจาก teliospore, sporidia และเส้นใย มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *b*E4 (5'- CGCTCTGGTTCATCAACG -3') และไพรเมอร์ *b*E8 (5'- TGCTGTCGATGGAAGGTGT -3') (Albert and Schenck, 1996) โดยทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย DNA 5 ไมโครลิตร dNTPs 2 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase enzyme (5 unit/ไมโครลิตร) 0.15 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (2.5 มิลลิโมลาร์) 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (*b*E4 และ *b*E8) 1 ไมโครโมลาร์ 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จนได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร PCR program เริ่มต้นด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ นำผลผลิต PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย electrophoresis

3.1.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีการ electrophoresis

ใช้อะกาโรส 1 % ใน 1X TAE buffer (50 X TAE 1 ลิตร : Tris base 242 กรัม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ $Na_2EDTA.2H_2O$ 37.2 กรัม) กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 30-45 นาที ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.1.4 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบความไวของปฏิกริยาโดยการผสมดีเอ็นเอของอ้อยปกติ ความเข้มข้น 70 ng กับ ดีเอ็นเอของ sporidia ของเชื้อที่ความเข้มข้น 20 ng, 400 pg, 40 pg และ 4 pg เทียบกับดีเอ็นเอของ sporidia ของเชื้อ 40 ng ทำปฏิกิริยาโดยใช้ PCR program และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีการ electrophoresis ดังวิธีการในข้อ 3.1.2 และ 3.1.3

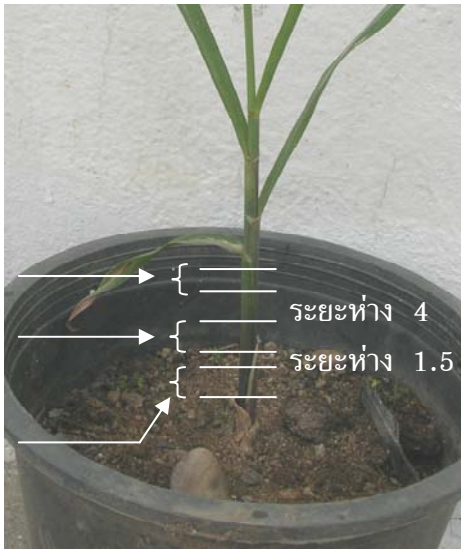
3.2 การตรวจสอบการเกิดโรคแส้ดำอ้อยในระยะเริ่มต้น

3.2.1 พันธุ์ทดสอบ

ใช้อ้อยทดสอบ 4 พันธุ์ ที่มีลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคแส้ดำแตกต่างกัน ได้แก่ อู่ทอง 1, H59-3775, K84-200 และกำแพงแสน 94-13 โดยนำท่อนพันธุ์ 1 ท่อนที่มี 1 ตา ทำการฆ่าเชื้อโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์โดยการแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปปลูกในถุงเพาะ เมื่ออ้อยมีอายุ 2 สัปดาห์ จึงนำไปปลูกเชื้อ

3.2.2 วิธีการปลูกเชื้อ

ทำการปลูกเชื้อโดยใช้เข็มฉีดยา ฉีด spore suspension ของ sporidia ไอโซเลท NP-KPS 30 ความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บริเวณโคนต้นอ้อยอายุ 2 สัปดาห์ โดยให้ห่างจากผิวดิน 3 เซนติเมตร หลังจากปลูกเชื้อ 1, 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน นำมาตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อด้วยเทคนิค PCR



<u>ภาพที่ 2</u> แสดงตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีด sporidia suspension และตำแหน่งที่นำมาตรวจสอบ

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอจากอ้อย

โดยดัดแปลงวิธีการจาก Edward *et al.* (1991) นำตัวอย่างพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อ คือ ตำแหน่งที่ 1 เหนือจุดที่ทำการปลูกเชื้อ ห่างจากจุดปลูกเชื้อ 4 เซนติเมตร ตำแหน่งที่ 2 บริเวณที่ทำการปลูกเชื้อ และตำแหน่งที่ 3 ล่างจุดที่ทำการปลูกเชื้อ ห่างจากจุดปลูกเชื้อ 1.5 เซนติเมตร แต่ละตำแหน่งที่นำมาทดสอบให้มีความยาว 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) โดยตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 0.5 กรัม บดในโกร่งโดยการเติมไนโตรเจนเหลว เพื่อให้ชิ้นพืชแข็งตัว ง่ายต่อการบด ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม extraction buffer (2% CTAB, 1.4 mM NaCl, 0.2 M EDTA, 100 mM Tris HCl pH 7.5) ปริมาตร 396 ไมโครลิตร และเติม ß- mercaptoethanol 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอด้วยการเติม chloroform : isoamyl alcohol ในอัตรา 24 : 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol (เย็น) ปริมาตร 0.6 เท่าของสารละลายส่วนบนที่ได้ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนโดยการเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 99.9 % ethanol (เย็น) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน TE buffer [1 ลิตร : 1 M Tris – HCl (pH 8.0) 10 มิลลิลิตร, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 2 มิลลิลิตร] ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4 การทำ PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย electrophoresis

ทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.1.2 และ 3.1.3

4. <u>การตรวจสอบการเกิดโรคแส้ดำอ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์</u>

นำตัวอย่างต้นอ้อยมาตรวจการเจริญของเชื้อด้วยการทำ free hand section โดยการทำ cross-section บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง เช่นเดียวกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR จากนั้นย้อมสี trypan blue โดยนำ 0.1% trypan blue และ 6% sodium hydroxide

อย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้สารเข้ากัน ตัดเนื้อเยื่อพืชในตำแหน่งต่าง ๆ ที่ต้องการตรวจสอบ ย้ายเนื้อเยื่อลงในหลอด ทิ้งไว้เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม 80% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ เท 80% ethanol ออก เติม lactophenol 500 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 2 นาที จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อลงบน slide โดยใช้ lactophenol เป็น mounting medium ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

5. <u>การศึกษาเชื้อรา *Ustilago scitaminea*</u>

5.1 การเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุของโรค

เก็บรวบรวม teliospore ของเชื้อรา *U. scitaminea* จากอ้อยที่เป็นโรค โดยการตัดส่วนของแส้ จากแหล่งปลูกอ้อยแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยที่มีการระบาดของโรคทั้งในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ นำมาผึ่งลมให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเคาะ teliospore ออก ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 mesh เพื่อนำเอาส่วนเศษพืชออก เก็บไว้ในขวดฝาเกลียวนำ ไปดูดความชื้นด้วยโถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิดฝาเกลียวให้แน่น พันด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.2 การศึกษาลักษณะของเชื้อรา *U. scitaminea*

5.2.1 การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดของ teliospore

นำ teliospore จากแต่ละแหล่งที่เก็บได้ในข้อ 4.1 มาเปรียบเทียบลักษณะและขนาดของสปอร์ โดยแตะสปอร์ลงบน slide ที่หยดด้วย lactophenol ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางด้วย ไมโครมิเตอร์ (micrometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า จำนวน 100 สปอร์ต่อไอโซเลท

5.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะโคโลนี

นำ teliospore ของเชื้อ *U. scitaminea* มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ อัตราส่วน 1 : 10 ในไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที โดยทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปทำ dilution plate บนอาหาร PDA ที่ผสม streptomycin ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้น 3 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ให้เชื้อเจริญเป็นเส้นใย ตรวจบันทึกลักษณะรูปร่าง สี และขนาดของโคโลนีเมื่อเชื้อมีอายุการเจริญ 28 วัน ทำการทดลอง 10 โคโลนีต่อไอโซเลท

5.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ electrophoresis

5.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา

นำส่วนของ sporidia ที่สามารถเตรียมได้ดังวิธีการข้อ 1.1 ถึง 1.3 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Dnaeasy plant mini kit (Qiagen®) ตามวิธีการในข้อ 3.1.1

5.3.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ electrophoresis

ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่นำมาศึกษาได้แก่ ดีเอ็นเอบริเวณที่ลำดับเบสของ variable number of tandom repeate (VNTR) และ internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งมีลำดับเบสไพรเมอร์ดังนี้

VNTR	5’- GGTGGCGGCTCT-3’
ITS (ITS1)	5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’
(ITS4)	5’- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’

เพิ่มขนาดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยการทำ PCR ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *U. scitaminea* ผสมกับ dNTPs 2.5 Mm, $MgCl_2$ 1

μM ของไพรเมอร์, 1X PCR buffer (Fermentas 10X buffer with KCl) และ 1 unit *Taq* DNA polymerase enzyme โดยมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร กำหนดอุณหภูมิในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ปฏิกิริยา		อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)		94	2
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)		94	0.40
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	VNTR	50	0.40
	ITS	55	0.40
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)		72	1.30
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)		72	10

ทำปฏิกิริยาขั้น 2-4 เป็นลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และ gel star 1 ไมโครลิตร แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 1 X TAE กระแสไฟ 50 โวลล์ต่อเซนติเมตร นาน 2 ชั่วโมง ตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

5.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน agarose gel บนตารางเมตริก โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอออกมาในรูปเปอร์เซ็นต์ similarity index ระหว่าง DNA pattern สร้างค่า Dendrogram ได้จากการคำนวณแบบ unweighted pair group method by arithmetic mean (UPGMA)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

ห้องปฏิบัติการ A411 อาคารศูนย์เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

งานวิจัยสภาวะแวดล้อม ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

โรงเรือนทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2547- กันยายน 2549