

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

● Potato Dextrose Agar (PDA)

ส่วนประกอบ

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมอาหาร

นำมันฝรั่งที่ปอกและหั่นแล้ว 200 กรัม ไปต้มในน้ำกรอง ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก แล้วกรองเอาแต่น้ำ ผสมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมในน้ำต้มมันฝรั่ง จากนั้นผสมวุ้น 15 กรัมในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนวุ้นสุก แล้วผสมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปใส่ขวดหรือ flask ปิดปากด้วยสำลีปิดทับอีกชั้นด้วยกระดาษมัตด้วยหนังยาง แล้วนำไป นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที

● Potato Dextrose Broth (PDB)

ส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเหมือนกับการเตรียม PDA แต่ไม่ต้องใส่วุ้น

● Rose Bengal Agar (RBA)

ส่วนประกอบ

Malt extract	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Rose bengal	0.033	กรัม
Chloramphenical	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมอาหาร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มจนกวนละลาย เทใส่ขวดอาหาร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที

- **การเตรียมอาหาร PDA ผสม culture filtrate**

ในการเตรียม PDA เพื่อให้ผสม culture filtrate จะใช้วิธีการลดน้ำที่ใช้เตรียม PDA เพื่อใช้น้ำจาก culture filtrate มาแทนที่น้ำใน PDA เช่น ให้ปริมาณ culture filtrate 50 มิลลิลิตร ก็จะใช้ น้ำในการเตรียม 1 ลิตร ให้เหลือเพียง 500 มิลลิลิตร โดยใช้ PDA แบบลดน้ำนี้มา 50 มิลลิลิตร เพื่อให้เตรียม PDA ผสม culture filtrate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ส่วนที่ 10 และ 30 มิลลิลิตร ก็เติมน้ำเพิ่มเข้าไปเพื่อให้ได้ PDA ผสม culture filtrate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สูตรการหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง คือ

$$\% \text{ ยับยั้งการเจริญเติบโต} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

ภาคผนวก ข
การทำ Slide culture และ สไลด์กึ่งถาวร

● **การทำ slide culture**

- เทอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร
- พอกอาหารแข็งตัว ใช้มีดโกนที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดอาหาร ให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร
- ใช้เข็มเย็บปิดเชื้อนำอาหารที่ตัดแล้ว ไปวางบนแผ่นสไลด์ที่วางบนแท่งแก้วรูปตัววีที่อบฆ่าเชื้อแล้วพร้อมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ใช้เข็มเย็บปิดเชื้อเย็บเส้นใยของเชื้อรามาตะที่ขึ้นอาหารบนสไลด์ ใช้ cover glass ที่เตรียมไว้พร้อมสไลด์ปิดทับบนอาหาร PDA
- ใช้สำลีชุบน้ำฆ่าเชื้อแล้วใส่ไว้จานละ 1 ก้อนเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วันแล้วแต่เชื้อ แล้วนำมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์

● **การทำสไลด์กึ่งถาวร**

1. ใช้ปากคีบจับแผ่นแก้วปิดสไลด์ออกจากชั้นอุ่น และค่อยๆ หยิบชั้นอุ่นทิ้งไป จะได้ตัวอย่างเชื้อรา 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่เจริญอยู่บนแผ่นแก้วปิดสไลด์และตัวอย่างที่เจริญบนแผ่นสไลด์
2. หยดเอทานอล 95% เพื่อกำจัดสปอร์ที่มากเกินไปบ้าง และเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเส้นใย แล้วเอียงทิ้งไป ชับเบาๆ ด้วยกระดาษทิชชูตรงมุมที่เอทานอลไหลออกมา ระวังอย่าให้เส้นใยเสียหาย
3. หยด lactophenol หรือ lactophenol cotton blue 1 หยดลงบริเวณที่มีเชื้ออยู่ ปิดทับด้วยแผ่นสไลด์แผ่นใหม่แล้วคว่ำด้านที่มีเชื้ออยู่ลงบนน้ำยา ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เช็ดน้ำยาส่วนเกินให้แห้ง โดยใช้กระดาษทิชชูซับเบาๆ
4. ใช้เข็มเย็บแผ่นแก้วปิดสไลด์ให้ตรง แล้วทาขอบๆแผ่นแก้วปิดสไลด์ ด้วยน้ำยาทาเล็บ ทิ้งให้แห้ง แล้วทาซ้ำอีกรอบ จะได้สไลด์กึ่งถาวรตามต้องการ

ภาคผนวก ค
พืชที่นำมาใช้ในการแยกเอนโดไฟท์

ข้อมูลเกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่ใช้ในการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539)

1. ข้ำพลู (ภาคผนวก ค ที่ 1)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper sarmentosum* Roxb.

วงศ์ (Family) PIPERACEAE

ชื่ออื่น นมวา ผักปุงา ผักพลูนก พลุลิง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

เป็นไม้ล้มลุก สูง 30-80 ซม. มีไหลงอกเป็นต้นใหม่ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปหัวใจ กว้าง 5-10 ซม. ยาว 7-15 ซม. ดอกช่อออกที่ซอกใบ รูปทรงกระบอก ดอกย่อยแยกเพศ ผลเป็นผลสด

สรรพคุณทางยา :

ตำรายาไทยใช้ทั้งต้นขับเสมหะ ใบเป็นยาขับลม การทดลองในสัตว์พบว่าสารสกัดทั้งต้นมีฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนไหวของลำไส้และคลายกล้ามเนื้อ

2. คาวตอง (ภาคผนวก ค ที่ 2)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Houttuynia cordata* Thunb.

วงศ์ (Family) SAURURACEAE

ชื่ออื่น ผักก้านตอง ผักเข้าตอง ผักพลูคาว ผักคาวทอง พลุแก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี สูง 15-31 ซม. ทั้งต้นมีกลิ่นคาว ลำต้นเลื้อยทอดตามผิวดิน แตกรากตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับรูปหัวใจกว้าง 4-6 ซม. ยาว 6-10 ซม. ก้านใบยาว ส่วนโคนแผ่เป็นกาบหุ้มลำต้น ดอกช่อ ออกตรงปลายยอด ไม่มีกลีบดอกและก้านดอก ผลเป็นผลแห้ง แตกได้

สรรพคุณทางยา :

ตำรายาไทยใช้ใบแก้กามโรค ทำให้น้ำเหลืองแห้ง แก้โรคผิวหนังทุกชนิด ตำรายาจีนใช้ทั้งต้น
เป็นยาขับปัสสาวะ ฆ่าเชื้อในทางเดินปัสสาวะ



ภาคผนวก ค ที่ 1 ข่าพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)



ภาคผนวก ค ที่ 2 คาวตอง (*Houttuynia cordata* Thunb.)

ภาคผนวก ง
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนอาหาร PDA

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	24	9108.6	379.53	61.53	0.0000
Error	100	616.81	6.1681		
Total	124	9725.4			
LSD _{0.01}	4.12				
CV (%)	4.60				

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อความงอกของเมล็ดพริกเมื่อเพาะบนกระดาษซับ

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	3	12.688	4.2292	0.95	0.4461
Error	12	53.250	4.4375		
Total	15	65.937			
LSD _{0.05}	3.25				
CV (%)	2.33				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อความงอกของเมล็ดพริก
เมื่อเพาะในดิน

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	3	54.500	18.167	13.21	0.0004
Error	12	16.500	1.3750		
Total	15				
LSD _{0.05}	1.81				
CV (%)	1.31				

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อความงอกของเมล็ดพริกที่ปลูก
ด้วยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ก่อน (24 ชั่วโมง) เมื่อเพาะบนกระดาษชั้น

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	4	6315.5	1578.9	258.83	0.0000
Error	15	91.500	6.1000		
Total	19				
LSD _{0.01}	5.14				
CV (%)	4.37				

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ต้นพริกที่ออกผิดปกติ เมื่อเพาะบนกระดาษขึ้น

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	4	435.20	108.80	45.33	0.0000
Error	15	36.000	2.4000		
Total	19				
LSD _{0.01}	3.03				
CV (%)	10.98				

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อความงอกของเมล็ดพริกที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ก่อน (24 ชั่วโมง) เมื่อเพาะในดิน

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	4	3195.8	798.95	168.79	0.0000
Error	15	71.000	4.7333		
Total	19				
LSD _{0.01}	4.53				
CV (%)	3.13				

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์หัตถ์พริกที่งอกผิดปกติ เมื่อเพาะในดิน

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	4	528.00	132.00	61.88	0.0000
Error	15	32.000	2.1333		
Total	19				
LSD _{0.01}	2.58				
CV (%)	13.28				

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นโตใบที่เป็นโรคของต้นพริกที่แช่เมล็ดด้วยเชื้อราแอนโดไฟท์ชนิดต่างๆ ก่อนปลูก

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	7	10421.00	1488.7	81.94	0.0000
Error	72	1308.1	18.168		
Total	79				
LSD _{0.01}	5.01				
CV (%)	30.86				

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคของต้นพริกที่แช่เมล็ดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์
ชนิดต่างๆ

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	7	3789.5	541.36	66.04	0.0000
Error	72	590.18	8.1969		
Total	79				
LSD _{0.01}	3.39				
CV (%)	30.77				

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคของต้นพริกที่ทำการฉีดพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์
ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังปลูกด้วยเชื้อ *Colletotrichum capsici*

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	7	5314.0	759.14	59.11	0.0000
Error	72	924.66	12.842		
Total	79				
LSD _{0.01}	4.24				
CV (%)	15.92				

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคของต้นพริกที่ทำการฉีดพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังปลูกด้วยเชื้อ *Colletotrichum capsici*

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	7	1813.5	259.07	41.19	0.0000
Error	72	452.88	6.2900		
Total	79				
LSD _{0.01}	2.97				
CV (%)	17.79				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวเพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง
วัน เดือน ปีเกิด	13 เมษายน 2520
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย ในปีการศึกษา 2538 จากโรงเรียนหล่มสักวิทยาคม สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา วิชาโรคพืช) ปีการศึกษา 2541 จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved