



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

## ภาคผนวก

## อาหารเลี้ยงเชื้อรา

## วิธีการเตรียม

## 1. Potato dextrose agar (PDA)

## ส่วนประกอบ

มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	16	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าเล็กๆ ซึ่งมา 200 กรัม จากนั้นนำมาต้มกับน้ำจำนวน 500 มิลลิลิตร จนเนื้อมันฝรั่งสุก กรองเอาเฉพาะน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาต้มพร้อมกับน้ำตาลและวุ้น ต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 – 20 นาที

## 2. Potato dextrose broth (PDB)

## ส่วนประกอบ

มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1.0	ลิตร

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าเล็กๆ 200 กรัม นำมาต้มกับน้ำจำนวน 1 ลิตร ต้มจนมันฝรั่งสุก จากนั้นนำมากรองเอามันฝรั่งออก จากนั้นเติมน้ำตาลและน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 – 20 นาที

## การตรวจวัดปริมาณ Total nonstructural carbohydrate (TNC) ในใบ

### อุปกรณ์และสารเคมี

#### สารเคมี

1. D-glucose
2. Anhydrous sodium carbonate
3. Sodium potassium tartrate
4. Sodium bicarbonate
5. Anhydrous sodium sulfate
6. Copper sulfate
7. Sulfuric acid
8. Ammoniummolybdate
9. Sodium dehydrogenarsenate
10. น้ำกลั่น

ทำการสุ่มเก็บใบค่น้ำ จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วสุ่ม

### ตัวอย่างมาหาปริมาณ TNC

#### 1. การเตรียมสารเคมี

##### 1.1 Nelson's reagent A

ละลาย Anhydrous sodium carbonate และ Sodium potassium tartrate ชนิดละ 25 กรัมผสมกับ Sodium bicarbonate และ Anhydrous sodium sulfate ชนิดละ 25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

##### 1.2 Nelson's reagent B

ละลาย Copper sulfate 15 กรัม ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม กรด Sulfuric 2 หยด แล้วคนจนละลาย

##### 1.3 Nelson's alkaline copper reagent

ในการใช้แต่ละครั้งควรเตรียมใหม่ และเตรียมให้พอดีสำหรับการใช้แต่ละครั้งเท่านั้น โดยนำสารละลาย Nelson's reagent A ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมกับ Nelson's reagent B ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

##### 1.4 Arsenomolybolic acid reagent

ละลาย Ammoniummolybolic  $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$  ปริมาณ 25 กรัมในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรด Sulfuric เข้มข้น 21 มิลลิลิตร และละลาย Sodium dehydrogenarsenate  $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O})$

3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย Sodium dehydrogenarsenate ผสมสารละลาย Ammoniummolybolic เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 วัน ก่อนนำมาใช้ สารละลายที่ได้ต้องมีสีเหลืองอ่อนเท่านั้น

## 2. การสกัด Total nonstructural carbohydrate (TAN) จากตัวอย่างพืช

โดยใช้วิธี Acid extractin ตามวิธีของ Smith et al. (1964) อ้างอิงโดยสุจริต (2531) ซึ่งมีวิธีการคือ นำตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง มาบดและร่อนผ่านตะแกรง 40 mesh เก็บไว้ในโถดูดความชื้นเมื่อต้องการนำมาใช้ นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก 0.05 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองแผ่นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 บรรจุเก็บไว้ในขวด 100 มิลลิลิตร เพื่อการวิเคราะห์

## 3. วิเคราะห์หาปริมาณ Total nonstructural carbohydrate (TNC)

การวิเคราะห์หาปริมาณ TNC โดยวิธี Nelson's reducing procedure ตามวิธีของ Hodge and Hofreiter (1962) ที่ดัดแปลงโดย สุจริต (2531) ซึ่งใช้วิธีการเปรียบเทียบเป็นปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัม ของ D-glucose) ในการวิเคราะห์ใช้สารละลาย D-glucose (equivalent) ตั้งแต่ 0.00 – 0.05 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมนelson's alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าและปิด ด้วยแผ่นอะลูมิเนียม นำไปวางในน้ำเดือดนาน 20 นาที จากนั้นนำไปวางในน้ำเย็น เมื่อหลอดทดลองเย็น ลงให้เติมสารละลาย Arsenomolybolic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าตะกอนละลายแล้วเติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่า Absorbent (%A) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากนั้นนำมาทำเป็นกราฟมาตรฐาน การวิเคราะห์หาปริมาณ TNC ทำเช่นเดียวกันใช้ สารสกัดจากตัวอย่างพืชแทน และนำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล                      นางสาวเววจันทร์ พงศ์จันดา  
 วัน เดือน ปีเกิด              17 เมษายน 2523  
 ประวัติการศึกษา              สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย  
    โรงเรียนสวนบุญโญปภัตม์ภักดิ์ ลำพูน ปีการศึกษา 2541  
    สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
    สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
    ปีการศึกษา 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright © by Chiang Mai University  
 All rights reserved