ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15 – 17	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยหั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำ 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งมันสุก กรองน้ำมันฝรั่งด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาล Dextrose คนจน Dextrose ละลายหมด เก็บน้ำไว้ เก็บน้ำไว้ จากนั้นนำวุ้นมาละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร ต้มจนวุ้นละลาย จึงผสมน้ำมันฝรั่งที่กรองไว้ วัดปริมาตรและเติมน้ำให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน แบ่งใส่ขวดแก้ว อุดด้วยจุกสำลี ใช้กระดาษหุ้มจุกสำลีอีกชั้น และรัดด้วยหนังยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อจะใช้ให้หลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ไมโครเวฟ จากนั้นจึงเทลงในจานอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จึงนำไปใช้ในการทดลองได้

การเตรียมอาหารเพื่อชักนำการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

อาหาร half-PDA

วิธีการเตรียม ทำเช่นเดียวกับอาหาร PDA แต่ปรับปริมาตรของมันฝรั่งและน้ำตาล Dextrose เป็น 100 กรัม และ 10 กรัม ตามลำดับ

อาหาร V-8 juice

เตรียมโดยอุ่นน้ำกลั่น แล้วเติม V-8 juice (ประกอบด้วยน้ำคั้นผัก 8 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ แครอท ผักกาดหอม คื่นฉ่าย หัวบีท พาร์สเลย์ ปวยเหล็ง และ Watercress) ลงไป 200 มิลลิลิตร เติม $CaCO_3$ 3 กรัม คนให้ละลาย แล้วเทวุ้นที่หลอมแล้ว 15 กรัม ผสมลงไป คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทใส่ขวด ปิดจุกสำลี และปิดทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที (เกวลิน, 2547)

อาหาร half-MS

เตรียมอาหารจาก stock A-G รวมกัน โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายแต่ละ stock ซึ่งดัดแปลงจากอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตาราง 7) เทวุ้นที่หลอมแล้ว 13 กรัม ผสมลงไป และเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

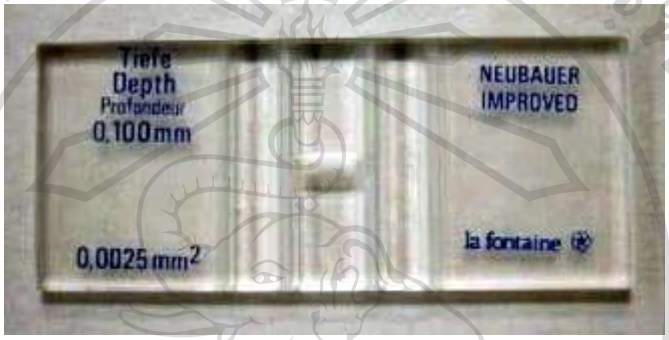
ตาราง 7 อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงจากสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ความเข้มข้น	Stock solution (g/250ml)	Stock (ml/L)
NH_4NO_3		A : 20.625	10
KNO_3		B : 23.7	10
- H_3BO_3		C : 0.31	2.5
- KH_2PO_4		8.50	
- KI		0.0415	
- $Na_2MoO_4.2H_2O$		0.0125	
- $CoCl_2.6H_2O$		0.00125	
$CaCl_2.2H_2O$		D : 22.0	2.5
- $MgSO_4.7H_2O$		E : 18.5	2.5
- $MnSO_4.4H_2O$		1.1	
- $ZnSO_4.7H_2O$		0.431	
- $CuSO_4.5H_2O$		0.0012	
NaFe-EDTA		F : 2.0	2.5
- Thiamine-HCl		G : 0.005	2.5
- Nicotinic acid		0.025	
- Ptridoxine-HCl		0.025	
- Glycine		0.1	
- Inosital	100 ppm		0.05 g
- Sucrose	3%		15 g
- Agar	0.6 - 0.7%		13 g

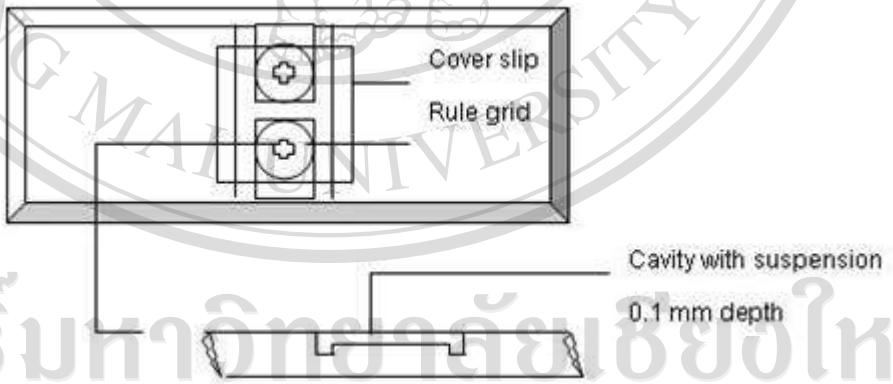
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (เกวลิน, 2547)

เครื่องมือวัดความเข้มข้นของ Inoculum เรียกว่า Haemacytometer เป็นอุปกรณ์ขนาดเล็ก รูปร่างคล้ายสไลด์ แต่มีความหนามากกว่าสไลด์แก้วธรรมดา (ภาพ 25) ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับขึ้น 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H ทำเป็น scale ที่ใช้ในการตรวจนับเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย เช่น สปอร์ หรือเซลล์ต่างๆ (ภาพ 26)



ภาพ 25 ลักษณะของ Haemacytometer



ภาพ 26 ลักษณะและตำแหน่งสำหรับการตรวจนับจำนวนตัวอย่าง เช่น สปอร์ของเชื้อรา ด้วย Haemacytometer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (Small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็ก จะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (Smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จะนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย

2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ 25 x 16 x 1/400 ตารางมิลลิเมตร

3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ 25 x 16 x 1/400 x 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรหรือ 1 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตร เท่ากับ 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นับสปอร์ได้ = Y สปอร์

ถ้าใน 1,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (1 มิลลิลิตร) จะมีสปอร์ = Y x 1,000 x 1/0.1 สปอร์

= Y x 1 x 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร

6. ในกรณีสปอร์ หรือเซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร = Z/5 x 1 x 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร

7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากครั้งขึ้น เช่น 5-10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม Wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือเซลล์กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นจึงใช้ Dropper หรือ Loop หยด Suspension ของเชื้อลงบน Scale ของ Haemacytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้ Cover slip ปิดทับ กดเบาๆ หากใส่หยดของ Spore suspension พอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อรา จะอยู่ในช่วง 10^5 -10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำ Inoculator

Inoculator ประกอบด้วย เข็ม 1 เล่ม และยางลบ โดยนำเข็มไปแทงผ่านยางลบให้ทะลุ เพื่อให้ยางลบเป็นตัวกำหนดความลึกของแผลที่จะทำบนผลมะม่วง ให้ส่วนปลายของเข็มที่ผ่านยางลบมีความยาว 3 มิลลิเมตร

การเตรียมกล่อง moist chamber

กล่อง moist chamber ประกอบด้วย กล่องพลาสติก สำลีก้อนชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อพอหมาด และ Petri dish วางผลมะม่วงที่ทำการทดลองบน Petri dish จากนั้นนำไปวางในกล่องพลาสติกที่มีสำลีก้อนชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เพื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่อยู่ภายใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวจามรี เกติมา

วัน เดือน ปี เกิด 17 ตุลาคม 2530

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนกาวิละวิทยาลัย เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2548

สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2552

ทุนการศึกษา ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา 2553

ประสบการณ์และผลงานวิจัย

- บทความวิชาการเสนอในการประชุมวิชาการ (Proceeding) เรื่อง "Effect of Electrolyzed Oxidizing (EO) Water on Growth Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* Pathogen of Anthracnose Post Harvest Disease of Mango". The 8th National Postharvest technology Conference 2010, 1 - 3 September 2010, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, Page 94-94.
- นำเสนอผลงานวิจัย เรื่อง "Effects of Electrolyzed Oxidizing Water on Reduction of Anthracnose Disease on Fruit of Mango cv. Nam Dok Mai". The First ASEAN Plus Three Graduate Research Congress (AGRC) 2012, 1 - 2 March 2012, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved