ภาคผนวก

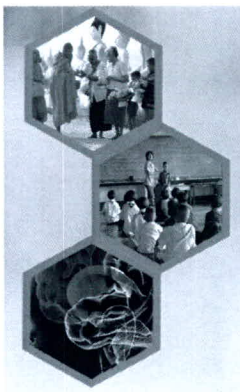
ภาคผนวก ก กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

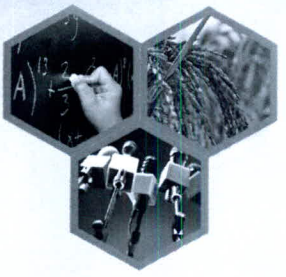
1. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน

- การผลิตบัณฑิต ทุนวิจัยนี้ได้มีส่วนสร้างผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาตรี โดยใช้เป็นหัวข้อในการทำปัญหาพิเศษของนักศึกษาปริญญาตรีจำนวน 1 คน (ว่าที่ร้อยตรีชไมพร ศรีสุข) ในหัวข้อวิจัยชื่อ "การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกจากมณฑาป่าในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum musae*"

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

ร่วมนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ (Poster Presentation) เรื่อง ความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์และแซพโพรบที่แยกจากมณฑาป่าในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum musae* (Antagonistic potential of endophytic and saprobic fungi, isolated from *Manglietia garrettii*, against *Colletotrichum musae*) ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "พิบูลสงครามวิจัย" ณ ลานชั้น 1 อาคารทีปวิชญ์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ระหว่างวันที่ 19-20 กุมภาพันธ์ 2557





บทคัดย่อ
abstracts

การประชุมวิชาการ "พิบูลสงครามวิจัย" และนิทรรศการ "การพัฒนาศักยภาพการท่องเที่ยว" จากท้องถิ่นสู่อาเซียน 2557

19-20 กุมภาพันธ์ 2557

ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว)

P-B22

ความสามารถของราเอนโดไฟต์และแซพโพรบที่แยกจากมณฑาป่าในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต้านการเจริญของ *Colletotrichum Musae*

ชไมพร ศรีสุข และรำไพ โกฏสืบ*
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
*Corresponding author; email: kodsueb@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกหาเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในกล้วย (*Colletotrichum musae*) จากเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกเชื้อจากกิ่งสดและเชื้อราแซพโพรบที่แยกจากกิ่งแห้งของมณฑาป่า (*Mangleitia garrettii*) ที่เก็บจากป่าในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก คัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ของราเอนโดไฟต์และราแซพโพรบที่แยกเชื้อได้จำนวน 96 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ต้านการเจริญของเชื้อ *C. musae* โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกันในจานเพาะเชื้อ (dual culture technique) แล้ววัดผลจากร้อยละของการยับยั้งการเจริญ ผลการศึกษาพบว่ามีเชื้อราบางไอโซเลตแสดงผลยับยั้งการเจริญของ *C. musae* โดยเกิดปฏิกิริยาการเป็นปฏิปักษ์แบบสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) และ/หรือแบบแก่งแย่งพื้นที่ (competition) จากเชื้อทดสอบจำนวน 96 ไอโซเลต มีเชื้อราจำนวน 23 ไอโซเลตให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญที่มากกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ เชื้อราแซพโพรบ *Trichoderma* sp. 6MG2004 ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญที่มากที่สุด (81.1%) โดยการเป็นปฏิปักษ์แบบแก่งแย่งพื้นที่เจริญปกคลุมโคโลนีของ *C. musae* นอกจาก *Trichoderma* sp. 6MG2004 ยังพบมีไอโซเลตของราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae* ได้มากกว่าร้อยละ 60 คือ WMG5-1.3-1, MG2-5.5-2, MG3-2.3-2, MG6-5.2-2 และ MG1-4.5-2 โดยให้ค่าร้อยละการยับยั้ง 62.2, 62.2, 60.8, 60.3 และ 60.1 ตามลำดับ เกือบทุกไอโซเลตข้างต้นแสดงปฏิกิริยาการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *C. musae* แบบแก่งแย่งพื้นที่ที่มีการเจริญเร็วกว่า *C. musae* ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต MG3-2.3-2 เกิดปฏิกิริยาการเป็นปฏิปักษ์แบบสร้างสารปฏิชีวนะ

คำสำคัญ: เชื้อปฏิปักษ์, แอนแทรคโนส, เอนโดไฟต์, มณฑาป่า, แซพโพรบ

ANTAGONISTIC POTENTIAL OF ENDOPHYTIC AND SAPROBIC FUNGI, ISOLATED FROM *MANGLIETIA GARRETTII* CRAIB, AGAINST *COLLETOTRICHUM MUSAE*

Chamaiporn Srisuk and Rampai Kodsueb*
Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University
*Corresponding author; email: kodsueb@yahoo.com

Abstract

The project was initiated in Phu Hin Rong Kla National Park, Phitsanulok province, northern Thailand. The objective of this study is to screen for antagonistic activity of fungi against *Colletotrichum musae*; causal agent of Banana's anthracnose. Endophytic and saprobic fungi were isolated from healthy branches and fallen branches of Montha Pa (*Manglietia garrettii*). Ninety-six isolates of fungi were then selected to test their *In vitro* antagonistic activity using dual culture technique. The result showed that some fungal isolates affected *C. musae* by antibiosis and/or competition. Twenty-three out of 96 isolates provided higher than 50% of percentage inhibition. Saprobic fungus; *Trichoderma* sp. 6MG2004; was able to overgrow the colony of *C. musae* with 81.1% of percentage inhibition. Besides *Trichoderma* sp. 6MG2004, these fungal isolate WMG5-1.3-1, MG2-5.5-2, MG3-2.3-2, MG6-5.2-2 and MG1-4.5-2 provided more than 60% of percentage inhibition at 62.2, 62.2, 60.8, 60.3 and 60.1%, respectively. The most of these isolates could inhibit the growth of *C. musae* by growth competition, while isolate MG3-2.3-2 inhibited the growth of *C. musae* as antibiosis inhibition.

Keywords: antagonist, anthracnose, endophytes, *Manglietia garrettii*, saprobes

ภาคผนวก ข สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา
อาหารแข็ง (Solid media/agar)

Potato Dextrose Agar (PDA; Oxoid) with Chloramphenicol

PDA	39	g
Distilled water	1000	ml
Chloramphenicol	0.05	g

½ Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) with Chloramphenicol

PDA	19.5	g
Agar	10	g
Distilled water	1000	ml
Chloramphenicol	0.05	g

Corn Meal Agar (CMA)

Corn meal	20	g
Peptone	20	g
Dextrose	20	g
Agar	17	g
Distilled water	1000	ml

Water Agar (WA)

Agar	17	g
Distilled water	1000	ml

ภาคผนวก ค สีย้อมและสารที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Stains and reagents for microscopic examination of fungi)

India ink

ใช้ในการตรวจสอบการมีเมือกหรือวุ้นของสปอร์หรือรยางค์ ก่อนใช้ต้องละลายน้ำหมึกในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10

Lactophenol:

ใช้ในการเตรียมสไลด์เพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้อรา และจัดเตรียมสไลด์กึ่งถาวร การใช้จะใช้หลังจากทำการถ่ายภาพและวัดขนาดเชื้อราเสร็จ เนื่องจากแลคโตฟีนอลจะมีผลทำให้โครงสร้างบางอย่างของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะปกติ หรือทำให้เห็นได้ไม่ชัดเจนเท่ากับตอนที่ mount สไลด์ด้วยการใช้น้ำ

วิธีการเตรียมแลคโตฟีนอล

Phenol (crystals)	10 g
Lactic acid	10 ml
Glycerol	10 ml
Distilled water	10 ml

ละลายฟีนอล 10 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml (ไม่ต้องใช้ความร้อนในการละลาย) จากนั้นจึงผสมกลีเซอรอลและกรดแลคติก อย่างละ 10 ml

Lactoglycerol:

มีวัตถุประสงค์ในการใช้และคุณสมบัติเหมือนกับแลคโตฟีนอล และมีข้อดีตรงที่ไม่เป็นสารก่อมะเร็งเหมือนแลคโตฟีนอล จึงมักนิยมใช้แทนแลคโตฟีนอล

วิธีการเตรียมแลคโตกลีเซอรอล

Lactic acid	10 ml
Glycerol	10 ml
Distilled water	10 ml

ผสมกรดแลกติก กลีเซอรอลและน้ำกลั่นปริมาตรอย่างละ 10 ml เข้าด้วยกัน

Melzer's reagent:

ใช้ในการตรวจสอบการติดสีย้อมบริเวณส่วนปลายแอสคัส (ascal ring) แอสโคมาและแอสโคสปอร์ของเชื้อรากลุ่มแอสโคมัยซีสต์บางชนิด โดยจะใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาการติดสีของ amyloid และ dextrinoid ของสปอร์ แอสคัสและเนื้อเยื่อส่วนของชั้น hymenium

วิธีการเตรียม Melzer's reagent

Chloral hydrate	100 g
Potassium iodide	5 g
Iodine	1.5 g
Distilled water	100 ml

ละลาย Chloral hydrate จำนวน 100 g เข้ากับ potassium iodide 5 g และ iodine 1.5 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

Potassium hydroxide (KOH):

ใช้ในการตรวจดูปฏิกิริยาการติดสีย้อมของเชื้อรา ascomycetes บางชนิดและเชื้อรากลุ่ม discomycetes

วิธีการเตรียม Potassium hydroxide

Potassium hydroxide	0.3 g
Distilled water	10 ml

ละลาย KOH จำนวน 0.3 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml

ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย)

Descriptives
PERCENT

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
6MG2004	3	81.0811	2.7027	1.5604	74.3672	87.7950	78.38	83.78
WMG5-1.3-1	3	62.1622	8.1081	4.6812	42.0205	82.3038	54.05	70.27
MG2-5.5-2	3	62.1622	2.7027	1.5604	55.4483	68.8760	59.46	64.86
MG3-2.3-2	3	60.7843	1.9608	1.1321	55.9135	65.6552	58.82	62.75
MG6-5.2-2	3	60.6838	1.4804	.8547	57.0063	64.3612	58.97	61.54
MG1-4.5-2	3	60.1307	4.9345	2.8490	47.8727	72.3888	54.90	64.71
MG7-1.1-3	3	58.1699	2.9951	1.7292	50.7296	65.6103	54.90	60.78
MG4-1.1-2	3	58.3333	2.7778	1.6038	51.4330	65.2337	55.56	61.11
MG3-1.2-2	3	57.5163	2.2641	1.3072	51.8920	63.1407	54.90	58.82
MG2-6.1-3	3	59.4771	2.9951	1.7292	52.0368	36.9175	56.86	62.75
MG6-1.1-1	3	56.8627	7.8431	4.5282	37.3793	76.3462	49.02	64.71
WMG1-5.3-2	3	56.8627	5.8824	3.3962	42.2502	71.4753	50.98	62.75
MG4-1.4-2	3	54.9020	3.9216	2.2641	45.1602	64.6437	50.98	58.82
MG5-2.2-2	3	54.9020	3.9216	2.2641	45.1602	64.6437	50.98	58.82
MG6-1.4-1(2)	3	54.9020	1.9608	1.1321	50.0311	59.7728	52.94	56.86
MG1-5.2-1	3	54.9020	3.9216	2.2641	45.1602	64.6437	50.98	58.82
1MG9001	3	54.0541	5.4054	3.1208	40.6263	67.4818	48.65	59.46
MG6-1.3-1	3	53.5948	2.9951	1.7292	46.1544	61.0351	50.98	56.86
MG7-1.5-2	3	52.2876	1.1321	.6536	49.4754	55.0998	50.98	52.94
MG6-2.4-1	3	52.7778	4.8113	2.7778	40.8260	64.7296	47.22	55.56
5MG1002	3	51.3514	2.7027	1.5604	44.6375	58.0652	48.65	54.05
MG2-5.4-3	3	51.6340	2.9951	1.7292	44.1936	59.0743	49.02	54.90
MG6-2.1-1	3	50.3268	4.9345	2.8490	38.0687	62.5849	45.10	54.90
Total	69	57.3852	7.0318	.8465	55.6960	59.0745	45.10	83.78

Test of Homogeneity of Variances
PERCENT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.894	22	46	.602

ANOVA
PERCENT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2580.626	22	117.301	6.902	.000
Within Groups	781.725	46	16.994		
Total	3362.350	68			

Homogeneous Subsets

PERCENT

		N	Subset for alpha = .05					
	ISOLATE		1	2	3	4	5	6
Duncan(a)	MG6-2.1-1	3	50.3268					
	5MG1002	3	51.3514	51.3514				
	MG2-5.4-3	3	51.6340	51.6340				
	MG7-1.5-2	3	52.2876	52.2876	52.2876			
	MG6-2.4-1	3	52.7778	52.7778	52.7778	52.7778		
	MG6-1.3-1	3	53.5948	53.5948	53.5948	53.5948		
	1MG9001	3	54.0541	54.0541	54.0541	54.0541	54.0541	
	MG4-1.4-2	3	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	
	MG5-2.2-2	3	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	
	MG1-5.2-1	3	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	
	MG6-1.4-1(2)	3	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	54.9020	
	MG6-1.1-1	3	56.8627	56.8627	56.8627	56.8627	56.8627	
	WMG1-5.3-2	3	56.8627	56.8627	56.8627	56.8627	56.8627	
	MG3-1.2-2	3	57.5163	57.5163	57.5163	57.5163	57.5163	
	MG7-1.1-3	3	58.1699	58.1699	58.1699	58.1699	58.1699	
	MG4-1.1-2	3	58.3333	58.3333	58.3333	58.3333	58.3333	
	MG2-6.1-3	3		59.4771	59.4771	59.4771	59.4771	
	MG1-4.5-2	3			60.1307	60.1307	60.1307	
	MG6-5.2-2	3				60.6838	60.6838	
	MG3-2.3-2	3				60.7843	60.7843	
	WMG5-1.3-1	3					62.1622	
	MG2-5.5-2	3					62.1622	
	6MG2004	3						81.0811
	Sig.		.055	.051	.059	.055	.052	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.