

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

1. การหาความชื้นของดิน

1.1 การหาความชื้นของดินปัจจุบัน (X_o) ชั่งบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร (A_1) แล้วเติมดินลงไป 100 กรัม (A_2) อบที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน dessicator ก่อน จากนั้นนำมาชั่งอีกครั้ง (A_3) บันทึกข้อมูลในการชั่งแต่ละครั้ง แล้วคำนวณหาความชื้นของดินปัจจุบันโดยใช้สูตร

$$X_o (\%) = \frac{A_2 - A_3}{A_3 - A_1} \times 100\%$$

โดยที่ A_1 = น้ำหนักบีกเกอร์

A_2 = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักดินก่อนอบ

A_3 = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักดินหลังอบ

1.2 การหาความชื้นของดินที่ FC (X_{wc}) นำดินมาใส่ในกระบอกตวงให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป 1 ใน 3 ของดิน (167 มิลลิลิตร) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง แล้วนำดินส่วนตรงกลางของกระบอกตวง (วัดความสูงของดินในกระบอกตวงทั้งหมดว่าได้เท่าไร แล้วหารด้วย 3 และค่าที่ได้คือดินส่วนตรงกลางของกระบอกตวง ตัวอย่างเช่น ความสูงของดินเท่ากับ 18 เซนติเมตร ผลลัพธ์ที่ได้คือ $18 / 3 = 6$ เพราะฉะนั้นดินส่วนตรงกลางคือ จากความสูง 7-12 เซนติเมตร) มาหาความชื้นของดิน ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.1 ก็จะได้ความชื้นของดินที่ FC (X_{wc})

1.3 การคำนวณเพื่อให้ได้ความชื้นของดินที่ต้องการ

สมมุติ ต้องการความชื้นของดินเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตร

$$0.9 \times X_{wc} (\text{ความชื้นของดินที่ FC}) = Y$$

$$Y - X_o (\text{ความชื้นของดินปัจจุบัน}) = Z$$

เพราะฉะนั้นต้องเติมน้ำลงไปดินปัจจุบันเท่ากับ Z มิลลิลิตร ก็จะได้ความชื้นของดินที่ต้องการ

2. การทำ moist chamber

โดยวางกระดาษทิชชูรูปครึ่งวงกลมลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำสำลีมาวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านตรงข้ามกับกระดาษทิชชู นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และให้ความชื้นโดยการหยดน้ำกลั่นที่ผ่านการนั่งฆ่าเชื้อแล้วที่สำลี โดยไม่ให้สำลีสัมผัสกับ

กระดาศพิษซู และคอยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่สำลเพื่อเพิ่มความชื้น ส่วนซากแมลงวางลงบนกระดาศพิษซู ซึ่งทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ

3. การทำ single spore isolation

ตะโคนิเดียของเชื้อราในสภาพปลอดเชื้อปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อการแยกให้ได้โคนิเดียเดี่ยวๆ โดยนำไปผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองประมาณ 1-2 มิลลิลิตร จากนั้นนำมา streak บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มี streptomycin จำนวน 0.5 กรัมต่อลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลหลังจากบ่มทุกวัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound เมื่อเชื้อเจริญขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จึงย้ายโคโลนีไปเพาะเลี้ยงต่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปเก็บไว้ในอาหารวุ้นที่เอียงในหลอดแก้ว (slant Sabouraud dextrose agar; SDA) เพื่อเก็บเป็นสต็อกของเชื้อสำหรับนำไปศึกษาต่อไป (Hywel-Jones, 2002)

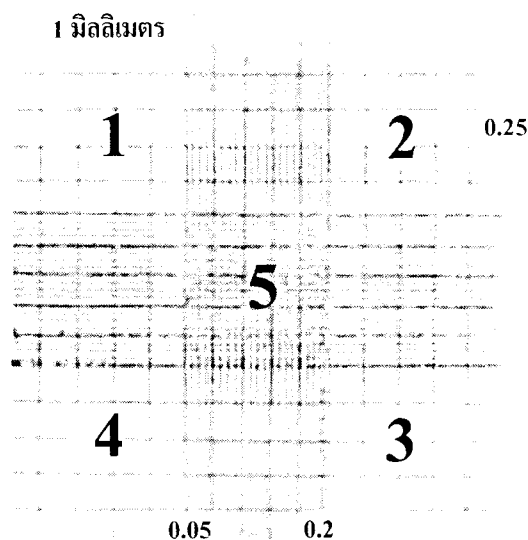
4. วิธีการใช้ haemocytometer และการคำนวณปริมาณโคนิเดีย (Tuite, 1969)

haemocytometer เป็นแผ่นแก้วสไลด์ที่ตีเส้นเป็นช่องตาราง รูปร่างเป็นรูปตัวอักษรตัว H ที่มีพื้นที่สำหรับการนับอยู่ 2 chamber บนตัวสไลด์มักมีตัวเลขระบุความลึกของช่องตาราง ซึ่งโดยทั่วไปมักมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ในบริเวณที่ใช้สำหรับนับจะแบ่งออกเป็น 9 ช่องใหญ่ๆ รวมพื้นที่ 9 ช่องใหญ่เท่ากับ 3x3 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งแต่ละช่องของ 9 ช่องใหญ่ มีพื้นที่เท่ากับ 1x1 ตารางมิลลิเมตร และ ช่องแต่ละช่องของ 9 ช่องใหญ่ (หมายเลข 1, 2, 3 และ 4) จะถูกแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก มีพื้นที่ในแต่ละ 16 ช่องเล็กนี้เท่ากับ 0.25x0.25 ตารางมิลลิเมตร ในช่องตรงกลาง (หมายเลข 5) จะถูกแบ่งย่อยออกเป็น 25 ช่องเล็ก มีพื้นที่ในแต่ละช่องเล็กนี้เท่ากับ 0.2x0.2 ตารางมิลลิเมตร และแต่ละ 25 ช่องเล็กนี้จะถูกแบ่งย่อยลงไปอีกเป็น 16 ช่องเล็ก โดยมีพื้นที่ในแต่ละ 16 เล็กดังกล่าวนี้เท่ากับ 0.05x0.05 ตารางมิลลิเมตร

ขั้นตอนการใช้

1. ทำความสะอาด haemocytometer จากนั้นใช้ alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ด แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
2. หยดสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราที่เตรียมไว้ บนแผ่นสไลด์ที่ปิดด้วย cover glass แล้ว โดยหยดลงตรงตำแหน่งหยดของแต่ละ chamber (1 สไลด์มี 2 chamber)
3. นับโคนิเดียที่อยู่ในช่อง ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ดังปรากฏในภาพของแต่ละ chamber รวมกัน โดยนับทั้ง 2 chamber จำนวนโคนิเดียที่นับได้จากแต่ละ chamber ต้องมีจำนวนอยู่ในช่วง 100-300

โคนิเดีย และมีความแตกต่างกันไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ จึงจะถือว่า dilution นั้นใช้ได้ ทั้งนี้ต้องนับ 6 chamber จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของทั้ง 6 chamber เพื่อนำไปแทนค่าในสูตร



4. คำนวณปริมาณ โคนิเดียต่อมิลลิตร สำหรับโคนิเดียของเชื้อราหรือจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่จะใช้สูตร $2P \times 10^{3+a}$ โดยที่ P = จำนวนโคนิเดียรวมจากช่องที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เฉลี่ย

จาก 2 chamber

a = dilution ที่นับโคนิเดียได้ในช่วง 100-300 โคนิเดีย

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโคนิเดีย

ถ้านับโคนิเดียได้ค่าเฉลี่ย 127 โคนิเดีย ที่ dilution 10^{-3} เมื่อแทนค่าในสูตรจะได้

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของสต็อกเชื้อ} &= 2(127) \times 10^{3+3} \\ &= 2.54 \times 10^8 \text{ โคนิเดียต่อมิลลิตร} \end{aligned}$$

หมายความว่าสต็อกเชื้อ (original concentration) มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.54×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิตร จากนั้นเป็นการคำนวณให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยกำหนดความเข้มข้นสำหรับใช้ในการพ่น คือ 1×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิตร ซึ่งสูตรที่ใช้คำนวณคือ $N_1 V_1 = N_2 V_2$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่นำมาทำให้เจือจางลง

V_1 = ปริมาตรของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่นำมาทำให้เจือจางลง

N_2 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่ต้องการ

โจทย์: ต้องการเตรียมสารแขวนลอยของโคนิเดียเข้มข้น 2.54×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ให้เข้มข้น 1×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จะต้องเติมสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ ลงไปจำนวนเท่าใด

$$\text{แทนค่าในสูตร } 2.54 \times 10^8 (V_1) = 1 \times 10^7 (10)$$

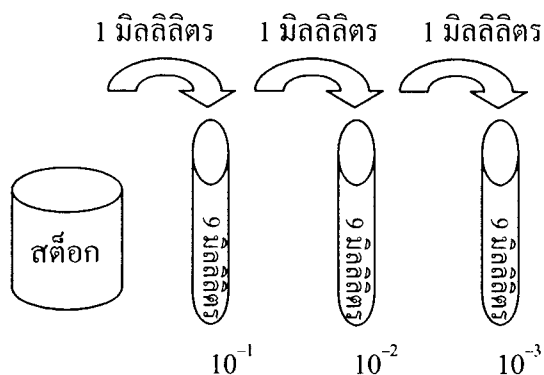
$$= \frac{1 \times 10^7 \times (10)}{2.54 \times 10^8}$$

$$V_1 = 0.39 \text{ มิลลิลิตร}$$

เพราะฉะนั้น จะต้องดูดสารแขวนลอยโคนิเดียเข้มข้น 2.54×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (สต็อกเชื้อ) มา 0.39 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเท่ากับ $10 - 0.39 = 9.61$ มิลลิลิตร ก็จะได้สารแขวนลอยโคนิเดียเข้มข้น 1×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

แต่ถ้าสมมุติที่ dilution 10^{-3} นับไม่ได้เนื่องจากมีความหนาแน่นของ โคนิเดียมากเกินไป (375 โคนิเดีย) จึงต้องนำสารแขวนลอยของโคนิเดียที่ dilution 10^{-3} ไปเจือจางต่ออีกครั้งหนึ่ง เช่น เจือจางด้วยอัตรา 1 ต่อ 4 แล้วนำไปนับ สมมุติว่าจาก 5 ช่อง นับได้ 184 โคนิเดีย ดังนั้นตัวอย่างชั้นตอนและคำนวณแสดงได้ดังนี้

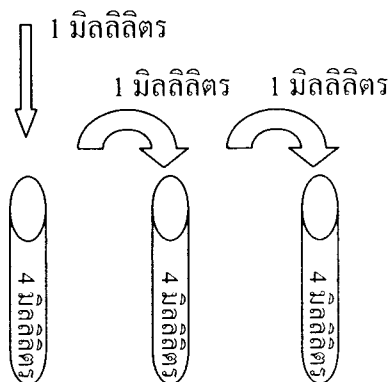
ขั้นที่ 1



= serial dilution ที่ต่างกัน 10 เท่า

$$\left(\frac{1}{1+9} = \frac{1}{10} = 10 \text{ เท่า} \right)$$

ขั้นที่ 2



= serial dilution ที่ต่างกันคือ 5 เท่า (นำตัวเลขนี้ไปคูณ

เพิ่มในขั้นที่ 2)

$$\left(\frac{1}{1+4} = \frac{1}{5} = 5 \text{ เท่า} \right)$$

วิธีคำนวณ

แทนค่าในสูตร $2P \times 10^{3+a}$

ขั้นที่ 2 = $2(184) \times 10^{3+3} \times (5)$ (dilution 10^{-3} ที่ถูกเจือจางไปอีก 5 เท่า ในขั้นที่ 2)

ดังนั้น ความเข้มข้นของโคนีเดียในสต็อก = $2(184) \times 10^6 \times 5$

= 1.84×10^9 โคนีเดียต่อมิลลิตร

แทนค่าในสูตร $1.84 \times 10^9 (V_1) = 1 \times 10^7 \times (10)$

$$= \frac{1 \times 10^7 \times (10)}{1.84 \times 10^9}$$

$V_1 = 0.054$ มิลลิตร

เพราะฉะนั้น จะต้องعدادสารแขวนลอยโคนีเดียที่มีอยู่ (สต็อกเชื้อ) มา 0.054 มิลลิตร

และเติมสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเท่ากับ $10 - 0.054 = 9.946$ มิลลิตร ก็จะได้สารแขวนลอยโคนีเดียเข้มข้น 1×10^7 โคนีเดียต่อมิลลิตร ปริมาตร 10 มิลลิตร

5. การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

การหาปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ เป็นเทคนิคที่จำเป็นมากเพราะเมื่อเตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อราแล้ว จำเป็นที่จะต้องทราบความเข้มข้นในตัวอย่างนั้น เพื่อที่จะทราบว่าควรใช้สารละลายดีเอ็นเอปริมาตรเท่าใดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยมีวิธีการดังนี้

1) วิธีการหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. แบ่งสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหาความเข้มข้นมา 5 ไมโครลิตร (μl) ใส่ลงในคูเวตต์ (cuvette) ชนิดที่ทำด้วยควอทซ์ (quartz) เติม TE buffer ลงไป 995 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) (A_{260} และ A_{280}) โดยใช้ TE buffer เป็น blank

2. คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม (μg) ต่อมิลลิลิตร)

$= A_{260} \times 50$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times$ dilution factor

(dilution factor ในกรณีนี้ $= (995 + 5) / 5 = 200$)

หมายเหตุ: A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ สามารถพิจารณาได้จาก ค่าสัดส่วนระหว่าง $A_{260} : A_{280}$ สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีค่า $A_{260} / A_{280} = 1.8$ ในกรณีที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ และในกรณีที่ค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนเปื้อน

2) วิธีการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงรูปของโมเลกุล ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมถาดรองเจล (gel mould) และเจลแชมเบอร์ (gel chamber) (Sunrise™ 96 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus; Life Technologies, Inc.)

2. ชั่งอะกาโรส (SeaKem® LE agarose; BioWhittaker Molecular Applications, USA) ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) เติม 1X TBE buffer (ภาคผนวก ค) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ กรณีที่วิเคราะห์ผลการสัคดีเอ็นเอจะใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) จะใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

3. นำไปให้ความร้อนจนอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้อุณหภูมิตกลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ วางหวี (comb) ลงที่ช่องวางหวีของถาดรองเจล รอให้เจลแข็งตัว

4. หลังจากเจลแข็งตัว นำถาดไปวางลงในเจลแอมเบอร์ เท 1X TBE buffer ลงไปจนท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ค่อยๆ คึงหวีออก

5. ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องโดยใช้ disposable micropipette และในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder และ GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Fragment Sizes; MBI Fermentas) ที่ทราบขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในช่องซ้ายสุดและขวาสุด สำหรับการหาปริมาณของดีเอ็นเอจะหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอเปรียบเทียบที่ทราบปริมาณที่มีความเข้มข้น 40, 80 และ 120 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยหยอดดีเอ็นเอเปรียบเทียบเรียงตามลำดับความเข้มข้น

6. เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ปิดฝาอิเล็กโทรโฟรีซิสแอมเบอร์ (electrophoresis chamber) แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 1-5 โวลต์ต่อเซนติเมตร ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วสีดำ (cathode) ไปยังขั้วสีแดง (anode) อย่าตั้งความต่างศักย์ให้สูงเกินไป เพราะจะทำให้เกิดความร้อนสูงซึ่งจะทำลายดีเอ็นเอ สังเกตการเคลื่อนที่ของสีติดตามเคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

7. นำเจลอะกาโรสออกใส่ลงในกล่องพลาสติกที่บรรจุน้ำย้อมดีเอ็นเอ (ethidium bromide 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ค) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วย้ายอะกาโรสเจลลงในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว

8. ตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ด้วยเครื่อง Gel Doc 2000™ Gel Documentation Systems (BIO-RAD)

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารสำหรับการ แยก เลี้ยงเชื้อรา
และศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์

สูตรอาหารสำหรับการ แยก เลี้ยงเชื้อรา และศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้ว 200 กรัม มาต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แยกกากมันฝรั่งที่ต้ม
ออกโดยการกรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง เติมน้ำตาล dextrose กวนให้ส่วนผสมเข้ากันดี ตวงน้ำอีก
500 มิลลิลิตร ละลายวุ้นต้มจนวุ้นหลอม แล้วนำมาผสมให้เข้ากันกับน้ำต้มมันฝรั่ง ปรับปริมาตรจน
ครบ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอให้อุณหภูมิลดลง นำมาเท
ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

2. Sabouraud dextrose agar (SDA)

Bacto® peptone (Difco)	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Agar	20	กรัม

นำส่วนผสมมาละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และอีก 500 มิลลิลิตรนำมาละลายวุ้น ต้ม
จนวุ้นหลอม ผสมให้ส่วนผสมเข้ากัน ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร แล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับอาหาร
PDA

3. Sabouraud dextrose broth (SDB)

มีส่วนผสมและการเตรียมเช่นเดียวกับอาหาร SDA เพียงแต่ไม่มีการเติมวุ้น

4. Sabouraud dextrose agar ที่เติม yeast extract (SDAY)

มีส่วนผสมและการเตรียมเช่นเดียวกับอาหาร SDA แต่เติม yeast extract (Bacto® yeast
extract, Difco) อีกจำนวน 2 กรัม

5. Fungus agar (FA)

Bacto [®] peptone	3.75	กรัม
Dextrose	2.50	กรัม
Glycerin	2.50	กรัม
NaCl	1.25	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.25	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.125	กรัม
Agar	20	กรัม

ปฏิบัติเช่นเดียวกับอาหาร SDA

6. Yeast malt extract medium (YM)

Bacto [®] yeast extract	3	กรัม
Bacto [®] malt extract	3	กรัม
Bacto [®] peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	20	กรัม

ปฏิบัติเช่นเดียวกับอาหาร SDA

7. อาหารทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease (SDA ที่มี gelatine 1 เปอร์เซ็นต์)

นำ gelatine จำนวน 10 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่อง Vortex mixer นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วผสมลงในอาหาร SDA ปริมาตร 950 มิลลิลิตร (ค่า pH เท่ากับ 6.0) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่ออุณหภูมิลดลง นำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

8. อาหารทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ lipase

Glycerol tributyrat	10	มิลลิลิตร
NaCl	10	กรัม
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1	กรัม
Agar	20	กรัม

นำ NaCl, CaCl₂.2H₂O และไขมันมาละลายในน้ำกลั่น แล้วต้มจนไขมันหลอม เติม glycerol tributyrat (ไขมัน) ในอาหารที่ร้อน ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร และผสมให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง homogenizer ปรับ pH ให้เป็น 6.0 นึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับอาหาร SDA

9. อาหารทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase

Saboraud dextrose agar (SDA) ที่มี colloidal chitin 2.4 เปอร์เซ็นต์

Bacto [®] peptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Agar	20	กรัม
Colloidal chitin*	24	กรัม

นำส่วนผสมมาละลายในน้ำกลั่นแล้วต้มจนข้น ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.5 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับอาหาร SDA

* วิธีเตรียม colloidal chitin นำ chitin จำนวน 5 กรัม ผสมกับ HCl (conc.) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (12 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เป็น 7.0

Saboraud dextrose broth (SDB) ที่มี colloidal chitin 2.4 เปอร์เซ็นต์

มีส่วนผสมและการเตรียมเช่นเดียวกับอาหาร SDA ที่มี colloidal chitin 2.4 เปอร์เซ็นต์ เพียงแต่ไม่มีการเติมไขมัน

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
และวิธีทางชีวโมเลกุล

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิธีทางชีวโมเลกุล

1. PVLG mountant

Polyvinyl alcohol	8.33	กรัม
Distilled water	50	มิลลิลิตร
Lactic acid	50	มิลลิลิตร
Glycerine	5	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนสาร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

2. Extraction buffer

[CTAB 2 เปอร์เซ็นต์, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 เปอร์เซ็นต์]

CTAB	4	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)*	20	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA**	8	มิลลิลิตร
NaCl	16.36	กรัม
PVP	2	กรัม

ละลายน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

* 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

ละลาย Tris base 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เติม HCl (conc.) ประมาณ 0.60 มิลลิลิตรลงไป ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง ปรับ pH เป็น 8.0 โดย HCl หรือ NaOH ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

** 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate.2H₂O (EDTA) จำนวน 1.861 กรัม ในน้ำ 8 มิลลิลิตร คนให้ละลายมากที่สุดโดยใช้เครื่องกวนสาร ปรับให้เป็น pH 8.0 โดยใส่ NaOH ประมาณ 0.2 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3. Chloroform : isoamyl alcohol* (อัตราส่วน 24 ต่อ 1)

ผสม chloroform ปริมาตร 240 มิลลิลิตร กับ isoamyl alcohol 10 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา หรือขวดแก้วหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

* ข้อควรระวังในการเตรียมนั้นต้องสวมถุงมือระหว่างการเตรียมทุกครั้งและเตรียมในตู้ดูดควัน เนื่องจาก chloroform เป็นสารอันตรายและมีกลิ่น

4. TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารผสมประกอบด้วย

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.02	มิลลิลิตร

5. Stock solution A

ผสม 3 M sodium acetate ปริมาตร 4 ไมโครลิตร กับ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. Stock solution B

ผสม 125 mM EDTA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ 3 M sodium acetate ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. 1X TBE buffer

เตรียม 10X TBE buffer** (89 mM Tris-OH, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) โดยละลาย Tris base 108 กรัม, boric acid 55 กรัม และ Na_2EDTA 93 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10X TBE buffer นี้ให้เป็น 1X TBE buffer โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10X TBE buffer จำนวน 100 มิลลิลิตร

** TBE เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง แลคิเอ็นเอที่แยกได้จะเล็กและคมชัด บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) จะเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้

8. DNA staining solution (ethidium bromide 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลาย ethidium bromide จำนวน 2.5 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ง

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวแทนไอโซเลตของเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษา

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวแทนไอโซเลตของเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษา

1. หลักเกณฑ์ในการแบ่งกลุ่มขนาดโคนิเดีย

วัดขนาดโคนิเดียทุกไอโซเลตแล้วหาพื้นที่หน้าตัดของโคนิเดีย (กว้างxยาว) ในแต่ละไอโซเลตของขนาดโคนิเดียเป็น 3 ช่วง คือ ให้นำผลพื้นที่หน้าตัดของโคนิเดียที่มีค่าสูงสุดลบด้วยค่าต่ำสุด แล้วนำผลลัพธ์ที่ได้หารด้วย 3 ก็จะได้ช่วงขนาดโคนิเดียเล็ก, กลาง และใหญ่ ตัวอย่างเช่น พื้นที่หน้าตัดของโคนิเดียสูงสุดเท่ากับ 12 และต่ำสุดเท่ากับ 3 ผลลัพธ์ที่ได้คือ $12-3 = 9$ จากนั้นนำ 9 หารด้วย 3 เท่ากับ 3 เพราะฉะนั้น กลุ่มโคนิเดียขนาดเล็กจะอยู่ในช่วงพื้นที่หน้าตัดของโคนิเดียตั้งแต่ 3-6, ขนาดกลางจะอยู่ในช่วงพื้นที่หน้าตัดของโคนิเดียตั้งแต่ 7-9 และขนาดใหญ่จะอยู่ในช่วงพื้นที่หน้าตัดของโคนิเดียตั้งแต่ 10-12 เป็นต้น

2. หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวแทนไอโซเลตของเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพ และ การบ่งชี้และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อโดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA

2.1 คัดเลือกตัวแทนไอโซเลตจากจังหวัดต่างๆ (แหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์) ให้ครบทุกจังหวัด โดยมีตัวแทนไอโซเลตของเชื้อที่แยกได้จากดินเกษตรกรรม ดินป่า (โดยไม่ได้จำแนกชนิดของพืชที่ปลูกและชนิดของป่า) รวมทั้งที่แยกได้จากตัวอย่างแมลง

2.2 นำผลจากการแบ่งกลุ่มขนาดโคนิเดีย ได้เป็นโคนิเดียขนาดเล็ก, กลาง และใหญ่ (ข้อ 1) มาสุ่มเลือกตัวแทนไอโซเลต และจากไอโซเลตที่มีการเจริญเติบโตของโคโลนีช้า ปานกลาง และเร็วที่สุด

2.3 นำผลความสามารถในการสร้างเอนไซม์ จากระดับกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ค่าที่คำนวณจากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส ได้แก่ ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ (วัดกิจกรรมได้ค่าเท่ากับ 1), ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ (กิจกรรมของเอนไซม์ระหว่าง 0.99-0.67), ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ปานกลาง (กิจกรรมของเอนไซม์ระหว่าง 0.66-0.34) และระดับกิจกรรมของเอนไซม์สูง (กิจกรรมของเอนไซม์ระหว่าง 0.33-0.01) โดยเรียงลำดับการคัดเลือกตัวแทนไอโซเลต ดังนี้ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease เป็นอันดับแรก รองลงมาคือความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase และ lipase

2.4 เลือกตัวแทนไอโซเลต โดยสุ่มเลือกไอโซเลตที่สุ่มจากกลุ่มตัวแทนในการคัดเลือกในการคัดเลือกตามข้อ 2.1-2.3

2.5 การศึกษาประสิทธิภาพ และการบ่งชี้และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อโดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA; rDNA) บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8S ในครั้งนี้ จึงได้ตัวแทนเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 18 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต IPKKU 175, IPKKU 180, IPKKU 181, IPKKU 189, IPKKU 191, IPKKU 194, IPKKU 200, IPKKU 207, IPKKU 212, IPKKU 214, IPKKU 218, IPKKU 221, IPKKU 225, IPKKU 234, IPKKU 239, IPKKU 244, IPKKU 246 และ IPKKU 247