

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารสำหรับแยกเชื้อราจากดิน และวิธีการต่างๆที่ใช้ศึกษา

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการแยกเลี้ยงเชื้อราในดิน

สูตรอาหาร Martin's medium

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
KH ₂ PO ₄	1	กรัม
Peptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Agar	20	กรัม
Rose bengal (1%)	3.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
Streptomycin sulfate	30	มิลลิลิตร

วิธีการ

ก. นำส่วนผสมที่เตรียมไว้ผสมกับน้ำกลั่น ยกเว้น streptomycin sulfate ยกขึ้นตั้งไฟต้มให้วุ้นละลายจนเข้ากันอย่างดี

ข. บรรจุลงในขวดอาหาร ปิดฝาขวด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ค. เมื่ออุณหภูมิอาหารลดลงเหลือประมาณ 65 °ซ จึงเติม streptomycin sulfate เขย่าเบาๆ ให้ผสมกันดีกับอาหาร แล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วโดยเทคนิคปลอดเชื้อ

2. สูตรอาหาร Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้ว 200 กรัม มาต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แยกกากมันฝรั่งที่ต้มออกโดยการกรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง เติมน้ำตาล dextrose กวนให้ส่วนผสมเข้ากันดี ตวงน้ำอีก 500 มิลลิลิตร ละลายวุ้นต้มจนวุ้นหลอม แล้วนำมาผสมให้เข้ากันกับน้ำต้มมันฝรั่ง ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 20 นาที รอให้อุณหภูมิลดลง นำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

3. การเตรียม perineal patterns สำหรับตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม (Eisenback, 1985)

มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. นำรากพืชที่ปรากฏอาการของปมชัดเจน และมีกลุ่มไข่เป็นสีน้ำตาล เพื่อจะได้ตัวเต็มวัย เพศเมียล้างทำความสะอาดเพื่อแยกเศษดินออกให้หมด
2. นำรากนั้นวางบนจานแก้ว (Syracuse dish) ที่มีน้ำประปาบรรจุอยู่จำนวนเล็กน้อย
3. ใช้มีดโกนปลายแหลมตัดเนื้อเยื่อรากบริเวณรอบ ๆ ตัวเต็มวัยเพศเมีย เพื่อนำตัวไส้เดือนฝอยออกมา
4. ใช้ปลายมีดปลายแหลมตัดบริเวณส่วนคอ และใช้ขนแปรงที่อ่อนนุ่มที่ติดอยู่บนปลายไม้ค้อยๆ ไล่ของเหลวภายในตัวไส้เดือนฝอยออกมาข้างนอก ให้แต่ส่วนที่เป็นผิวหนัง(cuticle)
5. ย้ายชิ้น cuticle ลงบนจานอาหารแบบพลาสติกที่มีหยดของสารละลาย lactic acid เข้มข้น 45% โดยสารละลาย 1 หยด ให้มี cuticle ของไส้เดือนฝอยประมาณ 10-20 cuticle จากนั้น บ่มไว้ 30 นาที สารละลาย lactic acid จะช่วยทำให้การลอกเอาเศษเนื้อเยื่อที่ติดบริเวณ cuticle ออกได้ง่ายขึ้น
6. ตัดชิ้น cuticle โดยใช้ปลายมีดปลายแหลมตัดบริเวณส่วนปลายลำตัวบริเวณ perineal patterns เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จากนั้นใช้ขนแปรงนุ่มย้ายชิ้น cuticle ที่ตัดไปวางลงบนหยดของ สารละลาย lactic acid เข้มข้น 45% ใหม่แล้วใช้มีดตัดแต่ง บริเวณ perineal patterns ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส และล้างเศษเนื้อเยื่อที่ติดค้างบน cuticle ด้วยขนแปรงที่นุ่ม
7. ย้ายชิ้น perineal patterns วางบนหยดของ glycerin ที่อยู่บนสไลด์แก้วที่สะอาด จัดเรียง perineal patterns ให้อยู่ในแนวเดียวกัน และหันส่วนช่องเปิดระบบสืบพันธุ์ (anus) ไปทางด้านล่าง และคว่ำให้ผิวหนังด้านในของ cuticle สัมผัสกับผิวสไลด์
8. ปิดด้วย cover และซับ glycerin ส่วนเกินออกโดยใช้กระดาษซับ นำไปตรวจสอบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope)

4. วิธีการแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน

ก. Sieving and gravity method

1. ใส่ตัวอย่างดิน 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในถังพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ฉีดน้ำผ่านท่อสายยางลงไปในถังที่บรรจุดินประมาณครึ่งถังพลาสติก ใช้มือกวาดและขยี้ ให้ดินแตกละเอียด แล้วปล่อย ไว้ 1 นาที

2. ค่อยๆรินน้ำผ่านตะแกรงร่อนขนาด 32 เมช และรองรับน้ำที่ผ่านตะแกรงด้วยถังพลาสติก ขนาดเดียวกัน ฉีดน้ำผ่านตะแกรงเพื่อไล่ไส้เดือนฝอยส่วนที่เหลือตกค้างอยู่บนตะแกรง

3. ฉีดน้ำลงไปเพิ่มอีก พร้อมกวนให้เข้ากันอีกครั้ง ปล่อยไว้ 30 วินาที แล้วค่อยๆรินผ่าน ตะแกรงร่อนขนาด 325 เมช (ขนาด $45\ \mu\text{m}$) ไล่เดือนฝอยรากปมจะตกค้างอยู่บนตะแกรงร่อน และ เก็บรวบรวมลงในแก้วพลาสติกโดยใช้น้ำค่อยๆ ฉีดไล่

4. ใช้ผ้าขาวบางหุ้มปิดปากแก้วและรัดยางให้แน่น นำไปคว่ำบนชุดกรวย โดยวิธี Baerman funnel technique ต่อไป

ข. วิธี Baerman Funnel technique

1. นำกรวยที่มีส่วนปากกว้างประมาณ 6 นิ้ว ต่อสายยางจากก้านกรวย และมีคลิป (clamp) หนีบสายยางไว้ วางชุดกรวยนี้ไว้บนชั้นวาง วางหลอดตะแกรงที่ตัดขนาดพอดีปากกรวยลงบนปาก กรวย

2. นำแก้วพลาสติกที่บรรจุไส้เดือนฝอยจากวิธี sieving and gravity method ไปคว่ำบน ตะแกรงบนชุดกรวย ใส่น้ำให้ทั่วขอบปากด้วยพลาสติก ทิ้งไว้ 3 วัน ไส้เดือนฝอยจะออกมาและตก ลงไปรวมอยู่ในท่อยาง

3. เปิดคลิปหนีบปล่อยน้ำออกมาทางสายยาง บรรจุในหลอด vial นำไปตรวจนับจำนวน ไส้เดือนฝอยได้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

ค. วิธี Centrifugal flotation technique

1. นำตัวอย่างดิน 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาแยกไส้เดือนฝอยจากดินโดยวิธี sieving and gravity method และเก็บเอาน้ำที่มีไส้เดือนฝอยจากตะแกรงร่อน 325 เมช

2. นำน้ำที่มีไส้เดือนฝอยใส่หลอดเหวี่ยง (centrifuge tube) และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,750 รอบต่อนาที นาน 4 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้

3. เติมน้ำตาลทราย น้ำตาลทราย 450 กรัมในน้ำ 1 ลิตร) ลงไปให้มีปริมาตร 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้ไส้เดือนฝอยแขวนลอยในน้ำตาล แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วย ความเร็ว 1,750 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที

4. ค่อยๆเทส่วนที่เป็นน้ำใสผ่านตะแกรงร่อนขนาด 325 เมช ไล่ไส้เดือนฝอยบนตะแกรงให้ สะอาด แล้วเก็บรวบรวมลงในปิпетเตอร์ นำไปตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยได้กล้องจุลทรรศน์ แบบสเตอริโอ

5. การย้อมสีไส้เดือนฝอยในเนื้อเยื่อพืช (Staining nematodes in plant tissue) โดยวิธี Sodium-Acid Fuchsin Method (Daykin and Hussy, 1985)

ก. นำตัวอย่างรากพืชที่แสดงอาการรากปมมาล้างให้สะอาด วางผึ่งให้แห้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1-2 เซนติเมตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลาย 5.25 เปอร์เซ็นต์ NaOCl ในอัตราร้อยละ 20, 40 หรือ 60 ในน้ำประปา โดยพิจารณาว่าเป็นรากอ่อน รากปานกลาง หรือรากแก่ ตามลำดับ

ข. แช่รากไว้นาน 4 นาที แล้วรินสารละลายทิ้งไป และปล่อยให้ น้ำประปาไหลผ่านตัวอย่างรากประมาณ 45 วินาที และแช่รากนั้นในน้ำประปานานไม่ต่ำกว่า 15 นาทีเพื่อล้าง NaOCl ให้หมด

ค. ย้ายรากใส่ในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายสี acid-fuchsin จำนวน 1 มิลลิลิตร โดยสารละลายสี stock solution เตรียมจาก

acid fuchsin	3.5	กรัม
acetic acid	250	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	750	มิลลิลิตร

ง. นำตัวอย่างรากต้มบน hot plate หรือใน microwave oven นาน 30 วินาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และรินสารละลายทิ้งไป และปล่อยให้ น้ำประปาไหลผ่านรากด้วยจนสีส่วนเกินหมด

จ. ย้ายรากใส่ในบีกเกอร์ที่มีส่วนผสมของ glycerine ปริมาตร 20-30 มิลลิลิตร และ 5 N HCL 2-3 หยด ต้มจนเดือดในตู้ดูดไอสารพิษ และปล่อยให้เย็นจึงนำมาตรวจนับไส้เดือนฝอยในรากพืช

6. การตรวจนับไข่ไส้เดือนฝอยรากปมจากเนื้อเยื่อรากพืช

นำตัวอย่างรากพืชที่เป็นโรครากปมมาล้างด้วยน้ำเบา ๆ ให้สะอาด ตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลาย NaOCl เข้มข้น 1 % โดยปริมาตร นาน 4 นาที พร้อมกับใช้แท่งแก้วกวารากเบา ๆ เทผ่านตะแกรงขนาด 35 เมช เก็บแยกเศษรากออกและรองรับน้ำที่ผ่านตะแกรงด้วยกาละมังพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 เซนติเมตร สูง 25 ซม. พร้อมใช้สายยางฉีดน้ำไล่ไข่ไส้เดือนฝอยที่ติดค้างอยู่บนรากและตะแกรง จากนั้นรีบเติมน้ำลงในกาละมังพลาสติกจนเกือบเต็มเพื่อเจือจางพิษของ NaOCl รินน้ำที่มีไข่ไส้เดือนฝอยผ่านตะแกรงขนาด 500 เมช (25 ไมครอน) ล้างไข่ที่ติดค้างโดยใช้สายยางฉีดไล่ไข่ไส้เดือนฝอยบนตะแกรง ลงไปในกาละมังพลาสติก เติมน้ำเกือบเต็ม รินน้ำผ่านตะแกรง 500 เมช ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเก็บรวบรวมไข่ไส้เดือนฝอยลงในบีกเกอร์แก้ว คำนวณความหนาแน่นของปริมาณไข่ไส้เดือนฝอยด้วยถาด

พลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 6 x 6 x 1 เซนติเมตร ที่บริเวณก้นถาดขีดแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมเล็กๆขนาดเท่ากัน สุ่มดูดสารแขวนลอยไขจากบีกเกอร์แก้วลงบนถาด และตรวนบไขภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนับไขที่อยู่ในแต่ละช่อง แล้วคำนวณหาไขที่มีทั้งหมดในถาดพลาสติก สุ่มทำ 3 ครั้งๆละ 5 มิลลิตร จากนั้นคำนวณย้อนกลับหาจำนวนไขทั้งหมดที่อยู่ในบีกเกอร์แก้วต่อน้ำหนักรากที่นำมาตรวจสอบ

7. การทำ single spore isolation

ตะโคนิเคียของเชื้อราในสภาพปลอดเชื้อปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อการแยกให้ได้โคนิเคียเดี่ยวๆ โดยนำไปผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองประมาณ 1-2 มิลลิตร จากนั้นนำมา streak บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มี streptomycin จำนวน 0.5 กรัมต่อลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ ตรวจสอบผลหลังจากบ่มทุกวัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound เมื่อเชื้อเจริญขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จึงย้ายโคโลนีไปเพาะเลี้ยงต่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปเก็บไว้ในอาหารวุ้น PDA ที่เอียงในหลอดแก้ว เพื่อเก็บเป็นสต็อกของเชื้อสำหรับนำไปศึกษาต่อไป (Hywel-Jones, 2002)

8. การใช้ haemocytometer และการคำนวณปริมาณสปอร์ (Tuite, 1969)

haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณเชื้อหรือสปอร์ของจุลินทรีย์ มีลักษณะเป็นแผ่นแก้วสไลด์ที่ตีเส้นเป็นช่องตาราง 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

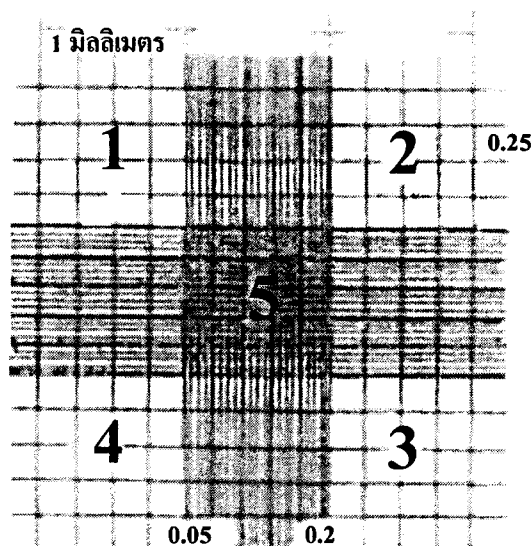
ขั้นตอนและวิธีการใช้

- ก. ทำความสะอาด haemocytometer จากนั้นใช้ alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ด แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
- ข. หยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่เตรียมไว้ บนแผ่นสไลด์ที่ปิดด้วย cover glass แล้วโดยหยดลงตรงตำแหน่งหยดของแต่ละ chamber โดย 1 สไลด์มี 2 chamber
- ค. นับสปอร์ที่อยู่ในช่อง ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ดังปรากฏในภาพของแต่ละ chamber รวมกัน โดยนับทั้ง 2 chamber จำนวนโคนิเดียที่นับได้จากแต่ละ chamber ต้องมีจำนวนอยู่ในช่วง 100-300 สปอร์ และมีความแตกต่างกันไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ จึงจะถือว่าอัตราความเข้มข้นนั้นเหมาะสม ทั้งนี้จะต้องนับ 6 chamber จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของทั้ง 6 chamber เพื่อนำไปแทนค่าในสูตร
- ง. คำนวณปริมาณ สปอร์ต่อมิลลิลิตรโดยใช้สูตร

$2Px10^{3+a}$ โดยที่ P = จำนวนโคนิเดียรวมจากช่องที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เฉลี่ย

จาก 6 chamber

a = dilution ที่นับโคนิเดียได้ในช่วง 100-300 โคนิเดีย



ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสปอร์

ถ้านับสปอร์ได้ค่าเฉลี่ย 250 สปอร์ที่ dilution 10^{-3} เมื่อแทนค่าในสูตรจะได้

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของส่อกเชื้อ} &= 2 (250) \times 10^{3+3} \\ &= 5 \times 10^8 \text{ สปอร์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

หมายความว่าสต็อกเชื้อ (original concentration) มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.54×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเป็นการคำนวณให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยกำหนดความเข้มข้นของสปอร์สำหรับใช้ทดลอง คือ 1.5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูตรที่ใช้คำนวณคือ

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยของสปอร์ ที่นำมาทำให้เจือจางลง

V_1 = ปริมาตรของสารแขวนลอยของสปอร์ที่นำมาทำให้เจือจางลง

C_2 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยของสปอร์ที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารแขวนลอยของสปอร์ที่ต้องการ

และถ้าต้องการเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เข้มข้น 2.54×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ให้เข้มข้น 1.5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

$$\text{แทนค่าในสูตร } 5 \times 10^8 (V_1) = 1.5 \times 10^6 \times (10)$$

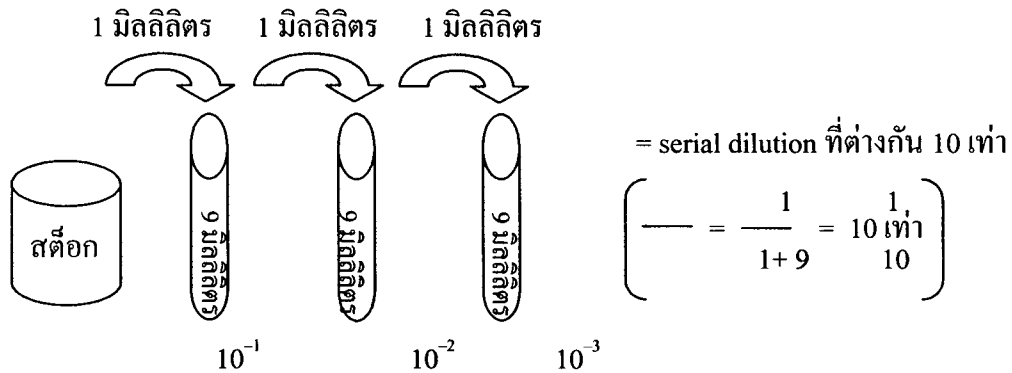
$$= \frac{1.5 \times 10^6 \times (10)}{5 \times 10^8}$$

$$V_1 = 0.03 \text{ มิลลิลิตร}$$

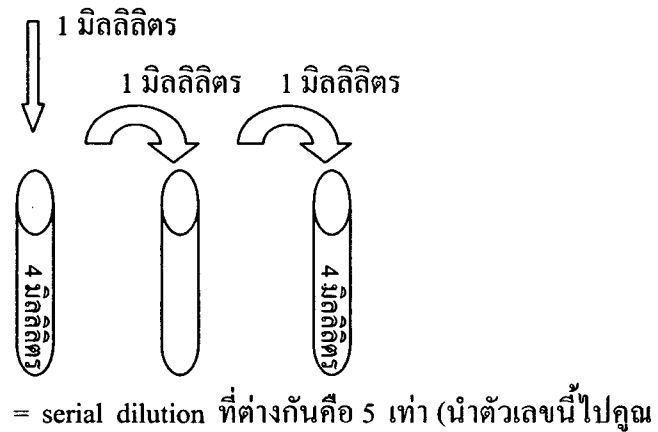
ดังนั้น จะต้องดูดสารแขวนลอยสปอร์เข้มข้น 5×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (สต็อกเชื้อ) มา 0.03 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อจำนวนเท่ากับ $10 - 0.03 = 0.07$ มิลลิลิตร ก็จะได้สารแขวนลอยสปอร์เข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ในกรณีที่ dilution 10^{-3} มีความหนาแน่นของสปอร์มากเกินไป (เช่น 400 สปอร์) ต้องนำสารแขวนลอยของสปอร์ที่ dilution 10^{-3} ไปเจือจางต่ออีกครั้งหนึ่ง เช่น เจือจางด้วยอัตรา 1 ต่อ 4 แล้วนำไปนับสปอร์เช่นเดิม สมมุติว่าจาก 5 ช่อง นับได้ 150 สปอร์ ดังตัวอย่างขั้นตอนและวิธีการคำนวณดังนี้

ขั้นที่ 1



ขั้นที่ 2



เพิ่มในขั้นที่ 2)

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

วิธีคำนวณ

แทนค่าในสูตร $2P \times 10^{3+a}$ ขั้นที่ 2 = $2 (150) \times 10^{3+3} \times (5)$ (dilution 10^{-3} ที่ถูกเจือจางไปอีก 5 เท่า ในขั้นที่ 2)

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น ความเข้มข้นของสปอร์ในสต็อก} &= 2 (150) \times 10^6 \times 5 \\ &= 1.5 \times 10^9 \text{ สปอร์ต่อมิลลิตร} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าในสูตร } 1.5 \times 10^9 (V_1) &= 1.5 \times 10^6 \times (10) \\ &= \frac{1.5 \times 10^6 \times (10)}{1.5 \times 10^9} \end{aligned}$$

$$V_1 = 0.001 \text{ มิลลิตร}$$

ดังนั้นจะต้องคูณสารแขวนลอยสปอร์ที่มีอยู่ (สต็อกเชื้อ) มา 0.001 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ จำนวนเท่ากับ $10 - 0.001 = 9.999$ มิลลิลิตร ก็จะได้สารแขวนลอยสปอร์เข้มข้น 1.5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

9. การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

เป็นวิธีการที่ใช้หาความเข้มข้นในตัวอย่างดีเอ็นเอ เพื่อที่จะทราบว่าต้องใช้สารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตรเท่าใดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยมีวิธีการดังนี้

9.1) การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

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

ข. คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม (μg) ต่อมิลลิลิตร)

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

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

หมายเหตุ: A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. 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

9.2) โดยอาศัยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

จัดเป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงสร้างของโมเลกุล โดยมีขั้นตอนดังนี้

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

ข. เตรียมอะกาโรส (SeaKem® LE agarose; BioWhittaker Molecular Applications, USA) ให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ใน 1X TBE buffer (ภาคผนวก ค) กรณีที่วิเคราะห์ผลการ สกัดดีเอ็นเอจะใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) จะใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

ค. หลอมจนอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 60 °ซ เทลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นวางหวี (comb) ลงที่ช่องวางหวีของ ถาดรองเจล ปล่อยให้เจลแข็งตัว

ง. นำถาดเจลไปวางลงในเจลแชนเบอร์ เท 1 X TBE buffer ลงไปให้ท่วมเจลขึ้นมา ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ค่อยๆ ดึงหวีออก

จ. นำดีเอ็นเอผสมกับสียติดตาม (tracking dye) แล้วใช้ disposable micropipette ดูดสารดี เอ็นเอลงในช่อง และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder และ GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Fragment Sizes; MBI Fermentas) ที่ทราบขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยจะ หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในช่องซ้ายสุดและขวาสุด สำหรับการหาปริมาณของดีเอ็นเอจะหยอด ตัวอย่างดีเอ็นเอเปรียบเทียบที่ทราบปริมาณที่มีความเข้มข้น 40, 80 และ 120 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร โดยหยอดดีเอ็นเอเปรียบเทียบเรียงตามลำดับความเข้มข้น

ฉ. ปิดฝาอิเล็กทรอนิกส์โพริซิสแชนเบอร์ (electrophoresis chamber) แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ เครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 1-5 โวลต์ต่อเซนติเมตร ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จาก ขั้วสีดำ (cathode) ไปยังขั้วสีแดง (anode) อย่างตั้งความต่างศักย์ให้สูงเกินไป เพราะจะทำให้เกิดความร้อนสูงซึ่งจะทำลายดีเอ็นเอ เมื่อสียติดตามเคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของความยาวเจล ให้หยุดกระแสไฟฟ้า

ช. นำเจลอะกาโรสออกไปใส่ลงในกล่องพลาสติกที่บรรจุน้ำย้อมดีเอ็นเอ (ethidium bromide 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ค) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วย้ายอะกาโรส เจลลงในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว

ซ. ตรวจสอบวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ด้วยเครื่อง Gel Doc 2000™ Gel Documentation Systems (BIO-RAD)

10. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารแขวนลอยด้วยวิธี Bradford's (1976)

10.1 การเตรียม Bradford's reagent

ชั่งสาร comassie brillint blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร กวนให้สารละลาย จากนั้นเติม ethanol เข้มข้น 96% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 85% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเก็บใส่ขวดสีชา สำหรับใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งต้องเตรียมก่อนการวิเคราะห์ทุกครั้ง

10.2 เตรียมสารละลายโปรตีน

เตรียม stock protein solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสาร bovine serum albumin จำนวน 2 มิลลิกรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร กวนในสารละลาย และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

10.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง (ความเข้มข้นละ 3 ข้าง) จากนั้นเติม Bradford's reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟเพื่อนำไปเป็นกราฟมาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน

11. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธีของ Somogyi (1952)

11.1 Reagent A

ชั่งสาร sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 25 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน จากนั้นเติมสาร potassium sodium tartrate (K-Na-Tartrate) จำนวน 25 กรัม, sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) จำนวน 20 กรัม และ sodium sulfate (Na_2SO_4) จำนวน 200 กรัม ตามลำดับ กวนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

11.2 Reagent B

ชั่งสาร copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 15 กรัม ใส่บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) จำนวน 2 หยด กวนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

11.3 Reagent C

ชั่งสาร ammonium molybdate $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ จำนวน 25 กรัม ใส่บีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันและปรับปริมาณสุดท้าย 450 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ปริมาตร 21 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน และเติมสารละลาย sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HASO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 3 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 – 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

11.4 สารละลายน้ำตาล

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ

11.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำสารละลายน้ำตาลที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง (ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) จากนั้นนำ reagent A / B (เตรียมก่อน วิเคราะห์ในอัตราส่วน A : B เท่ากับ 25 : 1) ใส่หลอดทดลอง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมเข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 20 นาที จากนั้นเติม reagent C ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมน้ำ กลั่นปริมาตร 4.4 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรรวมทั้งหมด คือ 4.8 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้นำมาทำเป็นกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาล

12. การวิเคราะห์ปริมาณ tyrosine ตามวิธีของ Yang and Wang (1999)

เตรียม stock tyrosine solution เช่นเดียวกับการเตรียม stock protein solution ในข้อ 2.2 จากนั้น นำ tyrosine solution ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) ใส่หลอดทดลอง เติม 0.4 M sodium carbonate (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม Folin ciocalteu phenol's reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาว คลื่น 660 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้นำมาทำเป็นกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนเพื่อใช้ในการ เปรียบเทียบปริมาณของกรดอะมิโน

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย

1) การเตรียม colloidal chitin

ชั่ง chitin จำนวน 5 กรัม นำมาละลายใน HCl เข้มข้น 60 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 คืน จากนั้นนำมาเติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ (ice-cold) ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 คืน จึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 จะได้ colloidal chitin solution 5% จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะใช้

2) 0.1 M Acetate buffer (pH 5.0)

ชั่งสาร sodium acetate trihydrate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 13.6 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย 0.1M glacial acetic acid จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3) 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)

ชั่งสาร potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) จำนวน 13.6 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) จำนวน 14.2 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4) 0.1 M Phosphate buffer (ผสมด้วย 0.05 M NaCl) (pH 6.9)

ชั่งสาร potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) จำนวน 13.6 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้สารละลาย ปรับ pH ให้ได้ pH 6.9 ด้วย sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) จำนวน 14.2 กรัม และ sodium chloride (NaCl) 2.92 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

5) 0.4 M Sodium carbonate (Na_2CO_3)

ชั่งสาร sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 42.39 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

6) DNS reagent

ชั่งสาร 3,5-dinitrosalicylic acid จำนวน 1.5 กรัม ใส่ปิกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

7) Folin ciocalteu phenol's reagent

เตรียมโดยนำ Folin ciocalteu phenol ผสมในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 N

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธีทางชีวโมเลกุล

1. 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 หม่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 20 นาที

2. 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

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

3. 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 หม่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 20 นาที

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

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

(ข้อควรระวังในการเตรียมนั้นต้องสวมถุงมือระหว่างการเตรียมทุกครั้งและเตรียมในตู้ดูดควัน เนื่องจาก chloroform เป็นสารอันตรายและมีกลิ่น)

5. 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

6. 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 Na₂EDTA 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 แลบดีเอ็นเอที่แยกได้จะเล็กและคมชัด บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) จะเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้)

7. DNA staining solution (ethidium bromide 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ละลาย ethidium bromide จำนวน 2.5 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ง

ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย การลดการฟักไข่ที่ถูก
ทำลาย และการทำให้เกิดปมที่รากถั่วเขียว

ตารางภาคผนวกที่ 1 สหสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของเชื้อรา 60 ไอโซเลตต่อเข้าการทำลายไข่เปอร์เซ็นต์การลดการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากลม (*Meloidogyne incognita*) และความรุนแรงของการเกิดปมที่รากถั่วเขียวที่ปลูกในกระถาง

ชนิดเชื้อรา	ไอโซเลต	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)		
		Egg ^{1/} x Hatching ^{2/}	Eggs x Galling ^{3/}	Hatching x Galling
<i>Alternaria lunata</i>	EUB03-16	-0.480	0.189	0.720
<i>Aspergillus niger</i>	EUB27-07	0.715	0.806	0.743
<i>Aspergillus niger</i>	SYT64-06	-0.949	-0.639	0.678
<i>Aspergillus oryzae</i>	SUB41-03	-0.769	0.127	0.011
<i>Aspergillus oryzae</i>	SSK73-08	-0.746	-0.631	0.452
<i>Aspergillus oryzae</i>	SSK75-06	0.151	0.959*	0.006
<i>Aspergillus parasiticus</i>	SUB41-12	-0.752	0.197	-0.686
<i>Aspergillus parasiticus</i>	SUB28-08	-0.746	-0.435	0.800
<i>Aspergillus parasiticus</i>	EYT07-05	0.087	-0.032	0.899
<i>Aspergillus parasiticus</i>	EYT07-10	0.721	0.846	0.855
<i>Auriobasidium</i> sp.	SSR32-07	0.122	-0.373	-0.529
<i>Botrytis</i> sp.	SSK18-03	-0.617	-0.294	0.481
<i>Fusarium oxysporum</i>	EYT16-07	-0.702	0.985*	-0.690
<i>Fusarium oxysporum</i>	EYT16-12	0.007	-0.067	0.906
<i>Fusarium</i> sp.	EYT16-01	0.215	-0.598	0.440
<i>Geotrichum cadidum</i>	SUB02-11	-0.227	0.972*	-0.327
<i>Geotrichum candidum</i>	SSK17-17	-0.471	0.554	-0.916
<i>Lecanicillium tenuipes</i>	SYT46-11	0.007	0.979*	-0.180

^{1/} ไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย (% egg colonization)

^{2/} การลดการฟักไข่ (% hatching reduction)

^{3/} การเกิดปมที่ราก (% galling)

ตารางภาคผนวกที่ 1 สหสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของเชื้อรา 60 ไอโซเลตต่อเข้าการทำลาย
ไข่เปอร์เซ็นต์การลดการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)
และความรุนแรงของการเกิดปมที่รากถั่วเขียวที่ปลูกในกระถาง (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	ไอโซเลต	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)		
		Egg ^{1/} x Hatching ^{2/}	Eggs x Galling ^{3/}	Hatching x Galling
<i>Lecanicillium tenuipes</i>	SNM01-06	-0.426	0.889	-0.660
<i>Metarhizium anisopliae</i>	SUB02-06	0.232	0.719	-0.408
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	EUB48-06	0.683	0.516	-0.250
<i>Pecilomyces lilacinus</i>	SSK19-02	0.042	0.516	0.632
<i>Paecilomyces</i> sp.	SSR53-09	0.156	0.013	-0.471
<i>Paecilomyces</i> sp.	ESR40-01	-0.934	0.049	-0.401
<i>Penicillium digitatum</i>	EUB01-03	0.930	-0.567	-0.432
<i>Penicillium digitatum</i>	ESR24-05	0.239	0.856	0.461
<i>Penicillium frequentans</i>	SUB02-04	0.515	0.234	-0.315
<i>Penicillium frequentans</i>	SUB08-04	0.893	0.987*	0.923
<i>Penicillium fungiculosum</i>	SSK19-03	-0.561	0.526	-0.987*
<i>Pennicillium funiculosum</i>	SSR33-12	0.223	-0.598	-0.481
<i>Penicillium islandicum</i>	SUB05-04	0.776	0.455	0.130
<i>Penicillium marneffe</i>	SUB33-13	0.163	-0.488	0.554
<i>Penicillium nigrican</i>	SYT24-11	-0.160	0.944	-0.333
<i>Penicillium purpurogenum</i>	EYT07-08	-0.560	-0.013	0.629
<i>Pennicillium restrichum</i>	SYT36-03	0.095	0.916	0.234

^{1/} ไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย (% egg colonization)

^{2/} การลดการฟักไข่ (% hatching reduction)

^{3/} การเกิดปมที่ราก (% galling)

ตารางภาคผนวกที่ 1 สหสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของเชื้อรา 60 ไอโซเลตต่อเข้าการทำลาย
ไข่เปอร์เซ็นต์การลดการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)
และความรุนแรงของการเกิดปมที่รากแก้วเขียวที่ปลูกในกระถาง (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	ไอโซเลต	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)		
		Egg ^{1/} x Hatching ^{2/}	Eggs x Galling ^{3/}	Hatching x Galling
<i>Penicillium spinulosum</i>	SYT14-07	0.265	0.694	-0.015
<i>Penicillium variable</i>	EUB01-04	0.695	0.527	-0.245
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	EYT11-09	0.671	0.689	0.985*
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	EUB26-02	0.682	-0.018	0.068
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	EUB26-08	-0.405	-0.221	-0.182
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	SYT64-08	-0.243	-0.780	0.493
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	EUB47-01	0.790	0.875	-0.906
<i>Talaromyces flavus</i>	SSK49-07	0.988*	-0.229	-0.087
<i>Trichoderma harzianum</i>	EUB31-03	-0.011	-0.147	-0.540
<i>Trichoderma harzianum</i>	ESR56-03	0.734	0.458	0.830
<i>Trichoderma harzianum</i>	SSK51-01	-0.105	0.447	0.590
<i>Trichoderma harzianum</i>	SUB34-10	0.949	-0.378	-0.068
<i>Trichoderma hamatum</i>	SUB34-01	-0.234	0.367	0.146
<i>Trichoderma hamatum</i>	ESR57-10	0.646	0.057	0.261
<i>Trichoderma hamatum</i>	SUB66-03	0.582	-0.882	-0.765
<i>Trichoderma hamatum</i>	SSR79-12	-0.921	0.472	-0.132
<i>Trichoderma</i> sp.	ESR56-06	0.467	0.533	0.223
<i>Trichoderma</i> sp.	SNM26-14	0.609	-0.638	-0.358

^{1/} ไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย (% egg colonization)

^{2/} การลดการฟักไข่ (% hatching reduction)

^{3/} การเกิดปมที่ราก (% galling)

ตารางภาคผนวกที่ 1 สหสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของเชื้อรา 60 ไอโซเลตต่อเข้าการทำลาย
ไข่เปอร์เซ็นต์การลดการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyn incognita*)
และความรุนแรงของการเกิดปมที่รากแก้วเขียวที่ปลูกในกระถาง (ต่อ)

ชนิดเชื้อรา	ไอโซเลต	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)		
		Egg ^{1/} x Hatching ^{2/}	Eggs x Galling ^{3/}	Hatching x Galling
<i>Torulomyces</i> sp.	SUB41-14	0.803	-0.976*	-0.666
NS ^{4/}	SUB33-06	0.520	-0.304	-0.066
NS	SUB35-12	-0.440	0.271	-0.608
NS	SUB40-05	0.234	0.378	0.988*
NS	EUB25-07	-0.462	0.716	-0.938
NS	EUB30-10	-0.509	0.663	-0.715
NS	SYT10-04	0.518	-0.412	0.561

^{1/} ไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย (% egg colonization)

^{2/} การลดการฟักไข่ (% hatching reduction)

^{3/} การเกิดปมที่ราก (% galling)

^{4/} ไม่พบการสร้างสปอร์