



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) (Shimizu *et al.*, 2000)

glucose	5	กรัม
soluble starch	5	กรัม
beef extract	1	กรัม
yeast extract	1	กรัม
NZ-case (enzyme hydrolyzed casein)	2	กรัม
NaCl	2	กรัม
CaCO ₃	1	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

2. ISP medium 2 : Yeast extract-malt extract agar (Shirling and Gottlieb, 1966)

yeast extract	4	กรัม
malt extract	10	กรัม
dextrose	4	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ 7.3 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 20 นาที

3. Potato dextrose agar (PDA)

glucose	20	กรัม
potato	200	กรัม
agar	15	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 20 นาที

4. S medium (Tan *et al.*, 2006)

glucose	20	กรัม
casein hydrolysate	4	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.1	กรัม
ferric citrate	10	มิลลิกรัม
CoSO ₄ · H ₂ O	0.01	มิลลิกรัม
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1	มิลลิกรัม
H ₃ BO ₃	1.5	มิลลิกรัม
MnSO ₄ · H ₂ O	0.8	มิลลิกรัม
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.2	มิลลิกรัม
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.6	มิลลิกรัม
agar	12	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 20 นาที

5. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ต่อเชื้อแอกติโนไมซีสต์ 1 ไอโซเลท

2x PCR mastermix	25.00	ไมโครลิตร
F1 primer	1.00	ไมโครลิตร
R5 primer	1.00	ไมโครลิตร
DNA template	1.00	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	22.00	ไมโครลิตร

ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา RFLP ต่อเชื้อแบคทีเรียไมซีสต์ 1 ไอโซเลท

6.1 ปฏิกิริยา RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ *SphI*

ผลผลิตของ PCR	5.00	ไมโครลิตร
buffer	2.00	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>SphI</i>	0.50	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	12.50	ไมโครลิตร

6.2 ปฏิกิริยา RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI*

ผลผลิตของ PCR	5.00	ไมโครลิตร
buffer	2.00	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>KpnI</i>	0.63	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	12.37	ไมโครลิตร

6.3 ปฏิกิริยา RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ *PstI*

ผลผลิตของ PCR	5.00	ไมโครลิตร
buffer	2.00	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>PstI</i>	0.63	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	12.37	ไมโครลิตร

6.4 ปฏิกิริยา RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ *ScaI*

ผลผลิตของ PCR	5.00	ไมโครลิตร
buffer	2.00	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>ScaI</i>	0.55	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	12.45	ไมโครลิตร

6.5 ปฏิกิริยา RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ *Kzo 91*

ผลผลิตของ PCR	5.00	ไมโครลิตร
buffer	2.00	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Kzo 91</i>	0.20	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	12.80	ไมโครลิตร

ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปปรมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

7. สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

Ethidium bromide (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายสาร ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ใส่ในภาชนะทึบแสง หรือใช้แผ่น aluminium foil หุ้มภาชนะปิดให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสารนี้ต้องใส่ถุงมือและระวังไม่หายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น strong agent

ตารางที่ 1 ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเอนโคไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Pst*I, *Sph*I และ *Kzo* 91

ไอโซเลต	เอนไซม์ตัดจำเพาะ																			
	<i>Pst</i> I				<i>Sph</i> I				<i>Kzo</i> 91											
MJC-B1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MJC-B2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
SSC1-L1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
SSC1-L2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
SSC1-L3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
SSC1-L4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
SSC2-B1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
SSC2-B2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
SSC2-B3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
SSC2-B4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
SSC2-R1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
SSC2-R2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
SSC2-R3	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
SSC2-R4	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC1-L1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-L2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC1-L3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-L4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-L5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-R1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-R2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	เอนไซม์ตัดจำเพาะ																			
	<i>Pst</i> I						<i>Sph</i> I			<i>Kzo</i> 91										
MWC1-R3	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC1-R4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-R5	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-R6	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC1-R7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MWC1-R8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MWC1-R9	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC1-R10	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-R11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MWC1-R12	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC1-R13	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC2-B1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC2-B2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC2-B3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC2-B4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC2-R1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC2-R2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC2-R3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC3-B1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
MWC3-B2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
MWC3-B3	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC3-B4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWC3-B5	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
MWC3-B6	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลข	เอนไซม์ตัดจำเพาะ																					
	<i>Pst</i> I						<i>Sph</i> I			<i>Kzo</i> 91												
MWC3-B7	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MWC3-B8	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
MWC3-B9	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
MWC3-B10	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
MWC3-B11	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
MWC3-B12	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWC3-B13	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWC3-B14	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWC3-B15	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWC3-B16	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT1-L1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT1-L2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT1-L3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
MWT2-L1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT2-L2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT2-L3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT2-L5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
MWT2-L6	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT2-L7	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
MWT2-L8	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
MWT2-L10	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT2-L11	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
MWT2-L14	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
MWT2-L15	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	เอนไซม์ตัดจำเพาะ													
	<i>Pst</i> I						<i>Sph</i> I			<i>Kzo</i> 91				
MWT2-L16	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT2-L17	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
MWT2-L18	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MWT3-L2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
MWT3-L3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
MWT3-L4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B4	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
MWT3-B5	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B6	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B7	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B8	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B9	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B10	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B11	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B12	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B13	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B14	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B15	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B16	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
MWT3-B17	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
MWT3-B18	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	เอนไซม์ตัดจำเพาะ																			
	<i>Pst</i> I						<i>Sph</i> I			<i>Kzo</i> 91										
MWT3-B19	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
MWT3-B20	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0

ตารางที่ 2 ผลการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีตส์ จำนวน 17 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

ไอโซเลท	อัตราการเจริญ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
SSC1-L1	1.85	53.65
SSC1-L3	1.93	51.68
SSC2-B1	1.64	59.10
SSC2-B2	1.92	52.08
SSC2-B3	1.73	56.70
SSC2-R1	0.78	80.53
SSC2-R2	1.05	73.65
SSC2-R3	0.96	75.93
SSC2-R4	1.01	74.70
MWC1-L3	1.95	51.18
MWC1-L4	2.25	56.35
MWC1-R4	1.47	63.10

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	อัตราการเจริญ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
MWC1-R5	1.78	55.65
MWC2-B1	1.39	65.35
MWC3-B2	1.85	53.68
MWC3-B8	1.45	63.70
MWC3-B16	1.87	53.23

ตารางที่ 3 ผลการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อเอนโดไฟต์ติก แอคติโนไมซีสต์ จำนวน 22 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

ไอโซเลท	อัตราการเจริญ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
SSC1-L1	2.32	57.89
SSC1-L3	2.07	51.90
SSC2-B1	2.47	61.77
SSC2-B3	2.05	51.35
SSC2-R1	0.74	81.50
SSC2-R2	1.22	69.55
SSC2-R3	0.97	74.80
SSC2-R4	2.75	68.73
MWC2-B2	1.78	55.40

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลข	อัตราการเจริญ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
MWC2-B3	1.91	52.32
MWC3-B1	1.71	57.25
MWC3-B2	1.82	54.45
MWT1-L1	1.81	54.65
MWT2-L2	1.51	62.14
MWT2-L7	1.63	59.28
MWT2-L8	1.79	55.28
MWT3-L3	1.91	52.35
MWT3-B1	1.90	52.40
MWT3-B7	1.71	57.23
MWT3-B10	1.87	53.33
MWT3-B15	1.94	51.48
MWT3-B17	1.88	52.95

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณัฐสุดา บรรณเลขสุวรรณค์
วัน เดือน ปีเกิด	3 ธันวาคม 2528
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาจากชั้นประถมศึกษา จาก โรงเรียนคาราวินาลัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาจากชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น จาก โรงเรียนคาราวินาลัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาจากชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียน ปรีณสร้อยแยลส์วิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วิทยาศาสตร์บัณฑิต) ปีการศึกษา 2550 จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่