ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวกที่ 1. การคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัด

กำหนดให้ความเข้มข้นของสารสกัด 10,000 ppm = สารสกัด 10 กรัม / อาหาร PDA 1,000 มล.

คือ ใช้สารสกัด 10 กรัม ผสมกับอาหาร PDA 1,000 มล.

ถ้าใช้สารสกัด 1 กรัม ต้องผสมกับอาหาร PDA 1x1,000/10 = 100 มล. หรือ 1 กรัม/100 มล. หรือ 1 %

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัด 10,000 ppm = 10 กรัม / 1,000 มล.

= 1 กรัม / 100 มล. หรือ 1 %

ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 15,000 ppm = สารสกัด 15 กรัม / อาหาร PDA 1,000 มล.

คือ ใช้สารสกัด 15 กรัม ผสมกับอาหาร PDA 1,000 มล.

ถ้า ใช้สารสกัด 1.5 กรัม ต้องผสมกับอาหาร PDA 1.5x1,000/10 = 100 มล.หรือ 1.5 กรัม/100 มล. หรือ 1.5%

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัด 15,000 ppm = 15 กรัม / 1,000 มล.

= 1.5 กรัม / 100 มล. หรือ 1.5%

ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 20,000 ppm = สารสกัด 20 กรัม. / อาหาร PDA 1,000 มล.

คือ ใช้สารสกัด 20 กรัม ผสมกับอาหาร PDA 1,000 มล.

ถ้า ใช้สารสกัด 2.0 กรัม ต้องผสมกับอาหาร PDA 2.0x1,000/20 = 100 มล. หรือ2.0 กรัม/ 100 มล. หรือ 2.0%

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัด 20,000 ppm = 20 กรัม / 1,000 มล.

= 2.0 กรัม / 100 มล. หรือ 2.0%

การคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำโดยการผสมกับอาหาร PDA ด้วยวิธีการลดน้ำในอาหาร PDA ครึ่งหนึ่ง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดในอาหาร PDA (ลออรัตน์, 2544)

วิธีคำนวณ อาหาร PDA 100 มล. ลดน้ำลง 50 มล. ผสมกับสารสกัดด้วยน้ำ 50 มล.

สารสกัดด้วยน้ำ 300 มล. ใช้พืชสมุนไพร 150 กรัม

ถ้า สารสกัดด้วยน้ำ 50 มล. ใช้พืชสมุนไพร 50x150/300 = 25 กรัม หรือ 25 %

ดังนั้น ในสารสกัดด้วยน้ำ 300 มล. จะมีเนื้อสาร 25 กรัม หรือ 25 % ในอาหาร PDA 100 มล.

ในสารสกัดด้วยน้ำ 300 มล. ประกอบด้วยน้ำ 300 มล. ต่อพืชสมุนไพร 150 กรัม เมื่อนำมาปรับความเข้มข้น เพื่อหาปริมาณเนื้อสารจากการลดน้ำในอาหาร PDA ลงครึ่งหนึ่ง จะทำให้ทราบปริมาณเนื้อสารเป็น 25 กรัม หรือ 25 % ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารสกัดในอาหาร PDA 100 มล.

ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำที่กำหนด คือ 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัม/100 มล. หรือ %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้น ต้องคำนวณโดยใช้ปริมาณเนื้อสาร 25 กรัม หรือ % เป็นสารตั้งต้น ตามสูตรการลดปริมาณน้ำในอาหาร PDA ครึ่งหนึ่ง

ดังนี้ $150X_1/300$ = X_2 กรัม หรือ %

X_1 = ปริมาตรของสารสกัดที่ต้องการจากความเข้มข้นของสารสกัดที่กำหนดขึ้น

X_2 = ความเข้มข้นของสารสกัดที่กำหนดขึ้น

แทนค่าจากสูตร $\frac{1}{2} X_1$ = 25

X_1 = 50 มล.

ดังนั้น ที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ต้องดูดสารสกัดด้วยน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร PDA ที่ลดน้ำลงครึ่งหนึ่ง 50 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง ความเข้มข้นที่กำหนดให้ 10 เปอร์เซ็นต์

จากสูตร $\frac{1}{2} X_1 = X_2$

$\frac{1}{2} X_1$ = 10

X_1 = 20 มล.

ดังนั้น ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ต้องดูดสารสกัดด้วยน้ำปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำสะอาด 30 มิลลิลิตร และผสมกับอาหาร PDA ที่ลดน้ำลงครึ่งหนึ่ง 50 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ที่ต้องผสมกับน้ำสะอาด 30 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เมื่อนำไปผสมกับอาหาร PDA ลดน้ำลงครึ่งหนึ่ง

ตัวอย่าง ความเข้มข้นที่กำหนดให้ 15 เปอร์เซ็นต์

จากสูตร $\frac{1}{2} X_1 = X_2$

$\frac{1}{2} X_1$ = 15

X_1 = 30 มล.

ดังนั้น ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ต้องดูดสารสกัดด้วยน้ำปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำสะอาด 20 มิลลิลิตร และผสมกับอาหาร PDA ที่ลดน้ำลงครึ่งหนึ่ง 50 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง ความเข้มข้นที่กำหนดให้ 20 เปอร์เซ็นต์

จากสูตร $\frac{1}{2} X_1 = X_2$

$\frac{1}{2} X_1$ = 20

X_1 = 40 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้น ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ต้องดูดสารสกัดด้วยน้ำปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำสะอาด 10 มิลลิลิตร และผสมกับอาหาร PDA ที่ลดน้ำลงครึ่งหนึ่ง 50 มิลลิลิตร

ภาคผนวกที่ 2. การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว และเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราด้วย Agar Method (นิรนาม, 2527)

1. สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละชุดการทดลองจากกรรมวิธี 3.3.1 –3.3.2 ชุดการทดลองละ 4 ๆ ซ้ำละ 100 เมล็ด
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) เทลงบนจากเพาะเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้เย็นภายในตู้ถ่ายเชื้อ
3. แช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละชุดการทดลอง ลงใน 1% Sodium hypochlorite นานประมาณ 5 นาที
4. เมื่อครบกำหนดเวลาที่แช่เมล็ดข้าวแล้ว ริน 1% Sodium hypochlorite ทิ้ง ล้างเมล็ดด้วยน้ำสะอาดนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง จากนั้นซับเมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูฆ่าเชื้อจนเมล็ดแห้ง
5. คีบเมล็ดมาวางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA ภายในตู้ถ่ายเชื้อที่ได้เตรียมไว้แล้ว โดยใช้คีมคีบที่ปลอดเชื้อ คีบเมล็ดข้าวลงบนอาหาร PDA จำนวน 20 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อ
6. เสร็จแล้วนำเมล็ดพันธุ์ที่เพาะในอาหาร PDAทั้งหมด ออกจากตู้ถ่ายเชื้อ โดยบรรจุลงในถุงพลาสติกใส พร้อมทั้งมัดปากถุงให้แน่นสนิทเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อโรคอื่น ๆ
7. นำไปวางบนชั้นที่เตรียมไว้ ภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจดูเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และกล้องจุลทรรศน์แบบ Compound พร้อมทั้งบันทึกผล

ภาคผนวกที่ 3. การตรวจสอบอาการโรคที่เกิดบนต้นกล้า และการเจริญเติบโตของต้นกล้าด้วย Standard Soil Method (นิรนาม, 2527)

1. สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละชุดการทดลองจากกรรมวิธี 3.3.1 –3.3.2 ชุดการทดลองละ 4 ๆ ซ้ำละ 100 เมล็ด
2. นำดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วบรรจุลงในถาดหลุม (multiple pot tray) ขนาด 100 หลุม
3. นำเมล็ดพันธุ์ข้าวที่สุ่มได้จากข้อ 1 มาเพาะลงบนถาดหลุม หลุมละ 1 เมล็ด ภายในโรงเรือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ตรวจนับดูการงอก การเจริญเติบโต และอาการโรคที่เกิดบนต้นกล้า หลังจากเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าว 7 วัน, 14 วัน, 21 วัน และ 28 วัน โดยบันทึกจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติ เมล็ดที่ไม่งอก และต้นกล้าที่เป็นโรค เช่น ต้นแห้งตาย ต้นขาวซีด ต้นแคระแกรน ปลายใบไหม้ และใบเหลือง
5. เมื่อต้นกล้าอายุครบ 28 วัน ถอนและล้างรากต้นกล้าอย่างระมัดระวังไม่ให้รากขาด และไม่ให้มีดินติดอยู่ที่ราก
6. วัดความยาวรากและลำต้นของต้นกล้าเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสด พร้อมทั้งบันทึกผล
7. จากนั้นนำต้นกล้าใส่ถุงกระดาษ แล้วนำไปอบแห้งด้วยเครื่อง Hot-air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
8. เมื่อครบ 3 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำค่าน้ำหนักแห้งที่ได้ไปลบค่าน้ำหนักสดในข้อ 7 จะได้น้ำหนักต้นกล้าที่แท้จริง เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าอีกครั้ง

ภาคผนวกที่4. การจำแนกชนิดสกุลของเชื้อรา *Fusarium* โดยใช้ **Fusarium Interactive Key**

ทำการป้อนข้อมูลในแบบฟอร์ม Fuskey (2002) เพื่อทำการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium*

การจำแนก *Fusarium semitectum*

โคโลนี (Colony)

สีของกลุ่ม conidia บนอาหาร PDA (Conidial Mass on PDA)

- ● ไม่มีสี
- O สีครีม
- O สีเหลือง
- O สีส้ม
- O สีน้ำตาล
- O สีน้ำตาลค่อนข้างแดง
- O สีฟ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดของโคโลนีหลังปลูกเชื้อบนอาหาร PDA 10 วัน

- o ไม่เกิด
- o น้อยกว่า 3 เซนติเมตร
- o 3-7 เซนติเมตร
- ● มากกว่า 7 เซนติเมตร

ลักษณะของเส้นใยบนอาหาร PDA

- o ไม่มี
- ● มีจำนวนมาก
- o มีจำนวนน้อย

สีของโคโลนีใต้จานอาหาร PDA

- o ไม่มีสี
- o สีครีม
- o สีน้ำตาล
- ● สีส้ม
- o สีแดง
- o สีม่วง

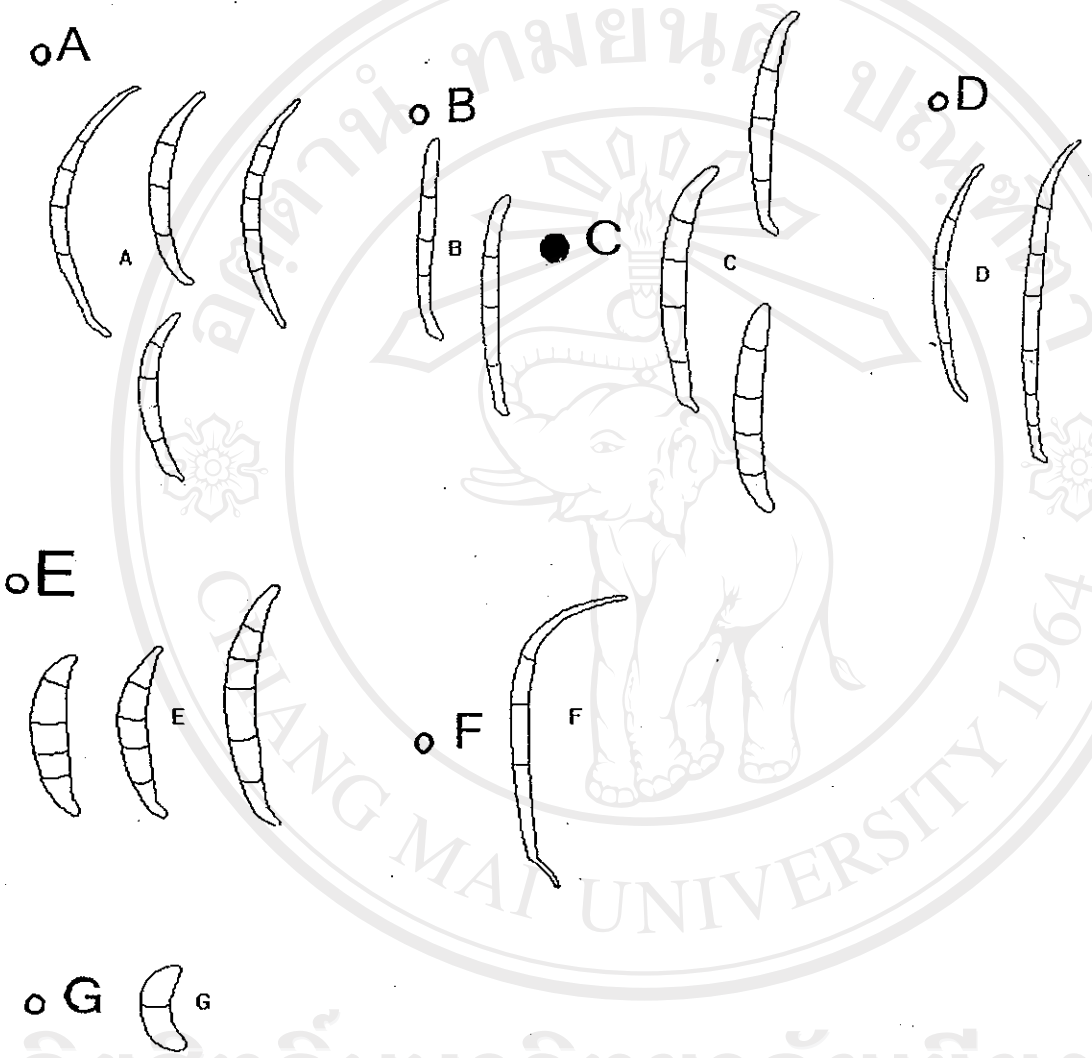
กลิ่น (Odour) ของเชื้อราบนอาหาร PDA

- ● ไม่มีกลิ่น
- o กลิ่นฉุน
- o กลิ่นหอม
- o Musky

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Macroconidia

รูปร่าง Macroconidia (Macroconidia shaped) ของเชื้อรา *Fusarium semitectum*



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าเฉลี่ยความยาวของ Macroconidia (µm)

20-40(µm)

ค่าเฉลี่ยความกว้างของ Macroconidia (µm)

มากกว่า 3 (µm)

ตำแหน่งของ Macroconidia

- ● อยู่ใกล้จุดศูนย์กลาง
- O อยู่เหนือจุดศูนย์กลาง
- O อยู่ใต้จุดศูนย์กลาง

Apical/ Basal cell

ความยาวของ Apical cell (Apical cell length)

- ● น้อยกว่าเซลล์ตำแหน่งสุดท้าย (penultimate cell)
- O เท่ากับเซลล์ตำแหน่งสุดท้าย (penultimate cell)
- O 1.5 – 2x ยาวกว่าเซลล์ตำแหน่งสุดท้าย (penultimate cell)
- O มากกว่า 2X ของเซลล์ตำแหน่งสุดท้าย (penultimate cell)

รูปร่างของ Apical cell (Apical cell shaped)

- O รูปกรวย (conical)
- ● รูปตะขอ (hooked)
- O รูปร่างค่อนข้างทู่ (blunt)
- O รูปร่างคล้ายหัวนม (nipple-like)

รูปร่างเซลล์ฐาน (Basal cell shaped)

- O รูปเท้า (Notched or foot-shaped)
- O ไม่มี foot cell
- O เซลล์ฐานขยายออกมากกว่า 2 um (Basal cell with extension > 2 µm)
- ● มี papilla

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Chlamydospore

- ● ไม่มี
- O มี

Known form

- O เกิดเป็นต่อกันเป็นโซ่
- ● ไม่เกิดต่อกันเป็นโซ่
- O เกิดเดี่ยว ๆหรือเป็นคู่
- O ลูกโซ่
- O อยู่ติดกับ microconidia

แหล่งที่พบ

- O ข้าวโพด
- O ข้าวสาลี
- O ดิน
- O ราก
- O ติดมากับแมลง
- O ต้นไม้หรือเปลือกไม้
- ● เมล็ดพืชอื่น ๆ

แหล่งกำเนิด

- O เขตหนาว
- ● เขตร้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการจำแนก *Fusarium semitectum*

สกุล - ชนิด (Genus Species)	% ความเหมาะสม (matches)
F. semitectum	86.70%
F. oxysporum	80.00%
F. sambucinum	80.00%
F. culmorum	73.30%
F. poae	73.30%
F. graminearum	73.30%
F. tumidum	73.30%
F. nivale	73.30%
F. heterosporum	73.30%
F. moniliforme	66.70%
F. subglutinans	66.70%
F. solani	66.70%
F. graminum	66.70%
F. lateritium	60.00%
F. equiseti	60.00%
F. proliferatum	60.00%
F. tricinctum	60.00%
F. beoforme	60.00%
F. avenaceum	60.00%
F. anthophilum	60.00%
F. nygamai	60.00%
F. crookwellense	53.30%
F. camptoceras	53.30%
F. dimerum	53.30%
F. napiforme	53.30%
F. scirpi	53.30%
F. sporotrichioides	53.30%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

F. xylarioides	53.30%
F. dlamini	53.30%
F. polyphialidicum	46.70%
F. merismoides	46.70%
F. compactum	46.70%
F. coccophilum	46.70%
F. chlamydosporum	46.70%
F. acuminatum	46.70%
F. longipes	46.70%
F. decemcellulare	46.70%
F. aquaeductuum	40.00%
F. reticulatum	33.30%
F. larvarum	33.30%
F. tabacinum	20.00%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจำแนก *Fusarium moniliforme*

โคโลนี (Colony)

สีของกลุ่ม conidia บนอาหาร PDA (Conidial Mass on PDA)

- ● ไม่มีสี
- O สีครีม
- O สีเหลือง
- O สีส้ม
- O สีน้ำตาล
- O สีน้ำตาลค่อนข้างแดง
- O สีฟ้า

ขนาดของโคโลนีหลังปลูกเชื้อบนอาหาร PDA 10 วัน

- O ไม่เกิด
- O น้อยกว่า 3 เซนติเมตร
- ● 3-7 เซนติเมตร
- O มากกว่า 7 เซนติเมตร

ลักษณะของเส้นใยบนอาหาร PDA

- O ไม่มี
- ● มีจำนวนมาก
- O มีจำนวนน้อย

สีของโคโลนีใต้จานอาหาร PDA

- O ไม่มีสี
- O สีครีม
- O สีน้ำตาล
- O สีส้ม
- O สีแดง
- ● สีม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลิ่น (Odour) ของเชื้อราบนอาหาร PDA

- ● ไม่มีกลิ่น
- O กลิ่นฉุน
- O กลิ่นหอม
- O Musky

Microconidia

Microconidia บนเส้นใย (Aerial mycelium)

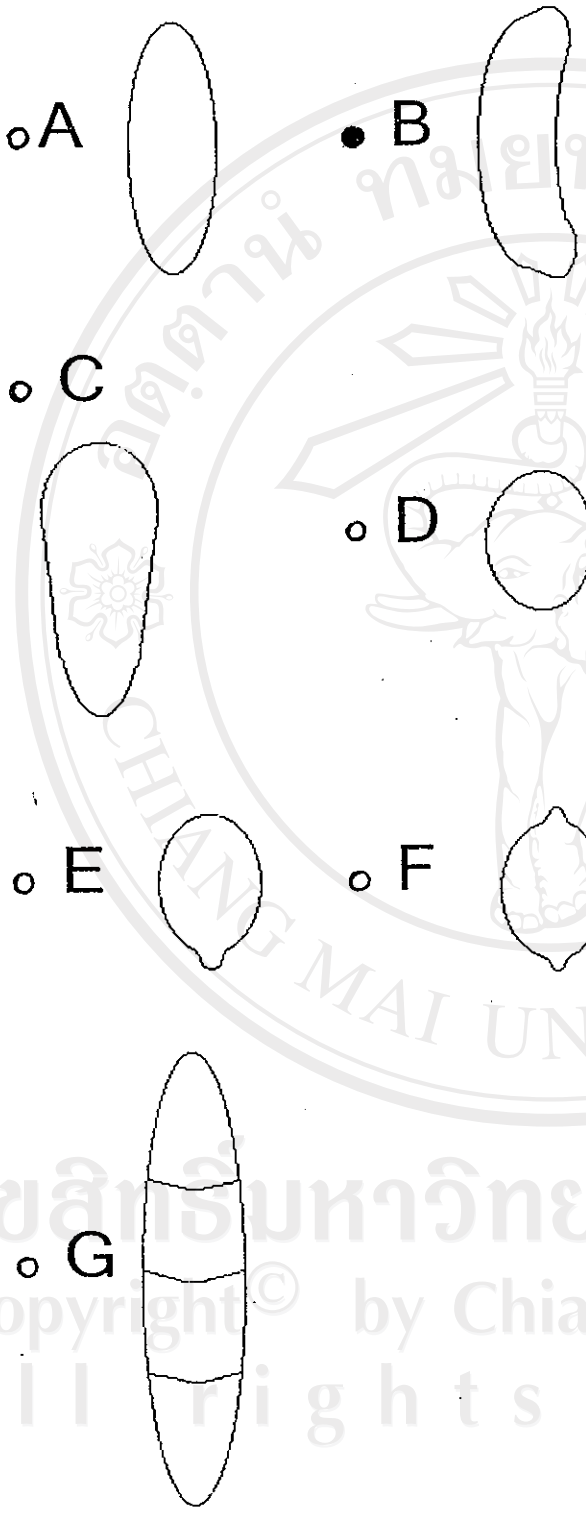
- O ไม่มีหรือมีจำนวนน้อย
- ● มีจำนวนน้อย

ก้านชู conidia (conidia)

- ● ก้านชู conidia เกิดแบบมี phialide เดี่ยว
- ● ก้านชู conidia เกิดแบบมี phialide หลายอัน และยาว
- O ก้านชู conidia เกิดแบบที่มี phialide เดี่ยว และแบบมี phialide หลายอัน
- O ปลายยอดหยักเป็นคลื่น (wavy apex)
- O Microconidia สร้างบน phialide ที่มีหลายอัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปร่าง Microconidia ของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Chlamydospore

- ● ไม่มี
- o มี

Known form

- o เกิดเป็นต่อกันเป็นโซ่
- o ไม่เกิดต่อกันเป็นโซ่
- ● เกิดเดี่ยว ๆหรือเป็นคู่
- o ลูกโซ่
- o อยู่ติดกับ microconidia

แหล่งที่พบ

- o ข้าวโพด
- o ข้าวสาลี
- o ดิน
- o ราก
- o ติดมากับแมลง
- o ต้นไม้หรือเปลือกไม้
- ● เมล็ดพืชอื่น ๆ

แหล่งกำเนิด

- o เขตหนาว
- ● เขตร้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการจำแนก *Fusarium moniliforme*

สกุล - ชนิด (Genus Species)	% ความเหมาะสม (matches)
F. moniliforme	80.00%
F. solani	70.00%
F. decemcellulare	70.00%
F. oxysporum	70.00%
F. xylarioides	70.00%
F. tricinctum	60.00%
F. proliferatum	60.00%
F. anthophilum	60.00%
F. sambucinum	60.00%
F. acuminatum	60.00%
F. nygamai	60.00%
F. tumidum	50.00%
F. dlamini	50.00%
F. avenaceum	50.00%
F. equiseti	50.00%
F. sporotrichioides	50.00%
F. nivale	50.00%
F. subglutinans	50.00%
F. compactum	50.00%
F. napiforme	40.00%
F. culmorum	40.00%
F. poae	40.00%
F. graminum	40.00%
F. graminearum	40.00%
F. chlamydosporum	40.00%
F. beoforme	40.00%
F. scirpi	40.00%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

F. lateritium	40.00%
F. heterosporum	30.00%
F. polyphialidicum	30.00%
F. larvarum	30.00%
F. reticulatum	30.00%
F. coccophilum	30.00%
F. camptoceras	30.00%
F. semitectum	30.00%
F. longipes	30.00%
F. crookwellense	30.00%
F. merismoides	20.00%
F. tabacinum	20.00%
F. dimerum	20.00%
F. aquaeductuum	20.00%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายทวัช พุ่มวงษ์

วันเดือนปีเกิด 27 ตุลาคม 2519

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2538 สำเร็จการศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนอู่ทอง อ. อู่ทอง จ. สุพรรณบุรี

พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) สาขาอารักขาพืช (โรคพืช) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่

ผลงานวิจัย **การนำเสนอผลงาน**

ประสิทธิภาพของสารสกัดน้ำจากเหง้าขมิ้นแห้งในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธีการคลุกและวิธีการแช่เมล็ด ในการสัมมนาวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว / หลังการผลิตแห่งชาติ ครั้งที่ 2 วันที่ 21-22 สิงหาคม 2546. โรงแรมเจริญธานีปริ๊นเซส, ขอนแก่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved