

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

## สูตรอาหาร Malt Extract Peptone Agar ; MEA

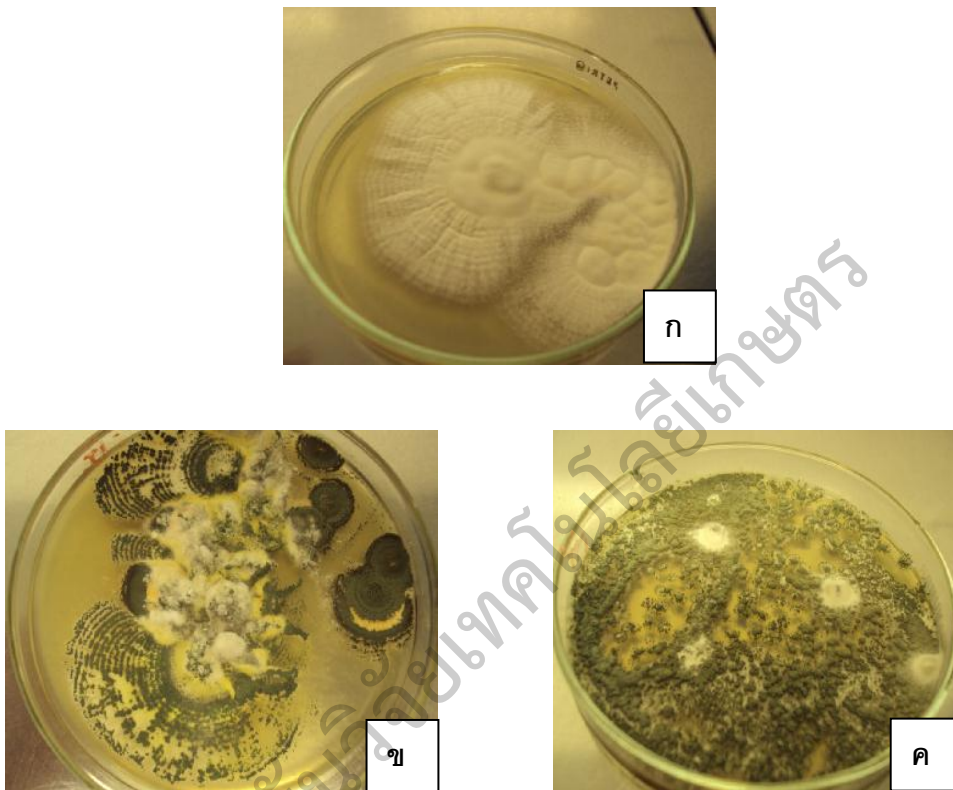
1. มอลต์สกัด 40 กรัม
2. เปปโตน 10 กรัม
3. รุ้น 5 กรัม
4. น้ำกลั่น 1 ลิตร

## วิธีการ

1. ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA จะชั่งส่วนผสมตามสูตรอาหารข้างต้น
2. นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (Autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ ทิ้งไว้ให้อุ่น (หากเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ร้อนจัดจะทำให้มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณใต้ฝาจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้อาหารเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียได้)
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ (โดยลนไฟบริเวณปากขวดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ก่อนการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อที่บริเวณปากขวดอาหาร) ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เย็นและแข็งตัว
5. ลนไฟเข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ที่มีลักษณะปลายงอเป็นรูปตัว L จนปลายเข็มเป็นสีแดง (เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ) รอให้เข็มเขี่ยเย็น
6. ใช้ปลายเข็มตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เจริญอยู่ (เลี้ยงไว้ไม่เกิน 30 วัน) ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1x1 เซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยเกี่ยวชิ้นรุ้นของเส้นใยเชื้อราที่ตัดวางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่เตรียมไว้ โดยวางชิ้นรุ้นของเส้นใยให้อยู่ตรงกึ่งกลางระหว่างจานเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อปิดขอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม (เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย) นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 10-15 วัน (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา)

## ภาคผนวก ข

## ลักษณะของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA



ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA

- (ก) เชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bb.6241 (25 วัน)
- (ข) เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 (25 วัน)
- (ค) เชื้อรา *Metarhizium flavoviride* ไอโซเลท Mfl.5744 (25 วัน)

## ภาคผนวก ค

การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171  
ในเมล็ดข้าวโพดบด

## วิธีการ

1. บรรจุข้าวโพดลงในถุงพลาสติกชนิดถุงร้อนขนาด 20x25 ถุงละปริมาณ 350 กรัม แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 175 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 2:1) ขยำให้เข้ากันทั่วทั้งถุง ใส่คอกขวดพลาสติกแล้วอุดด้วยสำลี จากนั้นหุ้มด้วยกระดาษแล้วใช้ยางรัดปิดปากถุงให้แน่น

2. นำถุงที่บรรจุข้าวโพดไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (autoclave) โดยใช้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลา (รอจนความดันลดลงเหลือ 0 ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง) นำถุงข้าวโพดออกจากหม้อนึ่ง โดยตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3. เปิดถุงข้าวโพดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ ตัดเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 จากที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่มีอายุการเลี้ยงไม่เกิน 30 วัน ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางชั้นละ 1x1 เซนติเมตร ใส่ลงในถุงๆ ละ 3 ชั้น เขย่าให้เชื้อรากระจายทั่วทุกถุง แล้วจึงปิดปากถุงให้สนิท นำไปเลี้ยงไว้บนชั้นที่ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ในอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เขย่าถุงทุก 3 วัน เพื่อให้เชื้อราที่เจริญเติบโตด้านบนไปผสมกับเมล็ดข้าวโพดทางด้านก้นถุง

4. เชื้อราจะขึ้นคลุมเมล็ดข้าวโพดทุกเม็ดภายใน 10 วัน (เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 ในวันที่ 5 จะมีเส้นใยเป็นสีขาวต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและสร้างโคนิเดีย) สามารถนำไปใช้ควบคุมแมลงได้ทันที หรือนำไปฝังลงในที่ร่มจนแห้งสนิทก่อน แล้วเก็บไว้ในถุงกระดาษเพื่อนำไปใช้ต่อไป

## ภาคผนวก ง

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## สูตรอาหาร Sabouraud Yeast Agar (SYA)

1. ไข่ขาว	40 กรัม
2. เปปโตน	10 กรัม
3. น้ำตาลกลูโคส	5 กรัม
4. ยีสต์	15 กรัม
5. น้ำกลั่น	1 ลิตร

## สูตรอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

1. ไข่ขาว	200 กรัม
2. มันฝรั่ง	17 กรัม
3. น้ำตาลกลูโคส	30 กรัม
4. น้ำกลั่น	1 ลิตร

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวภัทรินทร์ ชัดเรือง
วัน เดือน ปี เกิด	7 กรกฎาคม 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดลพบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	42/13 โครงการหมู่บ้านจิตต์อารีวิลล์ 4 ต.ชมพู อ.เมือง จ.ลำปาง 52130 เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 081-2886210
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเวียงเจดีย์วิทยา อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน
พ.ศ. 2551	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
ผลงานทางวิชาการ	
พ.ศ. 2555	ตีพิมพ์บทความวิจัย เรื่อง การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุ โรคแมลงเพื่อการควบคุมแมลงวันหัวเขียว blow fly, <i>Chrysomya</i> <i>megacephala</i> (F.) (Diptera: Calliphoridae) ในวารสารกีฏและ สัตววิทยา ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม-ธันวาคม 2555)