บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราแป้งที่พบบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชอาศัยต่างๆ ในเขตภาคเหนือของไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ได้ใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้แน่น และรีบนำมาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งทันที หากไม่สามารถนำมาตรวจดูภายในวันเดียวได้ แบ่งทำ herbarium ไว้ส่วนหนึ่ง และอีกส่วนหนึ่งนำใส่ถุงพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการตรวจสอบในวันต่อไป การทำงานควรทำให้เสร็จในวันรุ่งขึ้น เนื่องจากหากเก็บไว้นานจะทำให้ลักษณะสัณฐานของเชื้อราแป้งเปลี่ยนแปลงไป

2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1 ทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70% คัดเลือกเชื้อราแป้งที่มีลักษณะโคโลนีของเชื้อราแป้งที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน โดยสังเกตโคโลนีใหม่ๆ ที่มีสีขาวสะอาด นำเทปใสกดลงบนโคโลนีของเชื้อราแป้งที่เลือกไว้ ซึ่งจะได้เส้นใย และ conidia ของเชื้อราแป้งแต่จะมีปริมาณมากเกินไป ทำให้ไม่สามารถมองเห็นโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราแป้งได้อย่างชัดเจน จึงต้องกดลงบนโคโลนีเดิมอีกครั้งหนึ่งบนเทปใสที่ตำแหน่งต่างกันจะทำให้ได้เส้นใยและ conidia ของเชื้อราแป้งที่อยู่ห่างกัน จึงง่ายแก่การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาต่างๆ จากนั้นวางบนหยดน้ำกลั่นบนสไลด์ ไล่ฟองอากาศออก จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100, 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ conidia, conidiophore, mycelium cell, foot cell และ mother cell ลักษณะการเกิด appressorium

2.2 วัดขนาดความกว้างและความยาวของ conidia, conidiophore, mycelium cell, foot cell และ mother cell จำนวน 30 เซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง และทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ย

2.3 การตรวจสอบรูปแบบการงอกของ conidia (germination type) ตามวิธีของ Hirata (1942, 1955) ดังนี้

2.3.1 แบ่งหัวหอมออกเป็น 4 ส่วน กรีดด้านในให้เป็นสี่เหลี่ยมจตุรัส ขนาด 1×1 cm. ลอกเซลล์ผิว (epidermal cell) นำมาแช่ใน 80% ethanol ในขวดแก้วนาน 2 สัปดาห์

2.3.2 นำเซลล์เยื่อหอมมาล้างน้ำ (ใช้ผ้าขาวบางปิดปากบีกเกอร์) โดยเปิดน้ำไหลผ่านช้า ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.3ใช้คีมคีบเซลล์เยื่อหอมมาวางบนสไลด์ โดยให้ด้านที่เป็นแวกซ์อยู่ด้านบน ใช้กระดาษกรองซับน้ำออก

2.3.4 คัดเลือกโคโลนีเชื้อราแป้งที่ใหม่ และสะอาด เพื่อปลูกเชื้อ โดยนำสไลด์ที่มีเซลล์เยื่อหอมมากดทับเพื่อให้ conidia หลุดติดเซลล์เยื่อหอม จากนั้นนำไปลอยบนน้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยไม่ปิดฝาจานเพาะเชื้อ (การปิดฝาจานเพาะเชื้อ จะทำให้มีความชื้นสูงมากเกินไปซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราแป้ง ซึ่งอาจส่งผลให้การงอกของเชื้อราผิดปกติได้)

2.3.5 ภายหลังการบ่มเชื้อแล้ว ย้ายเซลล์เยื่อหอมมาวางบนกระจกสไลด์ที่สะอาดซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรอง หยดน้ำกลั่นลงบนเซลล์เยื่อหอม 1 หยด ปิดด้วย cover slip นำเซลล์เยื่อหอมมาตรวจรูปแบบการงอกของ germ tube ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกผล

2.3.6 นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับ germination type ของเชื้อราแป้งแบบต่างๆพร้อมทั้งวินิจฉัยรูปแบบการงอกของ conidia เชื้อราแต่ละชนิด พร้อมอธิบายลักษณะและวาดรูป

3. ศึกษาลักษณะผิว conidia ของเชื้อราแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ SEM

4.1 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อราแป้งที่ใหม่ และไม่มีเชื้อราอื่นปนเปื้อน ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 0.7×0.7 cm.

4.2 ทำการรักษาสภาพตัวอย่างด้วยสารเคมี (chemical fixation) โดยใช้ aldehyde fixative ประกอบด้วย glutaraldehyde และ paraformaldehyde อัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้นไม่เกิน 2% ใน buffer solution 0.05 M pH. 7.2-7.4 นำชิ้นพืชที่เตรียมไว้แช่ลงในขวด vial ที่มีสารอยู่ เป็นเวลาประมาณ 3 วัน (Bozzola and Russell, 1998)

4.3 กำจัดน้ำออกจากตัวอย่างและทำให้แห้ง (dehydration and drying) เป็นขั้นตอนตัวอย่างให้แห้ง โดยไม่ให้โครงสร้างผิดปกติ โดยการแทนที่น้ำภายในเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยของเหลวที่มีแรงดึงผิวต่ำ สารที่ใช้คือ ethanol จุ่มตัวอย่างลงใน ethanol ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับจาก 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% 2-3 ครั้งตามลำดับ โดยใช้เวลาแช่ในแต่ละความเข้มข้นนาน 5-10 นาที จากนั้นทำให้ตัวอย่างแห้งสนิท ซึ่งใช้เครื่อง Critical Point Dryer (CPD)

4.4 เคลือบผิวของตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (metal coating) โดยใช้ทองคำแท้ระเหิดให้เป็นละอองตกเคลือบลงบนตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Ion sputter ใช้เวลาเคลือบนาน 8-10 นาที

4.5 ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JEOL JSM 5910 LV (ชนิด Low vacuum SEM) บันทึกรายละเอียดของพื้นผิว conidia ของเชื้อราแป้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเก็บเชื้อราในรูปตัวอย่างแห้ง (herbarium specimens)

นำส่วนของพืชที่มีอาการโรคราแป้ง มาสอดเข้าไปในระหว่างคู่ของกระดาษหนังสือพิมพ์ พยายามคลี่ใบพืชออกโดยเฉพาะใบที่เป็นกระจุกซ้อนกันอยู่ แล้ววางทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์อีก 1 คู่ เพื่อช่วยในการดูดซับความชื้น จากนั้นนำตัวอย่างพืชแต่ละตัวอย่างมาเรียงซ้อนกันประมาณ 5-10 ตัวอย่าง เขียนรายละเอียดชื่อพืช เชื้อราสาเหตุ (ชื่อสามัญ และชื่อวิทยาศาสตร์) วันที่ และสถานที่เก็บ จากนั้นนำใส่ถุงพลาสติกที่มี silica gel เพื่อดูดความชื้นออกจากตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิ -4 ˚C เป็นเวลา 5-7 วัน หมั่นตรวจดูหาก silica gel เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู ให้ทำการเปลี่ยน silica gel ใหม่ สังเกตหากสีของ silica gel ไม่เปลี่ยนแปลง (สีน้ำเงิน) แสดงว่าตัวอย่างใบพืชนั้นๆ แห้งสนิท แล้วให้นำตัวอย่างถ่ายใส่ซองกระดาษ โดยใช้กระดาษขนาด A3 มาพับให้เป็นซองแล้วเหลือส่วนที่เป็นนขอบไว้ประมาณ 1-2 cm. เพื่อพับเป็นปากของซอง บันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ชื่อพืช (ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์) ชื่อผู้เก็บ สถานที่เก็บ และวัน เดือน ปีที่เก็บ นำเก็บในกล่องพลาสติกปิดฝาภายในบรรจุ naphthalene เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงเข้าทำลายตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved