บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างพืช

2. สารเคมี

$C_4H_{12}N_2O_6$

$CaCl_2.2H_2O$

KH_2PO_4

$MgSO_4.7H_2O$

agar

carboxymethylcellulose (CMC)

glucose

lactophynol

yeast extract

คองโก เรด (congo red)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเองตามสูตรในภาคผนวก ได้แก่

carboxymethylcellulose agar (CMC agar)

potato dextose agar (PDA)

water agar (WA)

อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ แบบ compound พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ

กล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ

ฟิล์มถ่ายรูป

ocular micrometer

stage micrometer

สไลด์ และ coverslide

เข็มเขี่ยขนาดเล็ก

จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ดำเนินการเก็บ 4 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่าง 2 เดือนต่อ 1 ครั้ง เริ่มเก็บเดือนตุลาคม 2545 และสิ้นสุดเดือนเมษายน 2546 โดยเก็บตัวอย่าง 10 จุด ตลอดเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติของป่าพรุสิรินธร จากการสำรวจก่อนการเก็บตัวอย่างพบว่าเส้นทางเดินธรรมชาติแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ เส้นทางเดิมซึ่งมีพืชที่อยู่หนาแน่นคือ กะพ้อแดง และหลุมพี และมีพืชวงศ์ปาล์มอื่นๆ ประปราย ได้แก่ เต่าร้างสาคู หมาก หมากงาช้าง หมากเขียว หมากลิง หวาย และ หวายสะเดาน้ำ ส่วนอีกเส้นทางหนึ่งนั้นเพิ่งเปิดให้เข้า เมื่อการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 เป็นเส้นทางที่มีสาคูอย่างหนาแน่น และมีกะพ้อแดง หลุมพี เต่าร้าง หมากงาช้าง และหวายน้ำ การเก็บตัวอย่างพยายามเก็บ 10 จุด ๆ ละ 4 จานเลี้ยงเชื้อ กำหนดให้ 1 จานเลี้ยงเชื้อ คือ 1 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นในน้ำ 2 จานเลี้ยงเชื้อ และ บนบก 2 จานเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ กะพ้อแดง และหลุมพี เป็นพืชหลักในการเก็บตัวอย่างในเส้นทางเดิม ส่วนเส้นทางใหม่ใช้ สาคูเป็นพืชหลักในการเก็บตัวอย่าง โดยแต่ละจุดห่างกันเป็นระยะทางประมาณ 100 เมตร จากการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้งสามารถเก็บตัวอย่างได้จำนวน 340 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

1.1 การเตรียมกล่องชื้น (moist chamber) เตรียมโดยใช้จานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยตัดกระดาษทิชชูแบบหนาให้มีขนาดเท่ากับกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นนำมาใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ 3-4 ชั้น โดยชั้นบนสุดเป็นกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วพรมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยทุกขั้นตอน aseptic technique

1.2 เก็บ ใบ ก้านใบ ลำต้น ทลาย และผล จากพืชตระกูลปาล์ม แยกเป็นส่วนที่จมอยู่ใต้น้ำ และส่วนที่อยู่บนบก ตัดให้มีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตรใส่ในกล่องชื้นซึ่งแต่ละจานใส่ตัวอย่าง 3-4 ชิ้น ตามความเหมาะสมนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ ของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างของพืชวงศ์ปาล์ม 12 ชนิด สำหรับศึกษาเชื้อรา Ascomycetes และ Mitosporic fungi

พืช	จำนวนตัวอย่าง	
	บนบก	ในน้ำ
กะพ้อแดง (*Licuala paludosa*)	40	40
เต่าร้าง (*Caryota urens*)	8	8
สาคู (*Metroxylon sagus*)	35	35
หมาก (*Areca catechu*)	6	2
หมากเขียว (*Ptychosperma marcarthurii*)	6	4
หมากงาช้าง (*Pinanga dicksonii*)	25	25
หมากแดง (*Crystostachys renda*)	2	2
หมากลิง (*Areca triandra*)	4	2
หลุมพี (*Eleiodoxa conferta*)	40	40
หวาย (*Calamus siamensis*)	6	0
หวายน้ำ (*Daemonorops angustifolia*)	4	2
หวายสะเดาน้ำ (*Korthalsia lacinosa*)	4	0
รวม	180	160

2. การตรวจเชื้อ และการจำแนกชนิดของเชื้อ

จัดจำแนกจากเชื้อราที่ขึ้นบนวัสดุโดยตรง โดยการตรวจภายใต้กล้อง stereo ตรวจเชื้อให้ครบทุกตัวอย่างภายใน 3-4 วัน และตรวจอย่างละเอียดอย่างน้อย 15 วัน สำหรับ Mitosporic fungi และ 30 วัน สำหรับ Ascomycetes เมื่อพบเชื้อราทำการบันทึก และนำมาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophynol เพื่อศึกษารายละเอียด และลักษณะต่างๆของเชื้อราได้แก่ ลักษณะของ

แอสโคมา (ascoma) แอสคัส (ascus) และ แอสโคสปอร์ (ascospore) เป็นต้นทำการเปรียบเทียบกับหนังสือ Key ต่างๆ ในส่วนของ Ascomycetes ได้แก่ หนังสือของ Hyde และ คณะ (2000), Dennis (1981), Hanlin (1990), Ainsworth และ คณะ (1973) และจากงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง สำหรับในส่วนของ Mitosporic fungi ศึกษาลักษณะคอนิดิโอฟอร์(conidiophore) และ คอนิเดีย (conidia) เปรียบเทียบกับหนังสือของ Ainsworth และคณะ (1973), Barnett และ Hunter (1972), Ellis (1971), Ellis (1976), Ellis และ Ellis (1997) และจากงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น

ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ความถี่ในการพบเชื้อบนพืชแต่ละชนิดโดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{ความถี่ของเชื้อที่พบ(\%)} = \frac{\text{จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่พบเชื้อรา} \times 100}{\text{จำนวนจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดของพืชแต่ละชนิด}}$$

3. การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อราจากตัวอย่างพืชใช้วิธี direct isolation โดยการนำตัวอย่างใส่ในกล่องชื้น (moist chamber) 3-7 วัน ตรวจดู fruiting body หรือแอสโคมาของเชื้อราภายใต้กล้อง stereo เมื่อพบ fruiting body หรือ ascostroma จึงใช้เข็มเขี่ยนำมาทำสไลด์เพื่อศึกษารายละเอียด บันทึกภาพ และทำการเพาะเลี้ยง fruiting body หรือ แอสโคมา เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์โดยนำ fruiting body หรือ แอสโคมา มาแช่ใน คลอรอกซ์ (chlorox) 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเตรียมสไลด์เพื่อวาง fruiting body โดยใช้สไลด์ที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟให้แห้งแล้วหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ วาง fruiting body ลงบนหยดน้ำ ใช้เข็มเขี่ยบีบให้แอสคัสหลุดออกมา จากนั้นตัก แอสคัส หรือ แอสโคสปอร์ ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มี สเตปโตมัยซินซัลเฟต(steptomycin sulphate) 500 ppm ส่วน Mitosporic fungi เขี่ย คอนิเดีย จากเศษซากแล้วทำการเกลี่ยลงบน WA หรือวางบนสไลด์ที่หยดเป็นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วทำการตักเฉพาะคอนิเดียไปเพาะเลี้ยงบน PDA ที่มีสเตปโตมัยซินซัลเฟต 500 ppm

4. ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

คัดเลือกเชื้อ Ascomycetes และ Mitosporic fungi ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ มาทดสอบการย่อยสลาย cellulose โดยการย้อมสี carboxymethylcellulose หรือ CMC ด้วยสี คองโกเรด (congo red) ตามวิธีการของ Pointing (1999)

เตรียม cellulysis basal medium (CBM) และเติม carboxymethylcellulose (CMC)

2 % w/v และ agar 1.6% w/v แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เทลงบนจานเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น เพาะเชื้อราที่ต้องการทดสอบ แล้วบ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ในที่มืด เมื่อโคโลนี มีอายุ 7 วัน ทำการย้อมสีโดย เท คองโกเรด 2 % w/v ใส่ในจานเพาะเลี้ยง ให้ท่วมทิ้งไว้ 15 นาที เทออก แล้วล้างสีด้วยน้ำกลั่นอบฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปกัดสี โดยเทโซเดียม-คลอไรด์ (NaCl) ใส่ในจานเพาะเลี้ยง ให้ท่วม นาน 15 นาที แล้วเทออก หลังจากนั้นทำการวัดผลโดย ดูการเกิดสีเหลืองทึบแสงรอบๆโคโลนี ซึ่งหมายถึงการเกิดการย่อยสลายของ CMC ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ถูกย่อย ซึ่งแปลผล แบ่งเป็น 4 ระดับคือ

\+ = ระดับต่ำแสดงลักษณะสีเหลืองทึบแสง 0-25 มิลลิเมตร

\+ + = ระดับกลางแสดงลักษณะสีเหลืองทึบแสง 26-50 มิลลิเมตร

\++ + = ระดับดีแสดงลักษณะสีเหลืองทึบแสง 51-75 มิลลิเมตร

\+++ + = ระดับดีมากแสดงลักษณะสีเหลืองทึบแสง 76-100 มิลลิเมตร