บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และวัสดุ

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง คือ ข้าวพันธุ์ไทชุง ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

2. สัตว์ทดลอง คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) ได้แม่พันธุ์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

3. เครื่องแก้ว ได้แก่ แท่งแก้วคนสาร , beaker , test tube , pasture pipette , flask , cylinder, slide , cover glass , Petri dish

4. อุปกรณ์ ได้แก่ เครื่องชั่ง เครื่องชั่งไฟฟ้า หม้อนึ่งความดัน อุปกรณ์นับปริมาณสปอร์ (Haemacytometer) อุปกรณ์วัดขนาดรา (Micrometer) เตาไฟฟ้า หม้อสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เข็มเขี่ย มีด ปากคีบ (forcep) ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตู้ถ่ายเชื้อ กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ กล้องถ่ายรูป cork borer , rack กรงสำหรับเลี้ยงแมลงพร้อมที่รองขาตู้ ถังพลาสติคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ตะกร้าพลาสติคขนาด 4x8x3 นิ้ว ขวดสเปรย์ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) กล่องพลาสติคใส หลอดสำหรับดูดแมลง ถังโฟม หลอดเก็บเชื้อ (cryotube) ถังไนโตรเจนเหลวพร้อมอุปกรณ์เก็บรักษาตัวอย่าง กระถางดินเผาก้นตันทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว

5. วัสดุ ได้แก่ กระดาษกรอง สำลี น้ำกลั่น ดินสำหรับปลูกข้าว aluminum foil , parafilm ฟิล์มถ่ายรูป อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร potato sucrose agar (PSA) potato sucrose agar เติม proteose peptone (PSA+P) Sabouraud sucrose agar (SSA) Malt extract agar , Czapek's agar น้ำยาสำหรับทำ slide ได้แก่ lactophenol และ lactophenol in aniline blue

6. สารเคมี

6.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร PSA , PSA+P , SSA , Czapek's agar และ malt extract agar (สูตรอาหารได้แสดงไว้ในภาคผนวก)

6.2 สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แอลกอฮอล์ คลอร็อกซ์

6.3 สารเคมีที่ใช้เพื่อลดแรงตึงผิว (surfactant) ได้แก่ tween80

6.4 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บรักษารา ได้แก่ ไนโตรเจนเหลว น้ำแข็งแห้ง (dry ice) และ glycerol 10% v/v

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เป็นโรคตายในสภาพธรรมชาติ มาตรวจหาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค โดยนำมาใส่ใน Petri dish ที่มีกระดาษกรองที่พรมด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจนชื้นรองอยู่ภายใน บ่มไว้ประมาณ 3-5 วัน ในสภาพที่มีแสงและอุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดการสร้างเส้นใยและสปอร์ หลังจากนั้นจึงตรวจดูเชื้อราที่ขึ้นบนตัวแมลงโดยส่องดูได้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกเชื้อราที่พบบนตัวแมลงไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยแตะสปอร์ของเชื้อราไปใส่บนบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA ในจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ บ่มไว้ประมาณ 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

2. ศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราที่แยกได้

นำเชื้อราที่แยกได้จากแมลงมาศึกษา โดยการทำสไลด์ส่องดูได้กล้องจุลทรรศน์ การเตรียมสไลด์ทำได้โดยหยด lactophenol ลงบนแผ่นสไลด์แล้วเขี่ยเชื้อราลงไป หลังจากนั้นปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ถ้าน้ำยาล้นออกมาให้ซับให้แห้ง แล้วจึงเคลือบบริเวณขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วจึงทาซ้ำอีกจนกระทั่งแน่ใจว่าน้ำยาไม่สามารถรั่วไหลออกมาได้ นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปส่องดูได้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยละเอียด เช่นลักษณะเส้นใย ลักษณะการสร้างสปอร์ สี และลักษณะอื่นๆที่จำเป็นต้องใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา เพื่อจำแนกสกุลของเชื้อราที่แยกได้ ตรวจสอบว่าเชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อราก่อโรคหรือ parasite ของแมลง คัดเลือกเชื้อราที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อโรคของแมลงและ/หรือพบบ่อยครั้ง สำหรับนำไปทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เอกสารที่ใช้ในการประกอบการจัดจำแนกได้แก่ Ainsworth, Sparrow and Sussman (1973), Hussey and Scopes (1985), Gilman (1975), Alexopoulos and Mims (1979), Steinhaus (1947), Raper and Fennell (1977), Booth (1971), Barnette (1967), Samson (1974), Burges and Hussey (1971) Burges (1981)

3. ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของราที่แยกได้จากแมลง

3.1 <u>การเตรียมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพื่อใช้ในการทดลอง</u>

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี โดยได้แม่พันธุ์ที่อยู่ในระยะตั้งท้อง แล้วนำมาเลี้ยงในกรงตาข่ายขนาด 90 x90x60 เซนติเมตร ที่บุรอบกรงด้วยมุ้งลวดและผ้าขาวบาง ใช้ต้นข้าวพันธุ์ไทชุงที่ปลูกในถังพลาสติกมีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ เป็นอาหารและพืชอาศัยสำหรับการวางไข่ของเพลี้ยแม่พันธุ์ เมื่อไข่ฟักเป็นตัวอ่อน รอจนกระทั่งตัวอ่อนอยู่ในระยะที่ 3-4 จึงนำมาทดสอบ ส่วนเพลี้ยตัวอ่อนที่ไม่ได้นำไปทดสอบก็เลี้ยงจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย และให้วางไข่ เพื่อใช้ในการทดสอบครั้งต่อไป ต้นข้าวที่ใช้ในการเลี้ยงแมลงจะเปลี่ยนทุกๆ 3-4 วัน หรือเมื่อข้าวต้นเดิมโทรม โดยใช้วิธีเคาะแมลงจากต้นเดิมไปต้นใหม่

3.2 <u>การเตรียมต้นข้าว เพื่อใช้เลี้ยงแมลงในการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของราในหลอดทดสอบ</u>

เพาะต้นข้าวพันธุ์ไทชุงในตะกร้าที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อ (ที่อุณหภูมิ 121 C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 30 นาที) นำไปวางไว้ในที่มีแสงสว่าง เมื่อต้นข้าวมีอายุประมาณ 20-30 วัน จึงนำมาล้างรากเอาดินออก เพื่อนำไปเลี้ยงแมลงในหลอดทดสอบ

3.3 <u>การเตรียมเชื้อราเพื่อใช้ในการทดสอบการเกิดโรค</u>

เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PSA (ตามสูตรอาหารที่แสดงไว้ในภาคผนวกสูตรที่ 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7-10 วัน นำมาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม tween80 0.05% โดยใช้แผ่นสไลด์ขูดสปอร์ของราบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำสปอร์ที่ได้ไปใส่ในน้ำกลั่นที่ผสม tween80 0.05% ที่เตรียมไว้ ใช้เชื้อรา 1 จานเลี้ยงเชื้อต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้สปอร์แขวนลอยในน้ำ กรองสปอร์แขวนลอยของเชื้อราด้วยผ้าขาวบาง นำสปอร์แขวนลอยที่ได้ไปตรวจนับปริมาณสปอร์ต่อปริมาตรด้วยอุปกรณ์ตรวจนับปริมาณสปอร์

3.4 <u>การทดสอบความสามารถของเชื้อราในการก่อให้เกิดโรคต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพหลอดทดสอบ</u>

ย้ายแมลงที่จะใช้ทดสอบไปบนต้นข้าวที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.2) ให้ต้นข้าว 1 ต้นมีแมลงประมาณ 3-5 ตัว ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของราแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบลงบนตัวแมลงย้ายต้นข้าวไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 24x200 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลายปุ๋ยหลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวนหลอดละ 1 ต้น ปิดปากหลอดด้วยผ้าขาวบางและรัดด้วยยางรัด (ภาพที่ 2) ตั้งไว้ในที่มีแสง ชุดทดลองควบคุม (control) ใช้แมลงและต้นข้าวในลักษณะเดียวกันแต่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ผสม tween80 0.05% ในแต่ละชุดการทดลองมีทั้งหมด 10 หลอด ตรวจนับแมลงที่ตายในแต่ละหลอดทุกๆ 2 วัน จนครบ 14 วัน โดยบันทึกเป็นจำนวนแมลงตายสะสม และเปลี่ยนต้นข้าวในหลอดที่ต้นข้าวเริ่มเหลือง วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Chi-square เปรียบเทียบอัตราส่วนการตายสะสมของแมลงในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้สูตร

อัตราส่วนการตายสะสม = จำนวนแมลงตายสะสม/จำนวนแมลงทั้งหมดที่ใช้ในชุดการทดลอง

โดยถือว่าการตายของแมลงในการทดลองชุดควบคุมเป็นการตายโดยธรรมชาติ คัดเลือกราที่มีแนวโน้มว่าสามารถเข้าทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยใช้อัตราส่วนการตายสะสมที่มีความแตกต่างจากการทดลองชุดควบคุม

ภาพที่ 2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

4.ทดสอบความสามารถของเชื้อราในการก่อให้เกิดโรคต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในระดับขยายขนาดหน่วยทดลอง

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราในสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ ใช้วิธีเดียวกันกับข้อ 3.3 ปลูกข้าวพันธุ์ไทชุงลงในกระถางกันตันทรงกระบอกให้มีต้นข้าว 50 ต้นต่อ 1 กระถาง เมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 2 สัปดาห์ ย้ายแมลงลงไปกระถางละ 100 ตัว ชุดการทดลองละ 2 กระถาง ใช้แมลงที่เป็นตัวอ่อนอายุประมาณ 10 วัน ฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยสารละลาย tween80 0.05% ตรวจนับจำนวนแมลงที่ตายทุกๆ 2 วัน จนครบ 14 วัน วิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4

5. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ PSA , PSA+P และ SSA ซึ่งปรับ pH เป็น 5.6 ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อในทุกจาน 25 มิลลิลิตรเท่ากัน ตัดบริเวณขอบโคโลนีของราแต่ละชนิดด้วย cork borer เบอร์ 3 ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาวางไว้บริเวณจุดกึ่งกลางของผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราทุก ๆ 3 5 7 และ 9 วัน เปรียบเทียบอัตราการสร้างสปอร์ของราแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ชนิดโดยการสังเกตด้วยสายตา ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

6. เก็บรักษาเชื้อราที่ได้ในไนโตรเจนเหลว

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA ใส่ลงในหลอด cryotube ให้หนาประมาณ 5 มิลลิเมตรปิดฝาให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดเย็นและแข็งตัว ย้ายเชื้อราลงไปเลี้ยงในหลอดโดยใช้เข็มเขี่ยแตะสปอร์ของราไปวางบนผิวหน้าอาหาร บ่มไว้จนเชื้อราเจริญปกคลุมทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียม glyceral 10% v/v ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เททับผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญให้ถึงขีด 1.8 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท นำหลอดไปตรึงกับก้านเก็บแล้วนำไปวางไว้ในถังน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่มีฝาปิดสนิท เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย