บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การสำรวจ เก็บรวบรวมเชื้อราสนิมใบกาแฟ และทำการประเมินโรคราสนิมใบกาแฟในแปลงปลูก

1.1 สำรวจ และเก็บตัวอย่างของใบกาแฟที่เป็นโรคราสนิมในพื้นที่ภาคเหนือ ได้แก่ 1. ตำบลวาวี อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย 2. ตำบลเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัด เชียงใหม่ 3. ตำบลอมก๋อย อำเภออมก๋อย จังหวัด เชียงใหม่ 4. ตำบลปางมะผ้า อำเภอปางมะผ้า จังหวัด แม่ฮ่องสอน 5. ตำบลแม่เหาะ อำเภอแม่สะเรียง จังหวัด แม่ฮ่องสอน และ 6. ตำบลห้วยห้อม อำเภอ แม่ลาน้อย จังหวัดแม่ฮ่องสอน (ตารางที่ 4) โดยมุ่งเน้นหาลักษณะอาการที่เชื้อราสนิมซึ่งอยู่ด้านใต้ใบ จากนั้นนำตัวอย่างใบกาแฟมาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสนิมทันที สำหรับกรณีที่ไม่สามารถทำเสร็จภายในวันเดียวได้จะแบ่งทำ herbarium ไว้ส่วนหนึ่ง และอีกส่วนหนึ่งนำใส่ถุงพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจสอบในวันต่อไป

1.2 ประเมินระดับความรุนแรงของโรคราสนิมใบกาแฟในแปลงปลูกกาแฟ 6 แหล่ง ได้แก่ 1. ตำบลวาวี อำเภอแม่สรวยจังหวัด เชียงราย 2. ตำบลเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัด เชียงใหม่ 3. ตำบลอมก๋อย อำเภออมก๋อย จังหวัด เชียงใหม่ 4. ตำบลปางมะผ้า อำเภอปางมะผ้า จังหวัด แม่ฮ่องสอน 5. ตำบลแม่เหาะ อำเภอแม่สะเรียง จังหวัด แม่ฮ่องสอน และ 6. ตำบลห้วยห้อม อำเภอ แม่ลาน้อย จังหวัดแม่ฮ่องสอน (ตารางที่ 4) โดยการสำรวจใช้วิธีการสุ่มตรวจจากต้นกาแฟจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 50 ต้น จากการนับจำนวนต้นกาแฟด้านกว้าง 10 ต้น × ด้านยาว 10 ต้น โดยเดินสำรวจปริมาณโรคราสนิมใบกาแฟเป็นแนวเส้นทแยงมุม (ภาพที่ 3) ทำการนับจำนวนต้นกาแฟที่เกิดโรคทั้งหมด บันทึกระดับความรุนแรง และคำนวณเป็นตัวเลขการเกิดโรคดังนี้

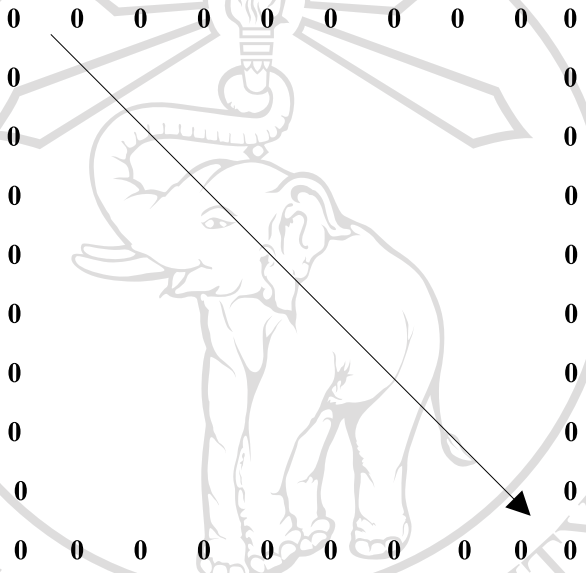
$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกาแฟที่เป็นโรค} \times 100}{\text{จำนวนต้นกาแฟที่สุ่มตรวจทั้งหมด}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในแต่ละระดับ = $\frac{\text{จำนวนต้นกาแฟในแต่ละระดับการเกิดโรค} \times 100}{\text{จำนวนต้นกาแฟที่เป็นโรค}}$

ดัชนีความรุนแรงของโรค = $\frac{n1 + n2 \times 2 + n3 \times 3 + n4 \times 4 + \ldots\ldots n9 \times 9}{n1 + n2 + n3 + \ldots\ldots n9}$

(n1 ถึง n9 = จำนวนต้นกาแฟในแต่ละระดับความรุนแรง)



ภาพที่ 3 ลักษณะการเดินสำรวจปริมาณและความรุนแรงโรคราสนิมใบกาแฟเป็นแนวเส้นทแยงมุม

สำหรับหลักเกณฑ์การประเมินความรุนแรงของโรคราสนิมใบกาแฟประยุกต์มาจากหลักเกณฑ์ของ Eskes และ Toma-Braghini (1981) ดังตารางที่ 5

หลังจากเดินสำรวจปริมาณโรคราสนิมใบกาแฟแล้วทำการนับจำนวนต้นกาแฟที่เกิดโรคทั้งหมด บันทึกระดับความรุนแรง (ภาพที่ 4) และคำนวณเป็นดัชนีการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค จากนั้นจึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ และนำค่าเฉลี่ยดัชนีการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของแปลงต่างๆ มาเปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference (LSD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ที่ตั้งแปลงปลูกกาแฟในพื้นที่ภาคเหนือที่ใช้ในการสำรวจ และประเมินโรคราสนิม

รหัสแปลง	ที่ตั้งแปลงปลูกกาแฟที่ใช้ในการสำรวจ และประเมินโรคราสนิม
DIC 101 DIC 102 DIC 103 DIC 104 DIC 105 DIC 106 DIC 107	หมู่บ้านดอยช้าง ตำบลวาวี อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย
OKS 101	โรงเรียนอมก๋อยวิทยา ตำบลอมก๋อย อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่
SPS 101	ศูนย์พัฒนาสังคมหน่วยที่ 3 ตำบลแม่เหาะ อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน
MH 101	หมู่บ้านแม่เหาะ ตำบลแม่เหาะ อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน
HH 101	หมู่บ้านห้วยห้อม ตำบลห้วยห้อม อำเภอแม่ลาน้อย จังหวัดแม่ฮ่องสอน
PHJ 101	หมู่บ้านผาเจริญ ตำบลปางมะผ้า อำเภอปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอน
PJP 101	หมู่บ้านปางจำปี ตำบลเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่
PP 101	หมู่บ้านป่าป่าน ตำบลเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่
PB 101	หมู่บ้านปางบง ตำบลเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่
MT 101 MT 102 MT 103 MT 104 MT 105	หมู่บ้านแม่ตอน ตำบลเทพเสด็จ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 วิธีการประเมินผลความระดับความรุนแรงของโรคราสนิมใบกาแฟโดยอาศัยการแสดงออกของลักษณะปฏิกิริยา

ดัชนี	การจำแนกลักษณะอาการของแผลตามศูนย์วิจัยโรคราสนิมกาแฟ	ลักษณะของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ใบหรือทั้งต้น
0	I	ไม่มีปฏิกิริยาเลย
1	fl –, t -	จุดสีซีดเล็ก ๆ และมักพบมีอาการเนื้อเยื่อนูนบวมร่วมอยู่ด้วย บางครั้งต้องใช้ hand lens หรือต้องยกขึ้นส่องกับแสงแดดจึงจะเห็น หรือแสดงอาการ 10 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
2	fl, t, 0	จุดสีซีดใหญ่ขึ้น มักพบมีอาการเนื้อเยื่อนูนบวมร่วมอยู่ด้วย หรือแสดงอาการ 20 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
3	fl, t, 0, 0+	จุดสีซีดที่มีหลาย ๆขนาดอยู่ด้วยกัน และรวมกันเป็นบริเวณกว้างสีซีด (chlorotic area) ขนาดใหญ่ มีอาการเนื้อเยื่อนูนบวมน้อยมาก ไม่มีการสร้างสปอร์ หรือแสดงอาการ 30 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
4	fl, t, 0,-1	จุดสีซีดที่มีหลาย ๆขนาดอยู่ด้วยกัน ในแผลแบบ chlorotic lesion ขนาดใหญ่ อาจมีการสร้างสปอร์บ้าง มีแผลที่สร้างสปอร์ได้ไม่เกิน 25% ของแผลทั้งหมด มีอาการเนื้อเยื่อนูนบวมรอบแผลน้อยมาก บางครั้งแผลเกิด necrosis เร็วกว่าปกติ หรือแสดงอาการ 40 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
5	fl, t, 0-2	เหมือน 4 แต่มีการสร้างสปอร์มากกว่า โดยมีแผลที่สร้างสปอร์ได้ไม่เกิน 50% ของแผลทั้งหมด หรือแสดงอาการ 50 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
6	fl, t, 0-3	เหมือน 5 แต่มีการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้น โดยมีแผลที่สร้างสปอร์ได้ไม่เกิน 75% ของแผลทั้งหมด หรือแสดงอาการ 60 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
7	fl, t, 0-4	เหมือน 6 แต่มีการสร้างสปอร์มากมาย โดยมีแผลที่สร้างสปอร์ได้ถึง 95% ของแผลทั้งหมด หรือแสดงอาการ 70 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
8	t, 2-4	มีแผลที่สร้างสปอร์ได้หลาย ๆระดับอยู่ปนกัน บางครั้งพบมีอาการเนื้อเยื่อนูนบวมรอบ ๆแผลบ้าง หรือแสดงอาการ 80 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้น
9	4	มีแต่แผลที่สร้างสปอร์อยู่มากมาย และไม่มีอาการเหลือง (chlorosis) รอบ ๆแผล หรือแสดงอาการ 90 เปอร์เซ็นต์ของทั้งต้นขึ้นไป

ที่มา : Eskes and Toma-Braghini (1981) อ้างโดยศุภชัย (2532)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

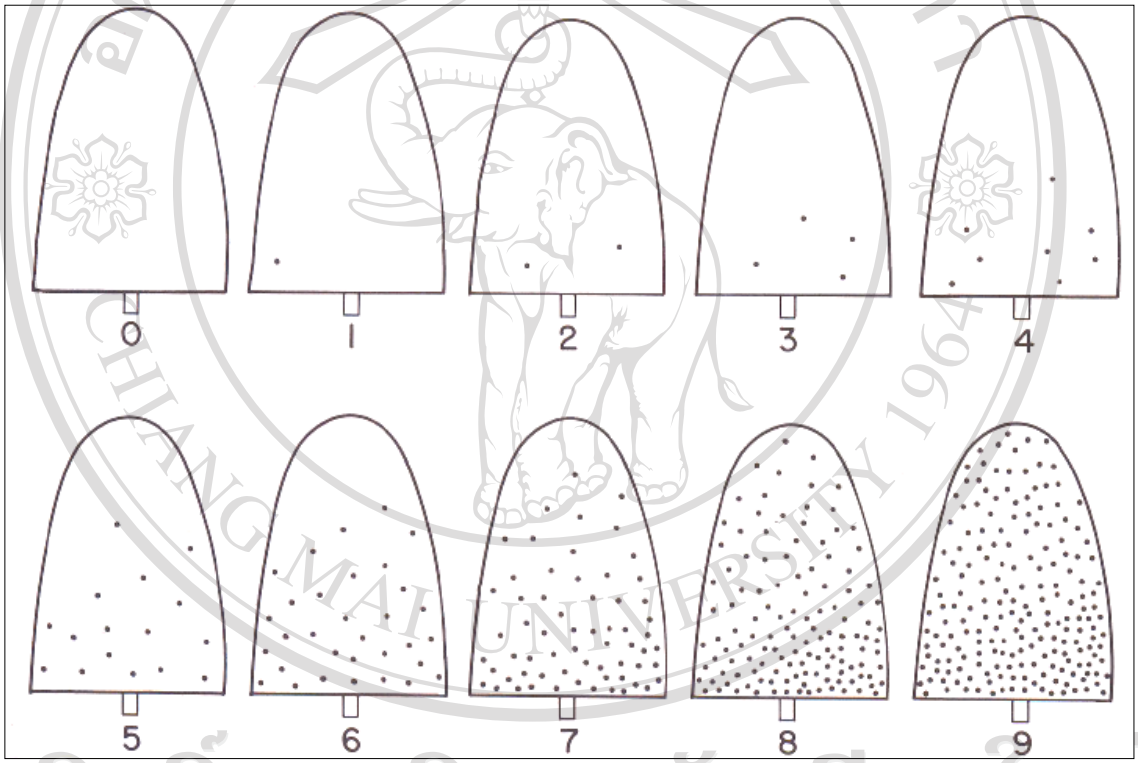
ดัชนีแบบที่ 1 ถึงที่ 9 เป็นลักษณะแบบ intermediate ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามความหนาแน่นของการสร้างสปอร์ต่อแผล ร่วมกับการเพิ่มสัดส่วนของแผลที่สร้างสปอร์ได้ แต่ถ้าจะให้ง่ายต่อการรายงานผลก็อาจรวมดัชนีแต่ละระดับให้น้อยลง โดยให้

ดัชนีที่ 1, 2, 3 = HR (highly resistant = ต้านทานโรค)

ดัชนีที่ 4 และ 5 = MR (moderately resistant = ต้านทานโรคปานกลาง)

ดัชนีที่ 6 และ 7 = MS (moderately susceptible = ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรค)

ดัชนีที่ 8 และ 9 = S (susceptible = อ่อนแอต่อโรค)



ภาพที่ 4 ระดับความรุนแรงของโรคราสนิมของกาแฟโดยอาศัยการแสดงออกของลักษณะปฏิกิริยาของเชื้อราสนิมกับใบกาแฟ (Eskes and Toma-Braghini, 1981)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 ประเมินระดับความรุนแรงของโรคราสนิมใบกาแฟในแปลงปลูกกาแฟอราบิก้าที่เป็นระบบการปลูกกาแฟกลางแจ้ง เปรียบเทียบกับแปลงปลูกกาแฟอราบิก้าที่เป็นระบบการปลูกภายใต้ร่มเงา โดยการสำรวจใช้วิธีการสุ่มตรวจจากต้นกาแฟจำนวน 15 ซ้ำๆ ละ 50 ต้น จากการนับจำนวนต้นกาแฟด้านกว้าง 10 ต้น × ด้านยาว 10 ต้น โดยเดินสำรวจปริมาณโรคราสนิมใบกาแฟเป็นแนวเส้นทแยงมุม (ภาพที่ 3) ทำการนับจำนวนต้นกาแฟที่เกิดโรคทั้งหมด บันทึกระดับความรุนแรง และ

คำนวณเป็นค่าดัชนีความรุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคราสนิมใบกาแฟแล้วจึงนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ และนำค่าเฉลี่ยของแปลงทั้งสองมาเปรียบเทียบโดยวิธี LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Hemileia vastatrix*

2.1 เลือกตัวอย่างใบกาแฟที่มีโคโลนีของเชื้อราสนิมที่ไม่มีเชื้อราอื่นปน จากนั้นตัดเนื้อเยื่อใบกาแฟตามวิธีการ paraffin section ของวิชชา (2524) โดยแบ่งได้เป็นขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.1.1 การตัดตัวอย่างใบกาแฟที่เป็นโรค

เมื่อเก็บใบกาแฟที่เป็นโรคมาได้แล้วก็ต้องนำมาตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดพอเหมาะจะตัดได้ด้วยเครื่อง rotary microtome โดยขนาดชิ้นส่วนของใบกาแฟที่ตัดได้ไม่ควรยาวเกิน 5 มิลลิเมตร

2.1.2 การรักษาสภาพโครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ (Fixtation)

นำชิ้นส่วนของใบกาแฟที่ตัดได้มาทำการฆ่าและการรักษาสภาพโครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ โดยนำชิ้นส่วนของใบกาแฟแช่ในขวดที่มีน้ำยา FAA (ภาคผนวก ก 1) แช่เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อรักษาสภาพของเซลล์

2.1.3 การไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อใบกาแฟโดยการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ (Dehydration)

นำชิ้นส่วนพืชมาล้างน้ำยาออก โดยเทน้ำยาออกจากขวดที่ใช้แช่ชิ้นส่วนพืช ใช้ผ้าขาวบางปิดปากขวดและนำยางรัดมารัดไว้ จากนั้นนำไปใส่ในบีกเกอร์ นำบีกเกอร์ไปตั้งในอ่างน้ำเปิดน้ำให้น้ำไหลลงบีกเกอร์ช้าๆ ใช้เวลาประมาณ 7 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งหมดกลิ่นของ glacial acetic จากนั้นนำขวดที่บรรจุชิ้นส่วนของใบกาแฟมาเทน้ำออกให้หมด แล้วทำการไล่น้ำออกจากเนื้อเยื่อพืชโดยนำชิ้นส่วนของใบกาแฟที่ล้างเอาน้ำยาออกมาแช่ใน 50 % ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2-4 ชั่วโมง เพื่อล้าง acetic acid และ formalin ออก จากนั้นนำไปไล่น้ำออก โดยแช่ใน TBA ขั้นตอนที่ 1 ถึง 8 โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลาในการแช่เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง (ภาคผนวก ก 2)

2.1.4 การแทนที่แอลกอฮอล์ในเนื้อเยื่อใบกาแฟด้วยพาราฟิน (Infiltration) และการฝังชิ้นส่วนใบกาแฟในบล็อกพาราฟิน (Embedding)

หลังจากชิ้นส่วนของใบกาแฟได้ผ่านการไล่น้ำออกด้วย TBA ในขั้นตอนที่ 8 แล้วจะไม่เท TBA ออกแต่เติมพาราฟินลงไป นำขวดที่บรรจุ TBA ชิ้นส่วนใบกาแฟ และพาราฟินเปิดฝาออก และนำไปตั้งไว้ที่ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ปรับอุณหภูมิที่ 60-62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อหลอมพาราฟิน และระเหย TBA ออกไป พาราฟินออกจากขวดประมาณครึ่งหนึ่ง และเติมพาราฟินใหม่ที่หลอมอยู่ ต่อมาอีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเทพาราฟินในขวดออกให้หมดทำการเปลี่ยนพาราฟินในขวดอีก 2 ครั้งๆ ละ 2 ชั่วโมง ครั้งสุดท้ายอบในตู้อบเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อมานำชิ้นส่วนของพืชไปฝังลงในพาราฟิน นำถาดมาอุ่นให้ร้อนโดยวางบนแผ่นให้ความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ร้อน (hot plate) เทพาราฟินหลอมเหลวลงในถาด ย้ายถาดมาวางลงในจานที่ใส่น้ำไว้ตื้นๆ รอจนพาราฟินเริ่มแข็งตัว ซึ่งจะเริ่มจากก้นถาดขึ้นมาประมาณ 2 มิลลิเมตร จึงใช้คีมคีบร้อนๆ คีบชิ้นส่วนของใบกาแฟที่แช่ในพาราฟินมาจัดวางลงในถาด 2 ชิ้นต่อถาด รอให้พาราฟินแข็งตัวจนถึงผิวบนจึงนำถาดไปไว้ในตู้เย็นพาราฟินจะหดตัวร่อนออกมาจากถาด จากพาราฟินบล็อกที่แกะได้จากถาดเมื่อจะนำมาทำการตัดต้องนำมาแบ่งเป็นบล็อกย่อย 2 บล็อก ทำได้โดยใช้ใบมีดโกนคมตัดแบ่งตรงกลางระหว่างชิ้นส่วนของพืชทั้ง 2 โดยตัดให้เป็นรูปตัว V ให้ลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร จากนั้นหักออกจากกันตามรอยตัด ตัดแต่งบล็อกย่อยแบบหยาบๆ ด้วยใบมีดโกนให้ทุกด้านเรียบ จากนั้นนำไปเชื่อมติดกับบล็อกไม้ ซึ่งบล็อกไม้ที่ใช้ควรมีขนาด 1×1×2 เซนติเมตร นำบล็อกไม้ที่จะต่อเชื่อมกับพาราฟินบล็อกไปลนไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์จนพาราฟินส่วนที่ใกล้ไฟหลอมตัว จึงนำบล็อกไม้และพาราฟินบล็อกมาต่อติดกัน ตัดแต่งพาราฟินบล็อกบนบล็อกไม้ด้วยใบมีดโกนให้ด้านจะตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมมีด้านบนขนานกับด้านล่าง ในการตัดแต่งพยายามทำให้ชิ้นส่วนของใบกาแฟอยู่ในตำแหน่งตรงกลางของรูปสี่เหลี่ยม โดยห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตรทุกด้าน หลังจากตัดแต่งแล้วก็นำบล็อกไม้ที่มีพาราฟินบล็อกติดอยู่ไปเก็บไว้ในตู้เย็นแล้วจึงนำไปตัดด้วยเครื่อง rotary microtome เมื่อทำการตัด 1 ครั้งจะได้ชิ้นส่วนออกมา 1 ชิ้น โดยแต่ละชิ้นส่วนมีความหนาประมาณ 30 ไมโครเมตร และชิ้นส่วนที่ถูกตัดออกมาจะต่อกันเป็นสายยาวคล้ายริบบิ้น จึงเรียกว่า ribbon

2.1.5 การติด ribbon ลงบนสไลด์แก้ว

หยด Mayer's adhesive (เตรียมจากส่วนผสมของไข่ขาวและกลีเซอรีนในอัตราส่วน 1 : 1) ลงบนสไลด์หยดเล็กๆ ใช้นิ้วเกลี่ยให้คลุม 3 ใน 4 ของผิวหน้าสไลด์ ด้านใดด้านหนึ่ง จากนั้นหยดฟอร์มาลิน 4 % ในน้ำให้คลุมบริเวณที่ทา adhesive ไว้ ใช้มีดโกนตัด ribbon และนำมาลอยบนน้ำฟอร์มาลิน ย้ายสไลด์ไปวางบน hot plate (40-43 องศาเซลเซียส) จัด ribbon ให้อยู่ตรงตำแหน่งที่ต้องการและรอจน ribbon เหยียดตึงจึงยกเอาสไลด์ออกมาเทและซับสารละลายฟอร์มาลินออก ผึ่งสไลด์ไว้เป็นเวลาประมาณ 3 วันในที่ปราศจากฝุ่น เพื่อให้ตัวอย่างยึดเกาะกับแผ่นสไลด์ก่อนจึงนำไปย้อมสีในขั้นตอนต่อไป

2.1.6 การย้อมสีเนื้อเยื่อใบกาแฟ

การย้อมสีเนื้อเยื่อใบกาแฟที่ได้จากการทำ paraffin section ก่อนที่จะทำการย้อมสีจะต้องนำมาผ่านขั้นตอนละลายเอาพาราฟินออกก่อนโดยนำสไลด์ที่มี ribbon ติดอยู่มาแช่ใน xylene เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นก็ย้ายไปแช่ในสารละลาย xylene-absolute alcohol (1:1) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปย้อมด้วยสี safranin-fast green (ภาคผนวก ก 3) แล้วนำตัวอย่างไปวางบนสไลด์แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100, 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ sorus ของ uredium, uredium และ urediospore

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.7 การวัดขนาดของ urediospore ของเชื้อราสนิมใบกาแฟ

ทำการวัดขนาดของ urediospore โดยนำเทปใสกดลงบนโคโลนีของเชื้อราสนิมที่เลือกไว้ จากนั้นนำมาวางลงบนหยดน้ำกลั่นที่อยู่บนสไลด์และทำการไล่ฟองอากาศออก แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ทำการวัดขนาดความกว้างและความยาวของ urediospore จำนวน 30 เซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง และคำนวณหาค่าเฉลี่ย

2.2 ทำการเลือกตัวอย่างใบกาแฟที่มีโคโลนีของเชื้อราสนิมที่ไม่มีเชื้อราอื่นปน แล้วนำชิ้นส่วนของใบกาแฟที่ตัดได้มาเข้าขบวนการเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scaning electron microscope, SEM) ตามวิธีการของ Yukawa and Tanaka (1979) (อ้างโดย Mccain and Hennen, 1984) รายละเอียดดังนี้

2.2.1 ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ตัดตัวอย่างใบกาแฟเป็นแผ่นวงกลมเพื่อให้เล็กกว่าขนาดพื้นที่หน้าตัดของแท่นรองรับเล็กน้อย ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางของแท่นที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ SEM มีขนาดประมาณ 9 มิลลิเมตร เพื่อสะดวกในการเตรียมตัวอย่างและสามารถใช้กล้องตรวจดูได้อย่างทั่วถึง

2.2.2 แช่ชิ้นใบกาแฟที่ตัดได้ในสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7 แล้วนำไปใส่ในตู้ดูดความชื้น (desicator) และใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ดูดอากาศออกเพื่อให้สารละลาย glutaraldehyde แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อดียิ่งขึ้น จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 4 ชั่วโมง

2.2.3 ล้างตัวอย่างด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (pH 7) 2 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน alcohol series เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ทีละน้อย โดยเริ่มจากแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 30, 50, 70, 80, 90 และ 95% ขั้นตอนละ 15 นาที แล้วย้ายไปแช่ใน amyl acetate เป็นเวลา 10 นาที จึงนำตัวอย่างขึ้นมาซับด้วยกระดาษกรอง และบรรจุในตะกร้าแล้วเอาไปทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง critical point dryer (CPD) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเป็น transitional fluid ไปไล่ที่ amyl acetate ซึ่งเป็น intermediate fluid และตัวอย่างจะระเหยแห้งอย่างรวดเร็ว ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์มีจุดวิกฤตที่อุณหภูมิ 31.1 องศาเซลเซียส ความดัน 1,073 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.2.4 ใช้คีมคีบตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดน้ำออกตามวิธีการในข้อที่ 2.3.3 ซึ่งแห้งแล้วมาติดบนแท่นรองรับทองเหลือง (stub) โดยยึดตัวอย่างติดกับแท่นด้วยเทปกาว 2 หน้าหรือ silver paste ซึ่งเป็นกาวผสมกับเงิน เพื่อช่วยให้เป็นสื่อนำอิเล็กตรอนลง ground และป้องกันการ charge-up ที่ผิวตัวอย่าง แล้วนำไปเคลือบ gold-palladium alloy (ในอัตราส่วน 40 : 60) ด้วยเครื่อง ion sputter ในสภาพสุญญากาศเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆได้แก่ sorus ของ uredium, uredium และ urediospore ของเชื้อรา *H. vastatrix*

3. การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Hemileia vastatrix* ที่เป็นสาเหตุของโรคราสนิมใบกาแฟโดยเทคนิคทางอณูโมเลกุล

3.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราสนิม ใบกาแฟและราสนิมใบ ข้าวโพด โดยเขี่ยสปอร์ของราสนิมประมาณ 200-300 สปอร์ จาก 1 แผล (single uredium/ single pustule) ภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereo microscope) บดสปอร์ให้แตก โดยใช้สไลด์แก้วสองแผ่นวางประกบให้สปอร์อยู่ตรงกลาง และใช้ดินสอด้านปลายที่เป็นยางลบกด เพื่อบดให้สปอร์แตก จากนั้นใช้ extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.01% SDS) เพื่อล้างสปอร์ที่แตกจากแผ่นสไลด์ทั้ง 2 แผ่น ดูดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ตรงตำแหน่ง rDNA เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและลำดับเบสของดีเอ็นเอต่อไป

3.2 การเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcribed spacer)

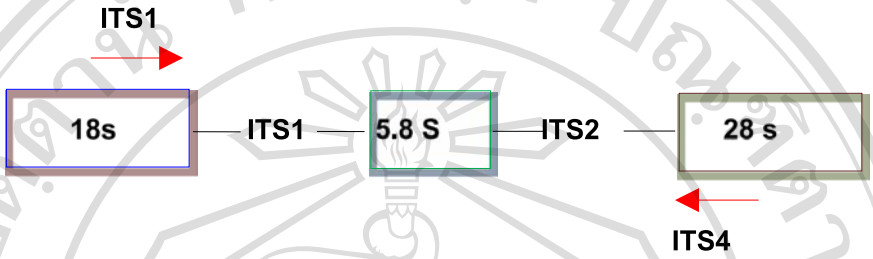
นำดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมมาเพิ่มปริมาณตรงบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al*., 1990) อย่างละ 0.2 pmol, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 10X PCR buffer และ 1 unit *Taq* polymerase โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยาดังนี้

1. initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ	
2. denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	35 รอบ
3. annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
4. extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
5. final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นนำผลผลิตจาก PCR ที่ได้มาตรวจสอบโดยทำ gel electrophoresis โดยนำผลผลิตจาก PCR มา 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตรแล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1% agarose gels electrophoresis ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์นาน 40 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 5 นาที

ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต แล้ว นำผลผลิตจาก PCR มาแยก หรือทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ MicroSpin S-400 HR column จากนั้นส่งไปเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ เทคโนโลยี อาคารศูนย์เทคโนโลยีดีเอ็นเอและจีโนมิคส์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม



ภาพที่ 5 แผนภาพแสดงบริเวณ 18S, 5.8S, 28S, ITS rDNA และตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS1/ ITS4

3.3 การทำ Sequence alignment และการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราสนิมทุกตัวอย่างที่ได้นำมาทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W (Thompson *et al*., 1994) โดยใช้ตัวอย่างที่ศึกษาร่วมกับตัวอย่างที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล DDBJ (DNA Data Bank of Japan) จากนั้นนำข้อมูล alignment มาสร้าง phylogenetic tree เลือกวิธี maximum parsimony methods และ UPGMA ใน MEGA version 4.1 สำหรับการหาค่า bootstrap ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเดียวกันจำนวน 1,000 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved