

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การสำรวจและรวบรวมข้อมูลการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเพบรินของไหม

#### 1.1 การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างไหม

โดยการสำรวจและรวบรวมเก็บตัวอย่างไหมจากแหล่งปลูกหม่อน-เลี้ยงไหมบ้าน (ไหมหม่อน) ที่สำคัญในบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงของจังหวัดขอนแก่น ทั้งนี้จะสุ่มเก็บตัวอย่างจากทุกระยะการเจริญเติบโต ระยะใดก็ได้ ซึ่งอาจเป็น ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย โดยขึ้นอยู่กับวิธีการพบระยะใด ซึ่งอาจจะมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต รวมทั้งอาจมีลักษณะผิดปกติหรือไม่ก็ได้ สำหรับอาการของไหมที่เป็นโรคนั้นมีลักษณะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆเช่น พันธุ์ไหม ระยะการเจริญเติบโตของไหม โดยทั่วไปในระยะหนอนมักพบมีอาการต่างๆกัน เช่น ขนาดเล็ก ลำตัวหดสั้น แคระแกรน นอนซีกกว่าปกติ เจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ แม้กระทั่งมีอาการของโรคอื่นๆร่วมด้วย ในระยะดักแด้ผิวของดักแด้มีลักษณะไม่เป็นมัน ขนาดและรูปร่างผิดปกติ ส่วนในระยะผีเสื้อมักพบว่าปีกหงิกงอ รูปร่างและขนาดผิดปกติ สำหรับการเก็บตัวอย่างนั้น โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างที่สำรวจพบในแต่ละระยะการเจริญเติบโต (Anonymous, 1975; Jolly, 1986) ซึ่งใช้หลักในการสุ่มเก็บตัวอย่างโดยทั่วไปถ้าทำได้จะสุ่มเก็บประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนที่พบและเกษตรกร ซึ่งจะแยกตามครัวเรือน พันธุ์ และลักษณะอาการของไหม ใส่ในถุงพลาสติกหรือกล่องฟิล์ม ปิดฝาให้สนิท บันทึกข้อมูล ได้แก่ วันเดือนปี สถานที่เก็บ ชื่อเกษตรกร ชื่อพันธุ์และลักษณะอาการของไหม จากนั้นแช่ตัวอย่างในกระดิกน้ำแข็ง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย และเพื่อไม่ให้เกิดการเข้าทำลายของเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุของโรค (secondary infection) ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆที่เกิดขึ้นทีหลัง จะส่งผลให้การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคน่าสงสัยขึ้น จากนั้นนำไปตรวจหาสปอร์ของเชื้อสาเหตุของโรคเพบริน (*Nosema bombycis*) ทันที่ (ภาคผนวก ก) หากยังไม่สามารถตรวจสอบได้ทันที ให้เก็บตัวอย่างไว้ชั่วคราวไว้ตรวจในตู้เย็น (ประมาณ 4 องศาเซลเซียส) หรือที่ -20 องศาเซลเซียสเมื่อจำเป็นต้องเก็บไว้นานๆ เพื่อรอการตรวจสอบต่อไป

### 2. การศึกษาแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเพบริน/*Nosema* spp.

#### 2.1 การคัดเลือกครัวเรือนเลี้ยงไหมตัวแทนเพื่อการทดลอง

คัดเลือกครัวเรือนสำหรับใช้ในการทดสอบ จากหมู่บ้านที่ได้จากการสำรวจตามข้อ 1.1 โดยคัดเลือกจากครัวเรือนที่ตรวจไม่พบโรคเพบรินจำนวน 1 ครัวเรือน และครัวเรือนที่ตรวจพบ

โรคเพบริน จำนวน 3 ครัวเรือน ทั้งนี้จะต้องเป็นครัวเรือนที่อยู่ในหมู่บ้านเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติงาน อีกทั้งให้อยู่ในบริเวณที่มีสิ่งแวดล้อมคล้ายกัน และมีการปฏิบัติในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน โดยต้องมีการเพาะเลี้ยงไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง หากเป็นไปได้จะเลือกไหมจากครัวเรือนที่เพาะเลี้ยงไหมพันธุ์เดียวกัน จากนั้นขอความร่วมมือและกำหนดให้แต่ละครัวเรือนตัวแทนเพาะเลี้ยงไหมพันธุ์ไทยพื้นเมืองพันธุ์เดิมที่เกษตรกรนั้นๆ เพาะเลี้ยงอยู่แล้ว เพื่อใช้ในการทดลอง โดยแยกออกมาจากการเพาะเลี้ยงตามปกติของเกษตรกร เพื่อใช้ในการศึกษานี้จำนวน 3 กระด้งๆละ 500 ตัว และสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว ในทุกๆระยะการเจริญเติบโตของไหม (ไข่ หนอนไหมวัย 1 ถึงวัย 5 ดักแด้ และตัวเต็มวัย) เป็นระยะเวลา 3 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน โดยเริ่มจากเดือนพฤษภาคม 2551 ถึง เดือนพฤษภาคม 2552 โดยมีการตรวจหาสปอร์ของเชื้อ พร้อมทั้งบันทึกข้อมูล จำนวน รูปร่าง ลักษณะ และขนาดสปอร์ (กว้าง x ยาว) ของเชื้อ *N. bombycis* ที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่าง การตรวจหาเชื้อนี้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ ภาคผนวก ก อีกทั้งรวบรวมข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นจากกรมอุตุนิยมวิทยา (2553) (ภาคผนวก ค)

## 2.2 การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงไหม

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงไหมจะได้ไหมที่แข็งแรงหรืออ่อนแอ นั้น นอกจากขึ้นอยู่กับพันธุ์ไหมแล้ว ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องคือ ผู้เพาะเลี้ยงมีความรู้และปฏิบัติที่ถูกต้อง มีความใส่ใจพอเพียง อีกทั้งต้องเข้าใจถึงแหล่งแพร่ระบาดหรือแหล่งสะสมของเชื้อสาเหตุของโรค อาทิ ผู้เลี้ยง (มือ) วัสดุอุปกรณ์ (กระด้ง จ่อ ผ้าคลุมกระด้ง) และแปลงพืชอาหาร (ใบหม่อน แมลงพาหะ)

การศึกษานี้ดำเนินการ โดยนำสำลีพันก้านซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้สำลีมีขนาดเท่าๆกัน จากนั้นนำมาจุ่มน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 2 มิลลิลิตร ปาดปัจจัยต่างๆต่อการแพร่ระบาดของสปอร์ของเชื้อ ที่ต้องการศึกษา คือ มือผู้เลี้ยงทั้ง 2 ซ้าง ใบหม่อน และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไหมของเกษตรกร ได้แก่ กระด้ง จ่อ และผ้าคลุมกระด้ง ซึ่งในการทดลองแต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 3 ซ้ำ โดยมีพื้นที่ในการปาดด้วยสำลี 20 x 20 เซนติเมตรของทุกปัจจัยที่ศึกษานี้ โดยกระทำเช่นนี้ในทุกๆระยะการเจริญเติบโตของหนอนไหม (หนอนไหมวัย 1 ถึงวัย 5) ศึกษาเช่นนี้ขณะที่เกษตรกรเลี้ยงไหมเป็นเวลา 3 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน ในครัวเรือนที่คัดเลือกแล้วในข้อ 2.1 หลังจากที่ได้ปาดหาสปอร์ของเชื้อจากปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงไหมแล้ว นำสำลีที่ได้เก็บใส่ถุงพลาสติกที่สะอาดแล้วมัดปิดปากถุง หากไม่สามารถศึกษาได้ทันทีให้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงในน้ำ 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (เครื่องปั่นเหวี่ยงยี่ห้อ GLC-1 General Laboratory Centrifuge) โดยประยุกต์ตามวิธีของกรมส่งเสริมการเกษตร (2535) (ซึ่งใช้ที่ 2,600-3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 3 นาที) จากนั้นดูค่าน้ำข้างบนออกจำนวน 19 มิลลิลิตร น้ำที่เหลือซึ่งอยู่บริเวณด้านล่างจำนวน

1 มิลลิเมตร นำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จึงคูลน้ำข้างบนออก จำนวน 800 ไมโครลิตร นำน้ำที่เหลือซึ่งอยู่บริเวณด้านล่างจำนวน 200 ไมโครลิตร ไปตรวจหาสปอร์ของเชื้อด้วยการหยดสารแขวนลอยที่ได้จำนวน 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วตรวจหาสปอร์ของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกข้อมูลจำนวน รูปร่างลักษณะ และขนาดสปอร์ (กว้าง x ยาว) ของเชื้อที่ตรวจพบในแต่ละซ้ำของแต่ละตัวอย่าง และหาค่าเฉลี่ย

### 2.3 การตรวจหาเชื้อ *Nosema* spp. จากแมลงในแปลงหม่อน

การศึกษาโดยการสุ่มโฉบแมลงชนิดต่างๆภายในแปลงหม่อนที่มีการนำไปเพาะเลี้ยงไหมของเกษตรกรครัวเรือนตัวแทนแต่ละครัวเรือน เป็นระยะเวลา 3 ฤดู กล่าวคือให้ใช้แปลงหม่อนของครัวเรือนตัวแทนนั้นๆ ในการเลี้ยงไหมโดยจะไม่ใช้แปลงหม่อนร่วมกัน โดยจะกำหนดพื้นที่ในการสุ่มโฉบแมลงของแต่ละครัวเรือนจำนวน 1 งาน และโฉบ 5 จุด ในแนวทแยงมุมตัดกันเป็นรูปกากบาท ซึ่งแต่ละจุดรัศมีกว้าง 2 เมตร โฉบจำนวน 20 ครั้งในแต่ละจุดภายในแปลง จากนั้นนำแมลงที่สำรวจพบมาบันทึกภาพ จำแนกชนิด บดตัวอย่างแมลงเพื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูล จำนวน รูปร่าง ลักษณะ และขนาดของสปอร์ (กว้าง x ยาว) ของเชื้อ *Nosema* spp. ที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่าง หากไม่สามารถตรวจได้ทันทีให้เก็บตัวอย่างไว้ชั่วคราวไว้ตรวจในตู้เย็น (ประมาณ 4 องศาเซลเซียส) หรือที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจำเป็นต้องเก็บไว้ยาวนานๆ เพื่อรอการตรวจสอบต่อไป การเตรียมสไลด์เพื่อตรวจหาเชื้อนี้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ ข้อ 2.2

### 2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงไหมต่อการติดเชื้อ

ศึกษาโดยอาศัยการตรวจหาสปอร์ของเชื้อสาเหตุ นับจำนวน และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (รูปร่างลักษณะ และขนาด) ของสปอร์ของเชื้อสาเหตุ *N. bombycis/Nosema* spp. จากตัวอย่างที่สุ่มได้จากปัจจัยต่างๆที่ได้ในการทดลอง (ข้อ 2.2) ซึ่งเป็นผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงไหมของครัวเรือนตัวแทนที่สุ่มได้จำนวน 3 ฤดู (ข้อ 2.1) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ของเชื้อที่ตรวจพบในปัจจัยต่างๆ กับการติดเชื้อของไหมในแต่ละครัวเรือนตัวแทนอย่างต่อเนื่อง 3 ฤดู

## 3. การติดเชื้อสาเหตุโรคเพบรินและการเป็นแมลงพาหะของเชื้อ *Nosema* spp.

### 3.1 หนอนกระทุ้หอม

โดยเพาะเลี้ยงหนอนกระทุ้หอมด้วยอาหารเทียมเพื่อผลิตเป็นสต็อก (ภาคผนวก ข) ที่ห้องปฏิบัติการ โรควิทยาของแมลงที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 83 - 84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหนอนกระทุ้หอมเข้าสู่วัย 3 วันที่ 1 คัดเลือกหนอนกระทุ้หอมขนาดเท่าๆกัน จากนั้นนำมาให้อุดอาหารก่อนปลูกเชื้อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง โดยเตรียมอาหารเทียมที่ไม่มีส่วนผสมของ

ฟอรัมาลิน นำมาตัดให้เป็นก้อนเล็กๆขนาด 5x5x5 มิลลิเมตร ใส่ในกล่องฟิล์มขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ฝาปิดเจาะรูมีตาข่ายปิด จำนวน 1 ชั้นต่อกล่องฟิล์ม จากนั้นหยดเชื้อ *N. bombycis* ไอโซเลต “หน้าค้าง” จำนวน 10 ไมโครลิตร ไว้เฉพาะบนผิวหน้าอาหารเทียม ที่เตรียมทิ้งไว้พอหมาดๆ จึงนำหนอนกระทู้หอมวางบนอาหารเทียมที่หยดเชื้อแล้ว 1 ชั้นอาหารต่อหนอนกระทู้หอม 1 ตัว โดยในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 นั้น ปฏิบัติเช่นเดียวกัน โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ  $1.1 \times 10^4$ ,  $1.1 \times 10^5$  และ  $1.1 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิเมตร จำนวน 3 ซ้ำๆละ 50 ตัว สำหรับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองประยุกต์ตามวิธีของ Tsai และคณะ (2003) โดยดูจากค่า  $LD_{50}$  ที่ความเข้มข้น  $1.1 \times 10^3$  ที่ใช้ปลูกเชื้อกับหนอนกระทู้หอม ส่วนกรรมวิธีควบคุมหยดด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตรต่อตัว จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 83 - 84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 24 ชั่วโมงหรืออาหารหมด ให้คัดเลือกกล่องฟิล์มที่หนอนกินอาหารไม่หมดออก ให้เหลือหนอนกระทู้หอมที่กินอาหารหมดความเข้มข้นละ 30 ตัว จากนั้นเพาะเลี้ยงหนอนต่อไปจนเสร็จสิ้นการทดสอบ ด้วยการเติมอาหารเทียมที่ไม่ได้หยดเชื้อ ประยุกต์ตามวิธีของ ศิวิลัย (2525) Tsai และคณะ (2003) และ สุขลวัจน์ และวัชร (ม.ป.ป.) สังเกตผลการปลูกเชื้อ โดยบันทึกการตายของหนอนกระทู้หอมทุกวัน จนกระทั่งตายหรือเข้าดักเค็ด และออกเป็นตัวเต็มวัย นำมาตรวจหาเชื้อสาเหตุจากหนอน ดักเค็ด ตัวเต็มวัยของหนอนกระทู้หอมที่ตายแล้ว เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม รวมทั้งบันทึก นับจำนวน รูปร่างลักษณะ และขนาดของสปอร์ของเชื้อที่ตรวจพบในทุกครั้งของการทดลอง การตรวจหาเชื้อนั้นปฏิบัติเช่นเดียวกันกับในภาคผนวก ก

### 3.2 หนอนถูน

#### 3.2.1 การสำรวจ

ศึกษาโดยการสุ่มเก็บตัวอย่าง จากตัวหนอนของผีเสื้อหนอนถูนที่อยู่รอบพื้นที่ที่มีการปลูกต้นถูนในบริเวณมหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยสำรวจพื้นที่ละ 30 ต้น จะสุ่มเก็บต้นละ 5 ตัว หากต้นใดมีจำนวนตัวอย่างไม่ครบตามที่กำหนดก็จะเก็บเท่าที่สำรวจพบ โดยสำรวจและรวบรวมตัวหนอนในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน 2553 ซึ่งเป็นช่วงที่มีแมลงชนิดนี้ระบาดมาก และเป็นช่วงที่ใบถูนและใบขี้เหล็กที่เป็นพืชอาหารหลักกำลังแตกใบอ่อน (นิรนาม, 2552) และบริเวณพื้นที่ที่สำรวจมีดังนี้คือ บริเวณถนน มลิวัดย์ฝั่งประตูศรีฐาน บริเวณโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ฝั่งถนนมิตรภาพ บริเวณถนนด้านข้างสาขาวิชาพืชสวน บริเวณสวนร่วมเกล้ากล้วยฤกษ์ บริเวณถนนฝั่งประตูกึ่งศาล และบริเวณถนนด้านหน้าศูนย์การประชุมอเนกประสงค์กาญจนาภิเษกฯ โดยเก็บตัวอย่างใส่ในถุงพลาสติก พร้อมทั้งจดบันทึก บริเวณ ต้นที่สำรวจพบ และถ่ายรูปลักษณะของหนอนที่พบ นำไปจำแนกชนิดของหนอน เพื่อการตรวจหาเชื้อ *Nosema* sp. ต่อไปหากไม่



สามารถตรวจหาเชื้อได้ทันที ให้นำไปเก็บรักษาไว้ชั่วคราวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่หากต้องการเก็บรักษาไว้นานให้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2.2 การตรวจหาสปอร์ของเชื้อ *Nosema* sp.

จากนั้นนำตัวอย่างที่สุ่มรวบรวมได้จากข้อ 3.2.1 มาตรวจ โดยการบดด้วยโกร่ง  $K_2CO_3$  0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 400 และ 800 ไมโครลิตรต่อหนอนหนึ่งตัว สำหรับหนอนตัวเล็ก ( $\leq 2$  เซนติเมตร) และตัวใหญ่ ( $> 2$  เซนติเมตร) ตามลำดับ โดยบดทีละตัว นำตัวอย่างที่บดแล้วไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาสปอร์ของเชื้อ *Nosema* sp. บันทึกผลโดย นับจำนวน ศึกษารูปร่าง ลักษณะ และวัดขนาดสปอร์ (กว้าง x ยาว) การตรวจหาเชื้อนั้นปฏิบัติเช่นเดียวกันกับในภาคผนวก ก อีกทั้งเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่ตรวจพบกับเชื้อ *N. bombycis* ไอโซเลต “หน้าต่าง” สาเหตุโรคเพรินของไหม และซึ่งได้มีการนำมาใช้ในการปลูกให้กับหนอนกระทู้หอมอีกด้วย

## 3.3 ผีเสื้อวงศ์ Pieridae

### 3.3.1 การสำรวจ

ศึกษาโดยสุ่มโฉบผีเสื้อหนอนควงศ์ Pieridae ภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น ช่วงเวลา 8.00 ถึง 10.00 นาฬิกา ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มียางานว่าผีเสื้อโดยทั่วไปจะออกหากิน (นิรนาม, 2551) ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาระหว่างเดือนมกราคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553 จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยสุ่มโฉบผีเสื้อหนอนควงศ์ บันทึกข้อมูลและภาพ นำมาจำแนกชนิดของผีเสื้อที่สุ่มโฉบได้ แล้วจึงนำไปตรวจหาสปอร์ของเชื้อ *Nosema* spp.

### 3.3.2 การตรวจหาสปอร์ของเชื้อ *Nosema* spp.

นำตัวอย่างที่สุ่มรวบรวมได้จากข้อ 3.3.1 มาตรวจ โดยการบดด้วยโกร่งเต็ม  $K_2CO_3$  0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 800 ไมโครลิตรต่อผีเสื้อหนึ่งตัว โดยบดแยกกันนำตัวอย่างที่บดแล้วมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อหาสปอร์ของเชื้อ *Nosema* spp. บันทึกผลโดย นับจำนวน ศึกษารูปร่างและลักษณะ พร้อมทั้งวัดขนาดสปอร์ (กว้าง x ยาว) ของเชื้อสาเหตุที่ตรวจพบ ส่วนการตรวจหาเชื้อปฏิบัติเช่นเดียวกันกับในภาคผนวก ก อีกทั้งเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่ตรวจพบกับเชื้อ *N. bombycis* ไอโซเลต “หน้าต่าง” ที่ได้จากหนอนไหม และซึ่งได้มีการนำมาใช้ในการปลูกให้กับหนอนกระทู้หอมอีกด้วย