บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3.1.3 กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์

3.1.4 กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 และ 90 มล.

3.1.5 จานเพาะเชื้อ

3.1.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์ และไม้ขีดไฟ

3.1.7 ตู้เขี่ยเชื้อ

3.1.8 ถุงผ้าขนาด

3.1.9 บีกเกอร์ขนาด 100 และ 200 มล.

3.1.10 ผ้าขาวบางขนาด 9x20 ซม.

3.1.11 ฟอกกี้

3.1.12 ขวดแก้วทรงกระบอก และสเปรย์หัวฉีด

3.1.13 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.14 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.15 เครื่องผสมสาร

3.1.16 เชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria bassina* จำนวน 12 ไอโซเลท

3.1.17 ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.1.18 ไมโครปิเปตขนาด 5 มล.

3.1.19 Cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.

3.1.20 แผ่นแก้วปิดสไลด์

3.1.21 Haemacytometer

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.1.22 สารเคมี

- น้ำกลั่น
- แอลกอฮอล์ 70%
- Chloral hydrate
- fuchsin acid 0.5%
- Malt extracts peptone agar (MEA)
- Tween - 80 ความเข้มข้น 0.1% และ 0.05%

3.2 การทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อเห็บโครยะตัวเต็มวัยเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่ม เห็บระยะตัวอ่อน และไข่เห็บในห้องปฏิบัติการ

3.2.1 เชื้อรา *Beauveria bassiana*

ใช้เชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 12 ไอโซเลท ที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน(ตาราง 3-1) ซึ่งรวบรวมโดยงานอารักขาพืช สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

ตาราง 3-1 เชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่นำมาใช้ในการศึกษา

เชื้อรา *Beauveria bassiana* (ไอโซเลท)	**แหล่งที่พบ**	
	แมลง	**จังหวัด**
Bb. 2637	ไม่ทราบชนิดแมลง	สุราษฎ์ธานี
Bb. 4591	ด้วงงวง	จันทบุรี
Bb. 5082	ผึ้ง	เพชรบูรณ์
Bb. 5335	มด	เพชรบุรี
Bb. 5436	ผึ้ง	เพชรบูรณ์
Bb. 5736	ผึ้ง	เพชรบูรณ์
Bb. 6241	เพลี้ยจั๊กจั่น	นครราชสีมา
Bb. 6243	เพลี้ยจั๊กจั่น	นครราชสีมา
Bb. 6966	ไม่ทราบชนิดแมลง	สุราษฎ์ธานี

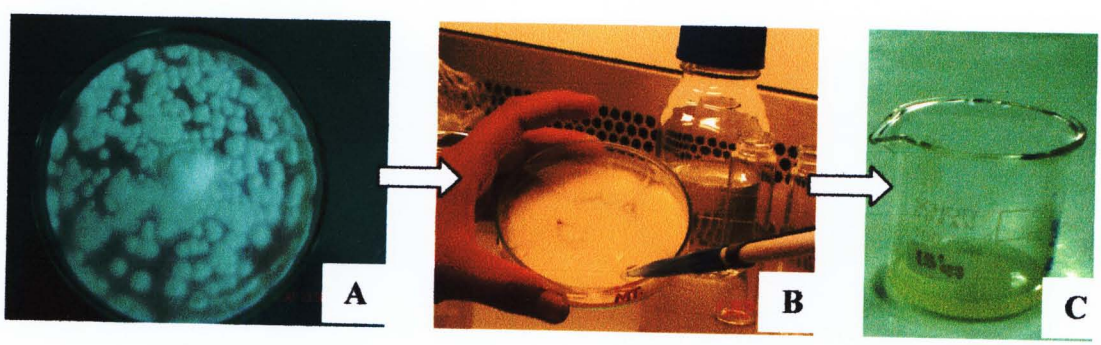
ตาราง 3-1 (ต่อ) เชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่นำมาใช้ในการศึกษา

เชื้อรา *Beauveria bassiana* (ไอโซเลท)	แหล่งที่พบ	
	แมลง	จังหวัด
Bb. 6988	ไม่ทราบชนิดแมลง	สุราษฎ์ธานี
Bb. 7683	ไม่ทราบชนิดแมลง	ตาก
Bb. 7757	ไม่ทราบชนิดแมลง	เชียงใหม่

3.2.2 วิธีการทดลอง

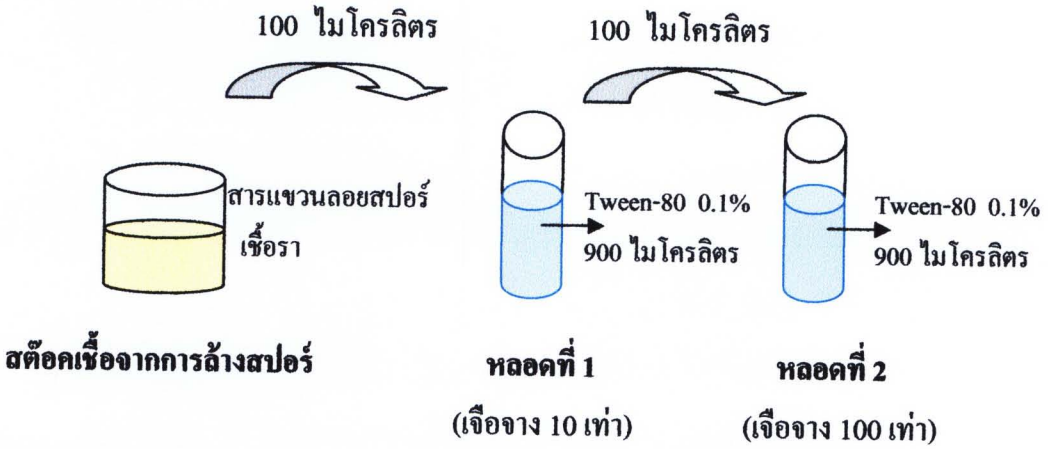
3.2.2.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา ความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมล.

3.2.2.1.1 นำเชื้อรา *B. bassiana* 12 ไอโซเลท จาก stock culture มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณบนอาหาร Malt extracts peptone agar (MEA) เมื่อเชื้อราอายุ 14-21 วัน (ภาพ 3-1 A) นำมาล้างสปอร์ ด้วย Tween-80 ความเข้มข้น 0.1% (ภาพ 3-1 B) แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง (ภาพ 3-1 C) จากนั้นนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราด้วย Haemacytometer



ภาพ 3-1 เชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร MEA อายุ 14-21 วัน (A), การล้างสปอร์ (B) และสารแขวนลอยสปอร์ที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง (C)

3.2.2.1.2. การคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราด้วย Haemacytometer เริ่มจากการดูดสารแขวนลอยสปอร์จากข้อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอดที่บรรจุ Tween-80 ความเข้มข้น 0.1% ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 1 เจือจาง 10 เท่า) จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์จากหลอดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่บรรจุ Tween-80 ความเข้มข้น 0.1% ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 2 เจือจาง 100 เท่า) (ภาพ 3-2)

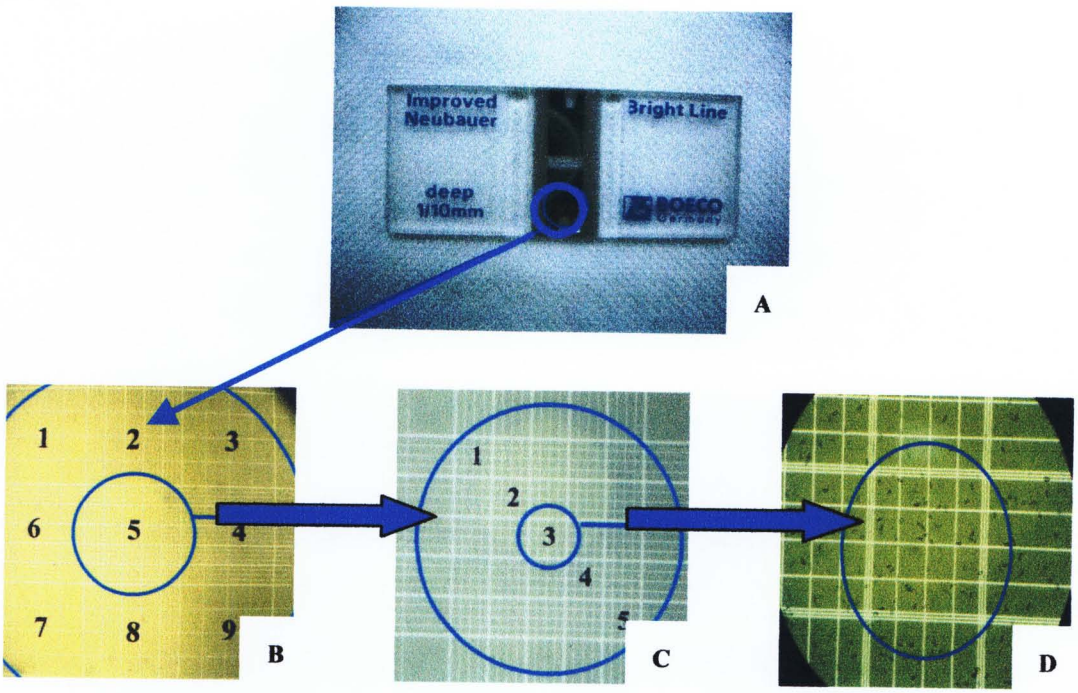


ภาพ 3-2 การเจือจางสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา

จากนั้นนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer (ภาพ 3-3 A) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Haemacytometer รูปร่างเป็นรูปอักษรตัว H ที่มีพื้นที่สำหรับการนับอยู่ 2 chamber บริเวณที่ใช้สำหรับนับจะแบ่งออกเป็น 9 ช่อง(ภาพ 3-3 B) ในช่องตรงกลาง (หมายเลข 5) จะถูกแบ่งย่อยออกเป็น 25 ช่องเล็ก (ภาพ 3-3 C) และแต่ละ 25 ช่องจะถูกแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก (ภาพ 3-3 D)

การนับจะนับสปอร์ที่อยู่ในช่องที่ 5 ของแต่ละ chamber โดยนับทั้ง 2 chamber สุ่มนับ chamber ละ 5 ช่องในแนวทแยงมุม (ภาพ 3-3 C) จากนั้นหาค่าเฉลี่ยทั้ง 2 chamber แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราดังนี้

ความเข้มข้นของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ที่นับได้x$2.5x10^5$xความเข้มข้นที่ใช้นับ



ภาพ 3-3 การนับสปอร์เชื้อราโดยใช้ Haemacytometer

A คือ พื้นที่สำหรับการนับสปอร์เชื้อราอยู่ 2 chamber

B คือ บริเวณที่ใช้สำหรับนับจะแบ่งออกเป็น 9 ช่อง

C คือ การนับสปอร์เชื้อราในแต่ละchamber จะนับในแนวทแยงมุม

D คือ ลักษณะของสปอร์เชื้อราที่ทำการนับ

ตัวอย่าง

นับจำนวนสปอร์ได้ $= \frac{33+29+40+39+35+45+27+40+33+39}{10}$

$= \frac{360}{10}$

$= 36$

ที่ระดับความเข้มข้น 10^2 มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย 36 สปอร์

ความเข้มข้นของเชื้อรา $= 36 \times 2.5 \times 10^5 \times 10^2$

$= 90 \times 10^7$

$= 9.0 \times 10^8$ สปอร์ต่อมล.

3.2.2.2. การหาความสามารถของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ต่อเห็บโครยะตัวเต็มวัยเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่ม เห็บระยะตัวอ่อน และไข่เห็บในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราที่ผ่านการหาความเข้มข้นของเชื้อรา มาคำนวณให้ได้ความเข้มข้นสำหรับใช้ในการทดลอง คือ $1x10^8$ สปอร์ต่อมล. โดยใช้สูตรดังนี้

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

โดย N_1= ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ของสต๊อคเชื้อ

V_1= ปริมาตรสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ต้องการหา

N_2= ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ต้องการ

V_2= ปริมาตรสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่นำไปใช้จริง

การปรับความเข้มข้น จะใช้ tween-80 ความเข้มข้น 0.05% ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ตัวอย่าง

ต้องการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ 15 มล. ให้ได้ความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมล.

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$9x10^8 x V_1 = 1x10^8 x 15$$

$$V_1 = \frac{1x10^8 x 15}{9x10^8}$$

$$= 1.67 \text{ มล.}$$

ดังนั้น ต้องดูดสารแขวนลอยสปอร์จาก Stock เชื้อรามา 1.67 มล. และเติม tween-80 ความเข้มข้น 0.05% เท่ากับ 15-1.67 = 13.33 มล. จึงได้สารแขวนลอยสปอร์เชื้อราความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมล. ในปริมาตร 15 มล.

3.2.2.2.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อเห็บโครยะตัวเต็มวัยเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่ม

ซึ่งการทดสอบความสามารถมีทั้งหมด 12 กรรมวิธี (12 ไอโซเลท) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว แต่ละซ้ำโดยนำเห็บตัวเต็มวัยเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่ม จุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อราความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์/มล. (ภาพ 3-4) ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อผสม tween-80 ความเข้มข้น 0.1% เป็นตัวเปรียบเทียบ วางเห็บโคที่ผ่านการจุ่มวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองรองอยู่ทั้งด้านตัวจานและฝาจานเลี้ยงเชื้อ นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ให้แสงแดดส่องถึง บันทึกการตายของเห็บตัวเต็มวัยทุกวัน นานจนกว่าเห็บไม่มีการตายเพิ่ม

ภาพ 3-4 การจุ่มเห็บเพศเมียลงในสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา

3.2.2.2.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อเห็บโครยะตัวอ่อน

การทดสอบความสามารถมีทั้งหมด 12 กรรมวิธี (12 ไอโซเลท) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 30 ตัว นำเห็บระยะตัวอ่อนวางบนบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองรองอยู่ทั้งด้าน 2 ด้านของจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 3-5) จากนั้นทำการพ่นด้วยสารแขวนลอยเชื้อราความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์/มล. ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อผสม tween-80 ความเข้มข้น 0.1% เป็นตัวเปรียบเทียบ วางเห็บโคที่ผ่านการพ่นวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองรองอยู่ทั้งด้านตัวจานและฝาจานเลี้ยงเชื้อ นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ให้แสงแดดส่องถึง บันทึกการตายของเห็บระยะตัวอ่อนทุกวัน นานจนกว่าเห็บไม่มีการตายเพิ่ม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพ 3-5 เห็บระยะตัวอ่อนหลังจากการพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา

3.2.2.2.3 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อไข่เห็บ

การทดสอบความสามารถมีทั้งหมด 12 กรรมวิธี (12 ไอโซเลท) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 30 ฟอง นำไข่เห็บวางบนบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองรองอยู่ทั้งด้าน 2 ด้านของจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 3-6) จากนั้นทำการพ่นด้วยสารแขวนลอยเชื้อราความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์/มล. ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อผสม tween-80 ความเข้มข้น 0.1% เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจการติดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอทุกวัน นาน 15 วัน

ภาพ 3-6 ไข่เห็บ หลังจากการพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา

จากนั้นนำข้อมูลบันทึกการตายของเห็บระยะต่างๆมาคำนวณหาอัตราการตาย (%mortality) โดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925) ดังนี้

$$\text{อัตราการตายที่แท้จริง} = \frac{(A-B)}{(100-B)} \times 100$$

A = อัตราการตายของกลุ่มทดลอง

B = อัตราการตายของกลุ่มควบคุม

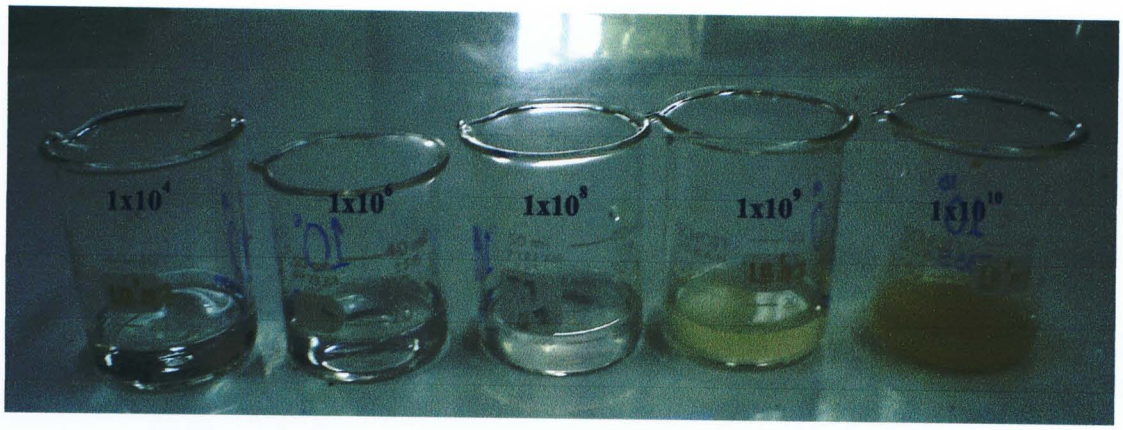
3.2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของผลการทดลองตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบอัตราการตายที่แท้จริงของเห็บ ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1980)

3.3 การทดลองที่ 2 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *B. bassiana* ที่ใช้ควบคุมเห็บในโครยะตัวเต็มวัยเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่ม (ค่า LC_{50} ; median lethal concentration และ LT_{50} ; median lethal time)

3.3.1 วิธีการทดลอง

นำเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท 5082 และ 5335 ที่มีความสามารถในการทำให้เห็บตายสูงสุด มาทดสอบหาความรุนแรงของเชื้อรา ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ $1x10^4$, $1x10^6$, $1x10^8$, $1x10^9$ และ $1x10^{10}$ สปอร์/มล. (ภาพ 3-7) นำเห็บตัวเต็มวัยเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่มจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่เตรียมไว้ โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ 3 ซ้ำๆ ละ 30 ตัว เห็บกลุ่มควบคุม (จำนวน 3 ซ้ำ) จุ่มด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางเห็บลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองรองอยู่ทั้งด้านตัวจานและฝาจานเลี้ยงเชื้อ นำจานเลี้ยงเชื้อไปวางที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ให้แสงแดดส่องถึง บันทึกการตายของเห็บตัวเต็มวัยทุกวัน นานจนกว่าเห็บไม่มีการตายเพิ่ม นำข้อมูลการตายที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละวันมาคำนวณหาค่า LC_{50} (median lethal concentration) และ LT_{50} (median lethal time) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ M stat C (Finney, 1971)



ภาพ 3-7 สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^4$, $1x10^6$, $1x10^8$, $1x10^9$ และ $1x1^{10}$ สปอร์ต่อมล. (เรียงจากซ้ายไปขวา)

3.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

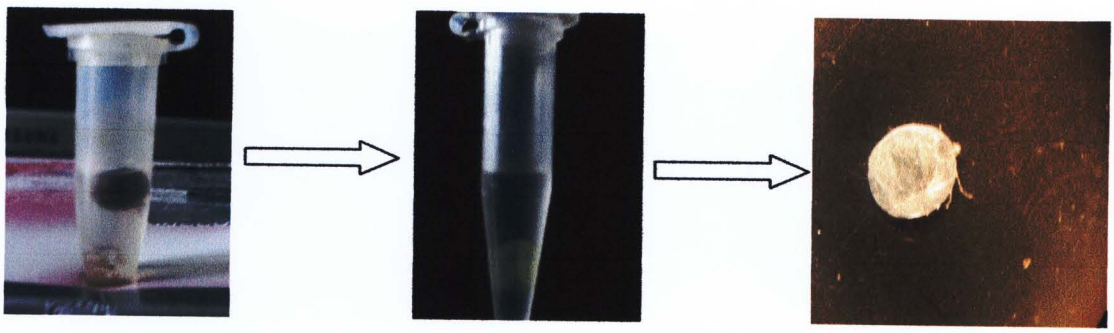
คำนวณหาค่า LC_{50} (median lethal concentration) และ LT_{50} (median lethal time) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ M stat C (Finney, 1971) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบค่า LC_{50} (median lethal concentration) และ LT_{50} (median lethal time) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 15

3.4 การทดลองที่ 3 ศึกษากลไกการเข้าทำลายของเชื้อรา *B. bassiana* ในเห็บระยะตัวเต็มวัยเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่ม

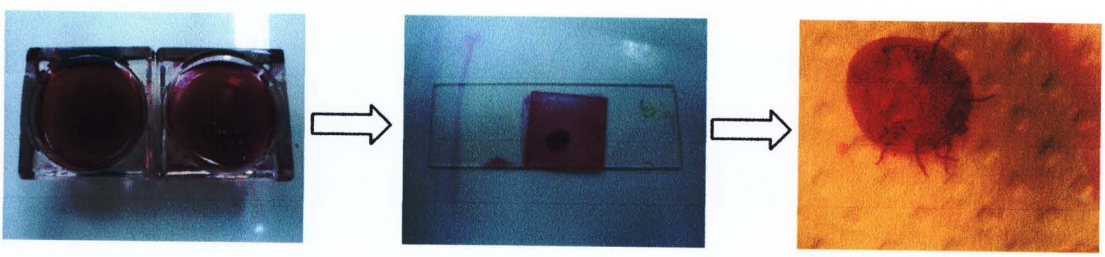
3.4.1 วิธีการทดลอง

ใช้เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท 5082 และ 5335 ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาความสามารถของเชื้อราในการทำให้เกิดโรคกับเห็บโค ทำการเก็บตัวอย่างเห็บไอโซเลทละ 2 ตัว ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจาก 72 ชั่วโมงเก็บเห็บวันละ 1 ครั้ง นาน 5 วัน โดยตัวอย่างเห็บที่เก็บมาจะนำไปใส่ในหลอดพลาสติกที่มี chloral hydrate บรรจุอยู่และแช่จนกว่าตัวอย่างเห็บมีลักษณะใส (ภาพ 3-8) ตัวอย่างที่เก็บทุก ๆ 6 ชั่วโมงจะถูกย้อมด้วย calcofluor ซึ่งมีลักษณะเป็นสารเรืองแสงสีฟ้า นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ ถ่ายรูปลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อรา ส่วนตัวอย่างที่เก็บหลัง 72 ชั่วโมง จะย้อมด้วย fuchsin acid

0.5% นาน 3 วัน (ภาพ 3-9) แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ถ่ายรูปลักษณะของการเจริญเติบโตของเชื้อรา



ภาพ 3-8 ลักษณะของเห็บที่แช่ใน chloral hydrate จนมีลักษณะใส และการวางตัวเห็บลงบนสไลด์ที่จะนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์



ภาพ 3-9 ลักษณะของการแช่เห็บลงใน fuchsin acid 0.5% และการวางเห็บลงบนสไลด์เพื่อนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์

3.5 การทดลองที่ 4 ศึกษาความสามารถเชื้อรา *B. bassiana* ต่อการฟักออกของไข่เห็บในสภาพเฉียนแบบธรรมชาติ

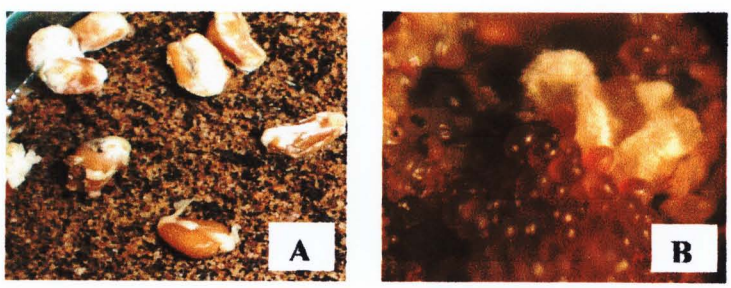
3.5.1 การเตรียมเชื้อรา

นำเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวฟ่าง หรือ ข้าวสาลี มาต้มให้เมล็ดอ่อนตัว บรรจุลงถุงพลาสติกชนิดถุงร้อน ถุงละ 200 กรัม ใส่คอขวดพลาสติกและอุดด้วยสำลี และหุ้มด้วยกระดาษปิดปากถุงให้แน่น นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำถุงข้าวฟ่างออกจากหม้อนึ่ง ทิ้งไว้ให้เย็น เปิดถุงข้าวฟ่างที่ผ่าน

การนึ่งฆ่าเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ ตัดเชื้อรา *B. bassiana* จากที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่มีอายุการเลี้ยงไม่ต่ำกว่า 30 วัน ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นละ 1 ซม. ใส่ลงในถุงถุงละ 3 ชิ้น เขย่าให้เชื้อรากระจายทั่วถุงเม็ดข้าวฟ่าง ปิดปากถุงให้สนิท นำไปเลี้ยงไว้บนชั้นที่ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์แล้ว ในอุณหภูมิห้อง (25±2°C) เขย่าถุงทุก 3 วัน (เพื่อให้เชื้อราที่เจริญเติบโตด้านบนไปผสมกับเม็ดข้าวฟ่างทางด้านก้นถุง) เชื้อราจะขึ้นคลุมเม็ดข้าวฟ่างทุกเม็ดภายใน 10 วัน

3.5.2 วิธีการทดลอง

ชั่งเชื้อรา *B. Bassiana* ที่อยู่บนวัสดุเลี้ยงเชื้อ ไอโซเลท 5082 และ 5335 ไอโซเลทละ 3 กรัม ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีทรายซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วไว้ เกลี่ยเชื้อราให้ทั่วจาน (ภาพ 3-10) จากนั้นเขี่ยไข่เห็บใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 100 ฟองต่อจานเลี้ยงเชื้อ 1 จาน (ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ) ส่วนกลุ่มควบคุมเขี่ยไข่เห็บใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีแต่ทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (จำนวน 3 ซ้ำๆละ 100 ฟอง) จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปวางที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ให้แสงแดดส่องถึง และพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อทุกๆ 3 วัน (เป็นการให้ความชื้นแก่ไข่เห็บ เพื่อไม่ให้ไข่เห็บตายเนื่องขาดความชื้น) บันทึกอัตราการฟักออกของไข่เห็บหลังจากใส่เชื้อราไปแล้ว 15 วัน (ช่วงระยะเวลาไข่ฟักออกเป็นเห็บระยะตัวอ่อนประมาณ 15-23 วัน) นานจนกว่าไข่เห็บไม่มีการฟักออกเป็นตัวอ่อนเพิ่ม จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาหาอัตราการฟักออกที่แท้จริง โดยใช้หลักการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1



ภาพ 3-10 เชื้อรา *B. bassiana* ในข้าวฟ่างวันที่ 1 ของการทดลอ ง(A) และไข่เห็บ (B)

3.5.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของผลการทดลองตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบอัตราการฟักออกของไข่เห็บ ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1980)

3.6 การทดลองที่ 5 ศึกษาเชื้อรา *B. bassiana* ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำลายเห็บตัวเต็มวัยบนตัวโค

3.6.1 สัตว์ทดลอง

3.6.1 เห็บเพศเมียที่ดูดเลือดจนอิ่ม

3.6.2 โคเนื้อลูกผสม จำนวน 10 ตัว

3.6.2 วิธีการทดลอง

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท 5082 และ 5335 ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมล. (ระดับความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมเห็บจากการทดลองที่ 3) นำเห็บตัวเต็มวัยเพศเมียใส่ลงในถุงผ้าขนาด 9x20 ซม. จำนวน 20 ตัวต่อถุง ปากถุงทำเป็นแบบหูรูด ผูกติดกับใบหูโคข้างละ 1 ถุง ทิ้งไว้ 2 - 3 วัน เพื่อให้เห็บเกาะบริเวณใบหูของโค จากนั้นพ่นเชื้อรา *B. Bassiana* ในปริมาณ 10 มล. ลงบนหูโค 1 ข้าง และอีก 1 ข้างพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ในปริมาณ 10 มล. (กลุ่มควบคุม) (ภาพ 3-11) ใช้โคจำนวน 5 ตัวต่อเชื้อรา 1 ไอโซเลท บันทึกอัตราการตายของเห็บตัวเต็มวัยเพศเมียหลังจากพ่นเชื้อไปแล้ว 3 วัน นานจนกว่าเห็บไม่มีการตายเพิ่ม ทำการทดลองเชื้อราไอโซเลทละ 5 ซ้ำ โดยเว้นระยะการทดลองนาน 2 สัปดาห์ แล้วทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลทใช้โคสลับกัน นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าอัตราการตายที่แท้จริงของเห็บโดยใช้หลักการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ภาพ 3-11 การพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราลงบนใบหูโค

3.6.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของผลการทดลองตามแผนการทดลองแบบสลับ (Change - Over Design) และเปรียบเทียบอัตราการตายที่แท้จริงของเห็บ ด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range test (Steel and Torrie, 1980)

3.7 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการงานอารักขาพืช และห้องปฏิบัติการกลาง สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

2. ฟาร์มโคเนื้อลูกผสมของคุณอารี สุวรรณสุระ ที่ตำบลน้ำอ่าง อำเภอตรอน จังหวัดอุตรดิตถ์

3.8 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ใช้ระยะเวลาในการทำวิจัย 12 เดือน ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2551 – พฤษภาคม 2552