

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวเพื่อการทดลองและศึกษาวงจรชีวิต

1.1 ทำการเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาว โดยปล่อยแมลงหวี่ขาวจำนวน 100 ตัว โดยใช้ดินมะเขือเทศ อายุประมาณ 1 เดือน เป็นพืชอาศัย วางไว้ในกรงตาข่ายขนาด 40 x 50 x 60 เซนติเมตร (ภาพ 9) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนถ่ายดินมะเขือเทศเพื่อให้ได้อายุของแมลงหวี่ขาวที่เท่ากัน และแยกเลี้ยงไว้ในกรงตาข่ายขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 เมตร (ภาพ 10) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ($28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 13 วัน ได้ตัวอ่อนระยะที่ 2 เพื่อใช้ในการทดลอง

1.2 ศึกษาวงจรชีวิตแมลงหวี่ขาวโรงเรือน โดยนำแมลงหวี่ขาวตัวเต็มวัยปล่อยลงบนดินมะเขือเทศ เพื่อให้วางไข่เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำตัวเต็มวัยออกจากมุ้งตาข่าย ตรวจสอบและบันทึกการเจริญเติบโตของแมลงหวี่ขาวโรงเรือนทุกวัน ตลอดระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ



ภาพ 9 กรงตาข่ายเพื่อให้แมลงหวี่ขาวผสมพันธุ์และวางไข่



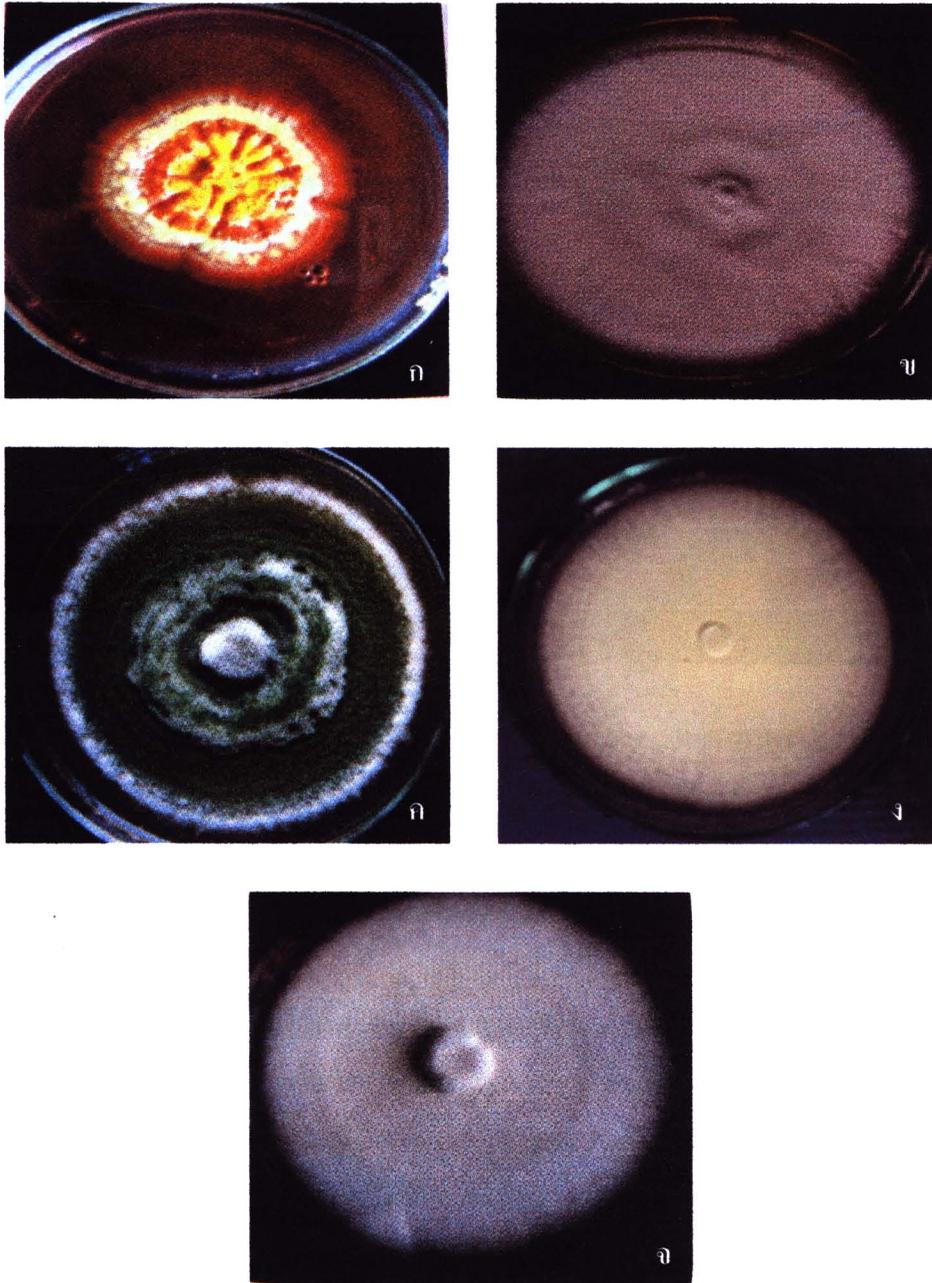
ภาพ 10 กรงตาข่ายและดินมะเขือเทศที่ใช้เลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาว

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

2.1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ทดสอบ ประกอบด้วย เชื้อรา จำนวน 5 สกุล 17 ชนิด 29 ไอโซเลท (ตาราง 3) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มาลี ตั้งระเบียบ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา 3 สกุล 5 ชนิด 11 ไอโซเลท และรับความอนุเคราะห์จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) 4 สกุล 15 ชนิด 18 ไอโซเลท ทั้งนี้เชื้อราแต่ละสกุลมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน (ภาพ 11)

ตาราง 3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ทดสอบ

Fungal species	Isolate number	Fungal species	Isolate number
<i>Aschersonia marginata</i>	BCC 18646	<i>Metarhizium flavoviride</i>	M. fl 1964
<i>Aschersonia placenta</i>	BCC 18647	<i>Metarhizium flavoviride</i>	Mf. 5744
<i>Aschersonia samoensis</i>	BCC 19756	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma.7965
<i>Aschersonia</i> sp.	BCC 19766	<i>Metarhizium anisopliae</i>	BCC 4849
<i>Aschersonia badia</i>	BCC 20305	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	BCC 19368
<i>Beauveria amorphia</i>	BCC 19337	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	BCC 19341
<i>Beauveria bassiana</i>	BCC 19012	<i>Paecilomyces</i> sp.	BCC 19790
<i>Beauveria bassiana</i>	BCC 25950	<i>Paecilomyces farinosus</i>	BCC 25949
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 6241	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	BCC 28245
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 5335	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Pt 8003
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 5082	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Pt 6073
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 4591	<i>Verticillium hemipterigenum</i>	BCC 27990
<i>Beauveria</i> sp.	BCC 31676	<i>Verticillium hemipterigenum</i>	BCC 32173
<i>Beauveria</i> sp.	2637	<i>Verticillium hemipterigenum</i>	BCC 33172
		<i>Verticillium</i> sp.	BCC 18660



ภาพ 11 ลักษณะ โคลนเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละสกุล

ก. เชื้อราสกุล *Aschersonia*

ข. เชื้อราสกุล *Beauveria*

ค. เชื้อราสกุล *Metarhizium*

ง. เชื้อราสกุล *Paecilomyces*

จ. เชื้อราสกุล *Verticillium*

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อราที่ใช้ทำการทดสอบ โดยนำเชื้อราที่อยู่ใน stock culture มาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract peptone agar (MEA) ซึ่งประกอบด้วย malt extract 3 กรัม peptone form soymeal 0.5 กรัม agar 1.5 กรัม และน้ำ 100 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อราสกุล *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* และ *Verticilium* ส่วนเชื้อรา *Aschersonia* เลี้ยงและเพิ่มปริมาณด้วยอาหาร potato dextrose agar (PDA) ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม วุ้น 15 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร. (ภาพ 12)

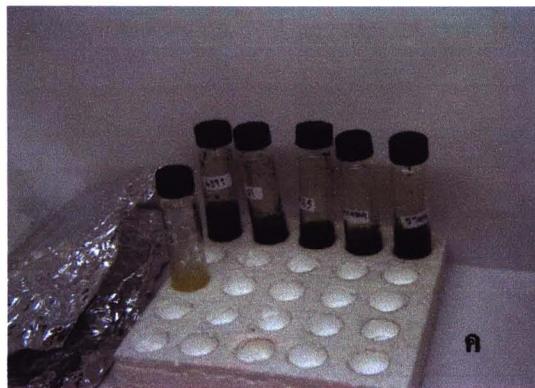


ภาพ 12 ส่วนประกอบทำอาหารเลี้ยงเชื้อ และประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ก. malt extract, agar, peptone form soymeal
- ข. malt extract peptone agar (MEA)
- ค. potato dextrose agar (PDA)

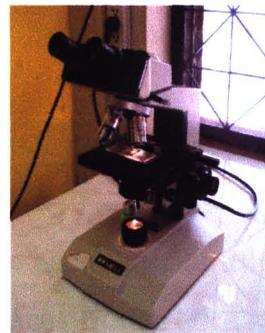
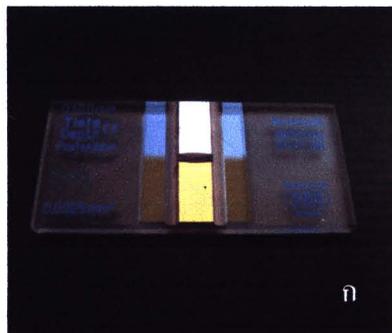
2.3 เตรียมเชื้อราสำหรับใช้ทดสอบ ความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยนำเชื้อราที่มีอายุได้ 10 – 21 วัน ขึ้นกับชนิดของเชื้อ มาทำสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นผสม tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 13) ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วกรองสารแขวนลอยสปอร์ด้วยผ้าขาวบาง นับด้วย hemacytometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อรา (ภาพ 14) ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนแมลงหวี่ขาวที่อยู่บนใบพืชอาหาร (ภาพ 15) สำหรับตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่ฟักเชื้อราเรียบร้อยแล้วนำไปวางบนถาดที่ใส่น้ำเพื่อเพิ่มความชื้น ดูการงอกของเส้นใยเชื้อราบนตัวแมลงหวี่ขาว ส่วนแมลงหวี่ขาวที่ยังไม่มีเส้นใยขึ้นปกคลุมบนตัวแมลงเก็บไว้ในกระดาษกรองที่ขึ้นที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 16) เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโต วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยแต่ละเชื้อทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้แมลงหวี่ขาว 100 ตัว ใช้น้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกจำนวนแมลงหวี่ขาวที่ตายทุก 1 วัน เป็นเวลา 7 วัน นำแมลงหวี่ขาวที่ตาย

ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่พบ
คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925)



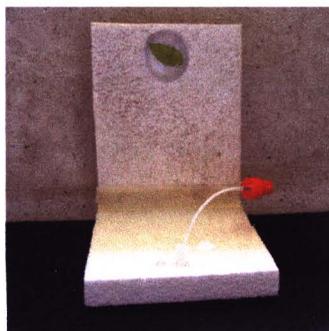
ภาพ 13 การล้างสปอร์เชื้อราเพื่อการทดสอบ

- ก. หยดน้ำกลั่นผสม tween 80 ความเข้มข้น 0.1 % ลงบนเชื้อราทดสอบ
- ข. ชูดเชื้อราผสมน้ำกลั่น
- ค. สปอร์แขวนลอยเชื้อรา



ภาพ 14 อุปกรณ์การคำนวณความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา

- ก. อุปกรณ์ใช้นับจำนวนสปอร์ (hemacytometer)
- ข. กล้องจุลทรรศน์



ภาพ 15 อุปกรณ์วัดคัพพัสสารแขวนลอย



ภาพ 16 อุปกรณ์ให้ความชื้นหลังการพ่นเชื้อราบนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือน

ก. ถาดใส่น้ำวางกล่องหลังพ่นเชื้อรา

ข. จานเพาะเลี้ยงใช้สังเกตการเกิดเส้นใยเชื้อราบนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือน

3. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาว

นำเชื้อราทดสอบในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาวที่มีเปอร์เซ็นต์การตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากข้อ 3 มาทดสอบความรุนแรงที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือที่ระดับความเข้มข้น 1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบกับตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว 20 ตัวต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ ของแต่ละระดับความเข้มข้น สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นผสม Tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกจำนวนแมลงหวี่ขาวที่มีเส้นใยขึ้นปกคลุม เป็นเวลา 7 วัน นำมาคำนวณหาค่า median lethal concentration (LC_{50}) ด้วยโปรแกรม LOGIT PC

4. การทดสอบเปรียบเทียบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมแมลงหวี่ขาวกับชีวภัณฑ์กำจัดแมลงหวี่ขาวทางการค้า

นำต้นพืชที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวจำนวน 30 ต้น ตรวจนับจำนวนแมลงหวี่ขาวบนใบพืช 3 จุด (ยอด กลาง และล่างของต้นพืช) จุดละ 3 ใบ จากนั้นฉีดพ่นสารตามกรรมวิธีดังนี้
 กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดลองที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร
 กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารชีวภัณฑ์ทางการค้า ใช้อัตราแนะนำ
 กรรมวิธีที่ 3 ชุดควบคุม (ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อผสม tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)

บันทึกผลการทดลองหลังจากพ่นสาร 3, 5 และ 7 วัน โดยตรวจนับตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวตายภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่พ่น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตาย และปรับเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula หากพบการตายของแมลงในชุดควบคุม

5. เปรียบเทียบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงหวี่ขาวโรงเรือน

T. vaporariorum บนพืชอาศัยต่างชนิดกัน

ทำการทดลองในสภาพโรงเรือน โดยปลูกแตงกวา และ มะเขือเทศในกระถาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร) (ภาพ 17) เมื่อแตงกวาและมะเขือเทศมีใบจริงอย่างน้อย 4 ใบ ฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อราทดสอบที่มีประสิทธิภาพสูงสุดทำให้แมลงหวี่ขาวตาย ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทั้งด้านบนใบและใต้ใบให้ทั่ว ทำเครื่องหมายใบที่พ่นสารแขวนลอยเชื้อราไว้ ทำการเก็บใบพืชทันทีหลังจากพ่นเชื้อ และเก็บซ้ำทุกๆ 3 วันจนครบ 30 วัน หลังการพ่นเชื้อรา (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วัน) แต่ละครั้งเก็บใบพืช จำนวน 3 ใบ (ซ้ำ) นำใบพืชที่เก็บมาแต่ละครั้งดำเนินการทดลอง ดังนี้

5.1. ศึกษาความมีชีวิตของสปอร์เชื้อรา

นำใบพืชที่เก็บมาในแต่ละครั้งหลังจากพ่นเชื้อรา ตัดใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นวางลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลาย FDA และ PI อย่างละ 20 ไมโครลิตร ลงบนชิ้นส่วนใบพืช ปิดด้วยที่ปิดสไลด์ จากนั้นนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสงและฟิวเตอร์ BP 355-425-FT455-LP460 (Leitz- microscope) สปอร์เชื้อราที่มีชีวิต จะติดสีเขียวเหลือง ส่วนสปอร์เชื้อราที่ตายแล้วจะติดสีแดง นับจำนวนสปอร์ทั้งที่มีชีวิตและตายแล้วรวมกันอย่างน้อย 200 สปอร์ โดยแต่ละใบนับ 3 ครั้ง (รวม 600 สปอร์ต่อกรรมวิธี) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์เชื้อราในแต่ละกรรมวิธี

5.2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราที่คงทนบนใบพืชในระยะเวลาต่าง ๆ กันในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหีขาวโรงเรือน

นำใบพืชที่เก็บมาในแต่ละครั้งหลังจากพ่นเชื้อรา ตัดลงในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตรที่ให้ความชื้นด้วยวุ้น (ภาพ 18) โดยในแต่ละพืชทำ 3 กล่อง จากนั้นนำแมลงหีขาววัยที่ 1 ซึ่งเป็นวัยที่สามารถเคลื่อนย้ายได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาสังเกตความสามารถในก่อโรคของเชื้อรา ที่เพาะเลี้ยงในข้อ 1 ใส่ลงไปกล่อง จำนวนกล่องละ 30 ตัว บันทึกจำนวนแมลงหีขาวที่ตายทุกวัน นำแมลงหีขาวที่ตายมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบเส้นใยและสปอร์เชื้อราที่ขึ้นปกคลุมเป็นเชื้อราตัวเดียวกันกับที่ทดสอบ คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายที่ถูกต้องโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925)



ภาพ 17 ต้นมะเขือเทศและแตงกวาเตรียมงานทดสอบ



ภาพ 18 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes*