บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวเพื่อการทดลองและศึกษาวงจรชีวิต

1.1 ทำการเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาว โดยปล่อยแมลงหวี่ขาวจำนวน 100 ตัว โดยใช้ต้นมะเขือเทศอายุประมาณ 1 เดือน เป็นพืชอาศัย วางไว้ในกรงตาข่ายขนาด 40 x 50 x 60 เซนติเมตร (ภาพ 9) เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนถ่ายต้นมะเขือเทศเพื่อให้ได้อายุของแมลงหวี่ขาวที่เท่ากัน และแยกเลี้ยงไว้ในกรงตาข่ายขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 เมตร (ภาพ 10) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 ºC ± 3 ºC) ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 13 วัน ได้ตัวอ่อนระยะที่ 2 เพื่อใช้ในการทดลอง

1.2 ศึกษาวงจรชีวิตแมลงหวี่ขาวโรงเรือน โดยนำแมลงหวี่ขาวตัวเต็มวัยปล่อยลงบนต้นมะเขือเทศเพื่อให้วางไข่เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำตัวเต็มวัยออกจากมุ้งตาข่าย ตรวจดูและบันทึกการเจริญเติบโตของแมลงหวี่ขาวโรงเรือนทุกวัน ตลอดระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

ภาพ 9 กรงตาข่ายเพื่อให้แมลงหวี่ขาวผสมพันธุ์และวางไข่

ภาพ 10 กรงตาข่ายและต้นมะเขือเทศที่ใช้เลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

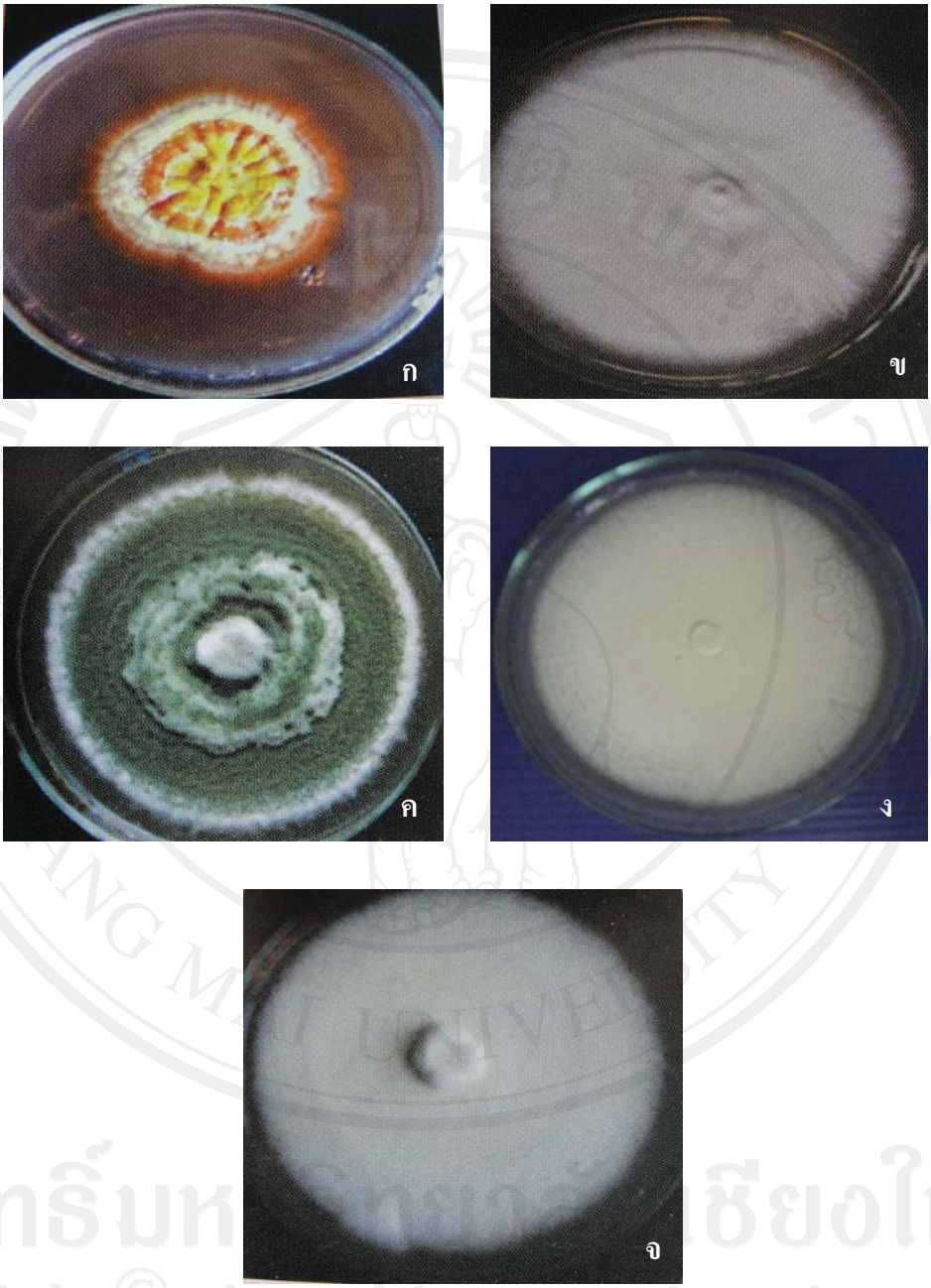
2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

2.1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ทดสอบ ประกอบด้วยเชื้อรา 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**
Aschersonia marginata	BCC 18646	*Metarhizium flavoviride*	M. fl 1964
Aschersonia placenta	BCC 18647	*Metarhizium flavoviride*	Mf. 5744
Aschersonia samoensis	BCC 19756	*Metarhizium anisopliae*	Ma.7965
Aschersonia sp.	BCC 19766	*Metarhizium anisopliae*	BCC 4849
Aschersonia badia	BCC 20305	*Paecilomyces lilacinus*	BCC 19368
Beauveria amorpha	BCC 19337	*Paecilomyces cinnamomeus*	BCC 19341
Beauveria bassiana	BCC 19012	*Paecilomyces* sp.	BCC 19790
Beauveria bassiana	BCC 25950	*Paecilomyces farinosus*	BCC 25949
Beauveria bassiana	Bb 6241	*Paecilomyces tenuipes*	BCC 28245
Beauveria bassiana	Bb 5335	*Paecilomyces tenuipes*	Pt 8003
Beauveria bassiana	Bb 5082	*Paecilomyces tenuipes*	Pt 6073
Beauveria bassiana	Bb 4591	*Verticillium hemipterigenum*	BCC 27990
Beauveria sp.	BCC 31676	*Verticillium hemipterigenum*	BCC 32173
Beauveria sp.	2637	*Verticillium hemipterigenum*	BCC 33172
		Verticillium sp.	BCC 18660

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 11 ลักษณะโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละสกุล

ก. เชื้อราสกุล *Aschersonia*

ข. เชื้อราสกุล *Beauveria*

ค. เชื้อราสกุล *Metarhizium*

ง. เชื้อราสกุล *Paecilomyces*

จ. เชื้อราสกุล *Verticillium*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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* ส่วน เชื้อรา *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

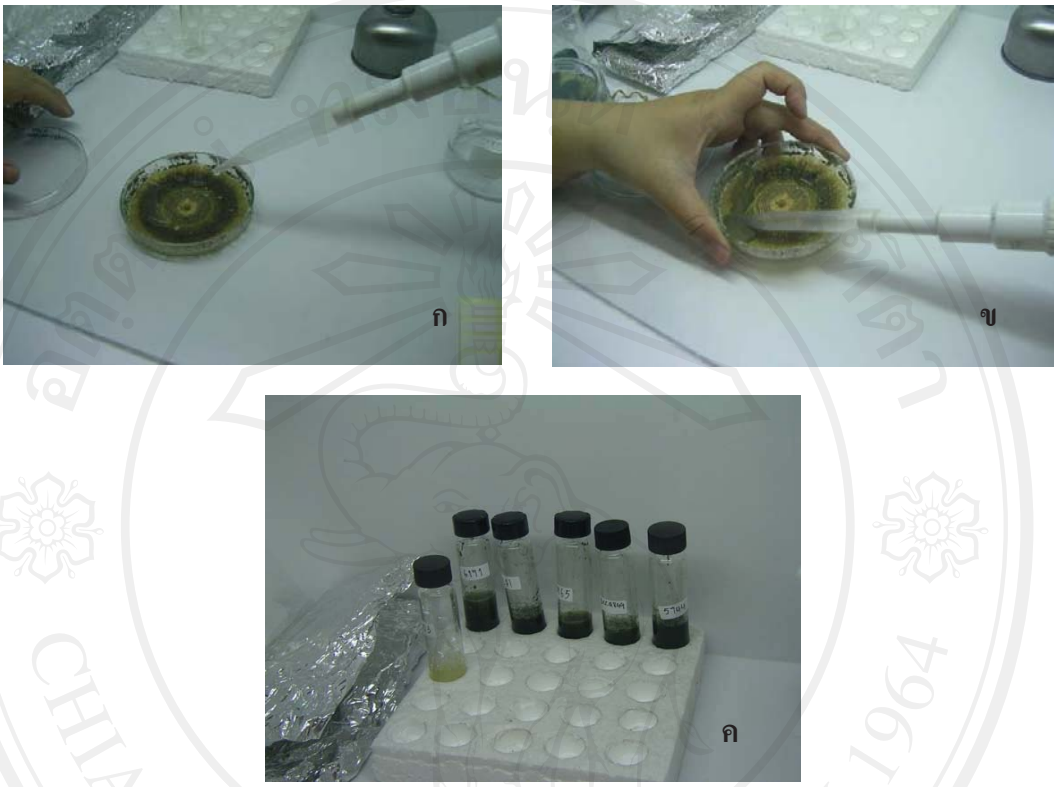
ข. malt extract peptone agar (MEA)

ค. potato dextrose agar (PDA)

2.3 เตรียมเชื้อราสำหรับใช้ทดสอบ ความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยนำเชื้อราที่มีอายุได้ 10 – 21 วัน ขึ้นกับชนิดของเชื้อ มาทำสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นผสม tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 13) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วกรองสารแขวนลอยสปอร์ด้วยผ้าขาวบาง นับด้วย hemacytometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อรา (ภาพ 14) ปรับความเข้มข้นให้ได้ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร ฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนแมลงหวี่ขาวที่อยู่บนใบพืชอาหาร (ภาพ 15) สำหรับตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่พ่นเชื้อราเรียบร้อยแล้วนำไปวางบนถาดที่ใส่น้ำเพื่อเพิ่มความชื้น ดูการงอกของเส้นใยเชื้อราบนตัวแมลงหวี่ขาว ส่วนแมลงหวี่ขาวที่ยังไม่มีเส้นใยขึ้นปกคลุมบนตัวแมลงเก็บไว้ในกระดาษกรองที่ชื้นที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ (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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

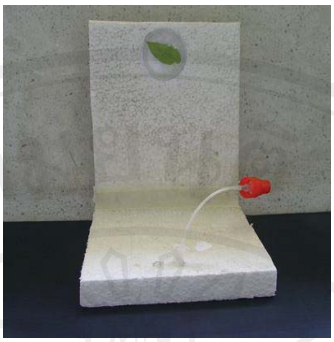
ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่พ่น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925)



ภาพ 13 การล้างสปอร์เชื้อราเพื่อการทดสอบ
ก. หยดน้ำกลั่นผสม tween 80 ความเข้มข้น 0.1 % ลงบนเชื้อราทดสอบ
ข. ขูดเชื้อราผสมน้ำกลั่น
ค. สปอร์แขวนลอยเชื้อรา

ภาพ 14 อุปกรณ์การคำนวณความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา
ก. อุปกรณ์ใช้นับจำนวนสปอร์ (hemacytometer)
ข. กล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 15 อุปกรณ์ฉีดพ่นสารแขวนลอย

ภาพ 16 อุปกรณ์ให้ความชื้นหลังการพ่นเชื้อราบนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือน
ก. ถาดใส่น้ำวางกล่องหลังพ่นเชื้อรา
ข. จานเพาะเลี้ยงใช้สังเกตการเกิดเส้นใยเชื้อราบนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือน

3. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาว

นำเชื้อราทดสอบในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาวที่มีเปอร์เซ็นต์การตายมากว่า 50 เปอร์เซ็นต์จากข้อ 3 มาทดสอบความรุนแรงที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือที่ระดับความเข้มข้น $1x10^2$, $1x10^4$, $1x10^6$, $1x10^7$ และ $1x10^8$ 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบเปรียบเทียบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมแมลงหวี่ขาวกับชีวภัณฑ์กำจัดแมลงหวี่ขาวทางการค้า

นำต้นพืชที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวจำนวน 30 ต้น ตรวจนับจำนวนแมลงหวี่ขาวบนใบพืช 3 จุด (ยอด กลาง และล่างของต้นพืช) จุดละ 3 ใบ จากนั้นฉีดพ่นสารตามกรรมมวิธีดังนี้

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

ทำการทดลองในสภาพโรงเรือนโดยปลูกแตงกวา และ มะเขือเทศในกระถาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร) (ภาพ 17) เมื่อแตงกวาและมะเขือเทศมีใบจริงอย่างน้อย 4 ใบ ฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อราทดสอบที่มีประสิทธิภาพสูงสุดทำให้แมลงหวี่ขาวตาย ที่ระดับความเข้มข้น 1 x 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

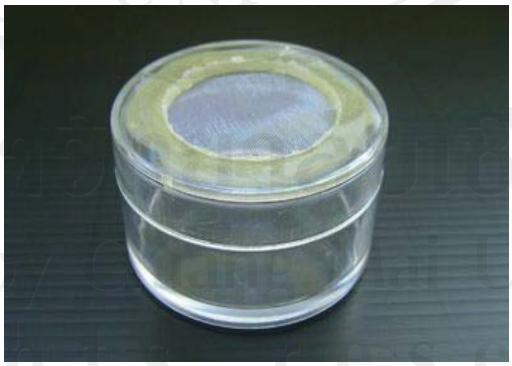
นำใบพืชที่เก็บมาในแต่ละครั้งหลังจากพ่นเชื้อรา ตัดใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นวางลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลาย FDA และ PI อย่างละ 20 ไมโครลิตร ลงบนชิ้นส่วนใบพืช ปิดด้วยที่ปิดไสด์ จากนั้นนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูโอเรสเซนต์ ที่ระดับความยาวเคลื่อนแสงและฟิวเตอร์ BP 355-425-FT455-LP460 (Leitz- microscope) สปอร์เชื้อราที่มีชีวิต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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราที่คงทนบนใบพืชในระยะเวลาต่าง ๆ กันในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาวโรงเรือน

นำใบพืชที่เก็บมาในแต่ละครั้งหลังจากพ่นเชื้อรา ตัดลงในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตรที่ให้ความชื้นด้วยวุ้น (ภาพ 18) โดยในแต่ละพืชทำ 3 กล่อง จากนั้นนำแมลงหวี่ขาววัยที่ 1 ซึ่งเป็นวัยที่สามารถเคลื่อนย้ายได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการทดลอง ในการสังเกตความสามารถในก่อโรคของเชื้อรา ที่เพาะเลี้ยงในข้อ 1ใส่ลงไปในกล่อง จำนวนกล่องละ 30 ตัว บันทึกจำนวนแมลงหวี่ขาวที่ตายทุกวัน นำแมลงหวี่ขาวที่ตายมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบเส้นใยและสปอร์เชื้อราที่ขึ้นปกคลุมเป็นเชื้อราตัวเดียวกันกับที่ทดสอบ คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายที่ถูกต้องโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925)

ภาพ 17 ต้นมะเขือเทศและแตงกวาเตรียมงานทดสอบ



ภาพ 18 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved