บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การคัดเลือกผึ้งพันธุ์เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

การจัดการรังผึ้งทดลองให้มีปริมาณประชากรผึ้งงานใกล้เคียงกัน

การคัดเลือกผึ้งพันธุ์ที่มีประชากรใกล้เคียงกันมาทำการทดลอง ได้มาจากการจัดการรังให้มีประชากรผึ้งงานเต็มคอนผึ้ง โดยให้รังผึ้งมีคอนผึ้ง รังละ 8 คอน จำนวน 12 รัง และทำการนับประชากรผึ้งในแต่ละรังที่นำมาใช้ในการทดลองตามวิธีของ Burgett and Burikhum (1985)

ในประเทศไทยใช้รวงผึ้งขนาดยาว 43.1 เซนติเมตร กว้าง 20.3 เซนติเมตร ดังนั้นพื้นที่คอนผึ้งคือ 1,749 ตารางเซนติเมตร หากมีประชากรผึ้งงานบนคอนผึ้งเต็มพื้นที่คอนทั้ง 2 ด้าน เมื่อคำนวณตามวิธีของ Burgett and Burikhum (1985) จะมีประชากรผึ้งงาน จำนวน 2,430 ตัว ต่อคอนผึ้ง 1 คอน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวนกรรมวิธี 12 กรรมวิธี (1 รัง = 1 กรรมวิธี) แต่ละกรรมวิธีทำ 8 ซ้ำ (1 คอน = 1 ซ้ำ) เมื่อนับประชากรผึ้งในแต่ละรังที่นำมาทำการทดลองครบทั้ง 12 รังแล้ว นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

การตรวจสอบปริมาณโรคชอล์คบรูดก่อนทำการทดลอง

การตรวจสอบปริมาณโรคชอล์คบรูดก่อนทำการทดลอง ได้มาจากการนำผึ้งพันธุ์จำนวน 12 รังที่นับประชากรผึ้งแล้ว นำมาตรวจสอบปริมาณโรคชอล์คบรูด โดยการนับจำนวนตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูดเปรียบเทียบกับจำนวนตัวหนอนทั้งหมด (ตัวหนอนในรวงที่ปิดฝารวงและไม่ปิดฝารวง) ซึ่งการนับจำนวนตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูดเลือกนับจากคอนผึ้งบริเวณที่มีตัวหนอน โดยทำการนับในพื้นที่ 20x20 เซนติเมตรต่อคอนผึ้ง 1 ด้าน และนับจากคอนผึ้ง 2 คอน ต่อรังผึ้ง 1 รัง วิธีการนับจำนวนตัวหนอนจากคอนผึ้งใช้วิธีการตัดแผ่นพลาสติกใสให้มีขนาด 20x20 เซนติเมตร นำไปวางลงบนคอนผึ้ง โดยการวางแผ่นพลาสติกใสลงบนคอนผึ้งจะวางในตำแหน่งกึ่งกลางของคอนผึ้งทุกครั้ง แล้วจึงทำการนับปริมาณตัวหนอนทั้งหมด และปริมาณตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูด ในพื้นที่ 20x20 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวนกรรมวิธี 12 กรรมวิธี (1 รัง = 1 กรรมวิธี) แต่ละกรรมวิธีทำ 8 ซ้ำ (คอนผึ้ง 1 ด้าน = 1 ซ้ำ) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การเตรียมอุปกรณ์เพื่อใช้ในการทดลอง

การเตรียมรังผึ้ง

เตรียมรังผึ้งเพื่อใช้ในการทดลองด้วยการนำรังผึ้งเปล่าจำนวน 9 รัง มาล้างทำความสะอาด แล้วตากแดดไว้ให้แห้ง

การเตรียมคอนผึ้ง

เตรียมคอนผึ้งเพื่อใช้ในการทดลองด้วยการนำคอนผึ้งเก่ามาทำความสะอาด นำรวงผึ้งเก่าที่ติดอยู่กับคอนผึ้งออก แล้วนำคอนผึ้งไปต้มเพื่อให้ไขผึ้งที่ติดอยู่กับคอนผึ้งเก่าหลุดออกจากคอนผึ้ง และนำไปตากแดดให้แห้ง หลังจากนั้นจึงนำคอนผึ้งที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว มาติดแผ่นฐานรวงใหม่ (ดังแสดงในภาพที่ 5) จำนวน 72 อัน เพื่อนำไปใช้ในการเปลี่ยนคอนผึ้งในรังผึ้งรังละ 8 คอน จำนวน 9 รัง

ภาพที่ 5 คอนผึ้งที่ติดแผ่นฐานรวงผึ้งใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การวางแผนการทดลองควบคุมโรคชอล์คบรูดโดยไม่ใช้สารเคมี

วางแผนการทดลองเปรียบเทียบการควบคุมโรคชอล์คบรูดโดยวิธีการต่าง ๆ ที่ไม่ใช้สารเคมี ได้แก่ การเปลี่ยนรังผึ้ง การใช้คอนผึ้งที่ติดแผ่นฐานรวงใหม่ (รวงผึ้งใหม่) การเปลี่ยนสถานที่ตั้งรังผึ้ง และการให้แสงแดด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวนกรรมวิธี 4 กรรมวิธี (กลุ่มรังควบคุม, กรรมวิธีที่ 1, กรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 3) แต่ละกรรมวิธีทำ 6 ซ้ำ (1 สัปดาห์ = 1 ซ้ำ) มีกลุ่มรังผึ้งควบคุมจำนวน 3 รัง และกลุ่มรังผึ้งทดลองจำนวน 9 รัง ทำการทดลอง 3 กรรมวิธี ๆ ละ 3 รัง โดยวิธีการที่ใช้ในการจัดการควบคุมโรคชอล์คบรูดโดยไม่ใช้สารเคมี ในแต่ละกรรมวิธีมีการทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มรังควบคุม

เป็นกลุ่มของรังผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูดจำนวน 3 รัง อยู่ในสภาพเดิมโดยไม่มีการเปลี่ยนรังผึ้ง, รวงผึ้ง, สถานที่ตั้งรังผึ้ง และตั้งรังผึ้งไว้ในที่ร่ม สถานที่ตั้งรังผึ้งคือสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ วัดผลการทดลองด้วยการนับจำนวนตัวหนอนผึ้ง ที่เป็นโรคชอล์คบรูดเปรียบเทียบกับปริมาณตัวหนอนผึ้งทั้งหมด (ตัวหนอนที่ปิดฝารวงและไม่ปิดฝารวง) ซึ่งการนับจำนวนตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูด เลือกนับจากคอนผึ้งบริเวณที่มีตัวหนอน โดยทำการนับในพื้นที่ 20x20 เซนติเมตรต่อคอนผึ้ง 1 ด้าน และนับจากคอนผึ้ง 2 คอนต่อรังผึ้ง 1 รัง นับจากรังผึ้งทุกรัง สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 1

เปลี่ยนรังผึ้งที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว เปลี่ยนรวงผึ้งใหม่ แต่ไม่มีการเปลี่ยนสถานที่ตั้งรังผึ้ง และตั้งรังผึ้งไว้ในที่ร่ม สถานที่ตั้งรังผึ้งคือสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ วัดผลการทดลองด้วยการนับจำนวนตัวหนอนผึ้ง ที่เป็นโรคชอล์คบรูดเปรียบเทียบกับปริมาณตัวหนอนผึ้งทั้งหมด (ตัวหนอนที่ปิดฝารวงและไม่ปิดฝารวง) ซึ่งการนับจำนวนตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูด เลือกนับจากคอนผึ้งบริเวณที่มีตัวหนอน โดยทำการนับในพื้นที่ 20x20 เซนติเมตรต่อคอนผึ้ง 1 ด้าน และนับจากคอนผึ้ง 2 คอนต่อรังผึ้ง 1 รัง นับจากรังผึ้งทุกรัง สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 2

เปลี่ยนรังผึ้งที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว เปลี่ยนรวงผึ้งใหม่ เปลี่ยนสถานที่ตั้งรังผึ้งจากสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ไปยังลานเลี้ยงผึ้งห้วยแก้ว ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และตั้งรังผึ้งไว้ในที่ร่ม วัดผลการทดลองด้วยการนับจำนวนตัวหนอนผึ้ง ที่เป็นโรคชอล์คบรูดเปรียบเทียบกับปริมาณตัวหนอนผึ้งทั้งหมด (ตัวหนอนที่ปิดฝารวงและไม่ปิดฝารวง) ซึ่งการนับจำนวนตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูด เลือกนับจากคอนผึ้งบริเวณที่มีตัวหนอน โดยทำการนับในพื้นที่ 20x20 เซนติเมตรต่อคอนผึ้ง 1 ด้าน และนับจากคอนผึ้ง 2 คอนต่อรังผึ้ง 1 รัง นับจากรังผึ้งทุกรัง สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 3

เปลี่ยนรังผึ้งที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว เปลี่ยนรวงผึ้งใหม่ เปลี่ยนสถานที่ตั้งรังผึ้งจากสถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ไปยังลานเลี้ยงผึ้งห้วยแก้ว ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และตั้งรังผึ้งไว้ในที่ที่มีแสงแดดส่องถึงรังประมาณ 4-6 ชั่วโมงต่อวัน วัดผลการทดลองด้วยการนับจำนวนตัวหนอนผึ้ง ที่เป็นโรคชอล์คบรูดเปรียบเทียบกับปริมาณตัวหนอนผึ้งทั้งหมด (ตัวหนอนที่ปิดฝารวงและไม่ปิดฝารวง) ซึ่งการนับจำนวนตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูด เลือกนับจากคอนผึ้งบริเวณที่มีตัวหนอน โดยทำการนับในพื้นที่ 20x20 เซนติเมตรต่อคอนผึ้ง 1 ด้าน และนับจากคอนผึ้ง 2 คอนต่อรังผึ้ง 1 รัง นับจากรังผึ้งทุกรัง สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองในแต่ละกรรมวิธีไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 6 ลานเลี้ยงผึ้ง สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ

ภาพที่ 7 ลานเลี้ยงผึ้งห้วยแก้ว ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การศึกษาลักษณะและการเจริญของเชื้อรา *Ascosphaera apis* เชื้อสาเหตุของโรคชอล์คบรูดในผึ้งพันธุ์

เก็บตัวอย่างตัวหนอนผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูด

ตัวอย่างหนอนผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูดเก็บจากรังผึ้งที่มีผึ้งเป็นโรคชอล์คบรูด โดยตัวหนอนที่เป็นโรคจะถูกเก็บจากหลอดรวงบริเวณคอนผึ้งที่มีตัวหนอนผึ้ง พื้นรัง หน้ารัง และบนพื้นดินบริเวณหน้ารังผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูด

การเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุของโรคชอล์คบรูดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเลี้ยงเชื้อราสาเหตุของโรคชอล์คบรูด ทำโดยการนำตัวอย่างตัวหนอนที่เป็นโรคชอล์คบรูดวางเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA เมื่อเชื้อราจากตัวหนอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อเจริญแล้ว จึงนำเชื้อที่ได้มาแยกเชื้อหลายครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (subculture) แล้วนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อ และการเจริญเติบโตของเชื้อภายในห้องปฏิบัติการ โดยมีการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะทำการวัดทุกวันจนกว่าเชื้อจะเจริญจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อราสาเหตุของโรคชอล์คบรูดด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

การศึกษาลักษณะของเชื้อด้วยกล้อง SEM โดยใช้ตัวอย่างเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA มาเตรียมตัวอย่างโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอนการ Fixation ตัวอย่างด้วย 5% Glutaradehyde (GA)

เลี้ยงเชื้อชอล์คบรูดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA ให้มีอายุ 15 วัน แล้วนำตัวอย่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้มาตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปใส่ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก หลังจากนั้นจึงเติม 5% GA ลงไปให้ท่วมตัวอย่าง แล้วนำไปไว้ในเครื่อง Vacuum เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างจมลงในสาร GA แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงเพื่อ fixed ตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างมาล้างด้วย Phosphorus oxide buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ขั้นตอนการทำ Post Fixation ด้วยสาร Osmium tetroxide

ใส่สาร Osmium tetroxide พอให้ท่วมตัวอย่าง เมื่อทำ post fixation แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง 1.5 –2 ชั่วโมง โดยให้สังเกตจากสีของตัวอย่าง ให้รอจนกระทั่งตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีดำ แล้วจึงนำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

3. ขั้นตอนการทำ Dehydration

โดยนำตัวอย่างมา dehydrate ด้วย Ethanol series 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, และ 100% ครั้งละ 15 นาที แล้วใส่ Amylacetate ให้ท่วมตัวอย่างและแช่ตัวอย่างไว้ประมาณ 7 นาที เพื่อให้ตัวอย่างแข็งตัวเร็วขึ้นนำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Critical Point Dryer (CPD) นำตัวอย่างเข้าไปในเครื่อง CPD แล้วทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการ Coat ทอง 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้อง SEM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved