# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเขียว

### 3.1.1 การคัดเลือกเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ Maejo, Chonburi, Suphan, Khon Kaen, BCC4849, BCC4951, BCC1707, BCC4810, BCC2074, BCC1858 (ตารางที่ 2) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA จนเจริญเต็มที่ สร้างสปอร์ แล้วไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือจุลินทรีย์อื่นๆ นาน 7 วัน จากนั้นนำหนอนกระทู้ผักวัย 2 ใส่ใน plate เชื้อราเขียว ประมาณ 30 นาที แล้วเขี่ยหนอนใส่ใน plate ที่มีใบคะน้า ซึ่งแต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ หลังจากนั้นตรวจนับผลการตาย

**ตารางที่ 2** แหล่งที่มาของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่างๆ

| ลำดับ | รหัส | สายพันธุ์ | ตัวอย่างที่เก็บ | สถานที่ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | BCC1707 | *M. flavoviride* | Homoptera-nymph | ศูนย์พันธุวิศวกรรม |
| 2 | BCC1858 | *M. anisopliae* | Coleoptera-Lampyridae | และเทคโนโลยี |
| 3 | BCC2074 | *M. anisopliae* | Lepidoptera-silkworm | ชีวภาพแห่งชาติ |
| 4 | BCC4810 | *M. anisopliae* | - | ,, |
| 5 | BCC4849 | *M. anisopliae* | - | ,, |
| 6 | BCC4951 | *M. anisopliae* var. *anisopliae* | - | ,, |
| 7 | Maejo | *M. anisopliae* | ตัวอย่างดิน | สภาวิจัยแห่งชาติ |
| 8 | Chonburi | *M. anisopliae* | ตัวอย่างดิน | สภาวิจัยแห่งชาติ |
| 9 | Suphan | *M. anisopliae* | ตัวอย่างดิน | สภาวิจัยแห่งชาติ |
| 10 | Khon Kaen | *M. anisopliae* | ตัวอย่างดิน | สภาวิจัยแห่งชาติ |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.1.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว**

นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโต ในอาหารชนิดต่าง ๆ จำนวน 8 ชนิด คือ Sabouraud dextrose agar (SDA), Sabouraud dextrose agar with yeast extract (SDAY), Sabouraud maltose agar with yeast extract (SMAY), Potato dextrose agar (PDA), Malt agar (MA), Mungbean agar (MU), Fungus agar (FA), Latch ' s medium (L) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านนศูนย์กลาง 1 ซม. ตัดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน นำไปเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น 8 ชนิด ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28$\pm$ 2 องศาเซลเซียส) นาน 15 วัน แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ หลังจากบ่มเชื้อได้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยวัดเส้นผ่านนศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ แต่ละไอโซเลต ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 10x8x3) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

**3.1.3 ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว**

นำเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA , SDAY และ MU จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยวัดเส้นผ่านนศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ แต่ละไอโซเลต ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 3x3x3) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

**3.1.4 ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว**

นำเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA , SDAY และ MU จากนั้นบ่มเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28$\pm$ 2 องศาเซลเซียส) และ 1) ที่มีแสง 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืดอีก 12 ชั่วโมง 2) ที่มีแสงตลอด 24 ชั่วโมง และ 3) ที่มืด 24 ชั่วโมง แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อราเขียว ในแต่ละ plate ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 3x3x3) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.2 การเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก**

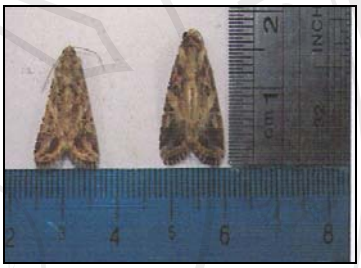
เก็บใบคะน้าที่มีกลุ่มไข่และตัวหนอนขนาดต่างๆ จากแปลงปลูกผักของเกษตรกร ต.สันผีเสื้อ จังหวัดเชียงใหม่ ใส่กล่องพลาสติกขนาด 24.5 x 17 x 9 เซนติเมตร โดยสามารถสังเกตได้จากใบพืชจะมีลักษณะรอยทำลายและโปร่งแสง เมื่อพลิกดูใต้ใบจะพบกลุ่มหนอนรวมอยู่กันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 1) จากนั้นนำหนอนกระทู้ผักที่เก็บมาจากแปลงมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 26.21 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 31.71 องศาเซลเซียส โดยนำหนอนกระทู้ผักเปลี่ยนไปใส่กล่องพลาสติกใหม่ขนาดเดิม พร้อมใบคะน้า (ภาพที่ 2) จนกระทั่งเข้าดักแด้ จึงแยกไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 8 x 10 x 8 เซนติเมตร เปิดฝา แล้วนำไปใส่ในกรงที่มีหญ้ามาเลเซีย (ภาพที่ 3) เมื่อดักแด้ออกเป็นตัวเต็มวัย (ภาพที่ 4) จึงให้อาหารผีเสื้อ ซึ่งเป็นน้ำผึ้งที่มีความเข้มข้น 10 % โดยผีเสื้อผสมพันธุ์และวางไข่บนหญ้ามาเลเซีย (ภาพที่ 5) จึงตัดใบหญ้ามาเลเซียไปใส่กล่องพลาสติกขนาด 17 x 24 x 11 เซนติเมตร แล้วให้อาหารด้วยยอดคะน้า รอจนกระทั่งหนอนที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เจริญเป็นหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 (ภาพที่ 6) จึงนำหนอนไปทดสอบกับเชื้อราเขียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ภาพที่ 1** กลุ่มหนอนกระทู้ผักบนใบคะน้า

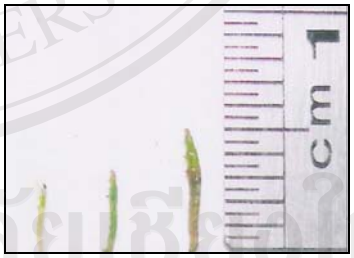
**ภาพที่ 2** การเลี้ยงหนอนกระทู้ผักใน ห้องปฏิบัติการ

**ภาพที่ 3** กล่องดักแด้ เปิดฝาไว้ในกรงที่มีหญ้ามาเลเซีย เพื่อเป็นที่วางไข่ ในระยะที่เจริญเป็นผีเสื้อ



**ภาพที่ 4** ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก ตัวผู้ (ซ้าย) ตัวเมีย (ขวา)

**ภาพที่ 5** กลุ่มไข่หนอนกระทู้ผักบนหญ้ามาเลเซีย



**ภาพที่ 6** หนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก**

นำเชื้อราเขียวจำนวน 3 ไอโซเลต ที่ได้จากการทดลองที่1 มาเลี้ยงบนอาหาร MU จนเจริญเต็มที่ สร้างสปอร์ แล้วไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ มาทดสอบ หาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก

เตรียม spore suspension ของเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลต ที่สร้างสปอร์บนอาหาร แล้วขูดออกจากอาหารมาผสม กับน้ำกลั่น กรองด้วยผ้าขาวบางที่นำมาทบกัน 2 ชั้น (ทำให้ผ้าเปียกก่อนนำมากรอง) การใช้ haemacytometer ในการนับสปอร์ นั้นทำได้โดยการปิด cover slip ให้คลุม scale ทั้งสอง จากนั้นใช้ loop จุ่มลงใน spore suspensions ที่เขย่าจนเข้ากันดีแล้วและย้าย loop ไปแตะตรงบริเวณขอบสไลด์ทั้ง สองด้าน spore suspensions จะซึมเข้าไปจนเต็มบริเวณ scale ทั้งสอง อย่าใช้ dropper ในการย้าย spore suspension มาใส่ haemacytometer เพราะจะได้ spore suspension มากเกินไปและไหลล้นลงช่องข้าง scale ซึ่งจะพาเอาสปอร์ที่นับได้ไม่ตรงตามความเป็นจริง เมื่อใส่ spore suspensions แล้วก็ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้สปอร์นอนก้นก่อนจึงนับจำนวนสปอร์

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ haemacytometer (ภาพที่7)

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย
2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ 25 x 16 x 1/400 ตารางมิลลิเมตร
3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ 25 x 16 x 1/400 x 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ.มม.
4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ.มม.
5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลบ.ซม. หรือ 1 มล. ซึ่ง 1 มล. เท่ากับ 1000 ลบ.มม.

ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ.มม. นับสปอร์ได้ = Y สปอร์

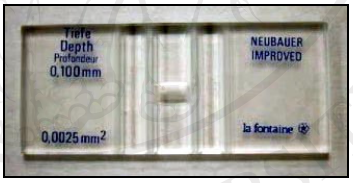
ถ้าใน 1000 ลบ.มม. ( 1 มล.) จะมีสปอร์ = Y x 1000 x 1/0.1 สปอร์

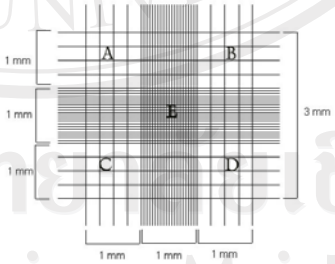
= Y x 1 x $10^4$ สปอร์/มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ในกรณีสปอร์ หรือเซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มล. = $Z/5 \times 1 \times 10^4$ สปอร์/มล.
7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากครั้งขึ้น เช่น 5 – 10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรืออาจจำเป็นต้องเติม wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือเซลล์ กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้น ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น)
8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น

โดยในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ $6x10^7$ สปอร์/มล., $6x10^8$ สปอร์/มล., $6x10^9$ สปอร์/มล. และ $6x10^{10}$ สปอร์/มล.

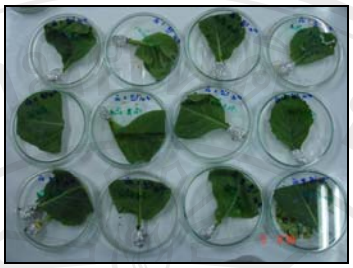



**ภาพที่7** สไลด์นับสปอร์ (haemacytometer)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำหนอนวัย 1, 2 และ หนอนวัย 3 ใส่ใน plate ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ฉีดพ่นเชื้อราเขียวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ภาพที่8) หลังจากนั้นตรวจนับผลการตายที่ 3, 5 และ 7 วัน



**ภาพที่ 8** Plate ที่มีหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ถูกพ่นด้วยเชื้อราเขียวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

แปลงค่าจำนวนหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ที่ตายในทุกกรรมวิธีเป็นเปอร์เซ็นต์การตายตามสูตร

% การตายของหนอนกระทู้ผัก =

(จำนวนหนอนก่อนทดสอบเชื้อราเขียว-จำนวนหนอนหลังทดสอบเชื้อราเขียว) x100

จำนวนหนอนก่อนทดสอบเชื้อราเขียว

ถ้ามีการตายของกรรมวิธีควบคุม (control) มากกว่า 5 % ให้ทดลองใหม่

ถ้ามีการตายของกรรมวิธีควบคุม (control) อยู่ในช่วง 0-5 %ให้ปรับค่าเปอร์เซ็นต์ การตายของหนอนกระทู้ผักด้วย Abbott's formula ดังนี้

$$\text{Abbott's formula, } Pt = \frac{Po-Pc}{100-Pc} \times 100$$

Pt = % Corrected mortality

Po = % Observed mortatity

Pc = % Control mortatity

(สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 3x3x3x4) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows บันทึก รูปร่างลักษณะ สีของโคโลนี และสปอร์ของเชื้อแต่ละไอโซเลต แล้วนำไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วินิจฉัยเพื่อยืนยันข้อมูลเปรียบเทียบกับที่เคยรายงานไว้จากสัณฐานวิทยา และลักษณะการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราเขียว ด้วยกล้องอิเล็คตรอนแบบสแกนนิ่ง

**สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและการรวบรวมข้อมูล**

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย**

พฤษภาคม 2548 - เมษายน 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved