บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ตาย และตัวอย่างดินเพาะปลูกพริกในจังหวัดเชียงใหม่

สำรวจพื้นที่ปลูกพริกในจังหวัดเชียงใหม่ โดยสืบค้นข้อมูลพื้นที่ปลูกพริกจากสำนักงานเกษตรจังหวัดเชียงใหม่ (2553) ทำการเก็บข้อมูลและตัวอย่างในพื้นที่ที่มีการปลูกพริกมากที่สุด สุ่มนับจำนวนเพลี้ยไฟบนต้นพริก โดยการเคาะยอด และนับจำนวนเพลี้ยไฟที่อยู่บนผลอ่อน เพื่อประเมินการระบาดของเพลี้ยไฟบนต้นพริก เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เข้าทำลายพริก และเพลี้ยไฟที่เป็นโรคตาย ในพื้นที่ปลูกพริกของเกษตรกร ในจังหวัดเชียงใหม่ นำแมลงที่เก็บได้ใส่ไว้ในกล่องที่รองก้นกล่องด้วยกระดาษทิชชูหยดน้ำเล็กน้อยเพื่อให้ความชื้นกับตัวอย่าง และเก็บดินบริเวณแปลงปลูกและโคนต้นพริก โดยขุดบริเวณผิวหน้าดินลึกประมาณ 10-15 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติกประมาณ 200 กรัม นำกลับมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ส่วนตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เข้าทำลายพริกหวาน นำมาทำสไลด์และจำแนกชนิด การจำแนกชนิดจะใช้หลักการ การจำแนกชนิดของ ศิริณี (2544) และ Mound and Gillespie (1997)

2. การแยกเชื้อรา วิเคราะห์และเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเก็บรวบรวม

2.1 การแยกเชื้อราจากแมลง

2.1.1 นำเพลี้ยไฟตายที่เก็บมาจากโรงเรือน จุ่มลงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (Samuels *et al*., 2002; Maneesakorn *et al*., 2011) เพื่อทำลายเชื้ออื่นที่อาจติดมากับตัวแมลงและปนเปื้อนอยู่บนผนังลำตัวแมลง จากนั้นนำไปวางบนกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อเพื่อให้ตัวแมลงแห้ง หยดน้ำกลั่นลงบนสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อให้ความชื้น บ่มเชื้อราสาเหตุที่พบโดยนำซากเพลี้ยไฟที่ตาย ใส่ไว้ในจานแก้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3-4 วัน แมลงที่ตายด้วยเชื้อราคาดว่าเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเจริญเส้นใยปกคลุมบนลำตัวแมลง นำซากแมลงที่ตายมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 ลักษณะของเพลี้ยไฟที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุม

2.1.2 ทำการแยกเชื้อราจากแมลง โดยวางแมลงที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุมทั่วตัวแมลง (ภาพที่ 3) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งเติมกรดแลกติก 25 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1-2 หยด เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (นุชนารถ, 2540) เมื่อเชื้อราเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4) ทำการแยกเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนส่วนของเชื้อราบริเวณที่กำลังเจริญไปวางในจานเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-7 วัน

ภาพที่ 4 ลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นปกคลุมแมลงที่ตายด้วยเชื้อราและเจริญบนผิวหน้าของอาหาร

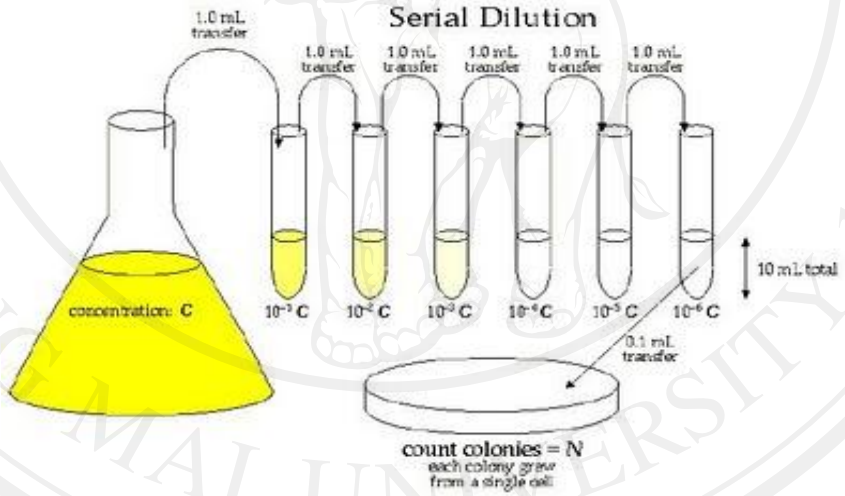
2.1.3 เมื่อเชื้อราเจริญ เขี่ยเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อราที่แยกได้มาจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยนำเชื้อราที่เลี้ยงจนบริสุทธิ์แล้วมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงโดยวิธี slide culture เป็นเวลา 5-7 วัน จำแนกชนิดของเชื้อราที่เจริญบนสไลด์ โดยตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของ โคโลนี ก้านชูสปอร์(conidiophores) และ โคนิเดีย

2.2 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน

2.2.1 นำตัวอย่างดินที่เก็บมาจากพื้นที่ปลูกพริกที่พบเพลี้ยไฟตายด้วยเชื้อราจำนวน 30 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Dilution pour plate ตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร (2554) (ภาพที่ 5) เพื่อวินิจฉัยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจากลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำดินจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้ดินกระจายตัวประมาณ 10-20 นาที ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยดินปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}-10^{-4} มิลลิลิตร



ภาพที่ 5 การแยกเชื้อด้วยวิธี Dilution pour plate (Kirkman, 2010)

2.2.2 ดูดสารแขวนลอยดินจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุ่น (ประมาณ 42-45 องศาเซลเซียส) ลงไป หมุนจานเพื่อให้สารแขวนลอยดินและอาหารเข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7 วัน

2.2.3 เมื่อกลุ่มเชื้อราเจริญบนผิวหน้าของอาหาร แยกเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ โดยใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนส่วนของเชื้อรา นำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีอาหาร PDA บ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่เขี่ยเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น นำเชื้อราที่แยกได้มาทำการจำแนกชนิดเช่นเดียวกับการจำแนกจากตัวแมลง

การวิเคราะห์ชื่อวิทยาศาสตร์และการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน อ้างอิงตามหลักการของ Samson (1974); Humber (2005); Blackwell *et al*. (2006); Sung *et al*. (2007) และ Barnett and Hunter (2011)

ภาพที่ 6 โคโลนีของเชื้อราที่แยกได้จากดินโดยวิธี Dilution pour plate

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรากับเพลี้ยไฟ

ทำการเพาะเลี้ยงเพลี้ยไฟ โดยเก็บเพลี้ยไฟจากแปลงปลูกพริกในพื้นที่ที่ทำการสำรวจมาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณบนต้นพริกหนุ่ม หรือพริกชี้ฟ้า ซึ่งอยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 43 x 63 x 36 เซนติเมตร เจาะช่องระบายอากาศทั้งสี่ด้านและฝาด้านบนกล่องปิดทับด้วยผ้าตาข่าย (ภาพที่ 7) ปล่อยเพลี้ยไฟลงบนต้นพริกประมาณ 50 ตัวต่อต้น ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เพลี้ยไฟวางไข่ หลังจากนั้นย้ายต้นพืชอาศัยที่เพลี้ยไฟวางไข่แล้วไว้ในกล่องใหม่ เพื่อให้ได้เพลี้ยไฟที่มีอายุเท่า ๆ กันเพื่อใช้ในการทดลอง เปลี่ยนต้นพริกที่ใช้เป็นพืชอาหารของเพลี้ยไฟทุกสัปดาห์ ใช้ตัวอ่อนเพลี้ยไฟในการทดลอง

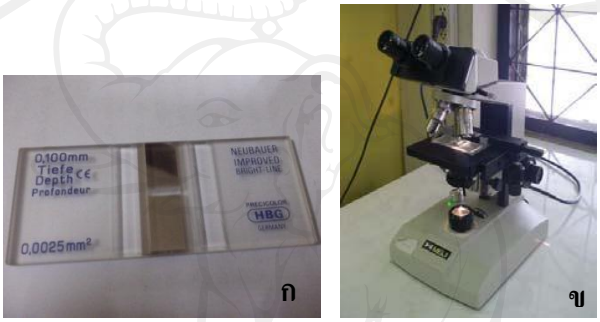
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 7 กล่องที่ใช้เพาะเลี้ยงเพลี้ยไฟ

นำเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จนเจริญเต็มที่และสร้างสปอร์แล้ว อายุ 10-21 วัน และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือเชื้อชนิดอื่นมาทดสอบ ทำการล้างสปอร์เชื้อรา โดยขูดเอาสปอร์เชื้อราที่เจริญบนอาหาร ผสมกับน้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 8) กรองสารแขวนลอยสปอร์ด้วยผ้าขาวบาง นับสปอร์เชื้อราด้วย haemacytometer (ภาพที่ 9) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้น ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 x 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (มาลี, 2552) เตรียมกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิด ล้างให้สะอาดและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใส่ใบพริกที่สะอาดลงไปในกล่องเพื่อใช้เป็นอาหารของเพลี้ยไฟ ให้ความชื้นโดยต้มวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส มีความชื้นสัมพัทธ์ 60-70 เปอร์เซ็นต์) (Patrick and Kearns, 2009) เทลงในกล่องก่อนใส่ใบพริกลงไป (ภาพที่ 10) ใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนของเพลี้ยไฟลงไปกล่องละ 20 ตัว ฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนตัวอ่อนเพลี้ยไฟ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ มีชุดควบคุม 1 ชุด โดยน้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกจำนวนเพลี้ยไฟที่ตายทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน นำเพลี้ยไฟที่ตายมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรน์สเตอริโอเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่พ่น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายที่ถูกต้องโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

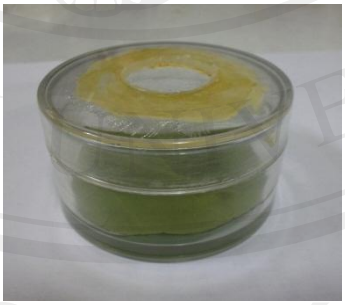
ภาพที่ 8 เชื้อราที่ผ่านการล้างสปอร์แล้ว



ภาพที่ 9 อุปกรณ์ในการคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อรา

ก. อุปกรณ์ใช้นับจำนวนสปอร์ (hemacytometer)

ข. กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 10 กล่องพลาสติก ใช้ใส่เพลี้ยไฟในการพ่นเชื้อรา

4. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อที่เข้าก่อโรคกับเพลี้ยไฟ

นำเชื้อราทดสอบที่สามารถเข้าก่อโรคกับเพลี้ยไฟได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากข้อ 4 มาทดสอบความรุนแรงที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 1×10^{3}, 1×10^{5}, 1×10^{7}, 1×10^{8}, 1×10^{9} และ 1×10^{10} โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบกับเพลี้ยไฟ 20 ตัวต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ ของแต่ละระดับความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น โดยใช้น้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกจำนวนเพลี้ยไฟที่มีเส้นใยขึ้นปกคลุม เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาคำนวณหาค่า median lethal concentration (LC_{50}) ด้วยโปรแกรม Logit PC

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราและสารเคมีฆ่าแมลงในการควบคุมเพลี้ยไฟในแปลงทดลอง

ทำการทดลองโดยปลูกพริกหวานในถุงปลูก จำนวน 100 ต้น แบ่งเป็น10 แถว แถวละ 10 ต้น เมื่อต้นพริกมีอายุหลังการย้ายปลูก 2 เดือน ทำการสุ่มนับจำนวนเพลี้ยไฟโดยการเคาะบริเวณส่วนยอดของต้นพริก แถวละ 5 ต้น จากนั้นฉีดพ่นสารตามกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดลองในข้อ 4 ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อรา *B. bassiana* ที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า ตามอัตราแนะนำ

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารอิมิดาคลอพริด (imidacloprid) ตามอัตราแนะนำ

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารฟิโปรนิล (fipronil) ตามอัตราแนะนำ

กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุม (ใช้น้ำผสมสารจับใบ)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) บันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนเพลี้ยไฟก่อนพ่นและหลังจากพ่นสารในแต่ละกรรมวิธีแล้ว 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน โดยสุ่มเก็บเพลี้ยไฟจำนวน 10 ต้น ๆ ละ 2 ใบ บันทึกการตายโดยตรวจนับตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟที่ตายในแต่ละกรรมวิธี ส่วนกรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อราให้นำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโออีกครั้ง เพื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใยและสปอร์เชื้อราที่ขึ้นปกคลุมเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่พ่น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตาย และปรับเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula หากพบการตายของแมลงในชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved