บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาผลของอาหารเทียม และวัสดุเพาะ ชนิดต่างๆ ต่อการเจริญการสร้างสปอร์ และระดับ ความสามารถ ในการก่อโรคของเชื้อรา *Pandora neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 กับเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) และเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Mizus persicae*) (Hemiptera: Aphididae)

3.1.1 การศึกษาผลของอาหารเทียมต่อความสามารถในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนในเป้าหมาย

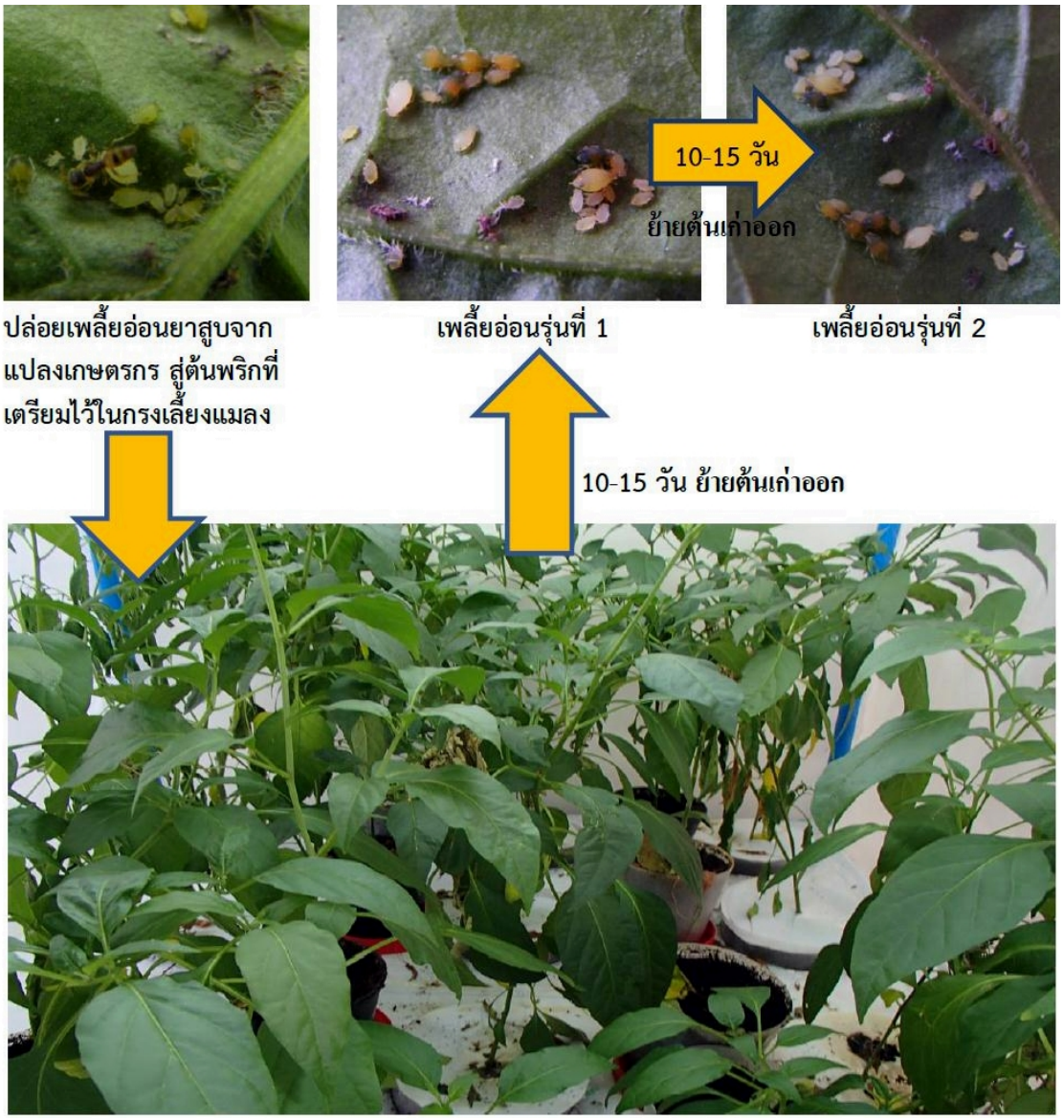
จากการวิจัยเรื่องการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความรุนแรงในระดับโมเลกุล ของเชื้อรา *Pandora neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) ซึ่งใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยอ่อนศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำอย่างยั่งยืน ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยในปีงบประมาณ 2555 – 2556 โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ซึ่งก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนชนิดต่างๆ และพบว่าเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 เป็นไอโซเลท ที่ประสิทธิภาพสูงสุดในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาต่อยอด ในการที่จะศึกษาผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะต่อระดับความรุนแรงของเชื้อราชนิดนี้ ดังรายละเอียดของวิธีการดังนี้

การเตรียมประชากรและ/หรือหน่วยทดลอง

เพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Mizus persicae*) โดยเริ่มจากเตรียมต้นพริกมาเพาะในกระถางพลาสติกขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง x สูง เท่ากับ 15 x 10 เซนติเมตร ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 50 x 50 เซนติเมตร และให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 14 วัตต์ ในช่วงแสง:มืด เท่ากับ 14: 8 ชั่วโมง เพื่อให้พริกมีการเจริญเติบโตทางใบสำหรับการใช้เพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อนยาสูบต่อไป โดยการเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อนดังกล่าวจากแปลงเกษตรโดยเก็บใบพริก มันฝรั่ง หรือมะเขือเทศ ที่มีวัยต่างๆ ของเพลี้ยอ่อนทำลายอยู่มาวางบนต้นพริกที่เตรียมไว้ และปล่อยให้เพลี้ยอ่อนยาสูบขยายพันธุ์ 1-2 รุ่น (เพลี้ยอ่อนจะใช้เวลา 10-15 วันสำหรับการขยายพันธุ์ต่อรุ่น) โดยสังเกตจากการพบกลุ่มตัวอ่อนระยะที่ 1-2 ของเพลี้ยอ่อนบนต้นมันฝรั่งต้นใหม่ (รุ่นที่ 1) จากนั้นย้ายต้นผักที่เริ่มปล่อยเพลี้ยอ่อนครั้งแรกออกจากกรง และนำพริกต้นใหม่วางในกรงเลี้ยงเพื่อให้มีเพลี้ยอ่อนรุ่นที่สองต่อไป (ภาพที่ 3.1)

เตรียมเพลี้ยอ่อนผักตามวิธีของ รุ่งเกียรติ และ ศมาพร (2557) โดยเพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) ให้ปลอดเชื้อโดยเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อนดังกล่าวจากแปลงเกษตรโดยเก็บใบผักคะน้า และกะหล่ำ ที่มีวัยต่าง ๆ ของเพลี้ยอ่อนทำลายอยู่มาวางบนต้นคะน้า (อายุ 30 วัน) ที่เตรียมไว้ในกระถางปลูกในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 50 x 50 เซนติเมตร ในเรือนทดลองกรงละ 1 ต้น และปล่อยให้เพลี้ยอ่อนดังกล่าวขยายพันธุ์ 1-2 รุ่น (20-30วัน) โดยสังเกตจากการพบกลุ่มตัวอ่อน

ระยะที่ 1-2 ของเพลี้ยอ่อนบนต้นผักต้นใหม่ (รุ่นที่ 1) จากนั้นย้ายต้นผักที่เริ่มปล่อยเพลี้ยอ่อนครั้งแรกออกจากโรงเรือน จากนั้นนำต้นผักต้นใหม่มาวางในกรงเลี้ยงเพื่อให้มีเพลี้ยอ่อนรุ่นที่สองต่อไป



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ต้นพริก

เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *P. neoaphidis* บนอาหารเทียมชนิดต่างๆ ตามวิธีของ รุ่งเกียรติ และคณะ (2557) ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA) และ Nutrient Agar (NA) นาน 15 วัน และเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ซึ่งเพาะเลี้ยงได้จากอาหารเทียมแต่ละชนิด โดยขูดสปอร์จากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีสารจับใบ Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนสปอร์โดยใช้เครื่องนับจำนวนสปอร์ Neybauer Hemocytometer และปรับความเข้มข้นของสปอร์ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของ Poinar and Thomas (1984) โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีสารจับใบ Tween 20 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย (Uziel and Kenneth, 1999, pp. 153-163)

ปลูกเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ที่ได้จากเชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ กับเพลี้ยอ่อนที่เตรียมไว้ตามวิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lacey (1997) และ Tanada and Kaya (1993) โดยนำต้นพืช (มันฝรั่งในกรณีทดสอบกับ เพลี้ยอ่อนยาสูบ และคะน้าในกรณีทำการทดสอบเพลี้ยอ่อนผัก) มีเพลี้ยอ่อนรุ่นที่สอง ที่เพาะเลี้ยงไว้มาตัดใบที่มีกลุ่มของเพลี้ยอ่อนที่ต้องการทดสอบอยู่จำนวนหนึ่งใบ ใช้พู่กันเบอร์ 2 เขี่ยเพลี้ยอ่อนออกจนเหลือ 50 ตัวต่อใบ วางใบพืชที่มีเพลี้ยอ่อนในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่ปูด้วยกระดาษกรอง (Wattman No 1) ชุ่มน้ำเพื่อให้มีระดับความชื้นสัมพันธ์ประมาณ 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ และพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) โดยมีวิธีควบคุม (control) คือการพ่นน้ำกลั่น ผสม Tween 20 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) หลังจากการปลูกเชื้อแล้ว และวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาพอุณหภูมิ 20 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพมืด และบันทึกจำนวนเพลี้ยอ่อนที่ตาย และ ที่มีชีวิตอยู่ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการรวบรวมข้อมูลและคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Percent Cumulative Mortality – PCM) ของแมลงที่ทดสอบโดยนำข้อมูลการตายมาปรับเป็นค่าการตายที่ถูกต้อง (corrected control mortality) ตามขบวนการทางพิษวิทยาโดยใช้ Abbott's Correction Formula (Abbott, 1925, pp. 265-267) ดังนี้

$$\text{การตายของแมลงที่ทดสอบ (\%)} = \frac{\text{\%การตายของแมลงที่ได้รับเชื้อ - \% ตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อ X100}}{\text{\%การตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อ X100}}$$

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของเพลี้ยอ่อนในเวลาที่กำหนดที่วัดได้จากทั้งสองการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการ

เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.1.2 การศึกษาผลของวัสดุเพาะต่อการเจริญของเส้นใย การสร้างสปอร์ และความสามารถในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนในเป้าหมาย

เนื่องจากยังไม่มีรายงานและการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 บนวัสดุเพาะชนิดต่างๆ ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการวัดการเจริญ ของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรานี้ บนวัสดุเพาะที่สามารถหาได้ในท้องถิ่น และเคยมีการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวเปลือก และ ข้าวสวย ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก รุ่งเกียรติ และคณะ (2557ข, 65 หน้า) และ Li and Feng, (2003, pp. 344-317) โดยเริ่มจากเตรียมข้าวเปลือกโดยนำข้าวหอมมะลิมาหุงโดยการนึ่งให้สุกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาเกลี่ยให้เย็นในถาดซึ่งสานด้วยไม้ไผ่เพื่อลดความชื้นส่วนเกิน นำข้าวเปลือกไปล้างน้ำให้สะอาด นำแช่น้ำนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มนาน 15 นาที และนำมาผึ่งลมให้หมาดในถาดไม้ไผ่นาน 30 นาที Sabouraud Deatrose Broth (SDB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักข้าวทุก 150 กรัม เตรียมข้าวฟ่างเช่นเดียวกับการเตรียมข้าวเปลือก ส่วนอาหารสุนัขเตรียมโดยการนำอาหารสุนัข (พลีโม่ สำหรับสุนัขโตทุกชนิดรสตับ) นำ มาแช่น้ำสะอาดนาน 1.5 นาที และนำออกมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำในถาดที่สานด้วยไม้ไผ่ นำวัสดุเพาะแต่ละชนิดมาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 25 กรัมต่อจาน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำออกมาผึ่งให้เย็นในสภาพอุณหภูมิห้อง ย้ายเชื้อบริสุทธิ์มาวางบนอาหาร SDAY หลังจากเชื้ออายุ 10 วัน โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้ออยู่มาวางในจานวัสดุเพาะที่เตรียมไว้วางบนชั้น ในสภาพอุณหภูมิ 20 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ จนกว่าจะพบว่าเชื้อราเจริญจนเต็มวัสดุเพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

การวัดการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา ดำเนินการโดยบันทึกจำนวนชั่วโมงที่เส้นใยของเชื้อราใช้ในการเจริญ และอาศัยข้อมูลส่วนนี้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนวันที่เชื้อใช้เจริญ} \times 100}{\text{จำนวนวันที่เชื้อมีการเจริญเต็มถุงเพาะถุงแรก}}$$

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 บนวัสดุเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

การตรวจหาปริมาณการผลิตสปอร์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เลี้ยงบนวัสดุเพาะแต่ละชนิดนำอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ทั้งหมดมาละลายน้ำ ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำมา 0.05 มิลลิลิตรไปตรวจนับบนเครื่องนับจำนวนสปอร์ (hemacytometer) และหาจำนวนสปอร์เป็นหน่วยสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีในข้อ 3.1.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่สร้างบนวัสดุเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด มาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 จากเชื่อที่เลี้ยงด้วยวัสดุเพาะดังที่กล่าวมาข้างต้น และหลังจากเตรียมพืชอาศัยและเพลี้ยอ่อนยาสูบซึ่งจะทดสอบตามวิธีในข้อ 3.1.1 และการทดสอบความสามารถของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนเพลี้ยอ่อนผักและเพลี้ยอ่อนยาสูบ โดยนำวัสดุเพาะซึ่งมีเชื้อราเจริญอยู่มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีสารจับใบ Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำ กากของวัสดุเพาะที่เหลือออก นับจำนวนสปอร์โดยใช้เครื่องนับจำนวนสปอร์และปรับความเข้มข้นของสปอร์ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของ Lacey (1997) โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อราที่มีสารจับใบ Tween 80 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย ปลูกเชื้อรากับเพลี้ยอ่อน วัดเปอร์เซ็นต์การตาย และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ตามวิธีในข้อ 3.1.1 สำหรับการแปรผลการศึกษาต่อไป

3.2 ผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105

3.2.1 ผลของอาหารเทียมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลทซ์ Pd105

การเตรียมประชากรและหรือหน่วยทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล

วัดปริมาณการสร้างเอนไซม์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 บนอาหารเทียมชนิดต่างๆ โดยเริ่มจากการเตรียมอาหารเทียมจำนวน 5 ชนิดได้แก่ Potato Dextrose (PDB), Sabouraud Dextrose Broth (SDB), Sabouraud Dextrose Broth Supplemented with Yeast Extract (SDBY), Malt Extract Broth (MEB) และ Nutrient Broth (NB) โดยนำสูตรสำเร็จของอาหารเหล่านี้มาละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 บนอาหาร SDAY นาน 10 วัน และขูดสปอร์ของเชื้อรามาละลายในน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตร และเพาะ เลี้ยงให้เชื้อผลิตเอนไซม์ protease และวิเคราะห์กิจกรรมของเอ็นไซม์ตาม วิธีซึ่งดัดแปลงจาก Kucera (1971, pp. 211-215) โดยบ่มในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียน ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 3 วัน จากนั้น

นำของเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยฝ้าขาวบาง และนำไป centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที และนำไปตรวจยืนยันการสร้างเอ็นไซม์โดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลของ protease โดยวิธี acrylamide gel electrophoresis ใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย เจล 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพที่ไม่มีการชักนำ ในสภาพอุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ใน Triton X -100 solution 2.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้าง SDS และทำให้เอ็นไซม์เสียสภาพ นำเจลมาบ่มในบัฟเฟอร์ (Tris-HCl (pH 8) 0.01 โมล – CaCl2 10 มิลลิโมล) นาน 5-8 ชั่วโมง นำมา fixed และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R – 250 นาน 3 ชั่วโมง และยับยั้งปฏิกิริยาด้วย methanol และ acetic acid 1 ชั่วโมง และนำไปส่องบนพื้นหลังสีฟ้าเข้ม โดยวัดขนาดโมเลกุลของแถบโปรตีนด้วยตัวชี้วัดมาตรฐาน (standard marker) ทั้งนี้จากการดำเนินการผลปรากฏว่าการสกัดเอนไซม์ด้วยวิธีการดังกล่าวไม่ประสบผลในการสกัดเอนไซม์ protease จากเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีการศึกษาโดยการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อรานี้ ด้วยชุดทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ API ZYM® – Semiquantitation of enzymatic activities โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ชนิดเหลว และนำอาหารเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และนำมาตัวอย่างละ 65 ไมโครลิตร มาทดสอบกับชุดทดสอบตามวิธีการที่ให้มาโดยบริษัทผู้ผลิต โดยปล่อยให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมนาน 5 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นหยดสาร ZYM ในแต่ละแถบของชุดทดสอบ ปล่อยให้เกิดการพัฒนาของสีนาน 5 นาที และวางใต้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ และวัดสีตามระบบของชุดทดสอบ กล่าวคือ ค่าตั้งแต่ 0 – 5 ซึ่ง 0 คือไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดใด (negative) ที่ระดับ 1 คือค่า 5 นาโนโมล 2 คือ ค่า 10 นาโนโมล 3 คือ20 นาโนโมล 4 คือ 30 นาโนโมล และ 5 คือ 40 นาโนโมล เป็นต้นไป โดยมีการทำซ้ำตัวอย่างละสองซ้ำ

3.2.2 ผลของวัสดุเพาะต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105

เตรียมวัสดุเพาะเลี้ยงต่างๆ ตามวิธีของรุ่งเกียรติ และคณะ (2557ก) โดยเตรียมเตรียมข้าวสวยโดยการหุงข้าวหอมมะลิโดยใช้หม้อหุงข้าวไฟฟ้าจนสุก 50 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมข้าวเปลือกโดยนำข้าวหอมมะลิมาหุงโดยการนึ่งให้สุกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาเกลี่ยให้เย็นในถาดซึ่งสานด้วยไม้ไผ่เพื่อลดความชื้นส่วนเกิน นำข้าวเปลือกไปล้างน้ำให้สะอาด นำแช่น้ำนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มนาน 15 นาที และนำมาผึ่งลมให้หมาดในถาดไม้ไผ่นาน 30 นาที เตรียมข้าวฟ่างเช่นเดียวกับการเตรียม นำมาแช่น้ำสะอาดนาน 1.5 นาที และนำออกมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำในถาดที่สานด้วยไม้ไผ่ นำวัสดุเพาะแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารโดยการเติมน้ำกลั่นระหว่างบด จากนั้นนำวัสดุที่บดแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาบรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมอาหาร Sabouraud Dextrose Broth (SDB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และขูดสปอร์ของเชื้อมาละลายในน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยง วัดกิจกรรมของเอ็นไซม์และการเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลตามวิธีในข้อ 3.2.1

3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และ วัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์

นำข้อมูลค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอ็นไซม์ protease และหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเทียม ซึ่งได้แก่ Potato Dextrose (PDB), Sabouraud Dextrose Broth (SDB), Sabouraud Dextrose Broth Supplemented with Yeast Extract (SDBY), Malt Extract Broth (MEB) และ Nutrient Broth (NB) มาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้างเอนไซม์ protease กับเปอร์เซ็นต์การก่อโรค กับเพลี้ยอ่อนในเป้าหมาย โดยใช้สมการถดถอย (regression equation) ซึ่งกำหนดให้ค่า log ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease y และ เปอร์เซ็นต์การก่อโรค x และ วัดค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r และ R) ในสมการ เป็นตัวชี้วัดระดับและแนวโน้มความสัมพันธ์ (LeClerg *et al*., 1966, Snedecor and Cochran, 1967, Wadley, 1967) จากนั้นนำข้อมูลชุดดังกล่าวมาแสดงค่าเป็นระดับความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย จากนั้นนำเข้ามูลมาพลอตกราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นให้เป็นแนวโน้มความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น

นำข้อมูลค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease และหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง และความสามารถ ในการก่อโรคของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะ ซึ่งได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่างและอาหารสุนัข มาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้างเอนไซม์ protease กับเปอร์เซ็นต์การก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนในเป้าหมาย โดยการใช้สมการถดถอย (regression equation) ซึ่งกำหนดให้ค่า log ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอ็นไซม์ protease y และเปอร์เซ็นต์การก่อโรค x และ วัดค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r และ R) เป็นตัวชี้วัดระดับ และแนวโน้มความสัมพันธ์ (LeClerg *et al*., 1966; Snedecor and Cochran, 1967; Wadley, 1967) จากนั้นนำข้อมูลชุดดังกล่าวมาแสดงค่าเป็นระดับความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย จากนั้นนำเข้ามูลมาพลอตกราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นให้เป็นแนวโน้มความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น

3.4 เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

ตู้สำหรับเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (Laminar flow) ที่มีการรับรองมาตรฐานตามมาตรฐานของ NSF ได้แก่ การทดสอบความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน โดยวัดปริมาณของสปอร์ของแบคทีเรียที่ออกมาจากพื้นที่การทำงานภายในตู้สู่สิ่งแวดล้อม ทดสอบความปลอดภัยของชิ้นงาน โดยวัดปริมาณของสปอร์ของแบคทีเรียภายนอกที่เข้ามาในพื้นที่การทำงานภายในตู้ และ ทดสอบการป้องกันการเกิด Cross Contamination โดยวัดปริมาณสปอร์ของแบคทีเรียที่ตกค้างภายในตู้หลังจากการทำงาน รวมทั้งการทดสอบต่างๆนี้จะวัดทั้งความเร็วของการไหลเวียนอากาศภายในและภายนอกตู้ วัดความเร็วของอากาศที่หมุนเวียนในห้องปฏิบัติการ ทดสอบการรั่วของแผ่นกรอง HEPA นอกจากนี้ยังทดสอบไปถึง การสั่นและความดังของตู้ขณะทำงาน และวัดปริมาณความเข้มแสงในห้องปฏิบัติงานโดยช่างดูและอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดันไปน้ำ (Tomy autoclave ss-320, Tomy Seiko Co. Ltd., Japan) ซึ่งได้รับการประกันคุณภาพและบำรุงรักษาจากบริษัทผู้จำหน่าย ผู้เชี่ยวชาญ หรือผู้ผลิต ได้แก่ 1) ตัวบ่งชี้ทางกายภาพ ประกอบไปด้วย โลหะอัลลลอยด์ ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีได้ โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ถ้าโลหะนี้เกิดหลอมเหลวหรือเสียหายจากการทำงานของเครื่องจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถมองเห็นได้ 2) ตัวบ่งชี้ทางเคมีได้แก่ การมีเทปสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave tape) ซึ่งจะมีแถบสีที่จะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีดำหรือน้ำตาลเข้มเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3) ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ โดยตัวบ่งชี้ชนิดนี้คือการบรรจุสปอร์ของแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูงมาก ถ้าเครื่อง Autoclave ไม่สามารถทำอุณหภูมิที่ถูกต้อง สปอร์เหล่านี้จะเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่งตัวบ่งชี้ทางชีวภาพนี้จะได้กล่าวถึงอย่างละเอียดในหัวข้อต่อไป อีกทั้งมีการทดสอบเครื่อง Autoclave ทุกๆ 6 เดือน โดยการทำ Spore test โดยใช้ชุดทดสอบแบบสำเร็จ (spore strips) ของเชื้อแบคทีเรียพวก *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ ที่ทนความร้อนได้สูงมาก โดยใส่ชุดทดสอบซึ่งภายในมีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ หลังจากเริ่มการทำงานเครื่องแล้ว จะทำให้หลอดแก้วภายในชุดทดสอบแตกสปอร์ที่อยู่ภายในก็จะตกลงไปในอาหารเหลวภายใน หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชุดทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ถ้าสปอร์ถูกทำลายทั้งหมดสีของอาหารจะยังคงเป็นสีฟ้าเช่นเดิม แต่ถ้าสปอร์มีการเจริญเติบโตและมีกระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นจะทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง อีกทั้งมีการใช้เครื่องมือ และมีการบรรจุสิ่งที่จะฆ่าเชื้ออย่างปลอดภัยตามคำแนะนำของผู้ผลิต

กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope และกล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพโดยบริการหลังการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการจัดการด้านพื้นฐานการใช้และการดูแลเบื้องต้นโดยผู้ใช้และดูแลอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ในห้องปฏิบัติการเช่น การเก็บกล้องจุลทรรศน์ไว้ในที่ที่ปราศจากฝุ่นละออง ไม่มีความชื้นสูง ในห้องมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก หลีกเลี่ยงจากสถานที่ที่มีเชื้อรา การเตรียมสไลด์ที่เหมาะสมกับการใช้กล้อง การเช็ดเลนส์ต้องใช้กระดาษเช็ดเลนส์ทุกครั้งโดยน้ำยาที่ใช้เช็ดเลนส์ ได้แก่ xylene 85% ผสม ether 15% หรือ alcohol 80% ผสม ether 20% ส่วนไมโครมิเตอร์ที่ใช้วัดขนาดของสิ่งที่ส่องใต้กล้อง ได้มีการเทียบค่าระยะห่างของแต่ละช่องกัน stage micrometer เมื่อต้องการวัดขนาดวัตถุ ให้ใส่แผ่นกระจกกลมในกระบอกเลนส์ใกล้ตา วางแผ่น stage micrometer บนแท่นวางสไลด์ หลังปรับกล้องให้เห็นภาพขีดแบ่งบนสไลด์ แล้วเทียบระยะห่างแต่ละช่องบนแผ่นกระจกกลมกับขีดแบ่งบนแผ่นสไลด์ และ คำนวณค่าของระยะห่างของช่องบนแผ่นกระจกกลมตามสูตร ค่า 1 ช่องของ ocular micrometer = จำนวนช่องของ stage micrometer / จำนวนช่องของ ocular micrometer x ค่า 1 ช่องของ stage micrometer

อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาอื่นๆ เช่นเครื่องแก้วและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขนาดเล็ก มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

อุปกรณ์พื้นฐานสำหรับ gel electrophoresis มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

เรือนทดลอง กรง กล่อง และและอุปกรณ์พื้นฐาน สำหรับเพาะเลี้ยงแมลงมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางผู้รับเหมาจัดทำและผู้ตรวจรับ รวมทั้งมีการปฏิบัติงานตามความเหมาะสมในระดับที่ทดสอบ

อุปกรณ์สำหรับฉีดพ่นเชื้อราโรคแมลงมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

อุปกรณ์สำหรับให้ความชื้น (Devatec Stream Humidifier) มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น (Temperature and Humidity Data Logger รุ่น SKL200THIIa, SK Sato, Japan) ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องชั่งดิจิตอล (Digital Scale 3000g, GM-3KG, Lutron, Taiwan) ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องเขย่าสารและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) KS 4000 ic control, Germany มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศทุก 6 เดือน รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

เครื่องมือสำหรับการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Z206A with 6x50ml, Hermle, Germany) มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศทุก 3 เดือน รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ขนาดเล็กที่จำเป็น สำหรับการสกัดโปรตีนและการทำ electrophoresis รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้มีการสั่งซื้อจากตัวแทนจำหน่วยที่ได้รับความเชื่อถือ รวมทั้งมีการคัดเลือกบริษัทผู้ผลิตที่มีคุณภาพ มีการตรวจสอบสภาพและอายุการใช้งาน และการใช้ในอัตราและวิธีการตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด โดยสารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่

1. Potato Dextrose Agar (PDA) Hi-Media Laboratories PVt. Ltd., Mumbai-400 086, India
2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) BIOMARK Laboratory, Pune 411011,India
3. Nutrient Agar Yeast Extract (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain. Made in European Union)
4. Malt Extract Agar (MEA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain. Made in European Union)
5. Beef Extract (Becton Dickinson Microbiolog Systems Company, Spatks, USA)
6. Peptone (Hi Media Laboratories PVt. Ltd., Mumbai400 086, India)
7. Casein Acid Hydrolysate (Hi-Media Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai 400-086 India
8. Agar (ผงวุ้น)

9. Malt Extract (Fluka biochemika)
10. Magnesium sulphate, Maso47H2O) (CARLO ERBA REAGENTI, France)
11. K2HPO4 (CARLO ERBA REAGENTI, France)
12. Glycerol
13. Dextrose (DIFCO, BECTON DICKINSON, MD, USA)
14. สารจับใบ Tween 80
15. สารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา
16. PCR Buffer
17. Iso amyl alcohol
18. Chloroform
19. Agarose
20. Ethidium bromide
21. acrylamide gel
22. Tyrosine
23. Coomassie brilliant blue R – 250
24. Ethanol 70 %
25. methanol
26. acetic acid
27. $Cacl_2$
28. Tris EDTA
29. สารเคมีอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ protease
30. API ZYM® – Semiquantitation of enzymatic activities, bioMérieux, Inc, Durham, NC, USA
31. น้ำมันพืช
32. สารจับใบ Tween 80
33. ปุ๋ยเคมี สูตร 15-0-0
34. เมล็ดธัญพืชที่ให้เป็นวัสดุเพาะ ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวเปลือก และ ข้าวสวย
35. สารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา
36. กรงเพาะเลี้ยงแมลง ตาข่ายซาราน (Saran wrap) ขนาดกว้าง x ยาวx สูง 4x 5x 4 เมตร และชุดหลอดไฟขนาด 14 วัตต์ ซึ่งติดตั้งเครื่องจับเวลา (timer) ปิดเปิดไฟฟ้า