

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษานิเวศวิทยาของหนอนคืบกินใบลำไย

1.1 พลวัตประชากรของหนอนคืบกินใบลำไยตามฤดูกาล

ทำการศึกษานาของประชากรหนอนคืบกินใบลำไยจากสวนลำไยพันธุ์อีดออายุ 5 ปี โดยเริ่มดำเนินการระหว่างเดือนพฤษภาคม 2543 และถึงในเดือนเมษายน 2544 ที่บ้านปากกอก อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นสวนที่ปลูกเฉพาะลำไยพันธุ์อีดอเพียงชนิดเดียว สวนที่ใช้ในการศึกษามีขนาดของพื้นที่ 3,255 ตารางเมตร มีการจัดการสวนลำไยโดยมีการให้น้ำและปรับปรุงดิน 3 ช่วง คือ ในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน ช่วงแทงช่อดอก และช่วงติดผลอ่อน มีการกำจัดวัชพืชโดยใช้เครื่องตัดหญ้าสะพายหลัง ทำการสูมตัวอย่างแมลงโดยวิธีของศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือ โดยสูมจากกิ่งลำไย ที่สูงจากพื้นดิน 1.5 เมตร ต้นละ 2 กิ่ง ความยาวแต่ละกิ่งเฉลี่ย 1 เมตร จำนวน 10 ต้น รวมทั้งหมด 20 กิ่ง ทำการเคาะกิ่งจำนวน 20 ครั้ง ตรวจนับปริมาณหนอนวัยต่าง ๆ ที่ร่วงลงในกรอบตารางสี่เหลี่ยม (quadrat) ขนาด 1x1 เมตร ทำการตรวจนับสัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนวัยต่าง ๆ ต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร

ส่วนดักแด้จะทำการสูมนับปริมาณดักแด้จากยอดลำไยยาว 50 เซนติเมตร ที่สูงจากพื้นดินโดยเฉลี่ย 0.5-1.5 เมตรจำนวน 10 ต้น ๆ ละ 2 ยอด ทำการตรวจนับสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เริ่มนับตั้งแต่ เดือนพฤษภาคม 2543 และถึงในเดือนเมษายน 2544 นำข้อมูลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยจำนวนดักแด้ต่อยอดลำไยยาว 50 เซนติเมตร บันทึกในรอบ 1 ปี

1.2 การเพาะเลี้ยงหนอนคืบกินใบลำไยสำหรับการศึกษาในด้านต่าง ๆ (Stock culture)

ทำการเก็บรวบรวมหนอนและดักแด้ของผีเสื้อหนอนคืบกินใบลำไยจากสวนลำไยของเกษตรกร ที่บ้านปากกอก อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ บ้านแม่เหิยะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และบ้านน้ำแพร่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ โดยตัวหนอนนำมาเลี้ยงด้วยยอดและ ใบอ่อนของลำไยพันธุ์อีดอใช้ลากลีซุ่มน้ำพันก้านเพื่อรักษาความชื้นให้กับยอดลำไย ทำการเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 6x8.5x3.5 เซนติเมตร ที่ฝากล่องบุ

ด้วยตาข่ายทองเหลือง โดยทำการเปลี่ยนใบพืชและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงทุกวันจนหนอนเข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ ซึ่งสังเกตสีของลำตัวหนอนที่เปลี่ยนเป็นสีชมพูอมม่วง จากนั้นทำการเปลี่ยนใบลำไยเป็นใบล่าง ทั้งนี้เพื่อให้ตัวหนอนใช้ห่อหุ้มตัวเข้าสู่ระยะดักแด้ จากนั้นนำดักแด้ใส่กระบะพลาสติกขนาด 32x45x13 เซนติเมตร โดยมีกระดาษรูปสามเหลี่ยมครอบเพื่อกันแสงแดด จากนั้นนำมาแขวนไว้ในกรงขนาด 6x6x3.5 เมตร ภายในกรงปลูกต้นลำไยพันธุ์คืออายุเฉลี่ยประมาณ 1-2 ปี ที่กำลังแตกยอดอ่อน เพื่อให้ตัวแม่ผีเสื้อวางไข่ ให้น้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารผีเสื้อตัวเต็มวัย โดยใส่ขวดและปิดปากขวดด้วยสำลี ก่อนนำไปแขวนไว้ในกรงจำนวน 12 จุด ทำการเก็บรวบรวมไข่ผีเสื้อทุก ๆ วัน เพื่อใช้ในการศึกษา

1.3 การศึกษาวงจรชีวิตของหนอนคืบกินใบลำไย

นำไข่หนอนคืบกินใบลำไยที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง จำนวน 20 ฟอง ใส่ในจานแก้ว (petri - dish) รองพื้นด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1) เพื่อให้ความชื้น นำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 25 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 68 ± 4 เปอร์เซ็นต์ การทดลองกระทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ฟอง เมื่อหนอนฟักออกจากไข่ ทำการแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 3x4x3 เซนติเมตร ฝากกล่องด้วยตาข่ายทองเหลืองกล่องละ 1 ตัว รวมจำนวน 20 กล่อง โดยใช้ใบอ่อนลำไยเป็นอาหารของตัวหนอน ทำการเปลี่ยนใบพืชและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงทุกวัน หลังจากหนอนลอกคราบแต่ละครั้งทำการวัดความกว้างของหัวกะโหลกจากหนอนแต่ละวัยเพื่อนำมาคำนวณหาค่า ทำนายความกว้างของสันหัวกะโหลก (E_i , predicted width of head capsule) โดยวิธีการของ Dyar ' law เสนอโดย (Suasa-ard (1976)

E_i = ค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญของความกว้างหัวกะโหลก X ค่าคำนวณของความกว้างหัวกะโหลก

และจดบันทึกจำนวนวันของการเจริญเติบโตของหนอนแต่ละระยะ จนกระทั่งหนอนเข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ ซึ่งจะสังเกตจากสีของตัวหนอนที่เปลี่ยนเป็นสีชมพูอมม่วง จากนั้นทำการเปลี่ยนใบพืชโดยใช้ใบล่างเพื่อให้ตัวหนอนใช้ห่อหุ้มตัวเข้าดักแด้ ทำการวัดขนาดของดักแด้และแยกเพศโดยรูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (genital pore) และรูเปิดของทวารหนัก (anal pore) หลังจากหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ประมาณ 3 วัน เมื่อดักแด้ฟักออกเป็นตัวเต็มวัยบันทึกจำนวนวัน จากนั้นนำผีเสื้อไปเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 40x60x40 เซนติเมตร ภายในกรงมีกิ่งตอนลำไยพันธุ์คืออายุ 5-6 เดือนที่กำลังแตกใบอ่อน และให้น้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นอาหารผีเสื้อในกรงโดยน้ำผึ้งจะใส่ขวดปิดปากขวดด้วยสำลีและแขวนไว้ในกรง บันทึกระยะเวลาอายุขัยของตัวเต็มวัย และคำนวณระยะเวลาเฉลี่ยในการเจริญเติบโตจากระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย

1.4 การศึกษาตารางชีวิต (Life table) ของหนอนคืบกินใบลำไย

การศึกษาตารางชีวิต (life table) ดำเนินการศึกษิตตามวิธีการของ Varley and Gradwell (1970) และ Napompeth (1973) ในห้องปฏิบัติที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 24 ± 2 เซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 67 ± 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาถึงอัตราการเพิ่มที่แท้จริง (net reproductive rate of increase, R_0) ความสามารถในการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (capacity for increase, r_c) สัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ที่แท้จริง (finite rate of increase, λ) และช่วงอายุขัยของกลุ่ม (cohort generation time, T_c) โดยใช้ไข่ของหนอนคืบกินใบลำไยอายุน้อยกว่า 24 ชั่วโมง จำนวน 200 ฟอง ใส่ไว้ในกล่องพลาสติกขนาด $8 \times 10 \times 6$ เซนติเมตร ที่ฝากล่องบุด้วยตาข่ายทองเหลือง พื้นกล่องรองด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำ เพื่อให้ความชื้นแก่ใบลำไย ตรวจสอบจำนวนไข่ที่ฟักทุก ๆ 3 วัน เมื่อหนอนฟักออกจากไข่ให้อาหารโดยใช้ใบลำไยอ่อน เปลี่ยนอาหารทุกวันจนกระทั่งเข้าสู่วัยที่ 2 เนื่องจากหนอนมีขนาดใหญ่ขึ้น และกินอาหารมากขึ้นจึงทำการแยกหนอนไปเลี้ยงในกล่องขนาด $8 \times 10 \times 6$ เซนติเมตร จำนวน 2 กล่อง ทำการบันทึกจำนวนหนอนที่มีชีวิตรอดทุก ๆ 3 วันและจำนวนหนอนที่เข้าคักแต่ทำการแยกเพศโดยอาศัยรูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (genital pore) และรูเปิดของทวารหนัก (anal pore) แล้วนำคักแต่ใส่กระบะพลาสติกขนาด $32 \times 45 \times 13$ เซนติเมตร โดยมีพลาสติกกรุสามเหลี่ยมครอบเพื่อกันแสงแดด (ภาพที่ 2 ก) จากนั้นนำมาแขวนในกรงขนาด $6 \times 6 \times 3.5$ เมตร (ภาพที่ 2 ข) ภายในกรงปลูกต้นลำไยพันธุ์อีดออายุเฉลี่ย 1-2 ปีที่กำลังแตกยอดอ่อน เพื่อให้ตัวแม่ผีเสื้อวางไข่ ตรวจสอบจำนวนคักแต่ที่ฟักออกเป็นตัวเต็มวัยและทำการแยกเพศในระยะผีเสื้อโดยอาศัยอวัยวะประสานปีก (frenulum) ที่เพศเมียจะมีอวัยวะประสานปีก 2 อัน ส่วนเพศผู้มีเพียงอันเดียว เพื่อหาสัดส่วนเพศ (sex ratio) ให้นำน้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหารผีเสื้อตัวเต็มวัยโดยใส่ขวดและปิดปากขวดด้วยสำลี (ภาพที่ 2 ค) ก่อนนำไปแขวนไว้ภายในกรงจำนวน 12 จุด บันทึกความสามารถในการวางไข่ของตัวเต็มวัยโดยตรวจสอบจำนวนไข่ที่วาง เพื่อนำค่าของการขยายพันธุ์ในแต่ละช่วงอายุ ($l_x m_x$) มาเขียนกราฟคู่กับช่วงอายุ (X) จะได้กราฟช่วงการเวลาการวางไข่ (Eggs curve) และการอยู่รอดของตัวเต็มวัยทุก ๆ 3 วัน พร้อมทั้งอัตราการอยู่รอดในแต่ละระยะการเจริญเติบโตเพื่อนำค่าอัตราการอยู่รอดในแต่ละระยะการเจริญเติบโต (l_x) มาหาความสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโต (X) จะได้กราฟอัตราการมีชีวิตรอด (Survivorship curve) จนกระทั่งตัวเต็มวัยตาย นำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างตารางชีวิตโดยวิธีการดังนี้

$$\text{อัตราการเพิ่มที่แท้จริง } (R_0) = \sum_{x=0}^{\alpha} l_x m_x$$

ความสามารถในการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r_c) = $\frac{\log_e R_0}{T_c}$

สัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ที่แท้จริง (λ) = $\text{antilog}_e r_c$

$$\text{ช่วงอายุขัยของกลุ่ม} (T_0) = \frac{\sum_{x=0}^{\alpha} l_x m_x X}{\sum_{x=0}^{\alpha} l_x m_x}$$



ภาพที่ 2 โรงเพาะเลี้ยงขนาด 6x6x3.5 เมตร (ก) พลาสติกรูปสามเหลี่ยมเพื่อกันแสงแดด (ข)
ขวดใส่น้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ และปิดปากขวดด้วยสำลี (ค)

1.5 การศึกษาวงจรชีวิตของแตนเบียน *Apanteles* sp.

การศึกษาวงจรชีวิตของแตนเบียน *Apanteles* sp. ในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 23 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 64 ± 4 เปอร์เซ็นต์ ที่ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววินทรีย์ แห่งชาติภาคเหนือ ที่ทำการเลี้ยงโดยนำตัวเต็มวัยของแตนเบียน *Apanteles* sp. อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง มาจำนวน 10 คู่ ใส่ลงไปในกล่องพลาสติกทรงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ที่ฝากล่องเจาะรูด้วยเข็มเบอร์ 4 ให้น้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สำลีชุบน้ำผึ้ง แขนงติดกับฝากล่อง ใส่หนอนคืบกล้วยไม้ 1 หรือ 2 ลงไป 10 ตัว ให้ใบอ่อนกล้วยไม้เป็นอาหาร ให้แตนเบียนวางไข่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนตัวหนอนให้ใหม่ทุกวัน นำหนอนคืบกินใบกล้วยไม้ที่ถูกเบียนแต่ละวันมาเลี้ยงด้วยใบอ่อนกล้วยไม้ และนำตัวหนอนมาผ่าดูทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาการพัฒนาระยะการเจริญเติบโตของแตนเบียน โดยการบันทึกจำนวนวันของการเจริญเติบโตของแตนเบียนแต่ละระยะการเจริญเติบโตจนกระทั่งแตนเบียนเข้าดักแด้ และเป็นตัวเต็มวัย นำตัวเต็มวัยมาแยกเพศโดยดูจากอวัยวะวางไข่ (ovipositor) ที่ส่วนท้องปล้องสุดท้ายของลำตัวบันทึกสัดส่วนเพศ (sex ratio) และเลี้ยงตัวเต็มวัยด้วยน้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อบันทึกอายุขัยตัวเต็มวัย

2. การศึกษาและประเมินประสิทธิภาพของศัตรูธรรมชาติในสภาพสวนในธรรมชาติ

การสำรวจศัตรูธรรมชาติของหนอนคืบกินใบกล้วยไม้ *O. scrobiculata* ในสภาพธรรมชาติ โดยทำการสุ่มเก็บไข่และหนอนคืบกินใบกล้วยไม้ในระยะต่าง ๆ จากสวนกล้วยไม้ของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน จำนวน 5 สวนคือ บ้านน้ำแพร่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่, บ้านแม่หิยะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่, บ้านสันกอกเกิด อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่, บ้านหนองปลาสวย อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน และบ้านปากก่อง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2543 ถึงเดือนเมษายน 2544 โดยการเลือกต้นกล้วยไม้ที่แตกใบอ่อน ทั้งนี้เนื่องจากต้นกล้วยไม้ที่แตกใบอ่อนจะเป็นที่ขยายพันธุ์ของหนอนชนิดนี้ (ชลิดา, 2538) ซึ่งการเก็บไข่นั้นจะทำการพลิกดูใต้ใบกล้วยไม้ในระดับที่สูงจากพื้นดิน 1-2 เมตร รวมถึงการสังเกตจากสายของไข่ตามการศึกษาของไพฑูริย์ และคณะ (2536) และทำการตรวจนับจำนวนไข่ที่พบนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จนกระทั่งไข่ฟักออกเป็นตัวหนอน ตรวจนับจำนวนไข่ที่ถูกศัตรูธรรมชาติทำลาย ส่วนการเก็บตัวอย่างหนอนจะสุ่มเก็บหนอนจากส่วนยอดโดยสุ่มเก็บให้ทั่วสวนสัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำตัวหนอนมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการใช้ยอดและใบอ่อนของกล้วยไม้ทั้งพันธุ์ฮือดอ เบี้ยวเขียว และสีชมพู พันกันใบด้วยสำลีชุบน้ำเป็นอาหาร เลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 6.0 x 8.5 x 3.5 เซนติเมตร ทำการตรวจนับจำนวนหนอนทั้งหมดในแต่ละสวน และตรวจนับจำนวนหนอนที่ถูกเบียนทุกวัน แล้วแยกชนิดของตัวเบียน จนกระทั่งหนอนเข้าสู่

และตรวจนับจำนวนหนอนที่ถูกเบียนทุกวัน แล้วแยกชนิดของตัวเบียน จนกระทั่งหนอนเข้าสู่ระยะคักแล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเบียนในระยะตัวหนอนของแต่ละชนิดในระชนอน โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การทำลาย} = \frac{\text{จำนวนหนอนที่ถูกทำลาย}}{\text{จำนวนหนอนทั้งหมด}} \times 100$$

เก็บตัวอย่างตัวเบียน เพื่อส่งไปตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ต่อไป ส่วนคักคักจะส่งเก็บตัวอย่างคักคักจากใบแก่ของลำไยให้ทั่วสวนนับจำนวนคักคักนำมาไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 6x8.5x3.5 เซนติเมตร เลียงไว้ในห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจนับจำนวนที่ถูกเบียนทุกวัน จนคักคักออกเป็นตัวเต็มวัย แยกชนิดของตัวเบียน นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเบียนในระยะคักคักของแต่ละชนิดในระชนคักคัก โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การทำลาย} = \frac{\text{จำนวนคักคักที่ถูกทำลาย}}{\text{จำนวนคักคักทั้งหมด}} \times 100$$

เก็บตัวอย่างตัวเบียนเพื่อส่งไปตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ต่อไป และศัตรูธรรมชาติที่เป็นตัวห้ำจะทำการสังเกด ในสภาพธรรมชาติ เมื่อพบการทำลายก็นำมาเก็บเป็นตัวอย่างเพื่อส่งไปตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ ซึ่งลักษณะและพฤติกรรมของศัตรูธรรมชาติจะเป็นการสังเกดจากการสำรวจในสวนลำไยในพื้นที่ต่าง ๆ ของจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน

3. สถานที่และระยะเวลาที่ทำการทดลอง

สวนลำไยของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนจำนวน 5 สวน คือ สวนลำไยที่บ้านน้ำแพร่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่, สวนลำไยที่บ้านแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่, สวนลำไยบ้านสันกอเกิด อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ และสวนลำไยที่บ้านหนองปลาชวย อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน สวนลำไยที่บ้านปากกอก ตำบลปากกอก อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคเหนือ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ระยะเวลาดำเนินการวิจัยตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2543 ถึงเดือน เมษายน 2544 รวมเวลา 12 เดือน