บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การศึกษาชนิดและจำนวนประชากรของเพลี้ยอ่อนในโรงเรือนปลูกต้นไม้

3.1.1 การศึกษาชนิดและจำนวนประชากรของเพลี้ยอ่อนในโรงเรือนปลูกต้นไม้ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ต้นส้มที่ใช้ในการทดลองเป็นส้มโชกุน อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 100 ต้น ปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 นิ้ว สูง 14 นิ้ว ทำการสำรวจยอดส้ม จำนวน 20 ต้น ต้นละ 5 ยอด เดือนละครั้ง นับจำนวนเพลี้ยอ่อนที่พบและจำแนกชนิดด้วยแว่นขยาย (handlens) ที่มีกำลังขยาย 10 เท่า (10X) โดยใช้กุญแจ (key) การจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อนของ Bänziger (1977) นำข้อมูลที่ได้มาหาจำนวนประชากรเฉลี่ยต่อต้นในแต่ละเดือน พร้อมทั้งบันทึกจำนวนยอดอ่อนที่แตกจากจำนวนยอดทั้งหมดของต้นส้ม นำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การแตกยอดเฉลี่ยของแต่ละเดือน และบันทึกข้อมูลสภาพภูมิอากาศ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝน เพื่อนำมาหาค่าสหสัมพันธ์ (correlation) กับจำนวนประชากรเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิด

3.1.2 การศึกษาชนิดและจำนวนประชากรของเพลี้ยอ่อนในโรงเรือนปลูกต้นไม้ ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ต้นส้มที่ใช้ในการทดลองเป็นส้มโชกุน อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 100 ต้น ซึ่งปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 นิ้ว สูง 20 นิ้ว ทำการทดลองวิธีเดียวกับที่โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การศึกษาชนิดและจำนวนประชากรของเพลี้ยอ่อนในสวนส้ม

ทำการทดลองที่แปลงปลูกส้มโชกุนของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งต้นส้มโชกุนมีอายุประมาณ 5-6 ปี จำนวน 100 ต้น สุ่มสำรวจยอดส้มเดือนละ 1 ครั้ง จำนวน 20 ต้น โดยนับ 5 ยอดต่อต้น จำแนกชนิดของเพลี้ยอ่อนและนับจำนวนประชากรที่พบด้วยแว่นขยายเช่นเดียวกับในโรงเรือนปลูกต้นไม้ และทำการประเมินการแตกยอดอ่อนของต้นส้มด้วยการใช้กรอบสี่เหลี่ยม ซึ่งมีพื้นที่ 2,500 ตารางเซนติเมตร โดยวางกรอบสี่เหลี่ยมเทียบกับต้นส้มแต่ละต้น แล้วนับจำนวนยอดอ่อนที่แตกจากจำนวนยอดส้มทั้งหมดในกรอบสี่เหลี่ยมนั้น เพื่อนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การแตกยอดอ่อนเฉลี่ยของแต่ละเดือน พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝน หาค่าสหสัมพันธ์ (correlation) กับจำนวนประชากรเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดที่พบ

ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้กับดักกาวเหนียวสีเหลืองร่วมกับการสำรวจยอดอ่อนของต้นส้ม เพื่อติดตามการระบาดของประชากรเพลี้ยอ่อนที่มีปีก โดยแขวนกับดักรูปทรงกระบอก สูง 12 นิ้ว เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว (ภาพ 3) แขวนกับดักด้วยเชือกฝางบนกิ่งต้นส้มต้นละ 1 กับดัก ที่ความสูงห่างจากพื้นดินประมาณ 1.5-2 เมตร แถวละ 3 กับดัก จำนวน 10 แถว โดยให้มีระยะห่างระหว่างกับดักในแต่ละแถวประมาณ 7 เมตร รวมจำนวนกับดักทั้งหมด 30 กับดัก และทำการเปลี่ยนกับดักกาวเหนียวทุก ๆ 1 เดือน

ภาพ 3 กับดักกาวเหนียวสีเหลืองรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว สูง 12 นิ้ว แขวนไว้บนทรงพุ่มเหนือพื้นดิน 1.5-2 เมตร เพื่อติดตามประชากรของเพลี้ยอ่อนที่มีปีก

3.3 การตรวจหาเชื้อทริสเตซ่าไวรัสจากเพลี้ยอ่อนด้วยเทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อนบนต้นส้ม

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่พบบนต้นส้มใน 3 พื้นที่ คือ โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โรงเรือนปลูกต้นไม้ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง และสวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดที่พบ จำนวน 20 ตัว รวมทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ซึ่งมีรายละเอียดดังแสดงในตาราง 3

3.3.2 การสกัดตัวอย่างเพลี้ยอ่อน

สกัดตัวอย่างเพลี้ยอ่อนโดยนำสารละลาย extraction buffer จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่บดแล้วใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 5 นาที จากนั้นแยกเอาของเหลวใสที่อยู่เหนือตะกอนใส่ใน eppendorf หลอดใหม่ เพื่อนำของเหลวนั้นไปตรวจหาเชื้อสาเหตุต่อไป

3.3.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่า

3.3.3.1 การเคลือบเพลท (plate) ด้วย antibody

เตรียมสารละลาย antibody เพื่อใช้สำหรับเคลือบเพลท โดยนำ antibody (Anti CTV IgG, BIOREBA Switzerland) ผสมกับ coating buffer ในอัตราส่วน 1:1000 ใส่ในหลอดพลาสติก แล้วผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำเพลทเก็บไว้ในกล่องชื้น (humid box) ซึ่งเป็นกล่องพลาสติกใสที่รองก้นกล่องด้วยกระดาษทิชชูชุบน้ำ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเทสารละลาย antibody ในเพลททิ้ง จากนั้นทำการล้างเพลทโดยใช้สารละลาย washing buffer หลุมละ 240 ไมโครลิตร แกว่งเพลทเบา ๆ ด้วยมือนาน 2–3 นาที แล้วเท washing buffer ทิ้ง ทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3.2 การใส่ตัวอย่าง (antigen)

นำของเหลวที่สกัดจากตัวอย่างเพลี้ยอ่อนใส่ลงในเพลทที่เคลือบด้วยสารละลาย antibody แล้ว ตัวอย่างละ 2 หลุม (2 ซ้ำ) เติมสารสกัดจากต้นที่เป็นโรคทริสเตซ่าลงในหลุม positive control และเติมสารสกัดจากต้นปลอดโรคลงในหลุม negative control จากนั้นนำเพลทเก็บไว้ในกล่องชื้น แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนด เทสารสกัดจากตัวอย่างในเพลททิ้ง จากนั้นทำการล้างเพลท 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย washing buffer ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว

3.3.3.3 การเติม conjugate

ทำการเตรียมสารละลาย enzyme-labeled antibody โดยนำ enzyme-labeled antibody (Anti CTV IgG conjugated, BIOREBA Switzerland) ผสมกับ conjugate buffer ในอัตราส่วน 1:1000 ใส่ในหลอดพลาสติก ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ในเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในกล่องชื้น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนด เทของเหลวในเพลททิ้ง และทำการล้างเพลทด้วยวิธีการเดิม 3 ครั้ง

3.3.3.4 การใส่ substrate

ละลาย p-nitrophenyl phosphate ใน substrate buffer อัตราส่วน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดหลอดพลาสติก ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่ในเพลท หลุมละ 200 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในกล่องชื้น ที่อุณหภูมิห้องและวางไว้ในที่มืดนานประมาณ 1 ชั่วโมง

3.3.3.5 การอ่านค่า optical density

นำไปอ่านค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 จำนวนตัวอย่างของเพลี้ยอ่อนชนิดต่าง ๆ ที่ดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่บนต้นส้ม

ลำดับ	**วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง**	**ชนิดของ เพลี้ยอ่อน**	**แหล่งที่เก็บตัวอย่าง**
1	12 กุมภาพันธ์ 2548	*A. gossypii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2	21 กรกฎาคม 2548	*A. gossypii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3	29 มีนาคม 2548	*A. gossypii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4	21 กุมภาพันธ์ 2548	*A. spiraecola*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5	29 มีนาคม 2548	*A. spiraecola*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6	12 กุมภาพันธ์ 2548	*T. aurantii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
7	29 มีนาคม 2548	*T. aurantii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
8	12 กุมภาพันธ์ 2548	*S. citricola*	โรงเรือนปลูกต้นไม้คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
9	6 กุมภาพันธ์ 2548	*A. gossypii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
10	16 มีนาคม 2548	*A. gossypii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
11	29 มีนาคม 2548	*A. gossypii*	โรงเรือนปลูกต้นไม้ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
12	3 มกราคม 2548	*A. spiraecola*	โรงเรือนปลูกต้นไม้ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ) จำนวนตัวอย่างของเพลี้ยอ่อนชนิดต่าง ๆ ที่ดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่บนต้นส้ม

ลำดับ	วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของเพลี้ยอ่อน	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
13	6 กุมภาพันธ์ 2548	*A. spiraecola*	โรงเรือนปลูกต้นไม้ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
14	3 มกราคม 2548	*S. citricola*	โรงเรือนปลูกต้นไม้ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
15	6 กุมภาพันธ์ 2547	*T. citricidus*	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดชียงใหม่
16	1 มีนาคม 2547	*T. citricidus*	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดชียงใหม่
17	9 เมษายน 2547	*A. gossypii*	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดชียงใหม่
18	1 มิถุนายน 2547	*A. gossypii*	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงเพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อน *Aphis gossypii* Glover ในห้องปฏิบัติการและในโรงเรือนปลูกต้นไม้

3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงเพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อน ในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการงานวิจัยโรคและแมลงศัตรูลำไย ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยทำการเพาะเมล็ดส้มโชกุนในกระถางปลูกต้นไม้ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 นิ้ว สูง 3.5 นิ้ว เมื่อต้นกล้างอกและมีความสูงประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร จึงนำมาใช้ในการทดลอง โดยใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยอ่อนในระยะตัวอ่อนซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 10 ตัว ลงบนยอดอ่อนของกล้าส้มแต่ละต้น แล้วฉีดพ่นสารฆ่าแมลงแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องพ่นสารแบบฝอยละเอียด (air brush) กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลองมี 7 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ สารฆ่าแมลงแต่ละกรรมวิธีใช้ตามอัตราที่แนะนำดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 cypermethrin (Erasect®) 25% EC อัตรา 4 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 imidacloprid (Confidor®) 10% SL อัตรา 8 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 abamectin (Vertimec®) 1.8% EC อัตรา 8 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 carbosulfan (Posse®) 20% EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 profenofos (Eraprofos ®) 50% EC อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6 petrolium oil (DC Tron Plus®) 83.9% EC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7 น้ำเปล่า (check)

ทุกกรรมวิธีผสมสารจับใบในอัตรา 4 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) นับจำนวนแมลงที่ตายหลังทดลอง 24 และ 48 ชั่วโมง และหาเปอร์เซ็นต์การตาย ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SX 4.0 (Statistix Version 4) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Gomez and Gomez, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงเพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อน ในโรงเรือนปลูกต้นไม้

ทำการคัดเลือกสารฆ่าแมลงที่คาดว่ามีประสิทธิภาพจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในห้องปฏิบัติการ 3 ชนิด มาทำการทดสอบซ้ำในโรงเรือนปลูกต้นไม้ที่ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการคัดเลือกต้นส้มโชกุนที่มีเพลี้ยอ่อนลงทำลาย จำนวน 16 ต้น บันทึกจำนวนเพลี้ยอ่อนในแต่ละยอดก่อนการทดลอง จากนั้นเตรียมสารฆ่าแมลงแต่ละกรรมวิธี ใช้ตามอัตราที่แนะนำ แล้วพ่นสารด้วยเครื่องพ่นแบบสูบโยกสะพายหลัง พ่นให้ทั่วทั้งต้น วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลองมี 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ (1 ยอด = 1 ซ้ำ) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 imidacloprid (Confidor®) 10% SL อัตรา 8 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 carbosulfan (Posse®) 20% EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 profenofos (Eraprofos ®) 50% EC อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 น้ำเปล่า (check)

ทุกกรรมวิธีผสมสารจับใบในอัตรา 4 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร บันทึกจำนวนแมลงที่ตายหลังพ่นสาร 24 และ 48 ชั่วโมง โดยนับจำนวนเพลี้ยอ่อนที่ยังมีชีวิตรอด นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเปอร์เซ็นต์การตาย และทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SX 4.0 (Statistix Version 4) และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Gomez and Gomez, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved