

### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.1 การศึกษานิเวศวิทยาประชากรของด้วงเต่า *Rodolia fumida* Mulsant และแมลงศัตรูธรรมชาติ

##### 3.1.1 พลวัตประชากรของด้วงเต่า *Rodolia fumida* Mulsant

ทำการศึกษาประชากรของด้วงเต่า *R. fumida* โดยทำการสำรวจประชากรด้วงเต่าในสวนมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยที่มีอายุ 10 ปี จากสวนมะม่วงที่บ้านป่าเหมือด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งจะมีการปลูกพืชหลายชนิด โดยเริ่มดำเนินการระหว่างเดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือนเมษายน 2546 รวมระยะเวลา 12 เดือน สวนที่ใช้ในการศึกษามีการจัดการสวนโดยไม่ปล่อยให้วัชพืชรบกวน ไม่มีการใช้สารเคมีใดๆ ทำการสุ่มตัวอย่างแมลงโดยวิธีของศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนบน จากการสุ่มนับ โดยตรงจากกิ่งมะม่วง ที่สูงจากพื้นดิน 1.5 เมตร ต้นละ 4 กิ่ง 1 กิ่งถือว่าเป็น 1 ตัวอย่าง ตรวจสอบปริมาณแมลงจาก 4 ทิศรอบต้น ทิศละ 1 กิ่ง ต้นมะม่วงที่จะสำรวจจะวัดความยาวจากยอดกิ่งเฉลี่ย 50 เซนติเมตรต่อต้น จำนวน 5 ต้น รวมทั้งหมดจำนวน 20 กิ่ง สำรวจสัปดาห์ละครั้ง บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนประชากรด้วงเต่า *R. fumida* พร้อมนำข้อมูลมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาเกี่ยวกับปริมาณประชากรของด้วงเต่า *R. fumida* ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2545 นำข้อมูลที่ได้ในรอบหนึ่งปีหาค่าเฉลี่ย โดยใช้เทคนิคของ ชาลนุรงค์ และคณะ (2540); Morris (1959; 1960); Pedigo and Buntin (1994) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณประชากรของด้วงเต่า *R. fumida* และปริมาณประชากรของเพลี้ยหอย *Icerya* sp. ที่ได้จากการสุ่มตัวอย่าง จากสวนมะม่วงที่บ้านป่าเหมือด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ Correlation & Regression Analysis

##### 3.1.2 พลวัตประชากรของเพลี้ยหอย *Icerya* sp. และศัตรูธรรมชาติ

ทำการศึกษาพลวัตประชากรของเพลี้ยหอย *Icerya* sp. โดยทำการสำรวจประชากรของเพลี้ยหอยในสวนมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยที่มีอายุ 10 ปี จากสวนมะม่วงที่บ้านป่าเหมือด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งจะมีการปลูกพืชหลายชนิด โดยเริ่มดำเนินการระหว่างเดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือนเมษายน 2546 รวมระยะเวลา 12 เดือน ทำการสุ่มตัวอย่างแมลงโดยวิธีการของศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนบน โดยสุ่มนับโดยตรงจาก

กิ่งมะม่วง ที่สูงจากพื้นดิน 1.5 เมตร ต้นละ 4 กิ่ง 1 กิ่งถือว่าเป็น 1 ตัวอย่าง ตรวจสอบปริมาณแมลง จาก 4 ทิศรอบต้น ทิศละ 1 กิ่ง ต้นมะม่วงที่จะสำรวจโดยจะวัดความยาวจากยอดกิ่งเฉลี่ย 50 เซนติเมตรต่อต้น จำนวน 5 ต้น รวมทั้งหมดจำนวน 20 กิ่ง สำรวจสัปดาห์ละครั้ง ตรวจสอบปริมาณ เพลี้ยหอยที่พบบนกิ่งมะม่วง 1 กิ่ง บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนประชากรเพลี้ยหอย *Icerya* sp. พร้อมนำข้อมูลมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาเกี่ยวกับปริมาณประชากรของเพลี้ยหอย *Icerya* sp. ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2545 นำข้อมูลที่ได้ในรอบหนึ่งปีหาค่าเฉลี่ย โดยใช้เทคนิคของ ชาญณรงค์ และคณะ (2540) การวิเคราะห์หาปัจจัยที่เป็นตัวควบคุมการเปลี่ยนแปลงปริมาณประชากรของเพลี้ยหอย *Icerya* sp. โดยใช้วิธีการ Combinative total factor analysis ตามวิธีของ Napompeth (1973) ตาม สมการดังนี้

$$\log N_{t+1} = \log a + b \log N_t$$

โดยที่

$N_t$  = จำนวนของเพลี้ยหอยในช่วงเวลาหนึ่ง

$N_{t+1}$  = จำนวนของเพลี้ยหอยในช่วงเวลาถัดมา

จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ Linear regression analysis ตามวิธีของ LeClerc *et al.* (1966) ต่อไป

### 3.1.3 การสำรวจศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยหอย *Icerya* sp.

ทำการสำรวจศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยหอย *Icerya* sp. ในสภาพสวนโดยทำการสุ่มเก็บเพลี้ย หอยในระยะต่างๆ จากสวนไม้ผลของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูนจำนวน 5 สวน คือ สวนมะม่วงที่บ้านป่าเหมือด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่, สวนลำไยและมะม่วงที่บ้าน ปากกอก อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่, สวนลำไยที่บ้านน้ำแพร่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่, สวนลำไยที่บ้านแม่เหิยะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และสวนลำไยที่บ้านหนองปลาสาวย อำเภอ บ้านโฮ้ง จังหวัดลำพูน โดยทำการเก็บข้อมูลทุกเดือน เดือนละ 1 ครั้ง ในช่วงเดือนพฤษภาคม 2545 ถึงเดือน เมษายน 2546 รวมเวลา 12 เดือน การสำรวจศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยหอยในสวนไม้ ผลในสภาพธรรมชาติ ดำเนินการโดยสุ่มเก็บและนำตัวอย่างของเพลี้ยหอย ในระยะต่าง ๆ โดยการ เก็บทุกระยะ คือ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ที่ได้มาไว้ใน petri-dish รองด้วยกระดาษกรอง เพื่อให้ ความชื้นโดยการพ่นด้วยน้ำ ทำการนับจำนวนตัวอ่อน ตัวเต็มวัยที่ได้มา เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อสังเกตศัตรูธรรมชาติที่เป็นตัวเบียนจะเจาะออกมา แยกชนิดของตัวเบียน ส่วนแมลงตัวห้ำจะ

สังเกตโดยตรงจากสภาพธรรมชาติพร้อมตรวจนับจำนวนประชากร เก็บตัวอย่างตัวเบียนและตัวทำเพื่อส่งไปตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ต่อไปพร้อมกับศึกษาลักษณะ และพฤติกรรมของศัตรูธรรมชาติจะเป็นการสังเกตจากการสำรวจในสวนไม้ผลในพื้นที่ต่าง ๆ ของจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดใกล้เคียง เปรียบเทียบศัตรูธรรมชาติที่ได้จากการสำรวจรวบรวมได้จากสภาพธรรมชาติว่าศัตรูธรรมชาติชนิดใดที่มีประสิทธิภาพในการทำลายสูง และพบได้ในเปอร์เซ็นต์ที่มากในการทำลายของเพลี้ยหอยและว่าสามารถที่จะนำมาเลี้ยงขยายปริมาณ เพื่อใช้ศึกษาวงจรชีวิตและนำไปควบคุมเพลี้ยหอยโดยชีววิธีต่อไป

### 3.2 การศึกษาวงจรชีวิตของด้วงเต่า *Rodolia fumida* Mulsant

ทำการเก็บรวบรวมไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัยของด้วงเต่าจากสวนมะม่วง และลำไยของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดใกล้เคียงมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวเต็มวัยของด้วงเต่าทั้งเพศผู้และเพศเมียจำนวน 20 คู่ เลี้ยงในกระบอกพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16.50 เซนติเมตร สูง 21 เซนติเมตร ฝาปิดเจาะเป็นวงกลมแล้วติดด้วยตาข่ายกันแมลง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ภายในกระบอกพลาสติกมีเพลี้ยหอย *Icerya* sp. ที่เลี้ยงไว้บนใบมะม่วงพันก้านด้วยสำลี มีน้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารเสริมให้กับด้วงเต่า เมื่อด้วงเต่ากินอาหารหมดจึงเปลี่ยนอาหาร หรือใบพืชอาหารของเพลี้ยหอยเหี่ยวเฉาจะให้ความชื้น โดยฉีดน้ำเป็นละอองเล็ก ๆ ภายในกระบอกพลาสติกทุกวัน เมื่อด้วงเต่าวางไข่จึง เก็บไข่ด้วงเต่าที่มีการวางใหม่ อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง จาก stock culture และนำมาเก็บใน petri-dish ที่รองพื้นด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ฉีดน้ำเพื่อให้ความชื้น จำนวน 20 ฟอง ในการทดลองกระทำ 10 ซ้ำ รวมจำนวน 200 ฟอง ตรวจนับเวลาที่ไข่ฟัก เมื่อไข่ฟักทำการแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 3 x 4 x 3 เซนติเมตร ให้เพลี้ยหอยชนิด *Icerya* sp. ที่ต้องการศึกษาเป็นอาหาร โดยเลี้ยงเพลี้ยหอยไว้บนใบพืชอาหาร แล้วชุบน้ำพันก้านใบเพื่อให้ความชื้นแก่ใบ และมีสำลีชุบน้ำกลั่นให้ความชื้น เปลี่ยนอาหารให้กับตัวหนอนด้วงเต่า และทำความสะอาดกล่องเลี้ยงแมลงทุกวัน เมื่อตัวหนอนของด้วงเต่าเข้าสู่วัยสุดท้ายและไม่กินอาหาร คือระยะก่อนเข้าดักแด้ ให้เปลี่ยนใบมะม่วงที่ค่อนข้างแก่ให้กับตัวหนอนด้วงเต่าเพื่อให้เข้าดักแด้ เมื่อด้วงเต่าฟักออกจากดักแด้แยกเพศผู้ และเพศเมีย อย่างละ 20 ตัว มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 18 x 25 x 9.5 เซนติเมตร ฝากล่องเจาะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ารูด้วยตาข่ายกันแมลงขนาด 13 x 17 เซนติเมตร ใช้สำลีชุบน้ำกลั่นไว้ในกล่องเพื่อให้ความชื้น บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับข้อมูล ชีววิทยา ลักษณะวิทยา การพัฒนาการในแต่ละระยะการเจริญเติบโต ซึ่งจะวัดขนาดความกว้างของหัวกะโหลก ความยาวลำตัว ความกว้างลำตัว

โดยใช้ ocular micrometer ในการวัดของช่วงระยะเวลาของแต่ละระยะ ตั้งแต่ระยะไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย จำนวนไข่ที่วางในแต่ละวัน ระยะเวลาอายุขัยของตัวเต็มวัยและข้อมูลอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

### 3.3 การศึกษาดารงชีวิตของด้วงเต่า *Rodolia fumida* Mulsant

ทำการศึกษาทั้ง biological life table และ partial ecological life table ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลตารางชีวิตที่ใช้สำหรับแมลงมีรากฐานมาจากวิธีการของ Morris (1959) และ Verley and Gradwell (1960) จะช่วยให้เราทราบถึงบทบาทและความสำคัญของปัจจัยแต่ละชนิดที่ทำให้แมลงตายรวมถึงปัจจัยชนิดใดที่มีส่วนสัมพันธ์กับการตายทั้งหมดของแมลง หรือผันแปรตามการตายทั้งหมด และปัจจัยใดมีส่วนสำคัญในการควบคุมปริมาณแมลง ตารางชีวิต (life table) แบบ partial ecological life table ดำเนินการศึกษาตามวิธีการของ Napompeth (1973)

การศึกษา biological life table ดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย  $27 \pm 2$  เซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย  $77 \pm 4$  เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาถึงอัตราการเพิ่มที่แท้จริง (net reproductive rate of increase,  $R_0$ ) ความสามารถในการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (capacity for increase,  $r$ ) สัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ที่แท้จริง (finite rate of increase,  $\lambda$ ) และช่วงอายุขัยของกลุ่ม (cohort generation time,  $T_c$ ) โดยนำไข่ของด้วงเต่า *R. fumida* ที่วางใหม่ ๆ อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง จาก stock culture จำนวน 200 ฟอง ใส่ในกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด  $7 \times 9 \times 4.5$  เซนติเมตร และใช้สำลีชุบน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ไข่ และไข่ของด้วงเต่า ตรวจนับจำนวนไข่ที่ฟักทุกวัน เมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอน แยกตัวหนอนที่มีขนาดโตขึ้นเล็กน้อยในกล่องพลาสติกขนาด  $8 \times 10 \times 6$  เซนติเมตร จำนวน 2 กล่อง ให้เพลี้ยหอยชนิด *Icerya* sp. จากต้นพลวงและต้นมะม่วงที่ต้องการศึกษาเป็นอาหารทุกวัน ทำการตรวจนับจำนวนตัวหนอนที่อยู่รอดในแต่ละระยะทุกวัน เมื่อด้วงเต่าเจริญถึงระยะตัวเต็มวัย จัดบันทึกจำนวนของตัวเต็มวัยที่อยู่รอด นำตัวเต็มวัยย้ายไปเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด  $19 \times 28 \times 11$  เซนติเมตร ผ่ากล่องเจาะเป็นวงกลมแล้วปิดด้วยตาข่ายกันแมลงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ให้เพลี้ยหอยเป็นอาหารทุกวันและใส่สำลีชุบน้ำกลั่นเพื่อรักษาความชื้น ปล่อยให้ด้วงเต่าจับคู่ผสมพันธุ์และวางไข่ บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของด้วงเต่า จำนวนที่รอดชีวิต ตั้งแต่ระยะไข่จนกระทั่งตัวเต็มวัยตายหมด หาสัดส่วนเพศ (sex ratio) และจำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยออกใหม่ทั้งหมดวางไข่ทุกวัน โดยใช้วิธีการที่เสนอโดย Andrewartha and Birch (1954); Laughlin (1965)

ในการบันทึกความสามารถในการวางไข่ของตัวเต็มวัยโดยตรวจนับจำนวนไข่ที่วาง เพื่อนำค่าของการขยายพันธุ์ในแต่ละช่วงอายุ ( $l_x m_x$ ) มาเขียนกราฟคู่กับช่วงอายุ (X) จะได้กราฟช่วงเวลาการวางไข่ (eggs curve) และการอยู่รอดของตัวเต็มวัยทุก ๆ 3 วัน พร้อมทั้งอัตราการอยู่รอดในแต่ละระยะการเจริญเติบโตเพื่อนำค่าอัตราการอยู่รอดในแต่ละระยะการเจริญเติบโต ( $l_x$ ) มาหาความสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโต (X) จะได้กราฟอัตราการมีชีวิตรอด (Survivorship curve) จนกระทั่งตัวเต็มวัยตาย นำข้อมูลทั้งหมดมาสร้างตารางชีวิตโดยวิธีการดังนี้

$$\text{อัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R}_0\text{)} = \sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x$$

(Net reproductive rate of increase)

$$\text{อัตราการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r}_0\text{) (วัน)} = \frac{\log_e R_0}{T_c}$$

(Capacity for increase)

$$\text{ช่วงอายุขัยของกลุ่ม (T}_0\text{)} = \frac{\sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x \cdot X}{\sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x}$$

(Cohort generation time)

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ที่แท้จริง (\lambda)} = \text{antilog}_e r_0$$

(Finite rate of increase)

### ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

#### 3.4 ประเมินประสิทธิภาพการเป็นตัวห้ำของด้วงเต่า *Rodolia fumida* Mulsant

การประเมินประสิทธิภาพการเป็นตัวห้ำของด้วงเต่า *R. fumida* ทุกระยะของการเจริญเติบโต ระยะละ 20 ตัว เพื่อศึกษาความสามารถในการทำในแต่ละระยะตั้งแต่ตัวหนอนวัยที่หนึ่งตัวเต็มวัย การคัดเลือกด้วงเต่าจะใช้จากกลุ่มไข่ที่ไข่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง จากกลุ่มไข่เดียวกัน เลือกตัวหนอนที่สมบูรณ์ แข็งแรง การประเมินการกินโดยจะใช้เพลี้ยหอย *Icerya* sp. ซึ่งเป็นระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย เป็นอาหาร โดยแยกเลี้ยงด้วงเต่าใน petri-dish จำนวนจานละ 1 ตัว ภายในรองด้วย

กระดาษกรองเบอร์ 1 มีสารสีขุ่นน้ำกลั่นวางไว้ให้ความชื้น ให้เพลี้ยหอยชนิดที่ศึกษาเป็นอาหาร โดยให้ในเวลาเดียวกันทุกวันเป็นจำนวนที่แน่นอน และมากกว่าที่ด้วงเต่าจะกินหมด จำนวนที่ใช้ 20 petri-dish ต่อ 1 กรรมวิธี โดยมีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ตัวหนอนวัยที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 ตัวหนอนวันที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 ตัวหนอนวัยที่ 3

กรรมวิธีที่ 4 ตัวหนอนวัยที่ 4

กรรมวิธีที่ 5 ตัวเต็มวัย

สำหรับแผนการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ บันทึกจำนวนเพลี้ยหอยที่ด้วงเต่ากินหมดในแต่ละระยะการเจริญเติบโต โดยจำนวนเพลี้ยหอยที่ด้วงเต่ากินเป็นอาหารในแต่ละระยะหมายถึง ประสิทธิภาพในการเป็นตัวห้ำของด้วงเต่า นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติในแต่ละระยะการเป็นตัวห้ำเพื่อหาความแตกต่างในแต่ละระยะ ตั้งแต่ตัวหนอนถึงตัวเต็มวัย และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีการ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

### 3.5 สถานที่และระยะเวลาที่ทำการทดลอง

สวนลำไยและมะม่วงของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูนจำนวน 5 สวน คือ

1. สวนมะม่วงที่บ้านป่าเหมือด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2. สวนลำไย และมะม่วงที่บ้านปากกอก อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่
3. สวนลำไยที่บ้านแม่เหิยะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
4. สวนลำไยที่บ้านน้ำแพร่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่
5. สวนลำไยที่บ้านหนองปลาทราย อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน

และในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติ ภาคเหนือตอนบน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ระยะเวลาดำเนินการวิจัยตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2545 ถึงเดือนเมษายน 2546

รวมเวลา 12 เดือน