# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การดำเนินการศึกษาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก (screening) และขั้นตอนที่สองเป็นการหาแนวทางประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการกินหนอนกระทู้ผักในแปลงปลูกคะน้า (field trial)

## 3.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก

### 3.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืช

คัดเลือกพืชที่มีลักษณะ ดังนี้

1) พืชที่มีรายงานฤทธิ์ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก
2) พืชที่อยู่ในตระกูลเดียวกับพืชในข้อที่ 1)
3) พืชที่มีรสขมหรือฝาด
4) พืชที่หาได้ง่ายและมีปริมาณวัตถุดิบมาก

นำตัวอย่างพืชสดมาล้างน้ำให้สะอาดแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ทำการบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช ชั่งตัวอย่างพืชน้ำหนัก 25 กรัม แช่ในตัวทำละลายเมทธานอล (commercial grade ซึ่งผ่านการกลั่นอีก 1 ครั้ง) ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน นำมากรองเอาเฉพาะส่วนของสารละลาย ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ จนได้สารสกัดหยาบเข้มข้น และเก็บสารสกัดที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

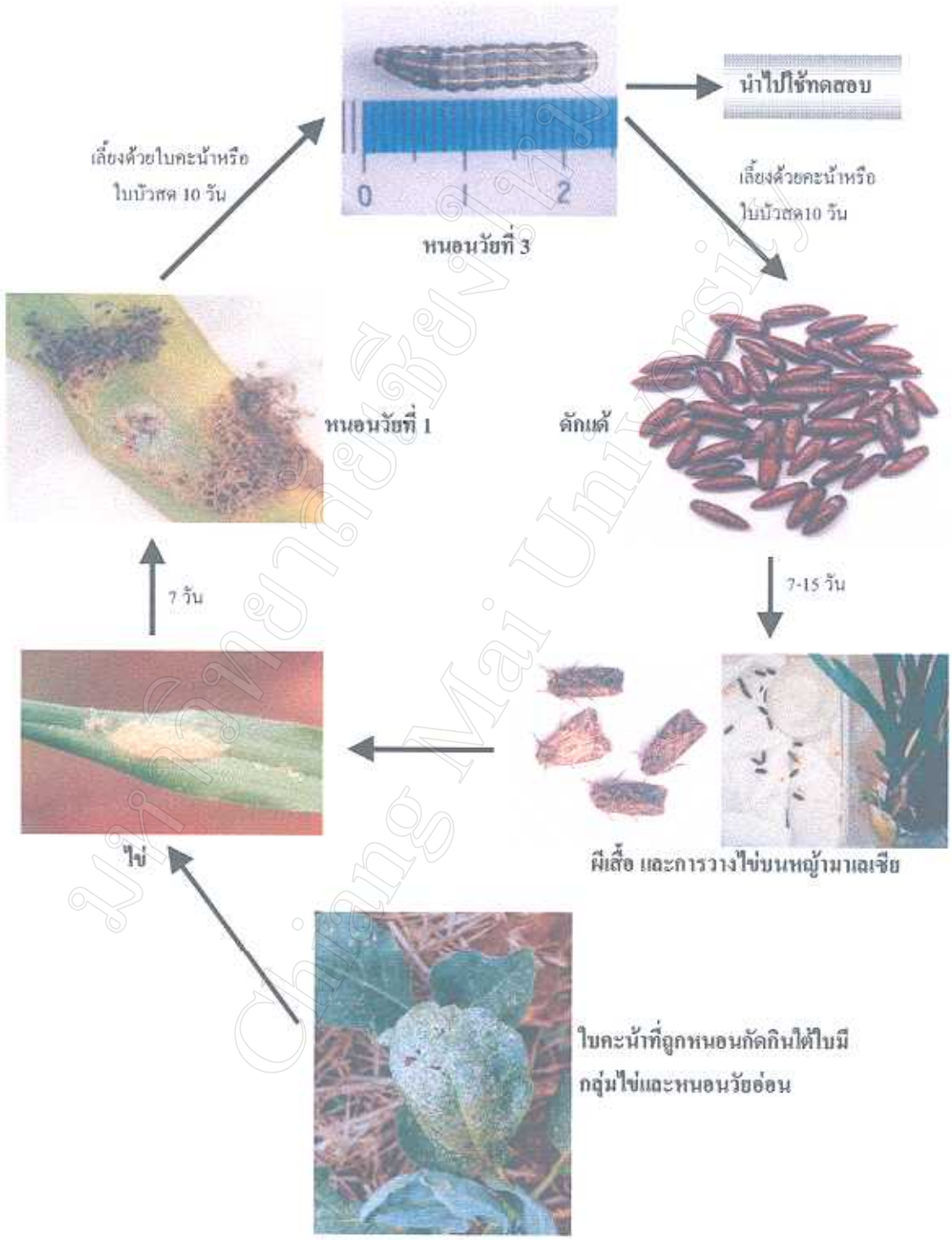
### 3.1.2 การเตรียมหนอนกระทู้ผักเพื่อใช้ในการทดลอง

1) เก็บรวบรวมหนอนและกลุ่มไข่หนอนกระทู้ผัก จากแปลงปลูกผักปลอดสารพิษของเกษตรกรหมู่ที่ 5 ตำบลท่ากว้าง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ โดยไข่จะอยู่ใต้ใบพืช มีลักษณะเป็นกลุ่มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 เซนติเมตร ปกคลุมด้วยขนสีน้ำตาลอ่อน กลุ่มหนอนวัยที่ 1 จะอยู่รวมกันบริเวณที่วางไข่ กัดกินผิวด้านล่างของใบพืชทำให้มองเห็นใบพืชมีลักษณะโปร่งแสง (ภาพที่ 1) ส่วนหนอนวัยที่ 5 มักจะพบบริเวณใต้วัสดุคลุมแปลงปลูก

2) นำหนอนมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 11 x 17 x 5 เซนติเมตร ที่มีรูระบายอากาศ และมีกระดาษทิชชูรองพื้นกล่องสำหรับให้หนอนมุดตัวลงไปพักตัวอยู่ข้างใต้ในระยะดักแด้

3) ย้ายดักแด้ไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 45 x 50 x 35 เซนติเมตร ที่มีรูระบายอากาศ จนกระทั่งเป็นผีเสื้อ หลังจากนั้นให้อาหารผีเสื้อด้วยน้ำผึ้ง 10-15 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมต้นหญ้ามาเลเซียใส่ในภาชนะปากแคบใส่ไว้ในกล่องพลาสติคด้วย เพื่อให้ผีเสื้อเกาะวางไข่

4) ย้ายกลุ่มไข่นำมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกที่มีรูระบายอากาศ ประมาณ 3-5 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวหนอน เมื่อหนอนมีอายุ 7-10 วัน (หนอนวัยที่ 3) จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 1)




**ภาพที่ 1** ขั้นตอนการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร

### 3.1.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธีเลือกกิน ( two-chioce leaf disk bioassay)

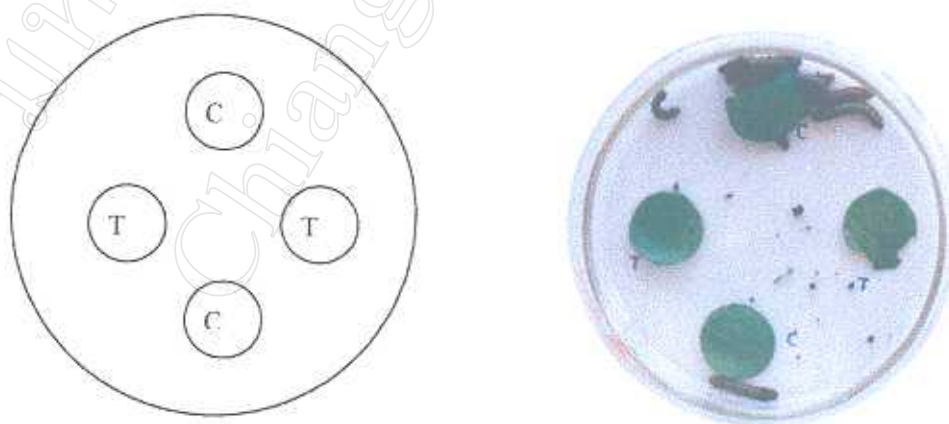
นำใบคะน้าปลอดสารพิษมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ใช้ที่เจาะรูจุกไม้คอร์กตัดใบคะน้าเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น ต่อสารสกัด 1 ชนิด ทาสารสกัดปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อ 1 ชิ้น จำนวน 2 ชิ้น อีก 2 ชิ้นทาด้วยอะซิโตนเจือจาง(กลุ่มควบคุม) วางสลับกัน ใน petridish ดังภาพที่ 2 ปล่อยหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 (อายุประมาณ 10 วัน) ลงไปจำนวน 15 ตัว ทิ้งไว้ในที่มืด นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกหนอนออก วัดพื้นที่ใบพืชที่เหลือจากการกัดกินของหนอนด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบ (ยี่ห้อ ADC รุ่น AM100) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำไปคำนวณค่า antifeedant index (AFI) ดังนี้

$$\text{antifeedant index} = [\%T/(\%T+\%C)] \times 100$$

$\%T$ = ร้อยละของพื้นที่ใบของชิ้นใบพืชทดสอบที่ถูกกัดกิน

$\%C$ = ร้อยละของพื้นที่ใบของชิ้นใบพืชควบคุมที่ถูกกัดกิน

กำหนดตัดสินสารสกัดจากพืชว่ามีศักยภาพมีฤทธิ์ยับยั้งการกิน ตามวิธีของ Escoubas *et al.* ( 1993) เมื่อค่า AFI น้อยกว่า 20




**ภาพที่ 2** ลักษณะการจัดเรียงชิ้นใบใน petridish ในการทดสอบโดย two - choice leaf disk bioassay และใบพืชที่ถูกกัดกินโดยหนอน (C = ชิ้นใบพืชที่ไม่ได้ทาสารทดสอบ, T = ชิ้นใบพืชที่ทาด้วยสารทดสอบ)

เมื่อการทดลองสิ้นสุดนำหนอนกระทู้ผักที่รอดตายมาเลี้ยงต่อ เพื่อศึกษาผลกระทบในระยะยาวของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญเติบโตของหนอน และตัวเต็มวัย โดยใช้ใบคะน้าสดปลอดสารพิษเป็นอาหารหนอน และน้ำผึ้งความเข้มข้น 10-15 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหารเลี้ยงตัวเต็มวัย บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนหนอนที่รอดตาย จำนวนหนอนที่เข้าดักแด้ได้เป็นปกติและผิดปกติ จำนวนตัวเต็มวัยที่ปกติและไม่ปกติ โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่ถูกต้อง โดยใช้ Abbott's formula ดังนี้ (Abbott , 1925 อ้างโดย เสียง, 2532)

$$\% \text{ การตายที่ถูกต้อง} = \frac{A - B}{100 - B} \times 100$$

A = เปอร์เซ็นต์ตายของแมลงที่เกิดจากผลของสารสกัดแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ

B = เปอร์เซ็นต์ตายของแมลงในสิ่งทดลองเปรียบเทียบ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

## 3.2 การหาแนวทางประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักในสภาพแปลงปลูกคะน้า

จากการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักดังอธิบายในข้อ 3.1 สามารถคัดเลือกพืชได้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ กิ่งประยงค์ เปลือกผลมะกรูด รากหนอนตายหยาก ผลดีปลี และลำต้นใต้ดินค้างคาวดำซึ่งในที่นี้ได้เลือกมาศึกษาเพียง 1 ชนิด โดยพิจารณาจากความสะดวกในการจัดหาปริมาณวัตถุดิบและความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่น ดีปลีเป็นพืชสมุนไพรไทยที่คุ้นเคยกันเป็นอย่างดีในสังคมไทย โดยใช้ในการประกอบอาหาร หาได้ง่าย นอกจากนั้นยังมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ มีค่า $LD_{50}$ ในหนูเท่ากับ 1.6 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเท่านั้น จึงน่าจะปลอดภัยต่อมนุษย์เพื่อนำมาใช้เป็นสารควบคุมแมลง และมีรายงานฤทธิ์ฆ่าแมลงศัตรูชนิดอื่นๆได้หลายชนิด รวมทั้งมีการศึกษาโครงสร้างของสารออกฤทธิ์แล้ว (จันทร์ทิพย์, 2535 ; พิมพร, 2537) ดังนั้นในการศึกษาเพื่อการประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักในแปลงคะน้า จึงเลือกดำเนินการศึกษากับสารสกัดหยาบจากดีปลีเป็นอันดับแรก

### 3.2.1 การตรวจสอบฤทธิ์ควบคุมหนอนกระทู้ผักของสารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีโดยวิธีการกินตายและถูกตัวตาย

จากการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก พบว่านอกจากฤทธิ์ยับยั้งการกิน ยังอาจมีฤทธิ์อื่นๆในการควบคุมหนอนกระทู้ผักได้ ไม่ว่าจะกินตายหรือถูกตัวตาย ซึ่งฤทธิ์กลุ่มนี้จะถูกนำไปใช้กำหนดระดับความเข้มข้นการใช้สารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีในสภาพแปลงปลูกด้วย เพราะฉะนั้นจึงทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีเพิ่มเติมอีก 2 รูปแบบ คือวิธีจุ่มใบพืชในสาร (leaf dipping method, LD) และการทดสอบโดยหยดสารลงบนตัวหนอนโดยตรง (topical application method, TA)

**1) วิธีจุ่มใบพืชในสาร**

นำใบคะน้าปลอดสารพิษมาทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ชั่งน้ำหนักใบคะน้าประมาณ 20 กรัม แล้วนำใบไปจุ่มในสารแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยการชั่งสารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลี 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.0 และ 2.5 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร) ผึ่งใบคะน้าให้แห้งแล้วนำไปวางในกล่องพลาสติกขนาด 11 x 17 x 5 เซนติเมตร ที่เจาะรูระบายอากาศและรองพื้นด้วยกระดาษทิชชู ปล่อยหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 ลงไปในกล่องทดลองจำนวน 10 ตัวต่อกล่อง ให้แต่ละความเข้มข้นมี 4 ซ้ำ เก็บกล่องเลี้ยงหนอนไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า Oral $LC_{50}$ และ Oral $LC_{90}$ ของแต่ละสารที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก โดยใช้โปรแกรม Logit PC

**2) วิธีการหยดสารลงบนตัวหนอน**

เตรียมสารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และ 2.5 เปอร์เซ็นต์เหมือนข้างต้น ใช้ไมโครปิเปตหยดสารสกัดหยาบแต่ละความเข้มข้นลงบนสันหลังส่วนอกของหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 ตัวละหนึ่งหยด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จำนวน 10 ตัว ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ นำไปเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 11 x 17 x 5 เซนติเมตร ที่รองด้วยกระดาษทิชชู ใช้ใบคะน้าสดปลอดสารพิษเป็นอาหาร บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลา 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า $LD_{50}$ และ $LD_{90}$ของแต่ละสาร โดยใช้โปรแกรม Logit PC

### 3.2.2 ผลกระทบของสารสกัดหยาบจากผลดีปลีต่อคะน้าในสภาพแปลงปลูก

**1) พืชทดลอง**

ปลูกคะน้าโดยวิธีย้ายปลูกต้นกล้าอายุ 24 วัน หลังจากเพาะเมล็ด ลงบนแปลงทดลอง ขนาด 1x3 เมตร ระยะปลูก 25x20 เซนติเมตร ระหว่างการเจริญเติบโตมีการให้น้ำตามปกติ และใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) แปลงละ 25 กรัม จำนวน 2 ครั้งได้แก่ เมื่อหลังย้ายปลูก 9 และ 19 วัน และเก็บเกี่ยวคะน้าเมื่ออายุ 65 วัน (หลังจากย้ายปลูก 41 วัน)

**2) ปัจจัยศึกษา**

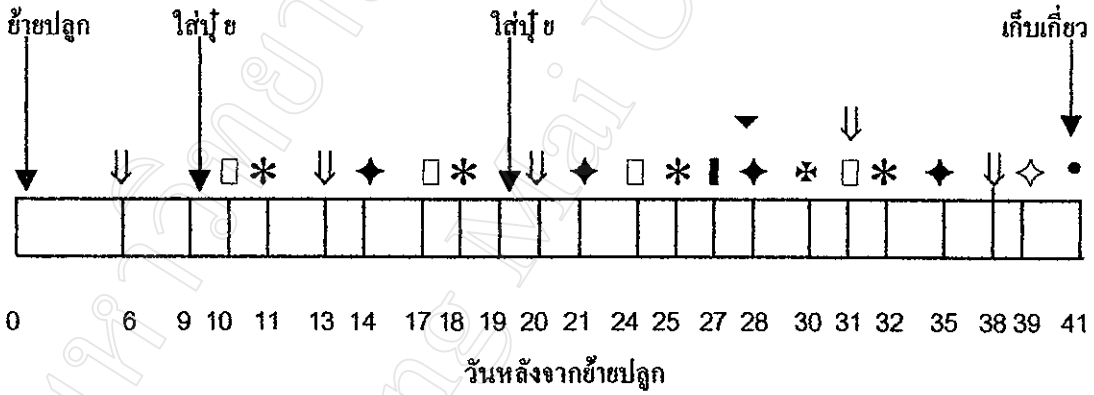
กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากผลดีปลีกับสารธรรมชาติเพื่อป้องกันกำจัดแมลงที่มีการซื้อขายในท้องตลาดได้แก่ สาร azadiracthin จากผลสะเดา และสาร permethrin ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์เลียนแบบสาร pyrethrin ที่ได้จากดอกไพรีทรัม ในส่วนของสารสกัดหยาบจากผลดีปลีได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลกับสารสกัดหยาบด้วยน้ำ สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีใช้ข้อมูลพื้นฐานจากการทดลองในข้อ 3.2.1 (LD-method และ TA- method)

วางแผนการทดลองแบบบล็อคสุ่มสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) โดยมีทั้งหมด 8 กรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำได้แก่

MP5 = สารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (0.5 %)
MP10 = สารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (1.0 %)
MP20 = สารสกัดหยาบด้วยเมทธานอลจากผลดีปลีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (2.0 %)
WP100 = สารสกัดหยาบด้วยน้ำจากผลดีปลีใช้น้ำหนักผลแห้ง 100 กรัมต่อลิตร (10 %)
WP200 = สารสกัดหยาบด้วยน้ำจากผลดีปลีใช้น้ำหนักผลแห้ง 200 กรัมต่อลิตร (20 %)
AZT = สาร azadirachtin ทางการค้า ( 0.1 % w/v E.C.) 2.5 มิลลิลิตรต่อลิตร
PYR = สารไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (permethrin 10 % w/v E.C.) 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร
control = น้ำกลั่น

**3) วิธีการทดลอง**

หลังจากย้ายปลูกคะน้า 11 วัน เมื่อต้นพืชตั้งตัวได้พ่นสารครั้งที่ 1 หลังจากนั้นพ่นสารอีกเป็นระยะๆ รวมทำการพ่นสารทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะเวลาห่างกัน 1 สัปดาห์ โดยพ่นตอนเย็น ในแต่ละกรรมวิธีผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพการจับใบลงไปด้วยในอัตรา 5 มิลลิลิตรต่อ 20 ลิตร เครื่องพ่นสารใช้ระบบแบบอัดอากาศเพียงครั้งเดียว (compressed air sprayer) (รังสิต, 2523) หลังจากพ่นสารครั้งสุดท้ายเว้นระยะไว้อีก 9 วันจึงเก็บเกี่ยว




✻ = พ่นสาร □ = เก็บข้อมูลแมลงก่อนพ่น ✦ = เก็บข้อมูลแมลงหลังพ่น

⇓ = วัดส่วนสูง ▮ = วัดค่าความต้านทานปากใบ อุณหภูมิ และความเข้มแสง

✠ = เก็บตัวอย่างใบเพื่อการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา ▼ = เก็บตัวอย่างใบพืชเพื่อหาปริมาณคลอโรฟิลล์

✧ = ตรวจนับคะน้าที่ผิดปกติ

• = นับจำนวนใบ ชั่งน้ำหนักสด วัดพื้นที่ใบ และเก็บตัวอย่างใบพืชเพื่อหาปริมาณ TNC

**ภาพที่ 3** วิธีการทดลองผลกระทบของสารสกัดหยาบจากผลดีปลีต่อคะน้าในสภาพแปลงปลูก

**4) การบันทึกข้อมูล**

**ประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดแมลง**

โดยสุ่มตัวอย่างแปลงละ 10 ต้น บันทึกข้อมูลก่อนการพ่นสารทดลองแต่ละครั้ง และหลังการพ่น 3 วัน ตรวจนับประชากรแมลงศัตรูพืชที่พบเห็น เช่น หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก เพลี้ยอ่อน หนอนคืบ ด้วงหมัดผัก เป็นต้น

**ผลต่อการเจริญเติบโตของคะน้า**

1) ความสูง โดยวัดจากโคนต้นจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด หน่วยวัดเป็นเซนติเมตร
2) จำนวนใบ โดยนับจำนวนใบที่คลี่สมบูรณ์แล้ว
3) พื้นที่ใบ วัดพื้นที่ใบด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบยี่ห้อ Li-COR รุ่น Li-3100 หน่วยวัดเป็นตารางเซนติเมตร (ตามรายละเอียดในภาคผนวก)

**ผลต่อปริมาณผลผลิตคะน้า**

1) น้ำหนักสดและแห้ง ของส่วนเหนือดิน(ลำต้นและใบ)
2) น้ำหนักสดและแห้ง ราก
3) น้ำหนักสดของส่วนที่บริโภคได้

เก็บเกี่ยวคะน้าโดยใช้พลั่วมือขุดห่างลำต้นเพื่อให้ได้ส่วนรากที่สมบูรณ์ ล้างดินที่ติดรากออก ชั่งน้ำหนักสดรวมทั้งต้น ตัดส่วนรากเพื่อนำมาชั่งน้ำหนักสดราก จะได้น้ำหนักส่วนเหนือดินจากน้ำหนักสดรวมที่ถูกหักด้วยน้ำหนักสดราก ตัดแต่งส่วนเหนือดินโดยตัดส่วนโคนต้นที่แข็ง เด็ดใบที่มีลักษณะผิดปกติ ไม่เหมาะต่อการบริโภคออก ชั่งน้ำหนักสดส่วนที่บริโภค หลังจากนั้นนำส่วนเหนือดินและรากไปทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินและรากต่อไป

**ผลต่อสรีรวิทยาคะน้า**

1) วัดความต้านทานของปากใบ อุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิใบ และความเข้มแสง เมื่อเวลา 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00 และ18.00 น. โดยใช้เครื่อง Porometer AP-4 (DELTA - T DEVICE , Cambridge - UK.) หน่วยวัดเป็นวินาทีต่อเซนติเมตร (รายละเอียดในภาคผนวก)
2) ปริมาณคลอโรฟิลล์ ตามวิธีของWhitham *et al.*(1971) หน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด (รายละเอียดในภาคผนวก)
3) ปริมาณ total non-structural carbohydrate(TNC) ตามวิธี Nelson's reducing procedure หน่วยวัดเป็น มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (สุจริต, 2531) (รายละเอียดในภาคผนวก)

**ความเป็นพิษของสารสกัด**

1) เปอร์เซ็นต์คะน้าที่มีลักษณะใบผิดปกติ โดยตรวจนับจากลักษณะของใบเปรียบเทียบกับแปลงควบคุม
2) ลักษณะโครงสร้างภายในใบที่ผิดปกติ โดยวิธี paraffin section (Johansen, 1940 ; Gray, 1964) (รายละเอียดในภาคผนวก)

**6) ระยะเวลาทำการวิจัย**

ตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2540 ถึงมีนาคม พ. ศ. 2542

**7) สถานที่ทำการวิจัย**

1. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. แปลงทดลองเกษตรกร หมู่ที่ 5 ตำบลท่ากว้าง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่