



บทที่ ๒
อุปกรณ์และวิธีการ
อุปกรณ์

วัสดุที่ใช้ทำการทดลองประกอบด้วยสิ่งของสำคัญต่าง ๆ ดังนี้

๑. Drosophila ananassae Doleshall
๒. เครื่องบด (Waring blender)
๓. Binocular Microscope (A.O. spencer)
๔. ตู้อบ (Oven)
๕. ตู้เลี้ยงขนาด กว้าง ๓๐ ซม. ยาว ๑๐๐ ซม. สูง ๘๐ ซม.
๖. ขวดเลี้ยงขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง ๕ ซม. สูง ๑๓ ซม.
ขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง ๓ ซม. สูง ๗ ซม.

วิธีการ

อาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงแมลง

อาหารสำหรับใช้เลี้ยงแมลง D. ananassae เป็นอาหารที่ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ Demerec (Demerec, 1961) มาเพื่อความเหมาะสมโคสัคส่วนของส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้

วุ้น	๗ กรัม
กลวายน้ำวาสุก	๓๕๐ กรัม
น้ำ	๓๕๐ กรัม

Moldex(๐.15% in 95% alc.) ๒ ลบ.ซ.ม.

อาหารที่ใช้เลี้ยงแมลงต้องเป็นอาหารที่สะอาด ปราศจากราและแบคทีเรีย ดังนั้นขวดบรรจุอาหารซึ่งใช้สำลีเป็นจุก โดยพันจุกให้แน่นพอสมควร และกระดาษฟางที่พับเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า นั้น ต้องฆ่าเชื้อราและแบคทีเรีย (sterilization) โดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ ๑๖๐°ซ. เวลา ๒ ชั่วโมง

การเตรียมอาหาร เกี่ยววุ้นกับน้ำตามสัดส่วนที่กล่าวแล้วข้างต้น ให้อุ่นละลายกับน้ำจนหมด นำกล้วยที่บดละเอียดคนลงในน้ำวุ้น คนให้อุ่นกับกล้วยผสมกันเป็นเนื้อเดียว ทิ้งวุ้นกับกล้วยนี้พอเดือดทั่วกันอีกครั้ง เติม Moldex ลงในอาหารคนให้ทั่ว นำอาหารที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ บรรจุลงในขวด การนำอาหารบรรจุขวด พยายามจัดสถานที่ในบริเวณที่มีความสะอาดมาก ๆ และฉีบลมเพื่อป้องกันเชื้อรา และบักเตรีลงในอาหารขณะบรรจุขวด นำอาหารที่ยังร้อนอยู่บรรจุลงในขวดที่ฆ่าเชื้อราและบักเตรีแล้วให้มีอาหารอยู่ภายในขวดหนาประมาณ ๒-๓ ซม. นำกระดาษฟางที่ฆ่าเชื้อราและบักเตรีแล้วบรรจุลงในขวดให้ปลายข้างหนึ่งจุ่มในอาหารกับให้กระดาษเยี่ยงพาดปลายอีกข้างหนึ่งกับข้างขวดภายใน ไซไฟลนปากขวดเพื่อฆ่าเชื้อราและบักเตรีอีกครั้งแล้วรีบปิดจุก เก็บขวดไว้ให้อาหารเย็นและไอน้ำในขวดแห้งสนิท จึงนำมาใช้เลี้ยงแมลงได้ ขวดเลี้ยงแมลงนี้เก็บเลี้ยงในตู้เลี้ยงแมลงซึ่งเป็นที่ที่บดด้วยตระแกรงลวด ๒ ด้านทางด้านบน กู้เลี้ยงแมลงนี้ตั้งอยู่ภายในห้องที่มีอากาศถ่ายเทได้ดี มีแสงสว่างพอประมาณคือภายในห้อง ๒๑๐ ตึกชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขวดที่บรรจุอาหารเรียบร้อยแล้วนำไปเลี้ยงแมลงได้มีสภาพดังรูปที่ ๑

การจับแมลงเพื่อการศึกษา

วิธีการจับแมลงนี้มีวิธีการ ๒ วิธีคือ

๑. วิธีจับ ใช้เศษผลไม้เช่นกล้วย หรือส้ม ใส่ในขวด ปล่อยให้แมลงลงค่อมเศษผลไม้ภายในขวด ใช้สำลีอุดปากขวด เก็บแมลงภายในขวดไว้ทำการศึกษาต่อไป
๒. วิธีจับโดยใช้เครื่องดูด การจับแมลงแบบนี้ใช้จับแมลงในที่ต่าง ๆ และสามารถเลือกจับเฉพาะแมลงบางตัวได้ตามต้องการ เครื่องมือประกอบด้วยหลอดพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๓.๐ ซม. สูง ๓.๕ ซม. มีจุกไม้คอกที่มีรูเจาะ ๒ รู ใช้สายพลาสติก ๒ สายสอดไว้ให้แน่นพอดี สายแรกใช้จ่อเข้าใกล้ ๆ แมลงเพื่อดูดตัวแมลงเข้าในหลอด โดยใช้ปากดูดที่ปลายสายพลาสติกอีกสายหนึ่ง ซึ่งปลายสายอีกด้านหนึ่งของสายนี้ที่อยู่ภายในหลอด

หุ้มด้วยผ้าบาง ๆ เพื่อกันแมลงผ่านออกมา (รูปที่ ๒)

การเก็บตัวเมียบริสุทธิ์ (Virgin female)

การศึกษาเพื่อหา genetic stock และการศึกษากรรมพันธุ์ของ stock ต่าง ๆ นั้น ดูจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นของลักษณะที่ถ่ายทอดไปยังลูกหลาน ดังนั้นลูกหลานของพ่อแม่คูใดเป็นอย่างไร ขึ้นอยู่กับการถ่ายทอดของยีน (gene) ที่ได้รับจากพ่อแม่ ฉะนั้นแม่ที่ทำการผสมจะต้องเป็นตัวเมียบริสุทธิ์ไม่เคยผสมกับตัวผู้อื่นมาก่อนที่จะผสมกับตัวผู้ที่ต้องการทำการทดลอง การเก็บตัวเมียบริสุทธิ์มีวิธีเก็บอยู่ ๒ วิธี

๑. โดยการเชี้ยคักแค้ แยกคักแค้ใส่ขวดละหนึ่งตัว เมื่อตัวแก่ออกมาจากคักแค้ อยู่ภายในขวด และตัวใดเป็นตัวเมียก็เป็นตัวเมียบริสุทธิ์แน่นอน

๒. โดยการแยกตัวเมียที่เกิดใหม่ ๆ จากขวดเลี้ยง ถ่ายแมลงที่อยู่ภายในขวดเลี้ยงออกให้หมด จับแยกแมลงตัวเมียที่เกิดมาใหม่ ๆ ที่เกิดมาเป็นตัวแก่ได้ไม่เกิน ๔

ช.ม. ออกเก็บไว้เป็นตัวเมียบริสุทธิ์

ลักษณะเพศของ D. ananassae Doleschall

ความแตกต่างระหว่างตัวผู้และตัวเมียของ D. ananassae สามารถสังเกตได้ง่าย ๆ จากลักษณะภายนอกดังนี้

๑. ขนาดของแมลง แมลงตัวเมียมีขนาดตัวใหญ่และท้องกว้างกว่าแมลงตัวผู้อย่างชัดเจน

๒. ขาคู่แรก (Foreleg) เฉพาะแมลงตัวผู้พบ sex-comb ที่บริเวณปลายคานหน้าของ metatarsal ของขาคู่แรก

๓. Tergite ของท้อง Tergite บริเวณปล้องที่ ๕ เป็นต้นไป จนถึงส่วนปลายของท้องของแมลงตัวผู้เท่านั้น มีสีดำเป็นแถบแตกต่างกับส่วนท้องตัวเมียอย่างชัดเจน

(รูปที่ ๗, ๘ และ ๑๐)

การปฏิบัติกร

การปฏิบัติกรกับ D. ananassae ครั้งนี้แบ่งเป็นการศึกษาส่วนใหญ่ได้

๒ ตอน ควบกันคือ

- ๑. ศึกษาลักษณะทั่วไปและวงรีพของ D. ananassae
- ๒. หา genetic stock และศึกษา heredity ของ stock นั้น ๆ
- ๑. การศึกษาลักษณะทั่วไปและวงรีพของ D. ananassae

การศึกษาลักษณะทั่วไปของ D. ananassae ทำการศึกษาตัวแก่ของแมลง โดยศึกษาลักษณะภายนอกทั่วไป และ terminology ของอวัยวะต่าง ๆ ของแมลง โดยสุ่มเลือกแมลงตัวผู้และตัวเมียจาก generation ต่าง ๆ ของแมลงที่เลี้ยงมา ศึกษาเปรียบเทียบกับลักษณะของ D. melanogaster อวัยวะที่ทำการศึกษาคือ

- ก. ลักษณะภายนอกของ D. ananassae
- ข. ขน (setae) บนส่วนต่าง ๆ ของ D. ananassae
- ค. ปีก และ venation ของ D. ananassae

การศึกษาวงรีพของ D. ananassae การศึกษาวงรีพของแมลงครั้งนี้ ศึกษาไปพร้อมกับขณะที่ทำการผสมพันธุ์ของแมลงคู่ต่าง ๆ ขณะที่ทำการทดลองศึกษาเพื่อหา genetic stock และหา heredity ของ stock ต่าง ๆ โดยจกระยะต่าง ๆ ของวงรีพ และเปรียบเทียบความเจริญในระยะเดือนต่าง ๆ จากนั้นทำการศึกษาลักษณะภายนอกและขนาดของ ไข่ ทนอ และคักแค ควบกันไปด้วย

- ๒. การทดลองหา genetic stock และศึกษา heredity ของ stock นั้น ๆ

การทดลองหา genetic stock เป็นการหา homozygous line ของลักษณะต่าง ๆ ที่จะเก็บไว้เป็น stock นำพ่อแม่ที่มีลักษณะเหมือนกัน ๑๐ คู่ คู่ลักษณะของลูกที่เกิดมาจาก แต่ละคู่ ถ้าไม่มีลักษณะของลูกในคู่ใดผิดแปลกจากพ่อแม่ นำเอาลูกมาผสมกัน (ใช้ virgin female เสมอในการผสม) การผสมใน generation ที่ ๒ นี้ จากพ่อแม่เดิม ๑ คู่ ในชั้นลูกผสมกันเอง ๓ คู่ (ใน generation ที่ ๒ เป็นต้นไปนี้จะมีคู่ผสม ๓๐ คู่) ถ้าลูกที่เกิดมาไม่ลักษณะแปลกจากพ่อแม่เดิมก็ผสมกันเองต่อไปเรื่อย ๆ ถ้าพบลักษณะใดผิดแปลกจากพ่อแม่ใน generation ใด นำลักษณะนั้นผสมกันเองของลักษณะนั้น ๆ

คุณลักษณะที่เกิดมาของชั้นลูก และนำชั้นลูกที่มีลักษณะเหมือนผสมกันเองไปเรื่อย ๆ ถ้าพบลักษณะที่ผิดแปลกจากพ่อแม่เพียงตัวเดียว นำเอาลักษณะที่ผิดแปลกนี้ผสมกับชั้นลูกด้วยกัน และแยกผสมพันธุ์กันไปเรื่อย ๆ ในพวกที่มีลักษณะเหมือน ๆ กัน จนได้ลักษณะที่เหมือนกันในชั้นลูกกับพ่อแม่เสมออยู่ b generation ก็ถือว่าลักษณะนั้นเป็น homozygous แล้ว และยึดถือเป็น genetic stock ได้

การศึกษา heredity ของ stock นั้น ๆ นำเอา mutant stock มาผสมกับ normal stock (เหมือนพ่อแม่คุณแรก wild type) โดยทำการผสมกันทีละ ๑ คู่ ในขวดขนาดเล็ก ทำการทดลองครั้งละหลาย ๆ คู่ และทำแบบ reciprocal cross ด้วยศึกษาลักษณะของ F_1 นำเอา F_1 มาผสมกันเอง ขณะเดียวกันนำ F_1 ทำ back cross กับ homozygous line ของพ่อแม่ (ทุก cross ผสมกันในขวด ๆ ละ ๑ คู่) จากผลของ F_1 , F_2 และลูกที่เกิดจาก back cross จะเป็นเครื่องแสดงถึง heredity ของลักษณะนั้น ได้ (การ cross ทุกครั้ง ใช้ virgin female เสมอ)