

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วิธีการเลี้ยงแมลงเพื่อใช้ในการทดลอง

หนอนใยผักที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้มาจากโรงเลี้ยงแมลงของกรมกสิกรรม บางเขน เป็น pure culture ที่เลี้ยงไว้สำหรับทำการทดลองโดยเฉพาะ เริ่มเลี้ยงจากระยะคักแค่อายุประมาณ 1-2 วัน เลี้ยงไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 30 x 30 x 45 เซนติเมตร การเลี้ยงทำในห้องทดลองที่มีแสงสว่างผ่านได้ตลอด อุณหภูมิระหว่าง 23.5 - 31.5 °C พอดีเลี้ยงเริ่มเกิดขึ้นให้อาหารโดยใช้สำลีชุบ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ วางใน petridish นำผักคะน้าใส่ขวด 2-3 ต้นตั้งไว้ในกรงเพื่อให้ดีเลี้ยงวางไข่ ดีเลี้ยงจะเริ่มผสมพันธุ์และวางไข่ภายในเวลา 1 วัน การผสมพันธุ์และวางไข่มักจะเกิดขึ้นในเวลากลางคืน พอรุ่งเช้านำผักออกมาเก็บไว้ในกรงอีกกรงหนึ่งเพื่อให้ไข่ฟัก ไข่จะฟักเป็นตัวหนอนภายในเวลา 2 วัน ไข่ฟักขนาดเล็กเขี่ยตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่มาไว้บนใบผักคะน้า (ใช้ผักที่ค่อนข้างอ่อน) เปลี่ยนผักทุกครั้ง เมื่อมีการเน่าหรือใบเหี่ยวเกิดขึ้น วิธีเปลี่ยนไข่ผักใหม่ใส่รวมไว้กับผักที่มีตัวหนอนอยู่ ทั้งไว้สักพักหนึ่งตัวหนอนจะย้ายมาอยู่ที่ผักใหม่ ระยะตัวหนอนมีการลอกคราบ 3 - 4 ครั้ง ซึ่งจะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 6 - 8 วัน ในระยะที่ตัวหนอนเริ่มเข้าคักแคจะไม่กินอาหาร มีการหดตัวและชักใยออกมาหุ้มรอบตัวติดอยู่บนใบผัก ใช้ forceps คอย ๆ คีบคักแค่ออกจากใบผักใส่ใน petridish เก็บไว้ในกรงเลี้ยงแมลงอีกกรงหนึ่ง ในกรณีที่ต้องการจะแยกเพศเพื่อทำการศึกษาก็ใส่คักแค้ในหลอดแก้วทดลองขนาด 25 c.c. หลอดละ 2 ตัว โดยใช้สำลีคั่นตรงกลาง ระยะคักแค้นาน 3 - 4 วัน เมื่อดีเลี้ยงออกจากคักแค้จะผสมพันธุ์และวางไข่ได้ในวันแรก จำนวนไข่ที่วางจะมีมากที่สุดในวันแรก และน้อยลงตามลำดับ ดีเลี้ยงมีอายุประมาณ 4 - 9 วัน

การเตรียม specimens

1. การเตรียม specimens เพื่อใช้ในการอบรังสี

1.1 ระยะไข่ ไข่ไข่อายุ 1 วัน ใส่ฝื่อเสื่อประมาณ 20 คู่ ในกรงเลี้ยงแมลงซึ่งบรรจุผักคะน้าไว้เพื่อให้ฝื่อเสื่อไข่วางไข่ ฝื่อเสื่อจะวางไข่ตอนกลางคืน พอวันรุ่งขึ้นนำผักที่มีไข่ติดอยู่มาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 4×4 เซนติเมตร ใส่ในกล่องสังกะสีรูปโค้งครึ่งวงกลม (รัศมี 4 เซนติเมตร กว้าง 1 เซนติเมตร) กลองละ 2 ชิ้น หลังจากทำการอบรังสีเสร็จแล้ว จึงนับจำนวนไข่ ไข่ไข่ 50 ฟอง ต่อ 1 ซ้ำ ใส่ไข่ในกล่องพลาสติกขนาด $8 \times 13 \times 6$ เซนติเมตร คำนบนมีฝาปิด ภายในกล่องมีกระดาษซับขุ่นน้ำพอกหมาดเพื่อให้ความชื้นแก่ผัก ใส่กล่องเหล่านี้ไว้ในตู้เลี้ยงแมลงขนาด $45 \times 75 \times 80$ เซนติเมตร ภายในตู้มีเทอร์โมมิเตอร์ สำหรับวัดอุณหภูมิ ตั้งไว้จนกว่าไข่จะฟักเป็นตัวหนอน (ประมาณ 1 วัน) และเลี้ยงต่อไปจนเป็นตัวเต็มวัย

1.2 ระยะตัวหนอน ไข่ตัวหนอนอายุต่าง ๆ กัน 3

ระยะคือ

1.2.1 ระยะตัวหนอนอายุ 2 วัน (Instar 1) ไข่หนอนที่ฟักออกจากไข่ได้ 2 วัน ตัดผักครึ่งที่มีตัวหนอนอยู่รวมกันมาก ๆ (ประมาณ 25 - 30 ตัว) เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในหลอดแก้วทดลองขนาด 25 c.c. อุดปากหลอดด้วยสำลีแล้ววางลงในตู้เลี้ยงแมลงสูงจากก้นหลอดประมาณ 2 เซนติเมตร หลังจากทำการอบรังสีเสร็จแล้วไข่อุกันขนาดเล็กเขี่ยตัวหนอนออกมาใส่ในผักคะน้าสดที่เตรียมไว้ ไข่หนอน 25 ตัวต่อ 1 ซ้ำ เลี้ยงในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษซับรองอยู่ คำนกลางของผัก แล้วใส่ไว้ในตู้เลี้ยงแมลง

1.2.2 ระยะตัวหนอนอายุ 4 วัน (Instar 2) ไข่อุกันเขี่ยตัวหนอนที่ผ่านการลอกคราบครั้งที่ 1 แล้ว (Instar 1 อายุประมาณ 3 วัน) ใส่ในหลอดแก้วทดลองที่มีผักคะน้าชิ้นเล็ก ๆ อยู่ด้วย ใส่ตัวหนอนหลอดละ 25 ตัว แล้วนำไปอบรังสี หลังจากนั้นเลี้ยงตัวหนอนไว้ในกล่องพลาสติก ด้วยวิธีการที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น

1.2.3 ระยะตัวหนอนอายุ 6 วัน (Instar 3) ไซ้หนอนที่ผ่านการลอกคราบครั้งที่ 2 แล้ว (Instar 2 อายุ 1 - 2 วัน) วิธีการเตรียมตัวหนอนเพื่ออาบรังสีและวิธีเลี้ยงทำเช่นเดียวกับวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น

1.3 ระยะคักแค้ นำตัวหนอนที่เข้าคักแค้ได้ 2 วัน ไปอาบรังสีโดยใช้ forceps คีบคักแค้ใส่ในหลอดแก้วทดลองหลอดละ 25 ตัว หลังจากอาบรังสีเสร็จแล้วนำมาใส่ไว้ในกล่องพลาสติกเก็บไว้ในตู้เลี้ยงแมลง

1.4 ระยะตัวเต็มวัย นำผีเสื้อที่เกิดขึ้นในวันแรกไปอาบรังสีโดยแยกเพศผีเสื้อตัวผู้และตัวเมียใส่ในหลอดแก้วทดลองขนาด 25 c.c. หลอดละ 10 ตัว วิธีแยกเพศใช้หลอดดูดแมลง (aspirator) ดูผีเสื้อใส่ในหลอดแก้วซึ่งมีสำลีสุบ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์วางอยู่ที่ก้นหลอด และมีกระดาษกรองตัดเป็นแผ่นกลมเจาะรูตรงกลางปิดทับบนสำลีสีกที่ อุดปากหลอดด้วยสำลีแล้วกลดลงมาให้สำลีสุบสูงจากก้นหลอดประมาณ 2 เซนติเมตร หลังจากอาบรังสีแล้วนำมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกทดลองละ 25 ตัว ให้ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหาร

2. การเตรียม specimens เพื่อศึกษาผลการพักของไข่

ใช้หลอดดูดแมลงดูดผีเสื้อตัวผู้และตัวเมียที่เกิดใหม่ใส่หลอดพลาสติกขนาด 100 c.c. หลอดละ 1 คู่ ภายในหลอดมีสำลีสุบ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ และฉีกกระดาษตัดเป็นชิ้นขนาด 3 x 3 เซนติเมตรสำหรับให้ผีเสื้อวางไข่ ผีเสื้อจะผสมพันธุ์และวางไข่ได้ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเกิด นับจำนวนไข่ที่วางในแต่ละวันและเก็บไว้ในหลอดพลาสติก ทั้งไว้ 2 วัน จึงนำมาตรวจผลการพักของไข่โดยนับจำนวนตัวหนอนที่ฟักออกมาในแต่ละวัน

แผนการทดลอง

ทุกระยะของหนอนไยผักได้จัดทำทำการทดลองเป็น 4 treatment และ 1 control ในแต่ละ treatment มี 4 ซ้ำ (replication) ใช้ sample ซ้ำละ 25 - 50 ตัว วิธีการทดลองมีดังนี้

1. การกำหนดปริมาณรังสี

ในการทดลองได้นำ specimens ต่าง ๆ ไปอาบรังสีแกมมา ที่ได้จาก Cesium - 137 ณ เรือนรูกขรังสี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน โดยใช้ scotch tape ติดภาชนะที่ได้ specimens ไว้รอบท่อเหล็กกลมซึ่งมี Cesium - 137 บรรจุอยู่ภายใน (ภาพที่ 1 และ 2) อัตรารังสี (dose rate) ที่ใช้ในการทดลองคือ 256 แรด/นาที่ และ 220 แรด/นาที่ ทั้งนี้เนื่องจากอัตรารังสีเปลี่ยนไปทุกระยะ 3 เดือน

ปริมาณรังสีที่ใช้แตกต่างกันขึ้นกับอายุของหนอนไยผัก จัดทำเป็น series ดังนี้

1.1 ระยะไซอายุ 1 วัน ใช้ปริมาณรังสี 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 แรด

1.2 ระยะหนอน

ระยะหนอนอายุ 2 วัน ใช้ปริมาณรังสี 1,000, 2,000 4,000, และ 8,000 แรด

ระยะหนอนอายุ 4 วัน ใช้ปริมาณรังสี 2,000, 4,000 8,000, และ 16,000 แรด

ระยะหนอนอายุ 6 วัน ใช้ปริมาณรังสี 4,000, 8,000 16,000, และ 32,000 แรด

1.3 ระยะคักแคอายุ 2 วัน ใช้ปริมาณรังสี 8,000, 16,000 32,000, และ 64,000 แรด

1.4 ระยะตัวเต็มวัยอายุ 1 วัน ใช้ปริมาณรังสี 16,000 32,000, 64,000, และ 128,000 แรด .

การบันทึกผล

เริ่มต้นบันทึกผลการทดลองหลังจากอาบรังสีแล้ว 1 วัน เป็นต้นไป

1. บันทึกผลการตาย (Mortality)

บันทึกจำนวนตายของแมลงตั้งแต่ระยะตัวหนอนจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย

1.1 ระยะไข่ หลังจากไข่ฟักออกมาเป็นตัวหนอนแล้ว บันทึกจำนวนตัวหนอนที่ฟักทั้งหมดเปรียบเทียบกับ control เลี้ยงตัวหนอน และบันทึกผลการตายของหนอนและคักแค้ ในแต่ละวันจนกว่าจะเกิดเป็นผีเสื้อ

1.2 ระยะตัวหนอน ทำการบันทึกผลการตายของตัวหนอน และคักแค้ในแต่ละวันจนกว่าจะเกิดเป็นผีเสื้อ

1.3 ระยะคักแค้ บันทึกผลการตายของคักแค้ทุกวันจนกว่าจะเกิดเป็นผีเสื้อ

1.4 ระยะตัวเต็มวัย บันทึกผลการตายของผีเสื้อทุกวันจนกว่าจะหมด เปรียบเทียบจำนวนที่ตายของผีเสื้อหลังจากอาบรังสีแล้ว 3 วัน กับ control และเปรียบเทียบอายุยืน (longevity) ของผีเสื้อที่อาบรังสีกับ control

คำนวณเปอร์เซ็นต์ตายของผีเสื้อในทุกการทดลองและนำมาแก้ไข เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การตายจริงที่เกิดขึ้นเนื่องจากรังสี โดยใช้ Abbott's Formula

$$\% \text{ Killed} = \frac{\% \text{ Survival in check} - \% \text{ Survival in Treatment}}{\% \text{ Survival in check}} \times 100 \%$$

นำค่าเปอร์เซ็นต์การตายที่แก้ไขแล้วไปหาค่า LD₅₀

2. บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโต

(Developmental period) บันทึกระยะเวลาที่ตัวหนอนใช้ในการเจริญเติบโตจาก Instar หนึ่ง เป็น Instar หนึ่ง และระยะจากคักแค้เป็นตัวเต็มวัย ในทุกการทดลอง หาค่าพิสัย (range) และค่าเฉลี่ย (average) เปรียบเทียบกับ control

3. บันทึกผลการฟักของไข่ (Hatchability) ตรวจสอบการฟักของไข่ที่เกิดจากนี้แล้วจากทุกการทดลองผสมพันธุ์กับ control ดังต่อไปนี้

♂ อาบรังสี × ♀ control

♀ อาบรังสี × ♂ control

♂ control × ♀ control

แต่ละ treatment ไข่นี้แล้ว 10 คู่

บันทึกจำนวนไข่และจำนวนฟักที่ได้ หาค่าเฉลี่ยและ Standard deviation (S.D) ของจำนวนไข่และเปอร์เซ็นต์ฟักของไข่

004422