หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ก. สัตว์ทดลอง

ผึ้งโพรง (Apis cerana) จำนวน 30 รัง

ข. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตนางพญาผึ้งโพรง

1. ถ้วยผลิตนางพญาที่ทำจากไขผึ้ง (queen cup)
2. คอนสำหรับติดถ้วยนางพญา (queen bar)
3. อุปกรณ์สำหรับย้ายตัวอ่อนซึ่งทำด้วยโลหะ
4. กรงขังผึ้งนางพญา (queen cage)
5. รังผสมพันธุ์ผึ้งนางพญา (mating nucleus)

ค. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเทียมนางพญาผึ้งโพรง

1. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
2. หลอดไฟชนิดส่องให้แสงเย็น (fiber optics)
3. ฐานเครื่องมือผสมเทียมของ Dr. Schley
4. เข็มสำหรับดูดเก็บและฉีดเชื้ออสุจิ (syringe & tip)
5. ตะขอสำหรับเปิดช่องสืบพันธุ์ของนางพญาผึ้งโพรง (ventral hook & sting hook)

6. กระบอกฉีดขนาด 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
7. บีกเกอร์ขนาด 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร
8. ขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร
9. กล่องอลูมิเนียมสำหรับต้มฆ่าเชื้อโรคเครื่องมือต่าง ๆ
10. ผ้าขาวบาง
11. ชุดเครื่องมือผ่าตัดแมลง
12. กาซคาร์บอนไดออกไซด์
13. น้ำเกลือ 0.9% (normal saline)
14. น้ำกลั่น
15. Streptomycin sulphate
16. อัลกอฮอล์ 70 %

ง. <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการนับไข่ผึ้ง</u>

1. เครื่องกดนับตัวเลข
2. ตะแกรงสุ่มนับจำนวนไข่ ขนาดพื้นที่ 1 ช่องเท่ากับ 1 ตารางนิ้ว

จ. <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบและนับเชื้ออสุจิ</u>

1. กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast
2. แผ่นสไลด์
3. แผ่นสไลด์ชนิดที่มีตารางนับ
4. น้ำเกลือ
5. น้ำกลั่น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

ก. การผลิตนางพญาผึ้งโพรง

1. คัดเลือกรังผึ้งที่มีสายพันธุ์ดี มีปริมาณการวางไข่สูง colony แข็งแรง เพื่อใช้สำหรับผลิตผึ้งนางพญาจำนวน 10 รัง

2. จับผึ้งนางพญาที่มีอยู่ในรังออก เพื่อให้รังมีสภาพขาดผึ้งนางพญาและพร้อมที่จะสร้างผึ้งนางพญาตัวใหม่

3. ใส่คอนซึ่งติดถ้วยสำหรับผลิตผึ้งนางพญาเรียบร้อยแล้วลงในรังที่เตรียมไว้ในข้อ 2. เพื่อให้ผึ้งงานทำความสะอาดและยอมรับก่อนประมาณ 1 วัน

4. นำคอนซึ่งติดถ้วยนางพญาที่ใส่ไว้ในรังออกมา ย้าย (transfer)ตัวอ่อนจากรังผึ้งที่มีลักษณะดีซึ่งเตรียมไว้ในข้อที่ 1. มีอายุไม่เกิน 1 วัน ใส่ลงในถ้วย ๆ ละ 1 ตัว จากนั้นนำคอนกลับไปใส่ไว้ในรังตามเดิม เพื่อให้ผึ้งงานนำอาหารมาเลี้ยงตัวอ่อนที่ใส่ลงไป

5. คอยตรวจสภาพภายในรังที่ทำการผลิตนางพญาสัปดาห์ละ 2 ครั้ง เพื่อไม่ให้มีการสร้างเซลล์นางพญาขึ้นเองตามธรรมชาติ หากพบจะต้องทำลายทิ้งให้หมด

6. ประมาณวันที่ 10 หลังจากที่ย้ายตัวอ่อนแล้ว ต้องแยกเซลล์ผึ้งนางพญาใส่กรงขังผึ้งนางพญาขนาดเล็กกรงละ 1 หลอด เพื่อรอให้ผึ้งนางพญาออกเป็นตัวเต็มวัย ประมาณวันที่ 13 หลังจากที่ย้ายตัวอ่อนแล้ว

7. ผลิตผึ้งนางพญาด้วยวิธีดังกล่าวโดยการย้ายตัวอ่อนรังละ 20 ตัว จำนวน 10 รัง

8. ศึกษาเปอร์เซนต์การอยู่รอดของตัวอ่อนที่สามารถเจริญเป็นผึ้งนางพญาตัวเต็มวัยจากการผลิตผึ้งนางพญาทั้งหมดในข้อ 7.

9. แบ่งผึ้งนางพญาที่ผลิตได้ออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบผลการวางไข่หลังจากผสมพันธุ์

กลุ่มที่ 1 ปล่อยให้ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ

กลุ่มที่ 2 ผสมเทียมผึ้งนางพญาโดยใช้เครื่องมือของ Dr. Schley ประเทศเยอรมนี

10. เลือกรังผึ้งที่มีนางพญาที่เกิดและผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ จำนวน 10 รัง เพื่อใช้สำหรับศึกษาเปรียบเทียบผลการวางไข่กับผึ้งนางพญาในข้อที่ 9.

ข. <u>การผสมเทียมนางพญาผึ้งโพรง</u>

1. เก็บเชื้ออสุจิจากผึ้งตัวผู้ที่มีอายุพร้อมที่จะผสมพันธุ์ (ประมาณ 6-10 วัน) โดยใช้เข็มสำหรับเก็บเชื้ออสุจิ

2. ตรวจสอบเชื้ออสุจิที่ดูดเก็บว่ามีชีวิตอยู่หรือไม่โดยดูที่การเคลื่อนไหวของเชื้ออสุจิมากกว่า 50% จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 x 40 เท่า

3. นำผึ้งนางพญาที่มีอายุประมาณ 3-10 วัน ซึ่งผลิตได้จากข้อ ก. มาทำให้สลบโดยใช้กาซคาร์บอนไดออกไซด์ และเปิดช่องอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยตะขอสำหรับเปิดอวัยวะสืบพันธุ์ของผึ้งนางพญาซึ่งต้องทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

4. ฉีดเชื้ออสุจิลงไปในช่องอวัยวะสืบพันธุ์ของผึ้งนางพญาประมาณ 4-6 ไมโครลิตร ต่อผึ้งนางพญา 1 ตัว

5. นำผึ้งนางพญามาตัดส่วนปลายของปีกออกข้างหนึ่งในขณะที่ผึ้งนางพญายังสลบอยู่ รอจนกระทั่งฟื้นจึงนำกลับไปใส่ในรังตามเดิม

6. ศึกษาเปอร์เซนต์การอยู่รอดของผึ้งนางพญาหลังจากการผสมเทียมแล้ว 2 สัปดาห์ และที่อยู่รอดจนกระทั่งสามารถวางไข่เป็นผึ้งงาน

ค. <u>การเปรียบเทียบผลการวางไข่ของนางพญาผึ้งโพรงที่เกิดและผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ, นางพญาที่ผลิตและผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ และนางพญาที่ผลิตและผสมเทียม</u>

1. นับการวางไข่ของผึ้งนางพญา โดยใช้ตารางสุ่มที่มีขนาดพื้นที่ 1 ช่อง เท่ากับ 1 ตารางนิ้ว สุ่มนับจำนวนไข่ในหลอดรวงผึ้ง ในแต่ละคอนสุ่มนับจำนวนพื้นที่ทั้งหมด 10 ตารางนิ้ว แล้วนำมาคำนวณหาจำนวนไข่ทั้งหมดในแต่ละรัง

2. ใช้วิธีการนับในข้อที่ 1. เพื่อนับการวางไข่ของผึ้งนางพญาที่เกิดและผสมพันธุ์ตามธรรมชาติจำนวน 10 ตัว, การวางไข่ของผึ้งนางพญาที่ผลิตและผสมพันธุ์ตามธรรมชาติจำนวน 10 ตัว และการวางไข่ของผึ้งนางพญาที่ผลิตและผสมเทียมจำนวน 10 ตัว นับสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลาทั้งหมด 5 เดือน

3. ข้อมูลที่ได้จากการนับทั้ง 3 กลุ่มจะนำไปเปรียบเทียบผลการวางไข่ของผึ้งนางพญาโดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ง. <u>การเปรียบเทียบจำนวนเชื้ออสุจิในถุงเก็บเชื้ออสุจิของนางพญาผึ้งโพรงที่ผลิตและผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ กับนางพญาที่ผลิตและผสมเทียม</u>

1. ผ่าส่วนท้องของผึ้งนางพญาแล้วดึงเอาถุงเก็บเชื้ออสุจิออกมา ใส่ลงในน้ำเกลือ 0.9% 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. ดึงเอาส่วนท่อลมซึ่งหุ้มอยู่รอบถุงเก็บเชื้ออสุจิออกให้หมด

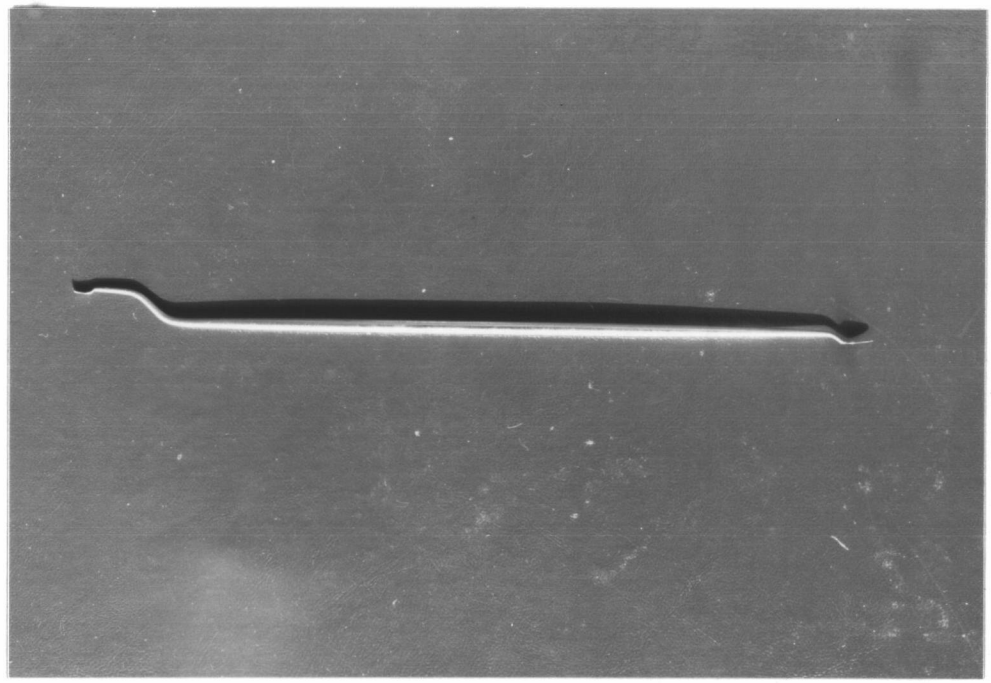
3. บดถุงเก็บเชื้ออสุจิให้แตกและผสมให้เข้ากันกับสารละลาย เติมน้ำเกลือลงไปอีก 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเติมน้ำกลั่นอีก 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3. หยดลงบนแผ่นสไลด์ชนิดที่มีตารางนับ 1 หยด ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast นับจำนวนเชื้ออสุจิใน 10 ช่องตาราง แล้วคำนวณหาจำนวนเชื้ออสุจิที่มีอยู่ในถุงเก็บเชื้ออสุจิ

5. หาค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้ออสุจิในผึ้งนางพญาแต่ละกลุ่ม เพื่อนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ T-test

จ. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์</u>

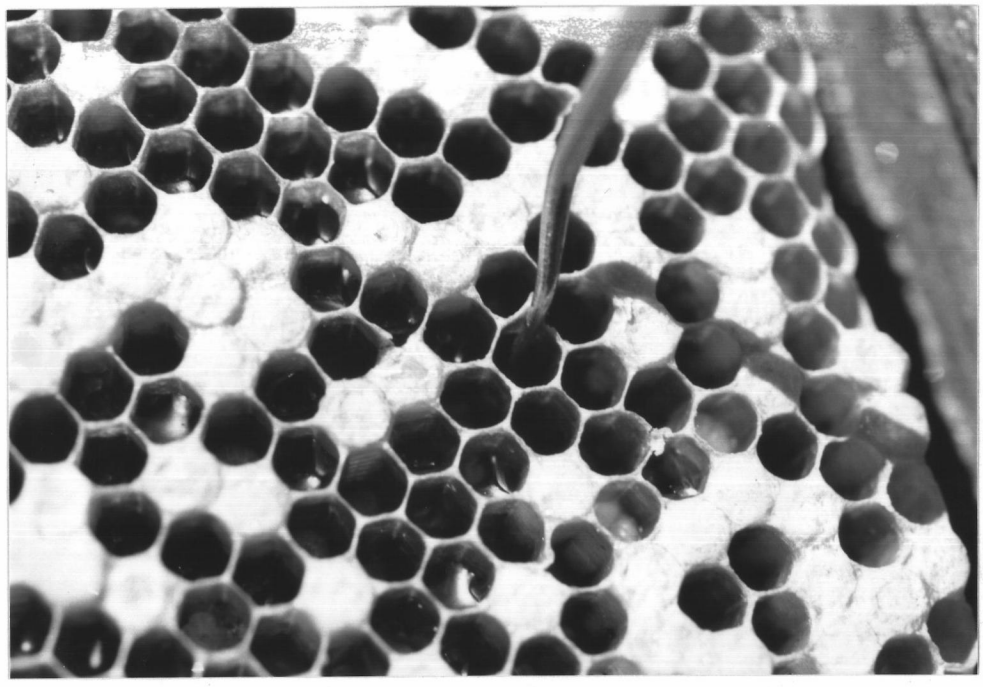
นำข้อมูลการวางไข่ของผึ้งนางพญาทั้ง 3 กลุ่มในข้อ ค. ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of varince) ในการทดลองแบบ factorial in CRD และใช้ LSD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล ที่ฝ่ายวิเคราะห์ทางสถิติ กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร



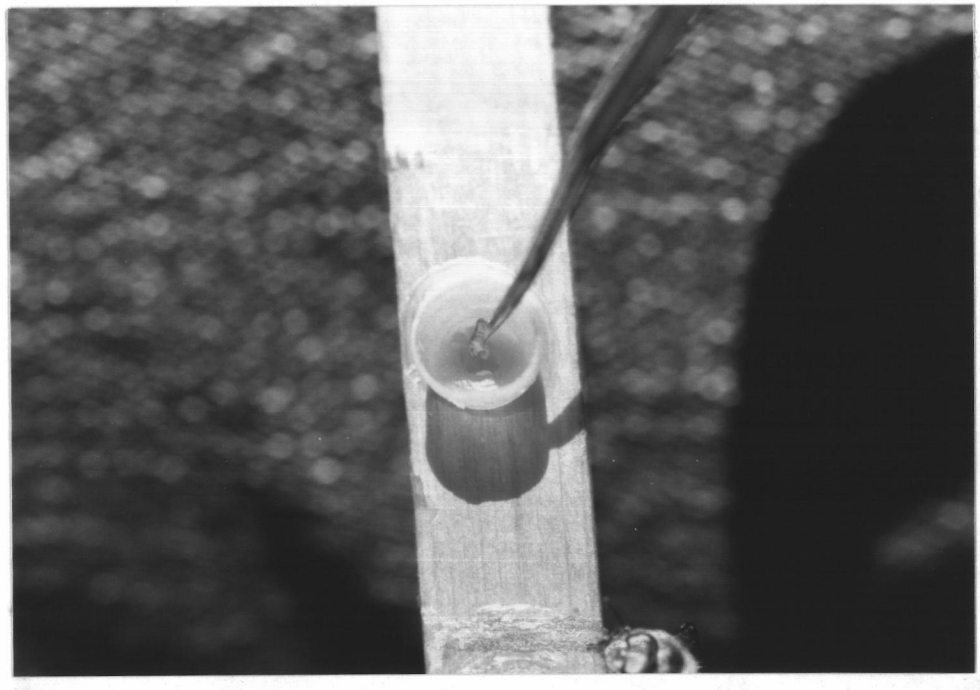
ภาพที่ 5 แสดงอุปกรณ์สำหรับย้ายตัวอ่อนซึ่งทำด้วยโลหะ

ภาพที่ 6 แสดงรังผึ้งที่ใช้สำหรับการผลิตนางพญา

ภาพที่ 7 แสดงรังผสมพันธุ์ผึ้งนางพญา (mating nucleus)



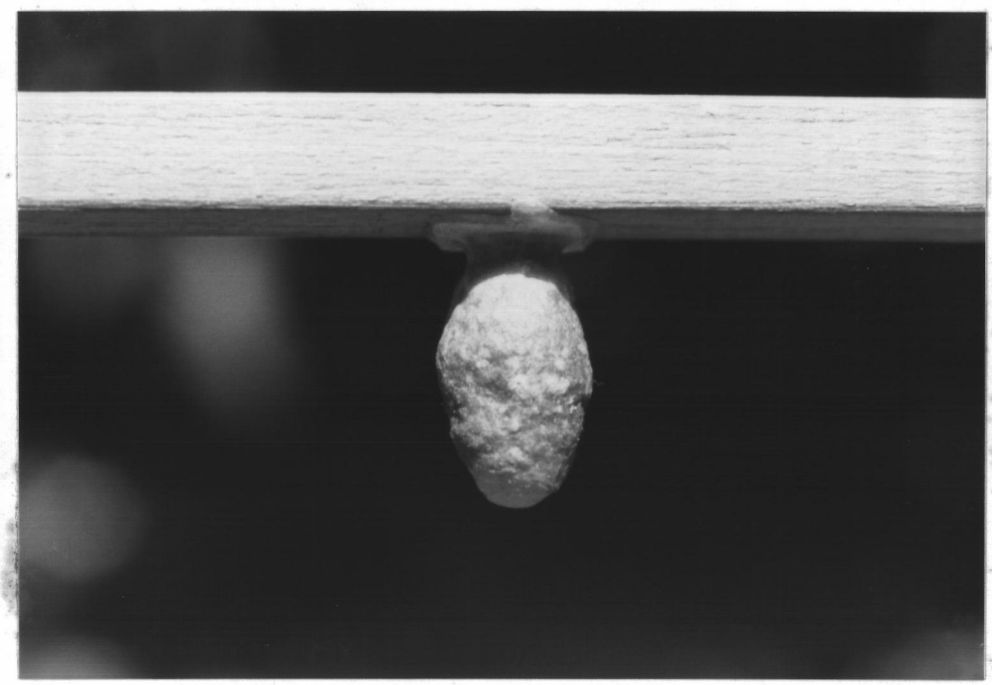
ก.



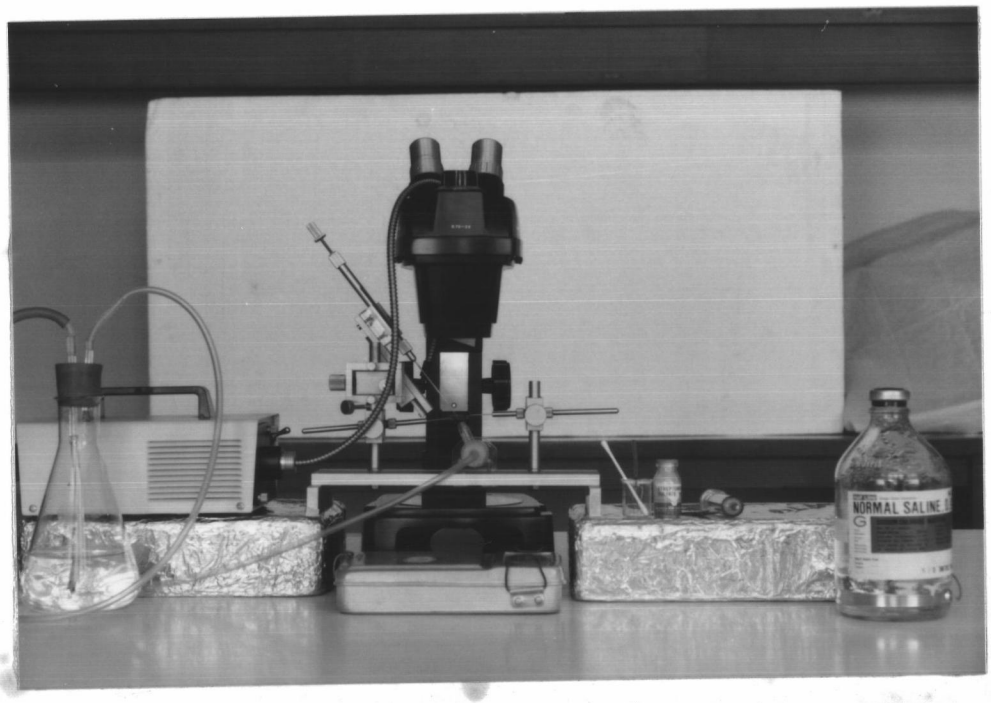
ข.

ภาพที่ 8 แสดงวิธีการย้ายตัวอ่อนจากเซลล์ผึ้งงาน (ก.) และนำไปใส่ในถ้วยผลิตนางพญา (ข.)

ภาพที่ 9 แสดงการนำคอนผลิตนางพญากลับไปใส่ในรังหลังจากย้ายตัวอ่อนเรียบร้อยแล้ว

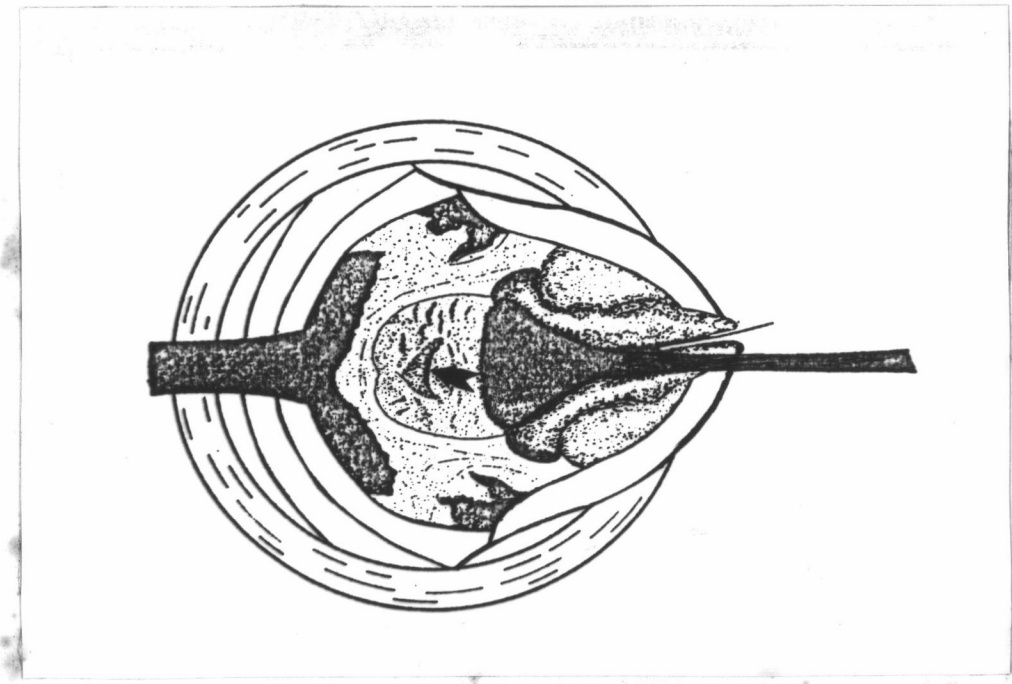


ภาพที่ 10 แสดงเซลล์นางพญาที่บิดแล้ว



ภาพที่ 11 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเทียมนางพญาผึ้งโพรง

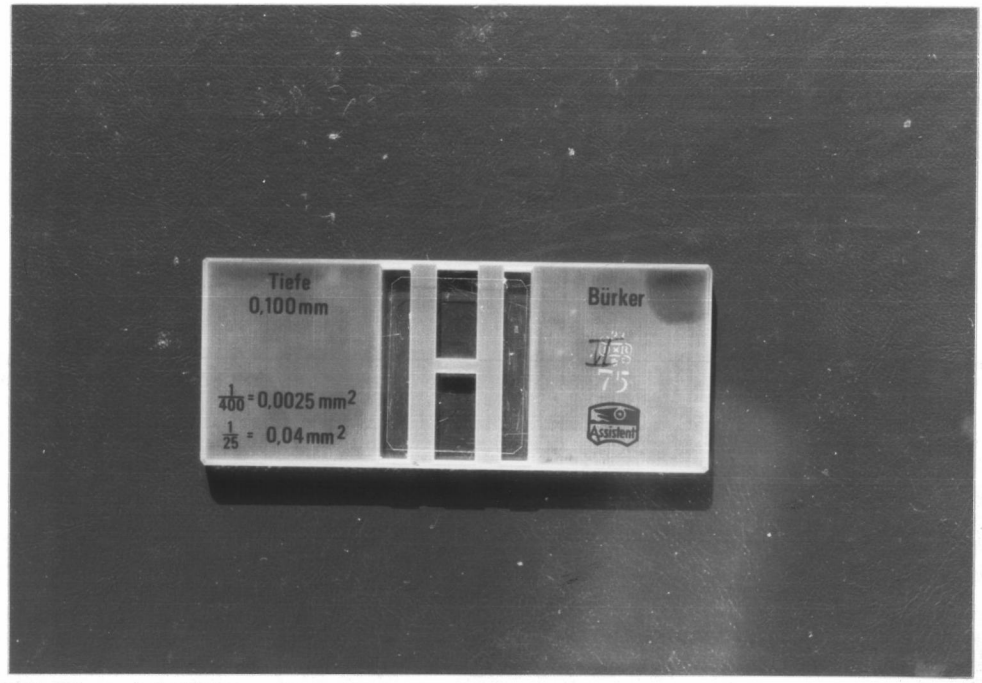
ภาพที่ 12 แสดงวิธีการเก็บเชื้ออสุจิจากผึ้งตัวผู้



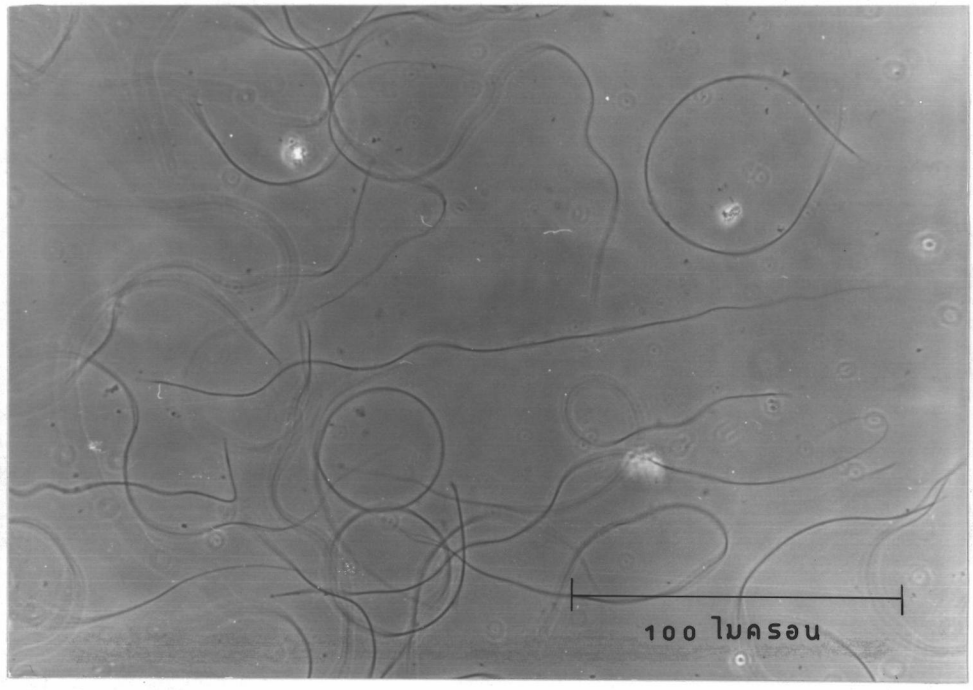
ภาพที่ 13 แสดงช่องอวัยวะสืบพันธุ์ของผึ้งนางพญา เมื่อใช้ตะขอเปิดออกแล้ว

ภาพที่ 14 แสดงการผสมเทียมนางพญาผึ้งโพรง

ภาพที่ 15 แสดงวิธีการสุ่มนับไข่ผึ้ง



ภาพที่ 16 แสดงแผ่นสไลด์สำหรับนับเชื้ออสุจิ



ภาพที่ 17 แสดงลักษณะอสุจิของผึ้งโพรง