

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

อุปกรณ์

1. แมลงที่โชททดลอง

ควงถั่ว Callosobruchus maculatus Fabricius จากสถานีทดลองข้าว
จังหวัดชัยนาท ทำการเลี้ยงและเพาะพันธุ์ของทดลอง แผนกชีววิทยา (ตึกเก่า) คณะ
วิทยาศาสตร์ จฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วัสดุที่ใช้เลี้ยงแมลง

2.1 ถั่วเขียว (green gram หรือ mung bean) Phaseolus aureus
Roxb.

2.2 ถั่วลิสง (peanut หรือ groundnut) Arachis hypogaea
Linnaeus

2.3 ขวดแก้วขนาด 6 X 15.5 เซนติเมตร

2.4 ขวดแก้วขนาด 6.5 X 18.5 เซนติเมตร

2.5 จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

2.6 จานแก้วทรงสูง (culture dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10.5 เซนติเมตร

2.7 หลอดทดลองขนาด 19 X 150 มิลลิเมตร

2.8 ขวดทดลอง (vial) ขนาด 2.3 X 8.2 เซนติเมตร

2.9 เครื่องเก็บความชื้น (desiccator) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25
เซนติเมตร

2.10 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (cooled incubator) ซึ่งสามารถปรับอุณหภูมิ
ได้ตั้งแต่ -10 ถึง 50 องศาเซลเซียส (Gallenkamp IH-270)

2.11 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack)

2.12 ผากอส

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

- 3.1 ขวดแก้วขนาด 2.5 X 4.3 เซนติเมตร
- 3.2 เทอร์โมมิเตอร์
- 3.3 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Tokyo)
- 3.4 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope Bausch and Lomb)
และเครื่องฉายแสง (illuminator)
- 3.5 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า (Mettler H 20 max. wt. 160 gm.)
- 3.6 ไมโครมิเตอร์ (Swift No. 1)
- 3.7 มีดผ่าตัดเบอร์ 3 และใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11
- 3.8 ปากคีบขนาดเล็กปลายงอ
- 3.9 พกัณ เบอร์ 0
- 3.10 นาฬิกาจับเวลา
- 3.11 เครื่องวัดความชื้น (hygrometer)
- 3.12 อุปกรณ์การวาดรูป (camera lucida)
- 3.13 สไลด์และกระจกปิดสไลด์

4. สารเคมี

- 4.1 นำยาฆ่าแมลง เค เอ เค ดี (KAAD mixture)
- 4.2 อัลกอฮอล์ 70 %
- 4.3 นำยาทาสไลด์ เกเตอร์ มีเดีย (Gater media)
- 4.4 โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide)
- 4.5 วาสลีน (vasaline)

วิธีทำการวิจัย

1. การเพาะพันธุ์แมลง เพื่อใช้ในการศึกษา

นำดวงตัวตัวผู้และตัวเมียที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลยและคัดเลือกที่มีลักษณะปกติ

(normal form) เท่านั้น จำนวนเท่าๆ กันรวม 30 คู่ ไล่ลงไปในช่วงแถวขนาด 6 X 15.5 เซนติเมตรซึ่งบรรจุด้ว้ข้าวไว้ 1000 เมล็ด ปิดขวดด้วยฝาอกสหนา 9 ชั้น วางขวดนอนลงและเกลี่ย เมล็ดด้ว้ไ้กระจายกันมากที่สุดเท่าที่ทำได้ เพื่อให้โอกาสที่แมลง จะวางไข่ด้ว้บนด้ว้ เมล็ดเดียวกันมีน้อยที่สุด ทั้งขวดแถวไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30.0-32.0 องศา เซลเซียส) ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วจึงปลดอยแมลงทั้งหมดออก เลือกเฉพาะเมล็ดด้ว้- ด้ว้ที่มีไข่แมลงวางติคอยู่ เมล็ดละ 1 ใบ แยกใส่ในขวดทกลองขนาด 2.3 x 8.2 เซนติเมตร ขวดละ 1 เมล็ด จนกระทั่งไข่แต่ละใบ เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย

การคัดเลือกเมล็ดด้ว้ ด้ว้ที่มีไข่ เป็นอาหาร

เลือกเมล็ดด้ว้ ด้ว้ที่มีลักษณะดังนี้

- ก. สะอาด คอนข้างสก เป็ลือกมีด้ว้ ด้ว้ ด้ว้
- ข. มีขนาดใหญ่พอสมควร น้ำหนักของ 1 เมล็ดประมาณ 70-90 มิลลิกรัม
- ค. ผิวของ เมล็ดเรียบ เป็นมัน

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของแมลงโดยใช้ด้ว้ ด้ว้ ด้ว้ เป็นอาหาร

แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ตอนดังนี้

2.1 ใช้ด้ว้ ด้ว้ ด้ว้ เต็มเมล็ดเป็นอาหาร

วิธีทดลอง นำด้ว้ ด้ว้ ด้ว้ เต็มวัยตัวผู้และตัวเมียที่เพิ่งเกิดใหม่ (newly emerged) และยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์เลย (virgin) จากขวด ทกลองที่เลี้ยงไว้มาทำการทดลองด้วยวิธีเดียวกับข้อ (1) แต่คัดเลือก เมล็ดด้ว้ ด้ว้ ด้ว้ ที่มีไข่วางติคอยู่ เมล็ดละ 1 ใบ ใส่วางกันไว้ในจานเพาะ เลี้ยง ปิดฝา นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิและความชื้นต่างๆ ดังนี้

2.1.1 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 2 ช่วงเวลาคือ

2.1.1.1 ระหว่างเดือนพฤศจิกายน ถึงธันวาคม (วันที่ 14

พฤศจิกายน 2517 ถึง 8 ธันวาคม 2517)

อุณหภูมิห้อง 25.5-30.0 องศาเซลเซียส (ฟิลล์

27.75 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 53-65 %

(ฟิลล์ 59 %)

2.1.1.2 ระหว่างเดือนเมษายน (วันที่ 6 เมษายน 2518 ถึง 24 เมษายน 2518) อุณหภูมิห้อง 30.2–33.5 องศาเซลเซียส (พิสัย 31.85 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 64–79 % (พิสัย 71.5 %)

2.1.2 เลี้ยงในควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30.0 องศาเซลเซียส นำจานเพาะเลี้ยง ใส่ในเครื่องเก็บความชื้น ความชื้นสัมพัทธ์ 60 %

วิธีการศึกษา นำเมล็ดถั่วที่เพาะเลี้ยงแมลงมาวัดขนาดของไข่ และผ่าเมล็ดทุกๆ ประมาณ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 10–20 เมล็ด นำตัวอ่อนออกมาศึกษาควยกลองจุดทัศน เพื่อ

- ก. ศึกษาลักษณะรูปร่าง
 - ข. วัดขนาดความกว้างและความยาวของลำตัวควยไมโครมิเตอร์
 - ค. วัดขนาดความกว้างส่วนหัว (head capsule)
 - ง. สังเกตลักษณะการเจาะเมล็ดถั่วเขียวของตัวอ่อน
 - จ. วัดระยะทางความลึกที่ตัวอ่อนแต่ละระยะเจาะลงในเมล็ดถั่วเขียว
 - ฉ. นับจำนวนคราบของตัวอ่อนและระยะที่พบ
- บันทึกผล

2.2 ใช้เมล็ดถั่วเขียวผักรับเป็นอาหาร

อาหาร ถั่วเขียวผักรับ 1000 ซีกใส่ในชวคแก้วขนาด 6 x 15.5 เซนติเมตร

วิธีทดลอง เช่นเดียวกับข้อ (2.1) นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30.2 – 33.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 64–79 %)

วิธีการศึกษา เช่นเดียวกับข้อ (2.1)

วิธีเตรียมเครื่อง เก็บความชื้นสำหรับใช้ในการทดลอง

ใช้โปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ 50 กรัมผสมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เพื่อจัดให้ไคระคัมความชื้น 60 % ตามวิธีของ Peterson (1964) ใส่สารละลายโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ ในจานแก้วทรงสูง แล้วนำไปไว้ในเครื่อง เก็บความชื้น

ปิดฝาให้สนิทโดยใช้วาสลินทาที่ขอบฝา

วิธีเก็บตัวอ่อนของแมลง เพื่อศึกษา

ฆ่าตัวอ่อนควายนายา เก เอ เอ ดี แลวเก็บ (preserve) ไว้ควย
อัลกอฮอล์ 70 % ในขวดแก้วขนาด 2.5 X 4.5 เซนติเมตร ปิดฝาสนิท

วิธีทำสไลด์

ใช้ เกเตอร์มีเดีย (Gater media)

วิธีเตรียมสารเคมี

นายา เก เอ เอ ดี (Chu 1949) มีสูตรดังนี้

น้ำมันก๊าด (kerosene) 1 ส่วน

เอทิล อัลกอฮอล์ 95 % 7-9 ส่วน

แกลซีเยล อาซิติก แอซิด (glacial acetic acid) 1 ส่วน

ไดออกเซน (Dioxan) 1 ส่วน

นายา เกเตอร์ มีเดีย มีสูตรดังนี้

คลอรัล ไฮเดรท (chloral hydrate) 75 กรัม

กัม อาราบิก (gum arabic) 8 กรัม

กลีเซอริน (glycerine) 5 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

แกลซีเยล อาซิติก แอซิด 3 มิลลิลิตร

3. การศึกษาการเจริญเติบโตของแมลงโดยใช้ตัวลิสง เป็นอาหาร

อาหาร ตัวลิสง 200 เมล็ดใส่ในขวดแก้วขนาด 6.5 X 18.5 เซนติเมตร 5 ขวด

วิธีทดลอง เช่นเดียวกับข้อ (2.1) นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 28.3-33.0 องศา-

เซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 62-75 %)

วิธีการศึกษา เช่นเดียวกับข้อ (2.1)

การเลือกถั่วลิสงเป็นอาหาร

เลือกถั่วลิสงที่มีลักษณะดังนี้

ก. สะอาด เมล็ดไม่เหี่ยวบน

ข. คัดขนาดใกล้เคียงกัน น้ำหนักของ 1 เมล็ดประมาณ 450-650 มิลลิกรัม

4. การศึกษาพฤติกรรมบางประการในการผสมพันธุ์ของแมลงตัวเต็มวัย

วิธีทดลอง ใส่แมลงตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียที่เพิ่งเกิดใหม่และยังไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย 1 คู่ในขวดทดลองขนาด 2.3 x 8.2 เซนติเมตร ปล่อยให้ผสมพันธุ์กันที่อุณหภูมิห้อง (29.5-33.0 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 40 การทดลอง

วิธีการศึกษา สังเกตพฤติกรรมและนับระยะเวลาที่แมลงใช้ในการผสมพันธุ์แต่ละครั้ง บันทึกผล

5. การศึกษาความสามารถในการวางไข่ (fecundity) ของแมลง

วิธีทดลอง ใส่แมลงตัวผู้และตัวเมียที่เพิ่งเกิดใหม่และยังไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย 1 คู่ในหลอดทดลองขนาด 19 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุถั่วเขียวไว้ 50 เมล็ด ปีกควยผากอสหนา 4 ชั้น วางหลอดทดลองนอนลง และเกลี่ยเมล็ดถั่วเขียวไม่ให้ชนกัน ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29.0-32.5 องศาเซลเซียส) ทดๆ ประมาณ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนถั่วเขียวในหลอดทดลองให้ใหม่ 50 เมล็ด พร้อมทั้งเปลี่ยนเอาแมลงตัวผู้ที่เพิ่งเกิดใหม่ใส่แทนตัวผู้ตัวเดิมควย ทำเช่นนั้นจนกว่าแมลงตัวเมียจะตาย ทำการทดลอง 25 การทดลอง

วิธีการศึกษา

ก. ตรวจนับจำนวนไข่ที่แมลงวางไว้ทุกๆ ประมาณ 24 ชั่วโมง และรวมจำนวนไข่ทั้งหมดที่แมลงหนึ่งตัววางได้ตลอดชีวิต

ข. ติดตามผลว่า ไข่ที่ถูกวางไว้นั้น ไข่เวลาในการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยนานเท่าไร เป็นเพศใดและมีไข่ที่เจริญจนเป็นตัวเต็มวัยจำนวนเท่าไร

6. การศึกษาอายุขัย (longevity) ของแมลงตัวเต็มวัย

วิธีทดลอง แบ่ง เป็น 3 ตอน ดังนี้

6.1 ตัวเต็มวัยตัวผู้ที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย (virgin male)

ใส่แมลงตัวผู้ที่เพิ่ง เกิดใหม่และไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย ในขวดทดลองขนาด 2.3 x 8.2 เซนติเมตร ปิดควยปากออสหนา 4 ชั้น ings ว่างที่อุณหภูมิห้อง (30.0 -32.0 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 59 การทดลอง

6.2 ตัวเต็มวัยตัวเมียที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย (virgin female)

ใส่แมลงตัว เมียที่เพิ่ง เกิดใหม่และไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย ทำการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ (6.1) ทั้งหมด 65 การทดลอง

6.3 ตัวเต็มวัยที่เคยได้รับการผสมพันธุ์ (mated adult)

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน คือ

6.3.1 ตัวเต็มวัยที่ได้รับการผสมพันธุ์ภายใน 24 ชั่วโมงแรกหลังจากเกิด

ใส่แมลงตัวผู้และตัวเมียที่เพิ่ง เกิดใหม่และไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย 1 คู่ ในหลอดทดลองขนาด 19 x 150 มิลลิเมตรที่มีตัว เชี่ยวอายุ 50 เมล็ด ปิดควยปากออสหนา 4 ชั้น ings ว่างที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง แยกแมลงทั้งสองออก ใส่ไว้ในขวดทดลองขนาด 2.3 x 8.2 เซนติเมตร ปิดควยปากออสหนา 4 ชั้น ขวดละตัว ปล่อยให้ว่างที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 36 การทดลอง

6.3.2 ตัวเต็มวัยที่มีโอกาสได้รับการผสมพันธุ์ตลอดชีวิต (continuous mated)

ทำการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ (6.3.1) แต่ทุกๆ ประมาณ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนตัว เชี่ยวให้แมลงใหม่โดยไม่แยกแมลงออกจากกัน จนกว่าทั้งตัว ผู้และตัวเมียจะตาย ทำการทดลอง 36 การทดลอง

วิธีการศึกษา ตรวจดูว่า ตัวเต็มวัยยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ ทุกๆ ประมาณ 24 ชั่วโมง จนกว่าแมลงจะตาย นับระยะเวลาที่แมลงมีชีวิตอยู่ เปรียบเทียบทั้ง 4 การทดลอง บันทึกผล

7. การศึกษาความสามารถในการทำลาย เมล็ดถั่วเขียวของแมลง

วิธีทดลอง ใส่แมลงตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียที่เพิ่งเกิดใหม่และไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย ในหลอดทดลองขนาด 19 x 150 มิลลิเมตรที่มีถั่วเขียว 50 เมล็ด ปิดด้วยฉากออสหนา 4 ชั้น ทำทั้งหมด 5 การทดลอง ings ที่อุณหภูมิห้อง (29.0-32.5 องศาเซลเซียส) ประมาณ 24 ชั่วโมงต่อมา ปล่อยแมลงออก คัดเลือกถั่วเขียวที่มีไข่แมลงวางติดอยู่เมล็ดละ 1 ใบไว้ 100 เมล็ด ทำเครื่องหมายทุกเมล็ด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่ละเมล็ด บันทึกผล พร้อมกันนี้ นำเมล็ดถั่วเขียวที่ไม่มีไข่แมลงวางติดอยู่จำนวน 100 เมล็ด ไปชั่งน้ำหนักรวม จัดเป็นกลุ่มควบคุม (control) บันทึกผล

เก็บถั่วเขียวทั้ง 2 ชุดนี้ไว้ในหลอดทดลองขนาด 19 x 150 มิลลิเมตร ปิดด้วยฉากออสหนา 4 ชั้น ที่อุณหภูมิห้อง (29.0-32.5 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งเริ่มเห็นรอยวงกลมบนเมล็ดถั่วเขียว ซึ่งเป็นร่องรอยที่แสดงให้เห็นว่า แมลงกำลังจะเป็นตัวเต็มวัยและจะเจาะเปลือกเมล็ดถั่วเขียวออกมา จึงแยกถั่วเขียวแต่ละเมล็ดไว้ในขวดทดลองขนาด 2.3 x 8.2 เซนติเมตร จนกระทั่งตัวเต็มวัยเจาะเมล็ดถั่วเขียวออกมา บันทึกผลว่าเป็นเพศใด แล้วนำถั่วเขียวที่มีรอยเจาะทั้งหมด และถั่วเขียว 100 เมล็ดที่เป็นกลุ่มควบคุม ไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง บันทึกผล

วิธีการศึกษา จากกลุ่มควบคุม

ก. คำนวณหาน้ำหนักถั่วเขียวที่หายไป เท่ากับ เป็นน้ำหนักน้ำที่ระเหยไปจากถั่วเขียว 100 เมล็ด

ข. คำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักน้ำที่ระเหยไปจากถั่วเขียว 1 เมล็ด

จากถั่วเขียวที่ใช่ เป็นอาหารของแมลง

ก. คำนวณหาน้ำหนักถั่วเขียวที่หายไปของแต่ละเมล็ด

ข. คำนวณหาน้ำหนักที่หายไปที่แท้จริง ซึ่ง เกิดจากการทำลายของแมลง 1 ตัวต่อถั่วเขียว 1 เมล็ด โดยคิดจาก

น้ำหนักถั่วเขียวเต็มเมล็ด - (น้ำหนักถั่วเขียวที่หายไป - น้ำหนักน้ำที่ระเหยไปจากเมล็ดถั่ว)

ค. คำนวณหาปริมาณการทำลายของแมลง เป็นการร้อยละ