

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ



อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ก. ราและไรที่ใช้ในการทดลอง

1. รา, Helminthosporium sp. ได้รับจากห้องปฏิบัติการ Cell Biology ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ไร, Caloglyphus krameri (Berlese) ได้รับจากห้องปฏิบัติการ Cell Biology ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. อาหารราและไร

Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco Laboratories)

ค. เครื่องมือแก้ว

1. Beaker ขนาด 1000, 500 มิลลิลิตร

2. Petri-dish ขนาด 15 x 100 มม.

3. ขวดรูปกรวย ขนาด 500, 250 มิลลิลิตร

4. หลอดทดลอง

5. แห้งแก้วคน

6. ทัพพีเหล็ก ขนาด 60 x 35 x 35 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ง. เครื่องมืออื่น ๆ

1. จานพลาสติกขนาด 35 x 10 mm. และ 55 x 15 mm.

2. ถาดวางจาน ขนาด 56 x 30 ตารางเซนติเมตร

3. สำลี

4. กระดาษเทปขน

5. ทุกัน
 6. เข็มเขี่ย
 7. เครื่องวัดความชื้น (hygrometer)
 8. เทอร์โมมิเตอร์ ที่วัดอุณหภูมิสูงสุด และต่ำสุด
 9. ไมโครมิเตอร์
 10. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
 11. กล้องจุลทรรศน์
 12. กล้องส่องตา
 13. autoclave
- จ. สารเคมี
1. เอทิลแอลกอฮอล์ 70 %
 2. น้ำยาทำสไลด์ Hoyer's Medium
 3. วาสลิน

วิธีทำการวิจัย

1. การเพาะพันธุ์ไรเพื่อใช้ในการศึกษา

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงไร คือ ราค่า Helminthosporium sp. ซึ่งได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ จากงานวิจัยการสำรวจราในอากาศ จากบริเวณชุมชนเขาวราช ของ วัฒน และคณะ (2523) สาเหตุที่เลือกใช้ราชนิดนี้ เนื่องจากราชนิดนี้มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วเต็มจานที่ใช้เพาะเลี้ยง ขนาดพื้นที่ผิว 5 x 15 x 100 มม. ภายใน 5 วันสามารถมองเห็นว่ามีสีดำ ซึ่งเหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงไรซึ่งมีสีขาวใส เมื่อนำมาส่องกล้องส่องตา กำลังขยาย 500 เท่า สามารถมองเห็นตัวไรบนราสีดำได้อย่างชัดเจน อาหารที่ใช้เลี้ยงราคือ อาหารแข็งสังเคราะห์ potato-dextrose agar (PDA) นำราสายพันธุ์บริสุทธิ์ มา streak ลงบนจานเพาะเลี้ยง ขนาด 15 x 100 มม. ใช้กระดาษเทียบพันรอบขอบจาน

เพาะเลี้ยง เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากห้องทดลอง และป้องกันการสูญเสียความชื้น นำไปเก็บไว้ในที่ ๆ มีแสงสว่างพอสมควร ที่อุณหภูมิห้อง 30.0-32.0 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 64-77 % เป็นเวลาประมาณ 5-7 วัน สปอร์ของราจะเจริญเต็มที่ แพร่กระจายเต็มจานเพาะเลี้ยง

นำไรเพศผู้และเพศเมียคัดเลือกที่มีลักษณะปกติ โดยดูจากความสมบูรณ์ของรูปร่าง มีขนาดใหญ่ ลำตัวใสเป็นมัน มีขาครบทั้ง 4 คู่ และที่สำคัญคือ คอนข้าง active จำนวนเท่า ๆ กันรวม 10 คู่ ใสลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารอยู่ประมาณ 20 ซุก ทั้งจานเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30.0-32.0 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 64-77 % ประมาณ 2-3 วัน นำมาตรวจดูจะพบไข่เป็นจำนวนมาก ทั้งไข่ตออีกจะพบว่าในแต่ละจานเพาะเลี้ยง จะมีไรเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก มองด้วยตาเปล่าจะพบเป็นกลุ่มสีขาว ๆ เคลื่อนที่ไปมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าปริมาณของไรภายในจานเพาะเลี้ยงหนาแน่นมาก มันจะขึ้นมาอาศัยตามขอบแก้วเลี้ยงไว้จนเพียงพอกับความต้องการ และเปลี่ยนอาหารใหม่ ทุก ๆ 10 วัน

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของไร

วิธีทดลอง นำไรตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่เพิ่งเกิดใหม่ (newly emerged) และยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์เลย (virgin) จากจานเพาะเลี้ยงมาทำการทดลองด้วยวิธีเดียวกับข้อ 1 แต่ใช้ไรเพียง 1 คู่ ทั้งไว้ให้ผสมพันธุ์กันประมาณ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูจะพบไข่เป็นจำนวนมาก เตรียมจานพลาสติกขนาดเล็ก 35 x 10 มม. ภายในบรรจุอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อราไว้เต็ม นำไข่ที่ไค้มาวางลงบนรา จานละ 1 ฟอง ทำ 60 ซุก นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 30.0-32.0 องศาเซลเซียส (พิสัย 31 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 64-77 % (พิสัย 70.5 %)

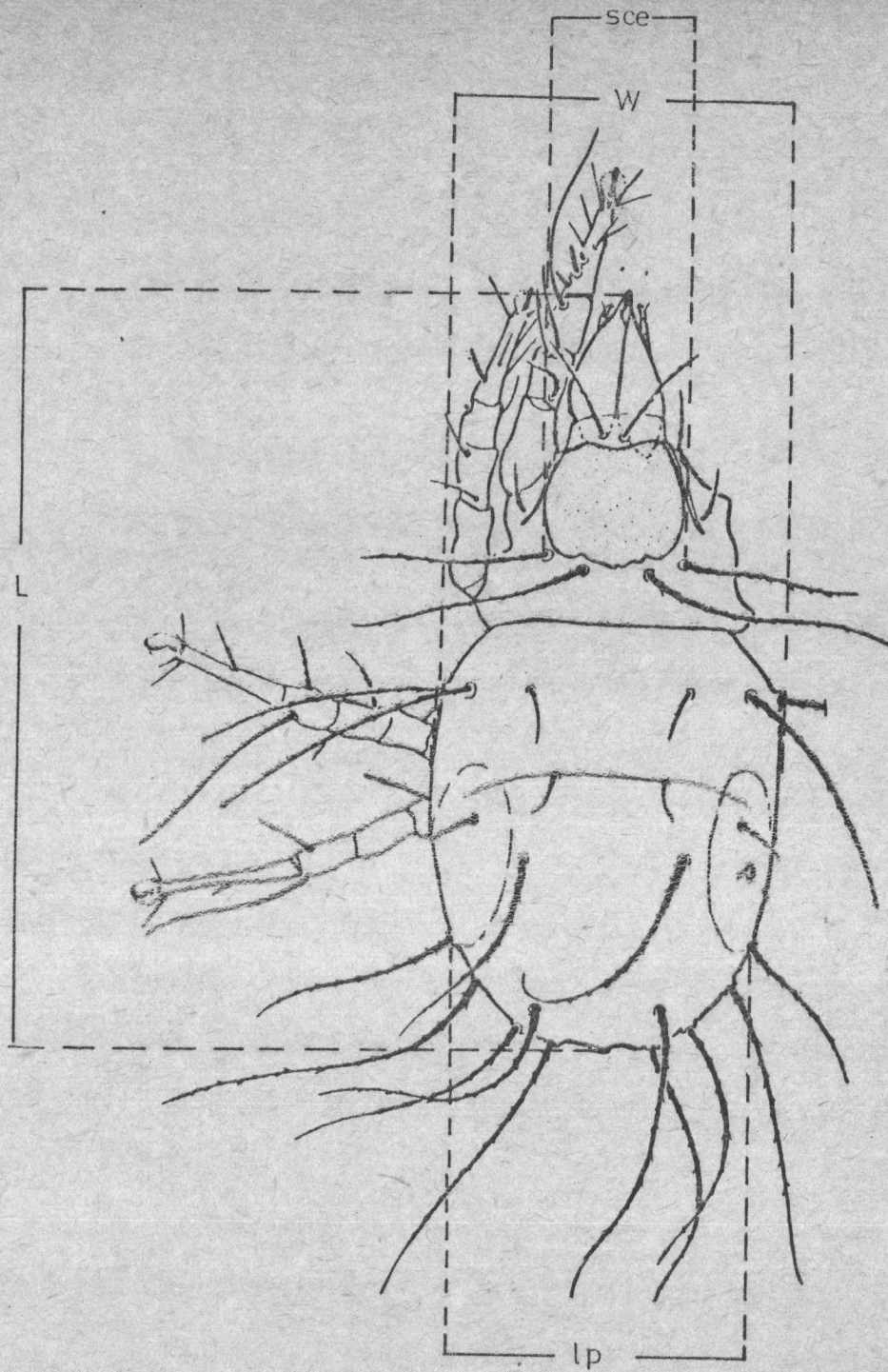
วิธีการศึกษา นำจานที่ใช้เพาะเลี้ยงไรมาตรวจสอบทุก ๆ 6 ชั่วโมง ศึกษาด้วยกล้องสองตา และกล้องจุลทรรศน์เพื่อ

- ก. ศึกษาลักษณะรูปร่างโดยการถ่ายภาพและวาดภาพ
 ข. วัดขนาดความกว้างและความยาวของลำตัวด้วยไมโครมิเตอร์
 ค. วัดระยะระหว่างฐานของขนหางคาน gnathosoma (sce) กับขน

หางคานข้างลำตัว (1p)

- ง. นับจำนวนคราบของตัวอ่อน และระยะที่พบ
 จ. สังเกตลักษณะการเข้าคราบ

บันทึกผล



รูปที่ 8

แสดงวิธีการวัดขนาดของลำตัว

(sce = ระยะห่างระหว่างขนทางคาน gnathosoma, lp = ระยะห่างระหว่างขนทางคานข้างของลำตัว, L = ความยาววัดจากส่วนปลายสุดของปากถึงส่วนปลายสุดของส่วนท้อง, W = ความกว้างวัดจากส่วนท้องระหว่างขาที่ 3 และ 4)

วิธีเก็บตัวอ่อนของไรเพื่อศึกษา

นำตัวอ่อนด้วยการเก็บ (preserve) ไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % ในขวดแก้วขนาด 2.5 x 4.3 เซนติเมตร ปิดฝาสนิท

วิธีทำสไลด์

ใช้ Hoyer's Medium

3. การศึกษาพฤติกรรมบางประการในการผสมพันธุ์ของไรตัวเต็มวัย

วิธีทดลอง ใส่ไรตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่เพิ่งเกิดใหม่และยังไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย 1 คู่ ในจานพลาสติกขนาด 55 x 20 มม. ปล่อยให้ผสมพันธุ์กันที่อุณหภูมิห้อง (30.0-32.0 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 30 ชั่วโมง

วิธีการศึกษา สังเกตพฤติกรรมและระยะเวลาที่ไรใช้ในการผสมพันธุ์แต่ละครั้ง บันทึกผล

4. การศึกษาความสามารถในการวางไข่ (fecundity) ของไร

วิธีทดลอง ใส่ไรเพศผู้และเพศเมียที่เพิ่งเกิดใหม่ และยังไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย 1 คู่ ในจานพลาสติกขนาด 55 x 20 มม. ที่มีอาหารราอยู่เต็มถังไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29.5-32.0 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 24 ชั่วโมง

วิธีการศึกษา

ก. ตรวจสอบจำนวนไข่ที่ไรวางไว้ทุก ๆ 24 ชั่วโมง และรวมจำนวนไข่ทั้งหมดที่ไรหนึ่งตัววางได้ตลอดชีวิต

ข. ติดตามผลดูว่า ไข่ที่ถูกวางนั้นใช้เวลาในการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยนานเท่าไร เป็นเพศใด และมีไข่ที่เจริญจนเป็นตัวเต็มวัยจำนวนเท่าไร

5. การศึกษาอายุขัย (longevity) ของไรตัวเต็มวัย

วิธีทดลอง แบ่งเป็น 3 ตอนดังนี้

5.1 ตัวเต็มวัยเพศผู้ที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย (virgin male)
ใส่ไรเพศผู้ที่เพิ่งเกิดใหม่ และไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย ในจานพลาสติกขนาด

35 x 10 มม. ที่มีอาหารราอยู่เต็ม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30.0-32.0 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 64-77 % ทำการทดลอง 20 ซ้ำ

5.2 ตัวเต็มวัยเพศเมียที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย (virgin female)
ใช้โรเพศเมียที่เพิ่งเกิดใหม่ และไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์เลย ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.1 ทำการทดลอง 20 ซ้ำ

5.3 ตัวเต็มวัยที่เคยได้รับการผสมพันธุ์ (mated adult)

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอนคือ

5.3.1 ตัวเต็มวัยที่ได้รับการผสมพันธุ์ภายใน 24 ชั่วโมงแรก

หลังจากเกิด

ใส่โรเพศผู้และเพศเมียที่เพิ่งเกิดใหม่ และไม่เคยได้รับ

การผสมพันธุ์เลย 1 คู่ ลงในจานพลาสติกขนาด

35 x 10 มม. ที่มีอาหารราอยู่เต็ม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง แยกโรทั้งสองออกใส่ไว้ใน

จานพลาสติกขนาด 35 x 10 มม. ที่มีอาหารราอยู่เต็ม

ปล่อยให้ที่อุณหภูมิห้อง (30.0-32.0 องศาเซลเซียส)

ความชื้นสัมพัทธ์ 64-77 % ทำการทดลอง 20 ซ้ำ

5.3.2 ตัวเต็มวัยที่มีโอกาสได้รับการผสมพันธุ์ตลอดชีวิต

(Continuous mated)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ (5.3.1) โดยไม่แยก

โรออกจากกัน จนกว่าทั้งเพศผู้และเพศเมียจะตาย ทำการ

ทดลอง 20 ซ้ำ

วิธีการศึกษา

ตรวจดูว่าตัวเต็มวัยยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ ในเวลา 10.0 น. ของทุกวันจนกว่าโรจะตาย นับระยะเวลาที่มีชีวิตอยู่ เปรียบเทียบทั้ง 4 การทดลอง บันทึกผล

6. ศึกษาพฤติกรรมบางประการ

6.1 การกินกันเอง (cannibalism)

วิธีทดลอง นำจานพลาสติกขนาด 55 x 15 ม.ม. ที่มีอาหารรูกักคอยู่
จนแห้งติดภาชนะ เชื้อโรลงไปบนจานพลาสติกจานละ 15 ตัว

วิธีการศึกษา ก. ตรวจนับจำนวนรูกักคทุก ๆ 6 ชั่วโมง

ข. สังเกตการเคลื่อนที่

ค. สังเกตจำนวนก้อนอุจจาระ (faecal pellet)

ง. สังเกตรูปร่างของไรที่มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม

6.2 การวางไข่โดยไม่ผสมพันธุ์ (parthenogenesis)

วิธีทดลอง นำไรเพศเมียที่เพิ่งเกิดใหม่ และไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์
ใส่ลงในจานพลาสติกขนาด 55 x 15 ม.ม. ที่มีอาหารราอยู่เต็ม หิ้งไว้ที่อุณหภูมิ
ห้อง (30.0-32.2 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 64-77 % ทำ 15 ชั่วโมง

วิธีการศึกษา ตรวจนับจำนวนไข่ทุก ๆ 6 ชั่วโมง บันทึกผล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติของสมชาย (2522)

1. การหาความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 สิ่ง แบบเส้นตรง (straight line
relation หรือ linear relationship)

มีสูตรทั่วไป $Y = a + bx$

เมื่อ คือ ความยาว

a คือ interception ของ Y

b คือ regression coefficient หรือ slope

ซึ่งมีค่าเป็น

$$b = \frac{\sum xy - \frac{1}{n} (\sum x \sum y)}{\sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2}$$

$$\sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2$$

x คือ เวลา

2. การหานัยสำคัญของเส้นตรง (Test of significant) สามารถหาได้โดยใช้ Correlation coefficient (r)

$$r = \frac{\sum xy - \frac{1}{n} \sum x \sum y}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2 \right] \left[\sum y^2 - \frac{1}{n} (\sum y)^2 \right]}}$$

$$\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2 \right] \left[\sum y^2 - \frac{1}{n} (\sum y)^2 \right]}$$

3. การแจกแจง t-distribution สำหรับตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก

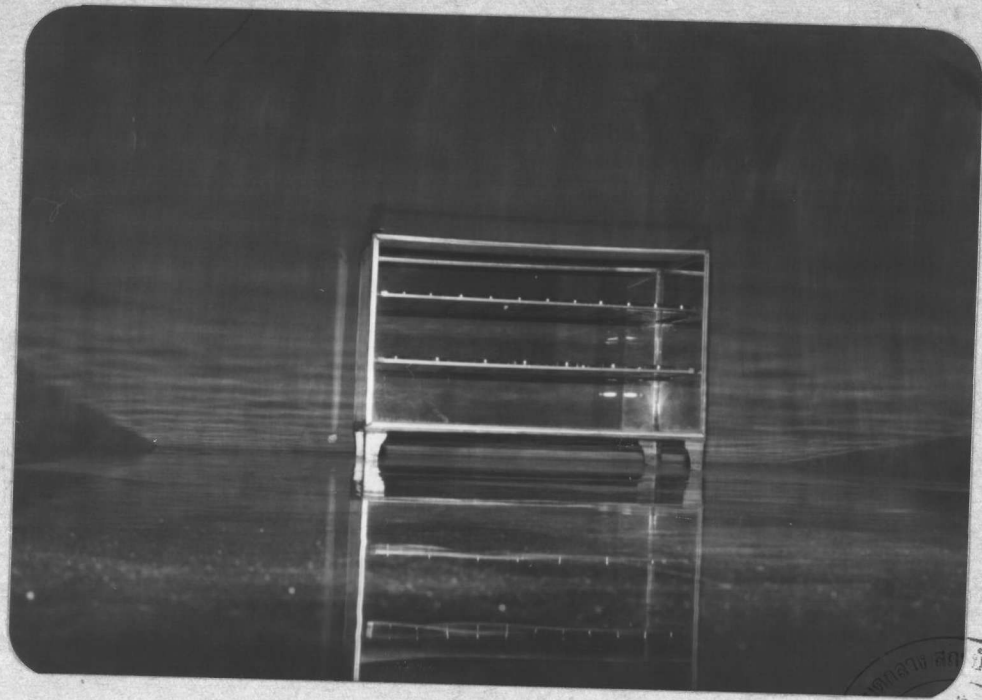
$$t = r \sqrt{(n-2) / (1-r^2)}$$

$$d.f. = n-2$$

(d.f. = degree of freedom)

r = สัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

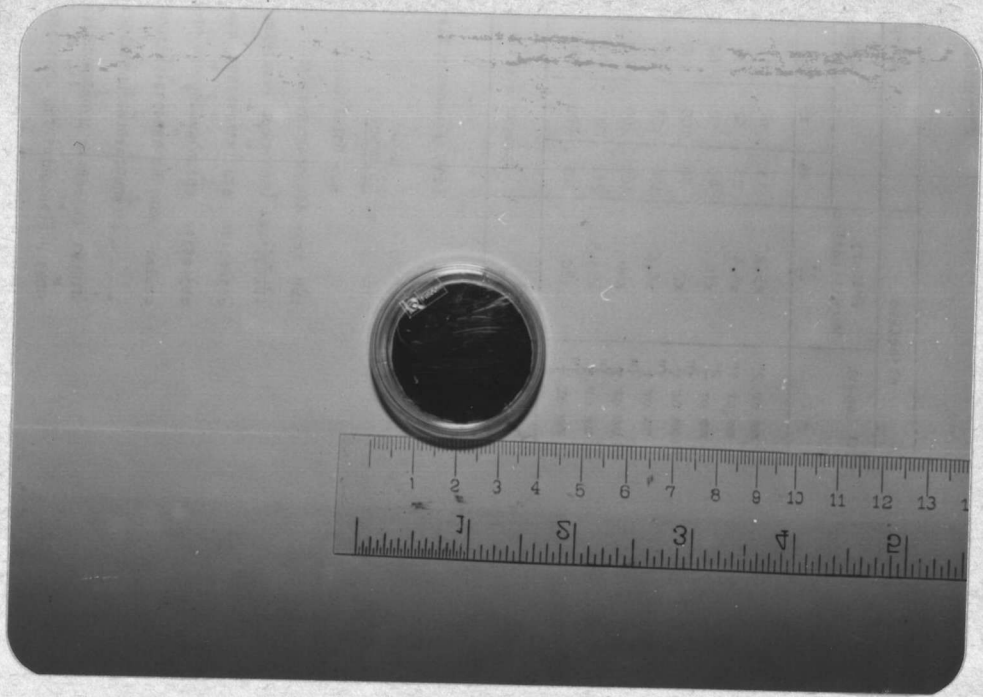
n = จำนวนของข้อมูล



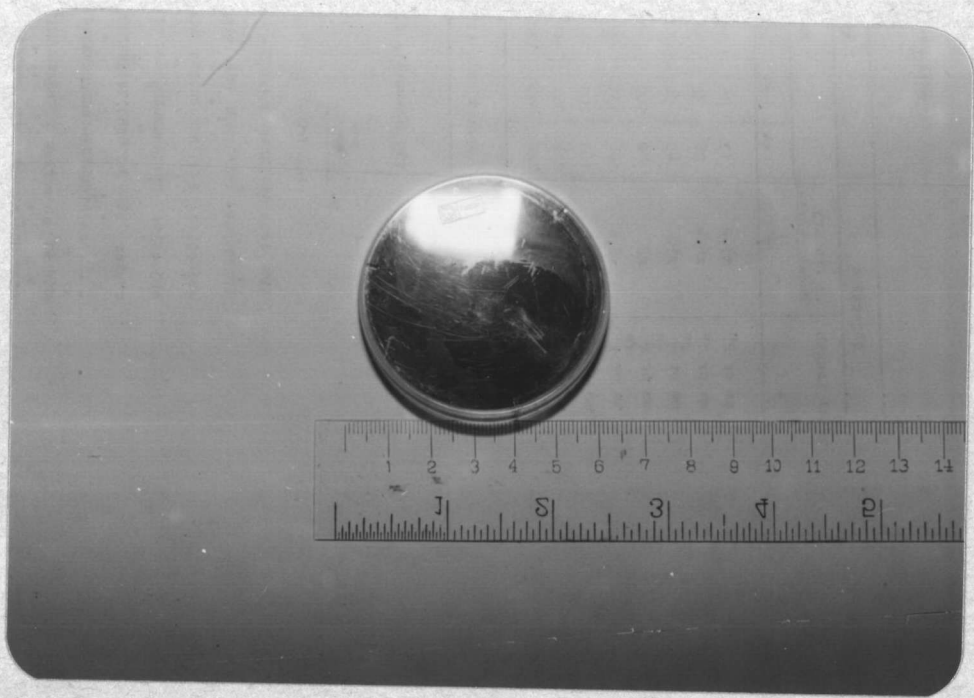
รูปที่ 9 ตู้กระจกที่ใช้เพาะเลี้ยงไร



รูปที่ 10 จานแก้วที่ใช้เพาะพันธุ์ไร ซึ่งบรรจุอาหารราหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร และเชื้อรา Helminthosporium sp. อายุประมาณ 6 วัน



รูปที่ 11 งานพลาสติกที่ใช้ศึกษาวงจรชีวิตของไร



รูปที่ 12 งานพลาสติกที่ใช้ศึกษาพฤติกรรมบางประการของไร