

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สวิงจับแมลง
2. ขวดเก็บตัวอย่าง ขนาด 15 มิลลิลิตร
3. ชุดผ่าตัดและถาดผ่าตัดแมลง
4. กระจกสไลด์
5. กระจกปิดสไลด์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร (Menzel – Glaser, Germany)
6. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. กล้องใส่สไลด์ ขนาด 100 ช่อง
8. แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
9. Gum arabic (Fluka)
10. Chloral hydrate (Fluka)
11. Glycerine (Merck)
12. Ethyl acetate (Merck)

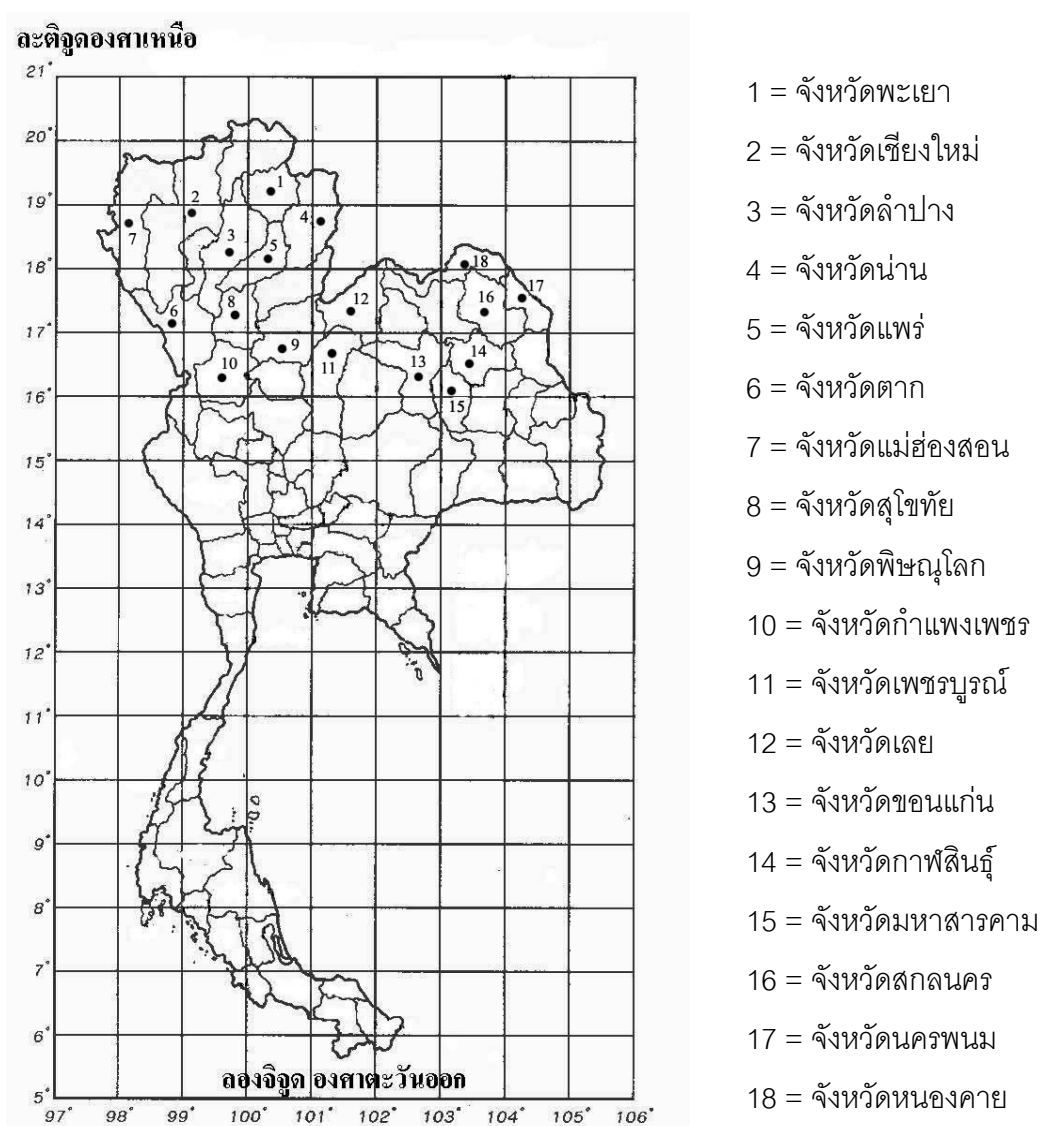
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ รุ่น SZ 11
2. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ รุ่น SZH 10 (Research Stereo)
3. กล้องดิจิทัล Olympus 5.0 Mega pixel
4. กล้องดิจิทัล ยี่ห้อ Sony
5. Hot air oven
6. Slide warmer

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างชันโรงงาน *T. collina* จากรังที่พบในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตั้งแต่เส้นละติจูดที่ 16° เหนือ ถึง 20° เหนือ จำนวน 54 รัง ๆ ละ 30 ตัว ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่มี ethyl acetate เพื่อทำให้ชันโรงสลบและช่วยให้ส่วนของโพรบอสซิส (proboscis) ยืดยาวออกมาได้ดี



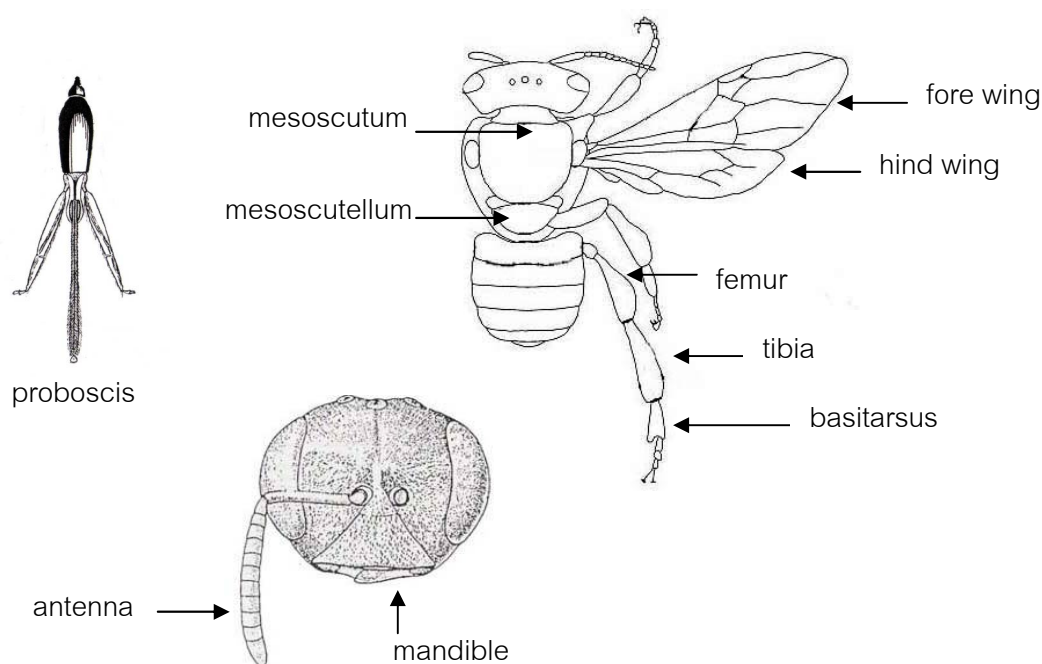
ภาพ 2 แผนที่ประเทศไทยแสดงตำแหน่งจังหวัดที่เก็บตัวอย่างชันโรง *T. collina*

2. นำชิ้นโรงที่สลับใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง

การผ่าตัดและการทำสไลด์ตัวอย่าง

1. นำชิ้นโรงงาน *T. collina* วางบนถาดผ่าตัดที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอยู่เพื่อไม่ให้ตัวอย่างแห้ง โดยทำการผ่าตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

2. ผ่าตัดชิ้นโรงงานแต่ละตัวเพื่อแยกส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ปีกหน้า (fore wing) ปีกหลัง (hind wing) หนวด (antenna) กราม (mandible) โพรบอสซิส (proboscis) ขาหลัง (hind leg) และส่วนบนของอกปล้องที่ 2 (mesoscutum และ mesoscutellum) (ภาพ 3) โดยมีขั้นตอนการผ่าตัดดังนี้



ภาพ 3 ส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชิ้นโรงงาน *T. collina* (ที่มา: Sung et al., 2004; Dade, 1985; Schwarz, 1939)

2.1 ใช้เข็มปักแมลงแทงลงบนด้านหน้าของส่วนหัวของชิ้นโรงงาน เพื่อตรึงชิ้นโรงงานบนถาดผ่าตัด ใช้ใบมีดผ่าตัดค่อย ๆ เลาะเนื้อเยื่อรอบกรามแล้วใช้ปากคีบดึงกรามแยกออกจากบริเวณส่วนปาก แล้วจากนั้นใช้ปากคีบจับบริเวณโคนของสเคป (scape) ของหนวดและใช้ใบมีดผ่าตัดเลาะเนื้อเยื่อบริเวณใต้สเคป เพื่อแยกหนวดออกมา

2.2 ใช้เข็มปักแมลงแทงลงบนด้านหลังของส่วนหัวของชันโรงงานแล้วใช้ใบมีดผ่าตัด ตัดบริเวณเนื้อเยื่อรอบ ๆ โพรบอสซิสตั้งแต่บริเวณโพสเมนต์ (postmentum) แล้วค่อย ๆ ดึงโพรบอสซิสออกมา

2.3 ใช้ปากคีบจับบริเวณส่วนอก เพื่อใช้ใบมีดโกนตัดบริเวณใต้ฐานปีกหน้าและปีกหลังแล้วใช้ปากคีบดึงปีกหน้าและปีกหลังออกมา จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนบนของอกปล้องที่ 2 บริเวณเมโซสคิวตัมและเมโซสคิวเทลลัม

2.4 ใช้ปากคีบจับบริเวณฟีมอร์ (femur) ของขาหลัง จากนั้นใช้ใบมีดโกนตัดแยกบริเวณรอยต่อของปล้องทรอแซเตอร์ (trochanter) กับฟีมอร์ รอยต่อของทิเบีย (tibia) กับบาซิทาร์ซัส (basitarsus) และรอยต่อของบาซิทาร์ซัสกับทาร์ซัส (tarsus) ได้ส่วนที่ต้องการ 2 ส่วนคือ ฟีมอร์ติดอยู่กับทิเบีย และบาซิทาร์ซัส

3. เก็บส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาของชันโรงงานแต่ละตัวใส่ใน microcentrifuge tube ที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์บรรจุอยู่

4. หยดน้ำยาฮอยเออร์จำนวน 1 - 2 หยด ลงบนแผ่นสไลด์โดยแบ่งพื้นที่ของสไลด์ออกเป็น 3 ส่วน เพื่อวางส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษา ดังนี้

4.1 ส่วนที่ 1 วางปีกหน้า ปีกหลัง หนวด และโพรบอสซิส

4.2 ส่วนที่ 2 วางฟีมอร์กับทิเบีย บาซิทาร์ซัส และกราม

4.3 ส่วนที่ 3 วางส่วนบนของอกปล้องที่ 2

ใช้ปากคีบ คีบส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษามาวางบนน้ำยาฮอยเออร์และจัดตัวอย่างให้อยู่ในลักษณะที่ต้องการ

5. ใช้ปากคีบจับกระจกปิดสไลด์ แล้วค่อย ๆ ปลดกระจกปิดสไลด์ลงเบา ๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วใช้ฟุ้งกันกดบนกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างติดบนแผ่นสไลด์ ในส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 ของแผ่นสไลด์จะหนูนกระจกปิดสไลด์ด้วยกระดาษ 100 ปอนด์ ตัดเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร แล้วเจาะรูเป็นวงกลมตรงกลางขนาด 0.6 มิลลิเมตร เพื่อวางตัวอย่างลงไป

6. นำแผ่นสไลด์ไปวางบน slide warmer เพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้นนำแผ่นสไลด์เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 สัปดาห์

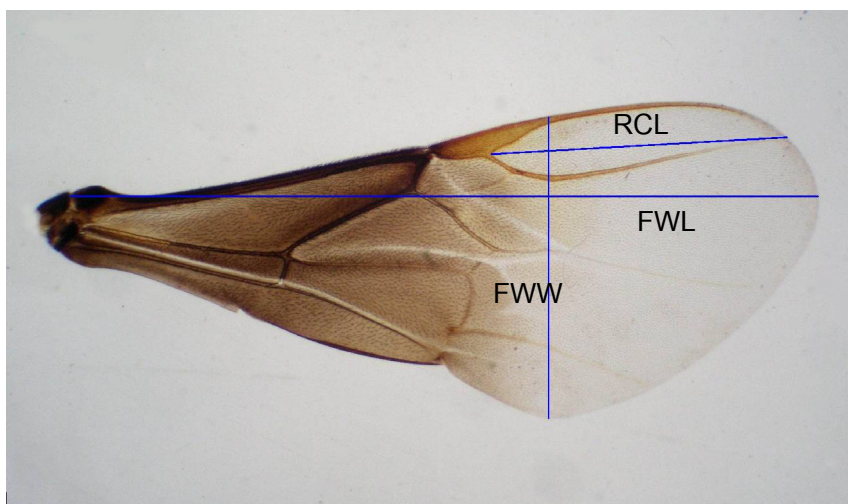
7. นำแผ่นสไลด์ออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปิดขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ ทิ้งไว้จนแห้ง ทาซ้ำ 2 - 3 ครั้ง และเก็บสไลด์ใส่ในกล่องเก็บสไลด์

การวัดและการวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริก

1. นำแผ่นสไลด์ตัวอย่างมาส่องดูและถ่ายภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่ต่อเข้ากับกล้องดิจิทัล และบันทึกภาพลงในคอมพิวเตอร์

2. นำภาพที่ได้มาทำการวัดขนาดความกว้างและความยาวของส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรงงาน *T. collina* แต่ละตัว (ภาพ 4 - 11) โดยใช้โปรแกรม Micro Image 4.0 รวมทั้งหมด 23 ลักษณะ (ทรรศนีย์ ไชยวงศ์, 2544; Mattu & Verma, 1984a; Mattu & Verma, 1984b) ได้แก่

- 2.1 ความยาวลำตัว (body length, B)
- 2.2 ความยาวของหนวด (length of antenna, AL)
- 2.3 ความยาวของแฟลเจลลัม (length of flagellum, FL)
- 2.4 ความยาวของสเคป (length of scape, SCL)
- 2.5 ความกว้างของปีกหน้า (width of fore wing, FWW)
- 2.6 ความยาวของปีกหน้า (length of fore wing, FWL)
- 2.7 ความยาวของเส้นปีกหน้า (length of radial cell, RCL)
- 2.8 ความกว้างของปีกหลัง (width of hind wing, HWW)
- 2.9 ความยาวของปีกหลัง (length of hind wing, HWL)
- 2.10 จำนวนของฮามูไล (number of hamuli, NH)
- 2.11 ความยาวของเวนนอล โลบ (length of vannal lobe, VnL)
- 2.12 ความยาวของฟีเมอร์ (length of femur, FML)
- 2.13 ความยาวของทิเบีย (length of tibia, TBL)
- 2.14 ความยาวของบาซิทาร์ซัส (length of basitarsus, BTL)
- 2.15 ความกว้างของเมโซสคูตัม (width of mesoscutum, MSW)
- 2.16 ความยาวของเมโซสคูตัม (length of mesoscutum, MSL)
- 2.17 ความกว้างของเมโซสคูเทลลัม (width of mesoscutellum, STW)
- 2.18 ความยาวของเมโซสคูเทลลัม (length of mesoscutellum, STL)
- 2.19 ความยาวของกลอสซา (length of glossa, GSL)
- 2.20 ความยาวของลาเบียล เพาพ์ (length of labial palp, LPL)
- 2.21 ความยาวของโพรบอสซิส (length of proboscis, PBL)
- 2.22 ความกว้างของกราม (width of mandible, MNW)
- 2.23 ความยาวของกราม (length of mandible, MWL)

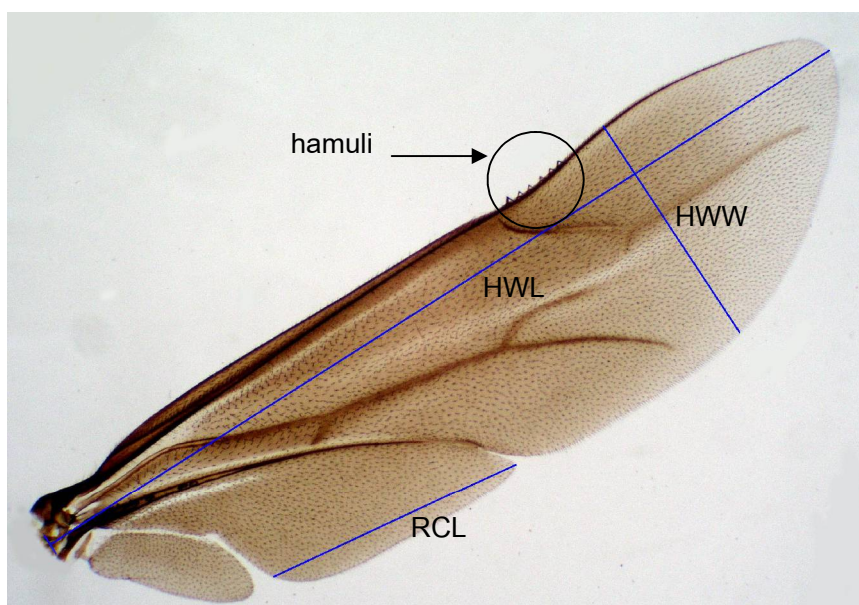


ภาพ 4 ปีกหน้าของชันโรงงาน *T. collina*

FWW = ความกว้างของปีกหน้า (width of fore wing)

FWL = ความยาวของปีกหน้า (length of fore wing)

RCL = ความยาวของเส้นปีกหน้า (length of radial cell)

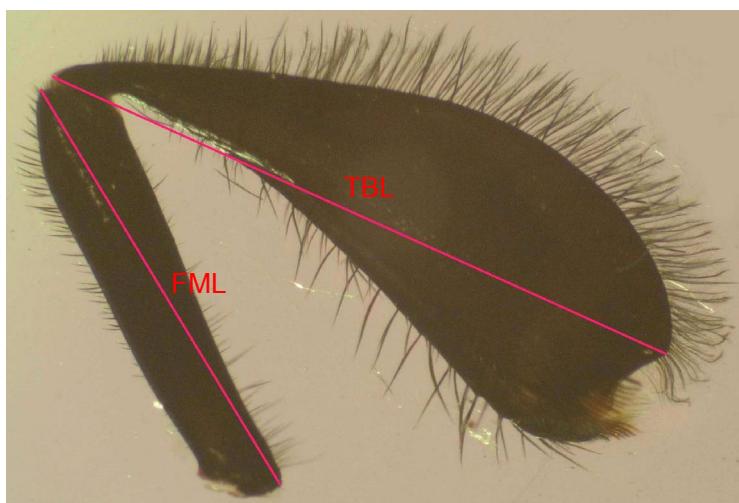


ภาพ 5 ปีกหลังของชันโรงงาน *T. collina*

HWW = ความกว้างของปีกหลัง (width of hind wing)

HWL = ความยาวของปีกหลัง (length of hind wing)

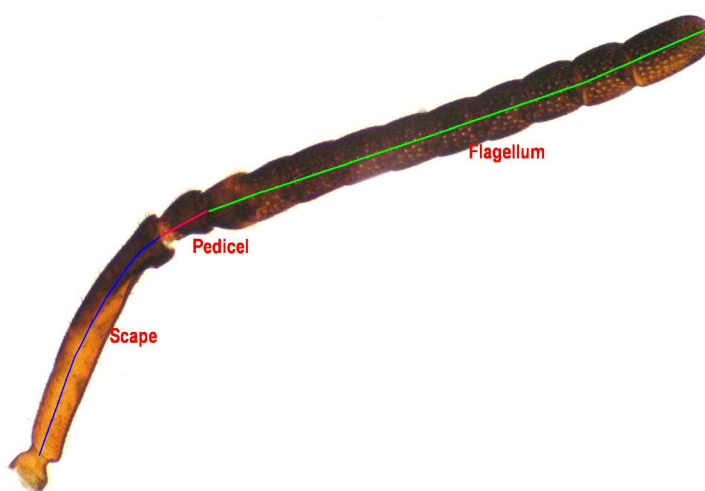
VnL = ความยาวของเวนนอล โลบ (length of vannal lobe)



ภาพ 6 ฟีมอร์และทิเบียของชันโรงงาน *T. collina*

FML = ความยาวของฟีมอร์ (length of femur)

TBL = ความยาวของทิเบีย (length of tibia)



ภาพ 7 หนวดของชันโรงงาน *T. collina*

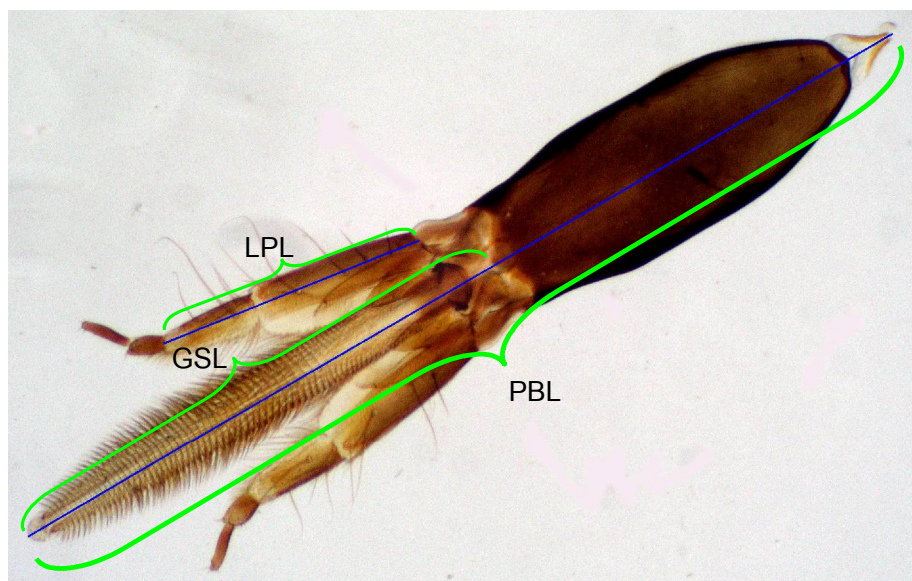
AL = ความยาวของหนวด

(length of antenna; FL+SCL+PDL)

FL = ความยาวของแฟลเจลลัม (length of flagellum)

SCL = ความยาวของสเคป (length of scape)

PDL = ความยาวของเพดดิเซล (length of pedicel)

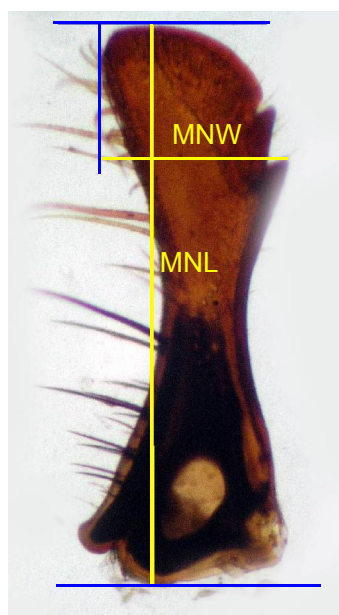


ภาพ 8 โพรบอสซิสของชั้นโรงงาน *T. collina*

GSL = ความยาวของกลอสซา (length of glossa)

LPL = ความยาวของลาเบียล เพาพ์ (length of labial palp)

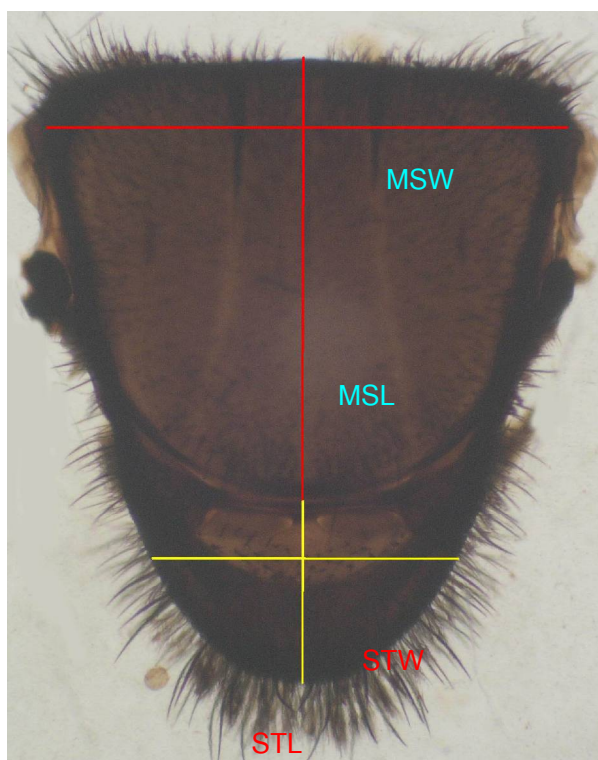
PBL = ความยาวของโพรบอสซิส (length of proboscis)



ภาพ 9 กรามของชั้นโรงงาน *T. collina*

MNW = ความกว้างของกราม (width of mandible)

MNL = ความยาวของกราม (length of mandible)



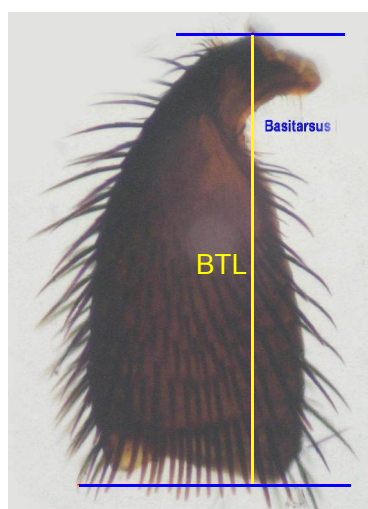
ภาพ 10 ส่วนบนของอกปล้องที่ 2 ของชันโรงงาน *T. collina*

MSW = ความกว้างของเมโซสคูตัม (width of mesoscutum)

MSL = ความยาวของเมโซสคูตัม (length of mesoscutum)

STW = ความกว้างของเมโซสคูเทลลัม (width of mesoscutellum)

STL = ความยาวของเมโซสคูเทลลัม (length of mesoscutellum)



ภาพ 11 บาซิทาร์ซัสของชันโรงงาน *T. collina*

BTL = ความยาวของบาซิทาร์ซัส (length of basitarsus)

3. นำข้อมูลที่ได้จากการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยามาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS for Windows 11.0

3.1 การจำแนกกลุ่มตัวแปรด้วยสถิติการวิเคราะห์ปัจจัย (factor analysis)

3.1.1 การวิเคราะห์ปัจจัย (factor analysis) ครั้งที่ 1 เพื่อคัดเลือกตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันมากไว้สำหรับการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 ซึ่งอาจจะเป็นความสัมพันธ์ในทางบวกหรือลบก็ได้ โดยพิจารณาจากตัวแปรที่มีค่าสัมประสิทธิ์ (factor loading) มากกว่าค่าสัมบูรณ์ 0.6

3.1.2 การวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 จะนำตัวแปรที่ถูกคัดเลือกไว้จากการวิเคราะห์ปัจจัยในครั้งที่ 1 มาจำแนกกลุ่มหรือรวมตัวแปรหลาย ๆ ตัวที่มีความสัมพันธ์กันไว้ในกลุ่มหรือปัจจัย (factor) เดียวกัน โดยพิจารณาจากตัวแปรที่มีค่าสัมประสิทธิ์ที่แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรกับกลุ่มของปัจจัยใหม่มากกว่าค่าสัมบูรณ์ 0.6 ทั้งนี้กลุ่มของปัจจัยใหม่ที่ได้จัดเป็นตัวแปรใหม่ที่สามารถหาค่าข้อมูลของตัวแปรใหม่ได้เรียกว่า factor score จากนั้นใช้ตัวแปรใหม่เป็นตัวแปรสำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

3.1.3 นำค่า factor score ของตัวแปรหรือปัจจัยใหม่ที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาจับคู่เขียนกราฟการกระจายเพื่อจำแนกกลุ่มของตัวอย่างชันโรงงาน *T. collina* ตามภูมิภาค ได้แก่ ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และเขียนกราฟการกระจายเพื่อจำแนกกลุ่มของตัวอย่างชันโรงงาน คือ ภาคเหนือตอนบนอยู่ระหว่างเส้นละติจูด (latitude) ที่ 16° เหนือ ถึง 18° เหนือ กลุ่มตัวอย่างชันโรงภาคเหนือตอนล่างอยู่ระหว่างเส้นละติจูดที่ 18° เหนือ ถึง 20° เหนือ และกลุ่มตัวอย่างชันโรงภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ระหว่างเส้นละติจูดที่ 16° เหนือ ถึง 18° เหนือ กับเส้นลองจิจูด (longitude) ที่ 101° ตะวันออก ถึง 105° ตะวันออก

3.2 จำแนกกลุ่มตัวอย่างชันโรงงานด้วยสถิติการจำแนกกลุ่ม (cluster analysis)

โดยการวัดความคล้ายหรือระยะห่างของตัวอย่างแต่ละคู่ ถ้าตัวอย่างคู่ใดมีระยะห่างระหว่างคู่น้อย แสดงว่าตัวอย่างคู่นั้นอยู่ใกล้กันหรือมีความคล้ายกันควรจัดให้อยู่ในกลุ่ม (cluster) เดียวกัน และใช้หลักเกณฑ์ในการรวมกลุ่มแบบ Between – groups linkage หรือที่เรียกว่า UPGMA (Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Average) ซึ่งจะคำนวณหาระยะห่างเฉลี่ยของตัวอย่างทุกคู่ โดยที่ตัวอย่างหนึ่งอยู่ในกลุ่มที่ i ส่วนอีกตัวอย่างหนึ่งอยู่ในกลุ่มที่ j ซึ่ง $i \neq j$ ถ้ากลุ่มที่ i มีระยะห่างเฉลี่ยจากกลุ่มที่ j สั้นกว่าระยะห่างจากกลุ่มอื่น จะนำกลุ่มที่ i และ j มารวมเป็นกลุ่มเดียวกัน จากนั้นเขียนเดนโดรแกรม (dendrogram) แสดงการรวมกลุ่มของตัวอย่างชันโรงงาน โดยจะเปลี่ยนหน่วยระยะห่างของข้อมูลเดิม เป็นระยะห่างที่มีค่าอยู่ในช่วง 1 ถึง 25 ซึ่งตัวแปรที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างชันโรงงานนั้นจะใช้ตัวแปรใหม่ที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 ในข้อ 3.1.2

3.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ละลักษณะของตัวอย่างชันโรงงานที่พบในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือตัวแปรที่มีค่า factor loading มากกว่าค่าสัมบูรณ์ 0.6 ที่ถูกคัดเลือกมาจากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 1 ในข้อ 3.1.1

3.4 วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีปัจจัยเดียว (One – Way ANOVA) ด้วยสถิติ F – test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ละลักษณะของตัวอย่างชันโรงงานที่แบ่งตามเส้นละติจูดและลองจิจูด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือตัวแปรที่มีค่า factor loading มากกว่าค่าสัมบูรณ์ 0.6 ที่ถูกคัดเลือกมาจากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 1 ในข้อ 3.1.1 ซึ่งการวิเคราะห์ความแปรปรวนนี้มีเงื่อนไขอยู่ 3 ประการ คือ

3.4.1 การสุ่มตัวอย่างจะต้องสุ่มอย่างเป็นอิสระกัน

3.4.2 สุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ โดยจะทดสอบด้วย Kolmogorov – Smirnov Test (K – S Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ในกรณีที่ไม่ทราบค่าเฉลี่ยและค่าแปรปรวนของประชากร จึงต้องใช้ค่าเฉลี่ยและค่าแปรปรวนของตัวอย่างแทน และทดสอบด้วย Shapiro – Wilk ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ในกรณีที่ทราบหรือไม่ทราบค่าเฉลี่ยหรือค่าแปรปรวนของประชากรก็ได้แต่ขนาดตัวอย่างต้องไม่เกิน 50 หน่วย

3.4.3 ค่าแปรปรวนของแต่ละตัวอย่างต้องเท่ากัน โดยจะทดสอบด้วย Levene's Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

3.5 ทดสอบการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (multiple Comparisons) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ละลักษณะพร้อมกันครั้งละหลาย ๆ คู่ของตัวอย่างชันโรงงานตามเส้นละติจูดโดยใช้วิธีของ Scheffe ซึ่งสามารถใช้กับกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดไม่เท่ากันได้ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ซึ่งจะนำค่าเฉลี่ยตัวอย่างมาเรียงลำดับจากน้อยไปมาก จากนั้นจัดกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน