

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง Material and Methods

3.1 อุปกรณ์

- Camera (Nikon, Japan)
- Freezer (Krungthai, Thailand)
- Incubator (Thermotek, Thailand)
- Incubater (WET binder, US)
- LKB Ultramicrotome Ultratome V (LKB, Sweeden)
- Light Microscope (Nikon, Japan)
- Microcentrifuge
- Microsyrinx 1 μ l (Varain, USA)
- Microsyrinx 10 μ l (Hewlett-packard, USA)
- Stereo Microscope (Nikon, Japan)
- Transmission Electron Microscope TEM (Phillip, Netherlands)
- Stereomicroscope (Nikon, Japan)
- Spectrophotometer (Shimadzu, Australia)
- Rotary microtome (Leica, Germany)
- Manetic sterer and magnetic bars (Heidolph, Germany)
- Microtome blades (Feather, Japan)
- Warmplate (Fisher, USA)
- Beakers 5, 25, 80, 125, 500 and 1,000 ml (Pyrex, Germany)
- Cuvets (VWR international)
- Capsules; Embedding, Size 00, 8 mm I.D (EMS, USA)
- Copper Grid 200 mesh (EMS, USA)
- Bee cages (80 x130x135 mm 3)
- Dissecting Scissors CV scissors, 4" (EMS, USA)
- Embedding Capsule Holder (EMS, USA)

- Eppendorf 1 ml
- Filter paper Whatmann No. 4 (Whatmann International Ltd., England)
- Forcep No. 4 INOX (Dumont & Fils, Switzerland)
- Glass Knife Boats (EMS, USA)
- Glass Knife Strips Size 6.4 mm × 25 mm × 400 mm (EMS, USA)
- Micropipette 10, 200 and 1,000 p (Gilson, France)
- Mixer Vortex Genies 2 (EMS, USA)
- Parafilm M and Dispenser (EMS, USA)
- Pasteur Pipettes
- Petri Dish (Pyrex, Germany)
- Pipette Tips 10, 200 and 1,000 μ l (Axygen-Hayward, USA)
- Sectioning set (Chiron Stainless, Germany)
- Specimen Forceps 4.5" (EMS, USA)
- Staining jars
- Test tube 12 × 75 mm²

3.2 สารเคมี

- Absolute Ethyl Alcohol (Merk, Germany)
- Dodecenyl Succinic Anhydride (Sigma Chemical Company, USA)
- DMP 30 (2, 4, 6 Tridimethyl Amionmethyl Phenol) (EMS, USA)
- Epon 812 (EMS, USA)
- Glutaraldehyde (Sigma Chemical Company, USA)
- Hydrochloric Acid (Merk, Germany)
- Lead Citrate (Sigma Chemical Company, USA)
- Methyl Nadic Anhydride (EMS, USA)
- Osmium Tetroxide, Crystalline, Highest Purity, 99.95% (EMS, USA)
- Paraformaldehyde, EM Grade, Purified (EMS, USA)
- Phosphotungstic acid (Fluka, Switzerland)
- Propylene Oxide, EM grade (EMS, USA)
- Sodiumborate (Fluka, Switzerland)
- Sodium Cacodylate (Sigma Chemical Company, USA)
- Sodium Hydroxide (Fluka, Switzerland)



- Methylene Blue (Fluka, Switzerland)
- Uranyl Acetate (Fluka, Switzerland)
- Activated charcoal
- Absoluted Ethyl Alcohol (J.T Baker, Malaysia)
- Basic Fuchsin (Labchem, Australia)
- Distilled water
- Formaldehyde Solution (Univar, Australis)
- Glacial Acetic Acid (Analar, England)
- Hydrochloric Acid (J.K Baker, USA)
- Light Green (Fluka, Switzerland)
- Picric Acid (Labchem, Australia)
- Periodic Acid (Merck Chemical,)
- Permout (Fisher Chemical, USA)
- Sodium Bisulfite
- Toluidine blue
- Xylene (Panreac, England)

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Specimens)

- แมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala*
- แมลงวันหัวเขียว *Chrysomya rufifacies*

3.4 สถานที่ศึกษา (Study site)

3.4.1 สถานที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ห้อง BS 3108-3110 ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี

3.4.2 สถานที่ทำการทดลองภาคสนาม

บริเวณภายในมหาวิทยาลัยบูรพา

3.5 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 การจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวระยะตัวเต็มวัยจากซากสัตว์ทดลอง วิธีปฏิบัติ

1. สุ่มเก็บตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวระยะตัวเต็มวัยขณะเข้าตอมซากสัตว์ทดลอง
2. โดยสุ่มเก็บแมลงวันหัวเขียวจำนวน 10 ตัว/ชนิด/ซากสัตว์ทดลอง

3. จำแนกชนิด (Identification) โดยใช้ key ของ Whitworth (2006)

3.5.2 การจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวระยะตัวหนอน

วิธีปฏิบัติ

1. นำแมลงวันหัวเขียวระยะตัวเต็มวัยที่เก็บจากซากศพสัตว์ทดลองในภาคสนาม
2. แยกชนิดและเพศ แล้วนำใส่กรงเลี้ยงพลาสติกขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12$ (gx ยx ส) cm^3 โดยสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 30: 30 ตัว/กรง
3. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 54 และน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. จากนั้นเลี้ยงด้วยน้ำดับหมูปดปริมาณ 10 กรัม/กรง เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อเตรียมพร้อมในการวางไข่
5. ใส่ดับหมูปดเฉลี่ย $5 \times 5 \times 1$ cm^3 น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม 12 ใส่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $8 \times 8 \times 4$ cm^3 ในกรงเลี้ยงเพื่อให้แมลงวันหัวเขียววางไข่
6. บันทึกเวลาที่แมลงวันหัวตัวแรกวางไข่ จำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้ง เวลาที่แมลงวันตัวสุดท้ายวางไข่ จำนวนไข่ที่วางทั้งหมดในแต่ละกรง
7. บันทึกอุณหภูมิทุก ๆ 1 ชั่วโมง และเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ได้จากสถานีอุตุนิยมวิทยาที่ใกล้เคียง ตลอดช่วงทำการทดลอง
8. แยกไข่จำนวน 50 ฟอง โดยใช้ฟู่กันขนละเอียดใส่ในดับหมูปดขนาด $10 \times 10 \times 2$ cm^3 ที่วางอยู่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $10 \times 10 \times 4$ cm^3
9. นำไปเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12$ (gx ยx ส) cm^3 ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกอุณหภูมิทุก 1 ชั่วโมง
10. ตรวจการเจริญเติบโตของไข่ทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งเข้าสู่ตัวหนอนระยะที่ 3 (third instars)
11. นำตัวหนอนระยะที่ 3 มาจำแนกชนิดโดยใช้กฎมาตรฐานของ Whitworth (2006) เพื่อเป็นการยืนยันร่วมกับการจำแนกด้วยตัวเต็มวัย

3.5.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมต่อขนาดและระยะเวลาการเจริญเติบโตของแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala*

การเตรียมตัวอย่างระยะไข่ของแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala*

- 1 นำไก่สดที่ทราบเวลาการตาย และทำให้เกิดบาดแผลข้างลำตัว ข้างละ 3 แผล วางบริเวณภาคสนามที่เป็นพื้นดินในที่ร่ม ที่มีแสงสว่างส่องประมาณ 4 ชั่วโมงต่อวัน ในกรงตาข่าย

ป้องกันสัตว์รบกวนขนาด $35 \times 30 \times 35 \text{ cm}^3$ บริเวณ ต. เหมือง อ. เมือง จ. ชลบุรี

2 รวบรวมกระดังแมลงวันหัวเขียวชนิด *C. magacephala* มาวางไข่ จนได้จำนวนเพียงพอต่อการศึกษา

3 ใช้ฟูกันเบอร์ 1 หรือ 2 เขี่ยไข่ จำนวน 100 ฟอง แล้วย้ายลงมาวางบนตลับหมึกน้ำหนัก 10 กรัม ที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด $4 \times 6 \times 1 \text{ cm}^3$ ที่วางอยู่ในกระทงที่ทำจากแผ่นอลูมิเนียม (Aluminum foil) ขนาด $4 \times 6 \times 1 \text{ cm}^3$ บันทึกเวลาที่แมลงวันหัวเขียววางไข่ ของทุก ๆ ครั้ง 14 บันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ ทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่วางไข่ จนได้จำนวน ตัวอย่างตามต้องการ

5 นำตัวอย่างไข่กลับไปศึกษาการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ

3.5.4 ผลของอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมต่อขนาดและระยะเวลาการเจริญระยะไข่ของแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala*

- นำไข่มาเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการโดยใช้อุณหภูมิสิ่งแวดล้อม และนำไข่ออกมาส่องภายใต้กล้องสเตอริโอ ทุก ๆ 1 ชั่วโมง
- เก็บไข่ของแมลงวันหัวเขียวประมาณ 4 – 5 ฟอง ทุก ๆ 1 ชั่วโมงใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่างที่มี Bouins' fluid solution ทิ้งไว้ 15 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็น 70 % ethanol ก่อนที่จะนำมาทำสไลด์ถาวร เพื่อนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Olympus CH30RF2 จนกระทั่งไข่ฟักออกเป็นตัวหนอนระยะที่ 1 (1^{st} instars)
- บันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ทุก ๆ 1 ชั่วโมง
- บันทึกเวลาที่เปลี่ยนระยะเป็นตัวหนอนระยะที่ 1
- ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.5.5 ผลของอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมต่อขนาดและระยะเวลาขนาดและระยะเวลาการเจริญ ของตัวหนอนระยะที่ 1 -2 ของแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala*

- นำตัวหนอนระยะที่ 1 จำนวน 150 ตัว วางลงบนตลับหมึกน้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม ขนาด $4 \times 6 \times 1 \text{ cm}^3$ ที่วางอยู่ในกระทงอลูมิเนียม ซึ่งอยู่ภายในกล่องพลาสติกขนาด $7.5 \times 10 \times 5.6 \text{ cm}^3$ และ เปลี่ยนตลับหมึกทุก ๆ 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (สิ่งแวดล้อม) โดยวัดอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ ทุก ๆ 1 ชั่วโมง
- นำตัวหนอนระยะดังกล่าวจำนวน 3 ตัว ออกมาศึกษาภายใต้กล้อง stereomicroscope ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบระยะการเจริญ จากนั้นนำตัวหนอนจุ่มลงในน้ำร้อน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วดองเก็บไว้ใน 75 % ethanol เพื่อนำไปวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบระยะการเจริญจนกระทั่งเข้าสู่ตัวหนอนระยะที่ 2

4. บันทึกเวลาที่เปลี่ยนระยะเป็นตัวหนอนระยะที่ 2
5. ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.5.6 ผลของอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมต่อขนาดและระยะเวลาการเจริญ ของตัวหนอนระยะที่ 2 -3 ของแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala*

1. เลี้ยงตัวหนอนด้วยตับหมูสดน้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม ขนาด $4 \times 6 \times 1 \text{ cm}^3$ เลี้ยงจนกระทั่งตัวหนอนเปลี่ยนจากระยะที่ 2 เป็นระยะที่ 3 โดยเปลี่ยนตับหมูสดทุก ๆ 24 ชั่วโมง
2. นำตัวหนอนระยะดังกล่าวจำนวน 3 ตัว ออกมาศึกษาภายใต้กล้อง stereomicroscope ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบระยะการเจริญ จากนั้นนำตัวหนอนจุ่มลงในน้ำร้อน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วดองเก็บไว้ใน 75 % ethanol เพื่อนำไปวัดขนาดด้วยไม้มบรรทัด
3. ตรวจสอบระยะการเจริญจนกระทั่งเข้าสู่ตัวหนอนระยะที่ 3
4. บันทึกเวลาที่เปลี่ยนระยะเป็นตัวหนอนระยะที่ 3
5. ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.5.7 ผลของอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมต่อขนาดและระยะเวลาการเจริญของตัวหนอนระยะที่ 3 ของแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala*

1. เลี้ยงตัวหนอนด้วยตับหมูสดน้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม ขนาด $4 \times 6 \times 1 \text{ cm}^3$ จนกระทั่งตัวหนอนระยะที่ 3 หยุดกินอาหาร
2. นำตัวหนอนระยะดังกล่าวจำนวน 3 ตัว ออกมาศึกษาภายใต้กล้อง stereomicroscope จากนั้นนำตัวหนอนจุ่มลงในน้ำร้อน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วดองเก็บไว้ใน 75 % ethanol เพื่อนำไปวัดขนาดด้วยไม้มบรรทัด

3.5.8 ผลของอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมต่อระยะเวลาการเจริญในระยะดักแด้ ของแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala*

1. เมื่อตัวหนอนหยุดกินอาหารแล้วให้เตรียมดินผสมซีลี้อย เพื่อให้ตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ โดยอัตราส่วนดินต่อซีลี้อย 80 : 20 และนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 90°C
2. ชั่งดินผสมซีลี้อยน้ำหนักเฉลี่ย 150 กรัม ผสมกับน้ำ พร้อมทั้งวัดค่า pH = 7 ความชื้นของดิน 70 % และ นำดินผสมซีลี้อยใส่กล่องพลาสติกขนาด $11.5 \times 11.5 \times 6.6 \text{ cm}^3$
3. นำตัวหนอนระยะที่ 3 ที่หยุดกินอาหารแล้วจำนวน 150 ตัว มาใส่ในกล่องที่มีดินผสมซีลี้อย
4. บันทึกเวลาที่ตัวหนอนระยะที่ 3 เปลี่ยนเข้าสู่ดักแด้ และเวลาที่ดักแด้ฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย พร้อมทั้งบันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ทุก 1 ชั่วโมง

3.5.9 การเลี้ยงแมลงวันหัวเขียว *C. magacephala* ที่อุณหภูมิสิ่งแวดล้อม

1. เมื่อแมลงวันฟักออกมาจากดักแด้แล้วให้เปลี่ยนไปเลี้ยงโดยใช้กล่องเลี้ยง (case) โดยให้ตัวเมียและตัวผู้และตัวเมียมีอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน (1:1)

2. แผลงวันหัวเขียว *C. magacephala* ในวันที่ 1 และวันที่ 2 ให้เลี้ยงด้วยน้ำตาลทรายก้อน และ น้ำตาลซูโครส 50 % และน้ำกลั่น
3. วันที่ 3 และ 4 เพิ่มอาหารโดยให้ตับบดประมาณ 2 กรัม
4. หลังจากวันที่ 4 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงจากตับบดเป็นตับหมูสดน้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม เพื่อให้ แผลงวันวางไข่

3. 5.10 ศึกษาช่วงเวลาการเจริญของระยะไข่ของแผลงวันหัวเขียวที่อุณหภูมิคงที่

1. เลี้ยงแผลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 30 ตัว แล้วนำไปใส่กรงเลี้ยงพลาสติก ขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12$ (gx ยx ส) cm^3
2. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 54 และน้ำ เป็น เวลา 24 ชั่วโมง
3. จากนั้นเลี้ยงด้วยน้ำตับหมูบดปริมาณ 10 กรัม/กรง เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อเตรียมพร้อมในการ วางไข่
4. ใส่ตับหมูขนาดเฉลี่ย $5 \times 5 \times 1$ cm^3 น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม 12 ใส่ในกระถงที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $8 \times 8 \times 4$ cm^3 ในกรงเลี้ยงเพื่อให้แผลงวันหัวเขียววางไข่
5. บันทึกเวลาที่แผลงวันหัวตัวแรกวางไข่ จำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้ง เวลาที่แผลงวันตัวสุดท้าย วางไข่ จำนวนไข่ที่วางทั้งหมดในแต่ละกรง
6. แยกไข่จำนวน 50 ฟอง โดยใช้พู่กันขนละเอียดใส่ในตับหมูสดขนาด $10 \times 10 \times 2$ cm^3 ที่วางอยู่ในกระถงที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $10 \times 10 \times 4$ cm^3
7. นำไปเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12$ (gx ยx ส) cm^3 ที่อุณหภูมิ 20 20 22 25 27 30 32 35 37 และ 40°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่ $50 \pm 5\%$ ให้ แสง L: D เป็น 12: 12 ชั่วโมง
8. ตรวจการเจริญเติบโตของไข่ทุก ๆ 1 ชั่วโมง บันทึกเวลาที่ไข่เปลี่ยนระยะเป็นตัวหนอนระยะที่ 1 (first instars) และจำนวนตัวหนอนที่เปลี่ยนแต่ละระยะ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะ ภายใต้อุปกรณ์ Stereo microscope และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
9. เปลี่ยนตับหมูสดทุกวันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง
10. ทำเช่นเดียวกันในชนิดอื่น ๆ และชนิดละ 3 ซ้ำ

3.5.11 ศึกษาช่วงเวลาการเจริญของระยะตัวหนอนระยะที่ 1 ถึง 2 ของแผลงวันหัวเขียวที่ อุณหภูมิคงที่

1. เลี้ยงแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 30 ตัว แล้วนำใส่กรงเลี้ยงพลาสติก ขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12$ (gx yx ส) cm^3
2. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 54 และน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. จากนั้นเลี้ยงด้วยน้ำดับหมูปดปริมาณ 10 กรัม/กรง เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อเตรียมพร้อมในการวางไข่
4. ใส่ดับหมูขนาดเฉลี่ย $5 \times 5 \times 1$ cm^3 น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม 12 ใส่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $8 \times 8 \times 4$ cm^3 ในกรงเลี้ยงเพื่อให้แมลงวันหัวเขียววางไข่
5. บันทึกเวลาที่แมลงวันหัวตัวแรกวางไข่ จำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้ง เวลาที่แมลงวันตัวสุดท้ายวางไข่ จำนวนไข่ที่วางทั้งหมดในแต่ละกรง
6. แยกไข่จำนวน 50 ฟอง โดยใช้ฟู่กันขนละเอียดใส่ในดับหมูสดขนาด $10 \times 10 \times 2$ cm^3 ที่วางอยู่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $10 \times 10 \times 4$ cm^3
7. นำไปเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12$ (gx yx ส) cm^3 ที่อุณหภูมิ 20 22 25 27 30 32 35 37 และ 40°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่ $50 \pm 5\%$ ให้แสง L:D เป็น 12: 12 ชั่วโมง
8. ตรวจการเจริญเติบโตของไข่โดยใช้เวลาที่ใกล้เคียงกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองตอนที่ 13.3 จนกระทั่งไข่เปลี่ยนระยะเป็นตัวหนอนระยะที่ 1 (first instars)
9. ตรวจระยะการเจริญของตัวหนอนระยะที่ 1 ทุก ๆ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งเปลี่ยนเข้าสู่ระยะที่ 2 (second instars) บันทึกช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญเปลี่ยนระยะ และจำนวนตัวหนอนที่เปลี่ยนระยะ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะและวัดขนาดภายใต้กล้อง Stereo microscope
10. เปลี่ยนดับหมูสดทุกวันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง
11. ทำเช่นเดียวกันในชนิดอื่น ๆ และชนิดละ 3 ซ้ำ

3.5.12 ศึกษาช่วงเวลาการเจริญของระยะตัวหนอนระยะที่ 2 ถึง 3 ของแมลงวันหัวเขียวที่อุณหภูมิคงที่

1. เลี้ยงแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 30 ตัว แล้วนำใส่กรงเลี้ยงพลาสติก ขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12$ (gx yx ส) cm^3
2. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 54 และน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. จากนั้นเลี้ยงด้วยน้ำดับหมูปดปริมาณ 10 กรัม/กรง เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อเตรียมพร้อมในการวางไข่

4. ใส่ดัดหมูขนาดเฉลี่ย $5 \times 5 \times 1 \text{ cm}^3$ น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม 12 ใส่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $8 \times 8 \times 4 \text{ cm}^3$ ในกรงเลี้ยงเพื่อให้แมลงวันหัวเขียววางไข่
5. บันทึกเวลาที่แมลงวันหัวตัวแรกวางไข่ จำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้ง เวลาที่แมลงวันตัวสุดท้ายวางไข่ จำนวนไข่ที่วางทั้งหมดในแต่ละกรง
6. แยกไข่จำนวน 50 ฟอง โดยใช้ฟุ้งกันชนละเอียดใส่ในดัดหมูขนาด $10 \times 10 \times 2 \text{ cm}^3$ ที่วางอยู่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $10 \times 10 \times 4 \text{ cm}^3$
7. นำไปเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12 \text{ (gx yx ส) cm}^3$ ที่อุณหภูมิ 20 22 25 27 30 32 35 37 และ 40°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่ $50 \pm 5\%$ ให้แสง L: D เป็น 12: 12 ชั่วโมง
8. ตรวจการเจริญเติบโตของไข่โดยใช้เวลาที่ใกล้เคียงกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองตอนที่ 13.4 จนกระทั่งตัวหนอนระยะที่ 1 (first instars) เปลี่ยนเป็นระยะที่ 2 (second instars)
9. ตรวจระยะการเจริญของตัวหนอนระยะที่ 2 ทุก ๆ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งเปลี่ยนเข้าสู่ระยะที่ 3 (third instars) บันทึกช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญเปลี่ยนระยะ และจำนวนตัวหนอนที่เปลี่ยนระยะ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะและวัดขนาดภายใต้กล้อง Stereo microscope
10. เปลี่ยนดัดหมูสดทุกวันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง
11. ทำเช่นเดียวกันในชนิดอื่น ๆ และชนิดละ 3 ซ้ำ

3.5.13 ศึกษาช่วงเวลาการเจริญของระยะตัวหนอนระยะที่ 3 เป็นระยะดักแด้ของแมลงวันหัวเขียวที่อุณหภูมิคงที่

1. เลี้ยงแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 30 ตัว แล้วนำไปใส่กรงเลี้ยงพลาสติกขนาด $13.3 \times 13.5 \times 12 \text{ (gx yx ส) cm}^3$
2. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 54 และน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. จากนั้นเลี้ยงด้วยน้ำดัดหมูสดปริมาณ 10 กรัม/กรง เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อเตรียมพร้อมในการวางไข่
4. ใส่ดัดหมูขนาดเฉลี่ย $5 \times 5 \times 1 \text{ cm}^3$ น้ำหนักเฉลี่ย 10 กรัม 12 ใส่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $8 \times 8 \times 4 \text{ cm}^3$ ในกรงเลี้ยงเพื่อให้แมลงวันหัวเขียววางไข่
5. บันทึกเวลาที่แมลงวันหัวตัวแรกวางไข่ จำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้ง เวลาที่แมลงวันตัวสุดท้ายวางไข่ จำนวนไข่ที่วางทั้งหมดในแต่ละกรง
6. แยกไข่จำนวน 50 ฟอง โดยใช้ฟุ้งกันชนละเอียดใส่ในดัดหมูขนาด $10 \times 10 \times 2 \text{ cm}^3$ ที่วางอยู่ในกระถางที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด $10 \times 10 \times 4 \text{ cm}^3$

7. นำไปเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด 13.3x13.5x12 (gx yx ส) cm³ ที่อุณหภูมิ 20 22 25 27 30 32 35 37 และ 40°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่ 50±5% ให้แสง L: D เป็น 12: 12 ชั่วโมง
8. ตรวจการเจริญเติบโตของไขโดยใช้เวลาที่ใกล้เคียงกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองตอนที่ 13.5 จนกระทั่งตัวหนอนระยะเข้าสู่ระยะที่ 3 (third instars)
9. นำตัวหนอนระยะที่ 3 ใส่ในดรัมหมุดขนาด 10x10x2 cm³ ที่วางอยู่ในกระทงที่ทำด้วยแผ่นอลูมิเนียมขนาด 10x10x4 cm³ ที่วางบนส่วนผสมระหว่างขี้เลื่อยและดินร่วนอบแห้งแล้วปรับความชื้นในดินให้ได้ 50% (โดยใช้ soil tester) สัดส่วน 1:1 น้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัม บรรจุในกล่องพลาสติกขนาด 15x10x8.5 cm³ โดยฝาด้านบนดัดแปลงเป็นตาข่ายระบายอากาศ นำกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิ 20 22 25 27 30 32 35 37 และ 40°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่ 50±5% ให้แสง L: D เป็น 12: 12 ชั่วโมง
10. ตรวจระยะการเจริญของตัวหนอนระยะที่ 3 ทุก ๆ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งเปลี่ยนเข้าสู่ระยะหยุดกินอาหาร (post feeding larvae) บันทึกช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญเปลี่ยนระยะ และจำนวนตัวหนอนที่เปลี่ยนระยะ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะและวัดขนาดภายใต้กล้อง Stereo microscope
11. เปลี่ยนดรัมหมุดทุกวันจนกระทั่งเข้าสู่ระยะหยุดกินอาหาร (post feeding larvae)
12. บันทึกจำนวนตัวหนอนที่เริ่มมีพฤติกรรมเคลื่อนย้าย (wandering stage larvae) ออกจากดรัมหมุดเพื่อมุดลงดินผสมขี้เลื่อยเพื่อซ่อนตัวเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ (pupation)
13. ทำเช่นเดียวกันในชนิดอื่น ๆ และชนิดละ 3 ซ้ำ

3.5.14 ศึกษาช่วงเวลาการเจริญของระยะดักแด้เป็นตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียวที่อุณหภูมิคงที่

1. ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 13.6 (ข้อ 1-12)
2. บันทึกเวลาเมื่อดักแด้ฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย จำนวน เพศ
3. ทำเช่นเดียวกันในชนิดอื่น ๆ และชนิดละ 3 ซ้ำ

3.5.15 ศึกษาช่วงเวลาการเจริญของระยะไข่ ตัวหนอนระยะที่ 1 ถึง 3 ระยะดักแด้และตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียวที่อุณหภูมิสิ่งแวดล้อมภาคสนาม

1. วางไข่ตายที่ทราบเวลาการตาย น้ำหนักเฉลี่ย 2 กิโลกรัม ทำให้เกิดบาดแผล จำนวน 10 แผล บริเวณด้านข้างลำตัวข้าง ๆ ละ 5 แผล โดยใช้มีด โดยมีกรงไม้ทำเป็นตาข่ายด้วยลวด ขนาด 45x30x30 cm³
2. วางซากสัตว์ทดลอง 2 บริเวณ คือ ในที่ร่มและกลางแจ้ง โดยทำ อย่างละ 3 ซ้ำ

3. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ให้สารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 54 และน้ำ 24 ชั่วโมง
 4. บันทึกเวลาที่แมลงวันหัวตัวแรกวางไข่ จำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้ง เวลาที่แมลงวันตัวสุดท้ายวางไข่ จำนวนไข่ที่วางทั้งหมดในแต่ละกรง
 5. นำไข่ออกจากซากสัตว์ทดลองเพื่อตรวจการเจริญเติบโตทุก ๆ 1 ชั่วโมง บันทึกเวลาที่ไข่เปลี่ยนระยะเป็นตัวหนอนระยะที่ 1 (first instars) โดยทำครั้งละ 10 ฟอง โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะและวัดขนาดภายใต้กล้อง Stereo microscope
 6. ตรวจระยะการเจริญเติบโตจากตัวหนอนระยะที่ 1 (first instars) ทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยทำครั้งละ 10 ตัว โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะและวัดขนาดภายใต้กล้อง Stereo microscope บันทึกช่วงเวลาในตัวหนอนเปลี่ยนเป็นระยะที่ 2
 7. ตรวจระยะการเจริญเติบโตจากตัวหนอนระยะที่ 2 (first instars) ทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยทำครั้งละ 10 ตัว โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะภายใต้กล้อง Stereo microscope บันทึกช่วงเวลาในตัวหนอนเปลี่ยนเป็นระยะที่ 3
 8. ตรวจระยะการเจริญเติบโตจากตัวหนอนระยะที่ 3 (first instars) ทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งกลายเป็นระยะหยุดกินอาหาร (post feeding larvae) โดยทำครั้งละ 10 ตัว โดยตรวจสอบการเปลี่ยนระยะและวัดขนาดภายใต้กล้อง Stereo microscope บันทึกช่วงเวลาในตัวหนอนเปลี่ยนเป็นระยะดักแด้
 9. บันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศทุกวันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง นำไปเปรียบเทียบกับสถานีอากาศที่ใกล้เคียงที่สุด
 10. ทำเช่นเดียวกันในชนิดอื่น ๆ และชนิดละ 3 ซ้ำ
- *หมายเหตุวิธีการทั้งหมดข้างต้นสำหรับการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี
- สำหรับรายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1 ได้ทำการศึกษา การเจริญเติบโตของแมลงวันหัวเขียว 2 ชนิด ข้างต้นที่อุณหภูมิคงที่ 27 และ 30 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิสิ่งแวดล้อม