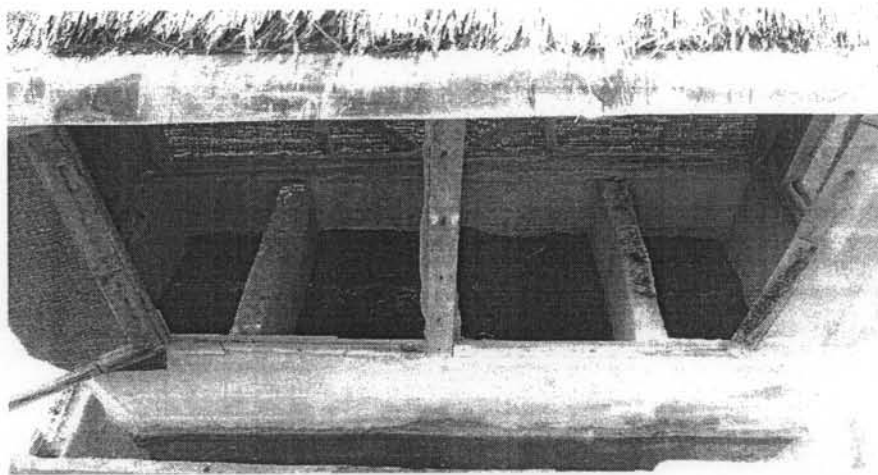


บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเลี้ยงแมลง

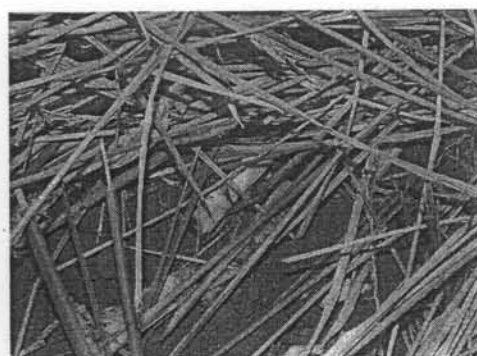
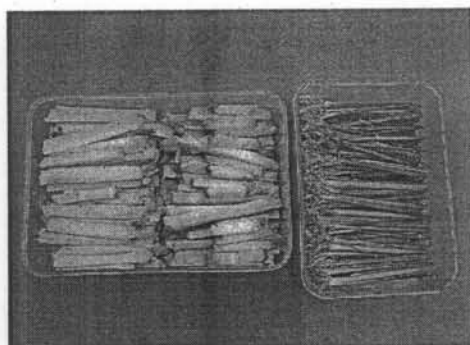
1.1 สร้างกรงเลี้ยงแมลง ให้มีขนาดใหญ่พอสมควร สำหรับการออกบินเพื่อผสมพันธุ์ของแมลง โดยมีขนาด กว้าง ยาว และสูงประมาณ 1, 2.5 และ 1.5 เมตร ตามลำดับ ทำหลังคาถักฉนวนด้วยพลาสติกแข็งใส (mylar) แล้วใช้หุ้ญาคาคลุมทับบนพลาสติกแข็งใสอีกครั้งเพื่อให้เกิดร่มเงาและป้องกันความร้อนจากแสงอาทิตย์ ส่วนด้านข้างกรงเลี้ยงแมลงบุด้วยมุ้งลวดอย่างมิดชิดเพื่อป้องกันการหลุดรอดออกไปของแมลงและช่วยระบายอากาศ โครงสร้างด้านล่างของกรงทำพื้นด้วยปูนซีเมนต์ ภายในกรงแบ่งออกเป็น 2 ช่องใหญ่สำหรับด้วงดำแต่ละชนิด มีมุ้งลวดกั้นระหว่าง 2 ช่องใหญ่และด้านหน้าของแต่ละช่องมีบานประตู แยกเป็นอิสระระหว่างด้วงดำแต่ละชนิด แล้วในแต่ละช่องใหญ่ยังแบ่งครึ่งเป็นช่องเล็กอีก 2 ช่อง (แสดงในภาพที่ 7) ส่วนแรกสำหรับให้แมลงวางไข่ เพื่อเพิ่มจำนวน ส่วนที่สองเลี้ยงแมลงที่จะนำมาศึกษา หรือทดลองต่างๆ



ภาพที่ 7 กรงที่ใช้เลี้ยงด้วงดำ

1.2 ผสมดินให้มีความชื้นประมาณ 25 – 40 เปอร์เซ็นต์ แล้วเทดินให้มีความลึกประมาณ 10 – 20 เซนติเมตร ใส่ลงในแต่ละช่องของกรง ทำการปล่อยแมลง จากนั้นให้อาหารแมลงด้วยท่อนอ้อยที่ผ่าเป็นชิ้นเล็กๆ ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร และต้นข้าวตัดส่วนใบออก (แสดงในภาพที่ 8) โดยทุกครั้งที่ให้อาหารแมลงได้พรมน้ำบนดินเพื่อรักษาระดับความชุ่มชื้นในดิน นำเศษฟางข้าว

คลุมผิวดินเพื่อรักษาระดับความชื้นในดินและช่วยลดแรงกระแทกจากละอองน้ำที่ฉีดลงบนดิน ทั้งนี้เป็นการชะลอการอัดตัวแน่นของดิน เพราะหากดินแน่นเกินไปจะมีผลต่อการดำรงชีวิตของแมลง นอกจากนี้ยังเป็นการป้องกันแสงแดดที่กระทบผิวดินโดยตรง ซึ่งได้พยายามปรับสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับชีวิต ความเป็นอยู่ตามธรรมชาติของด้วงดำ ที่อาศัยอยู่ในดินได้พงหญ้าตามคันนาหรือข้างคันนาที่มีดินไม่ใหญ่ให้ร่มเงา

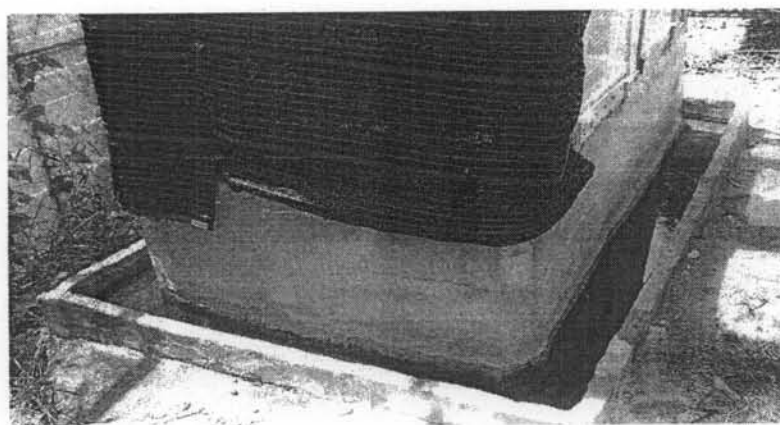


ภาพที่ 8 ก. การเตรียมท่อนอ้อยและดินข้าวสำหรับเลี้ยงด้วงดำ

ข

ข. สภาพในกรงที่ใช้เศษฟางข้าวคลุมผิวดิน

1.3 ทำร่อนน้ำรอบกรงเลี้ยงแมลงที่มีความกว้างและลึกประมาณ 10 และ 5 เซนติเมตร ตามลำดับเพื่อป้องกันการถูกรบกวนจากมดหรือแมลงชนิดอื่นๆ และใช้พลาสติกพรางแสง 75 % เพื่อป้องกันความร้อนทางด้านทิศตะวันตกของกรงเลี้ยงแมลง แสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ร่อนน้ำรอบกรงเลี้ยงด้วงดำเพื่อป้องกันการถูกรบกวนจากมด และผ้าพลาสติกพรางแสง 75 % ทางด้านทิศตะวันตกป้องกันความร้อน

2. ศึกษาวงจรชีวิต

การศึกษาวงจรชีวิต ใช้ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียของด้วงค้ำทั้ง 2 ชนิดๆ ละ 20 คู่ ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 10 ซ้ำ

2.1 เตรียมดินใส่ถ้วยพลาสติกความสูงประมาณ 12 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 8.4 เซนติเมตรจำนวน 100 ถ้วย 20 ถ้วยแรก ปลอ่ยตัวเต็มวัยด้วงค้ำถ้วยละ 1 คู่ โดยเริ่มปลอ่ยดินเดือนกันยายน พร้อมทั้งให้อาหารอย่างเพียงพอเพียงตลอดการทดลองจนกว่าแมลงจะตาย

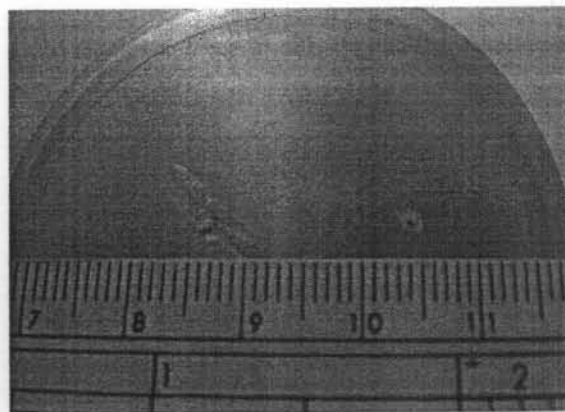
2.2 ทำการตรวจดูการวางไข่ของแมลงทุก 3 วัน พร้อมกับย้ายตัวเต็มวัยที่วางไข่แล้วใส่ในดินถ้วยใหม่ ถ้าพบแมลงวางไข่ให้ทำการนับไข่พร้อมกับเปลี่ยนดินทุก 72 ชั่วโมง

2.3 บันทึกเวลาของการวางไข่ แล้วนำไข่ของแมลงใส่ในถ้วยพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 เซนติเมตร และสูง 5 เซนติเมตร นำดินจากทุ่งกุลาร้องไห้ใส่ไว้ในถ้วยแล้ว ใส่ไข่แมลง 1 ฟองต่อถ้วย (ภาพที่ 10, ก) ปิดปากถ้วยด้วยฝาพลาสติกที่มีรูระบายอากาศขนาดเล็ก 2 รู (ภาพที่ 10, ข) แล้วมาเก็บไว้ในอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส

2.4 จากนั้นสังเกตไข่ที่กำลังฟักออกเป็นตัวหนอนทุก 24 ชั่วโมง และเมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนได้ 48 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนใส่ถ้วยที่ใส่ดินใหม่ เพื่อให้แมลงมีอาหารที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติตลอดเวลาการทดลอง



ก



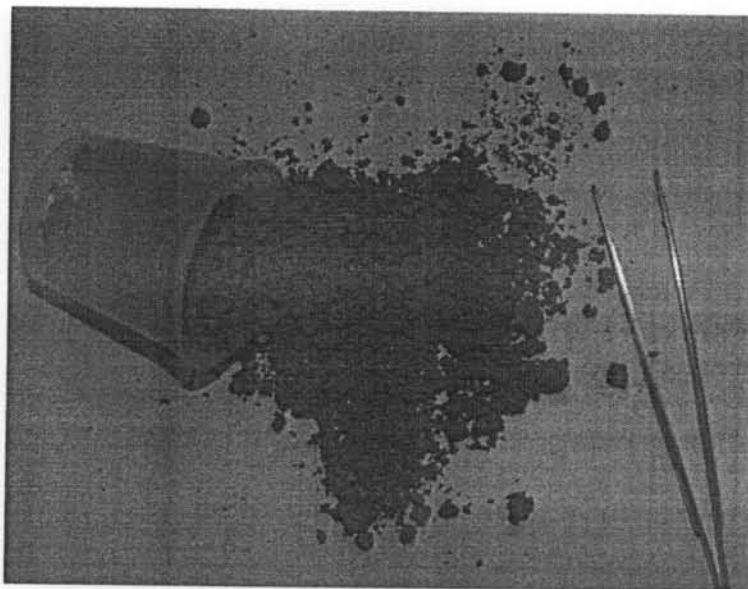
ข

ภาพที่ 10 ก. ไข่ของด้วงค้ำในถ้วยพลาสติก เพื่อศึกษาวงจรชีวิต

ข. ฝาถ้วยพลาสติกเจาะ 2 รู เพื่อระบายอากาศ

2.5 สังเกตการเปลี่ยนวัยของตัวอ่อนวัย 1 ทุก 72 ชั่วโมง โดยการเทดินที่ตัวหนอนออกจากถ้วยพลาสติก เบาๆ เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนต่อแมลง (ภาพที่ 11) และหลังจากหนอนเปลี่ยนเป็นวัย 2 เว้นระยะ 4 – 5 วัน ต่อการตรวจการเปลี่ยนวัยแต่ละครั้ง เพื่อลดการรบกวนแมลง

2.6 ถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาการเจริญเติบโตทุกระยะตัวหนอน ดักแด้ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย



ภาพที่ 11 ศึกษาการเปลี่ยนวัยของตัวหนอน โดยการเทดินออกจากถ้วยพลาสติก

3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลง

3.1 การศึกษารูปร่างลักษณะภายนอก โดยนำไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของด้วงดำ ทั้ง 2 ชนิด ทั้งเพศเมียและผู้มาวัดขนาดความกว้าง ความยาว และระยะห่างของลำตัวส่วนต่างๆ รวมทั้งศึกษารายละเอียดของรูปร่างลักษณะต่างๆ ของแมลงภายใต้กล้อง stereoscope วาดภาพด้วยดินสอ และถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายรูป ให้ครบทุกระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาการของแมลง

3.2 นำตัวเต็มวัยของแมลงทั้ง 2 ชนิด ทั้งเพศเมียและผู้ มาศึกษาข้อมูลเบื้องต้นทางสัณฐานวิทยา โดยการใช้ชุดผ้าตัดแมลงแบ่งแยกอวัยวะ ออกเป็นส่วนๆ โดยใช้กล้อง stereoscope ศึกษา รายละเอียด แล้วนำมาถ่ายรูป และวาดภาพ

3.3 ใช้เครื่องมือผ้าตัด ทำการผ่าตัดตัวเต็มวัยของแมลงทั้ง 2 ชนิด ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เพื่อศึกษาโครงสร้างกายวิภาควิทยาภายในของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยเฉพาะอวัยวะสืบพันธุ์ โดยใช้กล้อง Stereo micro scope ศึกษา รายละเอียด และวาดภาพ

4. ศึกษาระดับความชื้นในดินและระดับความลึกจากผิวดินที่ด้วงค้ำยอยู่อาศัย

การเตรียมดินระดับความชื้นต่าง ๆ

1. นำดินที่เก็บมาจากทุ่งกุลาร้องไห้บรรจุลงในถุงกระดาษ นำเข้าอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 °C นำดินออกมาชั่งน้ำหนักทุก 48 ชั่วโมง เมื่อดินมีน้ำหนักคงที่แสดงว่าดินมีระดับความชื้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์

2. นำน้ำใส่ภาชนะที่สามารถวัดปริมาตรได้ แล้วเทลงในดินที่อบแล้ว หรือดินที่มีความชื้น 0 เปอร์เซ็นต์ คลุกดินให้เข้ากันหรือให้มีความชื้นสม่ำเสมอพร้อมกับใช้ถุงมือบีบดินในขณะที่กำลังคลุกดิน หากดินเริ่มอืดตัวด้วยน้ำแต่ยังสามารถปั้นดินเป็นก้อนได้ โดยที่ไม่มีน้ำซึมออกมาตามร่องนิ้ว แสดงว่าดินมีความชื้น 100 เปอร์เซ็นต์

3. การเตรียมดินที่ระดับความชื้นต่าง ๆ สามารถทำได้ดังนี้ : สมมติว่า ดินที่มีความชื้น 0 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนัก 5 กิโลกรัม หลังจากผสมกับน้ำจนดินมีความชื้น 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้น้ำปริมาตร 150 มิลลิลิตร เมื่อต้องการดินเตรียมดินให้มีระดับความชื้น 25, 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ให้คำนวณจากปริมาตรน้ำ 150 มิลลิลิตร เนื่องจากดินที่มีความชื้นและน้ำหนักเท่าเดิม เช่น ต้องการดินเตรียมดินให้มีระดับความชื้น 25 เปอร์เซ็นต์

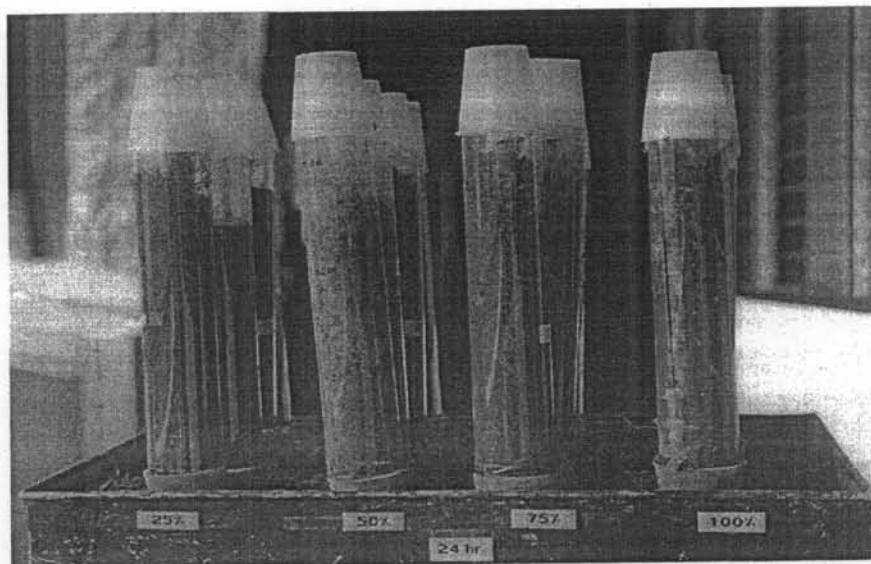
$$\text{ระดับความชื้น 25 เปอร์เซ็นต์ : } \frac{25 \text{ เปอร์เซ็นต์} \times 150 \text{ มิลลิลิตร}}{100 \text{ เปอร์เซ็นต์}} = 37.5 \text{ มิลลิลิตร}$$

4.1 ทดลองในสภาพบังคับ (No Choice Test)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 กรรมวิธีฯ ละ 4 ซ้ำ โดยทั้ง 4 กรรมวิธี ได้แก่ ระดับความชื้น 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.1.1 นำพลาสติกแข็งใส (mylar) ทำเป็นกระบอกกลมที่มีความสูง 40 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-6 เซนติเมตร ครอบลงบนดินที่มีระดับความชื้นต่างๆ แล้วทำเครื่องหมายระดับความสูงบนกระบอกด้วยปากกาเคมี แบ่งออกเป็น 3 ช่วงๆ ละ 10 เซนติเมตร และเจาะรูด้านบนบริเวณ 10 เซนติเมตรแรกเพื่อเป็นที่ระบายอากาศ แล้วจึงเริ่มทำเครื่องหมายจาก 10 เซนติเมตรต่อมา เตรียมทั้งหมด 48 กระบอก (จาก 4 กรรมวิธีฯ ละ 4 ซ้ำ และสำหรับการบันทึกผลที่ 3 เวลา)

4.1.2 เตรียมท่อนอ้อยขนาดยาว 30 เซนติเมตร ใส่ลงในกระบอกพลาสติกแข็งใส (mylar) ที่เตรียมไว้ทุกกระบอกเพื่อเป็นอาหารของด้วง จากนั้นผสมดินให้ได้ระดับความชื้นตามกรรมวิธีแล้ว เทดินใส่ในกระบอกต่างๆ ตามแผนการทดลอง ให้ระดับดินเท่ากับ 30 เซนติเมตรซึ่งเท่ากับขนาดความยาวของท่อนอ้อยโดยพยายามจัดให้ท่อนอ้อยอยู่ตรงกึ่งกลางกระบอก



ภาพที่ 12 สภาพบังคับที่ให้ด้วงดำอยู่ในดินที่มีความชื้น 25, 50, 75 และ 100 %

(การที่กำหนดให้ท่อนอ้อยมีขนาดยาวเท่ากับความลึกของดิน เพื่อให้ด้วงดำมีอาหารกินในทุกระดับความลึก) แล้วแยกออกเป็นชุดตามเวลาและทำเครื่องหมายกำกับไว้

4.1.3 ปล่อดังดำลงไปใกระบอบๆ ละ 10 ตัว แล้วปิดด้านบนด้วยถ้วยพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้ด้วงดำออกจากกระบอบ ดังภาพที่ 12

4.1.4 เมื่อครบกำหนดเวลา นำกระบอบวางลงในแนวราบแล้วผ่าทางด้านข้างไปตามยาวตรงบริเวณตะเข็บที่ยึดติดกัน ทำการบันทึกผลโดยนับจำนวนด้วงดำที่อาศัยในแต่ละช่วงระดับความลึกของดินที่มีระดับความชื้นแตกต่างกัน

4.2 ทดลองสภาพที่ให้เลือกได้ (Choice Test)

โดยนำดินที่มีระดับความชื้นต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ใส่ไว้ในกล่องเดียวกัน เพื่อศึกษารายละเอียดและแสดงความชัดเจนเพิ่มเติมจากทดลองในสภาพบังคับ เพื่อศึกษาระดับความชื้นในดินที่ด้วงดำชอบและไม่ชอบได้ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ

4.2.1 นำกล่องพลาสติกใสขนาดกว้าง ยาวและสูง 19, 28 และ 10 เซนติเมตร ตามลำดับจำนวน 4 กล่อง แบ่งภายในแต่ละกล่องออกเป็น 4 ช่อง โดยใช้กระดาษกั้นระหว่างช่องใส่ดินที่มีระดับความชื้นต่างๆ เช่นเดียวกับในสภาพบังคับ

4.2.2 เตรียมดิน โดยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน แต่ละส่วนให้มีระดับความชื้น 25, 50, 75 และ 100เปอร์เซ็นต์ แล้วนำดินใส่ในช่องของกล่องพลาสติกที่ได้สุ่มและทำเครื่องหมายระดับความชื้นไว้แล้ว

4.2.3 ปักท่อนอ้อยเพื่อเป็นอาหารของด้วงลงไปดินช่องละ 2 ท่อน ดังภาพที่ 13 แล้วดึงกระดาษที่คั่นระหว่างดินออกพร้อมกับปล่อยด้วงดำลงไปกล่องละ 40 ตัว ทันที (การให้อาหารที่ไม่เพียงพอ เป็นการกระตุ้นให้แมลงมีการเคลื่อนย้าย)

4.2.4 หลังจากปล่อยแมลงผ่านไป 48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการนับจำนวนของแมลงที่อยู่ในดินแต่ละระดับความชื้น (การที่กำหนดเวลา 48 ชั่วโมง เพราะที่เวลา 24 ชั่วโมงแมลงอาจจะยังไม่มีการเคลื่อนย้ายตามระดับความชื้นที่แมลงชอบ และหากเวลาผ่านไปเกินกว่า 48 ชั่วโมง ความชื้นในดินมีการเปลี่ยนแปลงมากจากการซึมผ่านระหว่างดินที่มีความชื้นแตกต่างกันที่เชื่อมติดกัน พร้อมกับการระเหยของน้ำออกสู่ภายนอก)



ภาพที่ 13 สภาพลักษณะความชื้นของดิน 25, 50, 75 และ 100 % พร้อมพืชอาหารที่ให้ด้วงดำเลือก (4 ชั่วโมง)