

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัตถุประสงค์

- 1.1 เพื่อศึกษาชนิด ความหลากหลายชนิด และการแพร่กระจายของริ้น *Culicoides* spp.
- 1.2 เพื่อศึกษาปริมาณและความชุกชุมของริ้น *Culicoides* spp.
- 1.3 เพื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาริ้นชนิดที่เด่นและเป็นปัญหาหาระบาดในพื้นที่
- 1.4 เพื่อเปรียบเทียบลักษณะอนุกรมวิธานของริ้นที่พบทั้งหมด

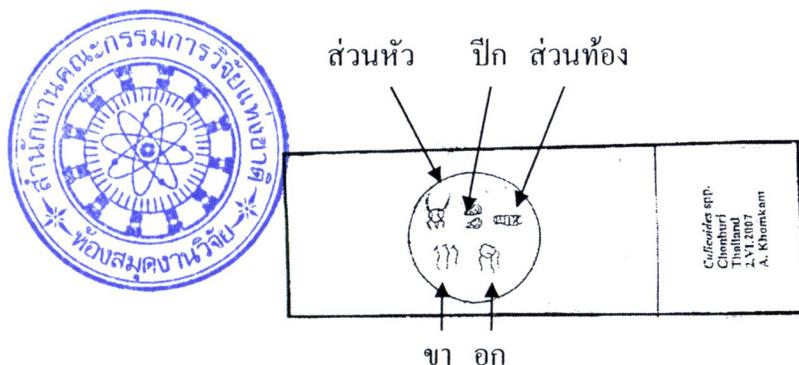
2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. CDC light trap
2. Animal baited trap
3. ขวดเก็บตัวอย่าง
4. Ethanol 70%
5. น้ำยาทำสไลด์ถาวร
6. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
7. กล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. วางกับดัก CDC light trap และเข่าวัว เพื่อเป็นโฮสต์ ในการทำกับดักแบบ Animal baited trap ตามภาพที่ 3.4 วางกับดักทั้งสองแบบ ในบริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่าง ในช่วงหัวค่ำ และเก็บกับดักในช่วงเช้า
2. ช่วงเช้า เก็บกับดัก CDC light trap นำแมลงทั้งหมด นำแมลงต่างๆ โดยนำไปใส่ในช่องเย็น และเก็บริ้นที่คูดกินเลือดวัว ที่เกาะพักตามผนังมุ้ง ช่วงเช้าตรู่ ประมาณ 5.00 น. โดยใช้ aspirator ดูริ้น เก็บตัวอย่างที่ได้ทั้งหมด ในขวด vial หรือขวดเก็บตัวอย่างที่บรรจุ Ethanol 70%
3. นำริ้นที่ได้ มานับจำนวน แบ่งชนิด ใต้กล้องสเตอริโอ และแยกริ้นตัวผู้ไว้ต่างหาก
4. ทำสไลด์ แยกส่วนหัว ส่วนท้อง และปีก ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แสดงการจัดวางส่วนต่างๆ ของรีนน้ำเค็ม โดยการแยกส่วนหัว ปีก ส่วนอก ส่วนท้อง และขา จัดเรียงเพื่อง่ายต่อการจำแนกชนิด โดยเฉพาะปีก *Culicoides* ต้องกางให้สมบูรณ์ ไม่ซ้อนทับกัน (อรุณรัตน์ และสมนึก, 2552)

ลักษณะอนุกรมวิธานที่ใช้ในการจำแนกชนิดรีน *Culicoides* spp.

ลักษณะภายนอกได้แก่

ส่วนหัว (Head)

- **หนวด (antennae)** สามารถแยกเพศผู้และเพศเมีย โดยเพศผู้มีหนวดแบบ plumose เพศเมียมีหนวดแบบ pilose
- **ตา (eye)** คุณลักษณะของตาว่าชิดกัน (holoptic) คือเพศผู้ หรือห่างกัน (dioptic) คือเพศเมีย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด
- **รยางค์ปาก (palps)** ตรวจสอบรูปร่าง ขนาดของปล้อง และตรวจหาอวัยวะรับความรู้สึก สัมผัสตำแหน่งที่ตั้ง
- **กราม (mandible)** ตรวจสอบรูปร่าง ขนาด และจำนวนของ mandibular teeth

ส่วนอก (Thorax) และส่วนท้อง (Abdomen)

- **ปีก (wings)** ตรวจสอบ pattern ของจุดต่างๆ บนปีก ตำแหน่งของ pale spot, dark spot เส้นปีก ความยาวของ costa สีหรือ marking บนปีก ดูความหนาแน่นของ macrotrichia และ macrotrichia บนปีก คู่มือของ halteres
- **ขา (legs)** ตรวจสอบรูปร่าง สีของขา จำนวน spines ที่ hind tibial comb
- **ส่วนอก (thorax)** ตรวจสอบรูปร่าง สี และ marking บนอก

ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน (Internal Morphology)

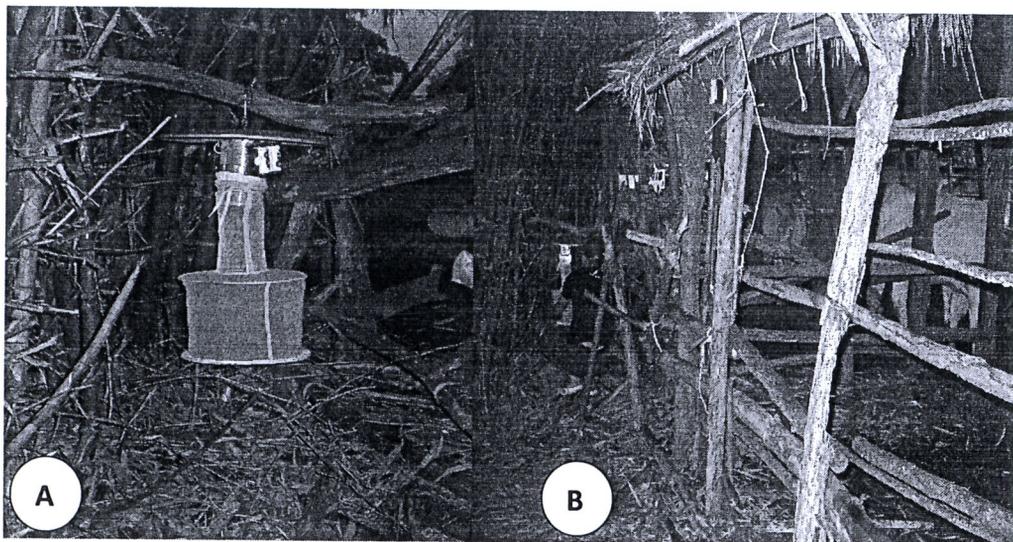
- ถุงเก็บอสุจิ (spermathecae) ของตัวเมีย ตรวจดูรูปร่าง ขนาด และจำนวนที่ถุง
- อวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) ของตัวผู้ ตรวจดูรูปร่างลักษณะ

สำหรับการจำแนก *Culicoides* โดยใช้จำนวนถุงเก็บอสุจิ ในเบื้องต้นให้แยกออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. *Culicoides* ชนิดที่มีถุงเก็บอสุจิ (spermatheca) 1 ถุง
2. *Culicoides* ชนิดที่มีถุงเก็บอสุจิ (spermathecae) 2 ถุง
3. *Culicoides* ชนิดที่มีถุงเก็บอสุจิ (spermathecae) 3 ถุง

3.2 เก็บรวบรวมตัวอย่างรีน เก็บข้อมูลภาคสนาม ดังต่อไปนี้

- 3.2.1 พื้นที่ชุมชนบ้านเรือน
- 3.2.2 พื้นที่ป่าสมบูรณ์
- 3.2.3 พื้นที่สวน หรือไร่ ในสภาพป่าถูกรบกวน
- 3.2.4 พื้นที่ฟาร์ม



ภาพที่ 3.2 (A) การวางกับดัก CDC (B) วางกับดักไวโกสับริเวณคอกวัว



ภาพที่ 3.3 Animal baited trap ใช่วัวเป็นเหยื่อล่อ