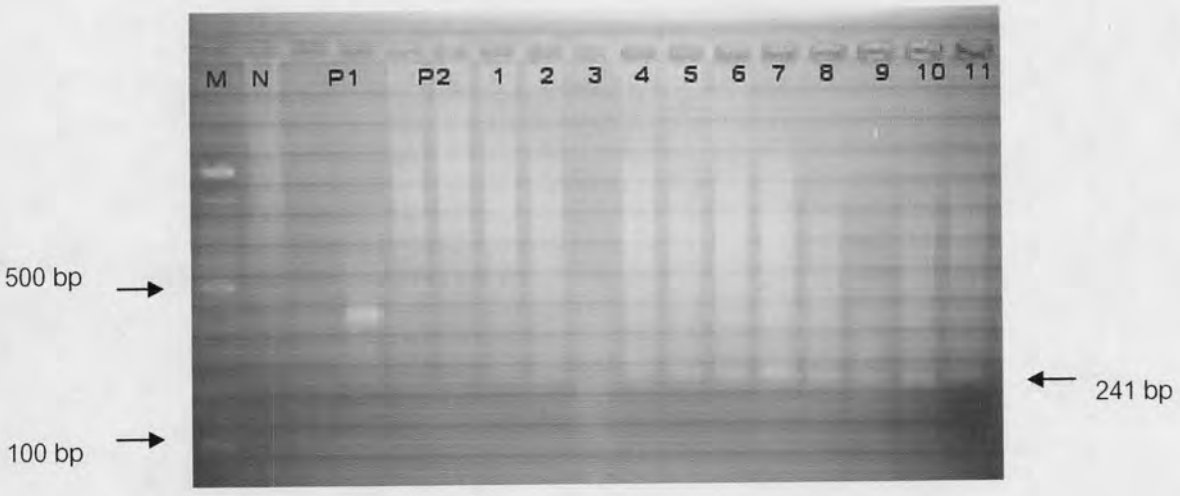
บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายบ้าน *Aedes aegypti*

นำไข่ของเรือด (*Cimex hemipterus)* ใหม่ๆ 5 ฟอง มาบดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 50 µl ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml ด้วย Pestle สำหรับบดยุงแล้วฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายบ้านตัวละประมาณ 0.2 µl ทั้งหมดจำนวน 60 ตัว แล้วหลังจากนั้น 48 ชั่วโมงพบว่าจำนวนยุงรอดชีวิต 11 ตัว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 18.33% (11/60) ซึ่งถูกกำหนดเป็นรุ่นที่ G_0 เพื่อให้วางไข่เป็น G_1 จากนั้นนำตัวเรือด ไข่ของเรือด และยุงมาสกัด DNA พร้อมกับตรวจสอบการติดเชื้อจากการส่งถ่ายเชื้อ (*Wolbachia* transinfection) ซึ่งตรวจสอบบริเวณ *Wolbachia* specific protein – 16s rRNA gene ด้วยเทคนิค Semi-nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ WspecF-WspecR ได้ผลิตภัณฑ์ DNA ขนาด 438 bp และคู่ที่สอง คือ $INTF_2$-WspecR ได้ผลิตภัณฑ์ DNA ขนาด 241 bp ดังภาพที่ 4.1 ปรากฏว่ายุงลายบ้านเพศเมียรุ่นที่ G_0 ที่รอดชีวิตจากการฉีดเชื้อนั้น ติดเชื้อ 10 ตัวจากที่รอดชีวิตทั้งหมด 11 ตัว คิดเป็น 90.91 % (10/11)



ภาพที่ 4.1 ภาพถ่ายจาก 2% เจล (Agarose gel electrophoresis) จากตัวอย่างยุงลาย บ้านรุ่นที่ G_0 ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* โดย

Lane (M) : Marker 100 bp ladder

Lane (N) : Negative control

Lane (P1) : First product of positive control 438 bp. (naturally infected Bed bug's egg)

Lane (P1) : Positive control (naturally infected Bed bug's egg)

Lane (3) : Uninfected *Aedes aegypti* DNA product

และ Lane 1-2 และ4-11 (sample 1-2 และ sample 4-11) : *Transinfected Aedes aegypti* DNA product

จากนั้นทำการศึกษาลำดับเบส (Sequencing) ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F เพื่อเป็นการยืนยันการติดเชื้อในไข่เรือด (ตามภาพที่ 4.2) โดยนำผลิตภัณฑ์ชิ้น DNA ที่ได้รับการเพิ่มขนาดจากเทคนิค Semi-nested PCR มาแทรกเข้ากับพลาสมิดชนิด pGEM®-T Easy vector ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่มีส่วนลำดับเบสของเอนไซม์ SP6 และ เอนไซม์ T7 RNA polymerase แล้วส่งถ่ายพลาสมิดเวคเตอร์นี้เข้ากับเซลล์ competence ที่เตรียมจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจแล้วนำส่งตรวจหาลำดับเบสต่อไป ซึ่งทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ตัวอย่างไม่สามารถเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในเรือดเขตร้อน *Cimex hemipterus* ได้ เพราะไม่มีรายงานฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 241 bp ดังกล่าวใน GenBank

ลำดับเบสของไข่เรือด Bed bug

AGTCATCATGGCCTTTATGGAGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGC
TACAATGGGCTGCAAAGTCGCGAGGCTGAGCTAATCTCTTAAAAGCCATC
TCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAG
TAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACA
CTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGTTTCACTCGAAGCT

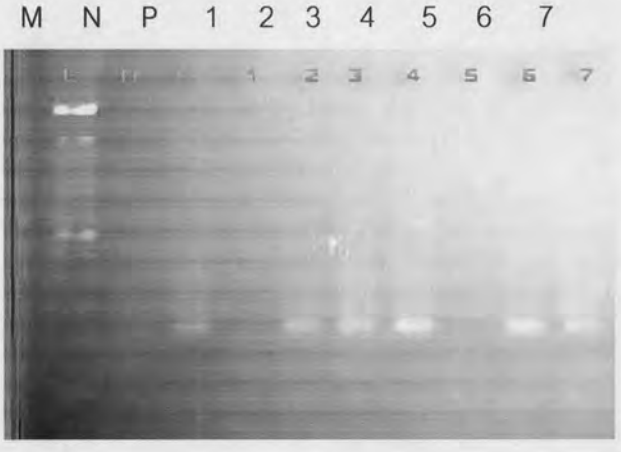
ภาพที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 241 bp จากชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่จำเป็นต้องอาศัยในเซลล์ของเรือด *Cimex hemipterus*

2. การศึกษาการติดเชื้อ *Wolbachia* ในยุงลายบ้านเพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียจากแม่สู่ลูก

การตรวจยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ในยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ได้นำ DNA ของยุงในรุ่นที่ 2 – รุ่นที่ 4 มาศึกษาเพิ่มจำนวนด้วย Semi-Nested PCR พร้อมทั้งโคลน DNA และศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ อีกทั้งยังเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงทั้งเพศผู้และแพศเมียที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F อีกด้วยพร้อมกัน

2.1 การตรวจการติดเชื้อในยุงลายบ้าน

หลังจากสกัดดีเอ็นเอของยุงลายบ้านในรุ่นที่สนใจศึกษาแล้วนำ DNA มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการศึกษาด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ในการตรวจการติดเชื้อนี้จำเป็นต้องเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค Semi-Nested PCR เนื่องจากวิธี conventional PCR ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ตัวอย่างได้และยุงตัวอย่างมีการติดเชื้อปริมาณน้อย ดั้งนั้นเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้จำนวนมากพอ โดยมีขนาด 241 bp ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นการติดเชื้อโดยวิธี Gel electrophoresis ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ภาพถ่ายจาก 2% เจล (Agarose gel electrophoresis) จาก Semi-Nested PCR ของ DNA ของตัวอย่างยุงลายบ้านทั้งเพศผู้และเพศเมีย

Lane (M) : Marker 100 bp ladder

Lane (N) : Negative control

Lane (P) : Positive control (naturally infected Bed bug)

Lane 1, 3, 5 และ 7 : ตัวอย่างจากยุงเพศผู้

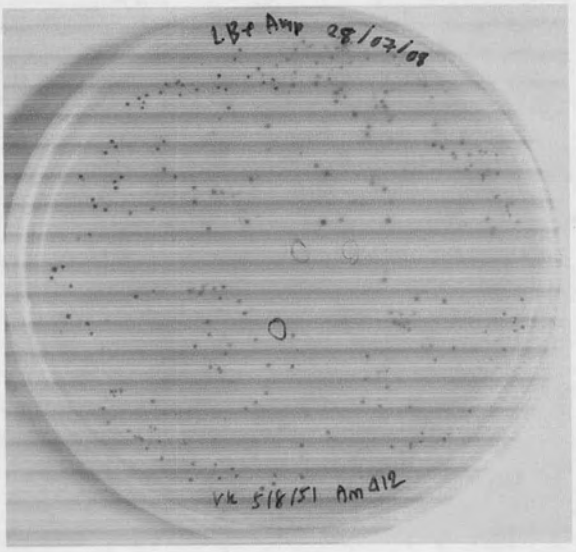
Lane 2, 4 และ 6 : ตวอย่างจากยุงเพศเมีย

2.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

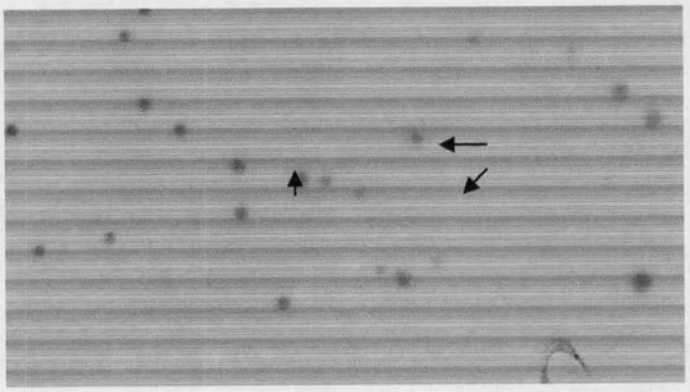
2.2.1 การคัดเลือกโคโลนี (Colony selection)

ในงานวิจัยนี้ได้นำผลิตภัณฑ์ DNA ที่เพิ่มจำนวนจากเทคนิค Semi-nested PCR ขนาด 241 เบส มาทำการศึกษาการหาลำดับนิวลีโอไทด์ ด้วยการเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pGEM®-T Easy แล้วส่งถ่ายเชื้อเข้าเซลล์ competence ที่เตรียมจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha แล้วลงเพลท LB plate ดังภาพที่ 4.4 ที่มียาแอมพิซิลิน พร้อมทั้งผสม X-Gal และ IPTG หลังจากอบที่ 37^0 C จะพบโคโลนีทั้งสีขาวและสีน้ำเงินขึ้นบนเพลท ซึ่งเฉพาะโคโลนีสีขาวเท่านั้นที่ถูกเลือกมาเลี้ยงเชื้อ ในระหว่างนี้จำเป็นต้องตรวจสอบการเชื่อมยีนในพลาสมิดด้วยเทนิควิธี PCR ($INTF_2$-WspecR) แล้วทำ Gel electrophoresis ด้วยวุ้นความเข้มข้น 2% (Wt/Vol) หลังจากนั้นนำแผ่นวุ้นมาย้อมสีของ Ethidium bromide และตรวจสอบแถบขนาดของ DNA โดยการดูผ่านแสงรังสี UV ด้วยเครื่อง Gel Photodocumentation System (Bio-rad) เทียบกับ DNA มาตรฐาน ซึ่งขนาด DNA ที่แท้จริงมีขนาด 241 bp เนื่องจากโคโลนีสีขาวมีชิ้นส่วน DNA ที่เชื่อมอยู่พลาสมิดและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดแล้วตรวจสอบขนาดของ DNA ด้วยเทคนิค PCR ($INTF_2$-WspecR) อีกครั้ง

a.



b.



ภาพที่ 4.4 แสดงโคโลนีสีขาวและสีน้ำเงินในเพลท LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG (a) และโคโลนีสีขาวที่ปลายหัวลูกศร (b)

2.22 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* บริเวณบางส่วนของชิ้นยีน 16S rRNA จากยุงลายบ้าน สำหรับยุงเพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อเมื่อเทียบกับเชื้อ *Wolbachia* ที่เป็น Endosymbionts ในเรือดเขตร้อน (*Cimex hemipterus*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านมีการเปลี่ยนแปลงในบางตำแหน่งที่แตกต่างกันและแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Wolbachia* ในไข่เรือด ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเบสเปลี่ยนแปลงแบบเทนที่ ดังนี้ ในยุงลายบ้านเพศผู้ (Im) มีตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ในตำแหน่งที่ 92 คือ เปลี่ยนแปลงจากเบส A เป็นเบส G ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่หนึ่ง (If1) มีตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 68 คือ เบสเปลี่ยนแปลงจากเบส T เป็นเบส A และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สอง (If2) มีตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 95 คือ เบสเปลี่ยนแปลงจากเบส C เป็นเบส T แต่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สาม (If3) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเบสใดๆของชิ้นส่วนยีนขนาด 241 bp (ภาพที่ 4.9)

ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* บริเวณส่วนของชิ้นยีน 16S rRNA ของยุงลายบ้านทั้งหมดเมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อแบคทีเรีย *Wobachia* ในไข่เรือด (*Cimex hemipterus*) พบว่าลำดับของกรดอะมิโนในยุงลายบ้านเพศผู้ (Im) มีตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันในตำแหน่งที่ 31 คือ เปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน Lysine (K) เป็นกรดอะมิโน Arginine (R) ลำดับของกรดอะมิโนในยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่หนึ่ง (If1) มีตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันในตำแหน่งที่ 23 คือ เปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน Valine (V) เป็นกรดอะมิโน Aspartic acid (D) แต่ในลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สอง (If3) และ แบบที่สาม (If3) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใดๆของชิ้นส่วนยีนขนาด 241 bp ที่มีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 79 ชนิด (ภาพที่ 4.10)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์และความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (F-supergroup) ที่ติดเชื้อในเรือดและติดเชื้อในยุงลายบ้านทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของในยุงที่แตกต่างจากในเรือดอาจเป็นเพราะว่า เชื้อแบทีเรียจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิตในเซลล์ของยุงได้ อย่างไรก็ตามสำหรับกรณีที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และ/หรือลำดับกรดอะมิโนแสดงว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมใหม่และสามารถดำรงชีวิตต่อไปในเซลล์ยุงดังกล่าวได้

Wolbachia **ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศผู้** ดังภาพที่ 4.5

AGTCATCATGGCCTTTATGGAGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGC
TACAATGGGCTGCAAAGTCGCGAGGCTGAGCTAATCTCTTAGAAGCCATC
TCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAG
TAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACA
CTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGTTTCACTCGAAGCT

ภาพที่ 4.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศผู้

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศเมีย พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันสามแบบ ได้แก่

รูปแบบที่หนึ่ง (ดังภาพที่ 4.6)

AGTCATCATGGCCTTTATGGAGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGC
TACAATGGGCTGCAAAGTCGCGAGGCTGAGCTAATCTCTTAAAAGCCATC
TCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAG
TAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACA
CTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGTTTCACTCGAAGCT

ภาพที่ 4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่หนึ่ง

<u>รูปแบบที่สอง</u> (ดังภาพที่ 4.7)

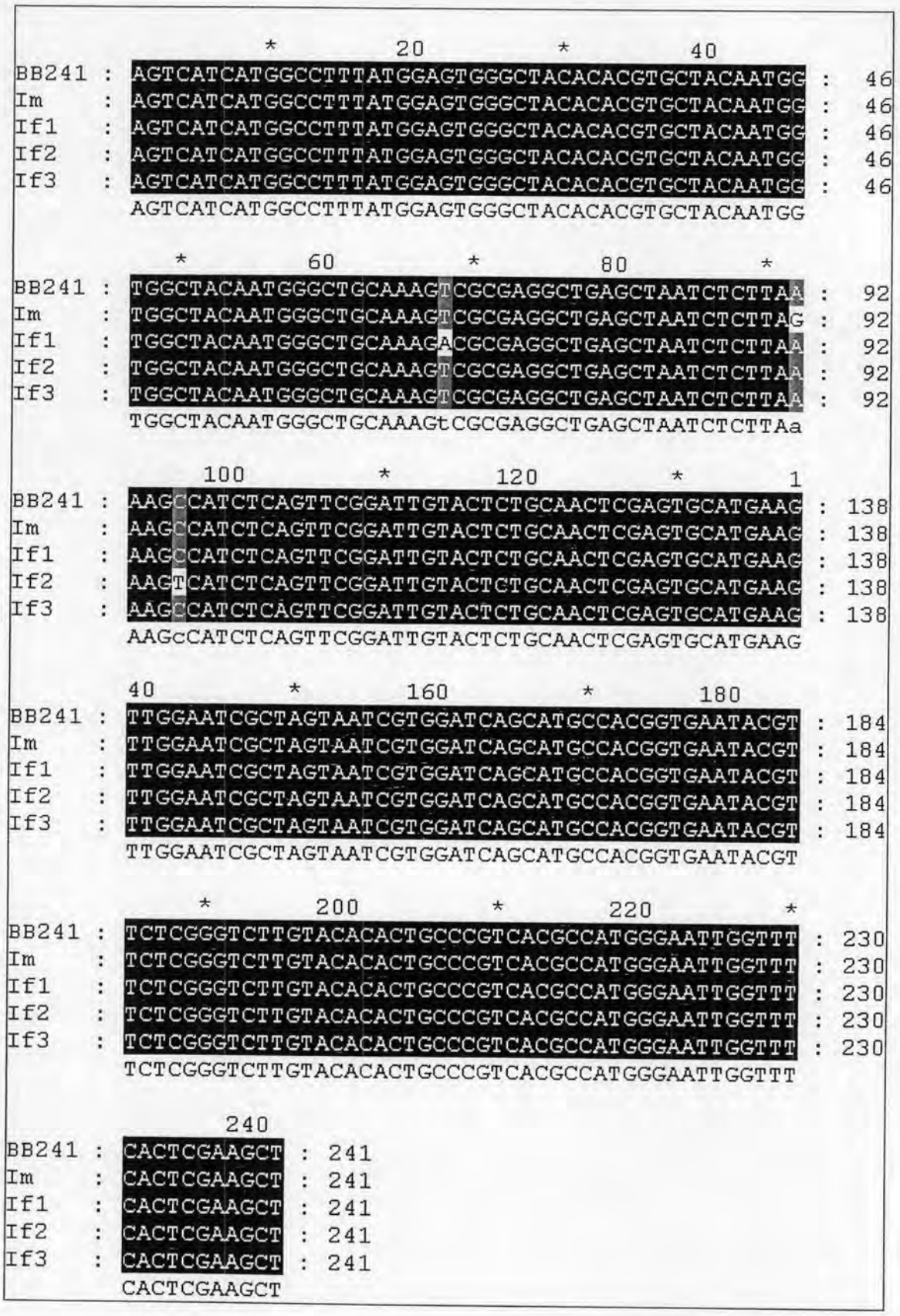
AGTCATCATGGCCTTTATGGAGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGC
TACAATGGGCTGCAAAGTCGCGAGGCTGAGCTAATCTCTTAAAAGCCATC
TCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTA
GTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACA
CACTGCCCGTCACGCCATGGGAATTGGTTTCACTCGAAGCT

ภาพที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สอง

<u>รูปแบบที่สาม</u> (ดังภาพที่ 4.8)

AGTCATCATGGCCTTTATGGAGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGCT
ACAATGGGCTGCAAAGTCGCGAGGCTGAGCTAATCTCTTAAAAGTCATCTC
AGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTA
ATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACT
GCCCGTCACGCCATGGGAATTGGTTTCACTCGAAGCT

ภาพที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สาม

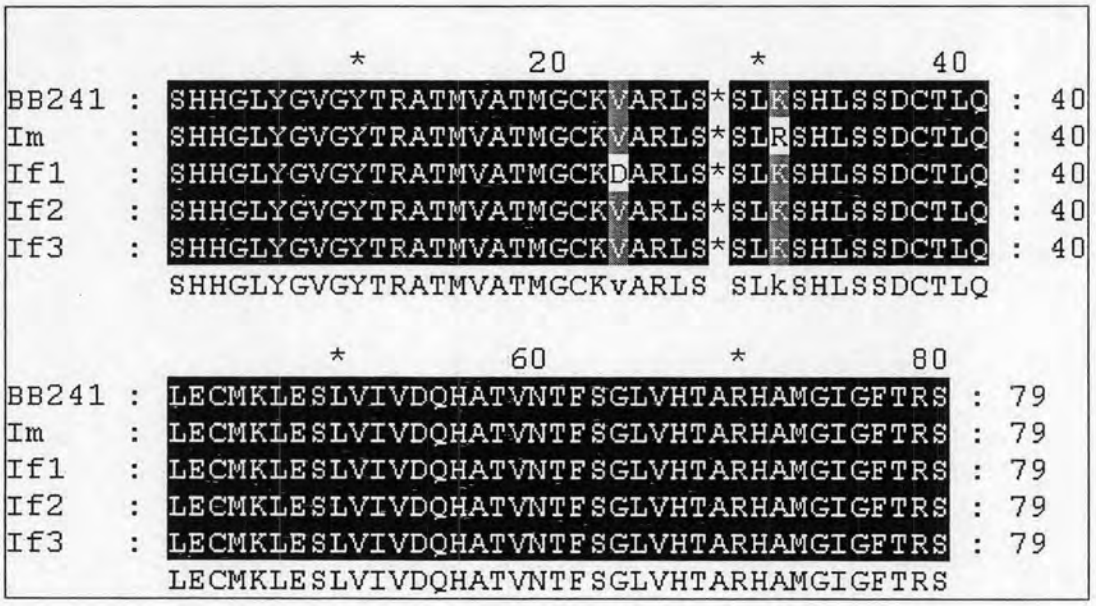


ภาพที่ 4.9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* (F-supergroup) ที่ติดเชื้อในไข่เรือด ยุงลายบ้านเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ ดังนี้

Bed 241 : Bed bug egg; ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในไข่เรือด

Im : Infected male; ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศผู้

If : Infected female; ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศเมีย



ภาพที่ 4.10 การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของแบคทีเรีย *Wolbachia* (F-supergroup) ระหว่างไข่เรือดกับยุงลายเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ ดังนี้

Bed 241 : Bed bug egg; ลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในไข่เรือด

Im : Infected male; ลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในของยุงลายบ้านเพศผู้

If : Infected female; ลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเพศเมีย

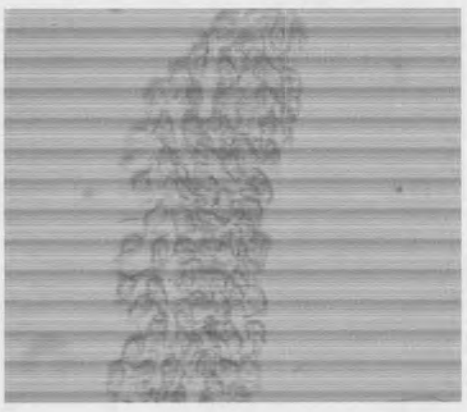
3. การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Fluorescence in situ Hybridization

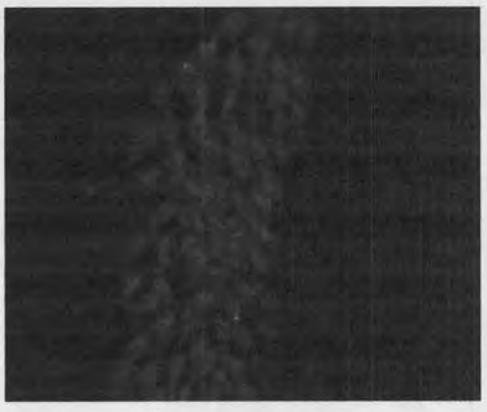
เทคนิค FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของทั้ง DNA และ RNA ของยีนที่สนใจ งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้สนใจศึกษาการแสดงออกของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วย DNA สายเดี่ยวที่ติดฉลาก (labeled single-stranded fragment of DNA) ที่เรียกว่า "labeled probe" ที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับ DNA เป้าหมายและสามารถจับกับ DNA เป้าหมายนั้นเกิดเป็น "hybrids" ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ต่อยีน 16S rRNA ของ *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในรังไข่ ตัวอ่อน และอัณฑะ ของยุงลายบ้าน ด้วยโพรบ 1 คู่ คือ VK INTF probe (5' fluoro TCC ATA AAG GCC ATG ACT) และ VK INTR probe (5' fluoro TCA TGT ACT CGA ATT GCA GAG T) ติดฉลากด้วยสารฟลูออเรซีนที่มีสีเขียว แล้วตรวจสอบการ Hybridize ของโพรบต่อยีนเป้าหมายซึ่งจะเปล่งแสงสีเขียวด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ และหรือกล้องคอนโฟคอล

ภาพที่ 4.11 ภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ (รังไข่)

a. รังไข่ไม่ติดเชื้อ (Uninfected ovaries)

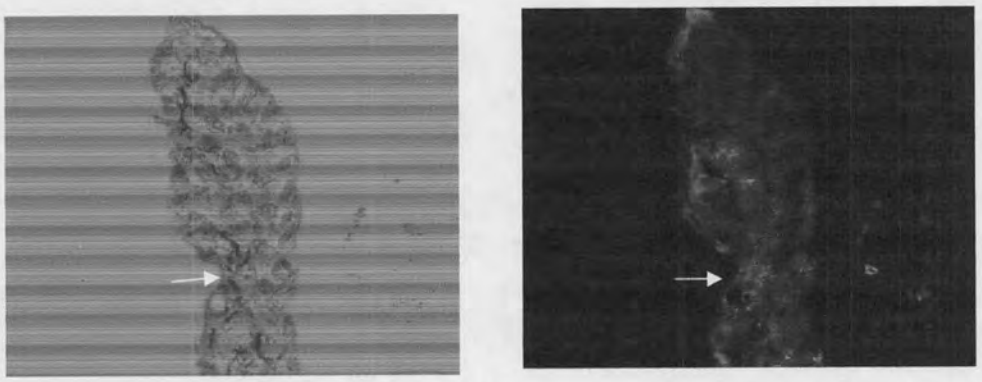
a1 a2





b. รังไข่ยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (Infected ovaries)

b1 b2

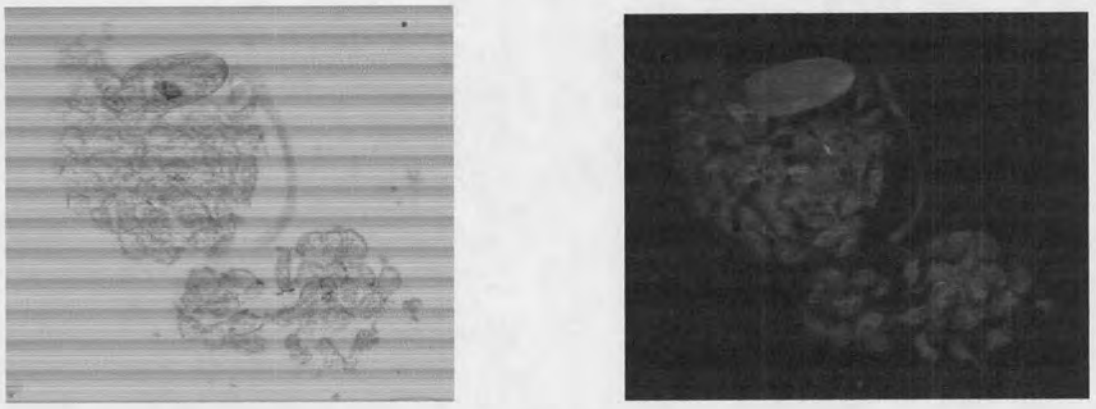


ภาพที่ 4.11a1 และ 4.11a2 คือ ภาพของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 4.11b1 นั่นคือเป็นภาพเดียวกันกับภาพที่ 4.11b2 คือ ภาพของรังไข่ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* แสดงให้เห็นเป็นจุดสีเขียว (*ลูกศรชี้*)

โดยภาพที่ 4.11a1 เป็นภาพที่ถ่ายจากฟิลเตอร์ของแสง Light ส่วนภาพที่ 4.11a2 เป็นที่ถ่ายจากฟิลเตอร์ GFP ของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อจึงมองไม่เห็นจุดสีเขียวของสสารฟลูออเรสเซนต์ ส่วนภาพที่ 4.11b2 คือ ภาพรังไข่ที่ติดเชื้อที่ถ่ายจากฟิลเตอร์ GFP เช่นเดียวกับภาพที่ 4.11a2 จึงทำให้มองเห็นการสะท้อนแสงสีเขียว (*ลูกศรชี้*) จากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ตำแหน่งเดียวกับรังไข่ในภาพที่ 4.11b1 ซึ่งเป็นภาพรังไข่ที่ถ่ายจากฟิลเตอร์แสง Light

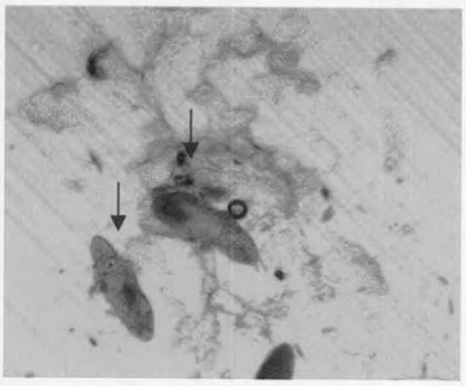
c. ตัวอ่อนอยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อ (Uninfected ovaries and embryo)

c1 c2

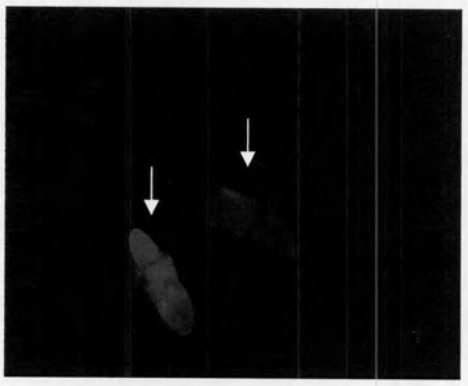


d. ตัวอ่อนอยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ไม่ติดเชื้อ (embryo in infected ovary)

d1



d2

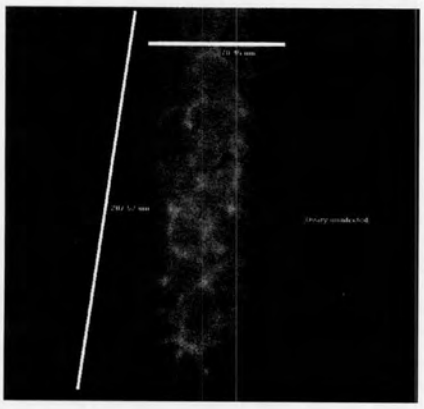


ภาพที่ 4.11c1 และ 4.11c2 เป็นภาพเดียวกันของตัวอ่อนที่อยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ซึ่งไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 4.11d1 และ 4.11d2 เป็นภาพของตัวอ่อนในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จึงสามารถมองเห็นแสงสีเขียวของสารฟลูออเรสเซนต์ได้ (ลูกศรสีขาวชี้)

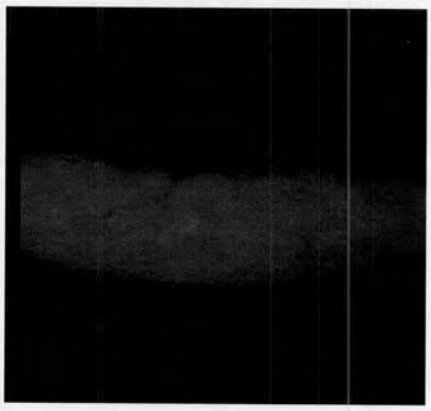
ภาพที่ 4.12 ภาพจากกล้องคอนโฟคอล (รังไข่)

a. รังไข่ที่ไม่ติดเชื้อ (Uninfected ovaries)

a1

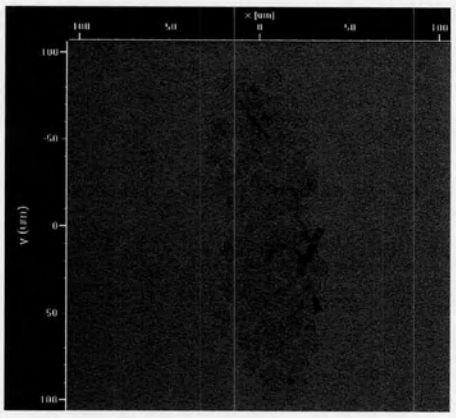


a2

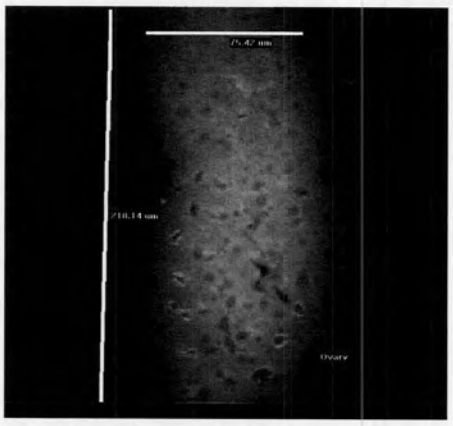


b. รังไข่ที่ติดเชื้อ (Infected ovaries)

b1



b2



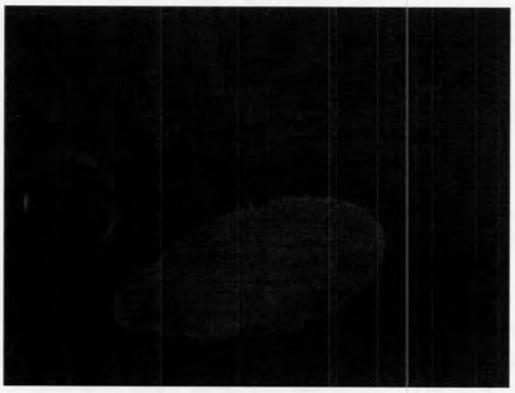
ภาพที่ 4.12a1 และ 4.12a2 เป็นภาพเดียวกันของตัวอ่อนที่ติดอยู่ในเนื้อเยื่อของรังไข่ซึ่งไม่ติดเชื้อ*Wolbachia* ภาพที่ 4.12a1 และ 4.12b2 เป็นภาพของตัวอ่อนในเนื้อเยื่อของรังไข่ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จึงสามารถมองเห็นแสงสีเขียวของสารฟลูออเรสเซนต์ได้ ซึ่งถ่ายจากกล้องคอนโฟคอล

ภาพที่ 4.13 ภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ (ตัวอ่อน)

a. ตัวอ่อนไม่ติดเชื้อ (Uninfected embryo)

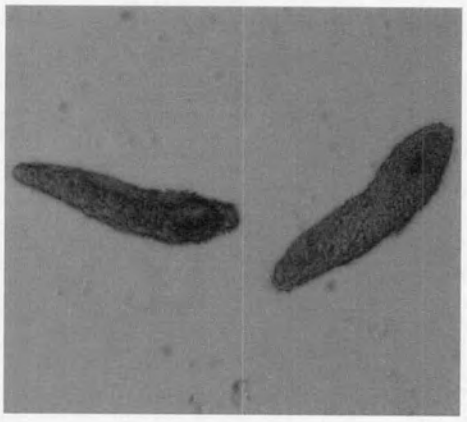
a1

a2

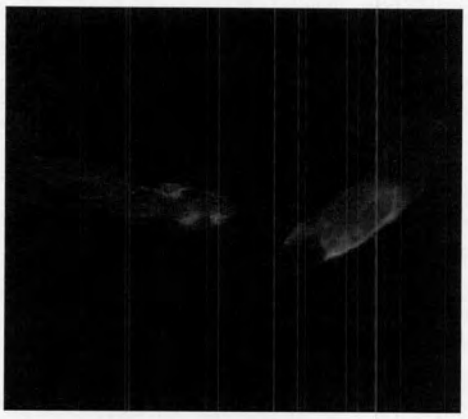


b. ตัวอ่อนติดเชื้อ (Infected embryo)

b1

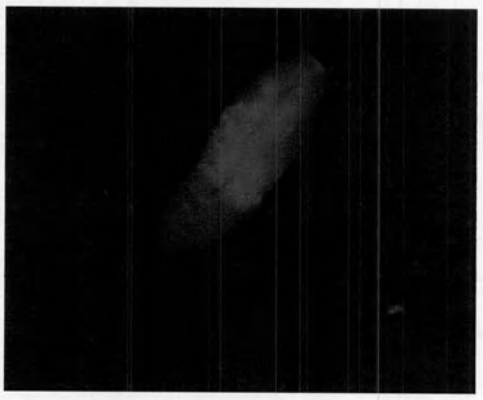


b2



b3

b4

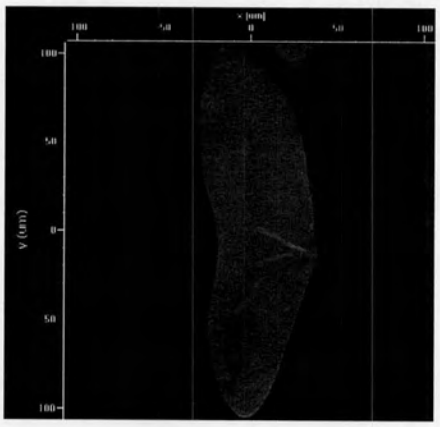


ภาพที่ 4.13a1 และ 4.13a2 เป็นภาพของตัวอ่อนที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ใช้ฟิลเตอร์ของแสง Light ส่วนภาพที่ 4.13b2, 4.13b3 และ 4.13b4 เป็นที่ตัวอ่อนติดเชื้อ ถ่ายจากฟิลเตอร์ GFP ของกล้องฟลูออเรสเซนต์ จึงทำให้มองเห็นการสะท้อนแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 4.13b1 คือ ภาพรังไข่ที่ถ่ายจากฟิลเตอร์แสง Light ซึ่งเป็นภาพเดียวกันกับภาพที่ 4.13b2

ภาพที่ 4.14 ภาพจากกล้องคอนโฟคอล (ตัวอ่อน)

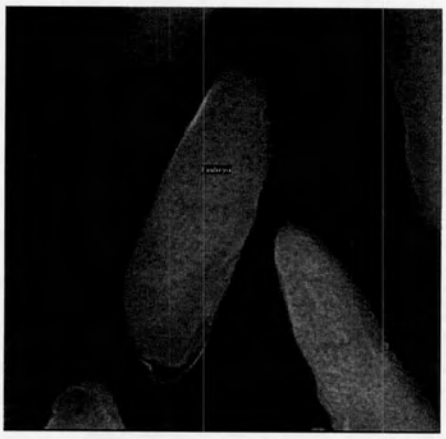
a. ตัวอ่อนไม่ติดเชื้อ (Uninfected embryo)

a1

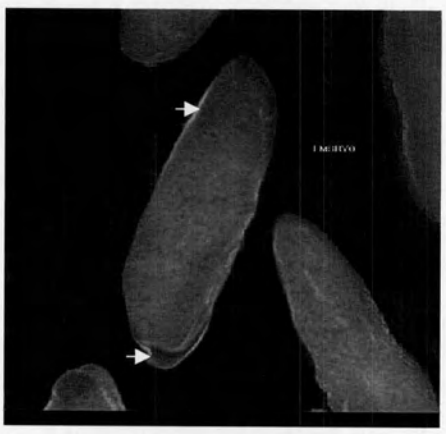


b. ตัวอ่อนติดเชื้อ (Infected embryo)

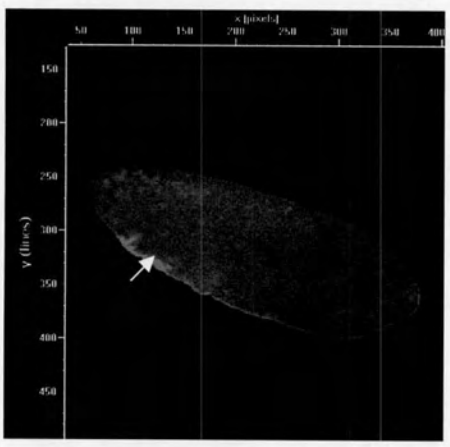
b1



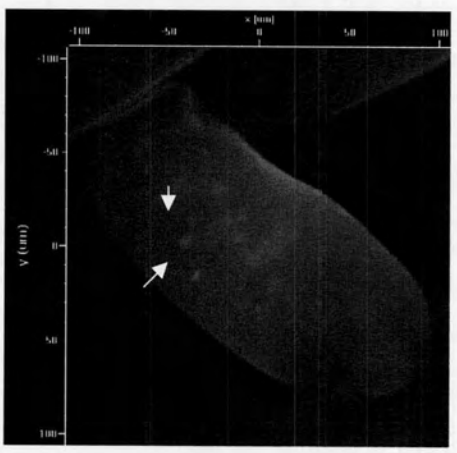
b2



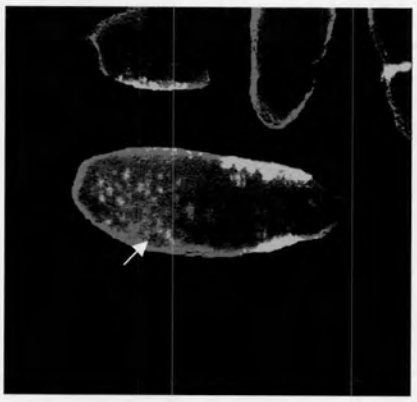
b 3



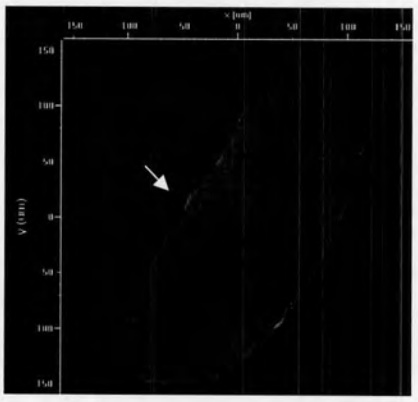
b4



b 5



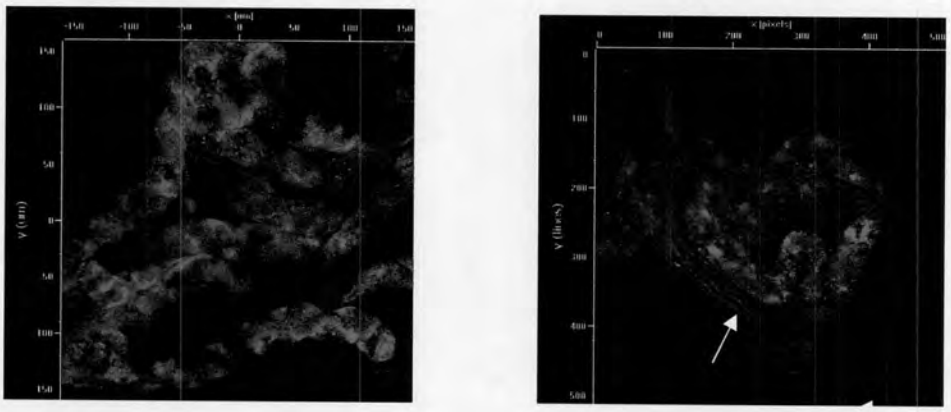
b6



ภาพที่ 4.14a1 เป็นภาพของตัวอ่อนที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งใช้ฟิลเตอร์ของแสง GFP ส่วนภาพที่ 4.14b2, 4.14b3 และ 4.14b6 (*ลูกศรชี้*) เป็นตัวอ่อนที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้านข้าง ส่วนหัว (Anterior pole) และส่วนท้าย (Posterior pole) ของตัวอ่อน ส่วนภาพที่ 4.14b4 สังเกตจากจุดสีเขียวของโพรบที่ปลายลูกศร และ ภาพที่ 4.14b5 เป็นภาพของตัวอ่อนที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สังเกตเห็นจุดสีเหลืองในไข่หรือที่ปลายลูกศร โดยมีสีพื้นหลังเป็นสีแดงทโดยถ่ายภาพจากฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองเห็นการสะท้อนแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนภาพที่ 4.14b1 คือ ภาพรังไข่ที่ถ่ายจากฟิลเตอร์แสง Light ซึ่งเป็นภาพเดียวกันกับภาพที่ 4.14b2

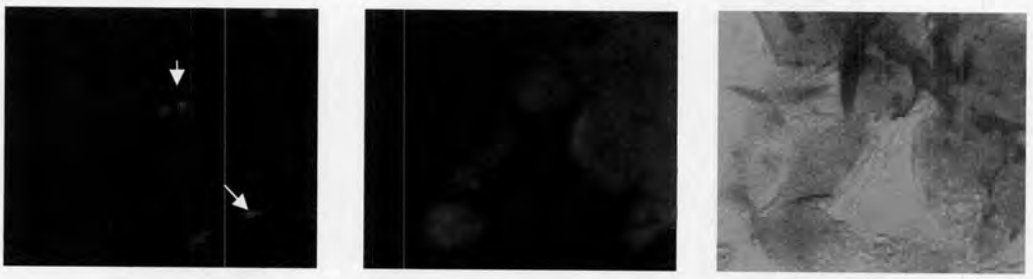
c. ระบบท่อทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ (Reproductive and alignmentary canal)

c1 c2



ภาพที่ 4.14c1 และ 4.14c2 เป็นภาพของท่อต่างๆในระบบสืบพันธุ์ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองเห็นจุดของแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในภาพที่ 4.15c2 สามารถสังเกตเห็นลักษณะของท่อชัดเจน (*ปลายลูกศรชี้*)

c 3 c4 c5



ภาพที่ 4.14c3 เป็นภาพของท่อต่างๆในระบบสืบพันธุ์ย้อมสี DAPI เทียบกับภาพภาพที่ hybrids ด้วยโพรบ และภาพถ่ายจากฟิลเตอร์แสง light โดยได้ สกัดจากสองปล้องท้ายของส่วนท้องของยุงลายบ้านที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

เมื่อใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องฟลูออเรสเซ็นต์ จึงทำให้มองเห็นจุดของแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ดังในภาพที่ 4.14c3 (เป็นภาพถ่ายจากบริเวณเดียวกับภาพที่ 4.14c4) สามารถสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงิน (*ปลายลูกศรชี้*) โดยถ่ายภาพจากฟิลเตอร์ DAPI ที่ถูก Stains ด้วย

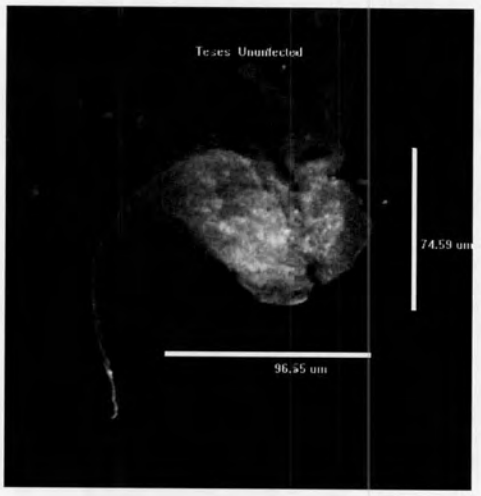
สารละลาย DAPI ที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์ เทียบกับ 4.14c4 (hybridize) และภาพที่ 4.14c5 ที่แสดงให้โครงสร้างของระบบสืบพันธุ์โดยใช้ฟิลเตอร์ของแสง light จึงแสดงให้เห็นว่าวิธีตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียด้วย FISH สามารถรักษาสภาพโครงสร้างของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาพที่ 4.15 ภาพจากกล้องคอนโฟคอล (อัณฑะ)

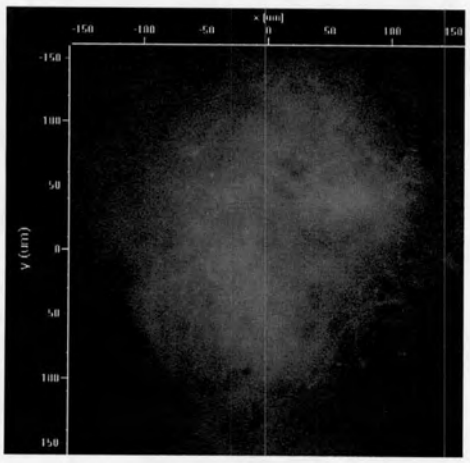
a. อัณฑะยุงไม่ติดเชื้อ (Uninfected testes)

a1

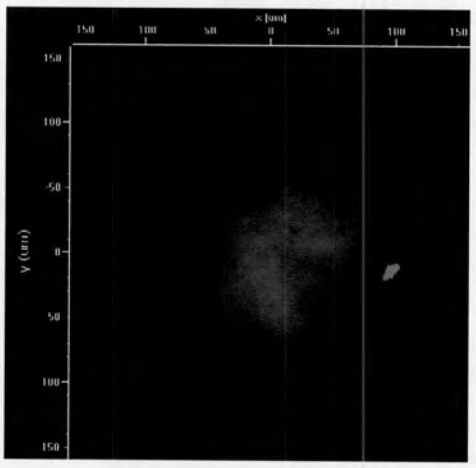
a2



a 3



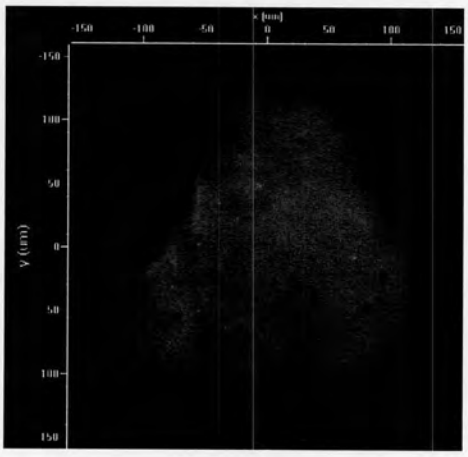
a4



ภาพที่ 4.15a3 (200x) และ 4.15a4 (100x) เป็นภาพเนื้อเยื่อของอัณฑะของยุงลายบ้านเพศผู้ที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (เช่นเดียวภาพที่ 4.15a1, 2 ถ่ายภาพจากฟิลเตอร์ light) ซึ่งถ่ายภาพโดยใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองไม่เห็นจุดของแสงสีเขียวจากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ส่วนสีเขียวที่มองเห็นนั่นคือสีของพื้นหลังของภาพเท่านั้น

b. อัณฑะยุงติดเชื้อ (Infected testes)

b1



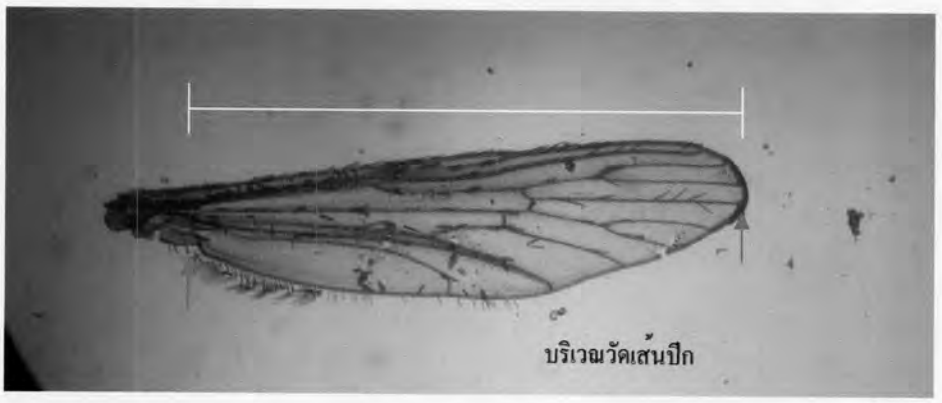
b2

ภาพที่ 4.15b1 (200x) และ 4.15b2 (100x) เป็นภาพเนื้อเยื่อของอัณฑะของยุงลายบ้านเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ใช้ฟิลเตอร์ GFP ของกล้องคอนโฟคอล จึงทำให้มองเห็นจุดของแสงสีเขียวจำนวนมาก จากสารฟลูออเรสเซ็นต์ที่ถูกติดฉลากที่โพรบซึ่งจำเพาะต่อชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยเฉพาะภาพ 4.14b2 (100x)

4. การวัดขนาดของร่างกายของยุงลายบ้าน (วัดเส้นปีก)

ขนาดของร่างกาย (ความยาวเส้นปีก) เป็นอีกพารามิเตอร์หนึ่งของการประเมินสมรรถนะหรือความแข็งแรงของยุงทั้งในเพศผู้และเพศเมีย สำหรับเพศผู้ขนาดของร่างกายอาจมีความสำคัญต่อความสามารถในการแข่งขันเพื่อแย่งเข้าคู่ผสมพันธุ์กับยุงเพศเมีย โดยยุงเพศผู้ที่ขนาดร่างกายใหญ่กว่าอาจจะได้เปรียบในเรื่องความเร็วเพื่อบินเข้าไปผสมพันธุ์กับยุงเพศเมียและอาจไม่ต้องกังวลต่อการรบกวนของยุงเพศผู้ตัวอื่นในขณะกำลังผสมพันธุ์ ซึ่งหมายความว่ายุงมีความสามารถอย่างเต็มที่และประสบผลสำเร็จในการผสมพันธุ์ในครั้งนั้นๆได้ นอกจากนี้ความยาวของเส้นปีกยังแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการบินระยะทางไกลๆเพื่อโอกาสต่อการหาอาหารเพื่อความอยู่รอดได้เช่นกัน ดังนั้นการวัดเส้นปีกจึงมีความสำคัญต่อการประเมินความแข็งแรงหรือสมรรถนะของยุงอย่างยิ่ง

ความยาวเส้นปีกของยุงนั้น วัดระหว่างบริเวณตำแหน่ง Auxiliary incision ถึง Wing tip วัดด้วย Ocular lens ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า ดังภาพที่ 4.16 แล้วนำข้อมูลมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 4.16 บริเวณที่วัดเส้นปีกด้วย Ocular lens ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x

หลังจากที่ตัดปีกของยุงลายบ้าย *Aedes aegypti* มาวัดความยาวเส้นปีกเพื่อเทียบขนาดร่างกายของยุงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบทีเรีย *Wolbachia* แล้ว จากนั้นนำผลที่วัดได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความยาวเส้นปีกด้วยค่าทางสถิติ ดังต่อไปนี้

4.1 การเปรียบเทียบความยาวเส้นปีกของยุงลายบ้านเพศเมียอายุ 10 วัน

ผลการวัดความยาวเส้นปีกของยุงลายบ้านในกลุ่ม T (กลุ่ม A และB) ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เทียบกับกลุ่ม U (กลุ่ม C) ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อายุ 10 วัน (จากตาราง 3.15) ได้ผลดังตารางที่ 4.1 และมีความยาวเส้นปีกเฉลี่ยเท่ากับ 2.90 ± .01 mm และ 2.82 ± .04 mm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

Uninfected female (mm)								Uninfected female (mm)	
Code	*Count*	*Code*	*Count*	*Code*	*Count*	*Code*	*Count*	*Code*	*Count*
If1	2.850	If14	3.000	If27	2.900	If40	2.825	Uf1	2.800
If2	2.975	If15	2.850	If28	2.950	If41	2.775	Uf2	2.975
If3	2.950	If16	2.850	If29	2.800	If42	2.850	Uf3	2.975
If4	2.825	If17	3.025	If30	2.975	If43	2.725	Uf4	2.875
If5	2.950	If18	2.900	If31	2.900	If44	2.875	Uf5	2.925
If6	2.950	If19	2.875	If32	2.900	If45	2.850	Uf6	2.775
If7	2.875	If20	2.975	If33	3.000	If46	2.775	Uf7	3.000
If8	2.975	If21	3.000	If34	2.900	If47	2.900	Uf8	3.200
If9	3.000	If22	2.925	If35	2.900	If48	2.925	Uf9	2.750
If10	2.800	If23	2.950	If36	2.925	If49	2.875	Uf10	2.500
If11	2.975	If24	2.950	If37	2.825	If50	2.875	Uf11	2.725
If12	2.925	If25	2.875	If38	2.825	If51	3.000	Uf12	2.675
If13	2.950	If26	2.900	If39	2.800	If52	2.875	Uf13	2.625

ตารางที่ 4.1 ผลการวัดเส้นปีกของยุงลายบ้านเพศเมียระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 10 วัน

สำหรับผลการวัดความยาวเส้นปีกของยุงเพศเมียจะนำมาเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยค่าสถิติ t-test (Independent sample t-test) แบบพาราเมตริก โดยกรณีทั้งสองกลุ่มที่นำมาเปรียบเทียบนั้นมีลักษณะของข้อมูลเป็นอิสระต่อกัน กล่าวคือข้อมูลหรือตัวแปรที่ต้องการทดสอบจะต้องมีการแจกแจงแบบปกติ หรือ ใกล้เคียงแบบปกติ และข้อมูลมีลักษณะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณหรือตัวแปรแบบคำนวณ (ratio/interval) ทั้งนี้ การทดสอบการกระจายหรือการแจกแจงของข้อมูลจะต้องทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบใด (Test of distribution) หรือ ทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ (Test of normality) ด้วยค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov ตามตารางที่ 4.2 ก่อนจึงจะสามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยได้ ดังในแต่ละกรณีต่อไปนี้

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Uf	If
N		13	52
Normal Parameters(a,b)	Mean	2.83077	2.90000
	Std. Deviation	.186009	.069310
Most Extreme Differences	Absolute	.105	.111
	Positive	.105	.077
	Negative	-.089	-.111
Kolmogorov-Smirnov Z		.377	.799
Asymp. Sig. (2-tailed)		.999	.546

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการแจกแจงข้อมูลแบบปกติของยุงลายบ้านเพศเมียด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov

จากผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลตารางที่ 4.2 แสดงค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Asymp. Sig. (2-tailed) สำหรับการทดสอบการแจกแจงภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจงแบบปกติ

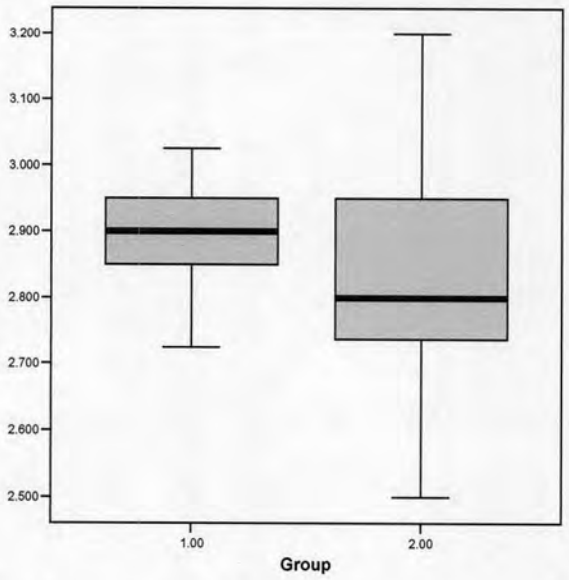
H_1 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจงไม่ใช่แบบปกติ

เนื่องจากค่า Asymp. Sig. (2-tailed) ที่โปรแกรมคำนวณได้สำหรับ กลุ่ม Female infected และกลุ่ม Uninfected คือ .546 และ .999 ตามลำดับ มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนด คือ 0.05 ของทั้งสองกลุ่ม จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 ของทั้งสองกลุ่มและสรุปผลได้ว่า ตัวแปร Infected female และกลุ่ม Uninfected female มีการแจกแจงแบบปกติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งนี้จากกราฟ Boxplots ในตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าข้อมูลไม่มีค่า outlier จึงช่วยยืนยันว่าข้อมูลที่นำมาใช้คำนวณไม่มีค่าที่ทำให้การสรุปผลผิดพลาดได้

Group Statistics

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
I and U 10	1.00	52	**2.90000**	.069310	**.009612**
days	2.00	15	**2.82333**	.173583	**.044819**

ตารางที่ 4.3 สถิติเบื้องต้นของตัวแปรที่นำมาทดสอบ กลุ่มยุงเพศเมียอายุ 10 วัน ติดเชื้อมีจำนวน 52 ปีก มีค่าเฉลี่ยประมาณ 2.90 ± 0.01 mm และไม่ติดเชื้อมี 15 ปีกมีค่าเฉลี่ย 2.82 ± 0.04 mm



ตารางที่ 4.4 แสดงกราฟ boxplots ของข้อมูลความยาวเส้นปีกของยุง ดังนี้ 1; กลุ่มยุงเพศเมียติดเชื้อ และ 2; กลุ่มยุงเพศเมียไม่ติดเชื้อ

เนื่องจากผลการทดสอบการแจกแจงพบว่าข้อมูลที่ต้องการนำมาเทียบค่าเฉลี่ยมีการแจกแจงแบบปกติทั้ง 2 ข้อมูล ดังนั้น จึงสามารถทำการทดสอบเพื่อเปรียบค่าเฉลี่ยได้ ด้วยค่าสถิติ t-test

จากตารางที่ 4.5 เป็นผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของข้อมูลความยาวเส้นปีกของยุงลายเพศเมียติดเชื้อและไม่ติดเชื้อภายใต้เงื่อนไขดังนี้

H_0 : ความยาวเส้นปีกของยุงเพศเมียทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ความยาวเส้นปีกของยุงเพศเมียทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน, alpha เป็น 0.05

กล่าวคือ จะปฏิเสธ H_0 เนื่องจากค่าความน่าจะเป็น Sig. (2-tailed) คือ .115 มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดไว้เท่ากับ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 นั่นคือ ความยาวเส้นปีกของยุงเพศเมียอายุ 10 วันของกลุ่มที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยยุงลายเพศเมียติดเชื้อมีความยาวเส้นปีก (2.90 ± .01 mm) และความยาวเส้นปีกของยุงลายเพศเมียไม่ติดเชื้อ (2.82 ± .04 mm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
If, Uf 10 days	Equal variances assumed	20.210	.000	2.583	65	.012	.076667	.029685	.01738	.13595
	Equal variances not assumed			1.673	15.308	.115	.076667	.045838	-.02086	.17419

ตารางที่ 4.5 แสดงการกระจายและค่าเฉลี่ยของข้อมูล

4.2 การเปรียบเทียบความยาวเส้นปีกของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 10 วัน

ผลการวัดความยาวเส้นปีกของยุงลายบ้านในกลุ่ม T (กลุ่ม A และB) ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เทียบกับกลุ่ม U (กลุ่ม C) ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อายุ 10 วัน (จากตาราง 3.15) ได้ผลดังตารางที่ 4.6 และมีความยาวเส้นปีกเฉลี่ยเท่ากับ 2.12 ± .02 mm และ 2.21 ± .02 mm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

Infected male				Uninfected male			
Code	*Count (mm)*	*Code*	*Count(mm)*	*Code*	*Count (mm)*	*Code*	*Count(mm)*
Im1	2.100	Im16	1.950	Um1	2.250	Um12	2.250
Im2	2.150	Im17	2.075	Um2	2.250	Um13	2.325
Im3	2.150	Im18	2.000	Um3	2.150	Um14	2.125
Im4	2.150	Im19	2.100	Um4	2.400	Um15	2.200
Im5	2.275	Im20	2.050	Um5	2.125	Um16	2.250
Im6	2.225	Im21	1.998	Um6	2.225	Um17	2.325
Im7	2.225	Im22	2.100	Um7	2.275	Um18	2.200
Im8	2.100	Im23	2.150	Um8	2.225	Um19	2.150
Im9	2.150	Im24	2.200	Um9	2.250	Um20	2.150
Im10	2.075	Im25	2.100	Um10	2.200	Um21	2.075
Im11	2.200	Im26	2.150	Um11	2.200	Um22	2.125
Im12	2.150	Im27	1.950				
Im13	2.050	Im28	2.250				
Im14	2.100	Im29	2.225				
Im15	2.100	Im30	2.225				

ตารางที่ 4.6 ผลการวัดเส้นปีกของยุงลายบ้านเพศผู้ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อายุ 10 วัน

สำหรับความยาวเส้นปีกของยุงเพศผู้จะนำมาเพื่อเปรียบเทียบทดสอบค่าเฉลี่ยโดยค่าสถิติ t-test (Independent sample t-test) แบบพาราเมตริก กรณีทั้งสองกลุ่มที่นำมาเปรียบเทียบนั้นเป็นอิสระต่อกัน และลักษณะข้อมูลเป็นข้อมูลเชิงปริมาณ เช่นเดียวกับความยาวเส้นปีกของยุงลายเพศเมีย กล่าวคือข้อมูลหรือตัวแปรที่ต้องการทดสอบจะต้องมีการแจกแจงแบบปกติ หรือ ใกล้เคียงแบบปกติ ดังนั้นจึงทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบใด (Test of distribution) หรือ ทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ (Test of normality) ด้วยค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov ตามตารางที่ 4.7 ก่อนจึงจะสามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยได้

จากผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลตารางที่ 4.7 แสดงค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Asymp. Sig. (2-tailed) สำหรับการทดสอบการแจกแจงภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงแบบปกติ

H_1 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงไม่ใช่แบบปกติ alpha ที่กำหนดคือ 0.05

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Im	Um
N		30	22
Normal Parameters(a,b)	Mean	2.12410	2.214773
	Std. Deviation	.084559	.0774055
Most Extreme Differences	Absolute	.121	.143
	Positive	.113	.143
	Negative	-.121	-.106
Kolmogorov-Smirnov Z		.664	.669
Asymp. Sig. (2-tailed)		.771	.762

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบการแจกแจงข้อมูลแบบปกติของยุงลายบ้านเพศผู้ด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov

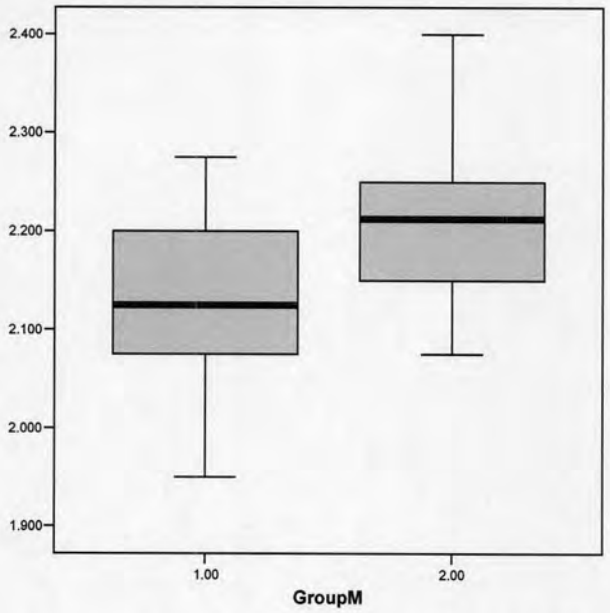
เนื่องจากค่า Asymp. Sig. (2-tailed) ที่โปรแกรมคำนวณได้สำหรับ กลุ่มยุงลายเพศผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 10 วัน คือ .771 และ .762 ตามลำดับ มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดคือ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 และสรุปผลได้ว่าความยาวเส้นปีกของยุงลายเพศผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 10 วัน มีการแจกแจงแบบปกติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

และจากกราฟ Boxplot ตามตารางที่ 4.9 พบว่าข้อมูลมีลักษณะเบ้ซ้ายเล็กน้อยในยุงกลุ่ม 1 และ ข้อมูลมีลักษณะเบ้ขวาเล็กน้อยในยุงกลุ่ม 2 แต่ทั้งนี้สามารถยืนยันได้ว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติจากผลการทดสอบการแจกแจงข้อมูลแบบปกติด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov ตามตารางที่ 4.7 อย่างไรก็ตาม ข้อมูลไม่มีค่า outlier ที่จะทำให้การสรุปผลจากข้อมูลนั้นผิดพลาด จึงแสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่นำมาทดสอบนั้นมีความน่าเชื่อถือ

Group Statistics

	GroupM	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
WingM10	1.00	30	**2.12410**	.084559	**.015438**
	2.00	22	**2.21477**	.077406	**.016503**

ตารางที่ 4.8 ค่าทางสถิติเบื้องต้นของความยาวเส้นปีกของยุงอายุ 10 วัน กลุ่มที่ติดเชื้อมีค่าเฉลี่ยประมาณ 2.12 ± 0.02 mm และไม่ติดเชื้อมีค่าเฉลี่ย 2.21 ± 0.02 mm



ตารางที่ 4.9 แสดงกราฟ Boxplots ของข้อมูลใน 2 กลุ่มคือ ยุงเพศผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ

เนื่องจากผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลตามตารางที่ 4.7 และ พบว่าข้อมูลที่ต้องการนำมาเทียบค่าเฉลี่ยความยาวเส้นปีกของยุงอายุ 10 วัน มีการแจกแจงแบบปกติทั้ง 2 ข้อมูล ดังนั้น จึงสามารถทำการทดสอบเพื่อเปรียบค่าเฉลี่ยได้ ด้วยค่าสถิติ t-test ดังตารางที่ 4.9

จากตารางที่ 4.10 เป็นผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของข้อมูลความยาวเส้นปีกของกลุ่มติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเพศผู้อายุ 5 วัน ภายใต้เงื่อนไขดังนี้

H_0 : ความยาวเส้นปีกของยุงเพศผู้มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ความยาวเส้นปีกของยุงเพศผู้มีค่าเฉลี่ยมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน โดยกำหนด alpha เป็น 0.05

กล่าวคือจะปฏิเสธ H_0 เนื่องจากค่าความน่าจะเป็น Sig. คือ .590 มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดไว้เท่ากับ 0.05 แสดงว่าความแปรปรวนของข้อมูลทั้งสองมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ค่า Sig. (2-tailed) คือ .000 มีค่าน้อยกว่าค่า alpha ที่กำหนดไว้เท่ากับ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_1 นั่นคือความยาวเส้นปีกของยุงเพศผู้อายุ 10 วันของกลุ่มที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยยุงลายเพศผู้ติดเชื้ออายุ 10 วัน มีความยาวเส้นปีก (2.12 ± 0.02 mm) สั้นกว่าความยาวเส้นปีกของยุงลายเพศเมียไม่ติดเชื้อ (2.21 ± 0.02 mm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

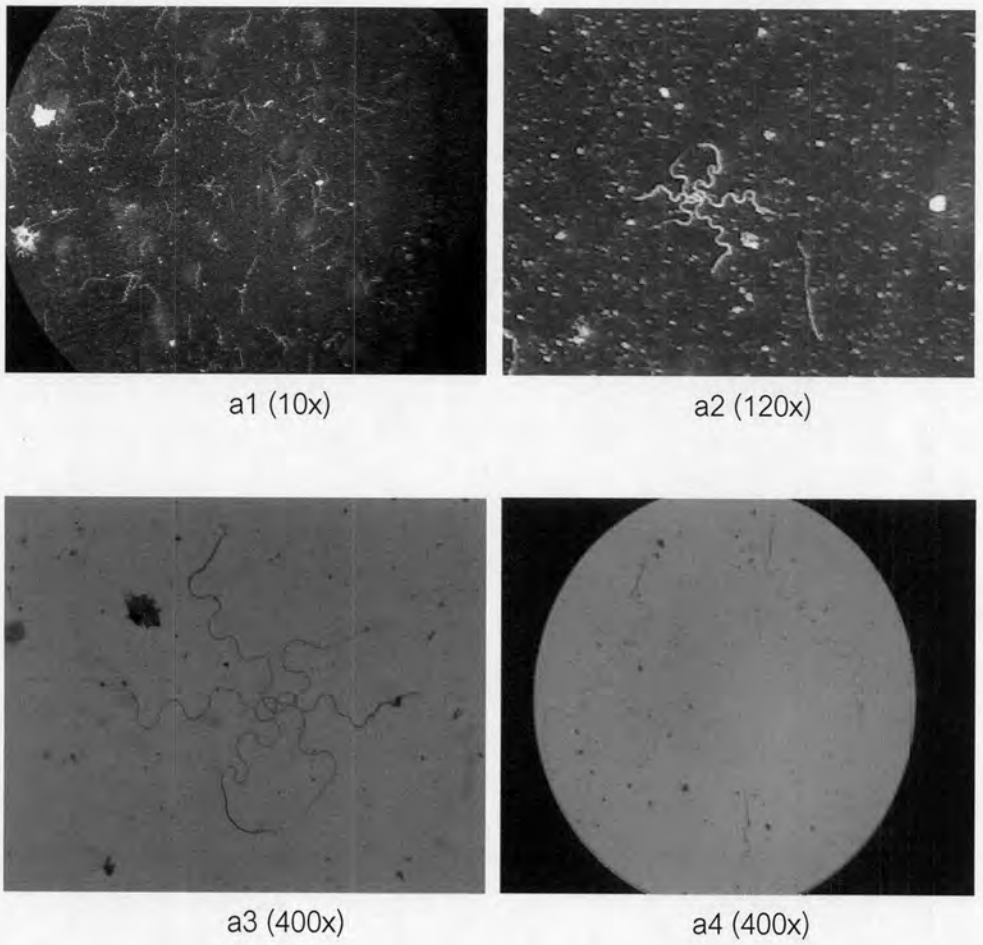
Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality Of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Wing Male 10 Days	Equal ariances assumed	.294	.590	-3.957	50	.000	-.090673	.022913	-.1366	-.0446
	Equal ariances not assumed			-4.012	47.497	.000	-.090673	.022598	-.1361	-.0452

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของข้อมูลความยาวเส้นปีกของกลุ่มติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ เพศผู้อายุ 10 วัน

5. การคำนวนปริมาณเชื้ออสุจิของยุงลายบ้าน

คุณภาพและปริมาณของอสุจิถือเป็นอีกพารามิเตอร์ที่สำคัญในการประเมินความแข็งแรงหรือสมรรถนะของยุงเพศผู้ซึ่งแสดงถึงความสามารถผสมพันธุ์กับยุงเพศเมียได้อย่างประสบผลสำเร็จ ซึ่งหมายความว่ายุงเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์จะมีจำนวนไข่ในปริมาณปกติและฟักตัวด้วยอัตราสูง ทั้งนี้ปริมาณอสุจิมีผลต่อพฤติกรรมการสืบพันธุ์ การกระจายตัวของประชากรและการดำรงเผ่าพันธุ์ของยุง โดยเฉพาะยุงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* อาจมีผลต่อการสร้างอสุจิได้ ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาจำนวนอสุจิของยุงลายบ้านที่ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือด (ดังภาพที่ 4.17) นอกจากนี้ยุงลายที่ติดเชื้ออาจมีผลต่อกระทบต่อการระบาดของเชื้อก่อโรคที่มียุงลายบ้านเป็นพาหะได้ จากการทดลองนับอสุจิดังกล่าวได้เปรียบเทียบปริมาณอสุจิจากการนับโดยใช้กล้อง Dark-field กับ light microscope แล้วพบว่าได้ค่าไม่ต่างกัน ผู้วิจัยจึงใช้กล้อง light microscope ในการศึกษาวิจัย



a1 (10x) a2 (120x)

a3 (400x) a4 (400x)

ภาพที่ 4.17 แสดงภาพของอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Dark field (a1 และ a2) และกล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (a3 และ a4)

5.1 การเปรียบเทียบปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านที่ได้รับการผสมพันธุ์กับยุงลายบ้านที่ไม่ได้ผสมพันธุ์ อายุ 5 วัน

ผลการนับปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ในกลุ่มได้รับการผสมพันธุ์และกลุ่มที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ ซึ่งไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้งสองกลุ่ม ที่อายุ 5 วัน ได้ผลดังตารางที่ 4.11 และมีค่าเฉลี่ยของทั้งกลุ่มที่ได้รับการผสมพันธุ์ (mated) และกลุ่มที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (virgins) ดังนี้ คือ 6,592 ± 2,136.50 และ 8,472 ± 2,445.71 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.12

Mated	*Virgin*
8,008	8,048
7,888	7,344
8,256	6,744
3,348	7,456
5,460	12,768

ตารางที่ 4.11 ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน โดย mated คือ ยุงที่ได้รับการผสมพันธุ์ และ virgin คือ ยุงที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Mated	5	**6592.0000**	2136.49994	3348.00	8256.00
No	5	**8472.0000**	2445.71135	6744.00	12768.00

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าสถิติเบื้องต้นเชิงบรรยายของปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน โดย mated คือ ยุงที่ได้รับการผสมพันธุ์ และ virgin คือ ยุงที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิของยุงลายที่ได้รับการผสมพันธุ์กับยุงลายที่ไม่ได้ผสมพันธุ์โดยใช้ค่าสถิติ t-test (Independent sample t-test) แบบพาราเมตริก กรณีทั้งสองกลุ่มตัวอย่างนั้นเป็นอิสระไม่เกี่ยวข้องต่อกัน ภายใต้เงื่อนไขข้อมูลหรือตัวแปรที่ต้องการทดสอบจะต้องมีการแจกแจงแบบปกติ หรือ ใกล้เคียงแบบปกติ ทั้งนี้ การทดสอบการ

กระจายหรือการแจกแจงของข้อมูลจะต้องทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบใด (Test of distribution) หรือ ทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ (Test of normality) ด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov ตามตารางที่ 4.13 ก่อนเพื่อทดสอบคุณสมบัติของข้อมูลแล้วจึงสามารถนำข้อมูลมาทดสอบค่าเฉลี่ยได้

จากผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลในตารางที่ 4.22 ด้วยค่าสถิติของ Kolmogorov - Smirnov พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Asymp. Sig (2-tailed) สำหรับการทดสอบการแจกแจงภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงแบบปกติ

H_1 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงไม่ใช่แบบปกติ alpha ที่กำหนดคือ 0.05

		Mated	No
N		5	5
Normal Parameters(a,b)	Mean	6592.0000	8472.0000
	Std. Deviation	2136.49994	2445.71135
Most Extreme Differences	Absolute	.328	.369
	Positive	.218	.369
	Negative	-.328	-.240
Kolmogorov-Smirnov Z		.733	.825
Asymp. Sig. (2-tailed)		**.655**	**.505**

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบการแจกแจงข้อมูลแบบปกติด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov

เนื่องจากค่า Asymp. Sig. (2-tailed) ที่โปรแกรมคำนวณได้สำหรับ กลุ่มยุงลายเพศผู้ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ได้รับการผสมพันธุ์ (mated) และไม่ได้ผสมพันธุ์ (virgins) อายุ 5 วัน คือ .655 และ .505 ตามลำดับ มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดคือ 0.05 ของทั้ง 2 กลุ่ม จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 ของทั้งสองกลุ่มและสรุปผลได้ว่าตัวแปรของทั้งกลุ่มยุงลายเพศผู้ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ได้รับการผสมพันธุ์ (mated) และไม่ได้ผสมพันธุ์ (virgins) อายุ 5 วัน มีการแจกแจงแบบปกติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และสามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบการกระจายก่อนแล้วจึงเปรียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มได้ด้วยค่าทางสถิติ t-test ในลำดับต่อไป

จากผลการทดสอบการกระจายของข้อมูลตารางที่ 4.14 แสดงค่าสถิติ t-test พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Sig. (2-tailed) สำหรับการทดสอบการกระจายของข้อมูลภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายไม่แตกต่างกัน โดยกำหนด alpha เป็น 0.05

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Count	Equal variances assumed	.002	**.97**	-1.29	8	**.23**	-1880.0	1452.31	-5229.05	1469.05
	Equal variances not assumed			-1.29	7.86	.23	-1880.0	1452.31	-5239.60	1479.60

ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน โดย mated คือ ยุงที่ได้รับการผสมพันธุ์ และ virgin คือ ยุงที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์

กล่าวคือจะยอมรับสมมติฐาน H_0 เนื่องจากค่าความน่าจะเป็น Sig. (ตารางที่ 4.23) ของค่าสถิติ F ในตาราง Levene's Test for Equality of Variances คือ .97 มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดไว้เท่ากับ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 นั่นคือปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 5 วัน ทั้งกลุ่มที่ได้รับการผสมพันธุ์กับกลุ่มไม่ได้ผสมพันธุ์ มีการกระจายของข้อมูลไม่แตกต่างกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ดังนั้นจึงพิจารณาเปรียบค่าเฉลี่ยต่อได้จากค่าสถิติ Sig. (2-tailed) แถว Equal variances assumed ในตาราง t-test for Equality of Means ต่อไปได้โดยสมมติฐานดังนี้

H_0 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน โดยกำหนด alpha เป็น 0.05

เนื่องจากค่า Sig. (2-tailed) (ตารางที่ 4.14) คือ .23 มีค่ามากกว่า ค่า alpha ที่กำหนดที่ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 ปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ ที่อายุ 5 วัน ทั้งกลุ่มได้รับการผสมพันธุ์แล้ว ซึ่งไม่ได้รับการผสมพันธุ์ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6,592 ± 2,136.50 และ 8,472 ± 2,445.71 ตามลำดับ

5.2 การเปรียบเทียบปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านติดเชื้อกับยุงลายบ้านไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 5 วัน ที่ยังไม่ได้ผสมพันธุ์

ผลการนับปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ในกลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 5 วัน ได้ผลดังตารางที่ 4.15 และมีค่าเฉลี่ยของทั้งกลุ่มที่ติดเชื้อและกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีค่าเท่ากับ 7,572.50 ± 441.88 และ 7,794.67 ± 759.90 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.16

นำผลการนับจำนวอสุจิของยุงลายที่ติดเชื้อกับยุงลายที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่าสถิติ t-test (Independent sample t-test) แบบพาราเมตริก ทั้งสองกลุ่มตัวอย่างนั้นเป็นอิสระต่อกัน เช่นเดียวกันกับในข้อ 5.1 ข้อมูลที่ต้องการทดสอบจะต้องมีการแจกแจงแบบปกติ หรือ ใกล้เคียงแบบปกติ จึงต้องการทดสอบการกระจายหรือการแจกแจงของข้อมูลจะต้องทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบใด (Test of distribution) หรือทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ (Test of normality) ด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov ตามตารางที่ 4.25 ก่อนเพื่อทดสอบคุณสมบัติของข้อมูลแล้วจึงสามารถนำข้อมูลมาทดสอบการกระจายพร้อมทั้งทดสอบค่าเฉลี่ยได้ในลำดับถัดไป

Infected male		Uninfected male	
Code	*Count*	*Code*	*Count*
I1	6,896.00	U1	7,836.00
I2	10,076.00	U2	7,900.00
I3	6,064.00	U3	10,860.00
I4	6,600.00	U4	4,804.00
I5	8,516.00	U5	9,444.00
I6	7,580.00	U6	4,760.00
I7	7,588.00	U7	9,612.00
I8	7,260.00	U8	5,496.00
		U9	9,440.00

ตารางที่ 4.15 ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน ซึ่ง Infected male (I1-I8) คือ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และ Uninfected male (U1-U9) คือกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

จากผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลตารางที่ 4.25 ด้วยค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Asymp. Sig. (2-tailed) สำหรับการทดสอบการแจกแจงภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงแบบปกติ

H_1 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงไม่ใช่แบบปกติ alpha ที่กำหนดคือ 0.05

เนื่องจากค่า Asymp. Sig. (2-tailed) ที่โปรแกรมคำนวณได้สำหรับ กลุ่มยุงลายบ้านเพศผู้ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 5 วัน คือ .723 และ .826 ตามลำดับ มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดคือ 0.05 ของทั้ง 2 กลุ่ม จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 ของทั้งสองกลุ่มและสรุปผลได้ว่าตัวแปรของทั้งกลุ่มยุงลายบ้านเพศผู้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 5 วัน มีการแจกแจงแบบปกติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการทดสอบดังกล่าว ข้อมูลจึงมีคุณสมบัติพร้อมที่จะนำข้อมูลมาวิเคราะห์การกระจายและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มได้

จากผลการทดสอบค่าการกระจายของข้อมูลตารางที่ 4.17 ด้วยค่าสถิติ t-test พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Sig. (2-tailed) สำหรับการทดสอบการกระจายของข้อมูลภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายไม่แตกต่างกัน

โดยกำหนด alpha เป็น 0.05

		Infected	Uninfected
N		8	9
Normal	Mean	7572.5000	7794.6667
Parameters(a,b)	Std. Deviation	1249.83645	2279.70261
Most Extreme	Absolute	.245	.209
Differences	Positive	.245	.177
	Negative	-.114	-.209
Kolmogorov-Smirnov Z		.693	.628
Asymp. Sig. (2-tailed)		.723	.826

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

ตารางที่ 4.16 ผลการทดสอบการแจกแจงข้อมูลแบบปกติด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov ของปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน ซึ่ง Infected male คือ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และUninfected male คือกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

กล่าวคือจะปฏิเสธ H_0 เนื่องจากค่าความน่าจะเป็น Sig. (ตารางที่ 4.26) ของค่าสถิติ F ในตาราง Levene's Test for Equality of Variances คือ .067 มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดไว้เท่ากับ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 นั่นคือปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่อายุ 5 วัน มีการกระจายของข้อมูลไม่แตกต่างกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
5 day	Equal variances assumed	3.91	.067	-.244	15	.810	-222.166	909.15	-2159.9	1715.65
	Equal variances not assumed			-.253	12.67	.805	-222.166	879.04	-2126.2	1681.93

ตารางที่ 4.17 ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน

ดังนั้นจึงพิจารณาเปรียบค่าเฉลี่ยจากค่าสถิติ Sig. (2-tailed) แถว Equal variances assumed ในตาราง t-test for Equality of Means ต่อไปได้โดยสมมติฐานดังนี้

H_0 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน โดยกำหนด alpha เป็น 0.05

เนื่องจากค่า Sig. (2-tailed) (ตารางที่ 4.17) คือ .810 มีค่ามากกว่า ค่า alpha ที่กำหนดที่ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 ค่าเฉลี่ยของปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ อายุ 5 วันที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7,572.50 ± 441.88 และ 7,794.67 ± 759.90 ตามลำดับ

5.3 การเปรียบเทียบปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านที่ได้รับการผสมพันธุ์กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้งสองกลุ่มที่อายุ 10 วัน

ผลการนับปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ในกลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้งสองกลุ่ม ที่อายุ 10 วัน ได้ผลดังตารางที่ 4.18 มีค่าเฉลี่ยของกลุ่มทั้งติดเชื้อและกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย*Wolbachia* ดังนี้ คือ 6,963.50 ± 2,740.23 และ 5,972.00 ± 3,724.90 ตามลำดับดังตารางที่ 4.19

Infected male		Uninfected male	
Code	*Count*	*Code*	*Count*
A202	2,268.00	C201	3,488.00
A203	4,856.00	C203	11,352.00
A204	7,652.00	C206	1,380.00
A205	7,880.00	C207	8,748.00
A210	8,092.00	C208	3,216.00
A211	11,780.00	C210	9,084.00
A216	6,528.00	C211	4,536.00
A218	6,652.00		

ตารางที่ 4.18 ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 10 วัน ซึ่ง Infected male คือ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และUninfected male คือกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่าสถิติ t-test (Independent sample t-test) แบบพาราเมตริก ทั้งสองกลุ่มตัวอย่างนั้นเป็นอิสระต่อกัน เช่นเดียวกันกับในข้อ 5.2 ต้องการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลว่าเป็นการแจกแจงแบบใด (Test of distribution) หรือ ทดสอบว่าเป็นการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ (Test of normality) ด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov ตามตารางที่ 4.19 ก่อนเพื่อทดสอบคุณสมบัติของข้อมูลแล้วจึงสามารถนำข้อมูลมาทดสอบการกระจายพร้อมทั้งทดสอบค่าเฉลี่ยได้ในลำดับถัดไป

จากผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลตารางที่ 4.19 แสดงค่าสถิติของ Kolmogorov-Smirnov พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Asymp Sig. (2-tailed) สำหรับการทดสอบการแจกแจงภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงแบบปกติ

H_1 : ข้อมูลที่นำมาทดสอบมีการแจกแจงไม่ใช่แบบปกติ alpha ที่กำหนดคือ 0.05

เนื่องจากค่า Asymp. Sig. (2-tailed) ที่โปรแกรมคำนวณได้ของกลุ่มยุงลายเพศผู้ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 10 วัน คือ .852 และ .882 ตามลำดับ มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดคือ 0.05 ของทั้ง 2 กลุ่ม จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 ของทั้งสองกลุ่มและสรุปผลได้ว่าตัวแปรกลุ่มยุงลายบ้านเพศผู้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 10 วัน มีการแจกแจงแบบปกติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการทดสอบดังกล่าว ข้อมูลจึงมีคุณสมบัติพร้อมที่จะนำข้อมูลมาวิเคราะห์การกระจายและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มได้ดังนี้

ผลการทดสอบค่าการกระจายของข้อมูลตารางที่ 4.20 แสดงค่าสถิติ t-test พร้อมกับค่าความน่าจะเป็น Sig. (2-tailed) ของข้อมูลภายใต้สมมติฐานดังนี้

H_0 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศผู้บ้านอายุ 10 วัน ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณอสุจิของยุงลายเพศผู้บ้านอายุ 10 วัน ทั้งสองกลุ่มมีการกระจายไม่แตกต่างกัน โดยกำหนด alpha เป็น 0.05

		Infected male 10 D.	Uninfected male 10 D
N		8	7
Normal Parameters(a,b)	Mean	**6963.5000**	**5972.0000**
	Std. Deviation	**2740.23351**	**3724.90429**
Most Extreme Differences	Absolute	.215	.221
	Positive	.215	.221
	Negative	-.187	-.201
Kolmogorov-Smirnov Z		.609	.586
Asymp. Sig. (2-tailed)		**.852**	**.882**

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

ตารางที่ 4.19 ผลการทดสอบการแจกแจงข้อมูลแบบปกติด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov

ของปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้อายุ 10 วัน ซึ่ง Infected male คือ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และUninfected male คือกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

กล่าวคือจะปฏิเสธ H_0 เนื่องจากค่าความน่าจะเป็น Sig. (ตารางที่ 4.20) ของค่าสถิติ F ในตาราง Levene's Test for Equality of Variances คือ .140 มีค่ามากกว่าค่า alpha ที่กำหนดไว้เท่ากับ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 นั่นคือปริมาณอสุจิของยุงลายเพศบ้านผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อายุ 10 วัน มีการกระจายไม่แตกต่างกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Sperm count	Equal variances assumed	2.477	*.140*	.593	13	*.564*	991.50	1672.82	-2622.40	4605.40
	Equal variances not assumed			.580	10.92	.574	991.50	1709.01	-2773.07	4756.07

จากตารางที่ 4.20 ผลการทดสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 10 วัน

ดังนั้นจึงพิจารณาเปรียบค่าเฉลี่ยจากค่าสถิติ Sig. (2-tailed) แถว Equal variances assumed ในตาราง t-test for Equality of Means ต่อไปได้โดยสมมติฐานดังนี้

H_0 : ปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน

H_1 : ปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 5 วัน ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน โดยกำหนด alpha เป็น 0.05

เนื่องจากค่า Sig. (2-tailed) (ตารางที่ 4.20) คือ .564 มีค่ามากกว่า ค่า alpha ที่กำหนดที่ 0.05 จึงตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 ค่าเฉลี่ยของปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 10 วันที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6,963.50 ± 2,740.23 และ 5,972.00 ± 3,724.90 ตามลำดับ

5.4 ค่าสถิติเบื้องต้นเพื่อวิเคราะห์จำนวนอสุจิของยุงลายบ้านที่ได้รับการผสมพันธุ์ กลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรียและกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

เนื่องจากยุงลายบ้านเพศผู้ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ที่อวัยวะเพศอาจมีผลต่อการผลิตอสุจิทั้งด้านปริมาณหรือคุณภาพและยากต่อการคำนวณหาปริมาณได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ การประเมินด้านปริมาณนั้นข้อมูลอาจผิดพลาดได้ง่าย จึงจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์ก่อนเพื่อให้ข้อมูลน่าเชื่อถือและนำมาซึ่งการอธิบายผลการทดลองได้อย่างแม่นยำ ถูกต้องและมีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

จากตารางที่ 4.21 นั้นได้แสดงค่าสถิติเบื้องต้นของปริมาณอสุจิของยุงในสิบหลุมของหนึ่งสไลด์ โดยกำหนดให้สัญลักษณ์ T แทนยุงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* และกำหนดให้สัญลักษณ์ U แทนกลุ่มยุงที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* พร้อมทั้งคำนวณค่าและความคลาดแคลื่อนด้วย และต้องนำไปวิเคราะห์ด้วยการอนุมานทางสถิติ นั่นคือการแจกแจงความถี่ของข้อมูล โดย ณ ที่นี้ได้นำข้อมูลของยุงทั้งสิบมาวิเคราะห์การแจกแจงด้วย Kolmogorov-Smirnov และ Shapiro-Wilk เพื่อทดสอบการแจกแจงหรือการกระจายของข้อมูลว่ามีการแจกแจงปกติหรือไม่ แสดงให้เห็นว่าวิธีตรวจปริมาณอสุจิของยุงลายบ้ายด้วยวิธีการนี้มีความน่าเชื่อถือ

จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 4.22 พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติเนื่องจากมีค่า Sig. มากกว่าค่า alpha ที่กำหนดคือ 0.05 ยกเว้น U1 ที่มีค่า Sig. ของตาราง Shapiro-Wilk น้อยกว่าค่า alpha แต่ในตาราง Kolmogorov-Smirnov มีค่า Sig. มากกว่าค่า alpha จึงถือว่ามีการแจกแจงแบบปกติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการแจกแจงของข้อมูโดยแสดงในรูปแบบ

กราฟ Normal Q-Q ที่แสดงในภาพที่ 4.18 โดยจุดแต่ละจุดอยู่ใกล้เส้นตรงแสดงว่ากราฟของ T1-T5 และ U1-U5 มีการแจกแจงใกล้เคียงปกติ ส่วนลักษณะกราฟโค้งปกติของข้อมูลส่วนใหญ่มีลักษณะโค้งแบบปกติ แต่กราฟของ T5 และ U4 มีลักษณะเบ้ขวาเล็กน้อย และกราฟของ T1 และ U1 มีลักษณะเบ้ซ้ายเล็กน้อย

No. of well	Transinfected					Uninfected				
	T1	T2	T3	T4	T5	U1	U2	U3	U4	U5
1	161	148	191	188	217	156	166	256	106	181
2	245	127	161	167	167	216	223	315	138	246
3	208	173	229	196	188	298	231	266	138	270
4	196	157	159	183	203	181	245	234	132	284
5	170	122	177	249	163	214	112	228	142	252
6	123	158	189	189	187	181	197	245	124	231
7	124	158	218	187	160	169	196	266	169	223
8	151	151	183	203	179	194	164	221	120	262
9	199	172	222	196	162	160	207	178	112	220
10	147	150	166	139	189	190	171	154	173	234
Total	*1,724.0*	*1,516.0*	*1,895.0*	*1,897.0*	*1,815.0*	*1,959.0*	*1,912.0*	*2,363.0*	*1,354.0*	*2,403.0*
Average ± S.E.	172.40± 12.39	151.60± 5.25	189.50± 8.11	189.70± 8.76	181.50± 6.01	195.90± 13.01	191.20± 12.40	236.30± 14.49	135.40± 6.48	240.30± 9.35
Sperm per testes	*6,896*	*6,064*	*7,580*	*7,588*	*7,260*	*7,836*	*7,648*	*9,452*	*5,416*	*9,612*

ตารางที่ 4.21 ค่าสถิติเบื้องต้นของปริมาณอสุจิของยุงที่ติดเชื้อเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรียในแต่ละสไลด์

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
T1	.126	10	.200(*)	.951	10	.680
T2	.214	10	.200(*)	.906	10	.256
T3	.177	10	.200(*)	.908	10	.266
T4	.216	10	.200(*)	.900	10	.219
T5	.177	10	.200(*)	.919	10	.346
U1	.218	10	.194	.816	10	.022
U2	.149	10	.200(*)	.955	10	.730
U3	.169	10	.200(*)	.962	10	.808
U4	.183	10	.200(*)	.929	10	.438
U5	.145	10	.200(*)	.971	10	.902

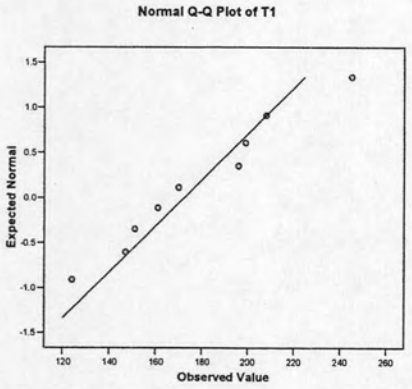
* This is a lower bound of the true significance.

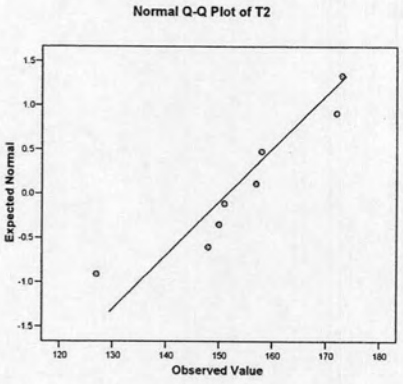
a Lilliefors Significance Correction

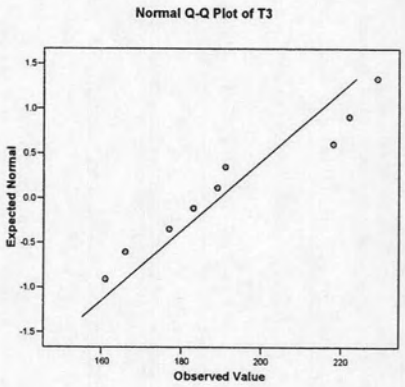
ตารางที่ 4.22 ค่าทางสถิติ Kolmogorov-Smirnov และ Shapiro-Wilk ที่กำหนด alpha เท่ากับ 0.05

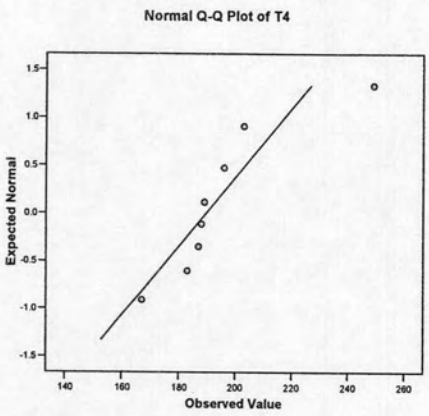
นอกจากนี้ข้อมูลในตารางแสดงที่ 4.23 สาธิตให้ทราบว่าข้อมูลในกราฟ Boxplots มีค่าข้อมูล Outlier หรือค่าที่แตกต่างจากค่าอื่นที่มีค่าเกาะกลุ่มกันอยู่ จากตำแหน่งของข้อมูล เช่น ควอไทด์หรือเปอร์เซ็นไทล์ในรูปของกราฟสี่เหลี่ยม Boxplots ซึ่งเป็นข้อมูลที่เบี่ยงเบนจากความจริงน้อยที่สุด ดังนั้นค่า Outlier จึงมีผลทำให้ลักษณะกราฟความโค้งปกติมีลักษณะเบ้

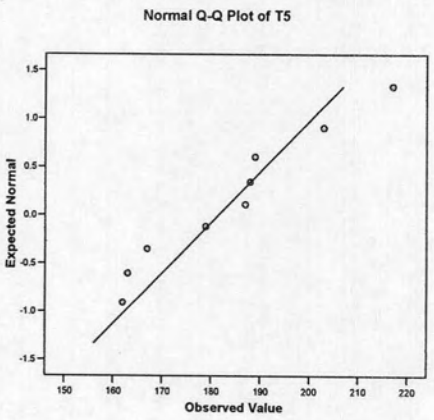
ส่วนเส้นตรงกลางของ Box หรือค่า median ของกราฟนั้นแสดงให้ทราบว่ากราฟ T4, U2, U3 และ U5 แสดงว่ากราฟไม่เบ้ และเมื่อพิจารณาความสูงของกราฟใน T3, T4, T5, U1 และ U2 มีความสูงใกล้เคียงกันแสดงว่ามีค่าเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 4.30 ที่มีค่าเฉลี่ยดังนี้ คือ 7,648, 7,836, 7,260, 7,588 และ 7,580 ตาลำดับ แต่ใน T2, T4 และ U1 มีค่า outlier ซึ่งเป็นค่าที่อาจจะสูงหรือต่ำกว่าช่วงข้อมูลที่เกาะกลุ่มระหว่างช่วงค่าต่ำและสูงมากแต่อาจเนื่องมาจากการไปเป็ตสารละลายอสุจิแบบสุ่มในระหว่างการหยดสารละลายอสุจิบนสไลด์ อาจมีผลทำให้ได้จำนวนอสุจิในแต่ละสไลด์มีค่าค่อนข้างแตกต่างกัน

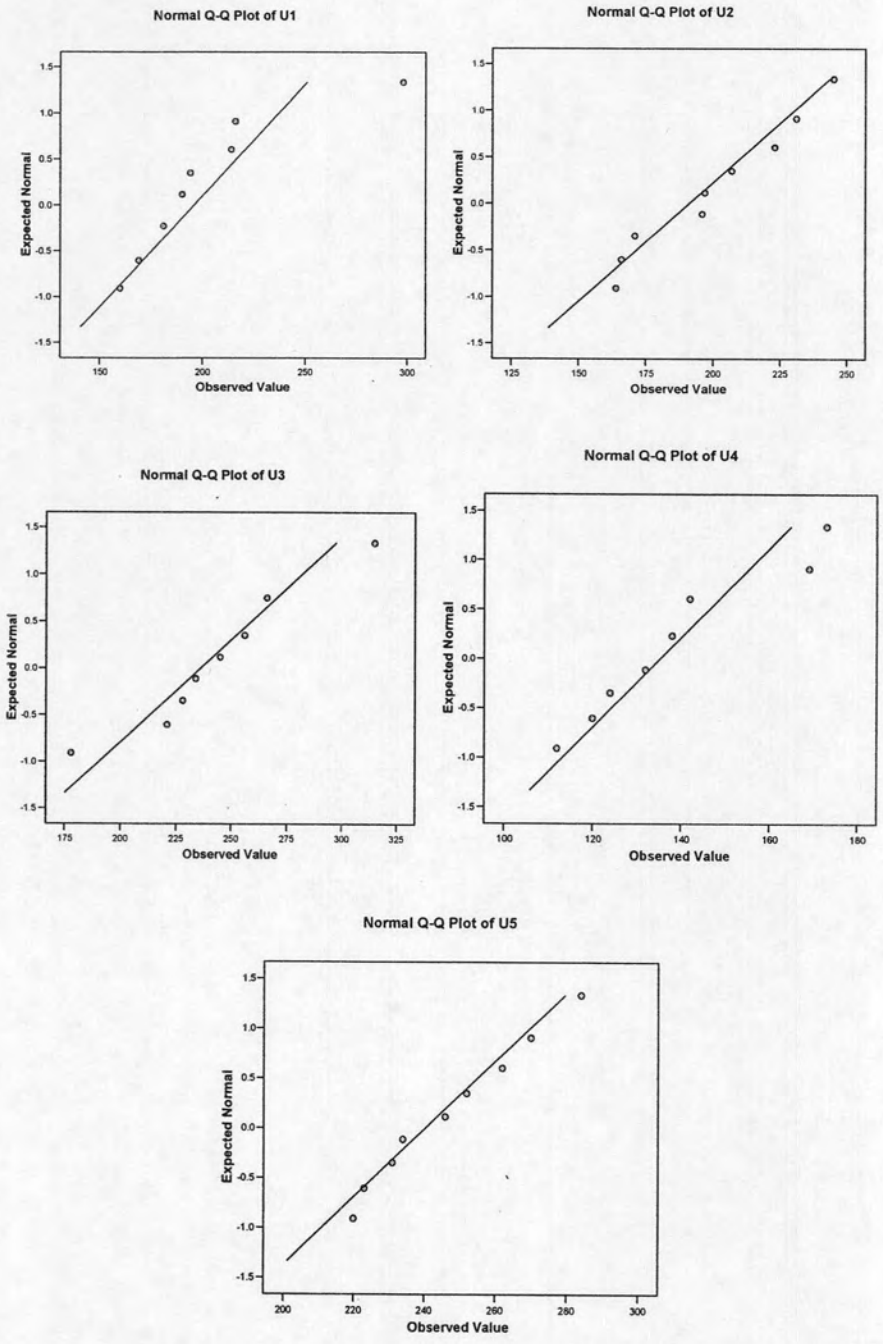

Normal Q-Q Plot of T1
Expected Normal
Observed Value


Normal Q-Q Plot of T2
Expected Normal
Observed Value

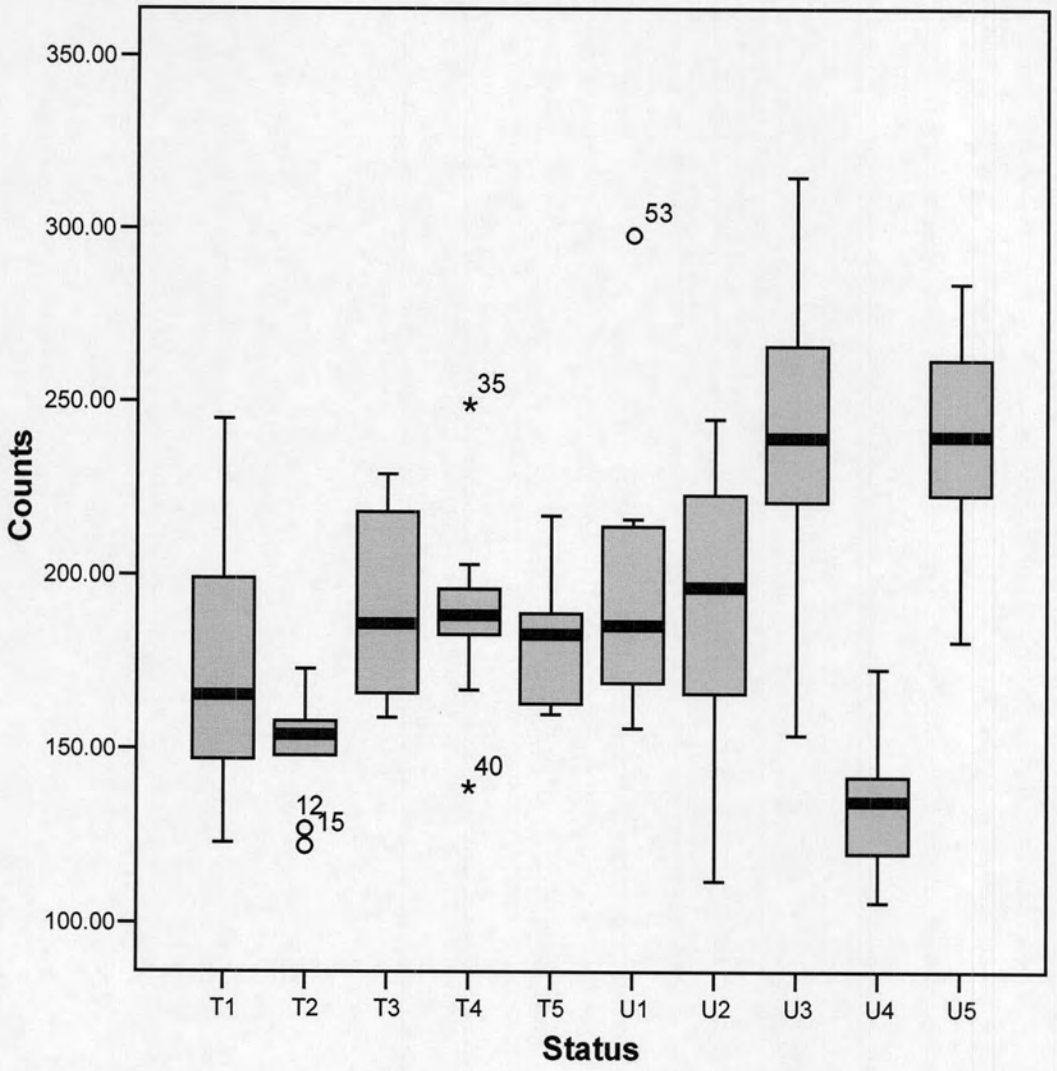

Normal Q-Q Plot of T3
Expected Normal
Observed Value


Normal Q-Q Plot of T4
Expected Normal
Observed Value


Normal Q-Q Plot of T5
Expected Normal
Observed Value



ภาพที่ 4.18 แสดงกราฟ Normal Q-Q ของข้อมูลยุงติดเชื้อ (T) และไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* (U)



ตารางที่ 4.23 แสดงกราฟ Boxplots ของข้อมูลยุงติดเชื้อ (T) และไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* (U)

6. การเปรียบเทียบอัตราการฟักไข่

การเปรียบเทียบอัตราการฟักไข่ยุงลายบ้าน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้งเพศผู้-เมียและคู่ผสมพันธุ์ที่ติดเชื้อเฉพาะเพศเมียเท่านั้น ซึ่งเปรียบเทียบกับคู่ผสมพันธุ์ที่ไม่ติดเชื้อทั้งเพศผู้-เมีย ดังแสดงผลในตารางที่ 4.24 โดยเปรียบเทียบอัตราการฟักไข่ด้วยค่าทางสถิติ Independent-sample t-test โดยกรณีที่คู่ทดสอบของตัวอย่างเป็นอิสระต่อกัน และแสดงผลอัตราการฟักไข่เป็นร้อยละ

เมื่อเทียบร้อยละการฟักไข่เฉลี่ยจากรุ่นที่ 2 และรุ่นที่ 4 ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ Transinfected×Transfected (46.63 ± 7.17) กับ Uninfected×Uninfected (55.83 ±11.00), คู่ระหว่าง Transinfected×Uninfeted (53.00 ± 6.87) กับ Uninfected×Uninfected (55.83 ±11.00) และ คู่ระหว่าง Transinfected×Transfected (46.63 ± 7.17) กับ Transinfected×Uninfeted (53.00 ± 6.87) พบว่าผลการเปรียบเทียบร้อยละการฟักไข่ของทั้งสามคู่มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งค่า Sig. (2-tailed) มากกว่าค่า alpha ที่กำหนด คือ .478, .544 และ .831 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ดังนั้นเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อัตราการฟักไข่ของยุงลายบ้าน

a.

Cross (female×male)	Total No. of eggs count	Total No. of eggs hatch	% egg hatch
a. Transinfected×Transfected	330	129	39.10
b. Transinfected×Uninfeted	409	167	40.83
c. Uninfected×Uninfected	315	173	54.92

b.

Cross (female×male)	Total No. of eggs count	Total No. of eggs hatch	% egg hatch
a. Transinfected×Transfected	482	295	61.20
b. Transinfected×Uninfeted	451	214	47.45
c. Uninfected×Uninfected	342	170	49.71

c.

Cross (female×male)	Total No. of eggs count	% egg hatch ± SE	Comparision	*P* Value
a. Transinfected×Transfected	812	46.63 ± 7.17	a,c	*.478*
b. Transinfected×Uninfeted	860	53.00 ± 6.87	a,b	*.544*
c. Uninfected×Uninfected	657	55.83 ±11.00	b,c	*.831*

จากตารางที่ 4.24 แสดงค่าสถิติการเปรียบเทียบอัตราการฟักไข่ยุง โดยตาราง 4.24a คือ อัตราการฟักยุงรุ่นที่ 2, ตาราง 4.24b คือ อัตราการฟักยุงรุ่นที่ 4 และ ตาราง 4.24c คือ ค่าทางสถิติเปรียบเทียบร้อยละของการฟักของยุงทั้งสามคู่