บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในภาคสนาม

3.1.1 สวิงจับแมลง

3.1.2 ขวดสเปรย์ฉีดน้ำ

3.1.3 กระป๋องควัน

3.1.4 ชุดป้องกันผึ้งต่อย

3.1.5 ขวดเก็บตัวอย่าง ขนาด 20 มิลลิลิตร

3.1.6 ปากคีบปลายทู่

3.1.7 Ethyl acetate (Merck, Germany)

3.1.8 Absolute ethanol (Merck, Germany)

3.1.9 สำลี

3.1.10 ถุงพลาสติกและยางรัด

3.1.11 กล้องถ่ายรูป Nikon FM2 (Nikon Co., Japan)

3.1.12 ฟิล์มถ่ายรูปสี 100 (Eastman Kodak Company, U.S.A.)

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.2.1 เครื่องมือ

3.2.1.1 Stereo microscope SZ40 (Olympus, Japan)

3.2.1.2 Incubator BM400 (Memmert GambH, Germany)

3.2.1.3 Balance 180A (Precisa Balances, Switzerland)

3.2.1.4 Stirrer/Hotplate model PC-320 (Corning, U.S.A.)

3.2.1.5 Vortex Genie-2 model G560E (Scientific Industries Inc., U.S.A.)

3.2.1.6 Personal computer (IBM)

3.2.1.7 กล้องวีดีโอวงจรปิดแบบขาวดำ CCTV Camera Panasonic รุ่น WV-BL 730/G (Panasonic, Japan)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 อุปกรณ์

3.2.2.1 โคมไฟ

3.2.2.2 กรรไกรผ่าตัดปลายแหลม (Bio Quip)

3.2.2.3 ปากคีบปลายแหลม (Grümed, Germany)

3.2.2.4 สไลด์ ขนาดกว้าง × ยาว 25.4 × 76.2 มิลลิเมตร และหนา 1-1.2 มิลลิเมตร (Sail brand, China)

3.2.2.5 กระจกปิดสไลด์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร (Menzel-Glaser, Germany)

3.2.2.6 เข็มปักแมลง (The shiga, Japan)

3.2.2.7 ถาดผ่าตัดแมลง

3.2.2.8 ใบมีดโกนพู่กัน เบอร์ 0

3.2.2.9 ขาตั้งหลอดทดลองและกรวยกรอง

3.2.2.10 บีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (Pyrex, U.S.A.)

3.2.2.11 ขวดใส่สารละลาย ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.2.2.12 แท่งแก้วสำหรับคนสารละลาย

3.2.2.13 หลอดหยดสาร

3.2.2.14 ถุงมือยาง

3.2.2.15 กล่องใส่สไลด์

3.2.2.16 Micrometer

3.2.3 สารเคมี

3.2.3.1 Gum arabic (Sigma, U.S.A.)

3.2.3.2 Chloral hydrate (Fluka, Switzerland)

3.2.3.3 Glycerine (BDH, England)

3.2.3.4 น้ำยาทาเล็บและน้ำยาเติม

3.2.4 วัสดุ

3.2.4.1 Microcentrifuge tube 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (Treff lab, Switzerland)

3.2.4.2 Whatman laboratory sealing film (Whatman Internation Ltd., England)

3.2.4.3 Filter paper whatman 4 MM (Whatman Internation Ltd., England)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4.4 ใบมีดโกน

3.2.4.5 กระดาษติดฉลาก

3.2.4.6 กระดาษ 100 ปอนด์

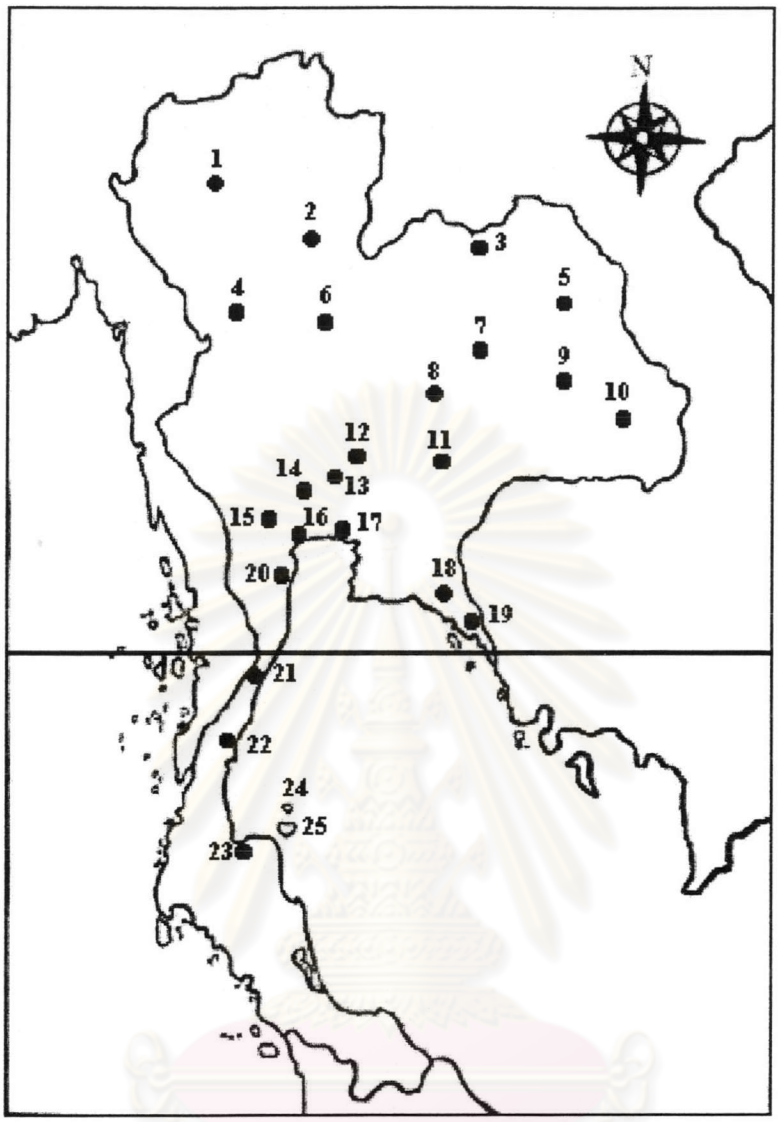
3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.3.1.1 เก็บตัวอย่างผึ้งงานของผึ้งมิ้ม *Apis florea* (รูปภาพที่ 6) 50 รัง ๆ ละ 15 ตัว (Ruttner, 1988) (รูปภาพที่ 7 และ ตารางที่ 1-2) ใส่ในขวดที่มี ethyl acetate เพื่อทำให้ผึ้งสลบ

รูปภาพที่ 6 แสดงรังของผึ้งมิ้ม *A. florea*

3.3.1.2 นำผึ้งที่สลบใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอยู่เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง แล้วติดฉลากแสดงชื่อผู้เก็บตัวอย่าง วันที่ และสถานที่



รูปภาพที่ 7 แผนที่ประเทศไทยแสดงตำแหน่งจังหวัดที่เก็บตัวอย่างผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

1 = เชียงใหม่ 2 = อุตรดิตถ์ 3 = หนองคาย
4 = ตาก 5 = สกลนคร 6 = พิษณุโลก
7 = ขอนแก่น 8 = ชัยภูมิ 9 = ร้อยเอ็ด
10 = อุบลราชธานี 11 = นครราชสีมา 12 = ลพบุรี
13 = อ่างทอง 14 = สุพรรณบุรี 15 = ราชบุรี
16 = สมุทรสงคราม 17 = สมุทรปราการ 18 = จันทบุรี
19 = ตราด 20 = เพชรบุรี 21 = ประจวบคีรีขันธ์
22 = ชุมพร 23 = สุราษฎร์ธานี 24 = เกาะพะงัน สุราษฎร์ธานี
25 = เกาะสมุย สุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 1 แสดงจังหวัดและจำนวนรังของตัวอย่างผึ้งมิ้มเมื่อแยกตามบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกันและหมู่เกาะ

บริเวณ	จังหวัด	จำนวนตัวอย่างผึ้งมิ้ม (รัง)
ภาคเหนือ	เชียงใหม่	2
	อุตรดิตถ์	1
	ตาก	1
	พิษณุโลก	1
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	หนองคาย	1
	สกลนคร	1
	ขอนแก่น	1
	ชัยภูมิ	1
	นครราชสีมา	2
	ร้อยเอ็ด	1
	อุบลราชธานี	1
ภาคกลาง	ลพบุรี	6
	อ่างทอง	1
	สุพรรณบุรี	1
	สมุทรปราการ	1
	สมุทรสงคราม	2
	ราชบุรี	2
ภาคตะวันออก	จันทบุรี	1
	ตราด	1
ภาคใต้	เพชรบุรี	1
	ประจวบคีรีขันธ์	6
	ชุมพร	3
	สุราษฎร์ธานี	2
หมู่เกาะ	เกาะพะงัน จังหวัดสุราษฎร์ธานี	4
	เกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี	6
รวม		**50**

ตารางที่ 2 แสดงจังหวัดและจำนวนรังของตัวอย่างผึ้งมิ้มเมื่อแยกตามบริเวณที่อยู่เหนือและใต้เส้นละติจูดที่ 12°N

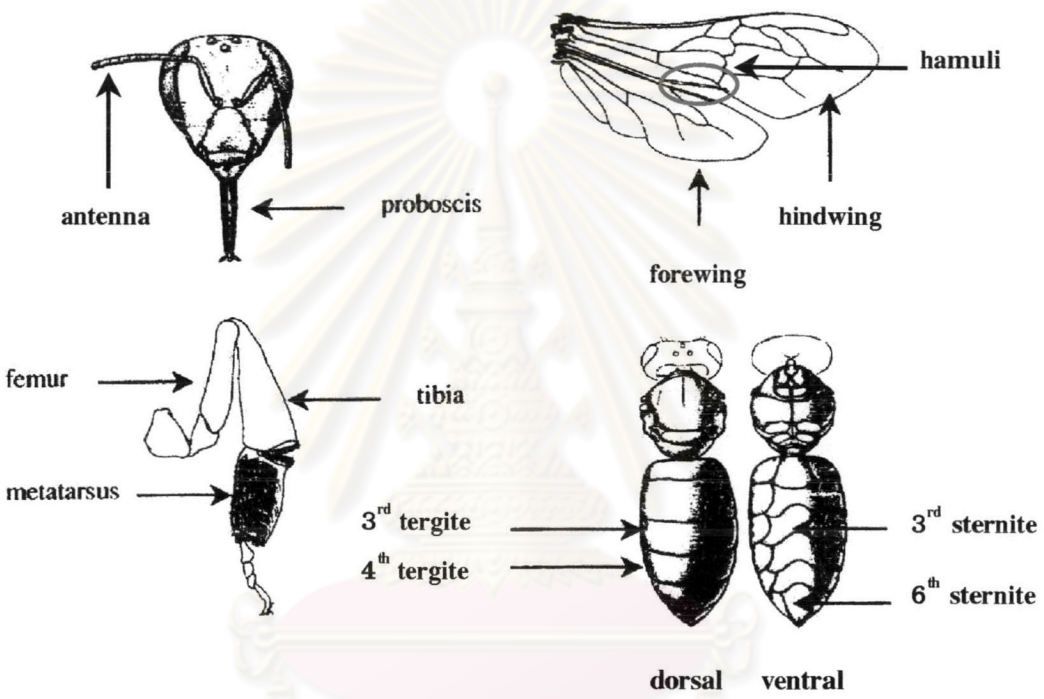
จังหวัด	จำนวนรังของผึ้งมิ้ม (รัง)	
	เหนือเส้นละติจูดที่ 12° เหนือ	ใต้เส้นละติจูดที่ 12° เหนือ
เชียงใหม่	2	-
อุตรดิตถ์	1	-
พิษณุโลก	1	-
ตาก	1	-
หนองคาย	1	-
ขอนแก่น	1	-
ชัยภูมิ	1	-
นครราชสีมา	2	-
ลพบุรี	6	-
อ่างทอง	1	-
สกลนคร	1	-
ร้อยเอ็ด	1	-
อุบลราชธานี	1	-
สมุทรปราการ	1	-
จันทบุรี	1	-
ตราด	1	-
สุพรรณบุรี	1	-
สมุทรสงคราม	2	-
เพชรบุรี	1	-
ราชบุรี	2	-
ประจวบคีรีขันธ์	1	5
ชุมพร	-	3
สุราษฎร์ธานี	-	2
เกาะสมุย สุราษฎร์ธานี	-	6
เกาะพะงัน สุราษฎร์ธานี	-	4
รวม	**30**	**20**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 การผ่าตัด

3.3.2.1 นำผึ้ง 15 ตัว จากขวดเก็บตัวอย่าง 1 ขวด วางบนถาดผ่าตัดที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์บรรจุอยู่เพื่อไม่ให้ตัวอย่างแห้งและง่ายต่อการผ่าตัด โดยทำการผ่าตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)

3.3.2.2 ผ่าตัดผึ้งแต่ละตัวเพื่อเอาส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ หนวด โพรบอสซิส ปีกหน้า ปีกหลัง ขาหลัง สเตอร์ไนต์ที่ 3 และ 6 และเทอร์ไกต์ที่ 3 และ 4 (รูปภาพที่ 8) โดยมีขั้นตอนการผ่าตัดดังนี้



รูปภาพที่ 8 แสดงส่วนต่าง ๆ ของผึ้งที่ทำการผ่าตัด

3.3.2.2.1 ใช้เข็มปักแมลงแทงลงบนด้านท้องของอกผึ้ง เพื่อตรึงผึ้งบนถาดผ่าตัด

3.3.2.2.1.1 ใช้ปากคีบจับบริเวณพรีเมนตัม (prementum) เพื่อใช้กรรไกรและใบมีดตัดเลาะเนื้อเยื่อรอบ ๆ โพรบอสซิสอย่างระมัดระวัง แล้วดึงโพรบอสซิสออกมาอย่างสมบูรณ์ ซึ่งประกอบด้วย โพสท์เมนตัม พรีเมนตัม และกลอสเส (glossae)

3.3.2.2.1.2 ใช้ปากคีบจับบริเวณปล้องของฟีเมอร์ (femur) ของขาหลังด้านขวา เพื่อใช้กรรไกรตัดบริเวณปล้องทรอแคนเตอร์ (trochanter) ของขาหลังด้านขวา ใช้ใบมีดตัดแยกบริเวณรอยต่อของทรอแคนเตอร์กับฟีเมอร์ รอยต่อของทิเบีย (tibia) กับเมตาทาร์ซัส (metatarsus) และรอยต่อของเมตาทาร์ซัสกับ

ทาร์ซัส (tarsus) จะได้ส่วนที่ต้องการ 2 ส่วนคือ ฟีเมอร์ติดอยู่กับทิเบีย และเมตาทาร์ซัส

3.3.2.2.2 ใช้เข็มปักแมลงแทงลงบนด้านหน้าของหัวผึ้ง เพื่อตรึงผึ้งบนถาดผ่าตัด

3.3.2.2.2.1 ใช้ปากคีบจับบริเวณโคนของสเคปของหนวดด้านขวา ใช้มีดเลาะเนื้อเยื่อบริเวณใต้สเคป เพื่อแยกหนวดออกมา

3.3.2.2.2.2 ใช้เข็มปักแมลงแทงลงบนด้านหลังของอกผึ้ง ใช้ปากคีบจับบริเวณปีกหน้าด้านขวา เพื่อใช้กรรไกรและใบมีดตัดเลาะบริเวณใต้ฐานปีก โดยระวังไม่ให้จุดเชื่อมต่อเล็ก ๆ ที่ฐานปีกขาดหายไป

3.3.2.2.2.3 ใช้ปากคีบสอดเข้าไปใต้เทอร์ไกต์ที่ 2 และ 3 เพื่อฉีกเนื้อเยื่อที่ขอบเทอร์ไกต์ที่ 3 ให้ขาดออกจนกระทั่งใช้ปากคีบดึงเทอร์ไกต์ที่ 3 ออกมาได้ ใช้ปากคีบและพู่กันเขี่ยและปัดให้เนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการออกไป

3.3.2.2.2.4 ใช้ปากคีบสอดเข้าไปใต้เทอร์ไกต์ที่ 4 เพื่อฉีกเนื้อเยื่อที่ขอบเทอร์ไกต์ที่ 4 ให้ขาดออกจนกระทั่งใช้ปากคีบดึงเทอร์ไกต์ที่ 4 ออกมาได้ ใช้ปากคีบและพู่กันเขี่ยและปัดให้เนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการออกไป

3.3.2.2.2.5 ใช้ปากคีบสอดเข้าไปใต้เหล็กในและสเตอร์ไนต์ที่ 6 เพื่อฉีกเนื้อเยื่อที่ขอบสเตอร์ไนต์ที่ 6 ให้ขาดออกจนกระทั่งดึงสเตอร์ไนต์ที่ 6 ออกมาได้ ใช้ปากคีบและพู่กันเขี่ยและปัดให้เนื้อเยื่อกับไขผึ้งที่ไม่ต้องการออกไป

3.3.2.2.2.6 ใช้ปากคีบสอดเข้าไปใต้สเตอร์ไนต์ที่ 4 และ 3 เพื่อฉีกเนื้อเยื่อที่ขอบสเตอร์ไนต์ที่ 3 ให้ขาดออกจนกระทั่งดึงสเตอร์ไนต์ที่ 3 ออกมาได้ ใช้ปากคีบและพู่กันเขี่ยและปัดให้เนื้อเยื่อกับไขผึ้งที่ไม่ต้องการออกไป

<u>หมายเหตุ</u> ทุกขั้นตอนของการผ่าตัดต้องทำอย่างระมัดระวัง เพราะส่วนต่าง ๆ ของผึ้งสามารถแตกหักและฉีกขาดได้ง่าย

3.3.2.3 เก็บส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาของผึ้ง 1 ตัว ใส่รวมกันใน microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์บรรจุอยู่ ส่วนที่เหลือเก็บใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์บรรจุอยู่ และติดฉลากตัวอย่างทั้งสองหลอดเหมือนกัน

3.3.3 การติดตัวอย่างลงบนสไลด์

3.3.3.1 ติดตัวอย่างลงบนสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3.3.3.2 เว้นที่ว่างจากขอบสไลด์ด้านกว้างเข้ามาประมาณด้านละ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อสามารถนำสไลด์ใส่ในช่องของกล่องเก็บสไลด์ได้ แล้วแบ่งพื้นที่ส่วนที่เหลือออกเป็น 4 ส่วน เพื่อติดตัวอย่างของส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษา โดยแบ่งออกเป็นดังนี้

3.3.3.2.1 ปีกหน้าและหลัง และสเตอร์ไนต์ที่ 3

3.3.3.2.2 เทอร์ไกต์ที่ 3 และ 4 และสเตอร์ไนต์ที่ 6

3.3.3.2.3 โพรบอสซิสและหนวด

3.3.3.2.4 ฟีเมอร์กับทิเบีย และเมตาทาร์ซัส

3.3.3.2.5 เขย่า microcentrifuge tube ที่เก็บส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาด้วยเครื่อง vortex เพื่อแยกสิ่งสกปรกออกไป

3.3.3.3 หยดน้ำยาฮอยเออร์ (Hoyer's Medium) (ภาคผนวก 1) 1-2 หยดลงบนแผ่นสไลด์ขนาด 25.4 × 76.2 มิลลิเมตร นำส่วนต่าง ๆ ที่จัดแบ่งไว้มาวางบนน้ำยา ใช้ปากคีบช่วยจัดตัวอย่างให้อยู่ในท่าที่ปกติ

3.3.3.4 ใช้ปากคีบจับขอบกระจกปิดสไลด์ขนาด 15 มิลลิเมตร แล้วค่อย ๆ ปล่อยกระจกปิดสไลด์ลงไปเบา ๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ ใช้พู่กันกดบนกระจกปิดสไลด์ให้ชิดตัวอย่างเพื่อไม่ให้ตัวอย่างเคลื่อนที่หรือบิด

3.3.3.5 สำหรับการติดฟีเมอร์กับทิเบีย และเมตาทาร์ซัส จะหนุนกระจกปิดสไลด์ด้วยกระดาษ 100 ปอนด์ ซึ่งตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร แล้วเจาะรูเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อวางฟีเมอร์กับทิเบีย และเมตาทาร์ซัสในช่องว่างนี้

3.3.3.6 ติดฉลากบนแผ่นสไลด์ที่ติดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ก่อนนำไปวางบน hot plate เพื่อไล่ฟองอากาศ

3.3.3.7 นำแผ่นสไลด์เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C นานประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้น้ำระเหยออกไป

3.3.3.8 นำแผ่นสไลด์ออกจากตู้อบ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นเพื่อให้แผ่นสไลด์กลับคืนสู่สภาพเดิม ก่อนที่จะปิดขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ ทิ้งไว้จนแห้ง แล้วทำซ้ำ 2-3 ซ้ำ เพื่อป้องกันความชื้นในอากาศเข้าไปในน้ำยาฮอยเออร์ และเก็บสไลด์ใส่ในกล่องเก็บสไลด์

3.3.4 การวัดตัวอย่าง

3.3.4.1 ส่องดูแผ่นสไลด์ด้วย stereo microscope และถ่ายภาพด้วยโปรแกรม Dazzle Digital Video Creator & Digital Photo Marker 3.6 เพื่อบันทึกภาพลงในคอมพิวเตอร์ โดยใช้กำลังขยายต่าง ๆ กัน ดังนี้

3.3.4.1.1 กำลังขยาย 1 เท่า ใช้ถ่ายภาพปีกหน้า

3.3.4.1.2 กำลังขยาย 1.2 เท่า ใช้ถ่ายภาพปีกหลัง เทอร์ไกต์ที่ 3 และ 4

3.3.4.1.3 กำลังขยาย 1.5 เท่า ใช้ถ่ายภาพสเตอร์ไนต์ที่ 3

3.3.4.1.4 กำลังขยาย 2 เท่า ใช้ถ่ายภาพโพรบอสซิส

3.3.4.1.5 กำลังขยาย 2.5 เท่า ใช้ถ่ายภาพหนวด สเตอร์ไนต์ที่ 6 ฟีเมอร์กับทิเบีย และเมตาทาร์ซัส

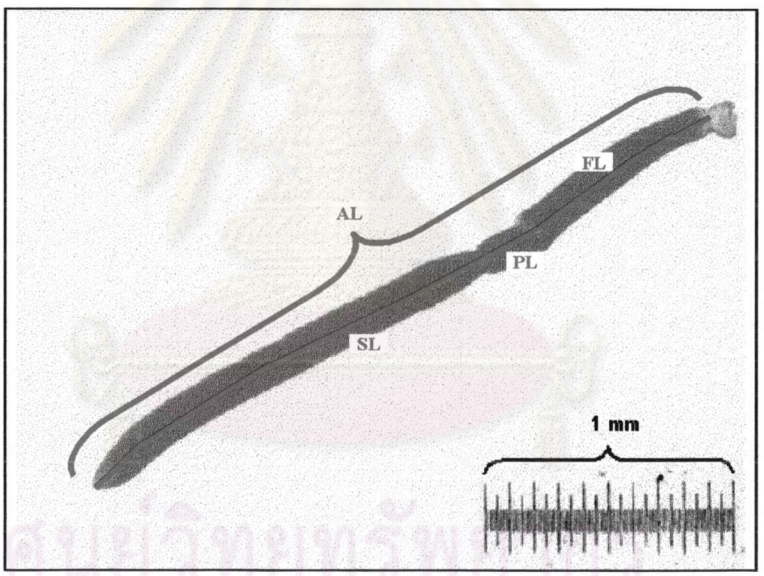
หมายเหตุ กำลังขยายที่ใช้อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสมของขนาดตัวอย่าง

3.3.4.2 ใช้โปรแกรม Image-Pro Plus 3.00 เพื่อวัดขนาดความกว้าง ความยาวและมุมของส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผึ้งมิ้มแต่ละตัว (รูปภาพที่ 9-18) รวมทั้งหมด 22 ลักษณะ (Ruttner, 1988; Verma *et al.*, 1994; Hepburn *et al.*, 2001) ได้แก่

1. forewing-length of radial cell (RCL)
2. length of apical portion of radial cell (ARCL)
3. length of forewing (FWL)
4. angle 34 of venation (AN34)
5. angle 35 of venation (AN35)
6. angle 37 of venation (AN37)
7. hindwing-length of basal portion of radial vein (BRVL)
8. number of hamuli (NH)
9. length of vannal lobe (VL)
10. hind leg-length of femur (FEL)
11. length of tibia (TL)
12. length of metatarsus (ML)
13. tongue-total length of tongue (TONGL)

14. length of labial palp (LPL)
15. abdomen-total length of 3rd tergite (TL3)
16. length of dark band of 4th tergite (DTL4)
17. total length of 4th tergite (TL4)
18. length of wax mirror on 3rd sternite (WSL3)
19. total length of 3rd sternite (SL3)
20. length or depth of 6th sternite (SL6)
21. antenna-length of flagellum (FL)
22. total length of antenna (AL)

แล้วบันทึกข้อมูลจากการวัดลงในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ทางสถิติ

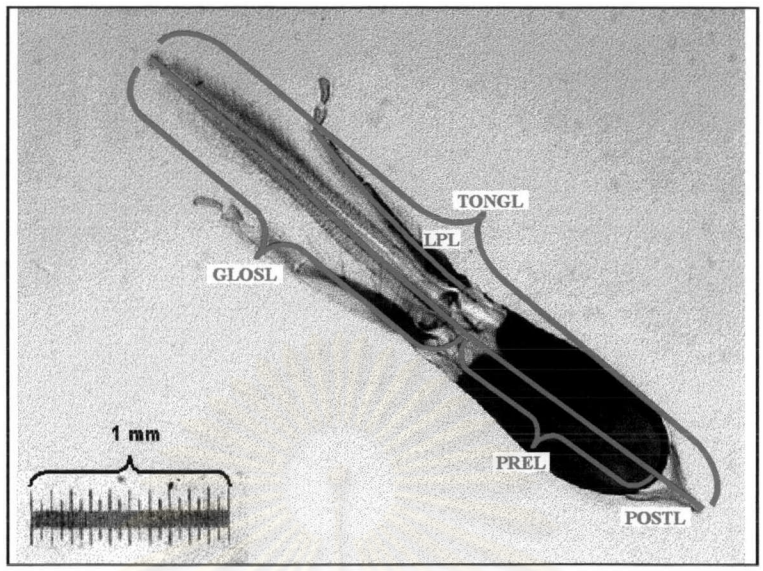


รูปภาพที่ 9 แสดงหนวดผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

SL = length of scape; PL = length of pedicel

FL = length of flagellum

AL = (SL+PL+FL) = total length of antenna

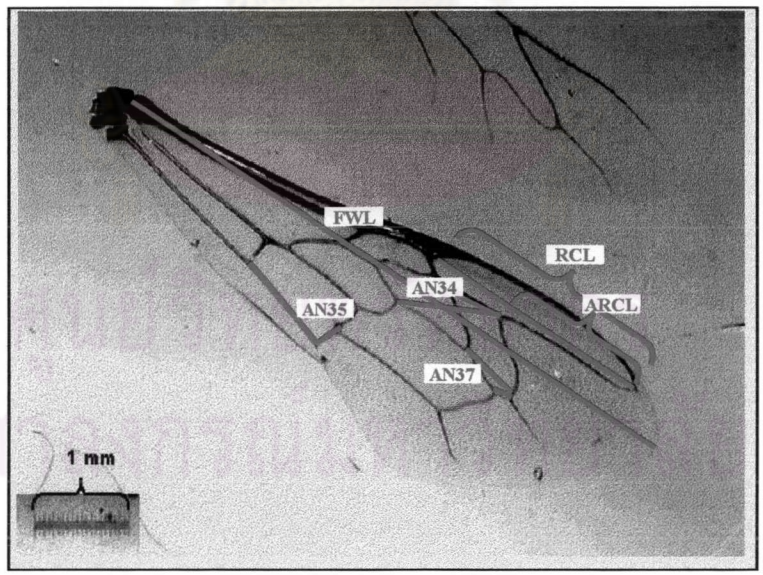


รูปภาพที่ 10 แสดงโพรบอสซิสผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

POSTL = length of postmentum; PREL = length of prementum

GLOSL = length of glossa; LPL = length of labial palp

TONGL = (POSTL+PREL+GLOSL) = tongue–total length of tongue



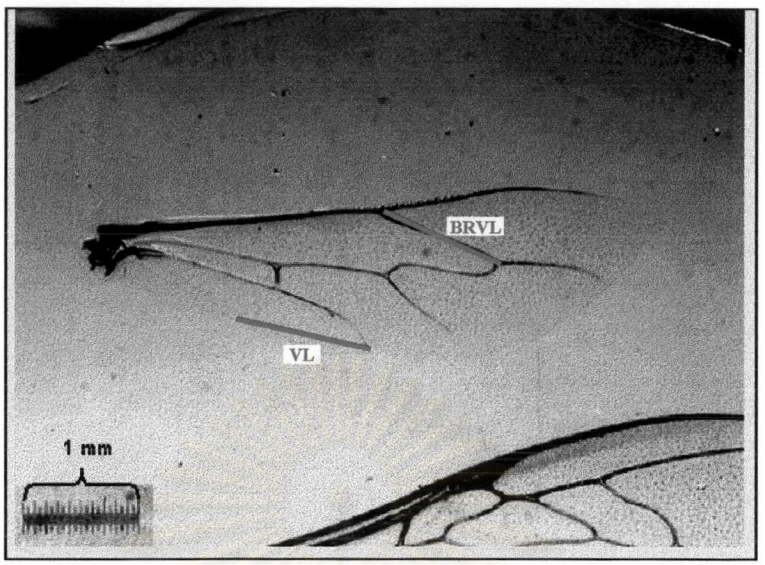
รูปภาพที่ 11 แสดงปีกหน้าผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

FWL = length of forewing; RCL = length of radial cell

ARCL = length of apical portion of radial cell

AN34 = angle 34 of venation; AN35 = angle 35 of venation

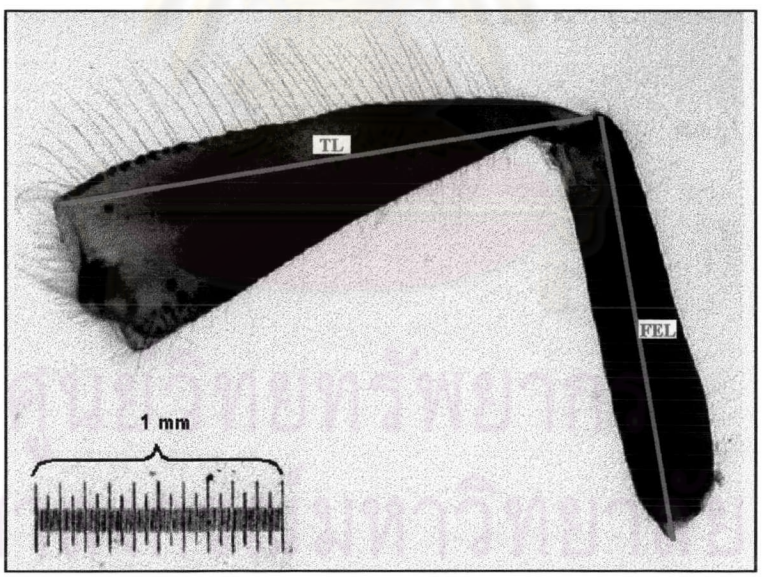
AN37 = angle 37 of venation



รูปภาพที่ 12 แสดงปีกหลังผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

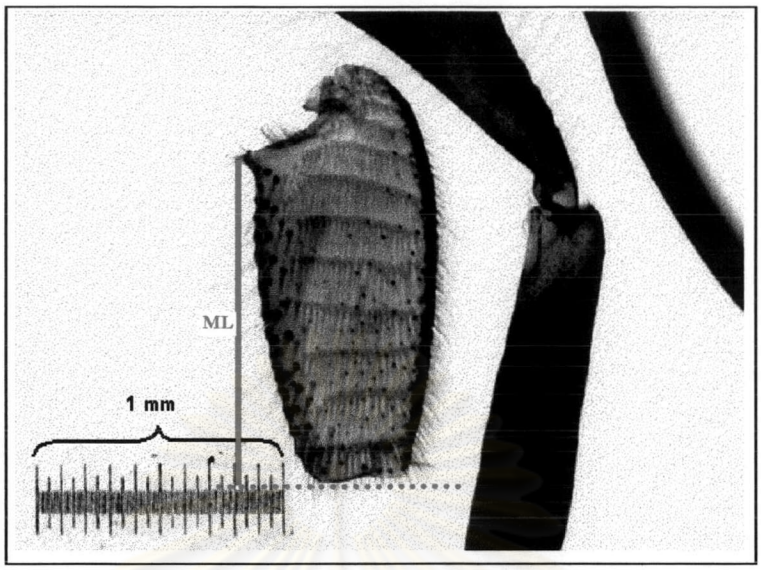
BRVL = length of basal portion of radial vein

VL = length of vannal lobe



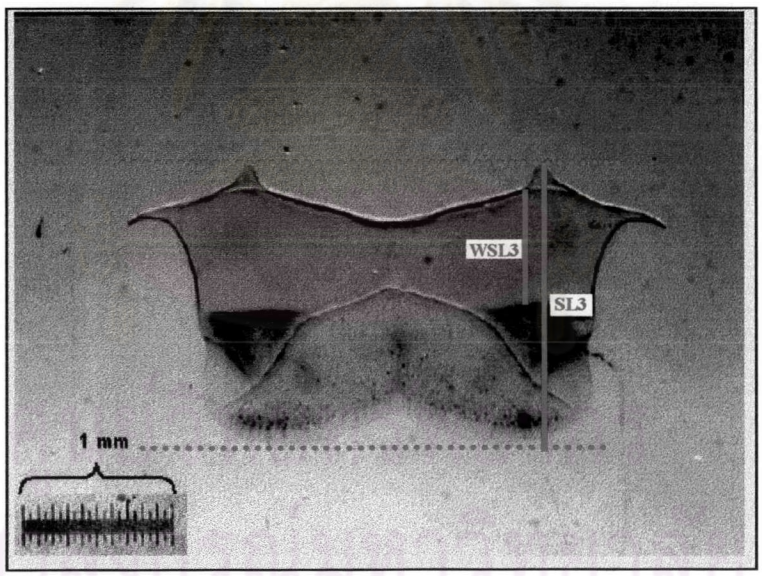
รูปภาพที่ 13 แสดงฟีเมอร์และทิเบียผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

FEL = length of femur; TL = length of tibia



รูปภาพที่ 14 แสดงเมตาทาร์ซัสผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

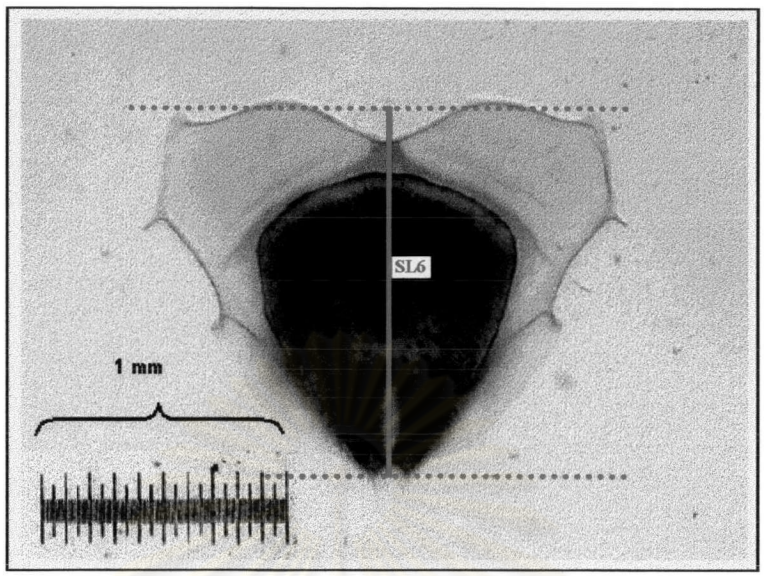
ML = length of metatarsus; MW = width of metatarsus



รูปภาพที่ 15 แสดงสเตอร์ไนต์ที่ 3 ของผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

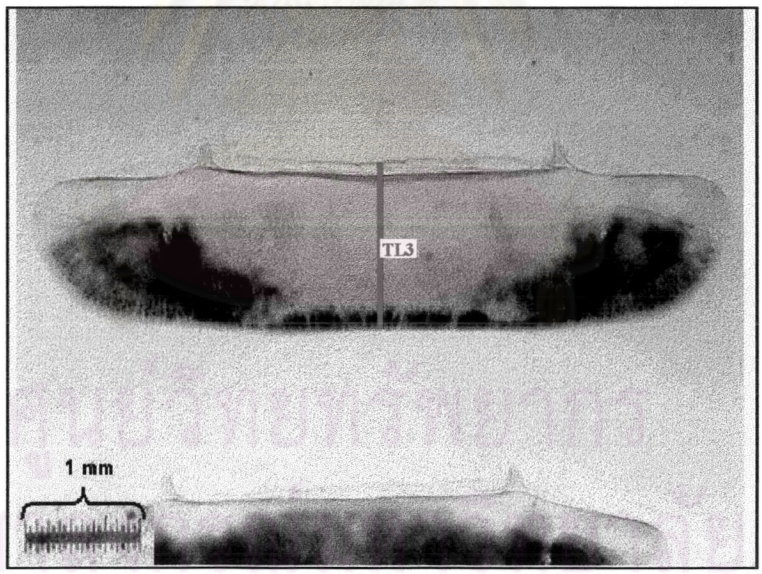
SL3 = abdomen–total length of 3rd sternite

WSL3 = length of wax mirror on 3rd sternite



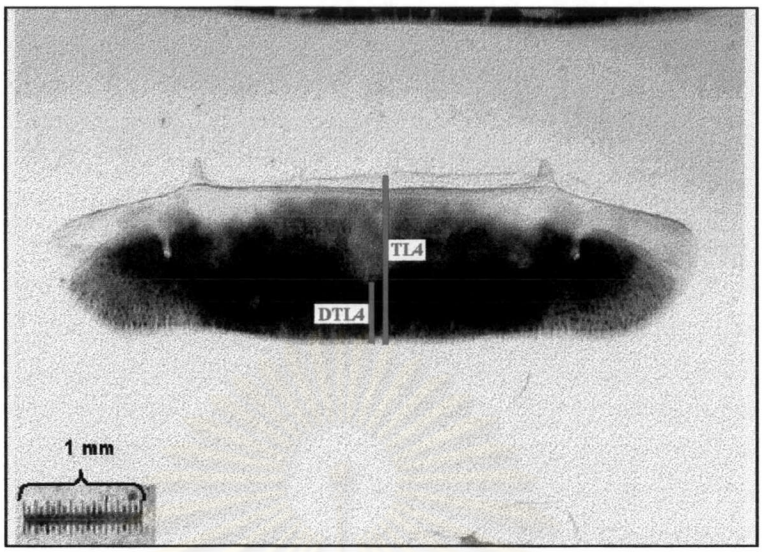
รูปภาพที่ 16 แสดงสเตอร์ไนต์ที่ 6 ของผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

SL6 = length or depth of 6th sternite



รูปภาพที่ 17 แสดงเทอร์ไกต์ที่ 3 ของผึ้งงานของผึ้งมิ้ม

TL3 = total length of 3rd tergite



รูปภาพที่ 18 แสดงเทอร์ไกต์ที่ 4 ของผึ้งงานของผึ้งมิ้ม
DTL4 = length of dark band of 4th tergite
TL4 = total length of 4th tergite

3.3.5 นำข้อมูลที่ได้จากการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาในข้อ 3.3.4.2 ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS for Windows 10.0

3.3.5.1 จำแนกกลุ่มตัวแปรด้วยสถิติ Factor Analysis

3.3.5.1.1 การวิเคราะห์ปัจจัย (Factor Analysis) ครั้งที่ 1 เพื่อคัดเลือกตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันมากไว้สำหรับการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 ซึ่งอาจจะเป็นความสัมพันธ์ในทางบวกหรือลบก็ได้ โดยพิจารณาจากตัวแปรที่มีค่าสัมประสิทธิ์ (factor loading) มากกว่าค่าสมบูรณ์ 0.6

3.3.5.1.2 การวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 จะนำตัวแปรที่ถูกคัดเลือกไว้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 1 มาจำแนกกลุ่มหรือรวมตัวแปรหลาย ๆ ตัวที่มีความสัมพันธ์กันไว้ในกลุ่มหรือปัจจัย (factor) เดียวกัน โดยพิจารณาจากตัวแปรที่มีค่าสัมประสิทธิ์ (factor loading) ที่แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรกับกลุ่มของปัจจัยใหม่มากกว่าค่าสมบูรณ์ 0.6 ทั้งนี้กลุ่มของปัจจัยใหม่ที่ได้จัดเป็นตัวแปรใหม่ที่สามารถหาค่าข้อมูลของตัวแปรใหม่ได้เรียกว่า factor score จากนั้นใช้ตัวแปรใหม่นี้เป็นตัวแปรอิสระสำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

3.3.5.1.3 จับคู่ค่า factor score ของตัวแปรหรือปัจจัยใหม่ที่ได้จากข้อ 3.3.5.1.2 ไปเขียนกราฟการกระจายเพื่อจำแนกกลุ่มของตัวอย่างผึ้งมิ้มตาม

สภาพภูมิอากาศและหมู่เกาะ และเขียนกราฟการกระจายเพื่อจำแนกกลุ่มของตัวอย่างผึ้งมิ้มที่อยู่บริเวณเหนือและใต้เส้นละติจูดที่ 12°N

3.3.5.2 จำแนกกลุ่มตัวอย่างผึ้งมิ้มด้วยสถิติ Cluster Analysis โดยการวัดความคล้ายหรือระยะห่างของตัวอย่างแต่ละคู่ ถ้าตัวอย่างคู่ใดมีระยะห่างระหว่างคู่น้อย แสดงว่าคู่นั้นอยู่ใกล้กันหรือมีความคล้ายกันควรจัดให้อยู่ในกลุ่ม (cluster) เดียวกัน และใช้หลักเกณฑ์ในการรวมกลุ่มแบบ Between-groups linkage หรือที่เรียกว่า Average linkage between groups หรือที่เรียกว่า UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) ซึ่งจะคำนวณหาระยะห่างเฉลี่ยของตัวอย่างทุกคู่ โดยที่ตัวอย่างหนึ่งอยู่ในกลุ่มที่ i ส่วนอีกตัวอย่างอยู่ในกลุ่มที่ j ซึ่ง $i \neq j$ ถ้ากลุ่มที่ i มีระยะห่างเฉลี่ยจากกลุ่มที่ j สั้นกว่าระยะห่างจากกลุ่มอื่น จะนำกลุ่มที่ i และ j มารวมกันเป็นกลุ่มเดียวกัน จากนั้นเขียนกราฟเดนโดรแกรม (Dendrogram) แสดงการรวมกันของกลุ่ม โดยเปลี่ยนหน่วยระยะห่างของข้อมูลเดิมให้มีค่าอยู่ในช่วง 1 ถึง 25 ซึ่งตัวแปรที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างผึ้งมิ้มนั้นจะใช้ตัวแปรใหม่ที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 ในข้อ 3.3.5.1.2

3.3.5.3 วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีปัจจัยเดียว (One-Way ANOVA) ด้วยสถิติ F-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ละลักษณะของตัวอย่างผึ้งมิ้มตามสภาพภูมิอากาศและหมู่เกาะ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือตัวแปรที่มีค่า factor loading มากกว่าค่าสมบูรณ์ 0.6 ที่ถูกคัดเลือกมาจากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 1 ในข้อ 3.3.5.1.1 ซึ่งการวิเคราะห์ความแปรปรวนนี้มีเงื่อนไขอยู่ 3 ประการ คือ

3.3.5.3.1 การสุ่มตัวอย่างจะต้องสุ่มอย่างเป็นอิสระกัน

3.3.5.3.2 สุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ โดยจะทดสอบด้วย Kolmogorov-Smirnov Test (K-S Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) ในกรณีที่ไม่ทราบค่าเฉลี่ยและค่าแปรปรวนของประชากร จึงต้องใช้ค่าเฉลี่ยและค่าแปรปรวนของตัวอย่างแทน และทดสอบด้วย Shapiro-Wilk ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)ในกรณีที่ทราบหรือไม่ทราบค่าเฉลี่ยหรือค่าแปรปรวนของประชากรก็ได้ แต่ขนาดตัวอย่างต้องไม่เกิน 50 หน่วย

3.3.5.3.3 ค่าแปรปรวนของแต่ละตัวอย่างต้องเท่ากัน โดยจะทดสอบด้วย Levene's Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

3.3.5.4 ทดสอบการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple Comparisons) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ละลักษณะพร้อมกันครั้งละหลาย ๆ คู่ของตัวอย่างผึ้งมิ้มตามสภาพภูมิอากาศและหมู่เกาะด้วยสถิติ Student-Newman-Keuls (SNK) Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) ซึ่งจะนำค่าเฉลี่ยตัวอย่างมาเรียงลำดับจากน้อยไปมาก จากนั้นจัดกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย