ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแมลงวันหัวเขียว,*Chrysomya rufifacies* (Macquart)

Effect of Temperatures on Development of Blow Fly,*Chrysomya rufifacies* (Macquart)

สุรศักดิ์ ยานมณี*

Surasuk Yanmanee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 13 November 2015

Accepted : 5 April 2016

Published online : 8 April 2016

RETRACTED

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya rufifacies* ที่มีความสำคัญต่อนิติวิทยาศาสตร์ที่อุณหภูมิ 15, 18, 27, 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัยในแต่ละอุณหภูมิใช้เวลาเฉลี่ย 618.62±33.84, 547.52±27.59, 216.6±10.64, 187.09±10.33, 168.03±4.69, 172.63±9.31 ชั่วโมง ตามลำดับ (p<0.0001) ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส แมลงวันหัวเขียวไม่สามารถเจริญพัฒนาจากดักแด้เป็นตัวเต็มวัยได้ ความยาวของตัวหนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.0001) อุณหภูมิต่ำสุดที่แมลงระยะไข่จนถึงเข้าสู่ระยะดักแด้สามารถเจริญได้เท่ากับ 11 องศาเซลเซียส จากสมการเส้นตรง y = 0.0007x - 0.0077;R^2 = 0.9906 และ ระยะไข่จนถึงเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยเท่ากับ 9.5 องศาเซลเซียส จากสมการเส้นตรง y = 0.0002x - 0.0019; R^2 = 0.9589 ค่าความร้อนสะสมเป็นวันที่แมลงใช้ในการเจริญที่ 15, 18, 27, 30, 33 และ 36 องศาเซลเซียส เท่ากับ 128.88, 182.51, 153.68, 155.91, 161.03 และ 187.02 ตามลำดับ การเจริญของแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* นำไปสร้างกราฟ isomegalen และ isomorphen diagrams เพื่อใช้ในการคาดประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยใช้แมลง

คำสำคัญ: การประมาณระยะเวลาหลังการตาย นิติกีฏวิทยาศาสตร์ แมลงวันหัวเขียว

Abstract

The effect of temperature on development of the forensically important blow fly, *Chrysomya rufifacies* were studied at seven different constant temperatures (15, 18, 27, 30, 33, 36 and 39 degree Celsius). Developmental times were significantly positively influenced by rearing (p<0.0001). Times (mean±SD) were 618.62±33.84, 547.52±27.59, 216.6±10.64, 187.09±10.33, 168.03±4.69 and 172.63±9.31 hours for 15, 18, 27, 30, 33 and 36 degrees Celsius respectively. No pupae emerged at 39 degrees Celsius. Larval length was significantly differences (p<0.0001). The threshold temperature estimated from the linear regression was 11 degrees Celsius for oviposition to pupariation; y = 0.0007x - 0.0077; R^2 = 0.9906. While it was 9.5 for oviposition to eclosion; y = 0.0002x - 0.0019; R^2 = 0.9589. The accumulated degree days (ADD) at 15, 18, 27, 30, 33 and 36 degrees Celsius were 128.88, 182.51, 153.68, 155.91, 161.03 and 187.02, respectively. Additionally, the isomegalen and isomorphen diagrams were generated to provide for Post-mortem interval (PMI) estimates.

Keywords: *Chrysomya rufifacies*, Blow flies, Forensic entomology, PMI.

***Corresponding author. E-mail** : surasuk_yan@hotmail.com

บทนำ

นิติกีฏวิทยา (forensic entomology) เป็นการนำความรู้ทางด้านชีววิทยาการเจริญของแมลงและสัตว์ขาข้อมาช่วยสนับสนุนกระบวนการสืบสวนสอบสวนทางกฎหมาย (Goff, 1993) การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยใช้แมลงในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ สามารถบ่งบอกกรอบเวลาของการตายได้แม่นยำ และช่วยในการสรุปสำนวนคดีร่วมกับหลักฐานชิ้นอื่น (Anderson, 2000)

แมลงวันหัวเขียว (blow flies) มีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) การเจริญแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ (egg) ตัวหนอน (larva) ดักแด้ (pupa) และ ตัวเต็มวัย (adult) การเจริญเติบโตของแต่ละระยะนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่จะส่งผลสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแมลงวันหัวเขียว เนื่องจากแมลงเป็นสัตว์เลือดเย็น (poikilothermic) อุณหภูมิของร่างกายเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม อัตราการเจริญจึงขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม อุณหภูมิจึงเป็นตัวแปรสำคัญในการเจริญ ทำให้อัตราการเจริญสูงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีอัตราการเจริญต่ำเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจนถึงจุดวิกฤต (Lower threshold) แมลงจะไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันในแมลงแต่ละชนิด และมีความสำคัญต่อการคำนวณในการประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยใช้แมลง (Post mortem interval, PMI) นักนิติกีฏวิทยามักจะใช้ 0 องศาเซลเซียส ในการคำนวณ PMI และค่าที่นิยมใช้สำหรับแมลงทุกชนิดคือ 6 และ 10 องศาเซลเซียส หรือ B6 (base temperature of 6 degree Celsius) และ B10 (base temperature of 10 degree Celsius) ยังมีการศึกษาส่วนน้อยที่หาค่าอุณหภูมิต่ำสุดที่แมลงใช้ในการเจริญเติบโต (base temperatures) ที่จำเพาะต่อแมลงแต่ละชนิดที่มีความสำคัญต่องานนิติกีฏวิทยาศาสตร์ มีการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แมลงวันหัวเขียว *Phormia regina* Meigen (Diptera: Calliphoridae) ไม่สามารถเจริญพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ (Byrd & Allen, 2001) ขณะที่แมลงวันหัวเขียว *Calliphora vicina* Robi-neau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) มีค่าอุณหภูมิต่ำสุดที่ใช้เจริญเติบโต อยู่ที่ 1 องศาเซลเซียส มาร์เชนโก (Marchenko, 2001) ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิต่ำสุดที่แมลงใช้ในการเจริญเติบโตของแมลงวันชนิดต่าง ๆ พบว่า แมลงวันหัวเขียว *C. vicina* ใช้ 2.0 องศาเซลเซียส, 3.0 องศาเซลเซียส สำหรับ *Calliphora vomitoria*, 7.8 องศาเซลเซียส สำหรับ *Protophormia terraenovae*, 9.0 องศาเซลเซียส สำหรับ *Lucilia sericata*, 10.2 องศาเซลเซียส สำหรับ *Chrysomya albiceps*, 11.4 องศาเซลเซียส สำหรับ *P. regina*, 7.2 องศาเซลเซียส สำหรับ *Muscina stabulans*, 7.9 องศาเซลเซียส สำหรับ *Muscina assimilis,* 7.8 องศาเซลเซียส สำหรับ *Boettcherisca septenrionalis* และ 6.4 องศาเซลเซียส สำหรับ *Piophila foveolata* ในการใช้ค่าอุณหภูมิต่ำสุดที่แมลงสามารถเจริญเติบโตได้นั้น ไม่สามารถใช้ค่าเดียวกันได้ในทุกพื้นที่ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อใช้จำเพาะในพื้นที่นั้น ๆ เพื่อความแม่นยำในการประมาณ PMI โดยใช้แมลง การเจริญเติบโตของแมลงวันในแต่ละระยะการเจริญ ต้องการความร้อนสำหรับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากระยะหนึ่งไปยังอีกระยะหนึ่ง จนกระทั่งพัฒนาสู่ตัวเต็มวัย เรียกว่าค่า thermal constant ซึ่งมีค่าเฉพาะในแมลงแต่ละชนิด ค่าความร้อนดังกล่าวสามารถหาได้จากค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิสูงสุด และต่ำสุดของแต่ละวัน เรียกว่า ค่าความร้อนสะสม (Degree day; DD) และเนื่องจากแมลงวันมีวงชีวิตและใช้เวลาในการเจริญเติบโตในแต่ละระยะที่แน่นอน ดังนั้นการคำนวณค่าความร้อนสะสม จะสามารถช่วยประมาณเวลาการตายที่เกิดขึ้นได้ ในการประมาณค่า PMI โดยใช้แมลงจะประมาณจากการวิเคราะห์อายุของตัวหนอนสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ซึ่งจะมี 4 วิธีด้วยกันคือ 1 กราฟถดถอยเชิงเส้น (curvilinear regression) กราฟ isomegalen diagrams กราฟ isomorphen diagrams และ ค่าความร้อนสะสมจำเพาะ (thermal summation models) ค่าความร้อนสะสมเป็นชั่วโมง (Accumulated Degree Hour, ADH) และ ค่าความร้อนสะสมเป็นวัน (Accumulated Degree Day, ADD) คำนวณได้จากสูตร

RETRACTED

$$ADH = (T - T_0)^* \text{ developmental time} \quad (1)$$

$$ADD = ADH/24 \quad (2)$$

เมื่อ T คือ อุณหภูมิที่แมลงใช้ในการเจริญ ลบด้วย T_0 คืออุณหภูมิต่ำสุดที่แมลงสามารถเจริญเติบโตได้ (มีค่าจำเพาะในแมลงแต่ละชนิด) คูณด้วยเวลาที่ใช้ในการเจริญ (developmental time) จะได้ค่า ADH ส่วนค่า ADD คำนวณได้จากนำค่า ADH มาหารด้วย 24 ซึ่งจะมีค่าเฉพาะในแต่ละระยะของแมลงแต่ละชนิด (Marchenko, 1988; Highley & Haskell, 2001) มีการศึกษาค่าพารามิเตอร์ (parameter) ต่าง ๆ เหล่านี้ทั่วโลกในแมลงที่มีความสำคัญทางนิติกีฏวิทยาศาสตร์ เช่น *Calliphora alpina* Zett. (Davies & Ratcliffe, 1994), *Calliphora vicina* (Reiter & Zum, 1984; Davies & Ratcliffe, 1994; Kamal, 1958; Greenberg, 1991), *Calliphora vomitoria* (Linnaeus) (Davies & Ratcliffe, 1994; Kamal, 1958; Greenberg & Tantawi, 1993), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Well & Kurahashi, 1994), *Chrysomya rufifacies* (Maquart) (Greenberg, 1991; Byrd & Butler, 1997; Figarola & Skoda,1998), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Grassberger, Friedrich & Reiter, 2003), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Greenberg, 1991; Wells & LaMotte, 1995; Byrd & Butler, 1996), *Lucilia sericata* Meigen (Grassberger & Reiter, 2001; Davies & Ratcliffe, 1994; Kamal, 1958; Greenberg, 1991), *Phormia regina* (Meigen) (Byrd & Allen, 2001; Greenberg, 1991) และ *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Davies & Ratcliffe, 1994; Kamal, 1958; Greenberg, 1991; Greenberg & Tantawi, 1993; Grassberger & Reiter, 2002) แต่ค่าในการประมาณระยะเวลาการตายโดยใช้แมลงข้อมูลส่วนใหญ่ถูกศึกษาในฝั่งยุโรป และอเมริกา สำหรับในประเทศไทยยังมีการศึกษาอยู่น้อย ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเจริญเติบโต หรือค่าขนาดความยาวของตัวหนอนระยะต่าง ๆ ของแมลงวันหัวเขียวแต่ละชนิดกับอุณหภูมิคงที่ค่าต่าง ๆ เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์ เพื่อคำนวณหาค่า lower threshold, ADD และ ADH เพื่อนำมาใช้ประมาณค่า PMI ดังนั้นการศึกษาชีววิทยาการเจริญ และการคำนวณค่าความร้อนสะสมที่ใช้ในแต่ละระยะการเจริญแมลงวันหัวเขียวที่มีบทบาทสำคัญในงานนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อนำไปใช้สำหรับการประมาณเวลาการตาย จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานนิติวิทยาศาสตร์ในประเทศไทย

C. rufifacies เป็นแมลงที่มีความสำคัญในงานด้านนิติกีฏวิทยาศาสตร์ และมีการแพร่กระจายทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย การศึกษาของ Bunchu (2012) พบแมลงวันเขียว *C. rufifacies* เป็นลำดับต้น ๆ สอดคล้องกับการศึกษาการเก็บตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวจากศพมนุษย์จำนวน 30 ศพ ในประเทศไทยของ Sukontason *et al*. (2007) นอกจากนี้ยังพบว่า *C. rufifacies* เป็นแมลงวันหัวเขียวกลุ่มแรก (the first visitor) ที่เข้ามายังศพเมื่อมีการตายเกิดขึ้น (Catts & Goff, 1992) ตัวหนอนของแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้มีหนามรอบลำตัว รู้จักกันดีในชื่อ “hairy maggots” รวมทั้งเป็นผู้ล่าตัวหนอนแมลงวันชนิดอื่นด้วย ในการใช้ชีววิทยาของแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้ในการประมาณ ในพื้นที่ ๆ แตกต่างกันทั้งทางสภาพภูมิอากาศ และสภาพภูมิประเทศ รวมทั้งความผันแปรด้านพันธุกรรม ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการประมาณ PMI เพื่อความแม่นยำจึงควรมีการศึกษาในพื้นที่นั้น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อนอย่างประเทศไทยที่ยังมีการศึกษาอยู่น้อยมาก

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การระบุชนิดของแมลงวันหัวเขียว

RETRACTED

ตัวเต็มวัย (adults) และตัวหนอน (larvae) ของแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* ได้จาก นำไก่สดน้ำหนัก 1.5-2.0 กิโลกรัม ที่ทราบระยะเวลาการตายมากรีดให้เกิดบาดแผลข้างลำตัวข้างละ 3-4 แผลวางบนสนามหญ้าบริเวณมหาวิทยาลัยบูรพา ตำบล แสนสุข อำเภอเมือง จังหวัด ชลบุรี ซึ่งตั้งอยู่ที่พิกัด 13°28′N 100°92′E แล้วนำกรงตาข่ายมาครอบไว้เพื่อป้องกันสัตว์รบกวน รอจนกระทั่งแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* เข้ามาตอม (colonized) ซากสัตว์ และวางไข่ ใช้พู่กันจุ่มน้ำพอเปียกย้ายกองไข่มาวางยังเนื้อวัวน้ำหนักเฉลี่ย 20 กรัม ซึ่งใส่อยู่ในกระทงที่ทำจากแผ่นอะลูมิเนียม ขนาด 4x6x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นใส่ในกล่องพลาสติก ขนาด 7x9.5x5 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเปลี่ยนเนื้อวัวทุก ๆ 24 ชั่วโมง นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Taksin N&D Medical LTD., Thailand) ที่ 30± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศร้อยละ 40-80 ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงตัวหนอนจนเป็นตัวเต็มวัย เพื่อตรวจสอบชนิดของแมลงวันหัวเขียว เลือกเฉพาะ *C. rufifcies* จำแนกชนิด (Identification) โดยใช้ key ของ Whitworth และ Roscoe (Whitworth & Roscoe, 2006) เมื่อได้ตัวเต็มวัยชนิดที่ต้องการแล้วนำไปเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 13x18x6 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในวันที่ 1 และ 2 เลี้ยงด้วยน้ำตาลทรายเม็ด 2 กรัมต่อวัน บรรจุในกระทงที่ทำจากแผ่นอะลูมิเนียม ขนาด 3x4x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 50 (w/v) และน้ำกลั่น ปริมาตรอย่างละ 10 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 และ 4 เพิ่มอาหารโดยให้น้ำตับบดประมาณ 2 กรัมต่อวัน หลังจากวันที่ 4 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงจากน้ำตับบดเป็นเนื้อวัวน้ำหนักเฉลี่ย 20 กรัม ใส่ในฝาแก้วกลมเพื่อให้ตัวเต็มวัยวางไข่

2 การศึกษาระยะเวลาและอัตราการเจริญของแมลงวันหัวเขียว

2.1 ระยะไข่

ทำการศึกษาที่อุณหภูมิคงที่ 15, 18, 27, 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียส เมื่อแมลงวันหัวเขียววางไข่เก็บไข่ภายใน 30 นาที ตรวจสอบระยะการเจริญจนกระทั่งเข้าสู่ตัวหนอนระยะที่ 1 (1st instar) โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (Olympus SZ30, Japan) บันทึกเวลาที่ไข่เปลี่ยนเป็นตัวหนอนระยะที่ 1 (n=100) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.2 ระยะตัวหนอน

เลี้ยงตัวหนอนระยะที่ 1 ที่พึ่งฟักออกจากเปลือกไข่ ด้วยเนื้อวัวน้ำหนักเฉลี่ย 20 กรัมต่อจำนวนตัวหนอน 100 ตัว ที่ใส่อยู่ในกระทงอลูมิเนียม ขนาด 4x6x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นใส่ในกล่องพลาสติกสำหรับเลี้ยงตัวหนอนขนาด 7x9.5x5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวนซ้ำละ 4 กล่อง กล่องที่ 1 เก็บตัวหนอนเพื่อดูการพัฒนาเปลี่ยนระยะครั้งละ 10 ตัว ทำให้ตายด้วยน้ำร้อนประมาณ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที รักษาสภาพด้วยเอทานอลร้อยละ 75 จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เพื่อดูการเจริญของรูหายใจด้านท้ายลำตัว (posterior spiracles) และการเปลี่ยนแปลงของลักษณะสัณฐานวิทยาอื่น ๆ กล่องที่ 2 ใช้สำรองใส่เข้าไปในกล่องที่ 1 ให้ความหนาแน่นของประชากรยังเป็น 100 ตัวต่อเนื้อวัว 20 กรัม กล่องที่ 3 เก็บตัวอย่างครั้งละ 4 ตัว ทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อวัดขนาดของตัวหนอน ทำการวัดขนาดตัวหนอนด้วยไม้โปรแทรกเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เปลี่ยนเนื้อวัวทุก ๆ 24 ชั่วโมง เมื่อเริ่มเข้าสู่ตัวหนอนระยะที่ 2 (2nd instar) บันทึกเวลาที่ตัวหนอนระยะที่ 1 (1st instar) เปลี่ยนเป็นตัวหนอนระยะที่ 2 (2nd instar) ในระยะตัวหนอนระยะที่ 2 (2nd instar) สู่ตัวหนอนระยะที่ 3 (3rd instar) ทำเช่นเดียวกับการเลี้ยงตัวหนอนระยะที่ 1

2.3 ระยะตัวดักแด้

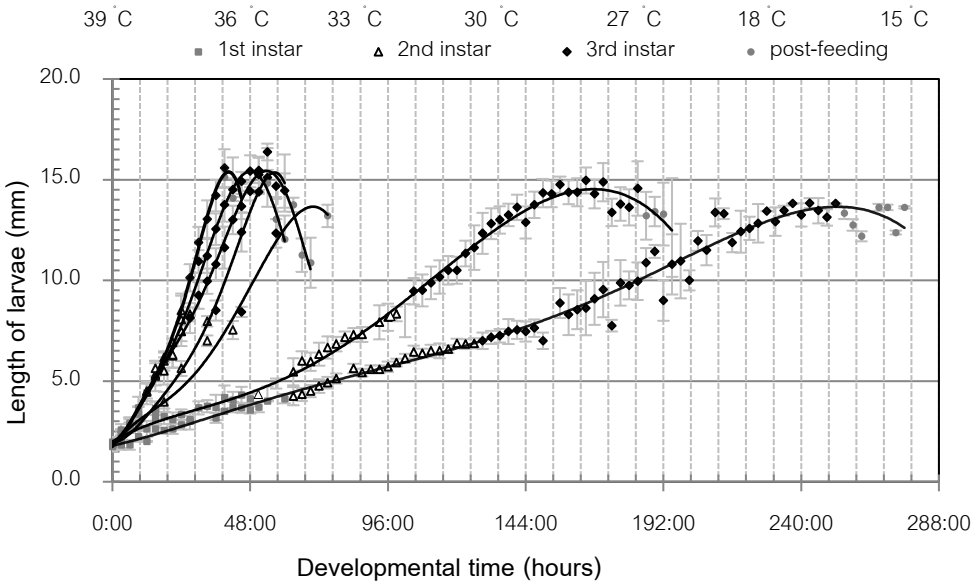
RETRACTED

เมื่อตัวหนอนระยะที่ 3 หยุดกินอาหารแล้วเตรียมดินผสมขี้เลื่อยในอัตราส่วน 1:1 และนำไปอบให้แห้งเพื่อป้องกันเชื้อราที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในตู้อบความร้อน (Clayson, Austraria) และปรับให้ได้ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60-70 ค่า pH เท่ากับ 7.5 และอุณหภูมิของดินประมาณ 28 องศาเซลเซียส บรรจุลงในกล่องพลาสติกขนาด 8.5x13.5x4.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ความสูงของดินประมาณ 3 เซนติเมตร บันทึกเวลาที่ตัวหนอนระยะที่ 3 เปลี่ยนระยะการเจริญจนเข้าสู่ระยะเตรียมเข้าดักแด้ (prepupae) รอจนกระทั่งระยะดักแด้ (pupae) เข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย (eclosion) บันทึกเวลาที่ดักแด้ฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย และคอยเช็คเวลาจนกว่าตัวเต็มวัยจะฟักหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี One way ANOVA และ วิธี Duncan's Multiple Range Test

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ

ความยาวเฉลี่ยของตัวหนอนของ *C. rufifacies* ตั้งแต่ฟักออกจากไข่ (eggs) จนถึงระยะหยุดกินอาหาร (post-feeding larva) ที่อุณหภูมิคงที่ 15, 18, 27, 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียส มีความยาวเฉลี่ย 1.80±0.20 - 13.80±0.80, 1.90±0.32 - 15.62±0.48, 1.83±0.12-13.20±0.50, 1.96±0.06 -14.83±1.40, 1.79±0.26 -15.79±0.96, 1.96±0.26 - 15.42±0.79 และ 1.87±0.22 - 15.57±0.94 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($p< 0.001$) และมีความยาวสูงสุดที่ 240 ชั่วโมง (13.8 ± 0.63 มิลลิเมตร), 177 -192 ชั่วโมง (15.6±0.9 มิลลิเมตร), 75 ชั่วโมง (13.2±0.5 มิลลิเมตร), 55 ชั่วโมง (15.1±1.44 มิลลิเมตร), 54 ชั่วโมง (15.79±0.96 มิลลิเมตร), 48 ชั่วโมง (15.42±0.79 มิลลิเมตร) และ 39 ชั่วโมง (15.57±0.94 มิลลิเมตร) ที่อุณหภูมิคงที่ 15, 18, 27, 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ความยาวเริ่มต้นเมื่อตัวหนอนฟักออกจากไข่ ตำแหน่งสูงสุดของกราฟคือ ระยะ peak feeding และกราฟสิ้นสุดเมื่อแมลงวันเข้าสู่ระยะดักแด้ หลังระยะ peak feeding ความยาวของตัวหนอนแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* จะลดลงเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้



ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความยาวตัวหนอนที่อุณหภูมิคงที่ที่ 15, 18, 27, 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียส

RESEARCHED

เวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการเจริญของตัวหนอนแต่ละระยะแสดงใน ตารางที่ 1 ที่ 15 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเฉลี่ยมากที่สุดในการในการเจริญทุกระยะคือ โดยระยะไข่ (eggs) ใช้เวลา 27.14±1.46 ชั่วโมง ตัวหนอนระยะที่ 1 (1st instar larva) ใช้เวลา 60.14±4.20 ตัวหนอนระยะที่ 2 (2nd instar larva) ใช้เวลา 73.15±2.19 ชั่วโมง ตัวหนอนระยะที่ 3 (3rd instar larva) ใช้เวลา 144.15±10.48 ชั่วโมง และระยะดักแด้ใช้เวลา 314.04±15.51 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่อุณหภูมิสูงที่สุดคือ 39 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเฉลี่ยจากระยะไข่ ตัวหนอนระยะที่ 1 ตัวหนอนระยะที่ 2 ตัวหนอนระยะที่ 3 น้อยที่สุดคือ 6.14± 0.40, 11.37± 0.38, 12.07± 0.14 และ 24.37± 0.10 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัยได้

ตารางที่ 1 เวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการเจริญเติบโตของตัวหนอนแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies*

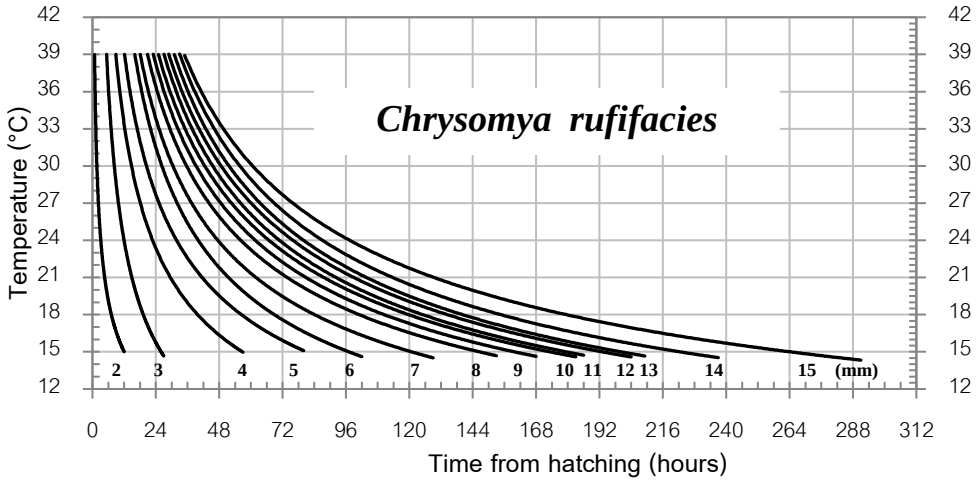
ระยะการเจริญ	เวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการเจริญ (ชั่วโมง) (mean±SD)						
	15 °C	18 °C	27 °C	30 °C	33°C	36 °C	39 °C
Eggs	27.14± 1.46^{a}	26.49± 2.48^{a}	10.29± 1.39^{b}	9.25± 1.14^{bc}	8.27± 0.18^{bcd}	7.10± 0.39^{cd}	6.14± 0.40^{d}
1st instar	60.14± 4.20^{a}	50.37± 2.17^{b}	19.23± 0.45^{c}	15.56± 0.60^{d}	12.26± 0.19^{e}	10.39± 0.20^{e}	11.37± 0.38^{e}
2nd instar	73.15± 2.19^{a}	52.40± 10.52^{b}	26.18± 0.46^{c}	20.01± 1.23^{cd}	14.29± 0.23^{d}	13.52± 1.22^{d}	12.07± 0.14^{d}
3rd instar	144.15± 10.48^{a}	129.18± 5.46^{b}	43.13± 4.15^{c}	31.16± 0.58^{d}	30.15± 1.56^{d}	26.51± 3.50^{d}	24.37± 0.10^{d}
Pupa	314.04± 15.51^{a}	289.08± 6.16^{b}	118.13± 4.19^{c}	111.11± 6.22^{cd}	103.06± 2.80^{d}	115.11± 4.00^{cd}	*
Total	618.62± 33.84^{a}	547.52± 27.59^{b}	216.96± 10.64^{c}	187.09± 10.33^{d}	168.03± 4.96^{f}	172.63± 9.31^{e}	-

* ไม่สามารถพัฒนาเป็นระยะตัวเต็มวัย

3.2 กราฟ Isomegalen และ Isomorphen diagrams

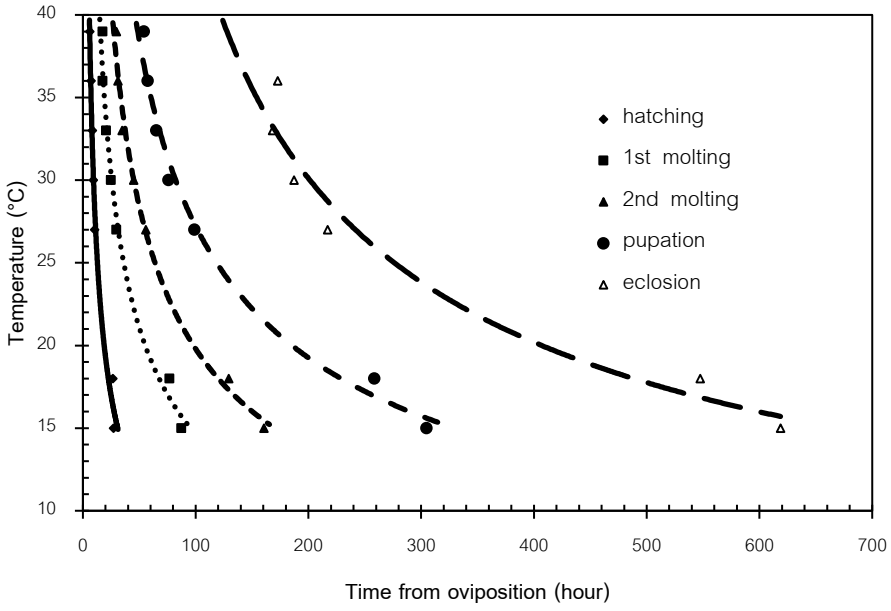
กราฟ Isomegalen diagram (ภาพที่ 2) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของตัวหนอนที่เจริญ อุณหภูมิ(Y) และระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ (X) แต่ละเส้นแสดงความยาวของตัวหนอนแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* ประโยชน์ของกราฟ Isomegalen diagram คือสามารถนำมาใช้ในการประมาณระยะเวลาการเสียชีวิต โดยใช้วิธีเก็บตัวหนอนวัดความยาวของตัวหนอนที่เจริญในศพ เปรียบเทียบกับกราฟ Isomegalen diagram ตามอุณหภูมิที่พบศพ แล้วลากเส้นลงมายังแกน X ซึ่งแสดงเวลา ก็จะสามารถประมาณระยะเวลาหลังการตายได้ อย่างไรก็ตามการใช้กราฟ Isomegalen diagram ยังมีข้อจำกัดอยู่ หากศพที่พบอยู่ในอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก การใช้กราฟนี้ในการประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยใช้แมลงจะไม่แม่นยำเท่าที่ควร (Grassberger & Reiter, 2002)

RETRACTED



ภาพที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวตัวหนอนที่เจริญในแต่ละอุณหภูมิต่อเวลาที่ใช้ในการเจริญ (Isomegalen diagram)

กราฟ Isomorphen diagram (ภาพที่ 3) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (Y) และระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญในแต่ละระยะของแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* (X) ตั้งแต่ระยะไข่จนถึงเวลาฟักออกเป็นตัวหนอน (hatching) ระยะดักแด้ (pupation) และระยะที่แมลงวันออกจากดักแด้ (eclosion) ประโยชน์ของกราฟ Isomorphen diagram คือ การประมาณระยะเวลาหลังการตายโดยใช้ระยะการเจริญของแมลงวันหัวเขียวที่พบบนศพ มาคำนวณย้อนกลับไป โดยนำแมลงวันหัวเขียวระยะที่แก่ที่สุดมาเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นระยะถัดไป และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณโดยลากเส้นจากอุณหภูมิที่วัดได้ขณะที่พบศพ แล้วลากเส้นลงมาจะได้อายุของแมลงวันหัวเขียวที่เจริญในศพ นำอายุของแมลงที่ได้ลบด้วยจำนวนวันที่เก็บมาเลี้ยง จะสามารถประมาณเวลาย้อนกลับไปถึงเวลาการเสียชีวิต (Grassberger & Reiter, 2002)



ภาพที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเจริญต่ออุณหภูมิของแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacis* (isomorphen diagram)

RE-PRACTICE

3.3 อัตราการเจริญ (Developmental rate)

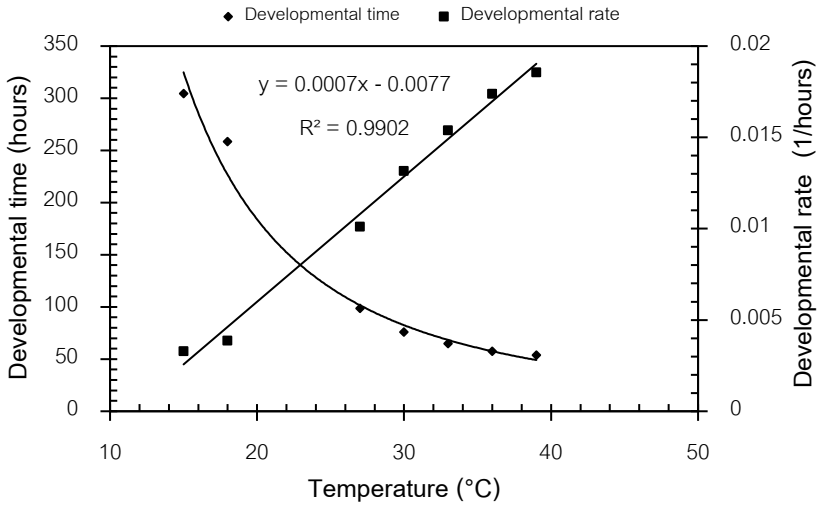
อัตราการเจริญของแมลงวันหัวเขียวที่อุณหภูมิคงที่ 15, 18, 27, 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ระยะไข่ถึงระยะดักแด้ คือ 0.00328, 0.00387, 0.01012, 0.01316, 0.01539, 0.01739 และ 0.01856 (1/ชั่วโมง) เมื่อนำอัตราการเจริญมาสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อหาจุดตัดแกน x (x-intercept) (ภาพที่ 4) จะได้สมการ

$$y = 0.0007x - 0.0077;\ R^2 = 0.9902 \quad (3)$$

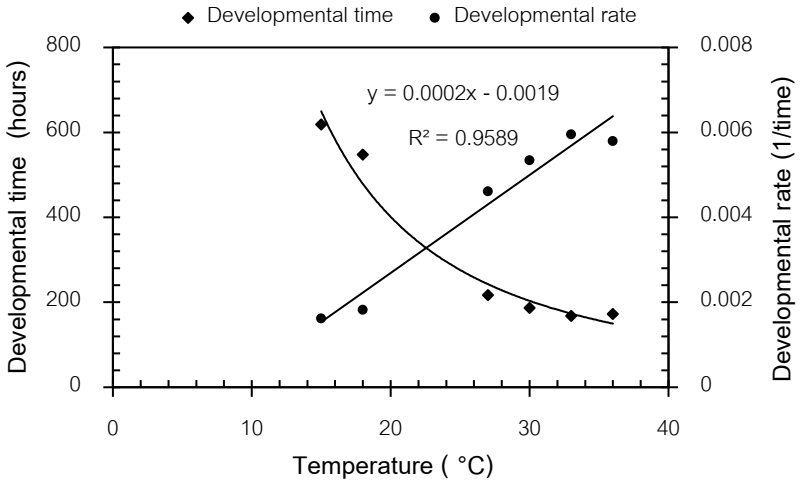
มีจุดตัดแกน x เท่ากับ 11 องศาเซลเซียส ส่วนระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัยที่อุณหภูมิ 15, 18, 27, 30, 33 และ 36 องศาเซลเซียส คือ 0.00162, 0.00183, 0.00461, 0.00535, 0.00595 และ 0.00579 (1/ชั่วโมง) เมื่อนำอัตราการเจริญมาสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อหาจุดตัดแกน x (x-intercept) (ภาพที่ 5) จะได้สมการ

$$y = 0.0002x - 0.0019;\ R^2 = 0.9589 \quad (4)$$

และมีจุดตัดแกน x เท่ากับ 9.5 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจากระยะไข่ถึงระยะดักแด้ (oviposition to pupation) และอุณหภูมิ



ภาพที่ 5 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจากระยะไข่ถึงระยะตัวเต็มวัย (oviposition to eclosion) และอุณหภูมิ

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* ที่อุณหภูมิคงที่ 15, 18, 27, 30, 33, 36, และ 39 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเปรียบเทียบการศึกษาในสปีชีส์เดียวกันที่อุณหภูมิคงที่ 27 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเจริญตั้งแต่ฟักออกจากไข่ (hatching) จนถึงเข้าสู่ระยะดักแด้ที่ 98.83 ชั่วโมง ความยาวเฉลี่ยสูงสุดของตัวหนอนเท่ากับ 13.2 มิลลิเมตร ในชั่วโมงที่ 75 ของการเจริญ สอดคล้องกับการศึกษาของ คม สุคนธสรรพ์ และคณะในปี 2008 (Sukontason et al., 2008) ที่อุณหภูมิสิ่งแวดล้อมเฉลี่ย 27.4 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่ใช้เวลา 96 ชั่วโมง ความยาวเฉลี่ยสูงสุดของตัวหนอนเท่ากับ 13.0 มิลลิเมตร ในชั่วโมงที่ 66-72 ของการเจริญ เวลาที่ใช้ในการเจริญที่อุณหภูมิคงที่ 27 องศาเซลเซียส ในทุกระยะสอดคล้องกับการศึกษาอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมที่มีค่าใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 2 (Byrd & Butler, 1997; Sritavanich, Jamjanya, Chamsuwan, & Hanboonsong, 2009 ; Swiger, Hogsette & Butler, 2014)

ตารางที่ 2 ข้อมูลเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 26.7 องศาเซลเซียส (23.9-29.5 องศาเซลเซียส) ศึกษาโดย Byrd ในปี 1997 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ศึกษาโดย Swinger ในปี 2014 และ ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส ศึกษาโดย Sritavanich ในปี 2009

Source	Temp. °C	eggs+1st instar	2nd instar	3rd instar	pupa	Total	ADH-B_{10}
Byrd (1997)	**26.7**	**32.0**	**24.0**	**78.0**	**82.0**	**216.0**	**3607.2**
Sritavanich (2009)	29.0	47.7	25.4	36.4	85.6	230.0	4370.6
Swinger (2014)	28.0	26.4	28.8	81.6	103.2	240.0	4320.0
Present study	**27.0**	**29.5**	**26.2**	**43.1**	**118.1**	**217.0**	**3682.0**

RETRACTED

สรุปผลการวิจัย

การเจริญของแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* ที่มีความสำคัญต่อนิติวิทยาศาสตร์ที่อุณหภูมิ 15, 18, 27, 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญ ที่อุณหภูมิต่ำจะใช้เวลาเฉลี่ยมากกว่าที่อุณหภูมิสูง คือที่อุณหภูมิต่ำสุดคือ15 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเฉลี่ยมากที่สุด คือ 618.62±33.84 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 18, 27, 30, 33, และ 36 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเฉลี่ย 547.52±27.59, 216.6±10.64, 187.09±10.33, 168.03±4.69 และ 172.63±9.31 ชั่วโมง ตามลำดับ (p<0.0001) ที่อุณหภูมิสูงสุด 39 องศาเซลเซียส ระยะไข่จนถึงระยะดักแด้ใช้เวลาเฉลี่ยน้อยที่สุด แต่ในระยะดักแด้ไม่สามารถเจริญพัฒนาจากดักแด้เป็นตัวเต็มวัยได้ ในอุณหภูมิต่างกันความยาวของตัวหนอนที่ใช้เวลา การเจริญเท่ากันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.0001) อุณหภูมิต่ำสุดที่แมลงสามารถเจริญได้เท่ากับ 11 องศาเซลเซียส (ระยะไข่-ระยะดักแด้) และ 9.5 องศาเซลเซียส (ระยะไข่-ตัวเต็มวัย) อย่างไรก็ตามการเจริญพัฒนาตั้งแต่ระยะไข่จนกระทั่งฟักออกเป็นตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียว อาจมีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง เช่น อาหาร ความหนาแน่นของประชากร สภาพภูมิศาสตร์ และสภาพอากาศ รวมทั้งการปรับตัวด้านวิวัฒนาการของแมลงวันหัวเขียวแต่ละชนิดให้สามารถอาศัยที่อุณหภูมิเหมาะสมในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ซึ่งแมลงชนิดสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมขณะนั้นได้มากที่สุด จะเจริญเติบโตและดำรงเผ่าพันธุ์ได้ดี ดังนั้นงานทางด้านนิติกีฏวิทยาต้องมีการศึกษาต่อไปและการประมาณระยะเวลาหลังการตาย ควรคำนึงถึงปัจจัยภายนอกและภายในที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแมลงชนิดนั้นๆ ด้วย เพื่อให้มีข้อมูลพื้นฐานที่แน่น ทำให้การประมาณระยะเวลาหลังการตายแม่นยำมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. กันทิมา สุวรรณพงศ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่อุปกรณ์และเครื่องมือ ขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในระหว่างการศึกษาและทำโครงการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Anderson, G. S. (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences*, *45*, 824–832.

Bunchu, N. (2012). Blow fly (Diptera: Calliphoridae) in Thailand: Distribution, Morphological identification and medical importance appraisals, *International Journal of Parasitology Research*, *4*(1), 57-64.

Byrd, J., & Allen, J. (2001). The development of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigan). *Forensic Science International*, *120*, 79-88.

Byrd, J. H., & Butler, J. F. (1996). Effects of temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) development. *Journal of Medical Entomology, 33*, 901-905.

Byrd, J., & Butler, F. (1997). Effects of temperature on *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) development. *Journal of Medical Entomology*, *34*, 353-358.

Catts, E. P., & Goff, M. L. (1992). Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, *37*, 253-272.

Davies, L., & Ratcliffe, G. G. (1994). Development rates of some pre-adult stages in blow flies with

RETRACTED

reference to low temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*, *8*, 245-254.

Figarola, J.L.M., & Skoda, S.R. (1998). *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) in Nebraska, *Journal of Entomological Science*, *33*, 319–321.

Goff, M.L. (1993). Estimation of postmortem interval using arthropod development and successional patterns. *Forensic Science Review*, *5,* 81-94.

Grassberger, M., Friedrich, E., & Reiter, C. (2003). The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. *International Journal of Legal Medicine*, *117*, 75–81.

Grassberger, M., & Reiter, C. (2001). Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Dipera:Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen-diagram and isomorphen-diagram. *Forensic Science International*, *120*, 6-32.

Greenberg, B. (1991). Flies as forensic indicator. *Journal of Medical Entomology 28*, 565-577.

Greenberg, B.,& Tantawi, T.I. (1993). Different developmental strategies in two boreal flies (Diptera:Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, *30*, 481-484.

Highley, L.G., & Haskell, N.H. (2001). Insects development and forensic entomology, in: J.H. Byrd, J.L. Castner (Eds.), Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations, (pp. 287-302). Boca Raton, FL: CRS Press.

Kamal, A.S. (1958). Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera). *Entomological Society of America*, *51*, 261–271.

Marchenko, M. L. (2001). Medico-legal relevance of cadaver entomofauna for the deter-mination of the time of death. *Forensic Science International, 102* (1-2), 89-109.

Marshall, S. A., Whitworth, T., & Roscoe, L. (2011). Blow flies (Diptera; Calliphoridae) of eastern Canada with a key to Calliphoridae subfamilies and genera of eastern North America, and a key to the eastern Canadian species of Calliphorinae, Luciliinae and Chrysomyiinae. *Canadian Journal of Arthropod Identification*, No. 11.

Reiter, C., & Zum. (1984). Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeibfliege *Calliphora vicina*. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, *91*, 295–308.

Sritavanich, N., Jamjanya, T., Chamsuwan, A., & Hanboonsong, Y. (2009). Biology of hairy maggot blow fly, *Chrysomya rufifacies* and its applicaiton in forensic medicine. *Khon Kaen University Research Journal*, *9*(2), 10-15. (in Thai)

Sukontason, K., Narongchai, P., Kanchai, C., Vichairat, K., Sribanditmongkol, P., Bhoopat, T., Kurahashi, H. Chockjamsai, M., Piangjai, S., Bunchu, N., Vongvivach, S., Samai, W., Chaiwong, T., Methanitikorn, R., Ngern-Klun, R., Sripakdee, D., Boonsriwong, W., Siriwattanarungsee, S., Srimuangwong, C., Hanterdsith, B., Chaiwan, K., Srisuwan, C., Upakut, S., Moopayak, K., Vogtsberger, R.C., Olson, J.K., & Sukontason, K.L. (2007). Forensic entomology cases in Thailand:

RETRACTED

a review of cases from 2000 to 2006. *Parasitology Research*, *101*, 1417-1423.

Sukontason, K., Piangjai, S., Siriwattanarungsee, S., & Sukontason, K. L. (2008). Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. Journal of *Parasitology Research, 102*, 1207-1216.

Swiger, S. L., Hogsette, J. A., & Butler, J. F. (2014). Larval Distribution and Behavior of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) Relative to Other Species on Florida Black Bear (Carnivora: Ursidae) decomposing carcasses. *Neotropical Entomology*, *43*, 21-26.

Well, J.D., &Kurahashi, H. (1994). *Chrysomya megachephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) development: rate, variation and the implication for forensic entomology. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, *45*, 303-309.

Wells, J.D., & LaMotte, L.R. (1995). Estimating maggot age from weight using inverse prediction, *Journal of Forensic Science*, *40*, 585–590.

RETRACTED