

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์และสารเคมี

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมึก
 - 1.1 อุปกรณ์ทางการประมงที่ใช้จับปลาหมึก คือ แห, ข่าย, ลอบ, ไซ, ตะดุ้ง, ต้อน และเหล็กยิงปลา
 - 1.2 ขวดใส่ตัวอย่างและถุงพลาสติกขนาดต่าง ๆ
 - 1.3 น้ำยารักษาสภาพ สารละลายฟอร์มาลิน 10%
 - 1.4 กระดาษ Label
 - 1.5 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

2. การศึกษาพื้นฐานวิทยา
 - 2.1 เวอร์เนียร์ คาลิเปอร์
 - 2.2 ถาดใส่น้ำสำหรับแช่ตัวอย่างขณะทำการศึกษา
 - 2.3 Stereo microscope
 - 2.4 Fiber optic
 - 2.5 ตารางบันทึกข้อมูล
 - 2.6 คอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรม SPSS for Windows

3. การศึกษากายวิภาคเปรียบเทียบ
 - 3.1 การผ่าตัดศึกษาเปรียบเทียบอวัยวะภายใน
 - 3.1.1 ถาดใส่น้ำสำหรับแช่ตัวอย่างขณะทำการศึกษา
 - 3.1.2 เครื่องมือผ่าตัด
 - 3.1.3 Light microscope
 - 3.1.4 สไลด์ พร้อมกระจกปิดสไลด์
 - 3.1.5 Stereo microscope
 - 3.1.6 Fiber optic
 - 3.1.7 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม
 - 3.1.8 กระดาษบันทึก

3.2 การดองใส

- 3.2.1 ปีกเกอร์
- 3.2.2 กระจบอกตวง
- 3.2.3 เครื่องมือผ่าตัด
- 3.2.4 แท่งแก้ว
- 3.2.5 แอลกอฮอล์ 95%
- 3.2.6 โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2%
- 3.2.7 คาร์บอนเตตระคลอไรด์
- 3.2.8 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3%
- 3.2.9 อะซิซารินเรด เอส
- 3.2.10 กลีเซอริน
- 3.2.11 ไทมอล
- 3.2.12 น้ำกลั่น
- 3.2.13 ถู่มือชนิดหนา
- 3.2.14 ผ้าปิดจมูก
- 3.2.15 กระดาษ label



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนดำเนินการศึกษา

1. รวบรวมและศึกษาเอกสารหลักฐานทางอนุกรมวิธาน

รวบรวมเอกสารหลักฐานหรือข้อมูลเบื้องต้นที่เกี่ยวข้องกับงานอนุกรมวิธานของปลาหมูกุล *Botia Gray, 1831* ให้ได้มากที่สุด เพื่อใช้เป็นความรู้เกี่ยวกับประวัติการศึกษา และพิจารณาแนวทางในการแก้ปัญหาและเพิ่มพูนประสิทธิภาพในการศึกษาวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดที่สำคัญคือ

- 1.1 เอกสารที่มีการตีพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของปลาหมูกุลเป็นครั้งแรก (original descriptions)
- 1.2 Talwar, P. K., and Jhingran, A. Q. 1991. Inland Fishes of India and Adjacent Countries. Vol. 1. New Delhi: Oxford & IBM Publishing.
- 1.3 Smith, H. M. 1945. The fresh water fishes of Siam, or Thailand. Washington D.C.: United States Government Printing Office. pp. 286 - 293.
- 1.4 Taki, Y. 1974. Fishes of the Lao Mekong Basin. United States Consultants, Inc. pp. 165 – 172.
- 1.5 Rainboth, W. J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. Rome: FAO. pp. 132 – 134.
- 1.6 Chu, X. *et al.* 1990. The Fishes of Yunnan, China Part II Cyprinidae. Science Press. Beijing, China. pp.63-72.
- 1.7 Roberts, T.R. 1989. The Freshwater Fishes of Western Borneo (Kalimanta Barat, Indonesia). San Francisco: California Academy of Sciences. 210 pp.

2. การเก็บรวบรวมตัวอย่างในภาคสนาม

2.1 การวางแผนเก็บรวบรวมตัวอย่าง

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมูกุลจากกลุ่มน้ำต่าง ๆ ในประเทศไทย ซึ่ง The Royal Irrigation Department (2001) ได้แสดงการจำแนกกลุ่มน้ำในประเทศไทยไว้ทั้งสิ้น 25 กลุ่มน้ำ ได้แก่

- | | | | |
|--|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 1. กลุ่มน้ำสาละวิน | 2. กลุ่มน้ำโขง | 3. กลุ่มน้ำกก | 4. กลุ่มน้ำชี |
| 5. กลุ่มน้ำมูล | 6. กลุ่มน้ำปิง | 7. กลุ่มน้ำวัง | 8. กลุ่มน้ำยม |
| 9. กลุ่มน้ำน่าน | 10. กลุ่มน้ำเจ้าพระยา | 11. กลุ่มน้ำสะแกกรัง | |
| 12. กลุ่มน้ำป่าสัก | 13. กลุ่มน้ำท่าจีน | 14. กลุ่มน้ำแม่กลอง | |
| 15. กลุ่มน้ำปราจีนบุรี | 16. กลุ่มน้ำบางปะกง | 17. กลุ่มน้ำโตนเลสาป | |
| 18. กลุ่มน้ำชายฝั่งทะเลตะวันออก | 19. กลุ่มน้ำเพชรบุรี | | |
| 20. กลุ่มน้ำชายฝั่งทะเลประจวบคีรีขันธ์ | 21. กลุ่มน้ำภาคใต้ฝั่งตะวันออก | | |

22. กลุ่มน้ำตาปี 23. กลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา 24. กลุ่มน้ำปัตตานี
25. กลุ่มน้ำภาคใต้ฝั่งตะวันตก

แต่เพื่อความสะดวกและเหมาะสมทั้งด้านเวลา แรงงาน และทุนทรัพย์ที่มีอยู่ จึงได้ทำการจัดแบ่งกลุ่มน้ำ โดยดัดแปลงจาก Kottelat (1989), ขวลิต วิทยานนท์ และคณะ (2540) และจรุงจิต สุนัยรัตนภรณ์ (2544) โดยแบ่งกลุ่มน้ำเป็น 6 กลุ่มน้ำ (ภาพที่ 2) ดังนี้คือ

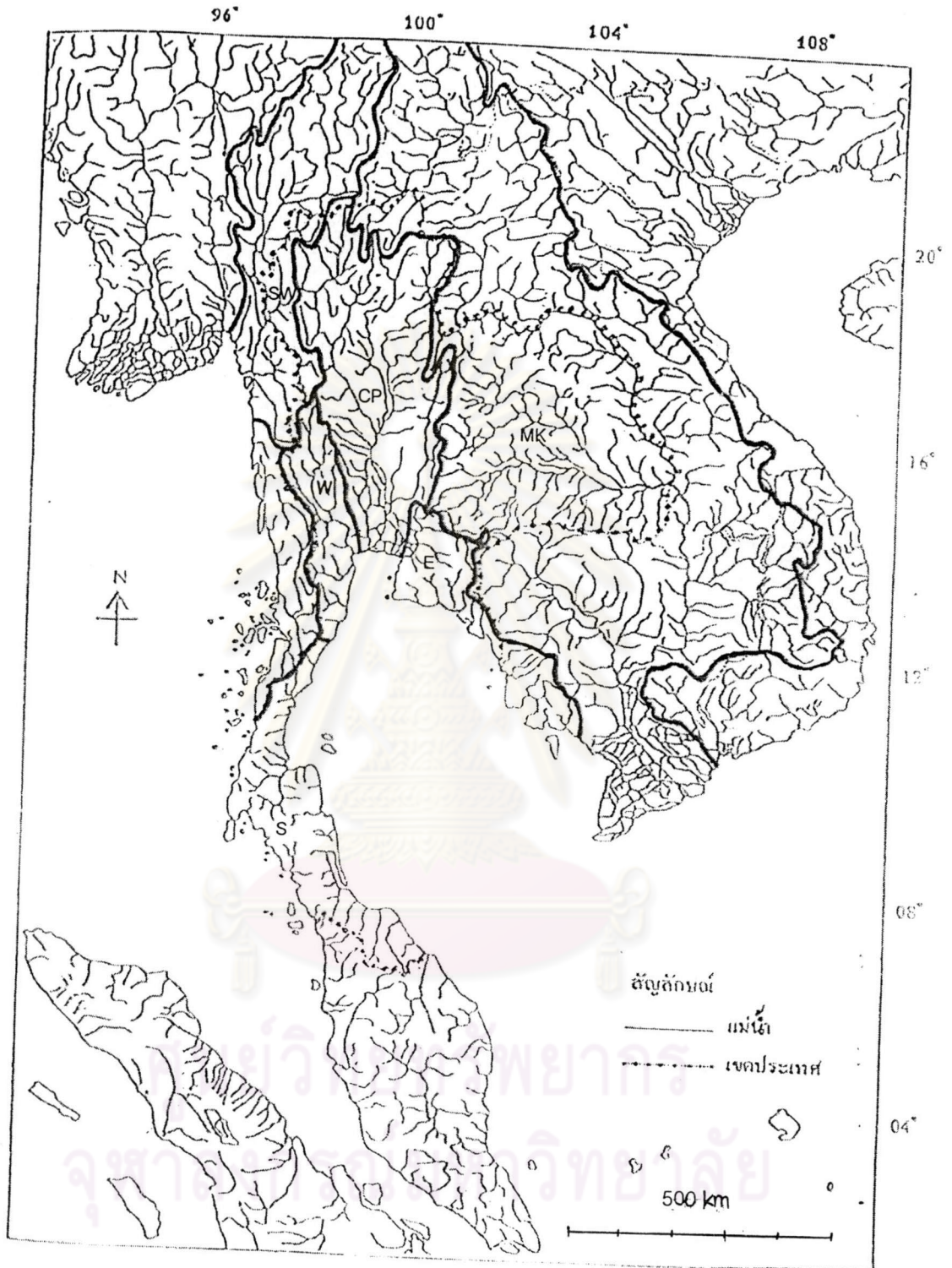
1. กลุ่มน้ำสาละวิน แม่น้ำสายหลักของกลุ่มน้ำนี้คือ แม่น้ำเมย, แม่น้ำปาย และ แม่น้ำยวม
2. กลุ่มน้ำเจ้าพระยา ประกอบด้วยแม่น้ำสายหลักคือ แม่น้ำปิง, แม่น้ำวัง, แม่น้ำยม, แม่น้ำน่าน, แม่น้ำเจ้าพระยา, แม่น้ำน้อย, แม่น้ำลพบุรี, แม่น้ำท่าจีน, แม่น้ำสะแกกรัง และแม่น้ำป่าสัก
3. กลุ่มน้ำโขง สำหรับในประเทศไทยมีพื้นที่กลุ่มน้ำโขงอยู่ 3 แห่งคือ
 - ก. พื้นที่กลุ่มน้ำโขงในภาคเหนือของประเทศ ประกอบด้วยแม่น้ำสายสำคัญคือ แม่น้ำกก, แม่น้ำลาว และ แม่น้ำฝาง
 - ข. พื้นที่กลุ่มน้ำโขงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ ประกอบด้วยแม่น้ำสายสำคัญคือ แม่น้ำโขง, แม่น้ำชี และแม่น้ำมูล
 - ค. พื้นที่กลุ่มน้ำโขงในภาคตะวันออกของประเทศ หรือกลุ่มน้ำโตนเลสาป ประกอบด้วยแม่น้ำหรือคลองหลายสายที่มีต้นกำเนิดจากบริเวณนี้แล้วไหลไปบรรจบกับแม่น้ำโขงในประเทศกัมพูชา ได้แก่ลำสะโตง, , ห้วยพรมโหด, คลองน้ำใส, คลองด่าน, และ คลองโป่งน้ำร้อน
4. กลุ่มน้ำภาคตะวันออก ประกอบด้วยแม่น้ำสายหลัก ได้แก่ แม่น้ำบางปะกง, แม่น้ำปราจีนบุรี, แม่น้ำนครนายก, แม่น้ำระยอง, แม่น้ำประแส, แม่น้ำจันทบุรี, แม่น้ำเวฬุ และ แม่น้ำตราด
5. กลุ่มน้ำภาคตะวันตก ประกอบด้วยแม่น้ำสายหลักคือ แม่น้ำแม่กลอง, แม่น้ำแควน้อย, แม่น้ำแควใหญ่, แม่น้ำเพชรบุรี, แม่น้ำปราณบุรี, คลองกุยบุรี และ คลองทับสะแก
6. กลุ่มน้ำภาคใต้ ประกอบด้วยแม่น้ำชุมพร, แม่น้ำตาปี, แม่น้ำปัตตานี, แม่น้ำสายบุรี และแม่น้ำโก-ลก ไหลลงสู่อ่าวไทย แม่น้ำกระบุรี และแม่น้ำตรัง ไหลลงสู่ทะเลอันดามัน

ก่อนที่จะออกไปเก็บตัวอย่างในภาคสนาม ทำการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเพื่อให้การเก็บตัวอย่างเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ครอบคลุมสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยทำการรวบรวมข้อมูลประจำตัวอย่างของปลาที่มีอยู่ตามสถาบัน อาทิเช่น ชนิด, วันที่เก็บตัวอย่าง, สถานที่เก็บตัวอย่าง, แล้วแจกแจงเป็นจำนวนชนิดที่ได้จากแต่ละกลุ่มน้ำ เป็นต้น สถาบันที่รวบรวมตัวอย่างปลาหมู่ที่สำคัญคือ

- พิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
- กองวิจัยธรรมชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ (National Science Museum) จ.ปทุมธานี
- สถาบันพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร
- พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร
- บริษัท เพอร์เฟ็คคอมพานีเยิน จำกัด (Perfect Companion) กรุงเทพมหานคร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงการจัดแบ่งลุ่มน้ำเพื่อการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างปลาหมูในประเทศไทย ประกอบด้วยลุ่มน้ำสาละวิน (SW), ลุ่มน้ำเจ้าพระยา (CP), ลุ่มน้ำโขง (MK), ลุ่มน้ำภาคตะวันออกเฉียง (E), ลุ่มน้ำภาคตะวันตก (W) และลุ่มน้ำภาคใต้ (S)

(ดัดแปลงจาก Kottelat (1989), ขวลิต วิทยานนท์ และคณะ (2540) และ จรุงจิต สุนัยรัตนภรณ์ (2544))

2.2 วิธีการเก็บรวบรวมตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมอในพื้นที่ลุ่มน้ำทั้ง 6 ลุ่มน้ำที่ได้ทำการแบ่งเพื่อศึกษาไว้จากข้างต้น พยายามให้ครอบคลุมพื้นที่ในแต่ละลุ่มน้ำให้ได้มากที่สุดโดยเฉพาะบริเวณที่ยังไม่เคยมีรายงานจากเอกสาร หรือจากข้อมูลของพิพิธภัณฑ์ต่าง ๆ

เครื่องมือประมงที่ใช้เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมอในธรรมชาติ (ภาพที่ 3) คือ

- ก. แห ใช้หว่านลงไปในแหล่งน้ำ สำหรับบริเวณที่จะหว่านแหแล้วมีโอกาสได้ปลาหมอคือบริเวณด้านท้ายของฝายหรือเขื่อนกั้นน้ำ บริเวณที่มีแก่งหินเป็นจำนวนมาก การหว่านแหอาจไม่ได้ผลเนื่องจากปลาหมอสามารถชุกซ่อนตัวอยู่ในก้อนหินได้
- ข. ข่าย ใช้เรือลากไปตามกระแส น้ำ การลากข่ายนั้นต้องเลือกบริเวณที่เป็นแม่น้ำที่มีขนาดกว้างและไม่มีพืชน้ำหรือตอไม้ อยู่ จะทำให้ข่ายชำรุดเสียหายได้ หรือหากว่าไม่ใช้วิธีการลากด้วยเรือก็สามารถที่จะผูกติดกับหลักเอาไว้แล้วค่อยมากู้ข่ายในวันรุ่งขึ้น
- ค. ลอบและไซ ให้ได้ดีกับบริเวณที่เป็นแก่งหิน กระแสน้ำไหลแรงบริเวณท้ายฝายทดน้ำ หากบริเวณนั้นมีปลาหมอก็จะได้ทั้งฝูงเลยทีเดียว
- ง. สะดุ้ง เหมาะสำหรับคลองที่ไม่กว้างมากนัก มีลักษณะคล้ายยอ มีเสายึดมุมทั้งสี่ด้านของตัวยอที่คล้องลำนลอบอยู่ เมื่อวางสะดุ้งลงไปใต้น้ำ ก็จะขวางคลองพอดี
- จ. ต้อน ใช้ตาข่ายที่ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทำเป็นถุงยาวเปิดด้านหน้า เพื่อให้ปลาเข้า มีประตูเปิดปิดด้านหน้า เมื่อปลาเข้ามาข้างใน จะปิดประตูแล้วก็จะทำการช้อนจับ
- ฉ. เหล็กยิงปลา เป็นอุปกรณ์ง่ายๆ โดยมีเพียงเหล็กแหลมยาวประมาณ 50 เซนติเมตร ผูกมัดกับเส้นยางหนังสติ๊กขนาดใหญ่ให้แน่น ใช้ยิงปลาด้วยมือในน้ำโดยมีหน้ากากดำน้ำ เพื่อที่จะเห็นปลาได้ชัดขึ้น เหมาะสำหรับปลาที่อาศัยซ่อนตัวตามซอกหิน

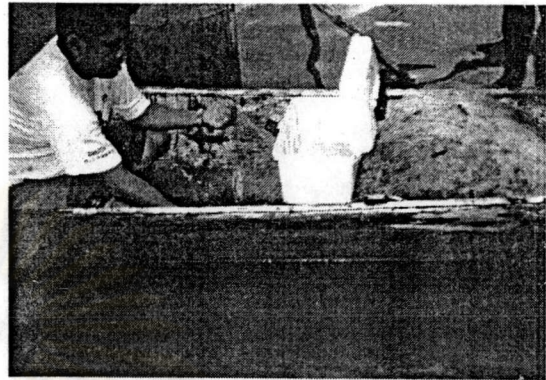
การเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมอกระทำโดย 5 วิธีการดังนี้

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมอด้วยตัวเอง จากอุปกรณ์ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น
2. ขอความช่วยเหลือจากชาวบ้าน รวบรวมตัวอย่างปลาหมอให้
3. ว่าจ้างชาวประมงซึ่งมีความชำนาญในการจับปลา ให้ช่วยจับปลาหมอให้
4. สัมภาษณ์ซื้อในตลาดสด เนื่องจากชาวประมงเมื่อหาปลาได้ก็จะนำมาขายกันในตลาดสด ทำการสอบถามถึงที่มาของแหล่งน้ำ ซึ่งโดยปกติแล้วก็จะอยู่ไม่ไกลจากตลาดสด
5. จากผู้คุ้นเคยหามาให้

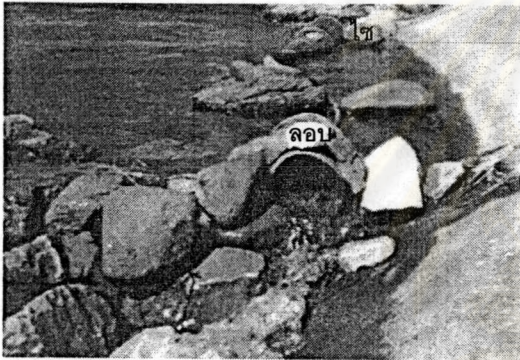
เมื่อได้ตัวอย่างมาแล้ว จดบันทึกข้อมูลทันทีหรือถ่ายภาพโดยเฉพาะสภาพสดของปลาหมอ



ก



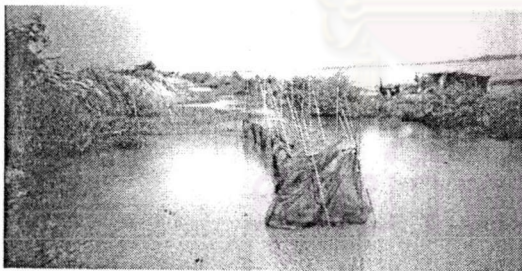
ข



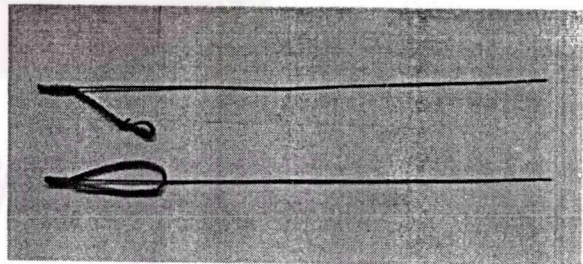
ค



ง



จ



ฉ

ภาพที่ 3 แสดงอุปกรณ์ทางการประมงที่ใช้จับปลาหมู คือ แห (ก) ข่าย (ข) ลอบและไซ (ค) สะตุ้ง (ง) ต้อน (จ) และเหล็กยิงปลา (ฉ)

2.3 การเก็บรักษาตัวอย่าง

หลังจากที่จัดบันทึกรายละเอียดต่างๆ เรียบร้อยแล้ว นำมารักษาสภาพด้วยสารละลายฟอร์มาลิน 10% โดยเตรียมจากสารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น (ฟอร์มาดีไฮด์ที่ละลายน้ำอิมิตัว 40%) นำมา 1 ส่วน เติมน้ำลงไปอีก 9 ส่วน จะทำให้ได้สารละลายฟอร์มาลิน 10% ซึ่งมีคุณสมบัติรักษาสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้เกิดการเน่าเปื่อย สำหรับตัวอย่างปลาหมึกที่ได้มาหากยังมีชีวิตอยู่ ควรนำตัวอย่างใส่ในสารละลายฟอร์มาลิน 10% ทันที จะทำให้ได้ตัวอย่างที่มีคุณลักษณะที่ดี ครีบจะกางออกทำให้สะดวกต่อการนับจำนวนก้านครีบ ส่วนตัวอย่างปลาหมึกที่ตายแล้วหากเป็นปลาหมึกที่ตัวใหญ่ขนาดเกิน 100 mmSL ควรฆ่าห้องเสียก่อนเพื่อให้สารละลายฟอร์มาลิน เข้าสู่อวัยวะภายในได้เร็ว ทำให้ไม่เกิดการเน่าเปื่อย

ขณะเดียวกันจะทำฉบับที่รายละเอียดใส่ในขวดหรือถุงพลาสติกที่ใช้ดองตัวอย่างปลาหมึก เขียนข้อมูลอย่างย่อจากที่ได้จัดบันทึกไว้ คือ

- ชื่อท้องถิ่น
- สถานที่เก็บตัวอย่าง
- วันที่เก็บตัวอย่าง
- ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- อุปกรณ์ที่ใช้จับหรือรวบรวม
- สภาพแวดล้อมโดยย่อ

หลังจากได้ตัวอย่างนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการแล้ว จัดทำทะเบียนตัวอย่างเพื่อความสะดวกเมื่อทำการศึกษ สำหรับชื่อวิทยาศาสตร์นั้นอาจจะยังไม่มีเขียนไว้ เพราะจะต้องศึกษาให้ถ่องแท้เสียก่อน จึงจะสามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของปลาหมึกแต่ละชนิดได้

ตัวอย่างใหม่ทั้งหมดทั้งรวบรวมได้และนำมาศึกษาในครั้งนี้ เก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การศึกษาและตรวจสอบตัวอย่าง

คัดเลือกตัวอย่างปลาหมึกที่เข้าใจว่าเป็นชนิดเดียวกัน โดยเลือกให้ได้ขนาดที่แตกต่างกันจากทุกบริเวณที่พบเป็นจำนวนไม่ต่ำกว่า 30 ตัว ยกเว้นชนิดที่พบจำนวนน้อยทำการศึกษาทั้งหมดที่มีอยู่ การศึกษาและตรวจสอบตัวอย่างกระทำดังนี้ คือ

3.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา

- ก. การศึกษาเปรียบเทียบอวัยวะที่เหมือนและที่แตกต่างกัน เพื่อพยายามหาลักษณะเด่น โดยเฉพาะที่ไม่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน

นำตัวอย่างปลาหมึกทุกชนิดที่มีอยู่มาวางไว้ด้วยกัน เพื่อตรวจดูลักษณะภายนอกที่สามารถบ่งบอกได้ชัดเจนว่ามีความแตกต่างกันในระดับชนิด โดยใช้ลักษณะดังนี้คือ

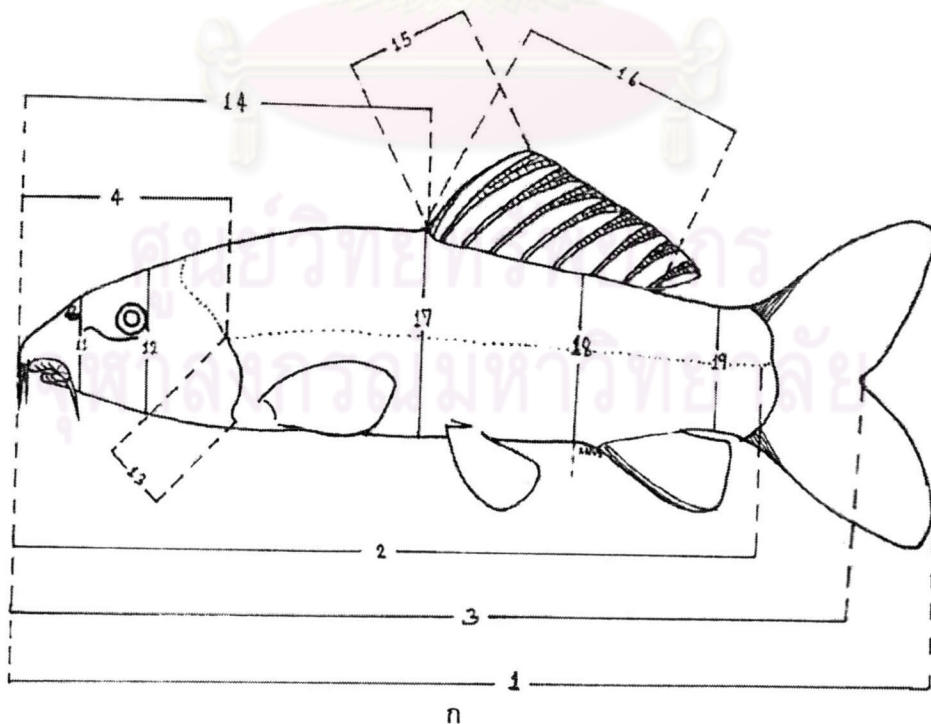
- เียงใต้ตา (erectile spine) สังเกตลักษณะการกาง ขนาดความยาวของเียง ลักษณะการแตกออกเป็นงาม รวมถึงรูปร่างลักษณะของร่องเียงใต้ตา

- เกล็ด มีขนาดเล็กมากฝังอยู่ในผิวหนัง เมื่อมองดูจากภายนอกจะเห็นเป็นเพียงตุ่มเล็กๆ ละเอียด การศึกษากระทำโดยนำเข็มหมุดชุดไปที่บริเวณชั้นผิวหนังตรงบริเวณคอดหางของปลาหมู แล้วนำมาแตะบนสไลด์ หยดน้ำลงไปปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะรูปร่างและลวดลายบนเกล็ดที่พบเห็นพร้อมทั้งถ่ายรูปเก็บไว้
- ครีบ สังเกตดูตำแหน่งต่างๆ ที่ตั้งครีบแต่ละแห่งคือ ครีบหลัง ครีบอก ครีบท้อง ครีบกัน และครีบหาง
- เส้นข้างตัว (lateral line) ศึกษาลักษณะเส้นข้างตัวของปลาหมู
- ลักษณะลวดลายบนลำตัวและครีบ

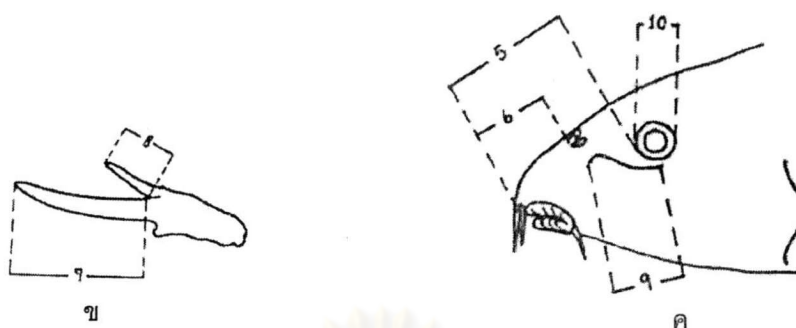
ข. การวัดเพื่อผลทางการเปรียบเทียบสัดส่วนและวิเคราะห์ผลในทางสถิติ (Proportion and Statistical analysis)

1. การวัดส่วนต่างๆ ของปลาหมู

ทำการวัดเป็นระยะทางหรือเส้นตรงจากจุดหนึ่งถึงจุดหนึ่ง โดยใช้เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ในหน่วยของมิลลิเมตรและให้มีความละเอียดถึงทศนิยม 1 ตำแหน่ง ส่วนต่างๆ ที่จะทำให้การวัดได้แสดงดังภาพที่ 4 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hubbs and Lagler (1974)



ภาพที่ 4 แสดงการวัดส่วนต่างๆ ของปลาหมูในรูป ก, ข และค (ข=เงี่ยงใต้ตา)



ภาพที่ 4 (ต่อ)

คำอธิบายภาพที่ 4

1. Total length (TL)
ความยาวสุด วัดจากปลายสุดของจะงอยปากถึงปลายสุดของครีบหางแพนล่าง
2. Standard length (SL)
ความยาวมาตรฐาน วัดจากปลายจะงอยปากถึงส่วนปลายสุดของกระดูก hypural plate
3. Fork length (FL)
ความยาวจากปลายจะงอยปากถึงปลายสุดของครีบหางที่เป็นส่วนเว้าลึกสุด
4. Head length (HL)
ความยาวหัวจากปลายจะงอยปากถึงขอบด้านท้ายของช่องเปิดเหงือก
5. Snout length (SnL)
ความยาวระหว่างปลายจะงอยปากถึงขอบด้านหน้าของตา
6. Prenostril length (PnL)
ความยาวระหว่างปลายจะงอยปากถึงขอบด้านหน้าของรูจมูกหน้า
7. Length of lower branch of erectile spine (LLE)
ความยาวของกิ่งล่างของเงี่ยงใต้ตา วัดจากโคนถึงปลายสุด
8. Length of upper branch of erectile spine (LUE)
ความยาวของกิ่งบนของเงี่ยงใต้ตา วัดจากโคนถึงปลายสุด
9. Length of groove for erectile spine (LGE)
ความยาวร่องของเงี่ยงใต้ตา โดยวัดจากจุดเริ่มต้นทางด้านหน้าถึงจุดสิ้นสุดทางด้านท้าย
10. Eye diameter (ED)

เส้นผ่านศูนย์กลางของตาในแนวนอน จากขอบตาด้านหน้าถึงขอบตาด้านหลัง

11. Head depth at posterior nostril (HDN)

ความลึกของส่วนหัวโดยวัดในแนวตั้งผ่านขอบด้านท้ายของจมูกด้านหลัง

12. Head depth at posterior eye margin (HDP)

ความลึกของส่วนหัวโดยวัดในแนวตั้งผ่านขอบด้านท้ายของตา

13. Gill opening width (GOW)

ความกว้างช่องเปิดเหงือกจากมุมบนสุดถึงมุมล่างสุด

14. Predorsal length (PDL)

ความยาวระหว่างปลายจะงอยปากถึงจุดเริ่มต้นของฐานครีบหลัง

15. Dorsal fin height (DFH)

ความยาวจากจุดเริ่มต้นของฐานครีบหลังไปถึงปลายสุดของก้านครีบหลังอันที่ยาวที่สุด

16. Dorsal fin base length (DFBL)

ความยาวจากจุดเริ่มต้นของฐานครีบหลังถึงจุดสิ้นสุดของฐานครีบหลัง

17. Body depth at predorsal fin (BDD)

ความลึกของลำตัวในแนวตั้งผ่านจุดเริ่มต้นของฐานครีบหลัง

18. Body depth at anus (BDA)

ความลึกของลำตัวในแนวตั้งผ่านรูก้น (anus)

19. Caudal peduncle depth (CPD)

ความลึกในแนวตั้งตรงบริเวณที่แคบที่สุดของคอดหาง

2. การคำนวณสัดส่วน

ใช้เครื่องคำนวณเทียบความยาวของอวัยวะหนึ่ง ๆ เป็นเปอร์เซ็นต์ของ ความยาวมาตรฐาน (SL) หรือของความยาวหัว (HL) หรืออื่น ๆ แล้วแต่กรณี เช่น เทียบสัดส่วนระหว่างความยาวของเงี่ยงใต้ตาถึงบนกับกึ่งล่าง หรือความยาวของฐานครีบหลังกับความสูงของครีบหลัง เป็นต้น

3. การวิเคราะห์ผลในทางสถิติ

นำผลการวัดหรือเทียบสัดส่วนมาวิเคราะห์หรือเปรียบเทียบผลในทางสถิติ โดยใช้สถิติ Duncan's New Multiple Range Test (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2542) เพื่อหาสัดส่วนของลักษณะที่บ่งบอกถึงความแตกต่างกันของปลาหมู่ในแต่ละชนิด ซึ่งอยู่ในโปรแกรม SPSS for Windows ในเครื่องคอมพิวเตอร์

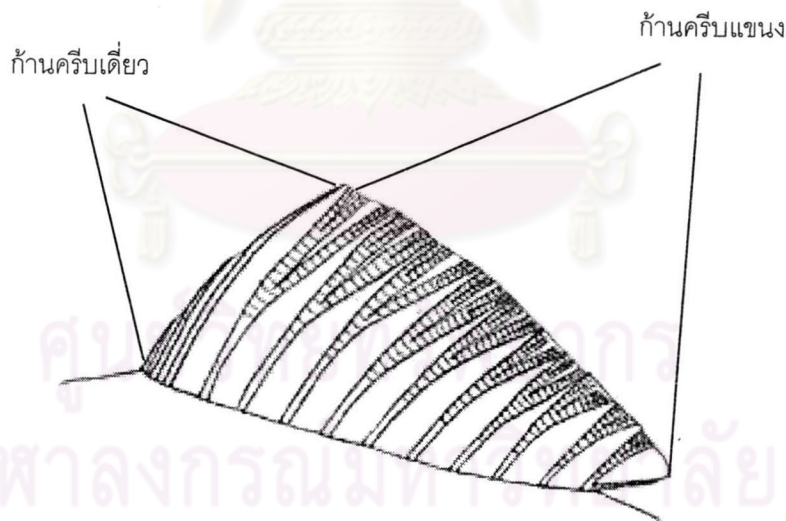
ค. การนับ (meristic count)

1. การนับจำนวนก้านครีบ

ปลาหมูไม่มีก้านครีบแข็ง มีแต่ก้านครีบอ่อนที่มี 2 ประเภทคือ ก้านครีบเดี่ยว หรือ simple ray และก้านครีบแขนงหรือ branched ray (ภาพที่ 5) จำนวนก้านครีบประเภทก้านครีบเดี่ยวแสดงด้วยเลขโรมันตัวพิมพ์เล็ก ส่วนจำนวนก้านครีบประเภทก้านครีบแขนง แสดงด้วยเลขอารบิก ครีบที่ศึกษาด้วยวิธีการนี้ได้แก่ ครีบหลัง (D) ครีบอก (P) ครีบท้อง (V) ครีบกัน (A) และครีบหาง (C) สำหรับการรายงานผลดัดแปลงจาก Talwar and Jhingran (1991) ดังตัวอย่าง เช่น

D iii, 10; P 14; V i, 7; A ii, 5-6; C i, 9, 8, i

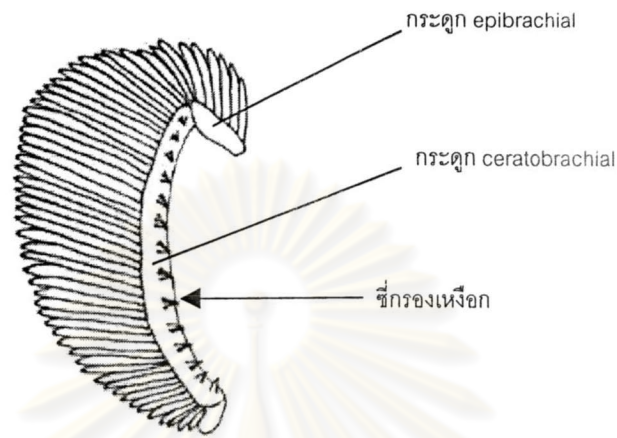
หมายถึง ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยว 3 ก้าน และ ก้านครีบแขนง 10 ก้าน ครีบอกประกอบด้วยก้านครีบแขนง 14 ก้าน ครีบท้องประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยว 1 ก้าน และ ก้านครีบแขนง 7 ก้าน ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยว 2 ก้าน และก้านครีบแขนง 5-6 ก้าน ครีบหาง มีแพนหางเป็น 2 แฉก คือแพนบนและแพนล่าง แพนบนประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยว 1 ก้าน ก้านครีบแขนง 9 ก้าน ส่วนแพนล่างประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยว 1 ก้าน ก้านครีบแขนง 8 ก้าน



ภาพที่ 5 แสดงก้านครีบเดี่ยวและก้านครีบแขนงของครีบหลัง

2. การนับซี่กรองเหงือก (Gill rakers)

นับจำนวนซี่กรองเหงือกทั้งหมดที่พบบนกระดูกแกนเหงือก ceratobranchial อันแรกที่อยู่หน้าสุด (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงซี่กรองเหงือก (gill raker) บนกระดูกแกนเหงือก ceratobranchial

3. การนับจำนวนข้อกระดูก [Total vertebrae (TV)]

แล้วเนื้อออกจนถึงกระดูกสันหลังทำการนับจำนวนข้อกระดูกสันหลังทั้งหมด นอกจากนั้นยังนับจำนวนข้อกระดูกสันหลังจากตัวอย่างที่ใช้วิธีดองใสด้วย

3.2 การศึกษากายวิภาคเปรียบเทียบ

นำตัวอย่างปลาหมูแต่ละชนิดมาศึกษาลักษณะภายในเพื่อเปรียบเทียบและตรวจหาลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ดังนี้คือ

ก. การผ่าและชำแหละเพื่อเปรียบเทียบอวัยวะภายใน

- จมูก ศึกษาคุณลักษณะของเนื้อเยื่อบุผิว (Olfactory epithelium หรือ Rosette) ที่กรูโพรงจมูก แล้วชำแหละศึกษาดูรูปร่างลักษณะจากกล้องสเตอริโอ บันทึกรายละเอียดพร้อมวาดภาพประกอบ
- กระเพาะลม ศึกษาลักษณะรูปร่างของกระเพาะลม ซึ่งมีอยู่ 2 ส่วน คือ ส่วนหน้า หรือ anterior chamber และ ส่วนท้ายหรือ posterior chamber และตำแหน่งของท่อ pneumatic พร้อมทั้งถ่ายรูปหรือวาดภาพประกอบ

ข. การศึกษาโครงกระดูก

โดยใช้วิธีการย้อมสีดองใส เพื่อศึกษารูปร่างทั่วไปของโครงกระดูกของปลาหมอ พร้อมทั้งนับจำนวนข้อกระดูกสันหลังทั้งหมด และศึกษากลไกการค้ำของเงี่ยงใต้ตาโดยกระทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ ซวลิต วิทยานนท์ (2528), นิพนธ์ ประพตติธรรม (2534) และ ทศพร วงศ์รัตน์ และคณะ (2542)

1. คัดเลือกปลาหมอแต่ละชนิดจากตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ นำมาแล่นเนื้อออกให้มากที่สุด แล้วแช่น้ำไว้ประมาณ 1 วัน เพื่อกำจัดกลิ่นฟอร์มาลิน และให้เนื้อปลาคลายตัว
2. นำตัวอย่างปลาแช่ลงในสารละลายคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เพื่อช่วยละลายไขมันที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ (เพราะไขมันที่มีอยู่ทำให้สารเคมีซึมผ่านเข้าไปในตัวปลาได้ช้า) โดยแช่ทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน
3. การฟอกสี โดยเตรียม 3% H_2O_2 : 2% KOH เป็นสัดส่วนเท่ากับ 9 : 1 นำตัวอย่างมาแช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 วัน หรือจนกว่าจะเห็นเนื้อเยื่อปลามีความขาวใสขึ้น
4. นำตัวอย่างแช่ลงใน 95% Alcohol นาน 30 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อของตัวปลา
5. นำตัวอย่างมาย้อมสีกระดูก โดยเตรียมสี Alizarin red S ประมาณ 1 กรัม ผสมน้ำ 1 หยด แล้วนำไปผสมกับ 2% KOH 1 ลิตร ใช้แท่งแก้วค่อยๆ ป้ายสีลงใน 2% KOH สังเกตสีหากเป็นสีม่วงเข้มก็จะใช้ย้อมสีได้ โดยแช่ตัวอย่างปลาทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน หรือจนกระทั่งเห็นกระดูกติดเป็นสีบานเย็นชัดเจน
6. นำตัวอย่างแช่ลงในสารละลายระหว่าง glycerin : 0.5 % KOH 1 : 3 เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วเปลี่ยนเป็นอัตราส่วน 1 : 1 และ 3 : 1 ตามลำดับ ขั้นตอนละ 1-2 วัน เช่นกัน
7. นำตัวอย่างปลาแช่ลงใน glycerin ล้วน ๆ ใส่ไหมมอลลงไป 1-2 เกล็ด เพื่อป้องกันเชื้อรา ปิดฝาภาชนะให้แน่น รอนำไปใช้ศึกษาต่อไป

การศึกษากลไกการค้ำของเงี่ยงใต้ตา

นำกระดูกปลาหมอที่ได้ทำการดองใสตามวิธีข้างต้นและการผ่าชำແລະจากตัวอย่าง ที่รักษาสภาพไว้ของปลาหมอชนิด *Botia modesta* มาศึกษาถึงกลไกที่ทำให้เกิดการค้ำของเงี่ยงใต้ตา บันทึกข้อมูลพร้อมทั้งเขียนแบบแผนของกลไกที่ทำให้เกิดการค้ำของเงี่ยงใต้ตาประกอบการบรรยาย

4. การศึกษาตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์

เพื่อการแก้ไขการวิเคราะห์ชนิดที่อาจผิดพลาดของงานในอดีตและเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์มากขึ้น เนื่องจากไม่สามารถทำการเก็บตัวอย่างได้ครบทุกสาขาแม่น้ำในแต่ละลุ่มน้ำ ประกอบกับได้มีการรวบรวมตัวอย่างพร้อมข้อมูลไว้ในพิพิธภัณฑ์หลายแห่งในประเทศ ทำให้ได้ประโยชน์ในกรณีที่ตัวอย่างบางชนิดมีจำนวนไม่เพียงพอ หรือตัวอย่างปลาหมูบางชนิดมีโอกาสพบได้ยาก หรือมีแหล่งที่พบแตกต่างกันไป จึงได้ทำการติดต่อกับภัณฑารักษ์ของพิพิธภัณฑ์ต่าง ๆ ทุกแห่งที่ปรากฏ เพื่อขออนุญาตตรวจศึกษาตัวอย่างตามวิธีการที่กล่าวมา และให้สอดคล้องกับกฎเกณฑ์ของพิพิธภัณฑ์เหล่านั้น ซึ่งมีดังต่อไปนี้คือ

- พิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- กองวิจัยธรรมชาติวิทยา องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ
- สถาบันพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาประมง กรมประมง
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การเขียนคีย์จำแนกชนิด

หลังจากที่ได้รวบรวมข้อมูลด้านต่าง ๆ ของปลาหมูจะได้นำมาเรียบเรียงเป็นตารางเปรียบเทียบ และใช้เป็นหลักในการศึกษากับเอกสารจนสามารถบ่งบอกชนิดเป็นที่แน่นอนแล้ว นำมาแจกแจงเป็นคีย์สำหรับทุกชนิดพร้อมกัน จากนั้นทดลองใช้เพื่อทดสอบความคล่องของคีย์ที่ได้เขียนขึ้น

6. การบรรยายข้อมูลโดยสรุปของปลาหมูแต่ละชนิด

เมื่อข้อมูลพร้อมจนสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อแสดงความแตกต่างระหว่างชนิดของปลาหมูจนสามารถกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์จากเอกสารที่เชื่อถือได้แล้ว นำข้อมูลทั้งหมดที่ทำการศึกษาไว้ของปลาหมูทุกชนิดมาเขียนรายละเอียด โดยกล่าวเป็นลำดับตั้งแต่ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง ชื่อภาษาไทย ชื่อภาษาอังกฤษ สถานที่พบตัวอย่างต้นแบบ ลักษณะเด่นที่ใช้เปรียบเทียบและสามารถแสดงความแตกต่างกับชนิดอื่น สันฐานวิทยา อวัยวะภายใน สี รวมถึงข้อมูลการกระจายพันธุ์ ชีววิทยาทั่วไป พฤติกรรม และความชุกชุมของแต่ละชนิดโดยละเอียด