

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และสถานที่เก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ คือ ตัวอย่างปลาสกุลปลาช่อนจำนวน 3 ชนิด 8 กลุ่มตัวอย่าง ประกอบด้วย ปลาช่อน *C. striata* จำนวน 3 กลุ่มตัวอย่าง ปลาก้าง *C. gachua* จำนวน 3 กลุ่มตัวอย่าง และปลากระสง *C. lucius* จำนวน 2 กลุ่มตัวอย่าง มีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มตัวอย่างที่ 1 คือ กลุ่มประชากรปลาช่อนจากจังหวัดบึงกาฬ (CS-NK) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 58 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากบึงกุดทิง อำเภอบึงกาฬ จังหวัดบึงกาฬ ซึ่งมีลักษณะเป็นกุด (oxbow lake) มีพื้นที่ประมาณ 26.40 ตารางกิโลเมตร (ประมาณ 16,500 ไร่) รูปร่างคล้ายปีกผีเสื้อ กุดทิงมีระบบนิเวศที่เชื่อมต่อกับแม่น้ำโขง ระดับความลึกของแหล่งน้ำแห่งนี้ประมาณ 2 – 5 เมตร และในฤดูน้ำหลากอาจลึกมากสุดถึง 10 เมตร แต่ลดลงมากในฤดูแล้ง (สิริกุล บรรพพงศ์, 2542; วันชัย จันทร์ฉาย และ สุธรา จันทรานิมิตร, 2546)

กลุ่มตัวอย่างที่ 2 คือ กลุ่มประชากรปลาช่อนจากจังหวัดขอนแก่น (CS-KK) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 79 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากแก่งละว้า อำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีลักษณะเป็นบึงขนาดใหญ่ทางตัวในแนวเหนือ-ใต้ อยู่ทางฝั่งขวาของลำแม่น้ำชี มีน้ำขังตลอดปี มีเนื้อที่ประมาณ 11.2 ตารางกิโลเมตร (ประมาณ 7,000 ไร่) ส่วนยาวที่สุดของบึงประมาณ 11 กิโลเมตร ส่วนกว้างที่สุดประมาณ 4 กิโลเมตร พื้นที่โดยรวมเป็นพื้นที่ราบเรียบ มีความลาดชันเล็กน้อย รอบแก่งละว้าเป็นที่นา บึงนี้มีโอกาสรับน้ำเข้า 2 ทาง คือ จากลำห้วยธรรมชาติและจากแม่น้ำชี (สิริกุล บรรพพงศ์, 2542; วันชัย จันทร์ฉาย และ สุธรา จันทรานิมิตร, 2546)

กลุ่มตัวอย่างที่ 3 คือ กลุ่มประชากรปลาช่อนจากจังหวัดมหาสารคาม (CS-MK) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 48 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากบ่อรวบรวมปลาตามธรรมชาติในทุ่งนา อยู่ในเขตพื้นที่บ้านโคกตำบลห้วยแอ่ง อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม มีลักษณะเป็นบ่อที่ขุดขึ้น เนื้อที่ประมาณ 2 ไร่ ความลึกประมาณ 1-2 เมตร ในฤดูฝนมีระบบนิเวศเชื่อมโยงกับระบบนิเวศนาข้าว แต่ในฤดูแล้งมีระบบนิเวศที่ตัดขาดจากพื้นที่รอบข้าง

กลุ่มตัวอย่างที่ 4 คือ กลุ่มประชากรปลาก้างจากจังหวัดบึงกาฬ (CG-NK) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 31 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากลำห้วยที่ไหลผ่านเขตพื้นที่เกษตรกรรมที่เป็นนาข้าวและสวนยางพารา อยู่ในเขตพื้นที่บ้านห้วยสะอาด ตำบลถ้ำเจริญ อำเภอโซ่พิสัย จังหวัดบึงกาฬ ความกว้างของลำห้วยประมาณ 3-5 เมตร ความลึกของน้ำประมาณ 0.5 – 1.0 เมตร กระแสน้ำไหลค่อนข้างแรง พื้นที่ท้องน้ำมีลักษณะที่หลากหลาย บางช่วงเป็นลานหิน บางช่วงเป็นกรวดมน บางช่วงเป็นทรายหยาบ และบางช่วงเป็นดินร่วนปนทราย

กลุ่มตัวอย่างที่ 5 คือ กลุ่มประชากรปลาก้างจากจังหวัดหนองบัวลำภู (CG-NB) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 31 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากลำธารภูเขา อยู่ในเขตพื้นที่บ้านภูพานคำ ตำบลโนนทัน อำเภอเมือง จังหวัดหนองบัวลำภู ซึ่งมีลักษณะเป็นลำธารขนาดเล็ก ความกว้างประมาณ 2-3 เมตร น้ำมีปริมาณน้อย กระแสน้ำไหลค่อนข้างช้า พื้นที่ท้องน้ำส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นลานหิน มีน้ำท่วมขังในหลุมและแอ่งขนาดเล็กที่เกิดจากการกัดเซาะของกระแสน้ำอยู่ทั่วไป

กลุ่มตัวอย่างที่ 6 คือ กลุ่มประชากรปลาก้างจากจังหวัดกาฬสินธุ์ (CG-KS) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 37 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งน้ำที่เกิดจากน้ำซับ อยู่ในเขตพื้นที่บ้านห้วยอ้อม ตำบลท่าคันโท อำเภوتاคันโท จังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งมีลักษณะเป็นแหล่งน้ำที่เกิดจากตาน้ำซับ พื้นที่รอบข้างเป็นทุ่งนา ในหน้าฝนจะมีระบบนิเวศเชื่อมโยงกับอ่างเก็บน้ำเขื่อนลำปาว เนื่องจากน้ำจากอ่างเก็บน้ำจะเอ่อเข้าท่วมพื้นที่เก็บตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ 7 คือ กลุ่มประชากรปลากระสงจากจังหวัดบึงกาฬ (CL-NK) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 92 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากบึงกุดทิง อำเภอเมือง จังหวัดบึงกาฬ เช่นเดียวกับกลุ่มตัวอย่างที่ 1

กลุ่มตัวอย่างที่ 8 คือ กลุ่มประชากรปลากระสงจากจังหวัดขอนแก่น (CL-KK) ประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 79 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากแก่งละว้า อำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น เช่นเดียวกับกลุ่มตัวอย่างที่ 2

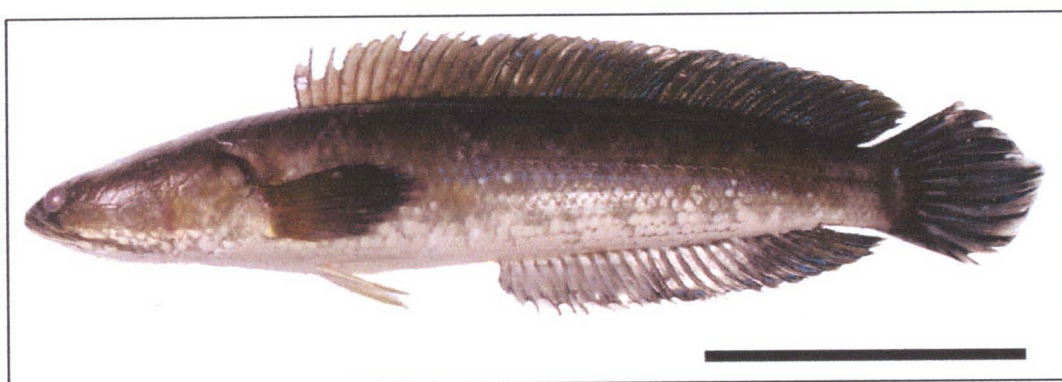
ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวอย่างแต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 16 ตำแหน่งที่ตั้งของสถานที่เก็บตัวอย่างแสดงในภาพที่ 17 และสภาพทางนิเวศวิทยาเชิงกายภาพโดยทั่วไปของสถานที่เก็บตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 18–23

2. การเก็บตัวอย่าง

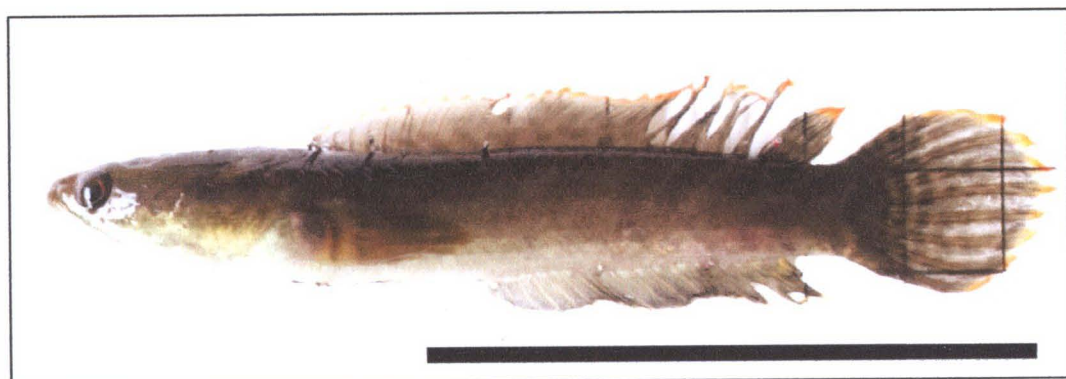
เก็บตัวอย่างปลาช่อน *C. striata* และปลากระสง *C. lucius* โดยการรับซื้อจากชาวประมงที่ทำการประมงในพื้นที่เก็บตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างปลาก้าง *C. gachua* โดยการชอร์ตด้วยกระแสไฟฟ้าและช้อนด้วยสวิงหรือช้อนด้วยสวิงโดยตรง หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ตีครีห์สหหมายเลข และเก็บในถุงพลาสติก แห้งถุงพลาสติกที่มีตัวอย่างในน้ำแข็ง เพื่อขนย้ายมาเก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (°C) ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ เพื่อรอการศึกษาในขั้นต่อไป

3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อสร้างข้อมูลมอร์โฟเมตริกส์

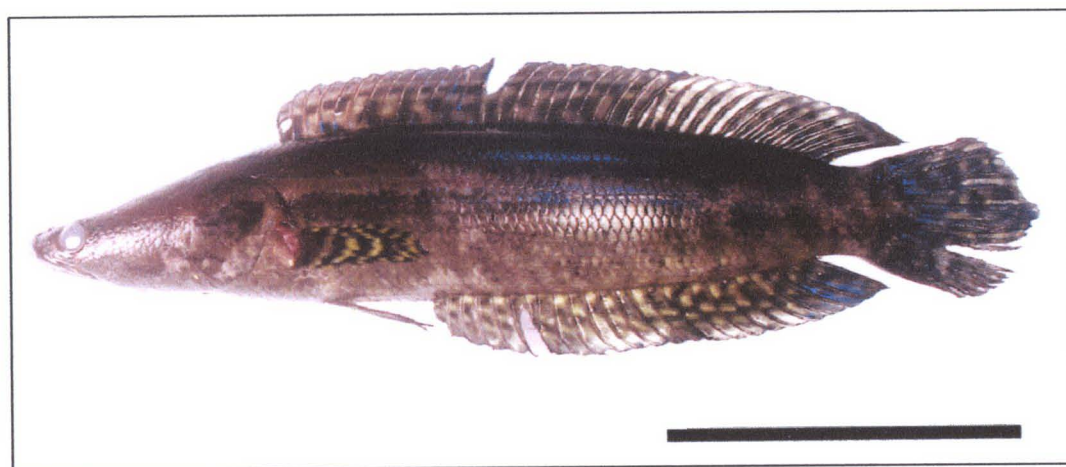
นำตัวอย่างออกจากตู้แช่แข็งและแช่ในน้ำประปา ทิ้งไว้จนน้ำแข็งละลายออกจากตัวปลาจนหมด จากนั้นซับน้ำออกจากตัวปลาและตรวจสอบสภาพของตัวอย่าง คัดเลือกตัวอย่างที่มีสภาพดีสำหรับการเก็บข้อมูล ถ้าตัวอย่ขงมีสภาพเปลี่ยนแปลงมาก เช่น ลำตัวคดงอ ท้องเปื่อย หรือครีบกหลุดลุ่ย ให้ทำการคัดทิ้ง เตรียมตัวอย่างสำหรับบันทึกภาพ โดยวางตัวอย่างบนกระดาษตารางที่มีแผ่นโฟม (polystyrene board) รองรับ โดยวางซีกขวาของตัวปลาลงด้านล่าง จัดลำตัวให้เหยียดตรง ครีบกแผ่นกางออก โดยใช้เข็มหมุดช่วยยึด นำแผ่นโฟมที่มีตัวอย่างตั้งอยู่วางบนแท่นถ่ายภาพ (ภาพที่ 24) บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพแบบสะท้อนภาพเลนส์เดียวระบบดิจิทัล (digital-SLR) ยี่ห้อ CANON รุ่น EOS 50D ที่ความละเอียด 15 ล้านจุดภาพ (megapixel) และเก็บข้อมูลภาพถ่ายในรูปแบบไฟล์ JPEG เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



(ก)

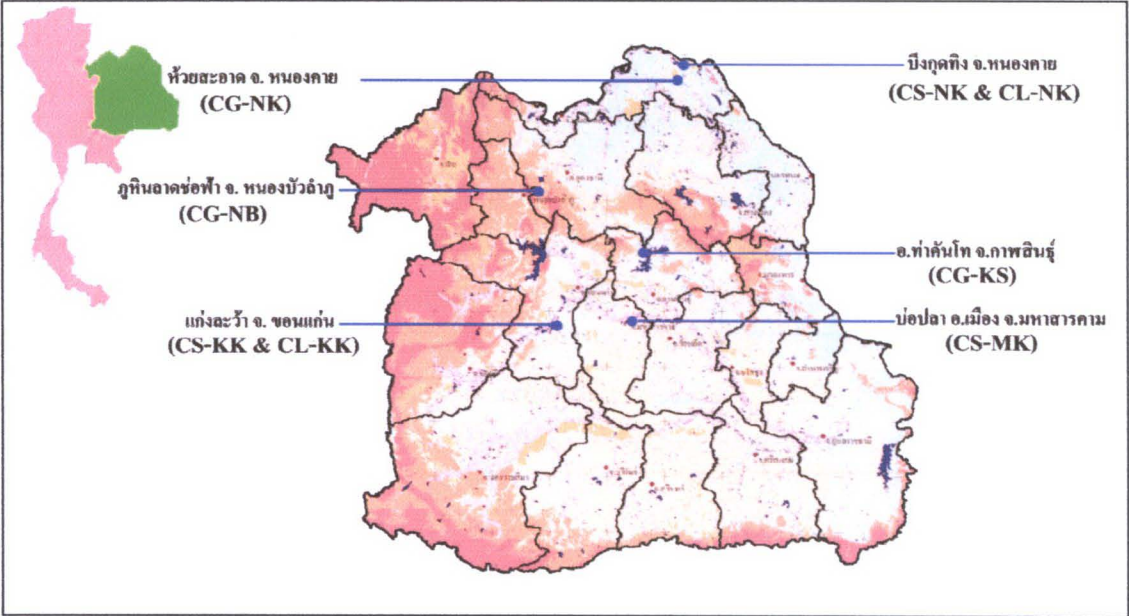


(ข)

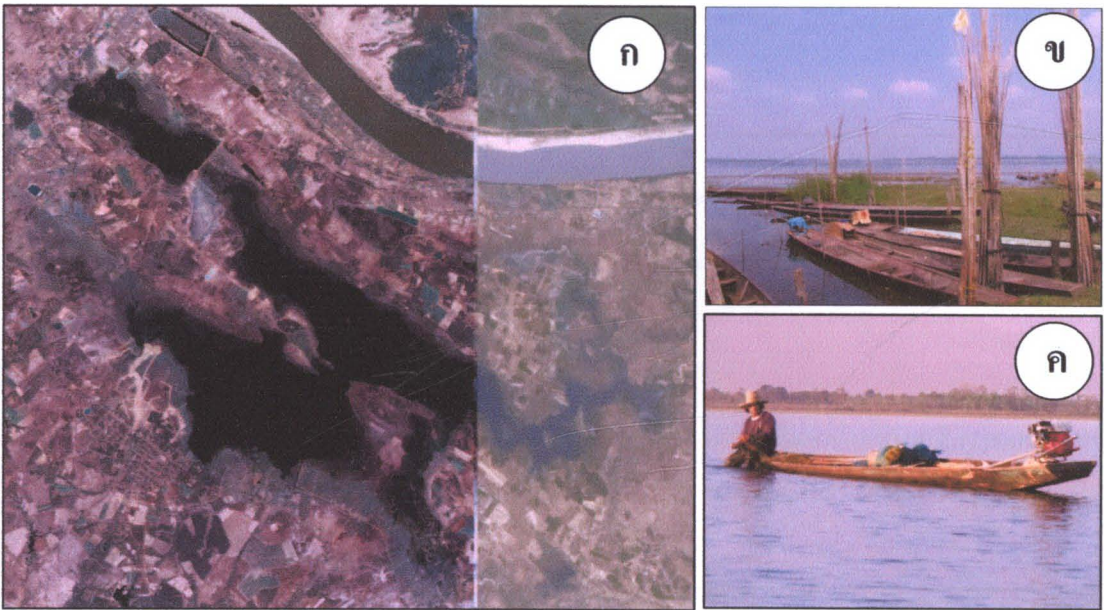


(ค)

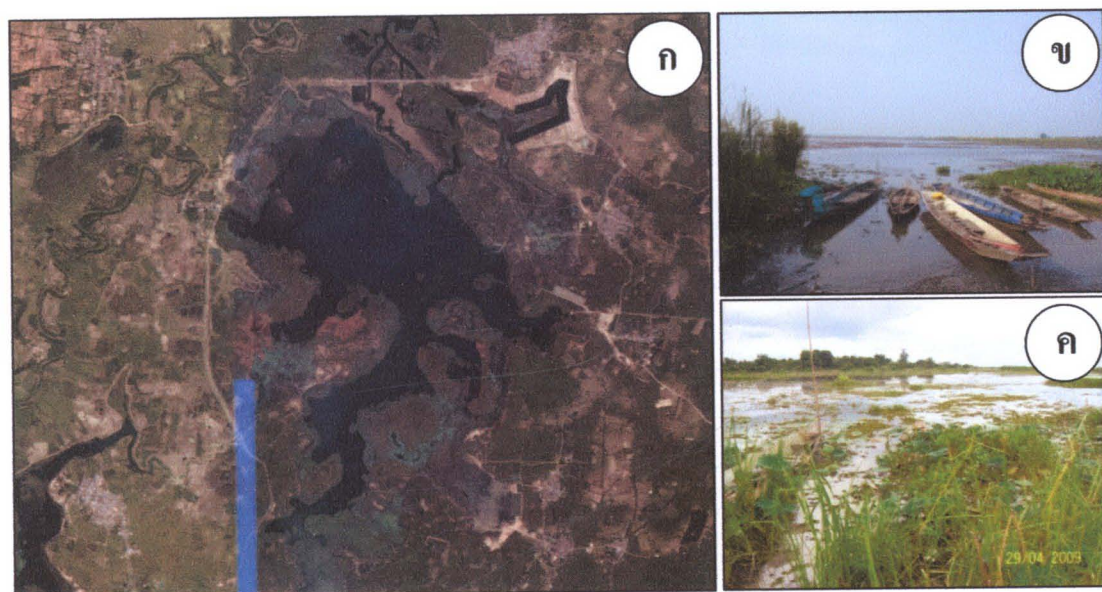
ภาพที่ 16 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวอย่างปลาสกุลปลาช่อนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ปลาช่อน *C. striata* (ก) ปลาก้าง *C. gachua* (ข) และปลากะพง *C. lucius* (ค) สเกลเท่ากับ 10 เซนติเมตร



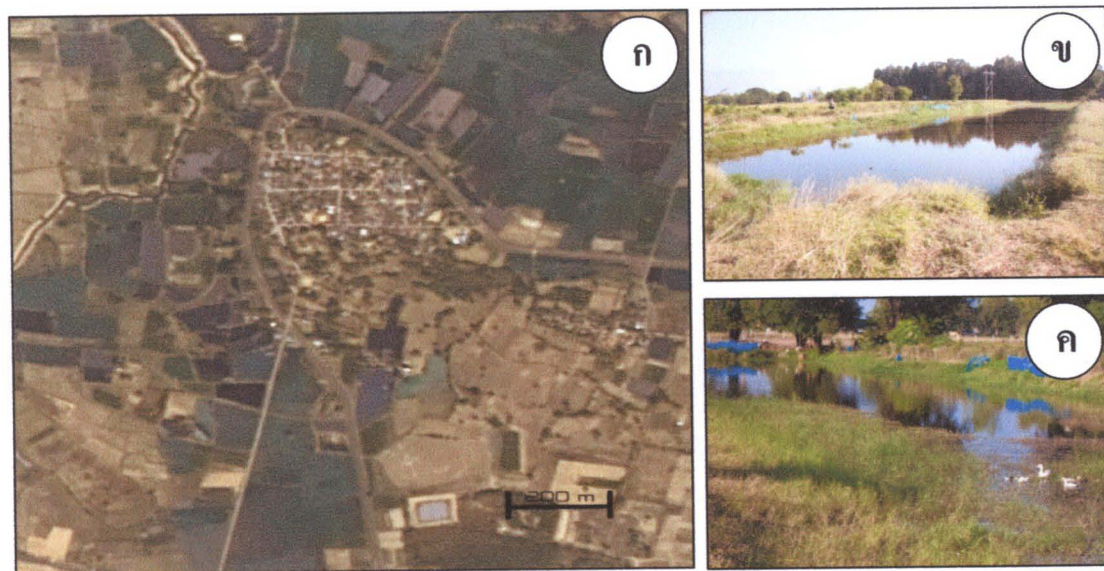
ภาพที่ 17 ตำแหน่งของสถานที่เก็บตัวอย่าง
(ดัดแปลงจาก ศูนย์ภูมิสารสนเทศเพื่อการพัฒนาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 2549)



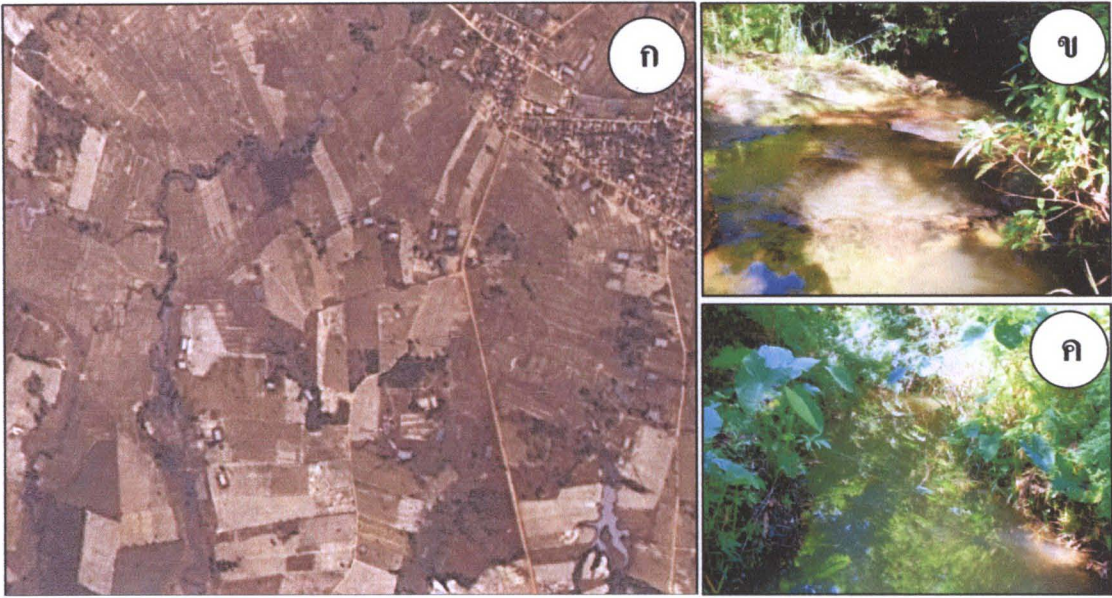
ภาพที่ 18 ภาพถ่ายดาวเทียม (ก) และลักษณะทางกายภาพทั่วไป (ข - ค: รัตนภักย์ สาขามาลา, 2553) ของบึงกุดทิง อำเภอบึงกาฬ จังหวัดบึงกาฬ



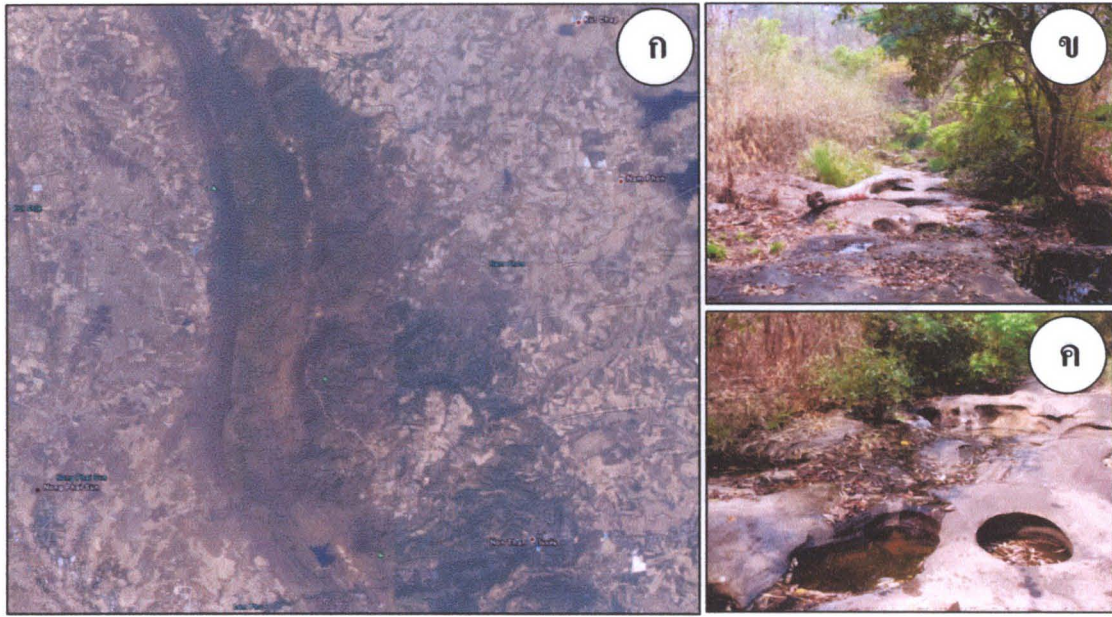
ภาพที่ 19 ภาพถ่ายดาวเทียม (ก) และลักษณะทางกายภาพทั่วไป (ข-ค) ของแก่งละว้า จังหวัดขอนแก่น



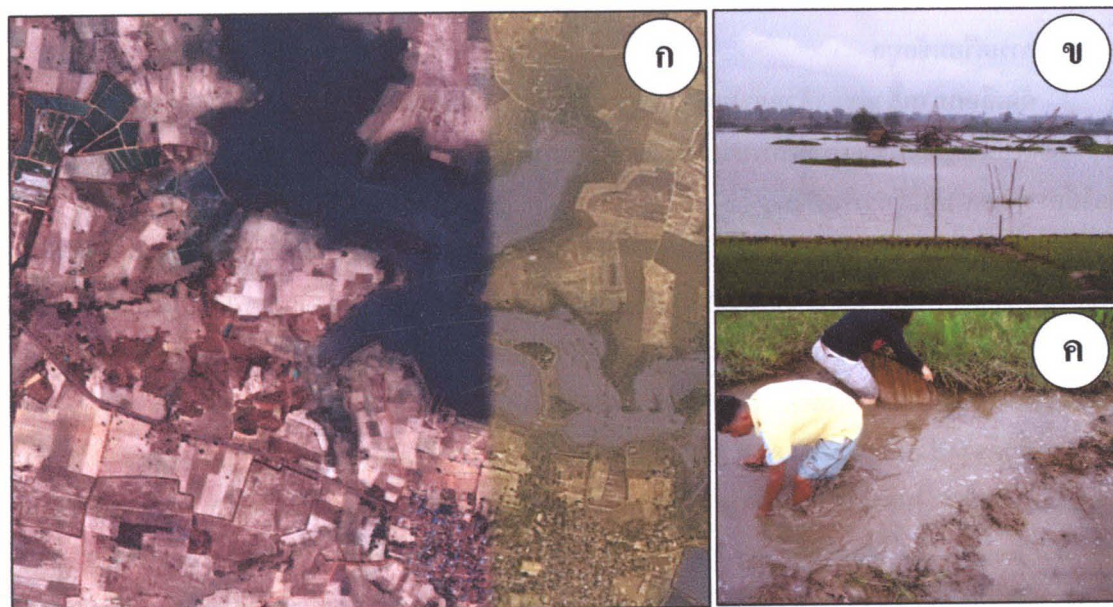
ภาพที่ 20 ภาพถ่ายดาวเทียม (ก) และลักษณะทางกายภาพทั่วไป (ข-ค) ของบ่อปลาบริเวณบ้านโค ตำบลห้วยแอ่ง อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม



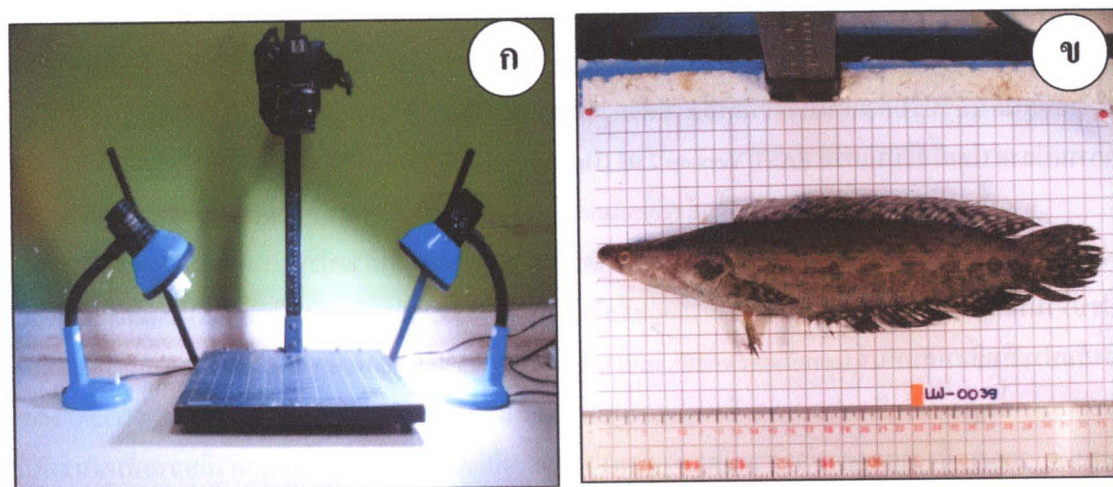
ภาพที่ 21 ภาพถ่ายดาวเทียม (ก) และลักษณะทางกายภาพทั่วไป (ข-ค) ของสถานที่เก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่บ้านห้วยสะอาด ตำบลถ้ำเจริญ อำเภอโซ่พิสัย จังหวัดบึงกาฬ



ภาพที่ 22 ภาพถ่ายดาวเทียม (ก) และลักษณะทางกายภาพทั่วไป (ข-ค) ของสถานที่เก็บตัวอย่างบริเวณภูหินลาดซ่อฟ้า บ้านภูพานคำ ตำบลโนนทัน อำเภอเมือง จังหวัดหนองบัวลำภู



ภาพที่ 23 ภาพถ่ายดาวเทียม (ก) และลักษณะทางกายภาพทั่วไป (ข-ค) ของสถานที่เก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่ บ้านห้วยอ้อม ตำบลท่าคันโท อำเภอท่าคันโท จังหวัดกาฬสินธุ์



ภาพที่ 24 การเตรียมอุปกรณ์ (ก) และการจัดทำทางของตัวอย่าง (ข) เพื่อบันทึกภาพสำหรับการใช้ในการศึกษา

4. การศึกษาด้วยวิธีมอร์โฟเมตริกส์เชิงพหุแบบเทคนิคระบบเครือข่ายโครงยึก

4.1 การเตรียมข้อมูล

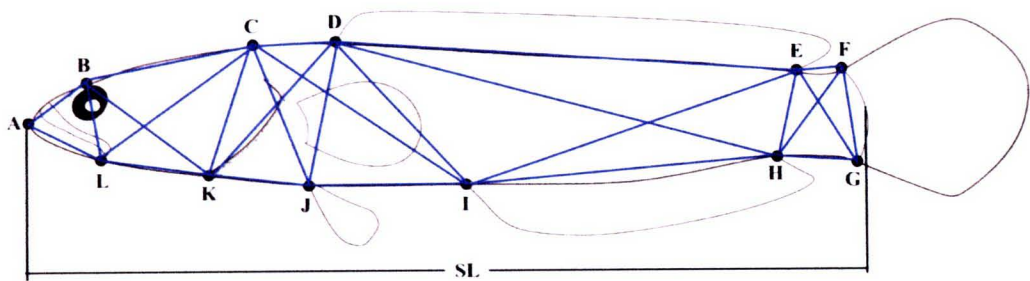
คัดเลือกภาพถ่ายของตัวอย่างแต่ละตัวเข้าสู่โปรแกรม ImageJ for Windows Version 1.43 (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) จากนั้นทำการปรับตั้งระยะทางในภาพ (distance calibration) โดยเทียบกับระยะที่ทราบค่าจากไม้บรรทัดและเส้นตารางในภาพ

กำหนดจุดกำหนดจำนวน 12 จุด บนตำแหน่งคู่เหมือนที่สมนัยกัน ซึ่งจะทำให้แต่ละจุดกำหนดมีตำแหน่งเดียวกันในทุกตัวอย่าง จากนั้นสร้างเส้นสมมติเชื่อมระหว่างจุดกำหนดดังกล่าว โดยเส้นที่สร้างขึ้นจะสานกันเป็นตาข่ายที่จัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบคลุมทั่วตัวปลา (ภาพที่ 24) ความยาวของเส้นสมมติแต่ละเส้นคือค่าของตัวแปรเครือข่ายโครงยึก (TNS) ที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วยตัวแปรจำนวนทั้งหมด 26 ตัวแปร ซึ่งเป็นค่าที่วัดจากส่วนหัวจำนวน 8 ตัวแปร ส่วนลำตัวจำนวน 12 ตัวแปร และส่วนหางจำนวน 6 ตัวแปร (รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2) ทำการวัดค่าความยาวของแต่ละตัวแปรข้างต้น และวัดค่าความยาวมาตรฐาน (standard length, SL) ของตัวอย่างแต่ละตัว บันทึกข้อมูลการวัดในรูปแบบไฟล์ตารางงาน (spread sheet) ของโปรแกรม Microsoft® Excel โดยกำหนดให้แต่ละสดมภ์ (column) ของตารางงานเป็นข้อมูลของแต่ละตัวแปร และแต่ละแถว (row) เก็บข้อมูลของตัวอย่างแต่ละตัว

4.2 การแปลงค่าและคัดเลือกข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการวัดจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการแปลงค่าเพื่อกำจัดความแปรปรวนเนื่องอิทธิพลของขนาดร่างกายออกจากข้อมูล เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แสดงถึงความแปรผันทางสัณฐานวิทยาที่เป็นความแปรผันของรูปร่างที่แท้จริง ไม่ใช่เป็นผลเนื่องจากการที่ตัวอย่างมีขนาดร่างกายที่ต่างกัน (Reist, 1985) การศึกษานี้ทำการแปลงค่าด้วยวิธีการปรับค่าขนาดของเบอร์นابی เนื่องจากสามารถกำจัดความแปรปรวนเนื่องอิทธิพลของขนาดร่างกายออกจากข้อมูลได้ดีกว่าวิธีอื่น (Parsons *et al.*, 2003) โดยกำหนดให้แกนองค์ประกอบแรกเป็นแกนของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับขนาด (size factor) จากนั้นกำหนดคะแนนองค์ประกอบของแกนองค์ประกอบแรกให้มีค่าเท่ากับศูนย์ แล้วปรับค่าแกนปัจจัยที่เหลือให้ตั้งฉากกับแกนปัจจัยแรก (Burnaby, 1966; Bookstein, 1987) ทำการแปลงค่าโดยใช้โปรแกรม PAST Version 2.03 (Hammer *et al.*, 2001)

จากนั้นทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร TNS ที่ผ่านการแปลงค่าแล้วแต่ละตัวกับค่าความยาวมาตรฐาน เพื่อทดสอบว่าตัวแปรที่ผ่านการแปลงค่ายังมีความแปรปรวนที่เกิดจากอิทธิพลของขนาดร่างกายอยู่หรือไม่ (Reist, 1985; Turan, 1999) โดยตัวแปรที่มีค่าสัมบูรณ์ของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlative coefficient) มากกว่า 0.30 ($|r| > 0.300$) เนื่องจากถือว่ามีความสัมพันธ์กับความยาวมาตรฐาน หรืออีกความหมายคือยังมีความสัมพันธ์กับขนาดของร่างกายอยู่ จะถูกตัดทิ้ง (Turan and Ergüden, 2004) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่า ตัวแปร TNS ที่ผ่านการแปลงค่าแล้วทุกตัวมีความสัมพันธ์กับตัวแปร SL น้อยมาก รายละเอียดของการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข1 ดังนั้นตัวแปรทุกตัวจะถูกนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 25 ตำแหน่งการวัดค่าตัวแปรเครือข่ายโครงยึด (TNS) และค่าความยาวมาตรฐาน (SL) จากตัวอย่าง

ตารางที่ 3 รายละเอียดของตัวแปรเครือข่ายโครงยึด (TNS) ที่ใช้ในการศึกษานี้

ชื่อตัวแปร	คำอธิบาย	ชื่อตัวแปร	คำอธิบาย
ตัวแปรลักษณะของส่วนหัว			
AB	ความยาวหน้าผาก	KL	ความยาวหัวด้านล่าง
AL	ความยาวขากรรไกรล่าง	BK	ความยาวหัวแนวทแยง 1
BL	ความลึกหัวตอนหน้า	CL	ความยาวหัวแนวทแยง 2
BC	ความยาวหัวด้านบน	CK	ความลึกหัวด้านท้าย
ตัวแปรลักษณะของส่วนลำตัว			
CD	ความยาวหลัง	DE	ความยาวฐานครีบท้อง
IJ	ความยาวท้อง	HI	ความยาวฐานครีบก้น
JK	ความยาวอก	DH	ความยาวลำตัวตอนท้ายแนวทแยง 1
CI	ความยาวลำตัวตอนหน้าแนวทแยง 1	EI	ความยาวลำตัวตอนท้ายแนวทแยง 2
CJ	ความยาวลำตัวตอนหน้าแนวทแยง 2	DJ	ความลึกลำตัวตอนหน้า
DK	ความยาวลำตัวตอนหน้าแนวทแยง 3	DI	ความลึกลำตัวตอนท้าย
ตัวแปรลักษณะของส่วนหาง			
EF	ความยาวคอดหางด้านบน	FH	ความยาวคอดหางแนวทแยง 2
GH	ความยาวคอดหางด้านล่าง	EH	ความลึกคอดหางตอนหน้า
EG	ความยาวคอดหางแนวทแยง 1	FG	ความลึกคอดหางตอนหลัง

4.3 การวิเคราะห์ความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในระดับภายในชนิดและระหว่างชนิด

ทำการวิเคราะห์รูปแบบความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มตัวอย่างทั้งในระดับระหว่างชนิดและระดับภายในชนิดโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) (Marcus, 1990; Bronte *et al.*, 1999; Turan, 1999; Molina *et al.*, 2006) โดยจัดกลุ่มแกนองค์ประกอบโดยใช้เมทริกซ์สหสัมพันธ์ (correlation matrix) ของตัวแปรเครือข่ายโครงยัดที่ผ่านการแปลงค่าแล้ว โดยตัวแปรที่มีค่าสัมบูรณ์ของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.700 ($|r| > 0.700$) จะถูกจัดเข้าเป็นสมาชิกของแกนองค์ประกอบนั้น และแสดงรูปแบบความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในรูปของแผนภาพการกระจาย (scatterplot) ของตัวอย่างบนแกนองค์ประกอบหลัก จัดกลุ่มที่มีรูปแบบความแปรผันแบบเดียวกันโดยใช้วงรีความเชื่อมั่น (confidence ellipse) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Bronte *et al.*, 1999; Bhassu and Rashid, 2009) ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม STATISTICA Version 8.0 (StatSoft[®], Inc., U.S.A.)

4.4 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และการระบุชนิดและกลุ่มประชากร

การวิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบทีละขั้น (stepwise discriminant analysis, SDA) เป็นเทคนิคที่คัดเลือกตัวแปรมารวมกันเชิงเส้นทีละตัวเพื่อสร้างฟังก์ชันจำแนกที่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างออกจากกันได้ถูกต้องมากที่สุด (Marcus, 1990; Turan, 1999) ดังนั้น ผลของการวิเคราะห์จำแนกกลุ่มจึงเป็นการรวมลักษณะที่สามารถแยกแต่ละกลุ่มตัวอย่างออกจากกันเข้าไว้ด้วยกัน โดยตัวอย่างที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมากจะถูกแยกกลุ่มออกจากกัน ทำให้ทราบถึงความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ในทางกลับกันยังสามารถใช้ลักษณะดังกล่าวในการจำแนกตัวอย่างเข้าเป็นสมาชิกของกลุ่มได้ (Marcus, 1990)

วิเคราะห์จำแนกกลุ่มแบบทีละขั้น โดยใช้ข้อมูลตัวแปร TNS ที่ผ่านการแปลงค่าแล้วจำนวน 26 ตัวแปร นำเข้าตัวแปรเพื่อสร้างฟังก์ชันจำแนกแบบไปข้างหน้า (forward manner) โดยกำหนดค่าสถิตินำเข้า (*F*-to-enter) เท่ากับ 3.84 ค่าสถิติดึงออก (*F*-to-remove) เท่ากับ 2.71 (Poulet *et al.*, 2005; Pollar *et al.*, 2007) จำแนกกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ฟังก์ชันจำแนกที่ได้ แสดงผลการจำแนกกลุ่มในรูปของแผนภูมิการจำแนก (discrimination plot) และระบุกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีการทดสอบซ้ำแบบแจคไนฟ์ (jackknife cross-validation) โดยใช้ค่าระยะห่างมาฮาลานอบิส (mahalanobis distance) ทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($\alpha = 0.05$) (Marcus, 1990; Cheng *et al.*, 2005; Pollar *et al.*, 2007) โดยใช้โปรแกรม STATISTICA Version 8.0 (StatSoft[®], Inc., U.S.A.)



5. การศึกษาด้วยวิธีมอร์โฟเมตริกส์เชิงเรขาคณิตโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์หินเพลทสไปล์

5.1 การเตรียมข้อมูล

คัดเลือกภาพถ่ายของตัวอย่างแต่ละตัว จากนั้นนำเข้าและจัดเรียงข้อมูลเพื่อทำการกำหนดจุดกำหนดด้วยโปรแกรม tpsUtil Version 1.44 (Rohlf, 2009a) ทำการกำหนดจุดกำหนดบนตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง ซึ่งจุดกำหนดต้องเป็นจุดคู่เหมือนที่เป็นตำแหน่งที่สมมาตรกันในตัวอย่่างทุกตัว (Zelditch *et al.*, 2004) การศึกษานี้ใช้จุดกำหนดเดียวกันกับการศึกษาด้วยเทคนิคระบบเครือข่ายโครงยึด (ภาพที่ 24) ทำการกำหนดจุดด้วยโปรแกรม tpsDig2 Version 2.14 (Rohlf, 2009b) จากนั้นตรวจสอบความคลาดเคลื่อนของจุดกำหนดด้วยโปรแกรม tpsSmall Version 1.20 (Rohlf, 2003) หากตรวจพบความคลาดเคลื่อนต้องกลับไปทำการแก้ไขใหม่ในขั้นตอนการกำหนดจุดกำหนด และหากไม่สามารถแก้ไขได้ต้องตัดตัวอย่างนั้นออกจากการวิเคราะห์ จากนั้นย้ายข้อมูลพิกัดจุดกำหนดไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม tpsRelw Version 1.46 (Rohlf, 2008) เพื่อจัดเรียงข้อมูลให้อยู่ในปริภูมิรูปร่างด้วยวิธีการซ้อนทับแบบกำลังสองทั่วไปน้อยที่สุด (GLS) (Rohlf and Slice, 1990; Rohlf and Marcus, 1993) คำนวณหาค่าส่วนประกอบเอกกรุปและคะแนนการโก่งตัวบางส่วน เพื่อใช้เป็นตัวแปรในการวิเคราะห์รูปแบบความแปรผันทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการทางสถิติต่อไป

5.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในระดับระหว่างชนิดและระดับภายในชนิด

วิเคราะห์ความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในระดับระหว่างชนิดและระดับภายในชนิดด้วยวิธีการวิเคราะห์การโก่งตัวสัมพัทธ์ (relative warps analysis) ซึ่งเทียบได้กับการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Bookstein, 1991) ดังนั้นแต่ละแกนการโก่งตัวสัมพัทธ์ (relative warps axis, RW) จะแสดงถึงองค์ประกอบของความแปรผันทางสัณฐานวิทยาที่แสดงในรูปของการโก่งตัวหลัก (principal warps) ที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน หรือเทียบได้แกนองค์ประกอบหลักหนึ่งแกน ทำการวิเคราะห์การโก่งตัวสัมพัทธ์โดยใช้โปรแกรม tpsRelw Version 1.46 (Rohlf, 2008) จากนั้นย้ายค่าคะแนนการโก่งตัวสัมพัทธ์ไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม STATISTICA Version 8.0 (StatSoft®, Inc., U.S.A.) เพื่อแสดงผลรูปแบบความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในรูปของแผนภาพการกระจายตัว แสดงความคล้ายคลึงของรูปแบบความแปรผันด้วยวงรีความเชื่อมั่นที่ระดับร้อยละ 95 และแสดงรูปแบบของความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในแต่ละแนวแกนของการโก่งตัวสัมพัทธ์ในรูปของตารางการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Thomson (1917) โดยใช้โปรแกรม tpsRegr Version 1.37 (Rohlf, 2009c)

5.3 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและการระบุชนิดและกลุ่มประชากร

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และระบุชนิดและกลุ่มประชากรด้วยเทคนิคการวิเคราะห์จำแนกกลุ่ม โดยใช้ค่าส่วนประกอบเอกกรุปและค่าคะแนนการโก่งตัวบางส่วนเป็นตัวแปรในการวิเคราะห์จำแนกกลุ่ม (Marcus, 1990; Hard *et al.*, 2006; Marcil *et al.*, 2006) จำแนกกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ฟังก์ชันจำแนกที่ได้จากการรวมเชิงเส้นของตัวแปรทั้งหมด และแสดงผลการจำแนกกลุ่มในรูปของแผนภูมิการจำแนก (discrimination plot) ระบุกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีการทดสอบซ้ำแบบแจคไนฟ์ (jackknife cross validation) โดยใช้ค่าระยะห่างมาฮาลานอบิส ทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($\alpha = 0.05$) (Marcus, 1990; Manly, 1994) โดยใช้โปรแกรม STATISTICA Version 8.0 (StatSoft®, Inc., U.S.A.) และแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละกลุ่มตัวอย่างในรูปของตารางการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยการวิเคราะห์การถดถอยของค่าคะแนนการโก่งตัวสัมพัทธ์ด้วยโปรแกรม tpsRegr Version 1.37 (Rohlf, 2009)

