



## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสำรวจ เก็บตัวอย่าง และวินิจฉัยตัวอย่างแมลง

1. ขวดแก้วเก็บตัวอย่าง ขนาด 20 มิลลิลิตร สำหรับดองตัวอย่าง
2. 70 % เอทิลแอลกอฮอล์ สำหรับดองตัวอย่าง
3. ตัวอย่างมวนจิ้งจ๋นน้ำที่ใช้ในการศึกษา
4. สวิงจับแมลง (sweep net)
5. กระดาษบันทึก ปากกา pigment ink และอุปกรณ์เครื่องเขียนชนิดต่างๆ
6. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอซูม (stereo zoom microscope)
7. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
8. กล้องถ่ายภาพดิจิทัล และอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ
9. อุปกรณ์ให้แสงสว่างแบบไฟเบอร์ (fiber optics)
10. แผ่นสไลด์ (microscope slide) และแผ่นปิดสไลด์ (cover glass)
11. น้ำยาฮอยเออร์ (Hoyer's solution)
12. ปากคีบ (forceps)
13. เข็มเขี่ย
14. พู่กัน
15. จานเลี้ยงเชื้อ (petridish)
16. หลอดหยด (droplet)
17. กระดาษสติ๊กเกอร์
18. กล่องเก็บแผ่นสไลด์ (slide box)
19. กล่องเก็บตัวอย่าง

#### 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บข้อมูลปัจจัยทางกายภาพ

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
2. เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen Meter)
3. เครื่องบอกพิกัดด้วยดาวเทียม (Global Positioning System: GPS)
4. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
5. เครื่องวัดความชื้น (hygrometer)
6. เครื่องวัดความเค็ม (salinity meter)

### 3.3 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและประมวลผล

1. คอมพิวเตอร์แมคอินทอชและโปรแกรม PAUP\* version 4.0b10, MacClade 4.0
2. คอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (personal computer) และโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เกี่ยวข้อง
3. เครื่องสแกนเนอร์ (scanner)
4. เครื่องพิมพ์ (printer)

### 3.4 วิธีการศึกษา

#### 3.4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

##### 1) พื้นที่ทำการศึกษา

ที่ตั้งและอาณาเขต พื้นที่ลุ่มน้ำแม่กลองเป็นอีกลุ่มน้ำหนึ่งที่มีพื้นที่อยู่ในเขตภาคกลาง มีพื้นที่ 30,836 ตารางกิโลเมตร มีอาณาเขตติดต่อดังนี้

ทิศเหนือ	จรด	กลุ่มลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำสาละวิน และประเทศพม่า
ทิศตะวันออก	จรด	ลุ่มน้ำเจ้าพระยา-ท่าจีน
ทิศตะวันตก	จรด	ประเทศพม่า
ทิศใต้	จรด	ลุ่มน้ำชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตะวันตก

พื้นที่ลุ่มน้ำแม่น้ำแม่กลอง แบ่งออกได้เป็นกลุ่มลุ่มน้ำสาขา 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควน้อย กลุ่มลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควใหญ่ ลุ่มน้ำสาขาห้วยตะเพิน ลุ่มน้ำสาขาลำภาชี และลุ่มน้ำสาขาที่ราบแม่น้ำแม่กลอง โดยมีรายละเอียดดังนี้ (ภาพที่ 3.1)

- 1.1) กลุ่มลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควน้อย ประกอบด้วย ลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควน้อยตอนบน ลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควน้อยตอนล่าง และลุ่มน้ำสาขาห้วยปิล็อก มีพื้นที่ทั้งหมด 9,256 ตร.กม. ครอบคลุมพื้นที่โดยส่วนใหญ่ใน 4 อำเภอ ในจังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่ อำเภอทองผาภูมิ อำเภอสังขละบุรี อำเภอด่านมะขามเตี้ย และอำเภอไทรโยค
- 1.2) กลุ่มลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควใหญ่ ประกอบด้วย ลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควใหญ่ตอนบน ลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควใหญ่ตอนล่าง ลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำห้วยขาแข้ง ลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำห้วยแม่จัน และลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำห้วยแม่ละมุง มีพื้นที่ทั้งหมด 12,788 ตร.กม. ครอบคลุมพื้นที่โดยส่วนใหญ่ใน 4 อำเภอ ในจังหวัด 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดตาก ในอำเภออุ้มผาง จังหวัดกาญจนบุรี ในอำเภอศรีสวัสดิ์ และอำเภอเมือง และจังหวัดอุทัยธานี ในอำเภอบ้านไร่
- 1.3) กลุ่มลุ่มน้ำสาขาห้วยตะเพิน มีพื้นที่ทั้งหมด 2,479 ตร.กม. ครอบคลุม 2 พื้นที่โดยส่วนใหญ่ในจังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่ กิ่งอำเภอบ่อพลอย และอำเภอหนองปรือ

- 1.4) กลุ่มลุ่มน้ำสาขาลำภาชี มีพื้นที่ทั้งหมด 2,664 ตร.กม. ครอบคลุมพื้นที่โดยส่วนใหญ่ใน 2 อำเภอ 1 กิ่งอำเภอ ในจังหวัดราชบุรี ได้แก่ กิ่งอำเภอบ้านคา อำเภอจอมบึง และอำเภอสวนผึ้ง
- 1.5) กลุ่มลุ่มน้ำสาขาที่ราบแม่น้ำแม่กลอง มีพื้นที่ทั้งหมด 3,649 ตร.กม. ครอบคลุมพื้นที่โดยส่วนใหญ่ใน 13 อำเภอ ใน 3 จังหวัด ประกอบด้วย จังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่ อำเภอท่ามะกา อำเภอท่าม่วง และอำเภอพนมทวน จังหวัดสมุทรสงคราม ได้แก่ อำเภอบางคนที อำเภออัมพวา และอำเภอเมืองสมุทรสงคราม และจังหวัดราชบุรี ได้แก่ อำเภอดำเนินสะดวก อำเภอบางแพ อำเภอบ้านโป่ง อำเภอปากท่อ อำเภอโพธาราม อำเภอเมืองราชบุรี และอำเภอวัดเพลง

ทิศทางการไหลของกลุ่มน้ำแม่กลองไหลจากทิศเหนือลงสู่ทิศใต้ ผ่านที่ราบภาคกลางจนถึงที่ราบต่ำบริเวณปากแม่น้ำแล้วไหลลงสู่ทะเลด้านอ่าวไทย (ภาพที่ 3.2) (สิทธิชัย ต้นธนะสฤณี, 2547)

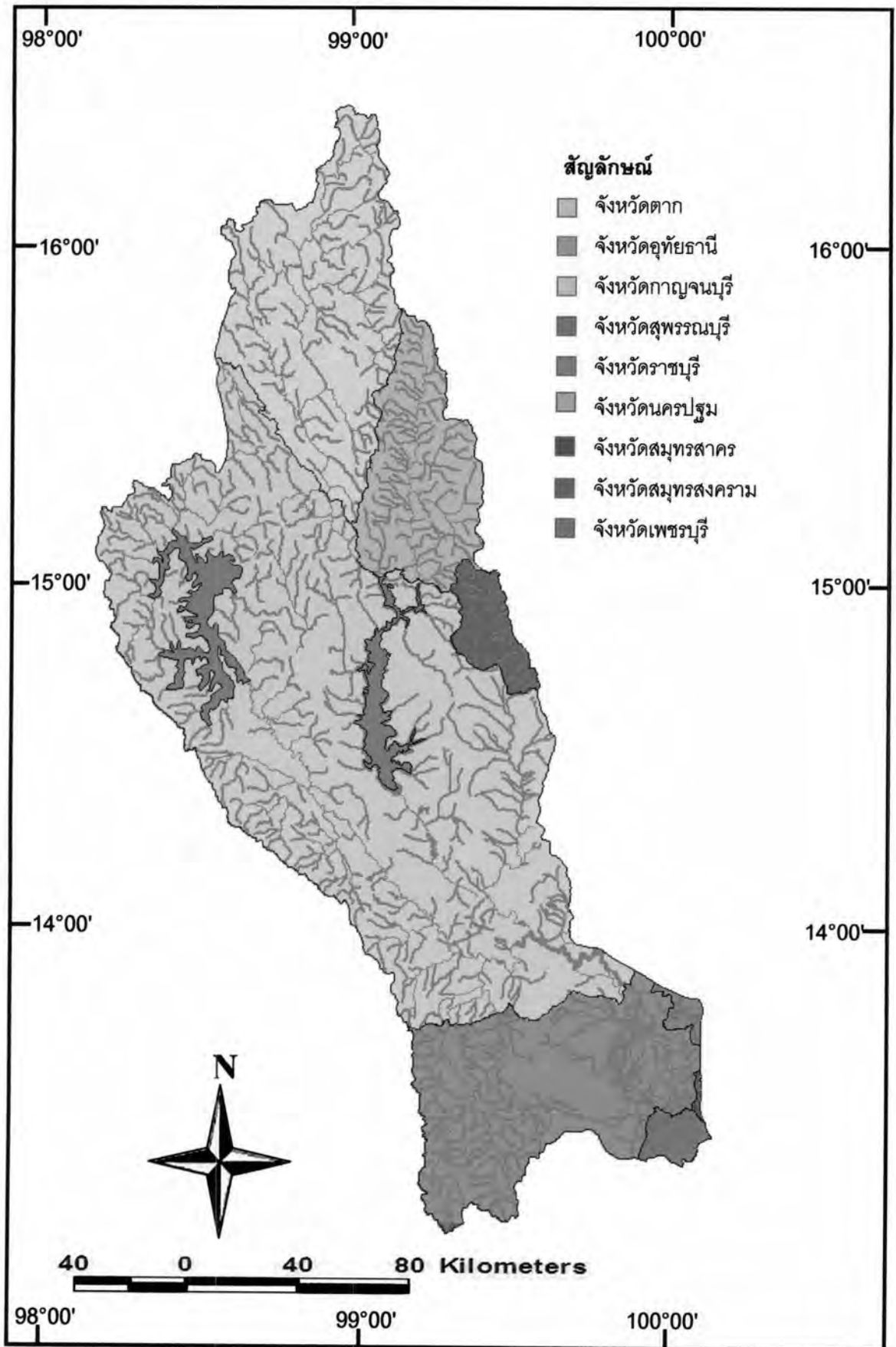
ลุ่มน้ำแม่กลองถือได้ว่าเป็นลุ่มน้ำที่มีทรัพยากรน้ำที่อุดมสมบูรณ์ที่สุด เมื่อเทียบกับลุ่มน้ำอื่นๆ ในประเทศไทย ด้วยทรัพยากรป่าไม้ยังเหลือปกคลุมพื้นที่ต้นน้ำลำธารอยู่มากกว่าลุ่มน้ำอื่นๆ กล่าวคือ มีอยู่ถึง 53 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ลุ่มน้ำ ในขณะที่พื้นที่ป่าของประเทศเหลืออยู่ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ด้วยขนาดพื้นที่ลุ่มน้ำ 30,800 ตารางกิโลเมตร โดยที่แม่น้ำสายหลักด้านต้นน้ำ คือ แม่น้ำแควน้อยและแม่น้ำแควใหญ่ และมีอ่างเก็บน้ำขนาดใหญ่ คือ อ่างเก็บน้ำเขื่อนศรีนครินทร์ และอ่างเก็บน้ำเขื่อนวชิราลงกรณ์ (เขื่อนเขาแหลม) (ภาพที่ 3.3)

ลักษณะภูมิประเทศในพื้นที่ลุ่มน้ำแม่กลอง ประกอบด้วยป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าดิบแล้ง เป็นส่วนใหญ่ โดยพบกระจายทั่วพื้นที่ลุ่มน้ำโดยเฉพาะในบริเวณตอนเหนือ ตอนกลางและขอบด้านตะวันตกของพื้นที่ลุ่มน้ำ ซึ่งมีลักษณะเป็นเทือกเขาสลับ ซับซ้อน อันเป็นส่วนหนึ่งของเทือกเขาตะนาวศรี บางแห่งเป็นหน้าผาสูงชัน มีความสูงถึงประมาณ 2,100 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง และมีพื้นที่บางส่วนเป็นที่ราบระหว่างภูเขาแทรกอยู่บ้าง ในบริเวณพื้นที่ลุ่มน้ำแห่งนี้โดยส่วนใหญ่เป็นพื้นที่อนุรักษ์หลายแห่ง เช่น เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง-ทุ่งใหญ่นเรศวร เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสลักพระ อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อุทยานแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์ อุทยานแห่งชาติเขื่อนเขาแหลม อุทยานแห่งชาติไทรโยค เป็นต้น นอกจากนั้นเป็นพื้นที่ราบสำหรับการเกษตรกรรมและทุ่งหญ้า โดยที่ราบส่วนใหญ่จะปรากฏอยู่ทางตอนล่างของพื้นที่ลุ่มน้ำ ในบริเวณจังหวัดสมุทรสงคราม จังหวัดราชบุรี และจังหวัดกาญจนบุรี สำหรับบริเวณที่ต่ำที่สุดของพื้นที่ลุ่มน้ำอยู่บริเวณปากแม่น้ำแม่กลองในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม ซึ่งเป็นพื้นที่ราบชายฝั่งที่ได้รับอิทธิพลจากน้ำทะเล (ภาพที่ 3.4)

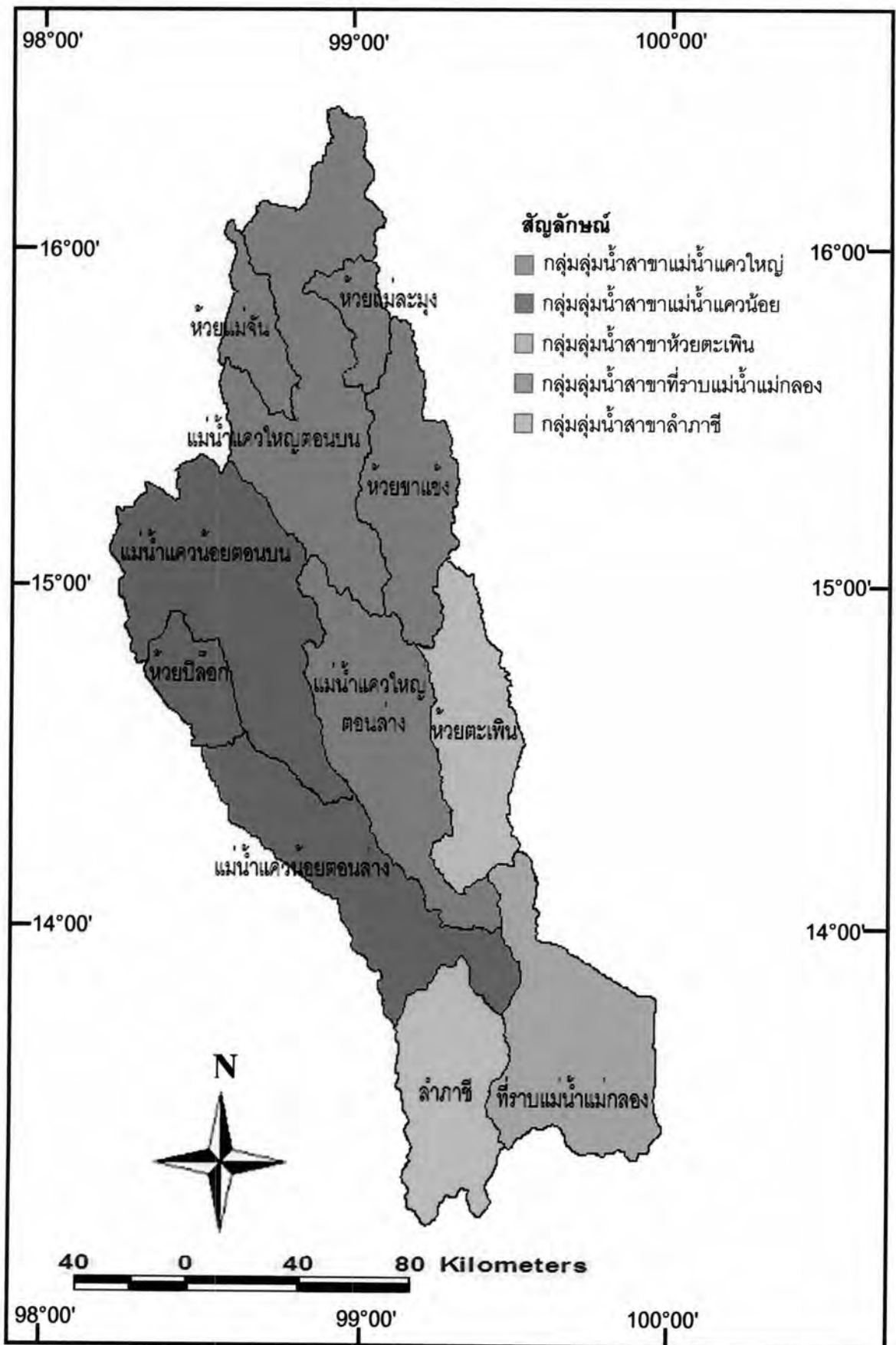
ลักษณะภูมิอากาศได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ และลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ อิทธิพลจากภูมิประเทศทำให้ลักษณะภูมิอากาศที่แตกต่างจากจังหวัดอื่นในภาคกลางด้วยกัน โดยร้อนจัดในฤดูร้อนและหนาวจัดในฤดูหนาว ส่วนฤดูฝนมีฝนตกปานกลางถึงหนักมาก จะตกถูกต้องตามฤดูกาล ฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม ฤดูร้อนเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน และฤดูหนาวเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคม

## 2) การเก็บตัวอย่างและบันทึกปัจจัยทางกายภาพ

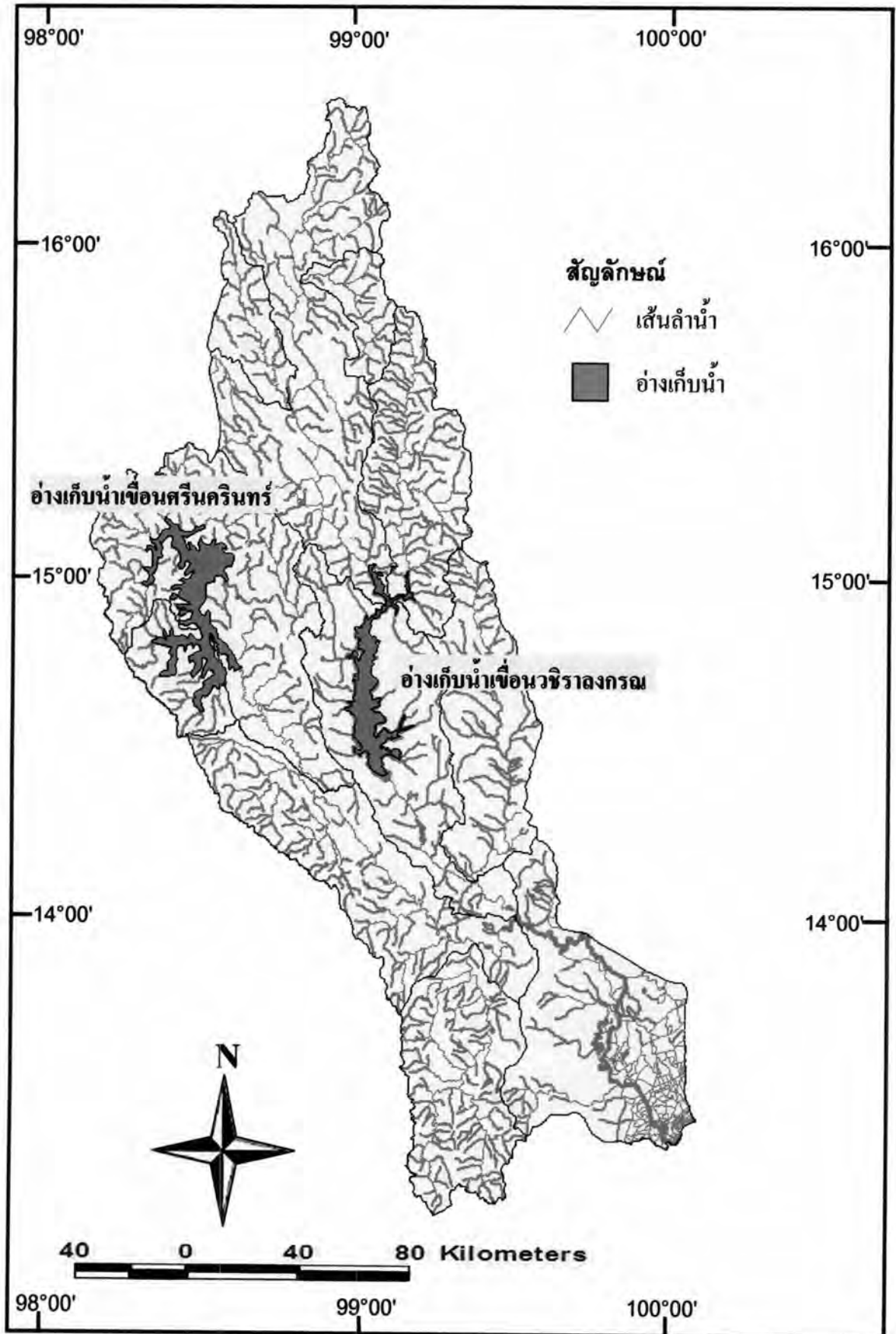
- 2.1) สุ่มเก็บตัวอย่างมวนจิ้งจ๋้าน้ำที่พบในเขตลุ่มน้ำแม่กลอง ในลำน้ำสาขาต่างๆ ทั้ง 5 กลุ่มลุ่มน้ำหลักของลุ่มน้ำแม่กลอง ได้แก่ กลุ่มลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควใหญ่ 60 แห่ง กลุ่มลุ่มน้ำสาขาแม่น้ำแควน้อย 69 แห่ง ลุ่มน้ำสาขาห้วยตะเพิน 8 แห่ง ลุ่มน้ำสาขาลำภาชี 14 แห่ง และลุ่มน้ำสาขาที่ราบแม่น้ำแม่กลอง 23 แห่ง รวมจำนวนทั้งสิ้น 174 แห่ง (ภาพที่ 3.5-3.8)
- 2.2) วิธีการเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างมวนจิ้งจ๋้าน้ำให้ครอบคลุมทุกแหล่งอาศัยย่อย บนผิวน้ำและที่ขึ้นแฉะบริเวณลำธาร น้ำตก โดยใช้สวิงจับแมลง และใช้ปากคีบจับตัวอย่างดองใน 70% เอทิลแอลกอฮอล์ พร้อมทั้งบันทึกแหล่งที่พบในแต่ละขวด เพื่อนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป
- 2.3) บันทึกภาพสถานที่เก็บตัวอย่างและแหล่งอาศัยย่อย และสังเกตพฤติกรรมและลักษณะของแหล่งอาศัยย่อยโดยทั่วไป รวมทั้งชีววิทยาอื่นๆ ในธรรมชาติของมวนจิ้งจ๋้าน้ำ
- 2.4) บันทึกข้อมูลปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญ ได้แก่ อุณหภูมิผิวน้ำ ในน้ำและอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l) ค่าความเค็ม (%) (เฉพาะในบริเวณน้ำกร่อย)
- 2.5) วัดพิกัดทางภูมิศาสตร์และระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลด้วยเครื่อง GPS (Global Positioning System)



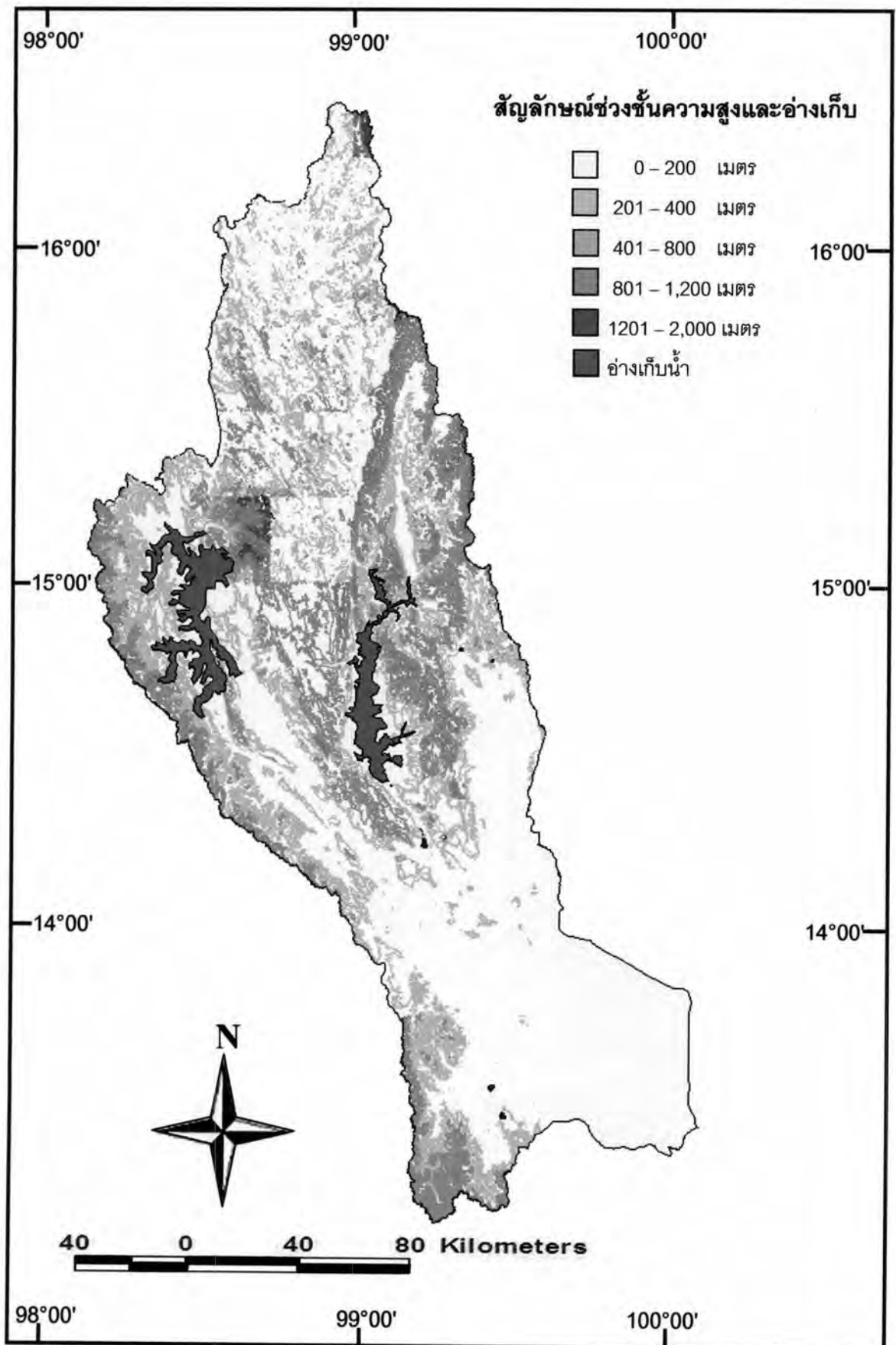
ภาพที่ 3.1 แสดงขอบเขตพื้นที่จังหวัดของกลุ่มน้ำแม่กลอง



ภาพที่ 3.2 แสดงพื้นที่ลุ่มน้ำสาขาย่อยของกลุ่มน้ำแม่กลอง

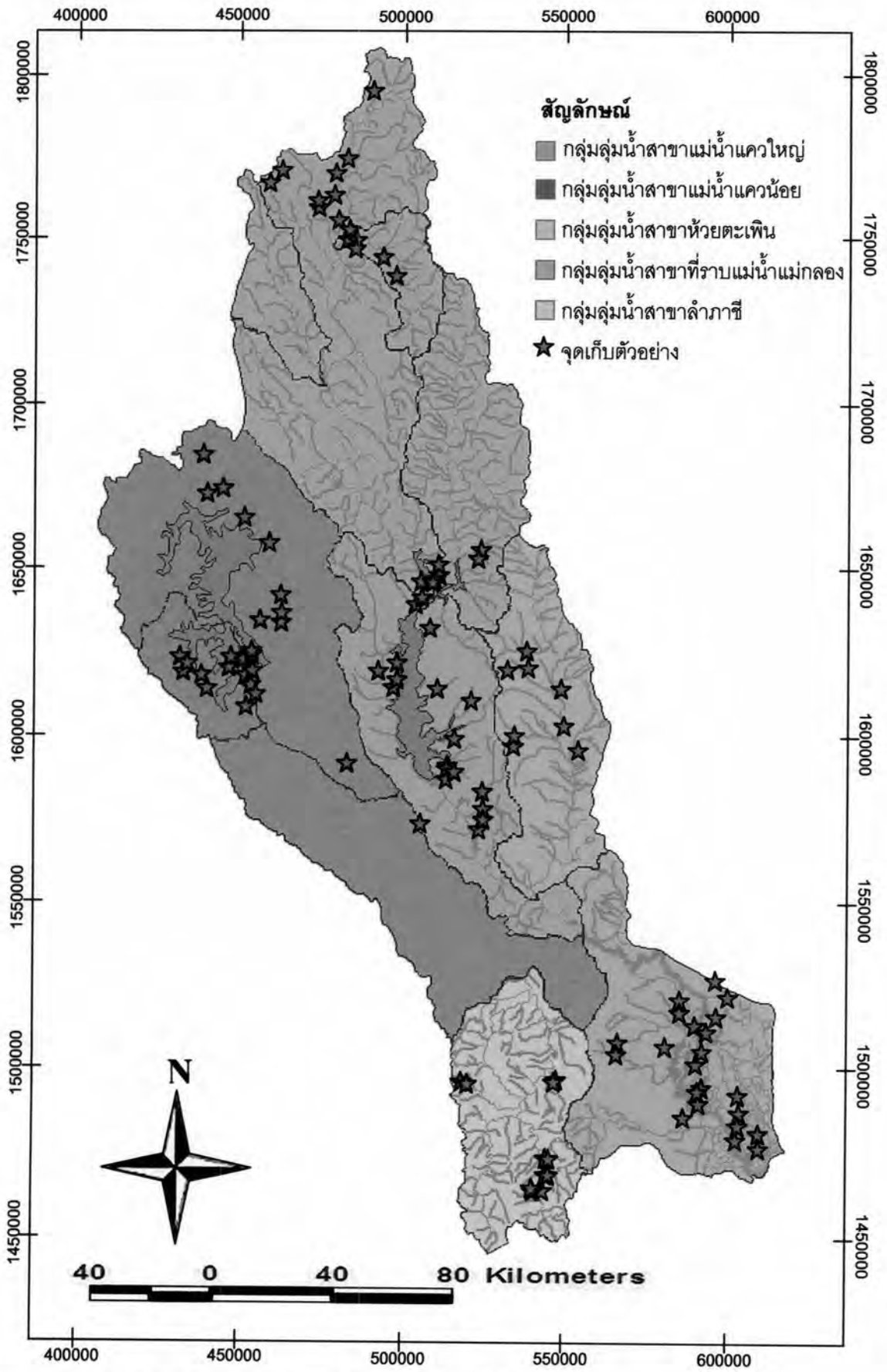


ภาพที่ 3.3 แสดงเส้นลำน้ำสาขาย่อยของกลุ่มน้ำแม่กลองและอ่างเก็บน้ำ



ภาพที่ 3.4 แสดงสภาพภูมิประเทศในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำแม่กลอง





ภาพที่ 3.5 แสดงจุดเก็บตัวอย่างมวนจริงไฉ่น้ำในพื้นที่ลุ่มน้ำแม่กลอง



ภาพที่ 3.6 แสดงพื้นที่ที่ศึกษา ก. เขื่อนท่าทุ่งนา อ.เมือง จ.กาญจนบุรี (K-6) ข. แม่น้ำน้อย อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี (K-14) ค. ห้วยแม่ปลาสร์อย อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี (K-20) ง. อ่างเก็บน้ำเขื่อนศรีนครินทร์ ต.แม่กระบุง อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี (K-22) จ. น้ำตกห้วยแม่ขมิ้น ต.แม่กระบุง อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี (K-37) ฉ. ออบป. ต.ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี (K-75)



ภาพที่ 3.7 แสดงพื้นที่ที่ศึกษา ก. ห้วยอู่ล่อง อ.สังขละบุรี จ.กาญจนบุรี (K-85) ข. น้ำตกไทรของถ้อง ต.ปรังเผล อ.สังขละบุรี จ.กาญจนบุรี (K-87) ค. ห้วยลิเจีย อ.สังขละบุรี จ.กาญจนบุรี (K-101) ง. ห้วยปากคอก ต.ห้วยเขย่ง อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี (K-113) จ. แม่น้ำภาชี อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี (R-6) ฉ. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าแม่น้ำภาชี อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี (R-7)



ภาพที่ 3.8 แสดงพื้นที่ที่ศึกษา ก. กิ่งอำเภอบ้านคา จ.ราชบุรี (R-12) ข. อ.โพธาราม จ.ราชบุรี (R-17) ค. คลองชลประทาน ต.เตาปูน อ.โพธาราม จ.ราชบุรี (R-23) ง. ต.บางขันแตก อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม (S-5) จ. ห้วยตะมือโก อ.อัมผาง จ. ตาก (T-5) ฉ. ห้วยแม่กลองดี อ.อัมผาง จ. ตาก (T-16)

### 3.4.2 การศึกษาด้านอนุกรมวิธานและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

#### 1) การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้จากการเก็บตัวอย่างในภาคสนาม และตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในส่วนของพิพิธภัณฑ์แมลง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำตัวอย่างมวนจิ้งจี้น้ำตัวเต็มวัยทั้งหมด 5,550 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานภายนอก เนื่องจากเป็นลักษณะโครงสร้างภายนอกที่สังเกตเห็นได้ง่าย และใช้เป็นลักษณะพื้นฐานในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตทั่วไป ลักษณะที่นำมาใช้ศึกษา เช่น ขนาด รูปร่าง สีและลวดลาย หนวด ส่วนหัว ออกปล้องแรก ออกปล้องกลาง ออกปล้องหลัง ส่วนท้อง ขา และ เล็บ เป็นต้น ซึ่งจะทำการตรวจสอบลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอซุม เพื่อวินิจฉัยชื่อวิทยาศาสตร์ การวินิจฉัยบางสกุลในระดับชนิดของมวนจิ้งจี้น้ำ ไม่อาจใช้ลักษณะสัณฐานภายนอกได้เพียงอย่างเดียว จึงมีการใช้ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ร่วมในการวินิจฉัยด้วย เนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีลักษณะที่มีความซับซ้อน มีวิวัฒนาการค่อนข้างช้า และเป็นลักษณะจำเพาะในแต่ละชนิด (species specific) จึงเป็นลักษณะที่เหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาอนุกรมวิธาน รายละเอียดของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่ใช้ในการวินิจฉัย ได้แก่ pygophore, proctiger และ paramere เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้ จะใช้ลักษณะสัณฐานภายนอก และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เป็นสำคัญ การศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งมีขนาดเล็กมากนั้น ต้องทำการผ่าตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอซุม และจัดทำสไลด์ถาวร เพื่อนำมาศึกษาลักษณะในรายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ประกอบการวินิจฉัยหาชื่อวิทยาศาสตร์จากเอกสารอ้างอิงของ Andersen (1980), Andersen (1982b), Andersen (1990), Boer (1965), Chen และ Nieser (1993), Chen และ Nieser (2002), Chen และ Zettle (1998a), Chen และ Zettle (1998b), Chen, Nieser และ Wattanachaiyingcharoen (2002), Cheng และ Fernando (1969), Cheng, Yang และ Andersen (2001), Hungerford และ Matsuda (1958), Hungerford และ Matsuda (1960a), Hungerford และ Matsuda (1960b), Hungerford และ Matsuda (1962), Hungerford และ Matsuda (1965), Miyamoto (1967), Nieser และ Chen (1992), Polhemus (2001), Polhemus และ Polhemus (2001), Polhemus และ Andersen (1984), Polhemus และ Karunaratne (1993), Tran และ Yang (2006), Tran และ Zettel (2006), Vitheepadit และ Sites (2007a), Vitheepadit และ Sites (2007b), Zettel (1995), Zettel (1998), Zettel (2002a), Zettel (2002b), Zettel และ Chen (1996), Zettel และ Chen (1997) และ Zettel, Yang และ Tran (2007) พร้อมทั้งจัดทำคีย์จัดจำแนกในระดับวงศ์ย่อยสกุล และชนิด โดยวิธีไดโคโตมัสคีย์ (dichotomous keys) จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานภายนอก และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เป็นหลัก ทั้งนี้จะจัดทำคำบรรยายลักษณะ ภาพถ่ายสี และภาพวาดรูปลายเส้นประกอบคีย์ด้วย เพื่อสะดวกในการใช้วินิจฉัย

ตัวอย่างมวนจิงไจ้ นำหลังจากทำการศึกษาแล้ว จะเก็บรักษาไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% พร้อมกับบรรจุแผ่นฉลากบันทึกข้อมูลลงในขวดตัวอย่าง ซึ่งมีการกำหนดรหัส CUMZ และหมายเลขรหัสประจำแต่ละขวด เพื่อความสะดวกในการจัดเก็บเข้าฐานข้อมูล ตัวอย่างดังกล่าวจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงของพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยา แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUMNH) เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงทางอนุกรมวิธานต่อไป

## 2) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic reconstruction)

### 2.1) ชนิดของมวนจิงไจ้ นำที่ใช้ในการศึกษา

ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับวงศ์ย่อย โดยใช้ลักษณะสัณฐานภายนอก (morphological-based phylogeny) โดยใช้มวนจิงไจ้ นำทั้งหมดที่สำรวจพบ 40 ชนิด และใช้มวนจิงไจ้ นำเล็ก (วงศ์ Veliidae) ชนิด *Rhagovelia sumatrensis* เป็น outgroup ในการศึกษา เนื่องจากจัดอยู่ในลำดับอนุกรมวิธานอินฟราออร์เดอร์ Gerromorpha และ superfamily Gerrioidea เดียวกัน และทั้งสองวงศ์มีสายวิวัฒนาการที่มาจากบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic group) ซึ่งมีลักษณะที่พัฒนาไปจากลักษณะดั้งเดิม (apomorphic characters) 6 ลักษณะ คือ ลักษณะขนที่บริเวณลำตัว, salivary pump, pretarsus, parempodia, evaporative grooves และ abdominal scent apparatus (Andersen, 1982: ตารางที่ 12, หน้า 256)

### 2.2) ลักษณะที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้ใช้ลักษณะสัณฐานภายนอกของเพศผู้ โดยแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม คือ หนวด, ส่วนหัว, ส่วนอก, ส่วนท้อง, ความยาวลำตัว, ขาคู่หน้า, ขาคู่กลาง, ขาคู่หลัง และใช้ลักษณะแหล่งอาศัยและการแพร่กระจาย รวมลักษณะทั้งหมด 54 ลักษณะ โดยมี 14 ลักษณะที่ได้มีการกำหนดทิศทางการเกิดวิวัฒนาการ (ordered characters) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

#### หนวด

1. หนามที่หนวดปล้องที่ 1: 0 = ไม่มีหนามยาว; 1 = มีหนามยาวสีดำเห็นได้ชัดเจน
2. หนามที่หนวดปล้องที่ 2: 0 = ไม่มีหนามยาว; 1 = มีหนามยาวสีดำเห็นได้ชัดเจน
3. หนามที่หนวดปล้องที่ 4: 0 = ไม่มีหนามยาว; 1 = มีหนามยาวสีดำเห็นได้ชัดเจน
4. ความยาวหนวดปล้องแรก: 0 = ไม่ยาวกว่าปล้องอื่น; 1 = ยาวกว่าทุกปล้อง
5. ความยาวหนวดปล้องแรก (ordered): 0 = หนวดปล้องแรกสั้นกว่าปล้องที่ 2 และ 3 รวมกัน; 1 = หนวดปล้องแรกยาวเท่ากับปล้องที่ 2 และ 3 รวมกัน; 2 = หนวดปล้องแรกยาวกว่าปล้องที่ 2 และ 3 รวมกัน
6. ความยาวหนวดปล้องที่ 3 (ordered): 0 = ความยาวหนวดปล้องที่ 3 สั้นกว่าปล้องที่ 4; 1 = ความยาวหนวดปล้องที่ 3 เท่ากับปล้องที่ 4; 2 = ความยาวหนวดปล้องที่ 3 ยาวกว่าปล้องที่ 4
7. ความยาวหนวดปล้องที่ 4 (ordered): 0 = สั้นกว่าปล้องอื่น; 1 = ยาวกว่าทุกปล้อง; 2 = ไม่สั้นหรือยาวกว่าปล้องอื่น
8. ลักษณะหนวดปล้องที่ 4: 0 = มีลักษณะตรงไม่บิดงอ; 1 = มีลักษณะโค้งหรือบิดงอ

9. ความยาวหมวด (ordered): 0 = สั้นกว่าปลายส่วนท้อง; 1 = เท่ากับปลายส่วนท้อง; 2 = ยาวกว่าปลายส่วนท้อง
10. สีของหมวดปล้องแรก: 0 = เป็นสีเดียวกันตลอด; 1 = มีสองสี  
**ส่วนหัว**
11. ส่วนหัว: 0 = ไม่มีร่องที่กลางส่วนหัว; 1 = มีร่องที่กลางส่วนหัว
12. ตำแหน่งของตา: 0 = ยื่นเลยทับอกปล้องแรก; 1 = ยื่นเลยทับอกปล้องกลาง
13. ความยาว rostrum (ordered): 0 = ยาวไม่เลยถึงอกปล้องแรก; 1 = ยาวไม่เลยถึงอกปล้องกลาง (mesosternum); 2 = ยาวไม่เลยถึงอกปล้องหลัง  
**ส่วนอก**
14. ความยาว pronotum: 0 = สั้นกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวส่วนหัว; 1 = ยาวกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวส่วนหัว
15. Metacetabula: 0 = ไม่มี metacetabula; 1 = มี metacetabula
16. ลักษณะอกปล้องหลังด้านท้อง: 0 = อกปล้องหลังลดรูปลง มีขนาดเล็กคล้ายรูปสามเหลี่ยม; 1 = มีลักษณะเป็นปล้องสั้นๆ
17. connexival spines: 0 = ไม่มี connexival spines; 1 = มี connexival spines  
**ส่วนท้อง**
18. ปล้องท้องปล้องแรก: 0 = เห็นไม่ชัดเจน; 1 = เห็นชัดเจน
19. หนามสีดำที่ปล้องท้องด้านท้อง: 0 = ไม่มีหนาม; 1 = มีหนาม  
**ความยาวลำตัว**
20. ความยาวลำตัว: 0 = สั้นกว่า 2 เท่าของความกว้างลำตัว; 1 = ยาวกว่า 2 เท่าของความกว้างลำตัว  
**ขาคู่หน้า**
21. trochanter ของขาคู่หน้า: 0 = ไม่มีขน; 1 = มีขนเห็นได้ชัด
22. trochanter ของขาคู่หน้า: 0 = ไม่มีหนาม; 1 = มีหนามเห็นได้ชัด
23. femur ของขาคู่หน้า: 0 = ไม่มีขนยาวสีดำ; 1 = มีขนยาวสีดำกระจายอยู่อย่างเห็นได้ชัด
24. femur ของขาคู่หน้า: 0 = ไม่มีหนามยาวสีดำ; 1 = มีหนามยาวสีดำกระจายอยู่อย่างเห็นได้ชัด
25. tibia ของขาคู่หน้า: 0 = ไม่มีขนยาวสีดำ; 1 = มีขนยาวสีดำกระจายอยู่อย่างเห็นได้ชัด
26. tibia ของขาคู่หน้า: 0 = ไม่มีหนามยาวสีดำ; 1 = มีหนามยาวสีดำกระจายอยู่อย่างเห็นได้ชัด
27. distal spur-like process ที่ tibia ของขาคู่หน้า : 0 = ไม่มี distal spur-like process; 1 = มี distal spur-like process
28. ความยาว tarsus ของขาคู่หน้า (ordered): 0 = ความยาว tarsus สั้นกว่าครึ่งหนึ่งของ tibia; 1 = ความยาว tarsus เท่ากับครึ่งหนึ่งของ tibia; 2 = ความยาว tarsus ยาวกว่าครึ่งหนึ่งของ tibia
29. จำนวน tarsus ของขาคู่หน้า: 0 = มีจำนวนปล้อง 2 ปล้อง; 1 = มีจำนวนปล้อง 3 ปล้อง
30. ลักษณะของเล็บที่ขาคู่หน้า: 0 = แบบ apical claws; 1 = แบบ preapical claws
31. สีของ femur ที่ขาคู่หน้า: 0 = เป็นสีเดียวกันโดยตลอด; 1 = มีสองสี
32. ลวดลายที่ femur ของขาคู่หน้า: 0 = ไม่มีลวดลาย; 1 = มีลวดลายหรือแถบสี

**ขาคู่กลาง**

33. ความยาว femur ของขาคู่กลาง (ordered): 0 = สั้นกว่า tibia; 1 = เท่ากับ tibia; 2 = ยาวกว่า tibia
34. femur ของขาคู่กลาง (ordered): 0 = สั้นกว่าความยาวลำตัว; 1 = เท่ากับความยาวลำตัว; 2 = ยาวกว่าความยาวลำตัว
35. แฉกบนที่ femur ของขาคู่กลาง : 0 = ไม่มีแฉกบน; 1 = มีแฉกบน
36. ความยาว tarsus ของขาคู่กลาง (ordered): 0 = ความยาว tarsus สั้นกว่าครึ่งหนึ่งของ tibia; 1 = ความยาว tarsus เท่ากับครึ่งหนึ่งของ tibia; 2 = ความยาว tarsus ยาวกว่าครึ่งหนึ่งของ tibia
37. tibia ของขาคู่กลาง: 0 = สั้นกว่าความยาวลำตัว; 1 = ยาวกว่าความยาวลำตัว
38. แฉกบนที่ tibia ของขาคู่กลาง: 0 = ไม่มีแฉกบน; 1 = มีแฉกบน
39. ความยาวปล้องแรกและปล้องที่ 2 ของ tarsus ในขาคู่กลาง (ordered): 0 = ความยาวปล้องแรกของ tarsus สั้นกว่าปล้องที่ 2; 1 = ความยาวปล้องแรกของ tarsus เท่ากับปล้องที่ 2; 2 = ความยาวปล้องแรกของ tarsus ยาวกว่าปล้องที่ 2
40. tarsus ของขาคู่กลาง: 0 = มีจำนวนปล้อง 2 ปล้อง; 1 = มีจำนวนปล้อง 3 ปล้อง
41. tarsus ของขาคู่กลาง: 0 = ไม่มีร่องลึก (deep cleft); 1 = มีร่องลึก (deep cleft)
42. ความยาวของขาคู่กลาง (ordered): 0 = ขาคู่กลางสั้นกว่าขาคู่หลัง; 1 = ขาคู่กลางเท่ากับขาคู่หลัง; 2 = ขาคู่กลางยาวกว่าขาคู่หลัง
43. coxa ของขาคู่กลางและขาคู่หลัง: 0 = ไม่อยู่ชิดติดกัน; 1 = อยู่ชิดติดกัน
44. ขนที่ขาคู่กลาง: 0 = ไม่มีขนเห็นเป็นรูปพัด (swimming fan); 1 = มีขนเป็นรูปพัด (swimming fan)
45. ลักษณะของเล็บที่ขาคู่กลาง: 0 = แบบ apical claws; 1 = แบบ preapical claws; 2 = ลดรูปไปหรือเป็นเส้นขน

**ขาคู่หลัง**

46. หนามที่ coxa ของขาคู่หลัง: 0 = ไม่พบหนาม; 1 = พบหนาม
47. femur ของขาคู่หลัง: 0 = สั้นกว่าความยาวลำตัว; 1 = ยาวกว่าความยาวลำตัว
48. femur ของขาคู่หลัง: 0 = ไม่ยื่นเลยปลายส่วนท้อง; 1 = ยื่นเลยส่วนท้อง
49. เปรียบเทียบความยาวของ femur ของขาคู่กลางและขาคู่หลัง (ordered): 0 = femur ของขาคู่กลางสั้นกว่า femur ของขาคู่หลัง; 1 = femur ของขาคู่กลางเท่ากับ femur ของขาคู่หลัง; 2 = femur ของขาคู่กลางยาวกว่า femur ของขาคู่หลัง
50. ความยาว tarsus ของขาคู่หลัง (ordered): 0 = ความยาว tarsus สั้นกว่าครึ่งหนึ่งของ tibia; 1 = ความยาว tarsus เท่ากับครึ่งหนึ่งของ tibia; 2 = ความยาว tarsus ยาวกว่าครึ่งหนึ่งของ tibia
51. tarsus ของขาคู่หลัง (ordered): 0 = มีจำนวนปล้อง 2 ปล้อง; 1 = มีจำนวนปล้อง 3 ปล้อง; 2 = tarsus เชื่อมรวมกัน

**แหล่งอาศัยและการแพร่กระจาย**

52. แหล่งอาศัย: 0 = บริเวณที่ชื้นแฉะ; 1 = บนผิวน้ำ
53. การแพร่กระจาย: 0 = มีรายงานพบในน้ำจืดเท่านั้น; 1 = มีรายงานพบในน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำเค็ม
54. ความเร็วของแหล่งน้ำในแหล่งอาศัย: 0 = พบในแหล่งน้ำนิ่ง; 1 = พบในแหล่งน้ำไหล; 2 = พบได้ทั้งในแหล่งน้ำไหลและแหล่งน้ำนิ่ง



การกรอกและการบริหารจัดการข้อมูลจะทำในโปรแกรม MacClade 4.0 (Maddison and Maddison, 1992) โดยจะได้ตารางข้อมูล (ตารางที่ 3.1) เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม PAUP\* version 4.0b10 (Swofford, 1998)

### 2.3) การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic reconstruction)

การวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้จะทำในโปรแกรม PAUP\* version 4.0b10 เพื่อค้นหาแผนภูมิต้นไม้ที่คาดว่าจะมีจำนวนขั้นของวิวัฒนาการที่สั้นที่สุด (Most parsimonious trees, MPTs) โดยใช้วิธีการค้นหาด้วย Maximum parsimony โดยใช้ Heuristic search 10,000 ซ้ำ มีการสลับแบบ tree bisection reconstruction (TBR) จากนั้นจะทำการวิเคราะห์ bootstrap (Felsenstein, 1985) โดยใช้ 1,000 ซ้ำ แต่ละ bootstrap ประกอบด้วย 500 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลจะแบ่งเป็น 2 แบบ คือ 1) ทุกลักษณะไม่มีการกำหนดทิศทางการเกิดวิวัฒนาการ (unordered) 2) ลักษณะที่มีมากกว่า 2 สถานะ (multistate characters) และสามารถกำหนดทิศทางการเกิดวิวัฒนาการ (ordered) จะถูกกำหนดให้มีทิศทางการเกิดวิวัฒนาการ จากนั้นจะนำแผนภูมิต้นไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองแบบมาเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้โปรแกรม PAUP\*

ตารางที่ 3.1 แสดงตารางแมทริกซ์ของมวนจิ้งจิกน้ำในพื้นที่ลุ่มน้ำแม่กลอง

Taxon	Characters																																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40														
<i>Amemboa armata</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	2	1	1	0	2	
<i>Amemboa cristata</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	2	1	1	0	2		
<i>Amemboa dentata</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	2	1	1	0	2			
<i>Amemboa javanica</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	2	1	1	0	2				
<i>Amemboa riparia</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	2	1	1	0	2				
<i>Amemboa schwendingeri</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	2	1	1	0	2				
<i>Aquarius adelaidis</i>	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
<i>Cylindrostethus costalis</i>	0	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	2				
<i>Cylindrostethus scrutator</i>	0	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	2	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	2				
<i>Eotrechus hygropetricus</i>	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1			
<i>Gnomobates sp.</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	1	0	0	1	0	2	1	0	0	
<i>Lathiobates johorensis</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	2	1	0	2	0	0	1	0	2	1	0	1	2	1	1	0		
<i>Limnogonus fossarum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	2					
<i>Limnogonus nitidus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	2						
<i>Limnometra ciliata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	2	1	0	1	0	2	0	0	2	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
<i>Limnometra matsudai</i>	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	2	0	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Limnometra sp.</i>	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1		
<i>Metrocoris acutus</i>	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	
<i>Metrocoris bilobatus</i>	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1		
<i>Metrocoris ciliatus</i>	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Metrocoris nigrofascioides</i>	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Metrocoris squamifer</i>	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Metrocoris tenuicoris</i>	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	0	2	0	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Naboandelus sp.</i>	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0	2	1	0	2	1	0	2
<i>Neogerris parvulus</i>	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	0	2		
<i>Onychotrechus esakii</i>	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
<i>Pleciobates pacholatko</i>	0	1	1	1	2	2	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	1	2	2	0	1	0	1	2	0	0	2	1	0	2	0	1	1	2	0	2	1	0	1
<i>Pleciogonus wongsirii</i>	0	1	1	1	2	2	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	1	2	2	0	1	0	1	2	0	0	2	1	0	2	0	1	1	1	0	2	1	0	1	
<i>Ptilomera hemmingseni</i>	0	0	0	1	2	2	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	1	0	1	2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	2	1	0	1	0	1	0	1	
<i>Ptilomera jariyae</i>	0	0	0	1	2	2	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	1	0	1	2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	2	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Ptilomera tennaserim</i>	0	0	0	1	2	2	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	1	0	1	2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	2	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Ptilomera tigrina</i>	0	0	0	1	2	2	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	1	0	1	2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	2	1	0	1	0	1	0	1		
<i>Rhagadotarsus kraepelini</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1		
<i>Rheumatogonus intermedius</i>	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	1	0	1	2	0	0	2	1	0	1	0	1	1	1	0	2	1	0	1	1	0	2	1	0	
<i>Rheumatogonus vietnamensis</i>	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	1	0	1	2	0	0	2	1	0	1	0	1	1	1	0	2	1	0	1	1	0	2	1	0	
<i>Rheumatometroides insularis</i>	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	2	1	0	2	0	0	1	1	1	0	2	1	1	1	0	2	1	