ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยขมสกุล *Filopaludina* ในลุ่มน้ำโขงแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequencing

วิทยานิพนธ์

ของ

ประภัสสร ไกรรัตน์

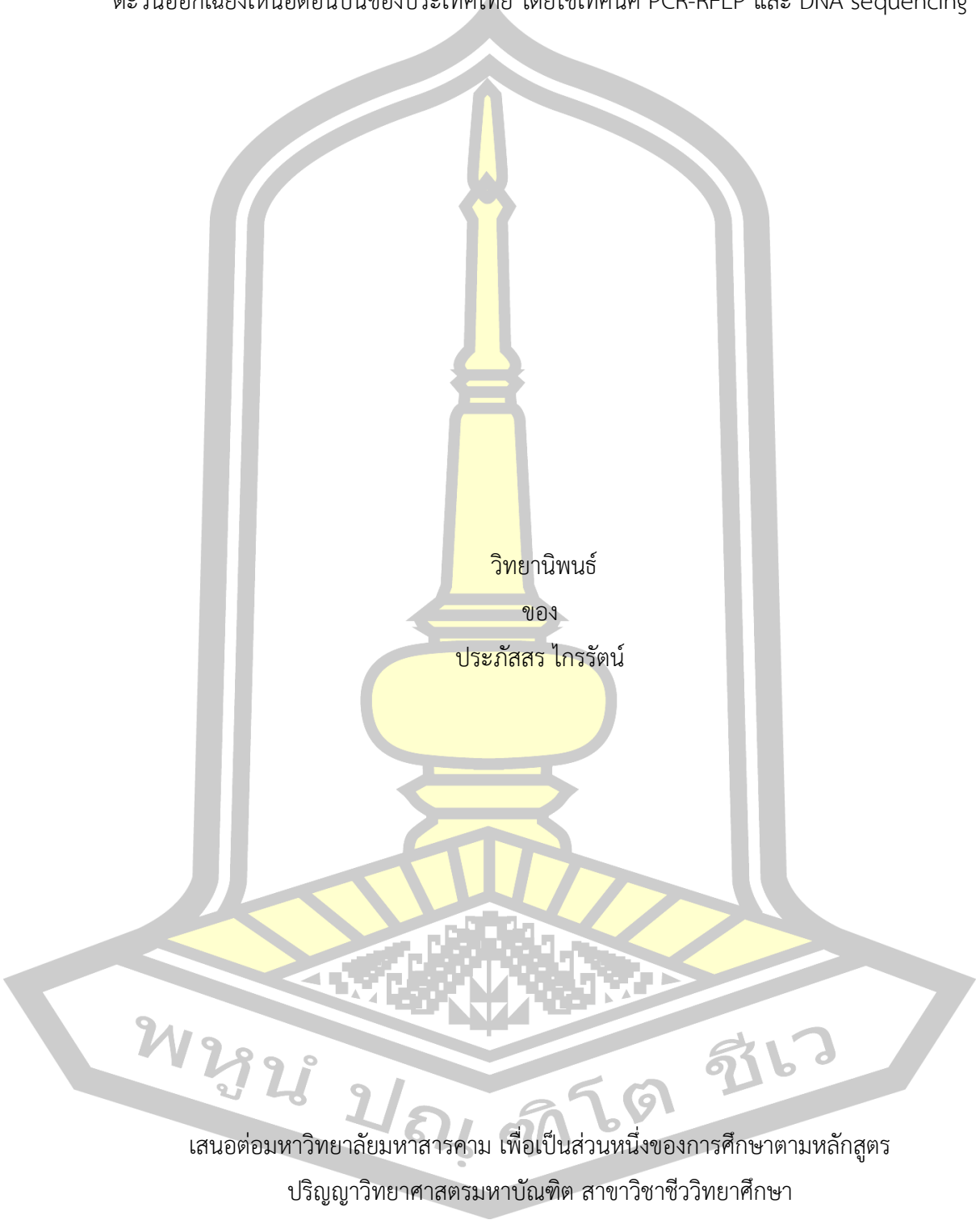
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

มิถุนายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยขมสกุล *Filopaludina* ในลุ่มน้ำโขงแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequencing



วิทยานิพนธ์

ของ

ประภัสสร ไกรรัตน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

มิถุนายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Genetic Diversity of genus *Filopaludina* in Mekong Basin Upper Northeastern Thailand Using PCR-RFLP and DNA Sequencing Techniques

Prapusson Grairut

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Biology Education)

June 2021

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวประภัสสร ไกรรัตน์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. กีรวิชญ์ เพชรจุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. บังอร แถวโนนงิ้ว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. บังอร กองอิ้ม)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. พรทิพย์ อติชาติ)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. ธีรพร กทิศาสตร์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(รศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยขมสกุล *Filopaludina* ในลุ่มน้ำโขงแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequencing

ผู้วิจัย ประภัสสร ไกรรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บังอร แถวโนนงิ้ว

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บังอร กองอิ้ม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** ชีววิทยาศึกษา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2564

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย คือ *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* ในพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ เลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม บริเวณลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย จำนวน 28 จุด พบตัวอย่างทั้งหมด 262 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา โดยวัดขนาดความยาวเปลือก (sl), ความกว้างเปลือก (sw), ความสูงของวงสุดท้าย (bc), ความยาวจากยอดถึงช่องเปิดเปลือก (ae), ความสูงของวงเกลียว (ah), ความยาวช่องเปิดเปลือก (ce) ความกว้างช่องเปิดเปลือก (fg), ความยาวจากซูเจอร์สุดท้ายถึงปากเปลือกบน (de) พบว่าลักษณะ ae และ fg มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกสูงที่ 0.938 และ 0.411 ส่วนลักษณะที่มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกต่ำที่สุดคือ bc ซึ่งมีค่าอยู่ที่ -2.264 เมื่อจำแนกโดย canonical discriminant พบว่าหอยชนิด *F. sumatrensis polygramma* มีตำแหน่งการกระจายต่างจากชนิดอื่นอย่างชัดเจน ส่วนชนิด *F. martensi cambodjensis* และ *F. martensi martensi* มีตำแหน่งการกระจายที่ไม่แตกต่างกันแสดงถึงความใกล้ชิดกันเป็นอย่างมาก โดยหอยชนิดที่มีการกระจายมากที่สุด *F. martensi martensi* คิดเป็น 75.6 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยด้วยวิธี PCR-RFLP และ DNA sequencing โดยทำการสกัดดีเอ็นเอหอยด้วยไพรเมอร์ COI ได้ genomic DNA มีขนาดเท่ากับ 710 bp ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Dde* I และ *Taq* I พบว่าได้ single haplotypes ทั้งหมด 5 รูปแบบทั้งคู่ นำ single haplotypes ที่ได้มาสร้างเป็น composite haplotypes ได้ 6 รูปแบบ ซึ่งไม่มีการทับซ้อนกันเลย โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ AB พบใน KMP1 และ KMP4 เป็น

ชนิด *F. m. martensi* ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 30 และทำการหาลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอย โดยสร้าง phylogenetic tree พบว่าหอยสกุล *Filopaludina* แบ่งเป็น 6 กลุ่ม (A, B, C, D, E และF) ซึ่งมีรูปแบบเป็น polyphyletic โดยความหลากหลายของ haplotype ที่พบมีรูปแบบการกระจาย 10 แบบ และเป็น haplotypes ที่ไม่ซ้ำกัน ระยะห่างทางพันธุกรรมภายใน *F. martensi martensi* และ *F. martensi cambodjensis* มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.1739 และ 0.1203 ตามลำดับ

คำสำคัญ : หอยขม, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, PCR-RFLP, Filopaludina

TITLE Genetic Diversity of genus *Filopaludina* in Mekong Basin Upper Northeastern Thailand Using PCR-RFLP and DNA Sequencing Techniques

AUTHOR Prapusson Grairut

ADVISORS Assistant Professor Bung-on Thaewnongiw , Ph.D.
Assistant Professor Bang-on Kong-im

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biology Education

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2021

ABSTRACT

The objective of this study was to study the genetic diversity and Morphology of Pond snail genus *Filopaludina* in the Mekong River Basin of Thailand (Loei, Nong Khai, Bueng Kan, and Nakhon Phanom). The 262 specimens were collected from 28 locations. All specimen was classified by external morphology to two species three subspecies including *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* and *F. sumatrensis polygramma* The Morphometrics were studied By measuring sizes of samples including, Shell length (sl), shell width (sw), last whorl hight (bc), apex to aperture height (ae), spire height (ah), aperture length (ce) aperture width (fg), length from last surture to upper lip (de) found that apex to aperture height (ae) and aperture width (fg) have high classification coefficient at 0.938 and 0.411. While the lowest coefficient characteristic is the last whorl high (bc) at -2.264. The canonical discriminant shows clearly separation of *F. m. cambodjensis* and *F. s. polygramma* while *F. m. cambodjensis* is distributed within the group of *F. m. martensi*, showing a very close relationship. The genetic diversity of the sample was studied by PCR-RFLP and DNA sequencing. The COI gene was selected to primer for the genomic DNA of the Pond snail in size 710 bp. The two restriction enzymes: *Dde* I and *Taq* I were selected to digested PCR product. There are both 5 pattern of single haplotypes, respectively. The composite haplotypes were constructed from single haplotypes and showed 6 patterns without overlapping. The most frequency

patterns were AB found in KMP1 and KMP4 (species *F. m. martensi*) as 30 percent. The mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA sequences were used to determine genetic variation. The phylogenetic tree classified genus *Filopaludina* into six evolutionary groups (A, B, C, D E and F), which is polyphyletic. The haplotype diversity was extremely distributed with 10 unique. The intraspecific divergence of *F. m. martensi* and *F. m. cambodjensis* shows the average was 0.1739 and 0.1203 respectively.

Keyword : Filopaludina, Genetic diversity

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยความสนับสนุนงบประมาณจากทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บังอร แถวโนนงิ้ว อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บังอร กองอิ้ม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรีวิชญ์ เพชรกุล ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ อติชาติ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร กทิศาสตร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้เสียสละเวลาให้คำปรึกษาแนะนำในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จึงขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่านมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรภาควิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่คอยช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยสนับสนุนในการทำวิจัย และให้กำลังใจเสมอมา

ประภัสสร ไกรรัตน์

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ซ

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฐ

สารบัญภาพ ..... ฒ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 หลักการและเหตุผล 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 4

2.1 อนุกรมวิธานของหอยสกุล *Filopaludina* 4

2.2 การแพร่กระจายของหอยขมสกุล *Filopaludina* 5

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหอยขม 6

2.3.1 ลักษณะภายนอก 6

2.3.2 ลักษณะภายใน 6

2.3.3 สัณฐานวิทยาของหอยขมสกุล *Filopaludina* 8

2.3.4 นิเวศวิทยาของหอยขม 10

2.4 เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม 10

2.4.1 เทคนิค Microsatellite Markers 10

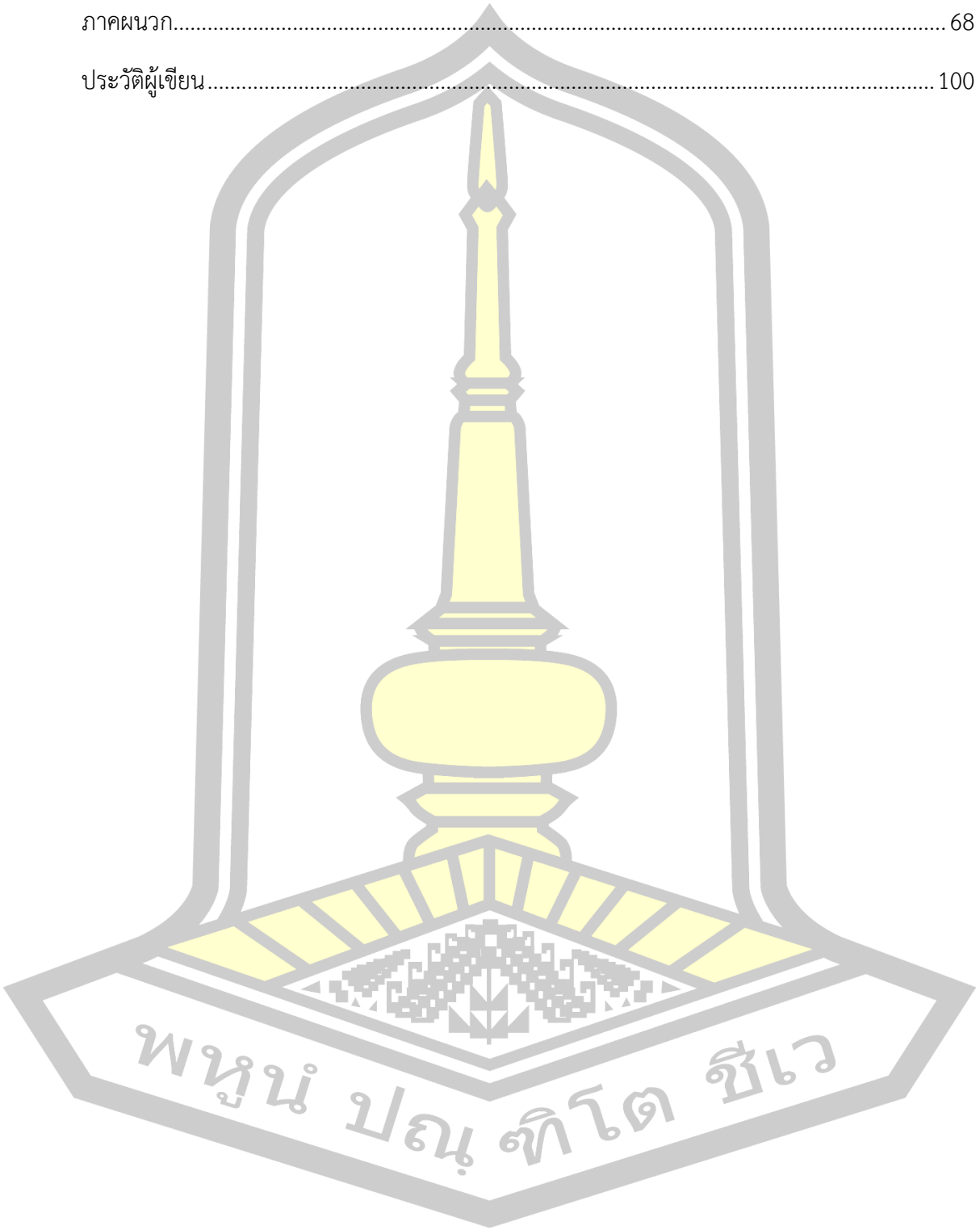
2.4.2 Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 11
2.4.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RADP) 12
2.4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) 12
2.4.4.1 หลักการทำ PCR (Principle of polymerase chain reaction) 13
2.4.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR 13
2.4.5 เทคนิค DNA sequencing 14
2.4.6 การศึกษาวิวัฒนาการโดยใช้ RFLP 15
2.4.6.1 การศึกษาวิวัฒนาการจากดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย 16
2.4.6.2 การศึกษา RFLP ร่วมกับ PCR (PCR-RFLP) 16
2.4.7 เทคนิคการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยอิเล็กโทรโฟเรซิสของกรดนิวคลีอิก 16
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18
2.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับหอยขม 18
2.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอณูพันธุศาสตร์ 19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 26
3.1 การเก็บตัวอย่างหอยขม 26
3.1.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง 26
3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง 26
3.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และการวิเคราะห์มอร์โฟเมตริก 27
3.2.1 การศึกษาลักษณะภายนอก 27
3.2.2 การวิเคราะห์มอร์โฟเมตริก 27
3.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequencing. 28
3.3.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของหอย 28
3.3.2 ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis 29
3.3.3 การเพิ่มปริมาณ genomic DNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 29

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ ได้แก่ 29
3.3.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยโดยเทคนิค PCR-RFLP 30
3.3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยขมโดยตรวจหาลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) 30
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล 30
3.4.1 PCR-RFlP 30
3.4.2 DNA Sequence 31
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย 32
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างหอยขม *Filopaludina* 32
4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยขมสกุล *Filopaludina* 35
4.3 การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา (Morphometric Analysis) 38
4.4 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม 40
4.4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ 40
4.4.2 การเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 41
4.4.3 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis 41
4.4.4 การตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค PCR-RFLP 42
4.4.5 ผลการศึกษาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) 49
4.4.5.1 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม 50
4.4.5.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) 52
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 56
5.1 สรุปผล 56
5.2 อภิปรายผล 57
5.3 ข้อเสนอแนะ 61

บรรณานุกรม..... 62

ภาคผนวก..... 68

ประวัติผู้เขียน..... 100



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและจำนวนตัวอย่าง 33

ตารางที่ 2 ผลค่าเฉลี่ยการวัดขนาดของส่วนต่างๆของหอยขม 39

ตารางที่ 3 รูปแบบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดที่ตำแหน่งยีน COI ของหอยขม..... 43

ตารางที่ 4 รูปแบบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดที่ตำแหน่งยีน COI ของหอยขม..... 43

ตารางที่ 5 รูปแบบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดที่ตำแหน่งยีน COI ของหอยขม สกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย คือ *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I..... 44

ตารางที่ 6 การกระจายความถี่ของ Single haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I..... 45

ตารางที่ 7 การกระจายความถี่ของ Single haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I..... 45

ตารางที่ 8 การกระจายความถี่ของ Single haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย คือ *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I 46

ตารางที่ 9 การกระจายความถี่ของ Composite haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I 46

ตารางที่ 10 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของหอยแต่ละชนิด 49

ตารางที่ 11 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. martensi martensi* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ใน GenBank 51

ตารางที่ 12 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. martensi cambodjensis* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ใน GenBank 51

ตารางที่ 13 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. sumatrensis polygramma* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ใน GenBank 51

ตารางที่ 14 ระยะห่างทางพันธุกรรมของหอย 52

ตารางที่ 15 ข้อมูลการวัดขนาดของส่วนต่างๆของหอยขม 74

ตารางที่ 16 ลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (F) ของตัวอย่างหอยขม 84

ตารางที่ 17 ลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (R) ของตัวอย่างหอยขม 92

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ลักษณะเปลือกของหอยฝาเดียว 8

ภาพประกอบ 2 ลักษณะภายในของหอยฝาเดียว 8

ภาพประกอบ 3 พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง..... 26

ภาพประกอบ 4 การวัดขนาดส่วนต่างๆของเปลือกหอยขม 27

ภาพประกอบ 5 จุดเก็บตัวอย่าง 32

ภาพประกอบ 6 ชนิดของหอยขมที่พบ 36

ภาพประกอบ 7 สัณฐานวิทยาของหอยขม *F. martensi martensi* 37

ภาพประกอบ 8 สัณฐานวิทยาของหอยขม *F. martensi cambodjensis* 37

ภาพประกอบ 9 สัณฐานวิทยาของหอยขม *F. sumatrensis polygramma* 38

ภาพประกอบ 10 กราฟความสัมพันธุ์ของมอโฟเมตริกและชนิดพันธุ์..... 40

ภาพประกอบ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 41

ภาพประกอบ 12 UPGMA dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย และตัวอย่างเปรียบเทียบ *Pila* sp. ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I 47

ภาพประกอบ 13 UPGMA dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย และตัวอย่างเปรียบเทียบ *Pila* sp. ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I..... 48

ภาพประกอบ 14 แผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอย ที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย (เลย, หนองคาย, บึงกาฬ และนครพนม) และข้อมูลลำดับเบสของยีน COI จาก GenBank ด้วยวิธี Neighbor-Joining ค่าสนับสนุน bootstrap ที่ 1,000 รอบ..... 54

ภาพประกอบ 15 แผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยตัวอย่าง 55

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

หอยขมสกุล *Filopaludina* Habe, 1964 เป็นหอยน้ำจืดฝาเดียวขนาดเล็ก มีเปลือกเป็นเกลียวกลมยอดแหลม เปลือกหนาและแข็ง ผิวชั้นนอกเป็นสีเขียวแก่ ฝาปิดเปลือกเป็นแผ่นกลม ตีนขนาดใหญ่ จะงอยปากสั้นทู่ ตามีสีดำอยู่ตรงกลางระหว่างหนวด มีอวัยวะทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ในตัวเดียวกัน ออกลูกเป็นตัว (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2545) อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดธรรมชาติทั่วไป เช่น คู หนอง คลอง บึง และในนาข้าว ที่เป็นพื้นดินหรือโคลน ที่ระดับน้ำตั้งแต่ 10 เซนติเมตร ถึง 2 เมตร ในน้ำนิ่งหรือน้ำที่ไหลไม่แรงและเป็นที่ร่ม ใช้เท้ายึดเกาะอยู่ตามวัตถุต่างในน้ำ หรือจมอยู่ในโคลน (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2533) ในฤดูแล้งสามารถฝังตัวอยู่ใต้ดินเพื่อรอฝนได้ การใช้ประโยชน์จากหอยขมส่วนใหญ่จะเป็นการนำมาบริโภคเป็นอาหารเมนูต่างๆ เช่น แกงคั่ว แกงอ่อม ยำ และลาบ เป็นต้น โดยเฉพาะแกงคั่วหอยขมเป็นที่นิยมรับประทานของคนไทย มีขายตามตลาดสดทั่วทุกภาคของประเทศไทย ทั้งในรูปของหอยสด หอยตัดก้น และขายเฉพาะเนื้อ ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงโดยเฉพาะเนื้อหอยขายกันในราคา 40 – 80 บาท และเมื่อนำมาทำเป็นอาหารที่ขายตามร้านอาหารอิสานและอาหารไทยเป็นเมนูแกงคั่วหอยขมในราคา 100-300 บาท (อรนภา นาคจินดา, 2551) นอกจากนี้ยังมีการนำเปลือกมาใช้การปรุงยา และตัวที่มีขนาดเล็กยังสามารถใช้เป็นอาหารเป็ดและสัตว์อื่นๆ ได้อีกด้วย (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2545) แต่หอยขมมีข้อเสียคือการเป็นโฮสต์ตัวกลาง (intermediate host) ลำดับที่ 1หรือ 2 ของพยาธิใบไม้ (echinostoma) ซึ่งเป็นต้นเหตุทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ลำไส้ในคน (echinostomiasis) จากการรับประทานหอยขมที่มีตัวอ่อนของพยาธิโดยไม่ทำให้สุกก่อน (Noikong & Chalobol, 2014) โดยหอยฝาเดี่ยวน้ำจืดในวงศ์ Viviparidae Gray, 1847 เป็นหอยที่มีการกระจายเกือบทั่วโลก ยกเว้นทวีปอเมริกาใต้ ในประเทศไทย พบหอยในวงศ์นี้ 8 สกุล คือ

แม่น้ำโขงเป็นหนึ่งในระบบแม่น้ำที่ใหญ่สายหนึ่งของโลก มีการไหลเป็นระยะทาง 4909 กม. และครอบคลุมพื้นที่ 795,000 ตารางกิโลเมตร ในภาคใต้ของจีน พม่า ไทย และภูมิภาคอินโดจีน โดยมีการแบ่งเป็นแม่น้ำโขงตอนบนและตอนล่าง (“Thai » Mekong River Commission,” n.d.) ลุ่มน้ำโขงตอนล่าง (Lower Mekong Basin) ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ใน 4 ประเทศ คือ ไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม ในประเทศไทยแม่น้ำโขงไหลผ่านจังหวัดเชียงราย เลย หนองคาย บึงกาฬ นครพนม มุกดาหาร อำนาจเจริญ และอุบลราชธานี เป็นระยะทาง 1,520 กิโลเมตร ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความ

หลากหลายทางชีวภาพสูง มีการค้นพบชนิดพันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้นในทุกๆปี และมีการระบุถึงจำนวนชนิดพันธุ์ที่ยังคงรอการค้นพบมีมากมาย ซึ่งยังไม่มีการศึกษาในหอยขมสกุล *Filopaludina*

โดยหอยฝาเดี่ยวน้ำจืดในวงศ์ Viviparidae Gray, 1847 เป็นหอยที่มีการกระจายเกือบทั่วโลก ยกเว้นทวีปอเมริกาใต้ (สุชาติ ผึ่งฉิมพลี, 2550) ในประเทศไทย พบหอยในวงศ์นี้ 8 สกุล คือ *Filopaludina*, *Sinotaia*, *Anulotaia, Trochotaia*, *Eyriesia*, *Idiopoma*, *Cipangopaludina* และ *Mekongia* ในประเทศไทยพบหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้งหมด 2 สกุลย่อย 6 ชนิด 7 ชนิดย่อย โดยพบการกระจายตัวตามจังหวัดต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้ *F. doliaris*, *F. filosa* , *F. sumatrensis* , *F. sumatrensis polygramma*, *F. sumatrensis speciosa*, *F. sumatrensis peninsularis*, *F. javanica*, *F. javanica continentalis*, *F. martensi*, *F. martensi martensi*, *F. martensi cambodjensis*, *F. martensi munensis*, *F. maekoki* เนื่องจากหอยขมเป็นสัตว์ที่มีความผันแปรทางลักษณะเปลือกสูง มีความคล้ายคลึงกัน การจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาภายนอกซึ่งใช้เฉพาะรูปร่าง ขนาด และสีของเปลือกจึงยากที่จะจำแนกความแตกต่าง (Sengupta et al. 2009) และยังไม่เคยมีรายงานการนำเอาเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ PCR-RFLP และ DNA sequencing มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของหอยชนิดนี้มาก่อน

ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาความหลากหลายของหอยสกุล *Filopaludina* ในลุ่มแม่น้ำโขงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COI โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และDNA sequencing เพื่อหาข้อมูลพันธุกรรมทางพันธุศาสตร์ของหอยขมสกุล *Filopaludina* เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ในการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ และเป็นข้อมูลในการบริหารด้านการอนุรักษ์และสาธารณสุขของหอยขมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อจัดจำแนกหอยขมสกุลสกุล *Filopaludina* ในลุ่มแม่น้ำโขงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก

2. เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* ในลุ่มแม่น้ำโขงโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และหาลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างประชากรของหอยขมสกุล *Filopaludina* จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ ห้วย หนอง คลอง บึง ในจังหวัดลุ่มแม่น้ำโขง ของประเทศไทย 4 จังหวัด คือ เลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม กำหนดจุดพื้นที่เก็บระยะห่าง 25-50 กิโลเมตร เก็บตัวอย่างหอย แล้วนำมาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก แล้วศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และDNA sequencing

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถจำแนกชนิดของหอยขมสกุล *Filopaludina* ได้
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกชนิดของหอยขมสกุล *Filopaludina* เพื่อใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร และด้านสาธารณสุข
3. เพื่อทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยขมสกุล *Filopaludina* ในพื้นที่ลุ่มน้ำโขง

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 อนุกรมวิธานของหอยสกุล *Filopaludina*

หอยขมสกุล *Filopaludina* โดยทั่วไปเรียกว่าหอยขม ชื่ออื่นที่รู้จักในประเทศไทยมีหลายชื่อ เช่น หอยจุ๊บ หอยจูบ หอยจุ๊บแจง หอยขมลาย หอยดูด เนื่องจากมีอยู่ทั่วไปจึงมีชื่อหลากหลายตามแต่ละท้องถิ่น จัดลำดับหมวดหมู่ตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Brandt, 1974)

Phylum Mollusca

Class Gastropoda

Order Mesogastropoda

Family Viviparidae

Genus *Filopaludina*

Species *F. (Filopaludina) doliaris* (Gould, 1844),
F. (Filopaludina) filosa (Reeve, 1863),
F. (Filopaludina) sumatrensis (Dunker, 1852),
F. (Siamopaludina) javanica (Von dem Busch, 1844),
F. (Siamopaludina) martensi (Frauenfeld, 1865),
F. (Siamopaludina) maekoki (Brandt, 1968)

Subspecies *F. sumatrensis polygramma* (Martens, 1860)
F. sumatrensis speciosa (Deshayes, 1876)
F. sumatrensis peninsularis (Deshayes, 1876)
F. javanica continentalis (von dem Busch, 1844)
F. martensi martensi (Frauenfeld, 1865)
F. martensi cambodjensis (Mabille & Le Mesle, 1866)
F. martensi munensis (Brandt, 1968)

2.2 การแพร่กระจายของหอยขมสกุล *Filopaludina*

หอยขมมีการกระจายทั่วภูมิภาคเอเชีย ทั้งเอเชียใต้ เอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Brandt, 1974) มีการแพร่กระจายทั่วไปในประเทศใกล้เคียง เช่น พม่า ลาว เวียดนาม และกัมพูชา รวมถึงในจีน และแอฟริกา หอยสกุลนี้ ในประเทศไทยพบหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้งหมด 2 สกุลย่อย 6 ชนิด 7 ชนิดย่อย โดยพบการกระจายตัวตามจังหวัดต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้ *F. doliaris, F. filosa, F. sumatrensis, F. sumatrensis polygramma, F. sumatrensis speciosa, F. sumatrensis peninsularis, F. javanica, F. javanica continentalis , F. martensi, F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis , F. martensi munensis , F. maekoki* มีกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยพบ *F. sumatrensis speciosa* กระจายตัวตามจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด นครพนม อุดรธานี บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ จันทบุรี ปราจีนบุรี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี นราธิวาส และยังพบในภาคกลางและภาคใต้ของลาว กัมพูชา เวียดนาม *F. sumatrensis polygramma* การกระจายตัวตามในภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย ไม่พบในพื้นที่สวนบนตั้งแต่ตาก ถึงนครสวรรค์ และฝั่งตะวันออกของนครราชสีมา พื้นที่ที่พบ ได้แก่ จังหวัดหนองคาย อุดรธานี และขอนแก่น และยังพบภาคใต้ในประเทศเมียนมาร์ พบ *F. sumatrensis penisularis* พบในภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น พบ *F. doliaris* กระจายตัวในประเทศอินเดีย พม่า พบทางภาคเหนือของไทย จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำปางเท่านั้น พบ *F. javanica continentalis* กระจายตัว ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ส่วนเหนือของภาคกลางและภาคตะวันออกพบเฉพาะบางแห่ง ไม่พบในพื้นที่เหนือจากจังหวัดนครพนม ถึงพิษณุโลก และตาก และยังพบในภาคใต้ของลาว กัมพูชา ภาคใต้ของเวียดนาม พบ *F. martensi martensi* กระจายตัวทั่วภาคกลาง และภาคใต้ของไทย จากจังหวัดเชียงใหม่ถึงชายแดนมาเลเซีย พบ *F. martensi combodjensis* กระจายตัวในประเทศไทย โดยเฉพาะภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ในจังหวัดจันทบุรี ตราด และปราจีนบุรี ทางใต้ของจังหวัดบุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี และยังพบในประเทศกัมพูชา ทางใต้ของลาว รวมไปถึงทางใต้ของเวียดนาม พบ *F. martensi munensis* การกระจายตัวตามลุ่มแม่น้ำมูล จังหวัดสุรินทร์ และในแม่น้ำคราม จังหวัดนครพนม และพบ *F. maekoki* กระจายตัวตามทางภาคเหนือประเทศไทย ในจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย และน่าน และยังพบในเวียดนามด้วย (Brandt, 1974) (Brandt, 1974)

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหอยขม

2.3.1 ลักษณะภายนอก

หอยขมเป็นหอยในกลุ่มหอยฝาเดียว มีเปลือกเป็นรูปกรวยรูปไข่ ลักษณะเป็นเกลียวเวียนขวาเรียวขึ้นไปถึงยอดปลายแหลม หอยขมแต่ละชนิดจะมีความหนาของเปลือก ความสูง ความโค้งและร่องลึกที่ผิวเปลือกที่แตกต่างกันไป เกลียววงยอดสุดมีขนาดเล็กเรียกว่า apex เป็นวงที่เกิดก่อนวงอื่นถัดลงมา 2 วง เรียกว่า spire วงล่างสุดเรียกว่า body whorl บริเวณนี้มีช่องเปิดขนาดใหญ่ให้ส่วนหัวและส่วนเท้ายื่นออกมาได้ เรียกว่า aperture ขอบในของช่องเปิดเรียกว่า inner lip ขอบนอกของช่องเปิดเรียกว่า outer lip แกนกลางของเปลือกเป็นท่อกลวงบิดโค้งเป็นเกลียวเรียกว่า columella มีช่องเปิด umbellicus ส่วนของฝาปิดเปลือกเป็นแผ่นบาง ๆ เรียกว่า operculum มีลายรูปวงรีอยู่ตรงกลางฝาปิดเป็นวงการแสดงการเจริญเติบโต สีของเปลือกขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย เปลือกหอยขมแบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้น Periostracum เป็นชั้นนอกสุดประกอบด้วยสารอินทรีย์พวกโปรตีน cochiolin ชั้น Prismatic อยู่ชั้นกลางของเปลือก มีความหนาและแข็ง ส่วนใหญ่ประกอบด้วยหินปูน และชั้นในสุดคือ Nacreous ประกอบด้วยสารอินทรีย์จำพวกโปรตีนลักษณะเป็นสีมุขมันวาว ซึ่งเป็นสารประกอบ calcite ในรูปผลึกหินปูน (ภาพประกอบ 1)

2.3.2 ลักษณะภายใน

มีการแบ่งลำตัวออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนก้อนอวัยวะภายในเรียกว่า visceral mass และส่วนของเท้า โดยส่วนหัว มีหนวด 1 คู่ สามารถยืดหดได้ ติดกับโคนหวดหนวดมีตาสีดำ 1 คู่อยู่บนก้านตา ปากมีลักษณะคล้ายท่อกลวงหรืองวงอยู่ตรงกลางระหว่างหนวด เรียกว่า siphon ส่วนก้อนอวัยวะ เป็นส่วนที่รวมอวัยวะไว้เป็นก้อน ขดเป็นเกลียวตามรูปของเปลือก อวัยวะภายในประกอบไปด้วยต่อมน้ำลาย หัวใจ เหงือก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ เป็นต้น ส่วนเท้า กล้ามเนื้อเท้าจะยึดติดกับฝาปิดเปลือก กล้ามเนื้อเท้าเป็นแผ่นแบน ๆ กว้าง ๆ จะเคลื่อนที่ในลักษณะเป็นคลื่นแบบตัวหนอน การทำงานของกล้ามเนื้อเท้าจะทำงานไล่จากส่วนหน้าไปยังส่วนท้ายติดต่อกัน เวลาหอยขมเคลื่อนที่ไปจะยื่นส่วนหัว ส่วนเท้า และ siphon ออกมาจากเปลือก

การกินอาหาร

หอยขมมีปาก ระบบทางเดินอาหารเริ่มจากปาก อาหารที่ลอยอยู่ในน้ำ เช่น แพลงก์ตอนเล็ก ๆ สามารถถูกดูดเข้าไปในช่องใต้ปากได้ นอกจากนี้ภายในปากก็จะมี redula ซึ่งมีลักษณะแข็งทำหน้าที่คล้ายเป็นฟันใช้ขูดแทะอาหารที่ติดอยู่กับวัสดุ เช่น ตะไคร่น้ำ ภายในช่องปากมีท่อเปิดจากต่อมน้ำลาย ต่อจากช่องปากคือหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ และทวาร ตามลำดับ อาหารของหอยขมได้แก่ ตะไคร่น้ำ พืชน้ำ แพลงก์ตอน และอินทรีย์สารที่เน่าเปื่อย

การหายใจ

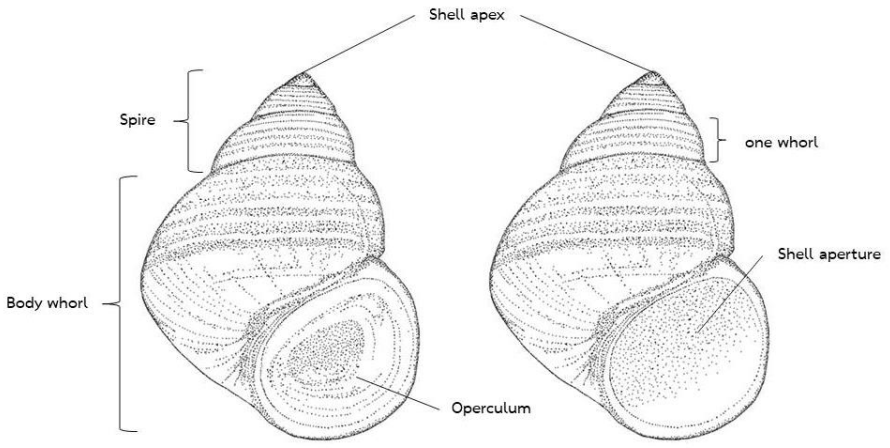
หอยขมหายใจด้วยเหงือก เหงือกจะอยู่ในช่อง mantle cavity โดยน้ำจะไหลผ่านช่องนี้ไปทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างน้ำกับเส้นเลือดบริเวณเหงือก

การสืบพันธุ์

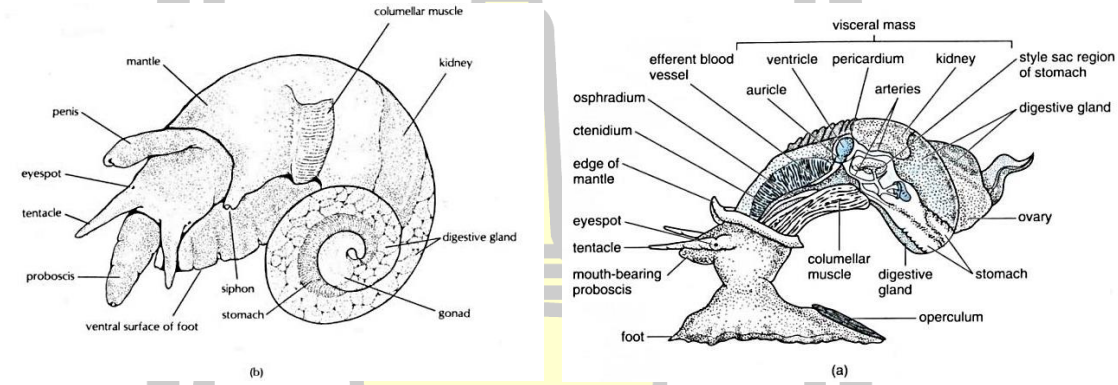
หอยขมมีอวัยวะเพศทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ในตัวเดียวกัน (hermoprodite) สามารถผสมตัวเองหรือผสมข้าม (cross fertilization) โดยการมาประกบกันได้ โดยมีอวัยวะที่ใช้ในการจับคู่เรียก copulatory organ มีอวัยวะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์อยู่ด้านหลังเรียกว่า โอโวเทสทิส (ovotestis) ซึ่งการสร้างไข่กับสเปิร์มจะไม่พร้อมกัน เซลล์สืบพันธุ์จาก ovotestis จะเข้าสู่ซีลอมและผ่านท่อไต (coelemoduct) ไปสู่โพรงแมนเทิล ไข่ที่ปฏิสนธิแล้วจะเจริญเป็นตัวอ่อนระยะแรกเรียกว่า ตัวอ่อนโทรโคฟอร์ (trocophore larva) ว่ายในน้ำโดยอาศัยซิเลีย (cilia) ที่เรียงเป็นวงอยู่กลางตัวเรียกว่า โปรโทโทรช (prototroch) ที่หัวมีแผ่นรับความรู้สึก (sensory plate) รูปครึ่งวงกลม มีกระจุกขนเรียกว่า apical tuft รับความรู้สึก จากนั้นจะเจริญเป็นตัวอ่อนเวลิเจอร์ (veliger) ที่มีส่วนหัว ส่วนเท้า ส่วนหนวด ตา และวีลัม ซึ่งเป็นแผ่นรูปวงกลมซึ่งเป็นแผ่นรูปวงกลมบางๆ เหมือนปีกผีเสื้ออยู่สองข้างลำตัว ช่วยในการว่ายน้ำ เมื่อถึงระยะหนึ่งจะสร้างเปลือกและจมลงกับพื้นเพื่อพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย การผสมพันธุ์ได้ด้วยตัวของมันเองจะทำได้เมื่ออายุได้ 60 วัน หอยขมออกลูกเป็นตัวครั้งละ ประมาณ 40-50 ตัว ลูกหอยขมที่ออกมาใหม่ ๆ จะมีวุ้นหุ้มอยู่ แม่หอยขมจะใช้หนวดแทงวุ้นจนแตกเพื่อให้ลูกหอยหลุดออกจากวุ้น ลูกหอยขมสามารถเคลื่อนไหวได้ทันทีเมื่อออกจากตัวแม่ ระยะที่จะพบเห็นชุกชุมอยู่ในช่วงเดือนธันวาคม-พฤษภาคม มีอายุขัยตั้งแต่ 3-11 ปี (ภาพประกอบ 2)

ในธรรมชาติหอยเป็นสัตว์ที่เป็นพาหะโดยเป็นโฮสต์ตัวกลางลำดับที่ 1 หรือ 2 ในการนำพยาธิมาสู่ผู้บริโภคในห่วงโซ่อาหาร เนื่องจากวงจรชีวิตของพยาธิในระยะตัวอ่อนจะเข้ามาฝังตัวในหอย โดยเฉพาะในหอยน้ำจืด สำหรับในหอยขมมีชนิดพยาธิที่ตรวจพบดังต่อไปนี้ *Echinostoma malayanum*, *Echinostoma revolutum*, *Echinostoma malayanum*, *Echinostoma ilocanum*, *Angiostrongylus cantonensis* (บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์, 2555)(Strong et al, 2008)(ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2533)

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 1 ลักษณะเปลือกของหอยฝาเดียว



ภาพประกอบ 2 ลักษณะภายในของหอยฝาเดียว (a) ลักษณะภายในของหอยฝาเดียว (b) ลักษณะตัวของหอยที่เอาเปลือกออก ที่มา Rupert, 2010

2.3.3 สัณฐานวิทยาของหอยขมสกุล *Filopaludina*

โดยทั่วไปหอยสกุลนี้จะมีเปลือกขนาดเล็กไปถึงใหญ่ เปลือกแข็ง และแข็งแรง เพอริเดิมสีเขียว มีหรือไม่มีวงเกลียวสีน้ำตาลเข้ม เพอริเดิมอาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ โดยแต่ละชนิด และชนิดย่อยมีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก ดังนี้

F. martensi เป็นหอยขมที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และเป็นที่รู้จักในประเทศไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาลายาและอินโดนีเซีย และยังพบใน Tonkin และทางใต้ของจีน เป็นชนิดที่มีการกระจายอยู่ทั่วไปและสามารถปรับตัวกับแหล่งที่อยู่อาศัยได้หลาหลาย (ทะเลสาบ สระน้ำ คลอง แม่น้ำ และลำธารภูเขาที่มีกระแสน้ำแรง) มักแบ่งออกเป็นหลายชนิดพันธุ์และรูปแบบมากกว่า 12 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น rassenkreis, ส่วนหนึ่งเป็น synonyms และอีกส่วนหนึ่งเป็น subspecies ที่มีการกระจายตามภูมิศาสตร์ที่กำหนดไว้ ลักษณะทั่วไปจะมีเปลือกขนาดใหญ่หรือขนาดกลาง หนา แข็ง สีดำมะกอก เขียวมะกอกหรือสีน้ำตาล ฝาปิดเปลือกมีชั้นสารต่างๆที่หนามาก

F. martensi martensi จะมีเปลือกขนาดใหญ่หรือขนาดกลาง หนา แข็ง ผิวนอกสีเขียวมะกอกซึ่งจะกลายเป็นสีน้ำตาล หรือสีดำ เมื่อมีอายุมากขึ้น ตัวอ่อนมีผิวเรียบยกเว้นมีเส้นสันบางๆ และไม่มีแถบสี วงโพสนิวเคลียร์แรกมีวงรอยชัดเจน และแถบสีจางๆ ซึ่งไม่ได้ยกสูงให้ดูใหญ่หรือสูงเกินจริงด้วยวงสันที่ชัดเจนต่างกัน แต่ไม่ค่อยพบวงแถบที่เข้มกว่า มีรอยที่ชัดเจนรอบอัมบิลิคัสและใกล้ผิวปาก อัมบิลิคัสมีทั้งปิดและแบบเปิดที่ไม่มี periomphalic carina ซึ่งไม่ค่อยพบ ปากเปิดเปลือก (Aperture) ใหญ่ เป็นรูปไข่กว้าง ด้านในสีฟ้าขาว ปากเปลือกถูกเชื่อมโดยแคลลัสสีขาวนมหนาปานกลาง บางครั้งขยายออก ฝาปิดเปลือก (operculum) มีชั้นสารต่างๆที่หนามาก มีรอยกล้ามเนื้อกว้าง ขรุขระ และยกสูง บริเวณโดยรอบมักมีสีเหลืองทอง ยกเว้น ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่า 35 มิลลิเมตร มีขนาด สูง 31-52 มิลลิเมตร ด้านกว้าง 35 มิลลิเมตร ตัวมีสีเทามีจุดสีส้ม โดยปกติตัวเมียที่เต็มวัยจะมีเอมบริโอขนาดใหญ่ 6-10 ตัว ภายในถุงรังไข่ (uterine brood-pouch) มีขนาด 6 มิลลิเมตร และมีวง 3 วง มีเส้นเกลียวประมาณ 23-25 เส้นใกล้รอยต่อและอาจมีเส้นบางๆ อยู่ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ เส้นเกลียวที่ใหญ่ที่สุดจะมีเดือย รอบนอกมีเรดูลาที่แข็ง 1 อันจะมีสันปุ่มขนาดเล็กเฉลี่ย 11 สัน สันคมตรงกลางกว้างแต่ไม่ยาวเท่าสันด้านข้าง *F. martensi* เป็นโฮสต์ตัวกลาง โดยพบปรสิทระยะเซอคาร์เรีย และเมตาเซอคาร์เรียของสกุล *Echinostomathidae* ถ้าหากนำไปรับประทานก็ทำให้ติดเชื้อจากปรสิทได้

F. martensi combodjensis ชนิดนี้มีความต่างจากชนิดอื่นคือมียอด (spire) ที่ต่ำ มีวงเกลียวกลม และไม่มีสันเกลียว วงตัวไม่พอง ปากเปิดเปลือกแทบจะไม่ขยาย ตัวอย่างที่อ่อนจะมีแถบเกลียวสีชัดเจน ส่วนตัวอย่างที่แก่อาจมีสีดำมะกอกเข้ม ขนาด สูง 41-18 มม. กว้าง 25-32 มม

F. martensi munensis ชนิดนี้มีความต่างจากชนิดที่มีความใกล้เคียงอย่าง *F. martensi combodjensis* โดยจะมีเปลือกที่หนากว่า เพอริเดอมสีน้ำตาลเกาลัด ปากเปลือกกลมและมีชั้นผิวที่ปากหนา เปลือกมีทั้งที่ไม่มีสันเกลียวหรือมีสันเกลียวอย่างชัดเจนบนผิวรอบนอก เฉพาะตัวอย่างที่ไม่เต็มวัยเท่านั้นจะไม่ค่อยพบรอยของแถบเกลียว ด้านนอกมีสันเกลียวคล้ายเส้นด้าย และปากเปิดเปลือกกลม มีขอบปากบานสามารถพบได้มากในชนิดนี้ มีความสั้น*กว่า F. martensi combodjensis* แม้มีขนาดเท่ากัน ดังนั้นจึงดูอ้วนสั้น ขนาด สูง 28-37 มิลลิเมตร ด้านกว้าง 21-28 มิลลิเมตร

F. sumatrensis มีเปลือกขนาดเล็กถึงกลาง มีอยู่ทั้งบนและล่างหรือแถบเกลียวอยู่เฉพาะที่ครึ่งบนของเกลียวตัว รอบนอกเป็นสันหรือไม่เป็นสัน ขอบด้านนอกมี 15-20 สัน

F. sumatrensis polygramma เป็นชนิดที่พบมากรองลงมา จำนวน 15 ตัวอย่างจากจังหวัดเลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม มีชื่อท้องถิ่นที่แตกต่างกัน ได้แก หอยขม หอยขมลาย หอยจูบ หอยทราย และหอยลาย เป็นต้น ลักษณะทั่วไปคือเปลือกขนาดกลาง ทรงกรวยรูปไข่ หนาปานกลาง ยอดเปลือกยกสูง แต่ละวงค่อนข้างโค้ง มีร่องระหว่างวงลึก ผิวเปลือกเรียบเป็นมัน สีเขียว

เหลือง มีแถบสีวนรอบเปลือกเป็นสีเขียวเข้มหรือสีน้ำตาล แถบสีจะปรากฏอย่างน้อย 4 แถบในวงอื่นๆ ส่วนในวงสุดท้ายจะพบแถบสี เพิ่มอีก 2-3 แถบจากบริเวณครึ่งของวงจนถึงส่วนฐานของวงสุดท้าย ขอบปากเปลือกบางและคม แผ่นเปิดช่องเปลือกแบน ค่อนข้างบางใสสีน้ำตาลแดง

หอย *F. sumatrensis speciosa* มีชื่อท้องถิ่นแตกต่างกันตามภูมิภาค ได้แก่ หอยขมลาย หอยจูบ หอยทราย และหอยหวาย เป็นต้น มีลักษณะคล้ายกับ *F. sumatrensis polygramma* แต่จะพบแถบสีในวงสุดท้ายเฉพาะครึ่งบนของวงเท่านั้น รอบนอกเป็นสัน ขอบด้านนอกมี 19-20 สัน และมีแถบสีเข้ม

F. sumatrensis peninsularis มีชื่อท้องถิ่นแตกต่างกันตามภูมิภาค ได้แก่ หอยขมลาย หอยจูบ หอยทราย และหอยหวาย เป็นต้น มีลักษณะคล้ายกับ *F. sumatrensis speciosa* แต่จะมีแถบสีจางกว่า (องค์การพัฒนาเศรฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2550)(อรนภา นาคจินดา, 2551)(Brandt, 1974)(Noikong and Chalobol, 2014)

2.3.4 นิเวศวิทยาของหอยขม

อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดธรรมชาติทั่วไป เช่น คู หนอง คลอง บึง และในนาข้าว ที่เป็นพื้นดินหรือโคลน ที่ระดับน้ำตั้งแต่ 10 เซนติเมตร ถึง 2 เมตร ในน้ำนิ่งหรือน้ำที่ไหลไม่แรงและเป็นที่ร่ม ใช้เท้ายึดเกาะอยู่ตามวัตถุต่างในน้ำ หรือจมอยู่ในโคลน ในหน้าแล้งสามารถฝังตัวอยู่ใต้ดินเพื่อรอฝนได้ มีเหงือกที่เป็นลักษณะพิเศษคือ เป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ช่วยในการกรองอาหาร ซึ่งจะเป็นพืชเป็นส่วนใหญ่ และรวมอาหารเข้ากับเมือกเพื่อจัดเรียงต่อกันและเก็บเป็นก้อนแล้วส่งไปยังส่วนหัวเพื่อกินในเวลาต่อมา (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2533)

2.4 เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม

2.4.1 เทคนิค Microsatellite Markers

ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงกันอยู่อย่างต่อเนื่องที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม โดยแต่ละชุดจะประกอบด้วยเบส 1-6 เบส พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ศึกษา การกระจายตัวของลำดับเบสแบบแซทเทลไลท์มีทั่วไปบนจีโนม แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณพบมาก บางบริเวณพบน้อย ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่จะกระจายอยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือส่วนนำรหัสของยีน (non-coding region) โดยเฉพาะพวกที่ชุดซ้ำมีขนาดไม่เป็นเบส 3 เบส เพราะหากเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frame shift จะพบในส่วนนำรหัสของยีนน้อย หรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนน้อยมาก โดยลำดับเบสบนไมโครแซทเทลไลท์จะมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าลำดับเบสทั่วไปซึ่งมีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 10^{-}

^{9} – 10^{-10} เนื่องจากเป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร โดยพบอัตราการกลายพันธุ์ต่อตำแหน่งต่อการจำลองดีเอ็นเอแต่ละครั้งในแบคทีเรีย *E. coli* ประมาณ 10-2 ในยีสต์ประมาณ 10-4 -10-5 ในคนประมาณ 10-3 ในหนูประมาณ 10-3 -10-4 ต่อตำแหน่งต่อ 1 ชั่วอายุ ส่วนในแมลงหวี่มีค่าประมาณ 6×10^{-6} ต่อตำแหน่ง

การตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายบริเวณแบบ Microsatellite-primed PCR (MP-PCR) ซึ่งเป็นลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำสั้นๆ 1-6 คู่เบส เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกัน โดยที่ในหนึ่งตำแหน่งอาจมีลำดับเบสซ้ำยาวต่อเนื่องกันหลายร้อยคู่เบส มีหลายชื่อเรียก คือ SSR (simple sequence repeat) หรือ STR (short tandem repeat) ในการตรวจสอบดีเอ็นเอแบบไมโครแซทเทลไลท์ทำได้โดยใช้วิธี Southern blot hybridization โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นให้มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำ เช่น $(CA)_{10}$, $(GAT)_{7}$ เป็นโพรบทำให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์นั้นๆได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน แต่การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริไดเซชั่นมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ราคาสูง ใช้ดีเอ็นเอปริมาณมากและต้องใช้เวลานานจึงมีการประยุกต์มาใช้เทคนิค PCR และใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ เช่น $(CA)_{10}$, $(GAT)_{7}$ เพียง 1 ชนิด เป็นไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ 2 ทิศทาง โดยมีปลาย 3′ เข้าหากัน และสามารถตรวจสอบได้โดยไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ส่วน Inter simple sequence repeat (ISSR) เป็นวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอที่คล้ายกับ RAPD มีการใช้พรเมอร์ชนิดเดียว และตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมๆกัน และเป็นการประยุกต์จากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสอื่นเข้าไปที่ปลาย 5 หรือ 3 ของลำดับไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 1-3 เบส จะช่วยให้ไพรเมอร์จับได้เฉพาะปลาย 5′ หรือ 3′ ของชุดซ้ำบนดีเอ็นเอต้นแบบ ได้ผลผลิต PCR ที่มีความยาวสม่ำเสมอ และสามารถแยกความแตกต่างของจำนวนชุดซ้ำที่ตำแหน่งไพรเมอร์จับได้โดยการเพิ่มเบสที่ปลาย 5′ ของไพรเมอร์ การทำแบบนี้จะได้ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้อยู่ส่วนระหว่างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ 2 บริเวณที่อยู่ใกล้กัน

2.4.2 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยนำเอ็นไซม์ตัดจำเพาะมาตัดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบก่อนเพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กัน คล้ายกับวิธี RFLP แล้วจึงนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพียงบางชิ้น เพราะหากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตัดทั้งหมดจะได้ปริมาณมากมายจนทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้ โดยวิธีนี้จะใช้การทำไฮบริไดเซชั่น เพื่อให้โพรบจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะเพียง 1-2 หรือจำนวนน้อยชิ้น และใช้วิธีต่อ adapter เข้าที่ปลายชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดวีทั้งหมดแล้วจึงเลือกเพิ่มปริมาณเพียงบางชิ้นด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกับส่วน adapter ที่ต่อเข้าไป ตามด้วยลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ และเพิ่มเบสอื่นๆ อีก 1-4

เบสทางปลาย 3′ โดยเรียกเบสเหล่านี้ว่า เบสคัดเลือก (selective base) ซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบหรือชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ได้เพียงบางส่วน ดังนั้นถ้าเราเพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบส ไพรเมอร์นั้นจะมีโอกาสจับได้สมบูรณ์กับชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 1 ใน 4 ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยวิธีการนี้เมื่อเพิ่มเบสคัดเลือกมากขึ้น จำนวนชิ้นดีเอ้ฯเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ก็จะลดลงเรื่อยๆ 4 เท่า ทุกๆ 1 เบสที่เพิ่มเข้ามา โดยเอนไซม์ที่ใช้ตัดดีเอ็นเอจะมี 2 ชนิด พร้อมกับ adapter และไพรเมอร์อีกอย่างละ 2 ชนิด และทำการปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา จะทำให้จำนวนดีเอ็นเอที่เพิ่มได้พอเหมาะต่อการแยก และตรวจสอบโดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนชนิดของเบสคัดเลือกได้ ทำให้เลือกใช้ไพรเมอร์ได้หลายแบบมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ลายพิมพ์แบบต่างๆ การทำเครื่องหมาย AFLP จึงช่วยตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่ง มีลักษณะแบบสุ่มทั้งจีโนม และทำได้โดยไม่ต้องทราบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตมาก่อน

2.4.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RADP)

ตั้งขึ้นโดย William และคณะในปี ค.ศ. 1990 เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ที่ไม่จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) แต่จะใช้เป็นไพรเมอร์ขนาดสั้น 10-12 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียวสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อมๆกัน ถ้าตำแหน่งใดมีไรพเมอร์จับตัวกันดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ทิศทางแบบที่ปลาย 3′ เข้าหากันและอยู่ห่างกันไม่มากนัก จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนนั้นได้แบบทวีคูณ โดยส่วนที่เพิ่มปริมาณได้กระจายอยู่ทั้งจีโนมโดยไม่จำเพาะเจาะจง เครื่องหมาย RAPD จึงตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยความแตกต่างจะปรากฏเป็นมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ (สุรินทร์ ปิยโชคณากุล, 2552)

2.4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นหลายเท่าในเวลาไม่นานโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ในหลอดทดลอง วิธีทำคือ สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 2 ชนิดที่สังเคราะห์ที่เตรียม เมื่อดำเนินปฏิกิริยา PCR จบแล้ว นำผลที่ได้ทำอิเล็กโทรฟอเรซิส แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เพื่อตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ว่ามีความยาวเท่าใด ถ้าส่วนของดีเอ็นเอในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายมีการเพิ่มหรือขาดหายไป จะพบว่าผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละตัวอย่างมีขนาดไม่เท่ากัน แต่ความแตกต่างของเบสภายในจะมีจะมีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากัน จึงต้องมีวิธีตรวจสอบต่อไปอีก เช่น นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดก่อนแล้วนำไปแยกขนาดโดยอิเล็กโทรโฟเรซิสเป็นวิธีการที่ไม่ต้องผ่านการทำไฮบริไดเซชัน จึงทำได้รวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณน้อย ใช้ตรวจสอบได้ทั้งดีเอ็นเอในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์

2.4.4.1 หลักการทำ PCR (Principle of polymerase chain reaction)

การทำ PCR คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซ้ำกันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ สิ่งจำเป็นที่ต้องใช้คือ ไพรเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่เบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 โนของดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบทั้งหมดหรือเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อนำไปออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จะใช้ในปฏิกิริยา โดยไพรเมอร์จะเป็นสารโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำ PCR เริ่มต้นโดยากรสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซต์ไตรฟอสเฟส (dNTP) 4 ชนิด ใช้ความร้อนเพื่อทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว พื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) สุดท้ายจึงปรับอุณหภูมิให้เมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส พร้อมกับการใส่เอนไซม์ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extention) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อเกิดปฏิกิริยาครบ 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอจะเพิ่มปริมาณขึ้นเป็น 2 เท่า ถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำไปเรื่อยๆ หลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8, ...เท่าไปเรื่อยๆ จนถึง 2^n เท่าเมื่อปฏิกิริยาเกิด n รอบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาศัยการทำงานของเอนไซม์ ดีเอ็นเอพอลิเอมเรส โดยปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากแบคทีเรียน้ำพุร้อน *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูง ทำให้ไม่ต้องมีการเติมเอนไซม์ใหม่ พร้อมยังสามารถใช้ได้กับเครื่องอัตโนมัติได้โดยควบคุมอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนทำซ้ำ 30-40 รอบ ก็จะสามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ เป็นล้านๆ เท่าโดยใช้เวลาพียง 3-4 ชั่วโมงเท่านั้น

2.4.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

สารเคมีที่ใช้ในดารทำ PCR โดยทั่วไปมี 6 ชนิด ได้แก่ บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยาที่จะมาพร้อมกับ *Taq* polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ของที่จะใช้จริง (10x buffer) dNTP ซึ่งประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ควาเข้มข้นอย่างน้อย 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ โดยที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากหยดเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟิน แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพจะได้ผลผลิตมากกว่า โดยทั่วไปนิยมใช้ปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา แมกนีเซียมคลอไรด์ จะเป็นส่วนช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอรเรส มีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปฏิกิริยามาก ดังนั้นการทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ๆ จึงควรที่จะทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ก่อนเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม (ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์) เอนไซม์ ซึ่งเป็น

เอนไซม์ที่ทนความร้อน (thermotable DNA polymerase) ชนิดที่นิยมใช้กันมากคือ *Taq* polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มักอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 ยูนิทต่อไมโครลิตร และใช้ในปฏิกิริยา 2.5-5 ยูนิทต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละชนิด คือ การมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอจากปลาย () เพราะเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3′ (3′→5′ exonuclease) จะสามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ผิดพลาดหรือ ตรวจสอบความถูกต้องได้ (proofreading) (สุรินทร์ ปิยโชคณากุล, 2552)

2.4.5 เทคนิค DNA sequencing

DNA Sequencing เป็นเทคนิคที่ทำให้ทราบถึงลำดับของ นิวคลีโอไทด์ ของ DNA กระบวนการ DNA sequencing หรือ DNA barcode เบื้องต้นมีสองขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนแรกเป็นการสร้างห้องสมุมบาร์โค้ดของชนิดที่ถูกระบุแล้ว และขั้นตอนที่สองคือการจับคู่ลำดับของบาร์โค้ดของตัวอย่างที่ไม่ถูกระบุกับห้องสมุดบาร์โค้ด ในขั้นตอนแรกต้องใช้ความเชี่ยวชาญทางด้านนิเวศวิทยาในการเลือกสปีชีส์ที่จะเป็นตัวอย่างอ้างอิงในห้องสมุดบาร์โค้ด โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อสามารถรวบรวมได้จากตัวอย่างมีชีวิตหรือจากตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ ตัวอย่างเหล่านี้ต้องผ่านกระบวนการประมวลผลทาง DNA และการหาลำดับเพื่อสร้างบาร์โค้ด DNA ในรูปแบบของโครมาโตกราฟ chromatogram เป็นการแสดงภาพของลำดับ DNA ที่สร้างโดยซีเควนเซอร์ (sequencer) โดยบาร์โค้ดนี้สามารถเก็บไว้ในฐานข้อมูลเพื่อใช้ในอนาคตหรือสามารถใช้เป็นลำดับดีเอ็นเอเพื่อเปรียบเทียบกับลำดับที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล โดย DNA barcode เป็นวิธีการจำแนกชนิดพันธุ์ที่รวดเร็วและแม่นยำ มีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่นการควบคุมศัตรูพืชเกษตร การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ การปกป้องสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ การเฝ้าระวังคุณภาพน้ำ การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ และการจำแนกพืชสมุนไพร (Kaur, 2015)

การทำ DNA Sequencing มีหลายวิธี สำหรับวิธี The chain termination method จะเป็นวิธีที่ต้องการ DNA สายเดี่ยวและโมเลกุลที่จะหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ มักจะถูก cloned ลงใน M13 vector ที่เป็นเช่นนี้เพราะวิธีนี้ต้องการ การสังเคราะห์ DNA สายที่ 2 โดยการใช้เอนไซม์ ซึ่ง DNA สายที่ 2 นี้จะมีลำดับของเบส complement กับลำดับของเบสบน DNA แม่พิมพ์ ขั้นแรกต้องให้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ จับคู่กับ recombinant M13 molecule โอลิโกนิวคลีโอไทด์นี้จะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ สำหรับการสร้างสายใหม่ที่ complement กับชิ้นส่วน DNA ที่เติมเข้าไปในจีน M13 เอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างคือ รูปดัดแปรของ DNA พอลิเมอเรส I (modified form of DNA polymeraseI)นอกจากนี้ยังต้องมีดีออกซีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดคือ dATP,dTTP, dGTP และ dCTP รวมทั้งนิวคลีโอไทด์ที่ถูก ดัดแปลงชนิดหนึ่งคือ ไดดีออกซีนิวคลี-โอไทด์ (dideoxynucleotide,dideoxy ATP) ซึ่งสามารถเข้าไปอยู่ใน สายพอลินิวคลีโอไทด์ สายใหม่เช่นเดียวกับดีออกซีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดดังกล่าว เมื่อ dideoxy ATP เข้าไปอยู่ในสายจะทำให้หยุดการสร้างสายต่อไป ทั้งนี้เพราะ dideoxy ATP ขาดหมู่ OH ที่ตำแหน่ง 3'ของน้ำตาล ซึ่งหมู่นี้จำเป็น

สำหรับ การจับของนิวคลีโอไทด์หน่วยใหม่ ถ้าเติม dideoxy ATP ในปฏิกิริยาจะทำให้หยุดการเพิ่มความยาวที่ตำแหน่งตรงข้ามกับ ไธมิดีน (thymidine) ในสายแม่พิมพ์ แต่การหยุดการเพิ่มความยาวจะไม่เกิดขึ้นที่ T ตัวแรก เนื่องจากมี dATP อยู่ในสารละลาย dATP จะเข้าไปแทนที่ dideoxy ATP ผลของปฏิกิริยาจะได้สายใหม่ทุกสายมีความยาวแตกต่างกัน และแต่ละสายมีปลายเป็น dideoxy ATP เมื่อใช้ไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dideoxy ATP,dideoxy TTP,dideoxy GTP และ dideoxy CTP สำหรับปฏิกิริยาการสร้างสายใหม่ ผลของปฏิกิริยาจะได้พอลินิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 4 ชนิด แต่ละชนิดมีปลายเป็น dideoxy ATP, dideoxy TTP,dideoxy GTP และ dideoxy CTP ขั้นตอนต่อไปคือ การแยกพอลินิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวต่างกันของแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) ผลที่ปรากฏให้เห็นเป็นแถบ (band) จำนวนมาก แต่ละแถบเป็นโมเลกุล DNA ที่มีความยาวแตกต่างกัน โดยทั่วไปโมเลกุลDNAถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีจึงสามารถเห็นแถบได้โดยการทำ autoradiography M13 vector เป็น M13 phage particle ซึ่งจะถูกปล่อยออกจากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านอย่างต่อเนื่อง phage particle นี้มี M13 จีโนมเป็นสายเดี่ยว เพราะฉะนั้นจีนที่เข้าไปต่ออยู่ใน M13 vector จึงเป็น DNA สายเดี่ยว DNA สายเดี่ยวนี้ถูกใช้ในเทคนิคหลายเทคนิคเช่น DNA sequencing (Maxam, 1977)

การทำ DNA barcode ที่ตำแหน่งยีน COI ถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการศึกษาความหลากหลายของวิวัฒนาการระดับโมเลกุลซึ่งมีศักยภาพที่ดีในการระบุชนิดพันธุ์ที่คลุมเครือและช่วยปรับปรุงความเข้าใจด้านความหลากหลายทางชีวภาพได้ โดยในสัตว์ มีไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็น single double-helical circular ประกอบด้วย protein-coding genes 13 ตำแหน่ง ribosomal genes 2 ตำแหน่ง และ tRNAs อีกหลายตำแหน่ง โดยยีนไมโตคอนเดรียเป็นที่นิยมมากกว่ายีนนิวเคลียร์เพราะมี mitochondrial genes lack introns มักเป็น haploid มีการรวมตัวที่จำกัด และแต่ละเซลล์มีไมโตคอนเดรียหลายอันและไมโทคอนเดรียแต่ละอันมีโมเลกุลดีเอ็นเอแบบวงกลมจำนวนมากจึงมียีนที่สมบูรณ์หลายชุด ดังนั้นเมื่อเนื้อเยื่อตัวอย่างมีจำนวน จำกัด ไมโทคอนเดรียนจึงเสนอแหล่งของ DNA ที่ค่อนข้างสมบูรณ์ (Purty and Chatterjee, 2016)

2.4.6 การศึกษาวิวัฒนาการโดยใช้ RFLP

RFLP หรือ Restriction Fragment Length Polymorphism หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสและไมโตคอนเดรียในรูปของดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้ มีความสามารถในการจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้อง เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่

เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองหรือเหตุอื่น อาจเป็นการเปลี่ยนแปลงถึงระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement หรือ invertion) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโซมหรือต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จนสามารถที่จะกล่าวได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดที่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอเหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twin) หรือพืชที่เกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ ความหลากหลายดังกล่าวนี้ใช้เวลามาก วิธีที่ง่ายกว่า คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้น

2.4.6.1 การศึกษาวิวัฒนาการจากดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย

ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย มีรูปร่างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ ขนาดมีความผันแปรในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ตั้งแต่ 16 กิโลเบสในคน จนถึง 200-2,000 กิโลเบสในพืช แต่จำนวนยีนที่พบในไมโตคอนเดรียของพืชและสัตว์ไม่ต่างกัน สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยวิเคราะห์ RFLP ของดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียได้ การศึกษา RFLP นั้นสามารถศึกษาได้จากดีเอ็นเอของนิวเคลียสด้วย แต่ดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีขนาดของจีโนมที่ใหญ่กว่า เมื่อนำมาแยกจะปรากฏรอยยาวต่อเนื่อง (smear) ไม่สามารถแยกแถบได้ จำเป็นต้องใช้ probe ซึ่งวิธีการนี้จะซับซ้อนกว่ามาก

2.4.6.2 การศึกษา RFLP ร่วมกับ PCR (PCR-RFLP)

เนื่องจากการตรวจ RFLP จากดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ต้องผ่านการทำ Southern hybridization ต้องมีโพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ผ่านการโคลนหรือทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการใดวิธีหนึ่งมาแล้ว ถ้าติดฉลากโพรบด้วยสารกัมมันตรังสีอาจมีอันตราย จึงต้องทำด้วยความระมัดระวังในพื้นที่ที่ควบคุม และใช้เวลานาน ดังนั้นจึงมีการตรวจพอลิมอร์ฟิซึมด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและเร็วกว่า (สุรินทร์ ปิยโชคณากุล, 2539)

2.4.7 เทคนิคการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยอิเล็กโทรโฟเรซิสของกรดนิวคลีอิก

หลังจากที่ทำการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตแล้ว จึงนำไปทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ อิเล็กโทรโฟเลซิส (electrophoresis) ไฮบริไดเซชั่น (hybridization) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) DNA sequencing และDNA microarray เป็นต้น

เทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิสคือ เป็นการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุ เช่น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน ในตัวค้ำจุน ภายใต้สนามไฟฟ้า (electric field) และในสารละลายบัพเฟอร์ที่เหมาะสม อัตราเร็วของ การเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับความแรงของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ประจุสุทธิของโมเลกุล รูปร่างและขนาดของโมเลกุล รวมทั้งความเข้มข้นของไอออน (ionic strength) ความหนืด

(viscosity) และอุณหภูมิของสารละลายบัพเฟอร์ เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติขิงโมเลกุลที่มีประจุ (single charged molecule) และเป็นการแยกโมเลกุลที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน (separation tecgnique) อีกด้วย

ตัวค้ำจุนที่ใช้ในเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิสที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันคือ agarose gel และ polyacrylamide gel โดยเจทั้ง 2 ชนิดนี้จะเป็นเมทริกซ์ ที่มีรูพรุนเมื่อแข็งตัว ขนาดของรูจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์ของเจลที่เตรียม เมื่อใส่สารละลายที่มีโมเลกุลขนาดต่างๆ แต่มีประจุชนิดเดียวกันเข้าไปในตัวค้ำจุนและกระตุ้นการเคลื่อนที่ด้วยกระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วเนื่องจากมีความสามารถในการแทรกเข้าไปในรูได้ง่าย ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า โดย agarose gel จะสามารถจัดเตรียมในเปอร์เซ็นต์ที่ทำให้มีรูขนาดใหญ่จึงนิยมใช้ในการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก ส่วน polyacrylamide gel จะมีรูขนาดเล็กกว่า จึงนิยมใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนหรือการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกที่ต้องการความละเอียดสูง เช่น DNA sequencing เป็นต้น

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis เกิดขึ้นจากพื้นฐานที่ว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีประจุเป็นลบ เนื่องจากมีหมู่ฟอตเฟต อยู่ในโมเลกุล เมื่อนำดีเอ็นเอใส่ไปใน agarose gel ที่แข็งแรงแล้ววางไว้ใต้สารละลายบัฟเฟอร์ที่นำไฟฟ้าได้ โมเลกุลดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก ดังนั้นจึงต้องวางเจลด้านที่มีช่องสำหรับใส่ดีเอ็นเอไว้ทางขั้วลบ และต้องใส่สารที่มีสี ลงไปผสม เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ว่าขณะนี้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปถึงระยะใดในเจลแล้ว เนื่องจากดีเอ็นเอไม่ได้มีสี จนเมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ขั้นตอนสุดท้ายคือการแสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่อยู่ในเจลมีวิธีตรวจสอบหลายวิธี ได้แก่ การย้อมเจลด้วยสารเรืองแสง เช่น ethidium bromide ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV โดยจะเห็นเป็นแถบสีส้ม การติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P, ^{33}P, ^{35}P ซึ่งตรวจสอบโดยการนำไปทำออโตเรดิโอกราฟ (aotoradiograph) เห็นดีเอ็นเอเป็นแถบสีดำ การติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสีเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วตรวจสอบโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated sequencer) ต่างจากการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารกัมมันตรังสีตรงที่สามารถตรวจสอบได้ในขณะที่แยกดีเอ็นเอเลย การย้อมเจลด้วยสีธรรมดา เช่น เมทิลีนบลู (methylene blue) ซิลเวอร์ไนเตรท หรือสีน้ำเงิน และการตรวจสอบโดยไฮบริไดเซชั่น ซึ่งทำโดยการย้ายดีเอ็นเอไปบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (blotting) แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี (สุรินทร์, 2552) โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ดสุดจะปรากฏอยู่ไกลกับจุดเริ่มต้นมากที่สุด และดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะปรากฏอยู่ใกล้กับจุดเริ่มต้นมากกว่า (เปรมใจ พัชรี และ ปีติ เสาวนันท์, 2548)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับหอยขม

สุชาติ ผึ่งฉิมพลี (2550) ทำการศึกษาชนิด และการแพร่กระจายของหอยน้ำจืดในแม่น้ำป่าสักตอนล่าง ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างรายเดือนในรอบปี ระหว่างเดือนมิถุนายน 2548 ถึงเดือนพฤษภาคม 2549 จากจุดเก็บตัวอย่าง 34 จุด จุดละ 10 ซ้ำในพื้นที่ 200 ตารางเมตร ผลการศึกษาพบหอยน้ำจืดในแม่น้ำป่าสักตอนล่างประกอบด้วยหอยฝาเดียวจำนวน 4 วงศ์ 6 สกุล หอยสองฝาจำนวน 3 วงศ์ 8 สกุล รวม 14 สกุล ปริมาณความชุกชุมของหอยมี ค่าเฉลี่ย 8.21±4.30 ตัวต่อตารางเมตร ประกอบด้วยหอยฝาเดียว 6.13 ตัวต่อตารางเมตร และหอยสองฝา 2.08 ตัวต่อตารางเมตร โดยหอยฝาเดียวสกุล *Filopaludina* spp. พบเป็นหอยชนิดเด่นที่สุด ส่วนการศึกษาการแพร่กระจายของหอยน้ำจืดพบหอยในสกุล *Mekongia* sp. เป็นชนิดที่มีการแพร่กระจายมากที่สุด โดยพบทุกจุดสำรวจคุณสมบัติดินในแม่ น้ำป่าสักตอนล่างพบมีค่าความอุดมสมบูรณ์อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำและคุณสมบัติน้ำจัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำผิวดินประเภทที่ 2 ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ

สาวิกา กัลปพฤกษ และคณะ (2559) ทำการศึกษาความหลากหลายชนิดพันธุ์ของหอยน้ำจืดในระบบนิเวศนาข้าว อำเภอมหาราช จังหวัด พระนครศรีอยุธยา พบหอยน้ำจืดทั้งสิ้น 8 วงศ์ 14 ชนิด โดยมีหอยน้ำจืดในวงศ์ Amblemidae และ Viviparidae เป็นกลุ่มหอยวงศ์ เด่นในด้านจำนวนชนิด โดยสามารถแบ่งหอยน้ำจืดออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามการใช้ประโยชน์ ได้แก่ กลุ่มหอยขมในวงศ์ Viviparidae 3 ชนิด ได้ แก่ *F. sumatrensis polygramma, F. martensi martunsi* และ *Trochotaia trochoides* และกลุ่มหอยสองฝาน้ำจืด 4 ชนิด ได้ แก่ *Ensidens ingallsianus ingallsianus, Uniandra contradens ascia, Pilsbryoconcha exilis compressa* และ *Corbicula sp.* กลุ่มหอยที่มีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ ได้แก่ หอยมุกน้ำจืดในวงศ์ Amblemidae และกลุ่มหอยที่มีประโยชน์ ด้านบทบาทการควบคุมระบบนิเวศ ได้แก่ หอยกินหอยหรือ หอยเพชฌฆาต (*Clea helena*) ซึ่งในภาษาท้องถิ่นจะเรียกว่าหอยเจดีย์ โดยในช่วงฤดูทำนาจะพบปริมาณความหนาแน่นของหอยน้ำจืดสูงกว่าช่วงนอกฤดูกาลทำนา ในด้านโครงสร้างประชากรทางนิเวศ พบว่าระบบนิเวศนาข้าวมีความหลากหลายของพรรณหอยน้ำจืดสูง แต่มีการกระจายของหอยน้ำจืดแต่ละชนิดไม่สม่ำเสมอ และมีหอยน้ำจืดบางชนิดที่มีปริมาณโดดเด่นกว่าชนิดอื่นๆ

Prasankok & Panha (2011) ทำการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของหอยทากสยาม *cryptozona siamensis* 432 ตัวอย่าง 24 พื้นที่ จากทั่วประเทศไทย และบางส่วนจากประเทศมาเลเซีย โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของ allozyme ที่ได้จากเนื้อเยื่อตับ และกล้ามเนื้อหอย พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำที่ค่า 0.254 และมีระยะห่างทางพันธุศาสตร์ที่ 0.000-0.124

Sor *et al.* (2017) ศึกษาการแบ่งพื้นที่ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ในลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่าง เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม คลอบคลุมพื้นที่ประเทศจีนตอนใต้ เวียดนาม ลาว และไทย จำนวน 60 จุด สุ่มตัวอย่างปีละ 1 ครั้ง ช่วงฤดูแล้งในเดือนมีนาคมตั้งแต่ปี พ. ศ. 2547 ถึงปี พ. ศ. 2551 โดยสุ่มตัวอย่างหน้าดิน 3 ตำแหน่ง พบสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ทั้งหมด 108 ตัวอย่าง ทำการจัดกลุ่มโดยใช้ Ward's hierarchical clustering method เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ One-way ANOVA พบว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ที่พบคิดเป็นพวกแมลง 44 เปอร์เซ็นต์ พวกหอย 33เปอร์เซ็นต์ และครัสเตเชียส 13 เปอร์เซ็นต์ โดยหอยที่พบมาคือหอยในอันดับ Unionida, Veneroida และ Caenogastropoda และแบ่งได้ 4 กลุ่ม ที่ส่วนใหญ่มีความแตกต่างทางปัจจัยสภาพแวดล้อมอย่างมีนัยสำคัญ โดยพื้นที่ตอนบน (กลุ่ม IIb2) และช่องแคบด้านบน (กลุ่ม IIa) มีระดับออกซิเจนที่ละลายน้ำสูง คุณสมบัติการนำไฟฟ้าสูง ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ป่าไม้ และไม้พุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลักที่พบคือแมลงในพื้นที่สามเหลี่ยมปากแม่น้ำโขง (กลุ่ม I) กลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังประกอบไปด้วยหอยจำนวนมากรองลงมาเป็นพวกแอนเนลิด ครัสเตเชียส และแมลงปีกคู่ ส่วน (กลุ่ม IIb1) ที่พบในระหว่างตอนบนและช่องแคบด้านบนและพื้นที่สามเหลี่ยมปากแม่น้ำมีความสัมพันธ์กับพื้นที่มีลักษณะเป็นพื้นที่ชุ่มน้ำและที่ดินเพื่อเกษตรกรรมโดยเป็นแหล่งที่พบหอยมากที่สุด โดยรวมแล้วการศึกษานี้พบว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ยังคงมีความหลากหลายสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่สามเหลี่ยมปากแม่น้ำจึงควรมีการอนุรักษ์ต่อไป

2.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอณูพันธุศาสตร์

บังอร แถวโนนงิ้ว และคณะ (2548) ศึกษาความหลากชนิดและเครื่องหมายทางพันธุกรรมของหอยโข่งพันธุ์พื้นเมือง ในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกพบหอยโข่งพันธุ์พื้นเมือง 4 ชนิด คือ *Pila pesmei, P. gracilis, P. polita* และ *P. angelica* ร่วมกับศึกษาความหลากทางพันธุกรรมของยีน COI โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I, *Taq*I และ *Ssp*I พบ composite haplotypes ทั้งหมด 8 รูปแบบ คือ BAA, NXA, PXA, BCA, BGA, FCA, GCA และ MCA สามารถจัดจำแนกหอยได้ 5 ชนิด คือ คือ *P. pesmei, P. gracilis, P. polita*, *P. angelica* และหอย pPCBE ซึ่งคาดว่าเป็นชนิดใหม่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน แต่เป็นหอยในสกุล *Pila sp.* อย่างแน่นอน และเมื่อนำไปวิเคราะห์ผลและสร้าง phylogenetic tree จากรูปแบบของยีน COI ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tag*I สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *P. polita, P. pesmei* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *P. gracilis, P. angelica* และหอย pPCBE ทั้งสองกลุ่มมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนประมาณ 54เปอร์เซ็นต์ และพบว่า *P. angelica* และหอย pPCBE มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 90เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การวิเคราะห์ผลและสร้าง phylogenetic tree จากรูปแบบของยีน COI ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I *Tag*I สามารถแบ่ง

ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย หอย pPCBE กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *P. polita, P. pesmei, P. gracilis* และ *P. angelica* โดยที่ทั้งสองกลุ่มมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนประมาณ 54เปอร์เซ็นต์ จากการที่ลักษณะภายนอกของ *P. pesmei* และ หอย pPCBE มีความคล้ายคลึงกันมากแต่ถูกจัดอยู่ต่างกลุ่มกัน แสดงว่าหอยที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันแต่อาจจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ และยังมีการพบ *P. pesmei* ในอำเภอสวี จังหวัดชุมพร ที่ในอดีตไม่เคยมีรายงานการพบหอยชนิดนี้ในภาคใต้ จึงสันนิฐานว่าอาจเกิดจากการที่ประชากรทางภาคตะวันออกเฉียงเหนืออพยพไปทำงานที่ภาคใต้และนำหอยชนิดนี้ไปปล่อยในธรรมชาติด้วย หรืออาจเกิดจากน้ำท่วมใหญ่ที่ภาคใต้ในปี 2531 จึงทำให้หอยจากภาคกลางแพร่กระจายไป

ลำไย ณีรัตน์พันธุ์ และคณะ (2555) ศึกษาการสะสมของโลหะหนักในเนื้อเยื่อและลายพิมพ์ดีเอ็นเอหอยขมชนิด *Filopaludina martensi* บริเวณน้ำพอง อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ทำการศึกษาการสะสมของโลหะหนักในเนื้อเยื่อและตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอตัวอย่างหอยขมชนิด *F. martensi* ด้วยเทคนิค RAPD ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ 12 แบบ พบว่า หอยขมที่เก็บในฤดูฝนมีค่า Genomic Template Stability น้อยที่สุด แสดงว่าหอยขมชนิด *F. martensi* มีความผันแปรทางพันธุกรรมเปลี่ยนสูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากถูกรบกวนด้วยปัจจัยมลพิษทางน้ำ

มณีรัตน์ สิริสวัสดิ์ (2558) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาช่อนสกุล Channa 4 ชนิด คือ *Channa striata, C. micropeltes, C. gachua* และ *C. lucius* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เก็บตัวอย่างปลาจำนวนทั้งหมด 112 ตัวจาก 14 จังหวัดได้แก่ นครพนม มุกดาหาร บึงกาฬ สกลนคร กาฬสินธุ์ มหาสารคาม อุดรธานี อุบลราชธานี หนองบัวลำภู หนองคาย อำนาจเจริญ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ และชัยภูมิ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ COI ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Alu*I, *Hha*I, *Hinf*Iและ *Taq*I ได้ single haplotypes ทั้งหมด 14 9 8 และ 7 รูปแบบตามลำดับพบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ตัวอย่างเปรียบเทียบและปลากลุ่ม *Channa* ทั้งหมด พบว่า *C. gachua* มีความแตกต่างจากปลา *Channa* ชนิดอื่น (ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง 60เปอร์เซ็นต์) และชนิด *C. striata* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงที่สุดซึ่งสอดคล้องกับแหล่งที่เก็บแสดงว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดได้แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างภายในชนิดได้ ซึ่งปลาสกุล *Channa* มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในระดับภายในชนิดอาจเป็นผลเนื่องจากปัจจัยหรืออิทธิพลของความแตกต่างทางพันธุกรรมความแตกต่างของปัจจัยสิ่งแวดล้อมหรืออิทธิพลร่วมกันระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม

Tantrawatpan *et al*. (2020) ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงทางภูมิศาสตร์ของ *Bithynia siamensis goniomphalossensu* lato ที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำน้ำ ในลุ่มน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย ลาว และกัมพูชา โดยใช้ลำดับเบสของ mitochondrial

cytochrome c oxidase subunit 1 และ 16S riboso-mal เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเก็บตัวอย่าง *B. s goniomphalos* จากแม่น้ำโขง, ชี, มูล, ปราจีนบุรีและบางปะกงในประเทศไทยรวมถึงการเก็บกักน้ำงึมในสปป. ลาว จากการอ่างเก็บน้ำในแม่น้ำโขงและทะเลบางเหียงในประเทศไทยและลาว จัดจำแนกได้ 100 และ 15 Haplotypes และวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า *B. s goniomphalos* จากแม่น้ำโขง, ชี, มูล, ปราจีนบุรีและบางปะกงในประเทศไทยรวมถึงการเก็บกักน้ำงึมในสปป. ลาวถูกจัดอยู่ใน Lineage 1 ตัวอย่างทั้งหมดจากโตนเลสาบถูกจัดอยู่ใน Lineage 2 และ ตัวอย่างจากแม่น้ำโขงในประเทศไทยและทะเลบางเหียงในสปป. ลาว ถูกจัดอยู่ใน Lineage 3 การศึกษานี้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า *B. s. goniomphalosis* มีวิวัฒนาการอย่างน้อยสามชนิดในลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่างและการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลที่ครอบคลุมนั้นควรมีเพิ่มเติมเพื่อให้เราเข้าใจถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและระบบการจัดจำแนกหอยสกุล *Bithynia*

Sanna *et al.* (2012) ศึกษาความแปรปรวนภายในชนิด และ)การจำแนกกลุ่มตัวอย่าง *Patella* spp จำนวน 65 ตัวอย่าง จากเมดิเตอเรเนียน ได้แก่ Sardinia, Sicily, Tuscany, northern Adriatic Sea จำนวน 32 ตัวอย่าง จาก ตะวันออกเฉียงเหนือของแอตแลนติก ได้แก่ Brittany 18 ตัวอย่าง และ กานาเรียส ได้แก่ Tenerife จำนวน 15 ตัวอย่าง โดย *P. ulyssiponensis* s.l. มีความแปรปรวนในรูปทรง รูปแบบสีของเปลือกและรูปแบบสีของเท้าสูง ทำให้การระบุตัวตนได้ยาก จึงใช้เทคนิค PCR-RFLP ในลำดับ COI มาตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Taq*I endonuclease มาใช้ในการจำแนก พบว่า สามารถจำแนก *Patella* spp ออกเป็น 4 ชนิดคือ *P. ulyssiponensis, P. caerulea, P. vulgate, P candei* ได้อย่างรวดเร็วและถือเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการทำการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้

Chantima *et al.* (2018) สำรวจหอยน้ำจืดในพื้นที่เกษตรกรรมของแม่ลาวในจังหวัดเชียงราย เพื่อประเมินความหลากหลายทางชนิดและแหล่งที่อยู่อาศัย รวบรวมและตรวจสอบหอยน้ำจืดจาก 14 พื้นที่ทางการเกษตรแม่ลาว พบหอยทั้งหมด 1,688 ตัว จำแนกได้ 7 วงศ์ 8 สกุล 12 ชนิด ความหลากหลายของหอยน้ำจืดที่อยู่ในนาข้าวสูงกว่าในคลองชลประทานและลำธาร ชนิดที่มีมากที่สุดคือ *Bithynia siamensis siamensis* คิดเป็น 54.6 เปอร์เซ็นต์ พบตัวอย่างหอยที่ทำหน้าที่เป็นโฮสต์ตัวกลางระดับแรกของ cercarial คือ *Filopaludina sumatrensis polygramma, B. s siamensis* และ *Melanoides tuberculata* พบ *cercariae* ทั้งหมด 7 *ประเภท ได้แก่ echinostome, monostome, gymnocephalous, virgulate, parapleurolophocercous, pleurolophocercous และ cercariae megalurous* โดยพบว่า *Parapleurolophocercous cercariae* เป็น *cercariae* ชนิดที่ติดเชื้อในหอยน้ำจืดมากที่สุด คือ *41. 2* เปอร์เซ็นต์ โดยการติดเชื้อของ *Echinostome metacercariae* พบในหอย 6 ชนิด ซึ่งมีความชุก 7.6เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังพบ metacercaria ของ *Thatariella* sp. ในหอยน้ำจืด *Filopaludina* spp. และ *B. funiculata* ซึ่งมีความชุก 0.5เปอร์เซ็นต์ ถือเป็นการรายงานครั้งแรกที่พบ *Thapariella metacercariae* ในหอยน้ำจืด *B. funiculata*

Sivaraman *et al*. (2018) ศึกษาผลการพัฒนาวิธีการสำหรับ PCR-RFLP เพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากกุ้ง 4 ชนิดที่มีความสำคัญทางการค้าในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp), *Penaeus monodon* (Tiger shrimp), *P. semisulcatus* (Flower shrimp) และ *Fenneropenaeus indicus* (Indian white shrimp) แต่ละชนิดแบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่ม Frozen, Cooked, Canned, Fried และ Raw ทำการสกัดดีเอ็นเอจากกุ้งตามวิธีของ Sumathi *et al*. (2015) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 16S rRNA/tRNA ตามแบบ Pascoal *et al*. (2008) และทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Tap5091 จากตัวอย่างที่ตรวจสอบทั้งหมด 52 ตัวอย่างด้วยโปรโตคอลที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจชนิดของกุ้ง 4 ชนิดที่มีความสำคัญทางการค้า พบว่ามีตัวอย่าง 29 ตัวอย่างที่ระบุไปถึงชนิด และ 14 ตัวอย่างยังไม่ระบุชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าโปรโตคอล PCR-RFLP ที่พัฒนาแล้วมีความน่าเชื่อถือในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งสุก และบรรจุกระป๋องเนื่องจากรูปแบบที่เกิดไม่ซ้อนทับกับผลิตภัณฑ์กุ้งที่ไม่ระบุชนิด ดังนั้นจึงเป็นที่รับรองโดยหน่วยงานกำกับดูแลด้านอาหารเพื่อปกป้องผู้บริโภคจากหลอกลวงชนิดของกุ้ง

Puslednik *et al*. (2009) ทำการตรวจสอบหอยคัน Lymnaeidae 3 ชนิด ในภูมิภาคออสตราเลเซีย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทำเครื่องหมายดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย และนิวเคลียส โดยทำการเก็บตัวอย่าง 44 ตัวอย่างจาก 4 ภูมิภาค คือออสเตรเลียตะวันออก นิวซีแลนด์ ออสเตรเลียใต้ และทัสมาเนียร์ เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับตัวอย่างจาก Australian Museum Collection และทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอย แล้วทำการเพิ่มปริมาณ genomic DNA ที่ตำแหน่ง 16s และ ITS-2 rDNA และทำการหาลำดับเบสเพื่อนำมาวิเคราะห์ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนก *Austropeplea tomentosa* ออกจากกลุ่มอื่นๆได้ และจำแนก *A. lessoni* ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง คือ ออสเตรเลียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือและออสเตรเลียตะวันตก ส่วนแผนภูมิวิวัฒนาการของลำดับเบสนั้น พบว่า จำแนก *A. lessoni* ออกจากกลุ่มอื่นๆได้ และจำแนก *A. tomentosa* ออกเป็น 2 กลุ่ม คือออสเตรเลียตะวันออก ออสเตรเลียเหนือและตะวันตก และนิวซีแลนด์ อีกหนึ่งกลุ่มแยกกัน

Sengupta *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาเพื่อตรวจสอบวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของหอยฝาเดี่ยววงศ์ Viviparidae ในทะเลสาบของ Rift Valley ในประเทศแอฟริกา โดยตัวอย่างเป็นหอย 2 สกุล คือ Bellamta sp. จากทะเลสาบ Albert, Bangwuelu, Kariba, Kyoga, Malawi, Mweru และ Victoria และชนิด *Neothauma tanganyicense* จากทะเลสาบ Tanganyika โดยใช้

วิธีการ PCR และหา DNA sequence จากไมโตคอนเดรีย (COI และ 16s) และนิวเคลียส (H3, 18S และ 28S) เพื่อการจัดจำแนกร่วมกับวิธีสัณฐานภายนอก นำไปหาความสัมพันธ์กันโดยใช้ phylogenetic tree ได้ผลแบ่งเป็นกลุ่มทะเลสาบ 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ทะเลสาบ Victoria Kyoga Albert กลุ่มทะเลสาบ Malawi กลุ่มทะเลสาบ Mweru และ Bangwuelu พบว่า ความหลากหลายของลำดับเบส COI ของหอยชนิด *Bellamya* ภายในแม่น้ำในแอฟริกันค่อนข้างต่ำ (0-5.9เปอร์เซ็นต์) ในทะเลสาบ Malawi มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนของ *B. jeffreysi* และ *B. robertsoni* ระหว่างชนิดก็มีความหลากหลายค่อนข้างต่ำมากเช่นกัน (ระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ 5.9 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่าหอยชนิด *Bellamya* นั้นมีการแพร่กระจายในทวีปแอฟริกาเมื่อไม่นานมานี้ และมีการแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วตามทะเลสาบต่างๆ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ *Bellamya* และ *Neothauma* ของทวีปแอฟริกากับทวีปเอเชีย ก็ไม่ได้ออกมาเป็นกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายมาจากทวีปเอเชียมายังแอฟริกาเมื่อไม่นานในยุค Miocene ไม่ใช่เกิดจากการแยกตัวกันของอินเดียกับแอฟริกาในช่วงต้นยุคครีเทเชียสแต่อยากใด

Carreira *et al.* (2018) ทำการจำแนกหอยนมสาว *Patella candei* 952 ตัวอย่าง จาก 4 หมู่เกาะ Azores, Madeira, Selvagens และ Canaries โดยใช้ mtDNA COI ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Taq*I ละ *Ava*I พบว่าสามมารถแยกกลุ่มหอยนมสาวเป็น 3 กลุ่ม คือ (i) Azores, (ii) Madeira และ (iii) Canaries และ Selvagens ซึ่งเหมือนกันกับรายงานการวิเคราะห์แผนผังวิวัฒนาการที่ใช้ mtDNA COI sequence ในการศึกษาความหลากหลายของหอยนมสาว จึงสามารถนำเทคนิค PCR-RFLP ไปแยกกลุ่ม Patella อื่นๆ ได้อย่างรวดเร็ว โดยการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมและวิธีการที่คล้ายคลึงกันได้

Prasankok *et al.* (2011) ศึกษาความกลาหลายทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Mekongia* 4 ชนิด และหอยชนิด *Anulotaia mekongensis* ในประเทศไทย 14 แห่ง โดยใช้ความแตกต่างของ allozyme ที่ตรวจสอบโดยวิธี Horizantal starch gel electrophoresis มาเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ พบว่ามีเอนไซม์ 8 ชนิดในกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกัน เมื่อจัดทำเป็นแผนภูมิต้นไม้แบ่งกลุ่มหอยสกุล *Mekongia* 13 ตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่มย่อย โดยมีระยะทางพันธุกรรมสูง (0.000-0.449) ยกเว้น กลุ่มของ *M. swainsoni* ที่มีระยะทางพันธุกรรมในกลุ่มย่อย (0.000-0.023) แสดงว่า *M. swainsoni* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก และพบว่า *M. sphaericula* ถูกแยกออกเป็นคนละกลุ่ม โดย *M. sphaericula extensa* อยู่กลุ่ม 1A และ *M. sphaericula sphaericula* อยู่ในกลุ่ม 2 แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางตัวที่ใช้ในการจำแนกลักษณะย่อยเช่นเปลือก subglose ไม่สะท้อนถึงความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการที่แท้จริง แต่เกิดจากกระบวนการวิวัฒนาการที่ซับซ้อนเช่นการลู่เข้าหรือการขนาน

Kumar *et al*. (2017) ทำการประยุกต์ใช้ DNA barcoding ในการระบุชนิดของหอยเขา *Telescopium telescopium* โดยใช้ลำดับเบสของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยชีวภูมิศาสตร์จากการวิเคราะห์ Phytogeny พบว่า *Telescopium sp.* เป็นสายพันธุ์เดียวกันที่มีโหนดแพร่กระจายและพบว่าวิวัฒนาการของกลุ่มที่ 2 เกิดขึ้นจากกลุ่มที่ 1 นอกจากนี้ยังพบว่ามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลำดับ mt-COI อย่างมากในกลุ่มตัวอย่าง (0.005 - 0.184) สังเกตได้ว่าระหว่างประชากรในแถบชายฝั่งตะวันตกเฉียงใต้ของอินเดียและออสเตรเลียมีความแตกต่างกัน บ่งชี้ว่าการไหลของยีนในสองทวีปเป็นไปโดยจำกัด รายงานการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหอย *Telescopium sp.* มีอยู่ทั่วโลกและมีความแตกต่างกันระหว่างภูมิภาคในระดับพันธุกรรม สรุปได้ว่ายีน mt-COI นั้นสามารถใช้ในการระบุชนิดหอยเขา *T. telescopium* ได้

Lawton *et al*. (2018) ศึกษาความสำคัญทางการแพทย์ของหอยน้ำจืด *Physa acuta* ที่มีการรุกรานสูงในแอฟริกา ทำการระบุชนิดโดยวิธี DNA barcoding ใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) เพื่อวิเคราะห์ phylogenetic เก็บตัวอย่าง *P. acuta* จำนวน 30 ตัวอย่าง จากแองโกลา, บุรุนดี และแอฟริกาใต้ พบว่า Phylogenetic tree ที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ *P. acuta* กับประเทศอื่น ๆได้ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบส COI ของแต่ละตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า ไม่มีการกระจุกที่เป็นลักษณะเฉพาะทางภูมิศาสตร์ และตัวอย่างจากแอฟริกา ได้กระจายไปทั่วทั้ง 4 clades โดยไม่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งบ่งบอกถึงการบุกรุกอย่างอิสระ ในการวิเคราะห์ Haplotype ระบุว่ามี haplotypes จำนวนมากที่มีความผันแปรต่ำระหว่างตัวอย่างซึ่งนำไปสู่ความแตกต่างที่สำคัญในการวิเคราะห์ AMOVA ระหว่างประเทศ ซึ่งเป็นหลักฐานที่ว่ามีการบุกรุกซ้ำซ้อน ต่อเนื่องและเป็นอิสระของหอยน้ำจืดชนิด *P. acuta* ในแอฟริกา

Noikong (2014) ศึกษาการระบุชนิดเชิงโมเลกุล และการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของพยาธิกลุ่ม Echinostomes ในหอยขม *Filopaludina* spp. เพื่อระบุชนิดของเมตาเซอร์คาร์เรียของ echinostome ในหอยน้ำจืดในธรรมชาติด้วยเทคนิค high annealing temperature-random amplification of polymorphic DNA (HAT-RAPD), Internal Transcribed Spacer 2 region (ITS2) and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 1 (ND1) ยีน และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ HAT-RAPD, ITS2 และ ND1 ของเมตาเซอร์คาเรียของ echinostome ในจังหวัดลำพูน ขณะเดียวกันนี้ยังศึกษาระบาดวิทยาของเมตาเซอร์คาเรียของ echinostome ที่ติดเชื้อในหอยขม *Filopaludina* spp. ที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง และตรวจสอบจุลพยาธิ วิทยาของหอยขม *Filopaludina* sp. ที่ติดเชื้อเมตาเซอร์คาเรีย echinostome ด้วยวิธี Periodic Acid Schiff's (PAS), Alcian Blue, and Calcium Cobalt โดยพบพยาธิ 3 ชนิด คือ *Echinostoma revolutum, Echinostoma malayanum* และ

Euparyphium ตามพื้นที่ต่างๆ และพบว่าหอยขมมี 2 ชนิดคือ *Filopaludina dorliaris* และ *F. martensi martensi* เป็นเป็นโฮสต์กึ่งกลาง โดยมีความชุก (prevalence) และความหนาแน่น (intensity) ของการติดเชื้อในแต่ละฤดูมีความแตกต่างกัน โดยฤดูฝนมีความชุกสูงที่สุดเท่ากับ 46.01 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือฤดูร้อนมีค่าเท่ากับ 37.42เปอร์เซ็นต์ และต่ำที่สุดในฤดูหนาวมีค่าเท่ากับ 35.99เปอร์เซ็นต์ สำหรับความหนาแน่นในฤดูร้อน ฤดูฝนและฤดูหนาว มีค่าเท่ากับ 26.49, 20.63 และ 14.89 ตามลำดับ

Hu *et al.* (2014) ศึกษาความหลาหลายทางพันธุกรรมของหอยโข่งเทศ *Pomacea canaliculata* ในประเทศจีนตอนใต้โดยใช้ลำดับเบสของไมโตคอนเดรีย 16S และ rDNA โดยทำการเก็บประชากรหอย 19 กลุ่มตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากกล้ามเนื้อเท้า และตับ เพิ่มปริมาณ Genomic DNA โดยใช้วิธี multiplex PCR แล้วนำไปหาลำดับเบส ยืนยันได้ว่าทั้ง 19 กลุ่มตัวอย่างนั้นเป็น *P. canaliculata* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่บ่งชี้ว่า *P. canaliculata* มีการแพร่กระจายไปยังจังหวัด Sichuan ในประเทศจีน และมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมหลายอย่าง

จากงานวิจัยที่ที่ผู้วิจัยได้ทำการสืบค้น จะเห็นได้ว่า เทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequence สามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มของหอยชนิดต่างๆได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกนำทั้ง 2 เทคนิคนี้ มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยขมในแถบจังหวัดลุ่มแม่น้ำโขงของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย

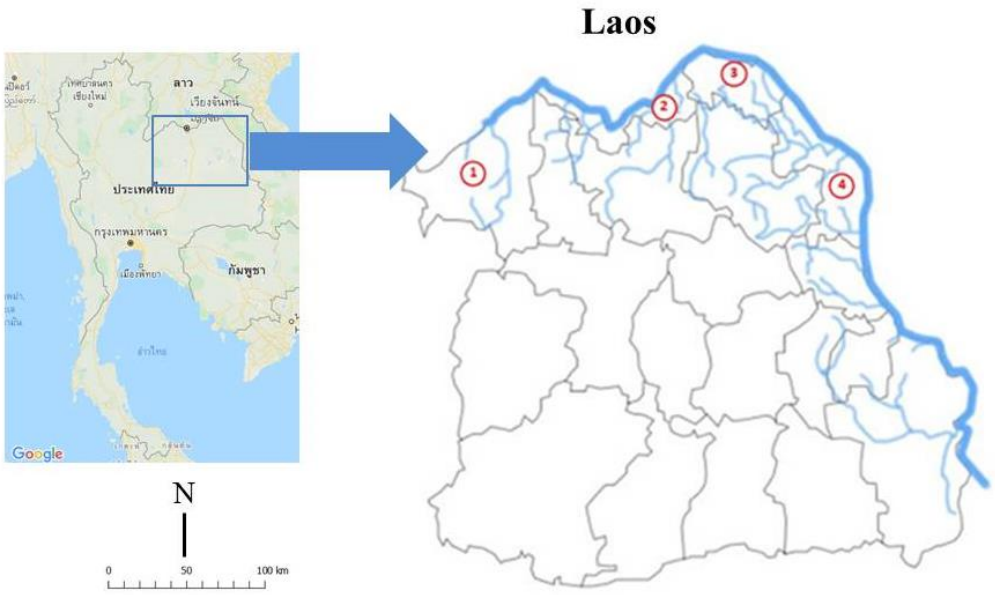
พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างหอยขม

3.1.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างประชากรหอยของหอยขมสกุล *Filopaludina* จากแหล่งน้ำธรรมชาติตาม 4 จังหวัดลุ่มน้ำโขง ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเลย, หนองคาย, บึงกาฬ และนครพนม จำนวน 28 จุด โดยกำหนดจุดระยะห่าง 25-50 กิโลเมตร (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง (1) เลย (2) หนองคาย (3) บึงกาฬ (4) นครพนม

3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างหอยจากแหล่งธรรมชาติโดยใช้สวิง ใส่ในถุงพลาสติกแล้วบันทึกวัน เดือน ปี ชื่อพื้นที่ พิกัด GPS และลักษณะของแหล่งน้ำที่เก็บ ทำการสลบหอยโดยใช้แช่ในน้ำมันกานพลู 55 มิลลิกรัม ผสมในน้ำ 500 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ (Wongtavatchai, 2006) นำตัวอย่างหอยมาทำความสะอาด ระบุรหัสและตัดเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเท้าของหอยแยกใส่หลอด eppendorf แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ส่วนเปลือกและฝาปิดเปลือก ทำความสะอาด

ด้วยน้ำประปาและขัดคราบสกปรกออกหลายๆรอบ ผึ่งให้แห้ง เก็บไว้เพื่อถ่ายภาพและวัดขนาด สำหรับใช้ในการวิเคราะห์มอร์โฟเมตริก ขั้นตอนการดำเนินการดังกล่าวข้างต้นนั้น ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (คกส. มมส) ใบรับรองเลขที่ 006/2562

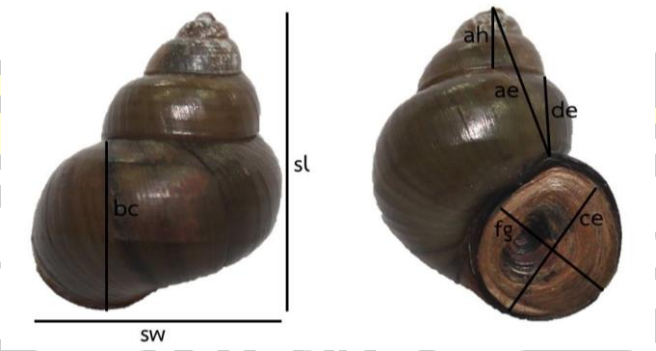
3.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และการวิเคราะห์มอร์โฟเมตริก

3.2.1 การศึกษาลักษณะภายนอก

จัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยขมตามวิธีของ (Brandt, 1974) (อรนภา นาคจินดา, 2551) (วัฒนา ดำรงโรจน์ และคณะ, 2544)โดยศึกษาลักษณะของเปลือก ขนาด ความสูง รูปร่าง ลักษณะผิวเปลือก สีของเปลือก ลายแถบบนเปลือก สันบนเปลือก ลักษณะฝาปิดเปลือกโดยสังเกต ความหนา องค์ประกอบของชั้น ลักษณะผิว และสีของฝาปิดเปลือก

3.2.2 การวิเคราะห์มอร์โฟเมตริก

นำตัวอย่างเปลือกหอยมาวัดขนาดด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ได้แก่ ความยาวเปลือก (sl) ความกว้างเปลือก (sw) ความสูงของวงสุดท้าย (bc) ความสูงจากยอดถึงช่องเปิดเปลือก (ae) ความสูงของวงเกลียว (ah) ความยาวช่องเปิดเปลือก (ce) ความกว้างช่องเปิดเปลือก (fg) ความยาวจากเซอเจอร์สุดท้ายถึงปากเปลือกบน (de) ตามวิธีของ (วัฒนา ดำรงโรจน์ และคณะ, 2544) (ภาพประกอบ 4) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Discriminant Analysis เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างปีชีส์หรือสปีชีส์ย่อย และหาลักษณะที่สามารถใช้ในการจำแนกหอยขม *Filopaludina* ได้ดีที่สุด โดยมีสมการการจำแนก ดังนี้ D = ค่าคงที่ + sw + bc + ae + fg



ภาพประกอบ 4 การวัดขนาดส่วนต่างๆของเปลือกหอยขม โดยกำหนด shell length (sl), shell width (sw), last whorl hight (bc), apex to aperture height (ae), spire height (ah), aperture length (ce), aperture width (fg), length from last surture to upper lip (de).

3.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequencing

3.3.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของหอย

วิธีที่ 1 นำเนื้อเยื่อส่วนเท้าที่ติดกับฝาปิดเปลือกมาแยกสกัด genomic DNA โดยวิธี CTAB Phenol Chloroform Proteinase K method ตามวิธีของ บังอร แถวโนนงิ้ว และคณะ (2548) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยประมาณ 1 cm^3 นำมาบดให้ละเอียดใส่ในหลอด centrifuge tube ที่มี Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) ปริมาตร 500 µl แล้วเติม Proteinase K (10 mg/ml) 7 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubated ที่ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยทำการกลับหลอดทุก 5 นาที จากนั้นนำมาเติม Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol (25:24:1) ปริมาตร 300 µl กลับหลอดให้สารเข้ากันแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที) จากนั้นทำการดูดของเหลวที่อยู่ขั้นบนไปใส่ในหลอด centrifuge tube ใหม่ แล้วเติม Chloroform : Isomyl Alcohol (24:1) ปริมาตร 300 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที) ดูดเอาของเหลวที่อยู่ขั้นบนไปใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยการเติม Absolute ethanol (เย็นจัด) 2 เท่าของปริมาณรวมของของเหลว ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที) เก็บไว้ที่ -20 °C 6-8 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดที่มีดีเอ็นเอตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที) เทส่วนบนที่เป็น Absolute alcohol ทิ้ง แล้วเติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol (เย็น) 200 µl ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที) เทส่วนบนทิ้งแล้วปล่อยให้แห้ง (air dry) ประมาณ 20 นาที จากนั้นทำการละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 100 µl (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 และ 1 mM EDTA) แล้วนำ DNA solution ไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 30 นาทีเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธี electrophoresis

วิธีที่ 2 ทำการแยกสกัด genomic DNA โดยชุด Kit GF-1 Tissue DNA Extraction ตาม User Guide version 4.1 ของ Viviantis ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ตัดเนื้อเยื่อหอย 20 ml นำมาบดให้ละเอียด ใส่ในหลอด centrifuge tube เติม Buffer TL 250 µl จากนั้นเติม Proteinase K. 20 µl ผสมให้เข้ากันโดย pulsed-vortexing จากนั้นเติม Lysis Enhancer 12 µl แล้วบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาเติม Buffer TB 400 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำออกมาเติม Absolute alcohol 200 µl ผสมทันที จากนั้นโหลดลงหลอดคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที) เทส่วนล่างที่ออกมาทิ้ง ทำการล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer 500 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที) ทำซ้ำ 2 รอบ ทิ้งคอลัมน์ให้แห้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอด

centrifuge tube ใหม่ แล้วเติม Elution Buffer 100 µl ทิ้งให้ไหลเอง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที) เมื่อเสร็จเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 ℃

3.3.2 ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาตรวจคุณภาพโดยวิธี gel electrophoresis โดยการนำดีเอ็นเอตัวอย่างจำนวน 5 µl มาแยกบน 1% agarose gel ซึ่งเตรียมโดยเติม agarose gel 0.4 mg ลงใน 0.5x TBE buffer 40 ml ในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมไว้ ปล่อยให้แพร่ เติม gel stain 1 µl แล้วอุ่นในไมโครเวฟ 2 นาที 2 รอบ รอให้อุ่นแล้วเทลงบล็อกเจล เสียบหวี แล้วทิ้งให้แข็ง 30 นาที ทำการผสม DNA solution 5 µl ผสมกับ loading dye 2 µl แล้วหยอดลงในช่องเจลที่เตรียมไว้ ปิดฝาและปล่อยกระแสไฟฟ้า 100 v ประมาณ 35 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปตรวจสอบภายใต้แสง UV

3.3.3 การเพิ่มปริมาณ genomic DNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ ได้แก่

LSU-2-3 [F] = 5′ CTA GCT GCG AGA ATT AAT GTG A 3′

LSU-2-3 [R] = 5′ ACT TTC CCT CAC GGT ACT TG 3′

LSU-2-4 [F] = 5 ′GGG TTG TTT GGG AAT GCA GC 3′

LSU-2-4 [R] = 5 ′GTT AGA CTC CTT GGT CCG TG 3′

16S rDNA [F] = 5 ′CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3′

16S rDNA [R] = 5 ′CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T 3′

18S rDNA [F] = 5 ′TGG ATC CCG GGC AAG CTC TGG TGC C 3′

18S rDNA [R] = 5 ′TGA AGT CAA GGG CAT CAC AGA CC 3′

28S rDNA [F] = 5 ′GAG AGT TCA AGA GTA CGT G 3′

28S rDNA [R] = 5 ′TGT TAG ACT CCT TGG TCC GTG T 3′

COI [F] = 5′ TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3′

COI [R] = 5′ TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3′

นำดีเอ็นเอของหอยที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ primer COI (F) และ primer COI (R) โดยใช้ PCR condition ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 25 µl และ 50 µl ประกอบด้วย dH_2O, 1X buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.06 mM dNTP, 0.5 µM primer (F) และ primer (R), 1U/µl *Taq* DNA polymerase, และ DNA sample (50ng/µl) ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยมี PCR profile คือ ขั้น initial denaturation ที่ 94 ℃ นาน 3 นาที ตามด้วย 10 รอบของขั้น denaturation ที่ 94 ℃ นาน 40 วินาที ขั้น annealing ที่ 50 ℃ นาน 45 วินาที และ 35 รอบของ

ขั้น extention 72 °C นาน 1 นาที และ final extention ที่ 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นนำไปทำการตรวจสอบขนาดโดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.3.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยโดยเทคนิค PCR-RFLP

นำ PCR product มาคัดเลือกหาเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 13 ชนิด ได้แก่ *Alu* I, *Hinf* I, *Pvu* II, *Bgl* I, *Dde* I (ใช้ buffer D), *Hae*I II ,*Hha* I (ใช้ buffer C), *Ssp* I, Taq I,*Hind* III, (ใช้ buffer E), *EcoR* I, *Pst* I (ใช้ buffer H) และ *Sma* I (ใช้ buffer J) โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาดังนี้ ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5.2 µl, 10X buffer ปริมาตร 1.5 µl, 10X BSA ปริมาตร 0.5 µl, 40 mM spermidine ปริมาตร 1.5 µl, (10U/ µl) restriction enzyme ปริมาตร 0.3 µl เขย่าให้เข้ากันเติม PCR product 6 µl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ยกเว้น *Taq* I บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผลการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธี agrose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาพ 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้า 80 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นตรวจสอบผลใต้แสง UV ด้วย UV transiluminator

3.3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยขมโดยตรวจหาลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 50 มิลลิลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ COI (F) = 5′-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3′ และ COI (R) = 5′ - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3′ เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน cytochrome oxidase subunit I (COI) โดยบริษัท Apical Scientific Sdn Bhd จำนวน 22 ตัวอย่าง

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.1 PCR-RFlP

เปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหอยขมโดยเทคนิค PCR-RFLP โดยอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล และบันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” แทนการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” แทนการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น แล้วนำรูปแบบโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ด้วยวิธี UPGMA โปรแกรม NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, pc Version 2.10p) เพื่อสร้างเป็น Phylogenetic tree

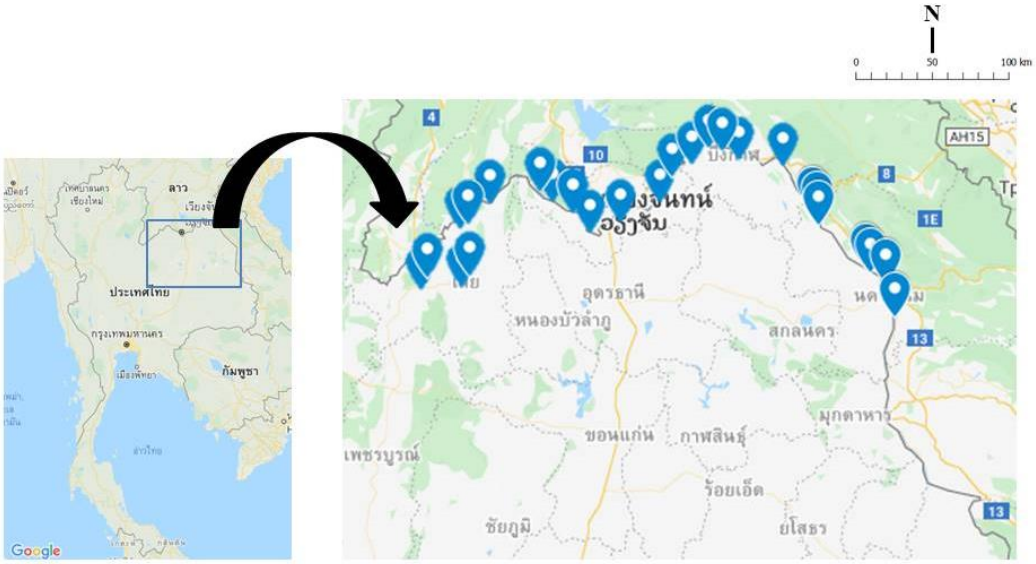
3.4.2 DNA Sequence

เปรียบเทียบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหอยขมโดยเทคนิค DNA sequencing โดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสจากฐานข้อมูล Genbank วิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมและความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร Kimura-2-Parameter (K2P) โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis เวอร์ชั่น 10 (MEGA-X) (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) สร้างแผนผังความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยวิธี Neihbor-Joining (NJ)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างหอยขม *Filopaludina*

จากการเก็บตัวอย่างหอยขม *Filopaludina* จากแหล่งน้ำธรรมชาติในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทย 4 จังหวัด ได้แก่ เลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม พบตัวอย่างทั้งหมด 262 ตัวอย่างในพื้นที่ละติจูดที่ 17-18 และลองติจูดที่ 101-104 พบอย่างจากแต่ละพื้นที่ดังแผนที่ (ภาพประกอบ 5) และจำนวนตัวอย่างหอยแต่ละชนิด (ตารางที่ 1)



ภาพประกอบ 5 จุดเก็บตัวอย่าง

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและจำนวนตัวอย่าง

อักษรย่อ	Co-ordinates	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จังหวัด	N	Sample name
Filopaludina martensi martensi (Frauenfeld, 1865)					
SF	16°15'1.6236 "N 103°14' 54.6972 "E	ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย	มหาสารคาม	2	SF5,6
BBP1	17°58' 0.2028 "N 104°12' 12.1896 "E	ต.บ้านแพง อ.บ้านแพง	นครพนม	10	BBP11-10
BBP2	17°55' 57.9216"N 104°14' 10.1472"E	ต.บ้านแพง อ.บ้านแพง	นครพนม	10	BBP22-10
TTP	17°34'34.0284"N 104°35'27.3372"E	ต.ท่าอุเทน อ.ท่าอุเทน	นครพนม	10	TTP1-10
NTP	17°32'53.916"N 104°37'5.5992"E	ต.โนนตาล อ.ท่าอุเทน	นครพนม	10	NTP1-10
AMP	17°28'22.4112"N 104°43'43.2264"E	ต.อาจสามารถ อ.เมือง	นครพนม	10	AMP1-7
KMP	17°14'38.1552"N 104°47'37.8384"E	ต.ขามเฒ่า อ.เมือง	นครพนม	10	KMP1-10
PBP	17°52'14.8556"N 104°15'5.2632"E	ต.โพนทอง อ.บ้านแพง	นครพนม	3	PBP1-3
PPL	18°1'49.962"N 101°51'44.9064"E	ต.ปากชม อ.ปากชม	เลย	6	PPL1-6
CCL1	17°52'5.0016"N 101°39'23.5512"E	ต.เชียงคาน อ.เชียงคาน	เลย	10	CCL12,5,10
SML	17°28'44.1912"N 101°40'11.4276"E	ต.เสี้ยว อ.เมืองเลย	เลย	10	SML1-10
	17°32'21.6564"N 101°25'48"E	ต.ท่าลี่ อ.ท่าลี่	เลย	10	TTL1-10
MML	17°32'42.702"N 101°43'32.6208"E	ต.ในเมือง อ.เมืองเลย	เลย	10	MML1-10
CCL2	17°53'47.6808"N 101°42'30.4344"E	ต.เชียงคาน อ.เชียงคาน	เลย	10	CCL21-10
NL	18°7'5.4948"N 102°12'56.9556"E	ห้วยน้ำไพรน้อย	เลย	10	NL1-10
PSRN	17°57'56.7864"N	ต.พระพุทธบาท อ.ศรี	หนองคาย	10	PSRN8-10

อักษรย่อ	Co-ordinates	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จังหวัด	N	Sample name
HMN	102°26'36.0096"E 17°55'4.7064"N 102°48'12.8556"E	เชียงใหม่ ต.หาดคำ อ.เมือง หนองคาย	หนองคาย	10	HMN1-10
JPN	18°2'57.3684"N 103°5'6.1404"E	ต.จุมพล อ.โพนพิสัย	หนองคาย	10	JPN1-10
RRN	18°13'44.7672"N 103°10'30.792"E	ต.รัตนวาปี อ.รัตนวาปี	หนองคาย		RRN1,2,5-7
PPB	18°18'51.0408"N 103°18'40.2768"E	ต.ปากคาด อ.ปากคาด	บึงกาฬ	10	PPB1-10
HHB	18°25'55.416"N 103°26'12.9804"E	ต.หอคำ อ.เมืองบึงกาฬ	บึงกาฬ	10	HHB1-10
NAB	18°20'55.194"N 103°39'40.8348"E	ต.บึงกาฬ อ.เมืองบึงกาฬ	บึงกาฬ	10	NAB1-10
NBB	18°18'9.1692"N 103°58'34.176"E	ต.หนองเดิ่น อ.บุ่งคล้า	บึงกาฬ	10	NBB1-10
Filopaludina martensi cambodjensis (Mabille & Le Mesle, 1866)					
SF	-	บ้านนาแง	มหาสารคาม		SF3,4
CCL1	17°52'5.0016"N 101°39'23.5512"E	ต.เชียงคาน อ.เชียงคาน	เลย		CCL12,5,10
CCL2	17°53'47.6808"N 101°42'30.4344"E	ต.เชียงคาน อ.เชียงคาน	เลย	10	CCL21-10
RRN	18°13'44.7672"N 103°10'30.792"E	ต.รัตนวาปี อ.รัตนวาปี	หนองคาย		RRN 3,4,8-10
BBP2	17°55' 57.9216"N 104°14' 10.1472"E	ต.บ้านแพง อ.บ้านแพง	นครพนม	10	BBNP21
AMP	17°28'22.4112"N 104°43'43.2264"E	ต.อาจสามารถ อ.เมือง	นครพนม		AMP 3,8,10
KMB	18°24'35.0388"N 103°31'56.7336"E	บ้านคำหมื่น อ.เมืองบึงกาฬ	บึงกาฬ	6	KMB1-6
CAB	18°16'18.9156 "N 103°50'11.7744 "E	ต.ชัยพร อ.เมืองบึงกาฬ	บึงกาฬ	10	CAB1-10
Filopaludina sumatrensis polygramma (Martens, 1860)					
NPL	17°27'28.1016"N	ต.หนองบัว อ.ภูเรือ	เลย	8	NPL1-8

อักษรย่อ	Co-ordinates	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จังหวัด	N	Sample name
PSRN	101°22'48.9972"E 18°2'46.1616"N 102°18' 23.5656"E	ต.ผาตั้ง อ.สังคม	หนองคาย	7	PSN1-7
NTN	17°50'31.3332"N 102°35'4.2864"E	ต.น้ำโมง อ.ท่าบ่อ	หนองคาย	10	NTN1-10

4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยขมสกุล *Filopaludina*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยขมจาก 28 พื้นที่ โดยใช้ลักษณะของเปลือก ขนาด ความสูง รูปร่าง ลักษณะผิวเปลือก สีของเปลือก ลายแถบบนเปลือก สันบนเปลือก ลักษณะฝาปิดเปลือก โดยสังเกตความหนา องค์ประกอบของชั้น ลักษณะผิว และสี พบหอยขม 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย ได้แก่ *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* ซึ่งลักษณะภายนอกที่ศึกษานั้นมีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก (ภาพประกอบ 6)

หอย *F. martensi martensi* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดคือ 198 ตัวอย่างจากจังหวัดเลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม มีชื่อเรียกท้องถิ่นที่แตกต่างกัน ได้แก หอยขม หอยขี้ขม หอยจุ๊บ หอยจูบ และหอยดูด เป็นต้น ลักษณะทั่วไปคือมีเปลือกขนาดใหญ่ ทรงกรวยกลม มีแถบสีน้ำตาลปรากฏบนวงอื่นๆ เหนือวงสุดท้ายอย่างน้อย 4 แถบแต่เห็นไม่ชัดเจน ที่วงสุดท้ายมีสัน (spiral ridge) ยื่นออกมาเห็นเด่นชัดโดยจะวนรอบเปลือกขนานไปกับร่อง โดยลักษณะการมีสันเป็นลักษณะเด่นที่ใช้แยกหอย *F. martensi martensi* ออกจากชนิดอื่นๆได้ชัดเจนที่สุด (ภาพประกอบ 7)

หอย *F. martensi cambodjensis* เป็นชนิดที่พบมากรองลงมา จำนวน 39 ตัวอย่างจากจังหวัดเลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม มีชื่อท้องถิ่น ได้แก่ หอยขม หอยขี้ขม หอยจุ๊บ หอยจุ๊บแจง หอยจูบ และหอยดูด เป็นต้น ลักษณะทั่วไปคือมี เปลือกขนาดใหญ่ หนา ทรงกรวยกลม วงมีลักษณะมนกลม ยอดยกสูงขึ้น ลักษณะทั่วไปคล้าย *F. martensi martensi* แต่ไม่มีสัน (spiral ridge) บนวงสุดท้าย (ภาพประกอบ 8)

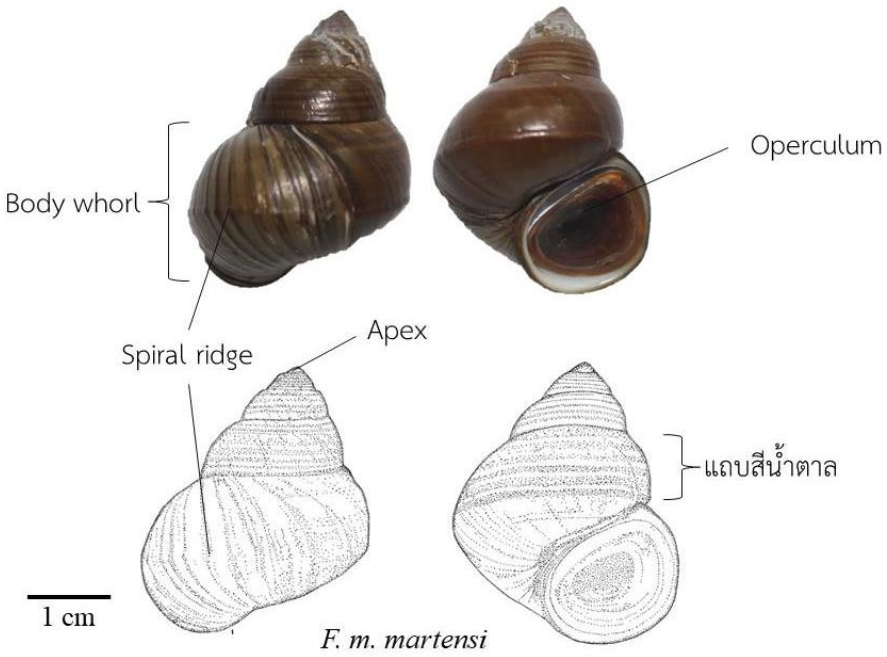
หอย *F. sumatrensis polygramma* เป็นชนิดที่พบมากรองลงมา จำนวน 25 ตัวอย่างจากจังหวัดเลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม มีชื่อท้องถิ่นที่แตกต่างกัน ได้แก หอยขม หอยขมลาย หอยจูบ หอยทราย และหอยลาย เป็นต้น ลักษณะทั่วไปคือเปลือกขนาดกลาง ทรงกรวยรูปไข่ หนา ปานกลาง ยอดเปลือกยกสูง แต่ละวงค่อนข้างโค้ง มีร่องระหว่างวงลึก ผิวเปลือกเรียบเป็นมัน สีเขียวเหลือง มีแถบสีวนรอบเปลือกเป็นสีเขียวเข้มหรือสีน้ำตาล แถบสีจะปรากฏอย่างน้อย 4 แถบในวง

อื่นๆ ส่วนในวงสุดท้ายจะพบแถบสี เพิ่มอีก 2-3 แถบจากบริเวณครึ่งของวงจนถึงส่วนฐานของวงสุดท้าย ขอบปากเปลือกบางและคม แผ่นเปิดช่องเปลือกแบน ค่อนข้างบางใสสีน้ำตาลแดง (ภาพประกอบ 9)

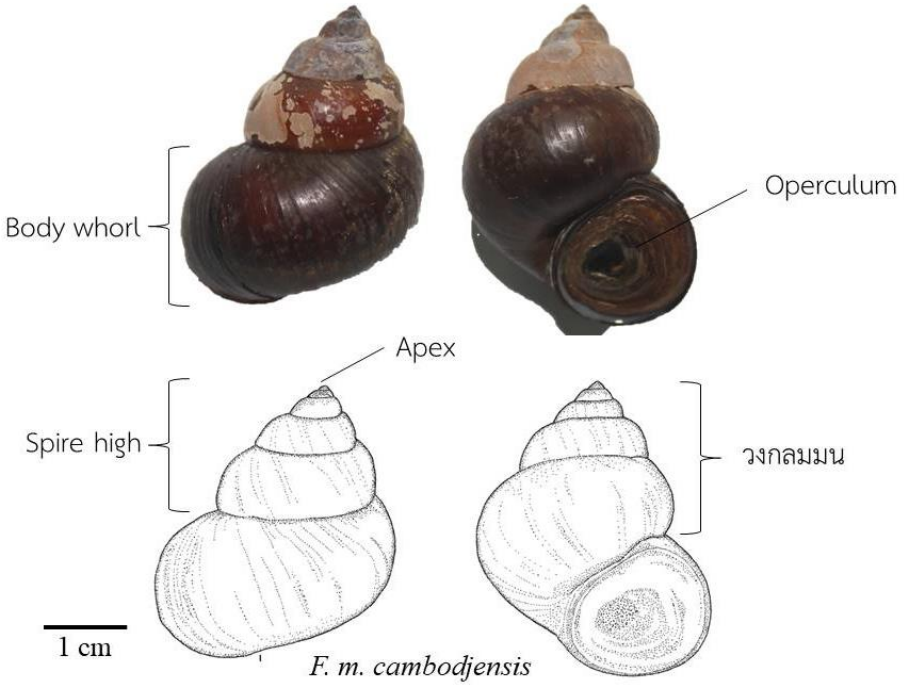
ในการศึกษาครั้งนี้มีการเก็บตัวอย่างหอยเพื่อเปรียบเทียบ (out group) คือหอยเกลียว *Trochotaia trochoides* (Martens, 1860) มี รูปร่างเป็นทรงพีรามิด ผิวเรียบ จุดยอดจนถึงวงถัดจากวงแรกมีสีม่วง วงที่เหลือด้านล่างมีสีเขียวเหลือง และปรากฏบริเวณที่เป็นสีน้ำตาลขนาดร่องระหว่างวง วงมีลักษณะเกือบแบน วงสุดท้ายมีสันคม (keel) โดยรอบบริเวณกลางวง ช่องเปิดเปลือกกว้าง แผ่นปิดช่องเปลือกมีสีน้ำตาล ด้านในเป็นมัน มีลายเป็นแบบคอนเซนทริก (concentric) (Brandt, 1974) (อรนภา นาคจินดา, 2551)

ภาพประกอบ 6 ชนิดของหอยขมที่พบ

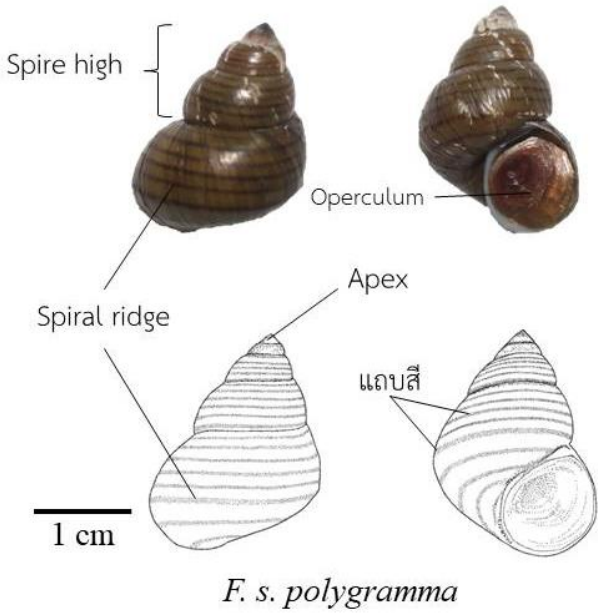
พหุน ปณฺฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 7 สัณฐานวิทยาของหอยขม *F. martensi martensi*



ภาพประกอบ 8 สัณฐานวิทยาของหอยขม *F. martensi cambodjensis*



ภาพประกอบ 9 สัณฐานวิทยาของหอยขม *F. sumatrensis polygramma*

4.3 การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา (Morphometric Analysis)

จากการวัดขนาดส่วนต่างๆของหอยขมได้แก่ ความยาวเปลือก (sl), ความกว้างเปลือก (sw), ความสูงของวงสุดท้าย (bc), ความยาวจากยอดถึงช่องเปิดเปลือก (ae), ความสูงของวงเกลียว (ah), ความยาวช่องเปิดเปลือก (ce) ความกว้างช่องเปิดเปลือก (fg), ความยาวจากเซอเจอร์สุดท้ายถึงปากเปลือกบน (de) ผลการวิเคราะห์ Discriminant Analysis กำหนดตัวแปรตามคือ ชนิด (species) ของหอยขม และตัวแปรอิสระคือ ค่าเฉลี่ยความยาวของส่วนต่างๆของหอยขม (ตารางที่ 2)

โดยลักษณะความกว้างเปลือก (sw) และความกว้างช่องเปิดเปลือก (fg) มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกได้สูงมีค่าอยู่ที่ 7.536 และ 0.938 ส่วนลักษณะที่มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกต่ำที่สุดคือ ความสูงของวงสุดท้าย (bc) ซึ่งมีค่าอยู่ที่ – 2.315

พบว่าหอยขมชนิด *F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* มีการกระจายและแยกกลุ่มต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนหอยขมชนิด *F. martensi martensi* มีความกระจายสูงมาก และยังพบว่าหอยขมชนิด *F. martensi cambodjensis* มีการกระจายอยู่ภายในกลุ่มของ *F. martensi martensi* แสดงถึงความใกล้ชิดกันเป็นอย่างมาก (ภาพประกอบ 10) โดยมีสมการการจำแนก ดังนี้ D = ค่าคงที่ + sw + bc + ae + fg

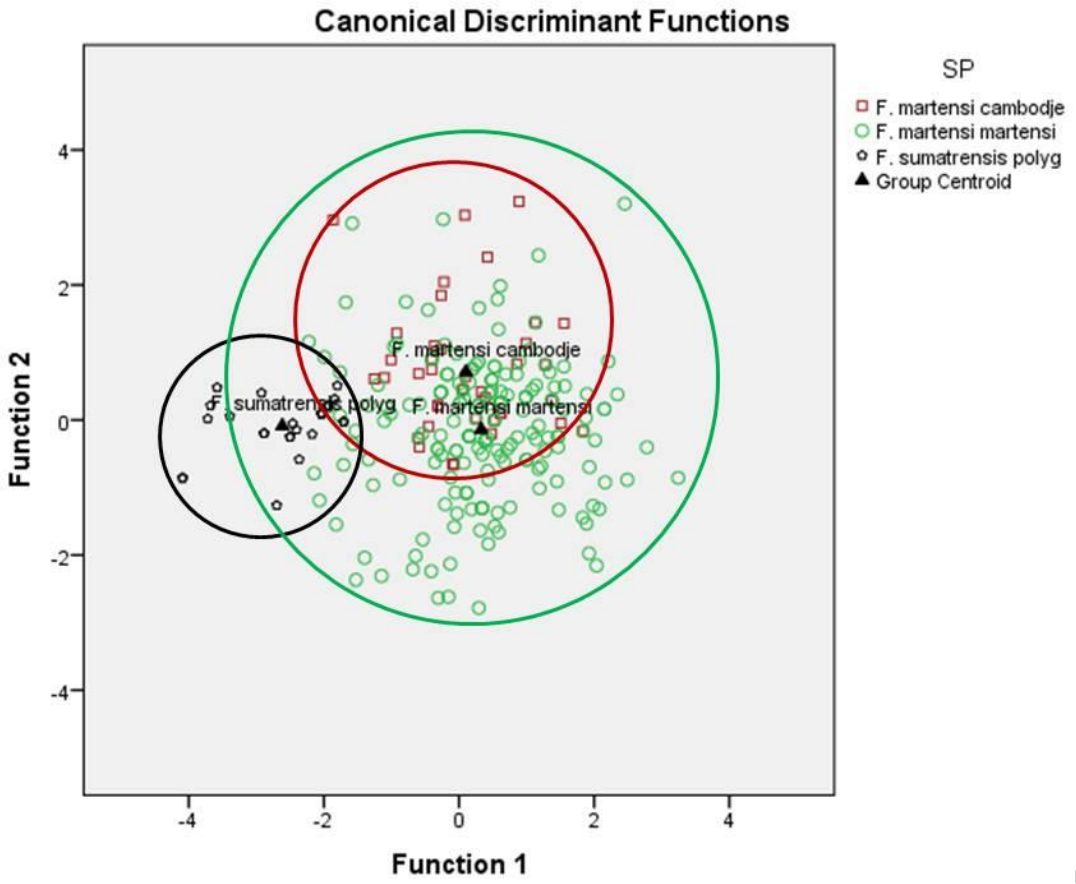
ฟังก์ชัน 1 D = -7.924 + 7.536 - 2.315 + 0.938 + 0.411

ฟังก์ชัน 2 D = -0.560 + 0.274 + 2.264 - 5.320 + 1.981

ตารางที่ 2 ผลค่าเฉลี่ยการวัดขนาดของส่วนต่างๆของหอยขมโดยกำหนด shell length (sl), shell width (sw), last whorl hight (bc), apex to aperture height (ae), spire height (ah), aperture length (ce), aperture width (fg), length from last suture to upper lip (de).

อักษรย่อ	N	ตัวที่	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
SN	8	1,2	*Trochotaia trochoides*								
		7, 8	*Pila sp.*								
		3,4	*F. martensi cambodjensis*	3.05	2.35	1.50	1.80	1.00	1.70	1.30	0.85
		5,6	*F. martensi martensi*	2.55	2.15	1.35	1.70	0.95	1.55	1.40	0.70
KMB	6		*F. martensi cambodjensis*	3.35	2.60	1.58	2.02	1.12	1.83	1.47	1.02
BBNP1	10		*F. martensi martensi*	3.29	2.52	1.94	1.95	1.01	1.83	1.48	0.94
BBNP2	10	1	*F. martensi cambodjensis*	3.50	2.50	1.70	2.20	1.20	1.70	1.30	1.00
		2-10	*F. martensi martensi*	2.22	1.54	1.08	1.31	0.73	1.12	0.99	0.61
TTNP	10		*F. martensi martensi*	2.78	2.28	1.66	1.57	0.86	1.52	1.25	0.80
NTNP	10		*F. martensi martensi*	2.55	1.97	1.50	1.40	0.79	1.53	1.24	0.73
AMNP	10	1,2,4-7,9	*F. martensi martensi*	2.57	2.10	1.47	1.53	0.82	1.48	1.20	0.78
		3,8,10	*F. martensi cambodjensis*	2.65	2.18	1.38	1.55	0.83	1.475	1.25	0.78
KMNP	10		*F. martensi martensi*	3.43	2.55	1.72	1.92	1.09	1.86	1.48	0.93
PBNP	3		*F. martensi martensi*	2.87	2.20	1.37	1.60	0.93	1.60	1.27	0.77
PSN	6		*F. martensi martensi*	2.90	2.23	1.50	1.77	1.00	1.65	1.35	0.83
PPL	6		*F. martensi martensi*	3.23	2.33	1.58	1.90	1.15	1.73	1.38	0.90
CCL1	3	2,5,10	*F. martensi cambodjensis*	3.43	2.60	1.53	2.10	1.17	1.83	1.43	0.90
	7	1,3,4,6-9	*F. martensi martensi*	3.11	2.37	1.54	1.89	1.03	1.68	1.30	0.86
SML	10		*F. martensi martensi*	2.37	1.90	1.28	1.44	0.75	1.43	1.11	0.70
NPL	8		*F. sumatrensis polygramma*	1.70	1.30	0.93	1.03	0.55	0.94	0.73	0.48
TTL	10		*F. martensi martensi*	3.20	2.45	1.58	1.93	1.07	1.72	1.42	0.81
MML	10		*F. martensi martensi*	3.20	2.47	1.72	1.87	1.02	1.75	1.42	0.89
CCL2	10		*F. martensi cambodjensis*	3.03	2.30	1.55	1.74	1.01	1.68	1.32	0.79
NL	10		*F. martensi martensi*	2.80	2.10	1.40	1.59	0.88	1.45	1.22	0.83
PSRN	7	1-3,5-9	*F. sumatrensis polygramma*	2.23	1.57	1.10	1.34	0.73	1.20	0.93	0.66
	3	4,9,10	*F. martensi martensi*	2.43	1.97	1.40	1.53	0.93	1.43	1.13	0.70
NTN	10		*F. sumatrensis polygramma*	2.29	1.60	1.12	1.40	0.75	1.20	0.97	0.67
HMN	10		*F. martensi martensi*	2.48	1.69	1.54	1.57	0.84	1.42	1.17	0.80
JPN	10		*F. martensi cambodjensis*	3.44	2.54	1.61	2.00	1.10	1.69	1.43	0.96
RRN		1,2,5-7	*F. martensi martensi*	3.04	2.40	1.50	1.84	0.92	1.78	1.48	0.86
	10	3,4,8-	*F. martensi cambodjensis*	2.86	2.10	1.30	1.72	0.94	1.56	1.24	0.82

อักษรย่อ	N	ตัวที่	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
		10									
PPB	10		*F. martensi martensi*	2.69	2.02	1.66	1.59	0.90	1.45	1.23	0.87
HHB	10		*F. martensi cambodjensis*	2.51	2.01	1.23	1.45	0.78	1.42	1.18	0.69
NAB	10		*F. martensi martensi*	3.31	2.57	1.74	1.88	1.04	1.81	1.46	0.92
NBB	10		*F. martensi martensi*	3.30	2.52	1.66	2.00	1.19	1.80	1.45	0.90
CAB			*F. martensi cambodjensis*	2.47	2.08	1.25	1.64	0.89	1.46	1.22	0.73



ภาพประกอบ 10 กราฟความสัมพันธุ์ของมอโฟเมตริกและชนิดพันธุ์ โดย แกน x = ฟังก์ชัน 1 และ แกน y = ฟังก์ชัน 2

4.4 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

4.4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

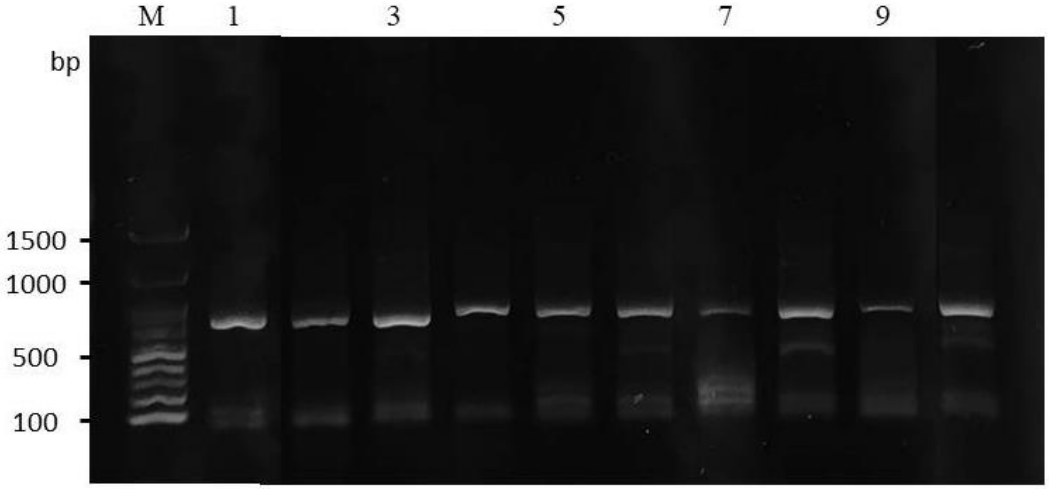
ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก 2 วิธี คือ วิธี CTAB-Phenol: Chloroform Proteinase K method และ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Kit GF-1 TISSUE DNA EXTRACTION

4.4.2 การเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม พบว่าตำแหน่งยีน COI เป็นไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ genomic DNA ได้ดีที่สุด โดยมีลำดับเบส คือ COI (F) = 5′-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3′ และ COI (R) = 5′ - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3′ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่อง Thermo-cycle

4.4.3 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพ PCR product โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใน 0.5x TBE buffer ที่ย้อมเจลด้วย gel stain จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ปล่อยผ่านเป็นเวลา 35 นาที แล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสง UV พบว่า PCR product ของหอยทั้งหมดมีขนาด 710 bp (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Lane M = 1000 bp DNA marker

Lane 1 = TTP1 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.นครพนม

Lane 2 = SML4 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.เลย

Lane 3 = NTN1 ชนิด F. sumatrensis speciosa จาก จ.หนองคาย

Lane 4 = RRN2 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.หนองคาย

Lane 5 = HHB1 ชนิด F. martensi cambodjensis จาก จ.บึงกาฬ

Lane 6 = KMB4 ชนิด F. martensi cambodjensis จาก จ.บึงกาฬ

Lane 7 = BBP14 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.นครพนม

Lane 8 = SML2 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.เลย

Lane 9 = KMP1 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.นครพนม

Lane 10 = JPL1 ชนิด F. martensi cambodjensis จาก จ.เลย

Lane 11 = AMP1 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.นครพนม

Lane 12 = PPL1 ชนิด F. martensi martensi จาก จ.เลย

4.4.4 การตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค PCR-RFLP

จากการนำโมเลกุลดีเอ็นเอของหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย คือ ได้แก่ *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ COI [F] และ COI [R] พบว่า PCR product ของหอยทั้งหมดมีขนาด 710 bp ทำการคัดเลือกและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม โดยเลือกวิเคราะห์ผลจากเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Dde* I และ *Taq* I

Dde I สามารถตัดโมเลกุลดีเอ็นเอขนาด 710 bp ได้ single haplotypes (restriction patterns) ได้ 5 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (250 และ 140 bp) รูปแบบ B (410 และ 300 bp) รูปแบบ C (300 250 และ 110 bp) รูปแบบ D (410 และ 250 bp) และรูปแบบ E (410 140 และ 110 bp) (ตารางที่ 3)

Taq I สามารถตัดโมเลกุลดีเอ็นเอขนาด 710 bp ได้ single haplotypes (restriction patterns) ได้ 5 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (350 bp) รูปแบบ B (460 350 และ 250 bp) รูปแบบ C (460 และ 200 bp) รูปแบบ D (350 และ 250 bp) และ รูปแบบ E (460 และ250 bp) (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาตัดโมเลกุลดีเอ็นเอขนาด 710 bp ของเอนไซม์ *Dde* I และ *Taq* เข้าด้วยกันแล้วจะได้ single haplotypes (restriction patterns) ทั้งหมด 6 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (350 250 และ 140bp) รูปแบบ B (460 350 250 และ 140bp) รูปแบบ C (410 350 และ 300 bp) รูปแบบ D (350 300 250 และ 110 bp) รูปแบบ E (410 350 และ 250 bp) และ รูปแบบ F (460 410 230 140 และ110 bp) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 รูปแบบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดที่ตำแหน่งยีน COI ของหอยขม สกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I

Restriction patterns (single haplotypes)				
COI-*Dde* I (bp)				
A	B	C	D	E
-	410	-	410	410
-	300	300	-	-
250	-	250	250	-
140	-	-	-	140
-	-	110	-	110

ตารางที่ 4 รูปแบบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดที่ตำแหน่งยีน COI ของหอยขม สกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I

Restriction patterns (single haplotypes)				
COI-*Taq* I (bp)				
A	B	C	D	E
-	460	460	-	460
350	350	-	350	-
-	250	-	250	250
-	-	-	-	-
-	-	200	-	-

พหุน ปณ ศโต ชีเว

ตารางที่ 5 รูปแบบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดที่ตำแหน่งยีน COI ของหอยขม สกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย คือ *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I

Restriction patterns (single haplotypes)					
COI-*Dde* I + COI-*Taq* I (bp)					
A	B	C	D	E	F
	460	-	-		460
		410		410	410
350	350	350	350	350	
		300	300		
250	250	-	250	250	
					230
140	140	-	-		140
-			110		110

การกระจายตัวและความถี่ของ single haplotypes ที่พบในแต่ละประชากร เมื่อทำการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I ได้ single haplotypes ทั้งหมด 5 รูปแบบ คือ รูปแบบ A พบใน NBB3 KMP1 และ KMP4 ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* มีความถี่เท่ากับ 3.33 รูปแบบ B พบใน BBP3และ KMB1 ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* มีความถี่เท่ากับ 2.22 รูปแบบ C พบใน MML4 และ SF1 ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* มีความถี่เท่ากับ 2.22 รูปแบบ D พบใน KMB3 ถูกระบุเป็น *F. martensi cambodjensis* มีความถี่เท่ากับ 1.11 รูปแบบ E พบใน SF7 ถูกระบุเป็น *Pila* sp. มีความถี่เท่ากับ 1.11

เมื่อทำการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I ได้ single haplotypes ทั้งหมด 5 รูปแบบ คือ รูปแบบ A พบใน NBB1, NBB3, BBP13, BBP22, MML4, TTL3, RRN2 และ KMB3 ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* มีความถี่เท่ากับ 3.63 รูปแบบ B พบใน KMP1, KMP2 และ HHB2 ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* และ *F. martensi cambodjensis* มีความถี่เท่ากับ 1.36 รูปแบบ C พบใน SF7 ถูกระบุเป็น *Pila* sp. มีความถี่เท่ากับ 0.45 รูปแบบ D พบใน AMP3, CAB2 และ NBB2 ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* และ *F. martensi cambodjensis* มีความถี่เท่ากับ 1.36 รูปแบบ E พบใน NTN1, NTN3, PSRN3, NPL1 และ JPN2 ถูกระบุเป็น *F. sumatrensis polygramma*, *F.*

sumatrensis polygramma, *F. sumatrensis polygramma* และ *F. martensi cambodjensis* ตามลำดับ มีความถี่เท่ากับ 2.72 รูปแบบ F พบใน NTP2 ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* มีความถี่เท่ากับ 0.45

ตารางที่ 6 การกระจายความถี่ของ Single haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I

Haplotypes COI-*Dde* I	FREQUENCY						
	NBB3	KMP4	KMP1	BBP13	MML4	KMB3	Out group
A	1(1)	1(1)	1(1)	-	-	-	-
B	-	-	-	1(1)	-	-	-
C	-	-	-	-	1(1)	-	-
D	-	-	-	-	-	1(1)	
E	-	-	-	-	-	-	1(1)

ตารางที่ 7 การกระจายความถี่ของ Single haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I

Haplotypes COI-*Taq* I	Frequency						
	NBB3	KMP4	KMP1	BBP13	MML4	KMB3	Out group
A	1(1)	-	-	-	1(1)	1(1)	-
B	-	1(1)	1(1)	1(1)	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	1(1)

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ตารางที่ 8 การกระจายความถี่ของ Single haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย คือ *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I

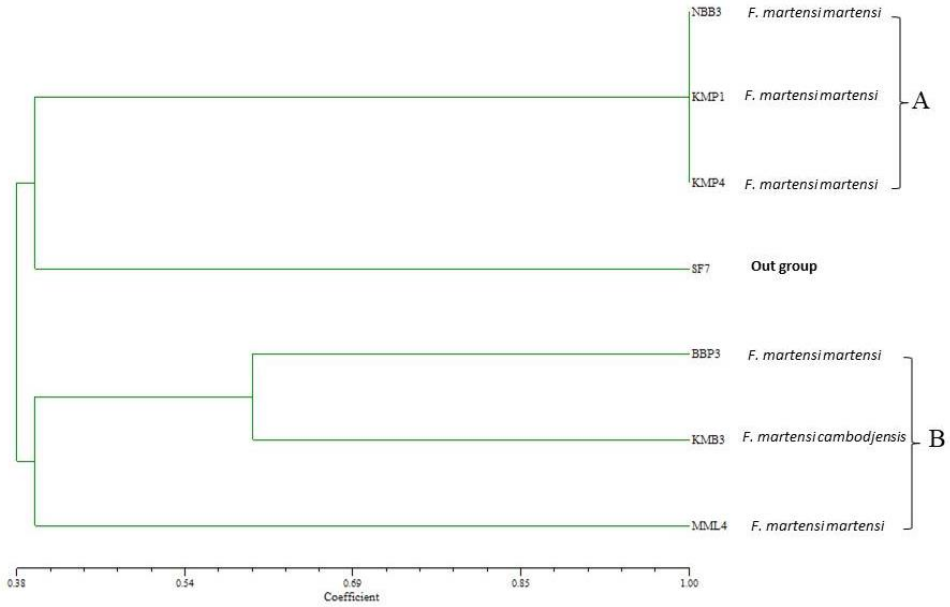
Haplotypes COI-*Dde* I+COI-*Taq* I	FREQUENCY						
	NBB3	KMP4	KMP1	BBP13	MML4	FBK3	Out group
A	1(1)	-	-	-	-	-	-
B	-	1(1)	1(1)	-	-	-	-
C	-	-	-	1(1)	-	-	-
D	-	-	-	-	1(1)	-	-
E	-	-	-	-	-	1(1)	-
F	-	-	-	-	-	-	1(1)

ตารางที่ 9 การกระจายความถี่ของ Composite haplotypes ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI ในหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I

Composite haplotypes	Frequency						
	NBB3	KMP1	KMP4	BBP13	MML4	KMB3	Out group
	F. martensi martensi	*F. martensi martensi*	*F. martensi martensi*	*F. martensi martensi*	*F. martensi cambodjensis*	*F. martensi cambodjensis*	*Pila* sp.
AA	1(1)	-	-	-	-	-	-
BB	-			1(1)	-		-
AB	-	1(0.5)	1(0.5)		-	-	-
CA	-	-	-	-	1(1)	-	-
DA	-	-	-	-		1(1)	-
EE	-	-	-	-	-	-	1(1)

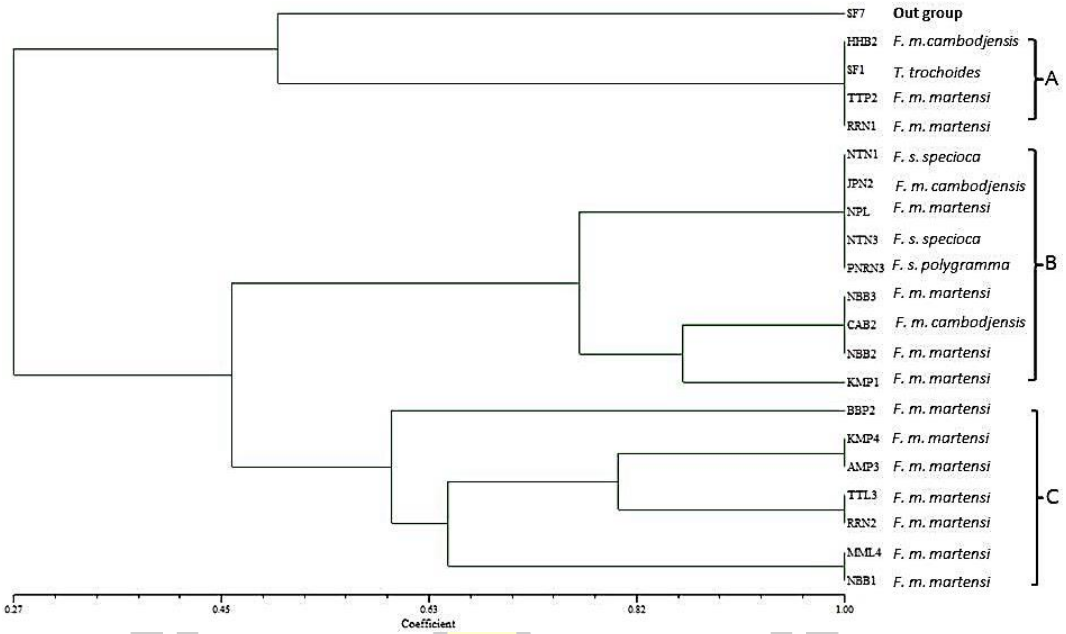
จากนั้นนำค่า single haplotypes ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I มาสร้างเป็น composite haplotypes ทั้งหมด 6 รูปแบบ โดยพบ composite haplotypes ในประชากร NBB3 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* เป็นรูปแบบ AA มีค่าความถี่เท่ากับ 1 ในประชากร

KMP1 และ KMP4 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* เป็นรูปแบบ AB มีค่าความถี่เท่ากับ 0.5 ในประชากร BBP13 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* เป็นรูปแบบ BB มีค่าความถี่เท่ากับ 0.25 ในประชากร MML4 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi cambodjensis* เป็นรูปแบบ CA มีค่าความถี่เท่ากับ 1 ในประชากร KMB3 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi cambodjensis* เป็นรูปแบบ DA มีค่าความถี่เท่ากับ 1 และตัวอย่างเปรียบเทียบ (out group) SF7 (*Pila* sp.) เป็นรูปแบบ EE มีค่าความถี่เท่ากับ 0.125 (ตารางที่ 9)



ภาพประกอบ 12 UPGMA dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย และตัวอย่างเปรียบเทียบ *Pila* sp. ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I วิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.11x

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 13 UPGMA dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย และตัวอย่างเปรียบเทียบ *Pila* sp. ที่พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I วิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.11x

จากการนำ single haplotypes ของหอยขมสกุล *Filopaludina* ทั้ง 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma* และตัวอย่างเปรียบเทียบ *Pila* sp. พบในแต่ละตำแหน่งของยีน COI เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I และ *Taq* I จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.11x โดยนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* แบบ UPGMA โดยข้อมูลจากถูกปรับเปลี่ยนโดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” กรณีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ กำหนดสัญลักษณ์ “0” กรณีที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แล้ววิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Cluster analysis ของโปรแกรม NTSYSpc version 2.11x เพื่อคำนวณระดับความเหมือนและความแตกต่างของหอยสกุล *Filopaludina* จากนั้นนำค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบไปเขียนเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ dendrogram พบว่าในแต่ละตำแหน่งของยีน COI เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I (ภาพประกอบ 12) สามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่มโดยกลุ่ม A พบ NBB3 KMP1 และ KMP4 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* อยู่แยกกับกลุ่ม B ที่พบ BBP3, MML4 และ KMB3 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* และ *F. martensi cambodjensis* ตามลำดับ ส่วน SF7 (out group) ถูกแยก

ออกจากกลุ่ม A และในแต่ละตำแหน่งของยีน COI เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I (ภาพประกอบ 13) สามารถแบ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A, B และ C ซึ่งพบว่ากลุ่ม A แยกออกจากกลุ่ม B และ C ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 27 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่ม B แยกออกจาก C ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ ภายในกลุ่ม A หอยที่เป็น out group แยกออกจากชนิดอื่นที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 49 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่ม B พบความหลากหลายของหอยสูงมากคือพบทั้งชนิด *F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis F. sumatrensis polygramma* และ *F. sumatrensis speciosa* ส่วนในกลุ่ม C พบเป็นชนิด *F. martensi martensi* ทั้งหมด

4.4.5 ผลการศึกษาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

เลือกตัวอย่างหอยจากพื้นที่ 28 จุด มาจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้แก่ SF1, PSN1, PPL1, HHB1, NBB1, HMN2, KMB1, BBP12, KMP2, TTP1, NTN1, RRN2, SML1, JPL1, TTL1, SF2, CCL12, KMB4, NTN2, RRN3, CAB1 และ PSRN2 มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด kit GF-1 Tissue DNA Extraction แล้วทำการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดย UV spectrophotometer ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณ genomic DNA ที่ยีน COI โดยใช้ไพรเมอร์ COI (F) = 5′-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3′ และ COI (R) = 5′ - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3′ แล้วจึงนำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอโดยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis ก่อนส่งไปทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลการหาลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของหอยแต่ละชนิด

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	การระบุชนิด	ลำดับเบส
TTP1	*F. martensi martensi*	TTGTGACTGCTCATGCATTTGTCATAATTTTTTTTATGGTTATACCAATAATAATTGGT GGATTTGGAAATTGATTAATTCCTTTGATATTAGGTGCTTCTGATATGGCTTTTCCTCG GTTAAATAATATAAGCTTTTGATTGTTACCACCTAGATTACTACTTCTTCTATCATCTG CTGCTGTTGAAAGTGGTGCCGGTACTGGTTGAACTGTATATCCACCATTGGCTAGTAAT TTAGCTCATGCTGGTGGATCTGTTGATTTGGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGTGC ATCATCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTGATTAATATACGATGATACG GTATGCAATTTGAACGTCTTCCATTATTTGTATGGTCGGTGAAAATTACTGCTATTTTG TTATTATTGTCTTTACCTGTATTGGCTGGAGCAATTACTATATTATTAACTGATCGAAA TTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGGGGGGATCCAGTTTTATATCAACATT TGTTTTGATTTTTTGGTCACC

พหุปัญญาลัย

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	การระบุชนิด	ลำดับเบส
RRN3	*F. martensi cambodjensis*	TTTGTTATAATTTTTTTTATGGTTATACCAATAATAATCGGTGGGTTTGGTAATTGATTA ATTCCATTGATGTTAGGTGCTTCTGATATGGCTTTTCCTCGATTGAATAATATAAGTTT TTGGTTATTACCTCCTAGTTTATTACTTCTTTTATCTTCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTG CTGGTACTGGTTGGACTGTGTACCCACCGTTGGCTGGGAATTTGGCTCATGCTGGTGG GTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCTTTGCATTTGGCTGGTGCATCGTCTATTTTAGGTG CTGTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATATGCGATGGTGTGGTATACAATTTGAGCGT CTTCCTTTATTTGTTTGGTCAGTGAAGATTACTGCTATTTTGCTGTTGCTATCTTTGCC TGTGTTGGCTGGGGCTATTACTATATTATTAACTGATCGGAATTTTAATACTTCTTTTT TTGATCCAGCAGGGGGTGGTGATCCAATTTTATACCAGCATTTATTTTGATTTTTTGGT CACC
PSN2	*F. Sumartensi polygramma*	ATAATTTTTTTTATGGTTATGCCAATAATAATTGGTGGGTTTGGTAATTCCTCTAATATT CTAATATTAGGTGCTTCTGACATGGCTTTTCCTCGGTTAAATAATATGAGTTTTTGGTT ATTATCACCTAGTTTATTACTTCTTTTATCATCTGCTGTTGTCGAAGGAGGTGTTGGTA CTGCTTGGCTGGGAATTTGGCTCGTGCTGGGTGGTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCCT TACATTTACCTGGTGCATCATCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATTA ATATGCGATGATGTGGTATACAATTTGAGCATCTTCCTTTATTAGTATGATTGGTGAAA ATTACTGCTATTTTATNNNTATTATCTTTACATGTAGTAGCAGGAGCAATGACTATGCT GTTGACTGATCGGAATTTTAATACTTCTTTTTTTGAAAATTTTATATCAGCATTTGTTTT GATTTTTTGGTCACC

***4.4.5**.1 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม*

เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยยีน COI ของดีเอ็นเอหอยขมจากลุ่มแม่น้ำโขงใน 4 จังหวัด กับฐานข้อมูลดีเอ็นเอจาก Genbank พบว่า ชนิดย่อยที่ 1 *F. martensi martensi* มีชนิดที่ใกล้เคียงมากที่สุดคือ F. *martensi* (I=77.78-92.57เปอร์เซ็นต์) *Filopaludina javanica* (I=90.40-91.45เปอร์เซ็นต์) และ *Viviparus georgianus* (I=82.56 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 11) ชนิดย่อยที่ 2 คือ *F. martensi cambodjensis* มีชนิดที่ใกล้เคียงมากที่สุด คือ *F. martensi* (I=93.28-93.49เปอร์เซ็นต์) และ *F. sumatrensis* (I=89.13เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 12) ชนิดย่อยที่ 3 คือ *F. sumatrensis polygramma* มีชนิดที่ใกล้เคียงมากที่สุดคือ *F. sumatrensis* (I=79.58-84.53เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 11 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. martensi martensi* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ใน GenBank

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง	Genbank accession number ที่คล้ายคลึง
TTP1	*Filopaludina javanica*	91.45%	MN997950.1
TTL1	*Filopaludina martensi*	77.78%	MN997960.1
HMN2	*Filopaludina martensi*	92.57%	MN997960.1
RRN2	*Filopaludina javanica*	90.40%	MN997946.1
KMP2	*Viviparus georgianus*	82.56%	MN436001.1
HHB1	*Filopaludina martensi*	88.63%	MN997958.1

ตารางที่ 12 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. martensi cambodjensis* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ใน GenBank

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง	Genbank accession number ที่คล้ายคลึง
CCL12	*Filopaludina martensi*	93.49%	MN997959.1
RRN3	*Filopaludina martensi*	93.28%	MN997959.1
CAB1	*Filopaludina sumatrensis*	89.13%	MN997972.1

ตารางที่ 13 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. sumatrensis polygramma* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST ใน GenBank

ตัวอย่างดีเอ็นเอ	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง	Genbank accession number ที่คล้ายคลึง
PSN2	*Filopaludina sumatrensis*	84.53%	MN997972.1
NTN1	*Filopaludina sumatrensis*	79.58%	MN997977.1

4.4.5.2 ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

จากตัวอย่างดีเอ็นเอหอยขมจาก 28 พื้นที่ จำนวน 11 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์หารูปแบบของแฮพโพลไทด์ (Haplotype: H) พบว่าประชากรหอยมีรูปแบบแฮพโพลไทด์ 11 รูปแบบ โดยเป็นรูปแบบของแฮพโพลไทด์ที่ไม่มีการใช้ร่วมกัน (Unique haplotype) โดยชนิดที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุดคือ RRN2 กับ TTP1 (0.0113) ชนิดที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยสูงสุดคือ TTL1 กับ NTN2 ห่างกันที่ 0.4318 (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ระยะห่างทางพันธุกรรมของหอย 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma*

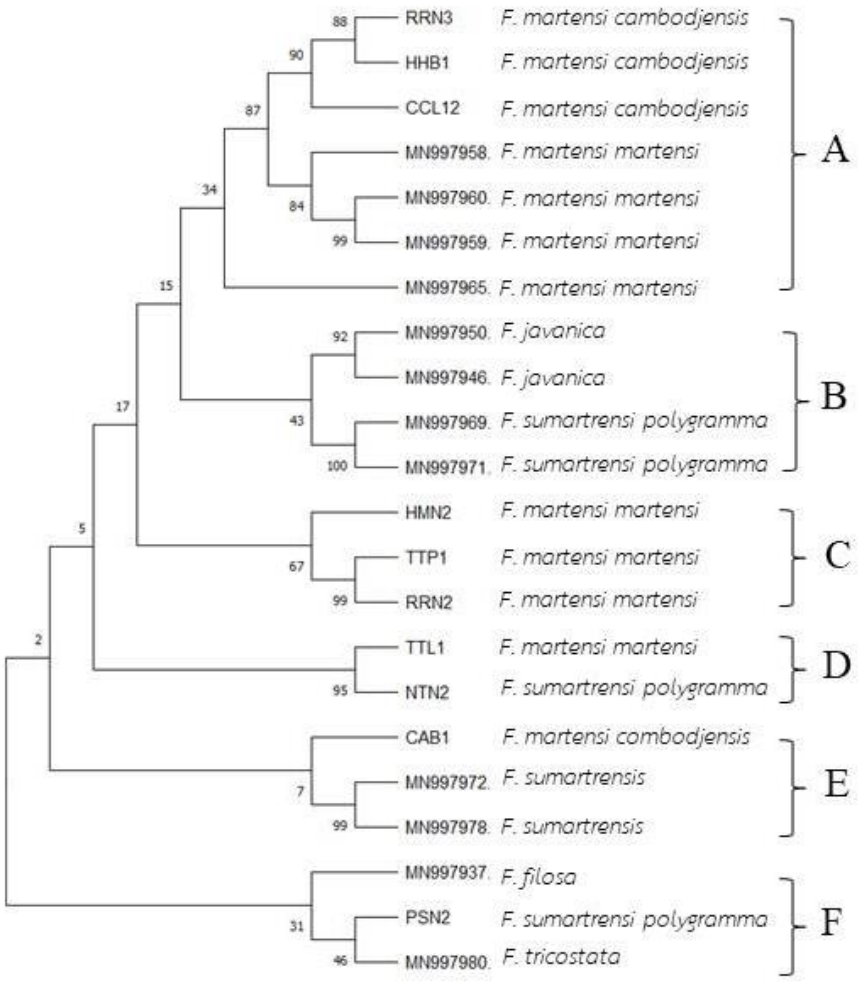
		F. m. muensis				*F. m. cambodjensis*				*F.s. polygramma*	
		TTP1	HMN2	RRN2	TTL1	RRN3	CCL12	HHB1	CAB1	PSN2	NTN2
F. m. martensi	TTP1										
	HMN2	0.06294									
	RRN2	**0.01134**	0.06505								
	TTL1	0.32167	0.31587	0.34377							
F. m. cambodjensis	RRN3	0.11955	0.10119	0.12656	0.36216						
	CCL12	0.11584	0.10214	0.12934	0.348069	0.04479					
	HHB1	0.16391	0.16290	0.17237	0.361028	0.07906	0.09941				
	CAB1	0.14000	0.15312	0.13793	0.401702	0.16811	0.16492	0.22637			
F.s. polygramma	PSN2	0.15455	0.13586	0.15455	0.360771	0.14641	0.14416	0.19257	0.18402		
	NTN2	0.29372	0.29587	0.28801	**0.431801**	0.30476	0.29062	0.34319	0.31848	0.34313	

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างยีน COI ของหอยขมที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทยกับลำดับเบสของหอยที่อยู่ในฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) ด้วยวิธี Neighbor-Joining พบว่าประชากรหอยขมที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทยแยกออกจากหอยชนิดอื่น โดยแบ่งเป็น 6 Clade ได้แก่ Clade A, Clade B Clade C Clade D Clade E และ Clade F (ภาพประกอบ 14) โดย Clade A พบตัวอย่างหอยขมที่เก็บจากหนองคาย บึงกาฬ และเลยซึ่งถูกระบุเป็น *F. martensi cambodjensis* อยู่ใน Clade เดียวกับหอยขมที่เก็บจากเอเชีย ซึ่งถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* ใน Clade B เป็นหอยชนิด *F. javanica* และ *F. sumatrensis polygramma* จากทวีปเอเชีย ใน Clade C เป็นหอยตัวอย่างที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทยทั้งหมดเป็น *F. martensi* จากหนองคาย และนครพนม ใน Clade D พบ *F. martensi martensi* จากเลย และ *F. sumatrensis polygramma* จากหนองคายอยู่ใน Clade เดียวกันโดยค่าสนับสนุนที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ใน Clade E พบ *F. martensi cambodjensis*

จากบึงกาฬ อยู่กับ *F. sumatrensis* จากทวีปเอเชีย และใน Clade F พบความหลากหลายสูงโดยพบ *F. sumatrensis polygramma* จากจังหวัดหนองคาย อยู่ใน Clade เดียวกับ *F. filosa และ F.tricostata* จากทวีปเอเชีย ซึ่งมีค่าสนับสนุนค่อนข้างต่ำที่ 31 และ 46 เปอร์เซ็นต์

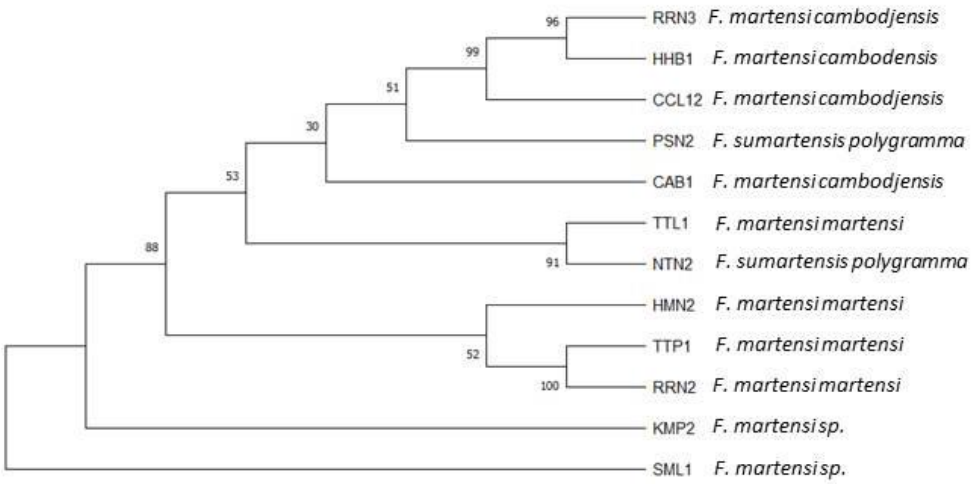
เมื่อพิจารณาแผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยตัวอย่าง (ภาพประกอบ 15) ที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทย พบว่าชนิด *F. martensi cambodjensis* ที่เก็บจาก จังหวัดหนองคาย บึงกาฬ และเลยอยู่ในกิ่งเดียวกันมีค่าสนับสนุน 100 เปอร์เซ็นต์ ชนิด *F. martensi martensi* ที่เก็บจาก จังหวัดหนองคาย และนครพนม อยู่ในกิ่งเดียวกันมีค่าสนับสนุน 52 เปอร์เซ็นต์ และยังพบหอยชนิด *F. sumatrensis polygramma* แทรกอยู่ภายในกลุ่มของชนิด *F. martensi cambodjensis* และชนิด *F. martensi martensi* โดยมีค่าสนับสนุนที่ 51 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 14 แผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอย ที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย (เลย, หนองคาย, บึงกาฬ และนครพนม) และข้อมูลลำดับเบสของยีน COI จาก GenBank ด้วยวิธี Neighbor-Joining ค่าสนับสนุน bootstrap ที่ 1,000 รอบ

พหูน ปณฺ ฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 15 แผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยตัวอย่าง ที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย (เลย, หนองคาย, บึงกาฬ และนครพนม) ด้วยวิธี Neighbor-Joining ค่าสนับสนุน bootstrap ที่ 1,000 รอบ

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

5.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยขมสกุล *Filopaludina* จำนวน 262 ตัวอย่าง จากแหล่งน้ำธรรมชาติในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทย 4 จังหวัด ได้แก่ เลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม มาศึกษาลักษณะภายนอกและจัดจำแนกชนิดของหอยในสกุล *Filopaludina* โดยศึกษาลักษณะของเปลือก ขนาด ความสูง รูปร่าง ลักษณะผิวเปลือก สีของเปลือก ลายแถบบนเปลือก สันบนเปลือก ลักษณะฝาปิดเปลือก ความหนา องค์ประกอบของชั้น ลักษณะผิว และสี พบว่ากลุ่มประชากรหอยที่ศึกษาในครั้งนี้สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย *คือ F. martensi martensi, F. martensi cambodjensis* และ *F. sumatrensis polygramma*

5.1.2 จากการศึกษาการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาของหอยขม โดยใช้การจำแนกกลุ่มด้วยสถิติ Canonical Discriminant พบว่าลักษณะที่ใช้ในการจำแนกได้สูงที่สุดคือ ความยาวจากยอดถึงช่องเปิดเปลือก (ae) และความกว้างช่องเปิดเปลือก (fg) มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกได้สูง อยู่ที่ 0.938 และ 0.411 ส่วนลักษณะที่มีค่าสัมประสิทธิ์การจำแนกต่ำที่สุดคือ ความสูงของวงสุดท้าย (bc) ซึ่งมีค่าอยู่ที่ – 2.264

ส่วนการจำแนกชนิดของหอยจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างฟังก์ชัน 1 และฟังก์ชัน 2 พบว่าหอยชนิด *F. sumatrensis polygramma* มีตำแหน่งการกระจายต่างจากชนิดอื่นอย่างชัดเจน ส่วนชนิด *F. martensi cambodjensis* และ *F. martensi martensi* มีตำแหน่งการกระจายที่ค่อนข้างไม่แตกต่างกัน และหอยชนิดที่มีการกระจายมากที่สุด *F. martensi martensi* คิดเป็น 75.6 เปอร์เซ็นต์

5.1.3 จากการสกัดและเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าตำแหน่งยีน COI เป็นไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ genomic DNA ได้ดีที่สุด และพบแถบดีเอ็นเอของหอยทั้ง 4 ชนิดและตัวอย่างเปรียบเทียบมีขนาด 710 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากันทุกตัว จากการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) จากการนำโมเลกุลของดีเอ็นเอของปลาสกุล *Filopaludina* 4 ชนิด และตัวอย่างเปรียบมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Dde* I สามารถตัดได้ single haplotypes 5 รูปแบบ และ *Taq* I สามารถตัดได้ single haplotypes 5 รูปแบบ พบ composite

haplotyte ของหอยขม 6 รูปแบบ ได้แก่ AA, BB, AB, CA, DA และ EE โดย AA พบในประชากร NBB3 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* BB พบในประชากร BBP13 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* AB พบในประชากร KMP1 และ KMP4 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* CA พบในประชากร MML4 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi cambodjensis* DA พบในประชากร KMB3 ที่ถูกระบุเป็น *F. martensi cambodjensis* และ EE พบในประชากร SF7 ที่ถูกระบุตัวอย่างเปรียบเทียบ (*Pila* sp.) จึงกล่าวได้ว่า PCR-RFLP สามารถใช้แยกหอยชนิด *F. martensi* ออกจากหอยโข่ง *Pila* sp. เมื่อพิจารณาชนิดย่อยก็สามารถแยก *F. martensi martensi* และ *F. martensi cambodjensis* ได้ ทำให้ได้ Marker ที่มีความเฉพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น

5.1.5 ผลการศึกษาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ของหอยขมสกุล *Filopaludina* จำนวน 11 ตัวอย่างเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยยีน COI ของดีเอ็นเอหอยขมจากลุ่มแม่นำโขงใน 4 จังหวัด กับฐานข้อมูลดีเอ็นเอจาก Genbank พบว่าทั้ง 2 ชนิด มีชนิดที่ใกล้เคียงคือ *F. martensi* การวิเคราะห์หารูปแบบของแฮพโพลไทด์ (Haplotype: H) พบว่าประชากรหอยทั้ง 11 ตัวอย่าง พบว่าเป็นรูปแบบแฮพโพลไทด์ที่ไม่มีการใช้ร่วมกัน (unique haplotype) จากแผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของหอยพบว่า หอยชนิด *F. martensi cambodjensis* ที่เก็บจากจังหวัดหนองคาย บึงกาฬ และเลย ในประเทศไทยมีความใกล้ชิดกับ *F. martensi* จากทวีปเอเชีย และชนิด *F. martensi martensi* ที่เก็บจากจังหวัดนครพนม และหนองคาย มีความใกล้ชิดกันมากที่สุดที่ค่าสนับสนุน 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.0113-0.4138 ชนิดที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุดคือ RRN2 กับ TTP1 (0.0113) ชนิดที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยสูงสุดคือ TTL1 กับ NTN2 (0.4138)

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 การเก็บตัวอย่างและการกระจายพันธุ์ของหอย

แม่น้ำโขงเป็นหนึ่งในระบบแม่น้ำที่ใหญ่สายหนึ่งของโลก มีการไหลเป็นระยะทาง 4909 กม. และครอบคลุมพื้นที่ 795,000 ตารางกิโลเมตร ในภาคใต้ของจีน พม่า ไทย และภูมิภาคอินโดจีน โดยมีการแบ่งเป็นแม่น้ำโขงตอนบนและตอนล่าง (“Thai » Mekong River Commission,” n.d.) ลุ่มน้ำโขงตอนล่าง (Lower Mekong Basin) ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ใน 4 ประเทศ คือ ไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม ในประเทศไทยแม่น้ำโขงไหลผ่านจังหวัดเชียงราย เลย หนองคาย บึงกาฬ นครพนม มุกดาหาร อำนาจเจริญ และอุบลราชธานี เป็นระยะทาง 1,520 กิโลเมตรซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ในทุกๆปีนักวิทยาศาสตร์จะระบุชนิดพันธุ์ใหม่ๆ ที่ได้รับการค้นพบเพิ่มขึ้นและระบุถึงจำนวนชนิดพันธุ์ที่ยังคงรอการค้นพบ โดยในระหว่างปี พ.ศ.2540 ถึง พ.ศ.2557 มีชนิดพันธุ์ใหม่ที่ได้รับการค้นพบมากถึง 2,216 ชนิดพันธุ์ (“ข้อมูลทั่วไปของแม่น้ำโขง | WWF,” n.d.)

1 ในชนิดพันธุ์ที่ยังคงรอการค้นพบก็คือหอยขมในสกุล *Filopaludina* เนื่องจากหอยน้ำจืดเป็นสัตว์ที่มีความผันแปรทางลักษณะเปลือกสูง มีความคล้ายคลึงกัน การจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาภายนอกซึ่งใช้เฉพาะรูปร่าง ขนาด และสีของเปลือกการจัดจำแนกความแตกต่างยากและค่อนข้างสับสน Sengupta *et al.* (2009) จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาของหอยน้ำจืดในวงศ์ Viviparidae นั้นในแต่ละภูมิภาคหรือประเทศที่พบก็มีการจัดหอยที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันอย่างมากในสปีชีส์ที่ต่างกัน แต่ในประเทศไทยยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย จึงเป็นเหตุผลให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาหอยขมซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีนี้ในจังหวัดลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย โดยเลือกพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเป็นแหล่งน้ำตามเส้นทางของแม่น้ำโขงใน 4 จังหวัด คือ เลย หนองคาย บึงกาฬ และนครพนม จำนวน 28 พื้นที่ พบตัวอย่าง 262 ตัวอย่าง พบชนิด คือ *F. martensi martensi* มีการกระจายตัวมากที่สุดโดยพบทุกจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง และชนิด *F. sumatrensis polygramma* มีการกระจายตัวน้อยที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ ลำไย ณีรัตน์พันธุ์ และคณะ (2555) ที่พบความชุกของหอยขมชนิด *F. martensi* บริเวณน้ำพอง การศึกษาของ สุธี วงศ์มณีประทีป และพรเทพ เนียมพิทักษ์ (2556) ที่พบหอยขมชนิด *F. martensi martensi* ในพื้นที่รับน้ำเหนือเขื่อนอุบลรัตน์ การศึกษาของ Noikong และ Chalobol (2014) ที่พบหอยขมชนิด *F. martensi* ในพื้นที่จังหวัดลำพูน การศึกษาของ Wang *et al.* (2015) ที่พบหอย *F. martensi martensi* ในอ่างเก็บน้ำชี การศึกษาของ สาวิกา กัลปพฤกษ และคณะ (2559) ที่พบ *F. martensi martensi* และ *F. sumatrensis polygramma* ในคลองชลประทาน ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา และการศึกษาของ Chantima *et al* (2018) ที่พบ *F. sumatrensis polygramma* ในแม่น้ำกก จังหวัดเชียงราย ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวนั้นเป็นส่วนหนึ่งของลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

5.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาภายนอก

จากหลายการศึกษาพบว่าความผันแปรทางลักษณะเปลือกหอยนั้นสูงมาก ตัวอย่างหอยทั้งหมด 262 ตัวอย่าง จาก 4 จังหวัดในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทย ถูกจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกตาม Brandt (1974) และ อรนภา นาคจินดา (2551) จำแนกได้ ได้ 2 ชนิด 3 ชนิดย่อย คือ *F. martensi martensi* จำนวน 198 ตัวอย่าง *F. martensi cambodjensis* จำนวน 39 และตัวอย่าง *F. sumatrensis polygramma* จำนวน 25 ตัวอย่าง โดยลักษณะที่แยก *F. martensi* และ *F. sumatrensis* ได้อย่างชัดเจนคือขนาด ลายบนเปลือก และสีของเปลือก โดย *F. martensi* จะมีขนาดใหญ่ เปลือกหนา สีน้ำตาลเข้ม หรือเขียว ส่วน *F. sumatrensis* นั้นจะมีขนาดเล็กมาก เปลือกบาง สีน้ำตาลอ่อน และมีแถบลายบนเปลือกชัดเจน ในชนิดเดียวกันมีลักษณะที่ต่างกันได้แก่ชนิดย่อย *F. sumatrensis speciosa* จะมีแถบสีในวงสุดท่ายเฉพาะครึ่งบนของวงแต่ชนิดย่อย *F. sumatrensis polygramma* จะไม่พบแถบสีในวงสุดท้าย ในชนิดย่อย *F. martensi cambodjensis* จะมีขนาดใหญ่ และเปลือกหนากว่า *F. martensi martensi* และลักษณะเฉพาะ

ของ *F. martensi martensi* คือการมีสัน (spiral ridge) บนวงสุดท้าย จากการศึกษาลักษณะภายนอกของหอยยังพบว่ามีความไม่ชัดเจนทำให้จำแนกได้ยาก จึงมีการนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์มอร์โฟเมตริกเข้ามาช่วยโดยวัดขนาดต่างๆของเปลือกหอย ได้แก่ ความยาวเปลือก (sl), ความกว้างเปลือก (sw), ความสูงของวงสุดท้าย (bc), ความยาวจากยอดถึงช่องเปิดเปลือก (ae), ความสูงของวงเกลียว (ah), ความยาวช่องเปิดเปลือก (ce) ความกว้างช่องเปิดเปลือก (fg), ความยาวจากเซอเจอร์สุดท้ายถึงปากเปลือกบน (de) มาวิเคราะห์ด้วย Discriminant Analysis พบว่าลักษณะที่ใช้ในการจำแนกได้สูงที่สุดคือ ความยาวจากยอดถึงช่องเปิดเปลือก (ae) และความกว้างช่องเปิดเปลือก (fg) และลักษณะที่ใช้ในการจำแนกได้ต่ำที่สุดคือ ความสูงของวงสุดท้าย (bc) ส่วนการจำแนกชนิดของหอยพบว่าหอยชนิด *F. sumatrensis polygramma* มีความแตกต่างจากชนิดอย่างชัดเจน ส่วนชนิด *F. martensi cambodjensis* และ *F. martensi martensi* ไม่แตกต่างจากกันโดยพบชนิด *F. martensi cambodjensis* กระจายอยู่ภายในกลุ่มของหอยชนิด *F. martensi martensi* และหอยชนิดที่มีการกระจายมากที่สุด *F. martensi martensi* สูงถึง 75.6 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความแตกต่างของความอุดมสมบูรณ์ในพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง ทำให้หอยที่เก็บจากพื้นที่ต่างกันแต่เป็นชนิดเดียวกันนั้นค่อนข้างมีขนาดที่แตกต่างกัน

5.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

จากข้อมูลการศึกษาทางพันธุกรรมของหอยพบว่ามีความแปรปรวนภายในสูงมากเช่นกัน อีกทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Filopaludina* นั้นมีน้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้จึงหวังเป็นการเพิ่มข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยชนิดนี้ โดยการนำโมเลกุลของดีเอ็นเอของหอยสกุล *Filopaludina* 4 ชนิด และตัวอย่างเปรียบมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Dde* I และ *Taq* I โดยพบว่า *Dde* I สามารถตัดได้ single haplotypes 5 รูปแบบ *Taq* I สามารถตัดได้ single haplotypes 5 รูปแบบ แลพพบ composite haplotyte ของหอยขม 6 รูปแบบ ได้แก่ AA, BB, AB, CA, DA และ EE โดยถูกระบุเป็นชนิด *F. martensi martensi*, *F. martensi martensi*, *F. martensi martensi*, *F. martensi cambodjensis*, *F. martensi cambodjensis* และ ตัวอย่างเปรียบเทียบ (*Pila* sp.) ตามลำดับ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I สามารถตัดได้ single haplotypes 8 รูปแบบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยนมสาว *Patella candei* ของ Carreira *et al* (2018) ที่พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq* I นั้นสามารถใช้ในการตัดจำเพาะยีน COI ของหอยได้

เมื่อเพิ่มการยืนยันโดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ของหอยขมสกุล *Filopaludina* จำนวน 11 ตัวอย่างเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยยีน COI ของดีเอ็นเอหอยขมจากลุ่มแม่นำโขงใน 4 จังหวัด กับฐานข้อมูลดีเอ็นเอจาก Genbank พบว่าทั้ง 4 ชนิด ไม่มีชนิดที่ใกล้เคียง แต่มีชนิดที่ใกล้เคียงมากที่สุดคือ *F. sumatrensis peninsularis* การ

วิเคราะห์หารูปแบบของแฮพโพลไทด์ (Haplotype: H) พบว่าประชากรหอยทั้ง 11 ตัวอย่าง พบว่าเป็นรูปแบบแฮพโพลไทด์ที่ไม่มีการใช้ร่วมกัน (unique haplotype) และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.0113-0.4138 มีความสอดคล้องกับการศึกษาความกลาหลายทางพันธุกรรมของหอยสกุล *Mekongia* 4 ชนิด และหอยชนิด *Anulotaia mekongensis* ในประเทศไทย 14 แห่ง โดยใช้ความแตกต่างของ allozyme ที่ตรวจสอบโดยวิธี Horizantal starch gel electrophoresisของ Prasankok *et al.* (2011) โดยพบระยะห่างทางพันธุกรรมที่สูง (0.000-0.449) การศึกษาชนิดพันธุ์ของ *F. martensi* ของลำไย ณีรัตน์พันธ์และคณะ และการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและความผันแปรทางภูมิศาสตร์ของ *Bithynia siamensis* ที่พบว่าหอยน้ำจืดมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงมาก (0.014-0.460) ซึ่งอาจเนื่องมาจากอิทธิพลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ถูกรบกวนด้วยปัจจัยมลพิษทางน้ำ ถูกจำกัดด้วยเขตแดนบางอย่าง เป็นต้น ทำให้เกิดกระบวนการวิวัฒนาการที่ซับซ้อนเช่น การลู่เข้าหรือการขนาน

จากแผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของหอยพบว่า หอยชนิด *F. martensi cambodjensis* ที่เก็บจากจังหวัดหนองคาย บึงกาฬ และเลย ในประเทศไทยมีความใกล้ชิดกับ *Bellamya* sp. จากประเทศญี่ปุ่น Hirano *et al.* (2015) ซึ่งลักษณะภายนอกของหอยทั้ง 2 ตัวอย่างนั้นมีความคล้ายคลึงกันมาก อีกทั้งการเรียกชื่อสกุลของทั้ง 2 ประเทศยังมีความสับสนอยู่จึงอาจเป็นไปได้ว่าจะเป็นชนิดเดียวกันที่มีสาเหตุมาจากการถูกนำเข้าหรือออกโดยกิจกรรมของมนุษย์ และชนิด *F. martensi martensi* ที่เก็บจากจังหวัดนครพนม และหนองคาย มีความใกล้ชิดกันมากที่สุดที่ค่าสนับสนุน 99 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นพื้นที่ของจังหวัดที่เป็นพื้นที่ติดต่อกัน

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างยีน COI ของหอยขมที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทยกับลำดับเบสของหอยที่อยู่ในฐานข้อมูลพันธุกรรม (GenBank) ด้วยวิธี Neighbor-Joining พบว่าประชากรหอยขมที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทยแยกออกจากหอยชนิดอื่น โดยแบ่งเป็น 4 Clade ได้แก่ Clade A, Clade B Clade C Clade D และ Clade F โดย Clade A พบตัวอย่างหอยขมที่เก็บจากหนองคาย บึงกาฬ และเลยซึ่งถูกระบุเป็น *F. martensi cambodjensis* อยู่ใน Clade เดียวกับหอยขมที่เก็บจากเอเชีย ซึ่งถูกระบุเป็น *F. martensi martensi* แสดงความใกล้ชิดกันภายในชนิด *F. martensi* แม้จะเก็บจากคนละพื้นที่ ใน Clade B เป็นหอยชนิด *F. javanica* และ *F. sumatrensis polygramma* จากทวีปเอเชีย ใน Clade C เป็นหอยตัวอย่างที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทยทั้งหมดเป็น *F. martensi* จากหนองคาย และนครพนม ซึ่งเป็นจังหวัดที่ไม่ได้มีความต่อเนื่องกันเป็นไปได้ว่าเกิดจากการไหลของยีนหอยขมในลุ่มน้ำโขง หรือเกิดจากการพาไปโดยกิจกรรมของมนุษย์ ใน Clade D พบ *F. martensi martensi* จากเลย และ *F. sumatrensis polygramma* จากหนองคาย อยู่ใน Clade เดียวกันโดยมีค่าสนับสนุนที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะภายนอกของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างมี

ความแตกต่างกันอย่างมากโดยเกิดจากความผันแปรลักษณะภายนอกที่ขึ้นกับความอุดมสมบูรณ์ สภาพแวกล้อม และมลพิษของพื้นที่นั้นๆ

จากแผนผังเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยตัวอย่าง ที่เก็บจาก 4 จังหวัดในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทย พบว่าชนิด *F. martensi cambodjensis* ที่เก็บจาก จังหวัดหนองคาย บึงกาฬ และเลยอยู่ในกิ่งเดียวกันมีค่าสนับสนุน 100 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะเก็บจากต่างจังหวัดกัน แต่เป็นพื้นที่ที่มีความต่อเนื่องกันทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายไปมาหากันได้ ชนิด *F. martensi martensi* ที่เก็บจาก จังหวัดหนองคาย และนครพนม อยู่ในกิ่งเดียวกันมีค่าสนับสนุน 52 เปอร์เซ็นต์ และยังพบหอยชนิด *F. sumatrensis polygramma* แทรกอยู่กับชนิด *F. martensi cambodjensis* โดยมีค่าสนับสนุนที่ 51 เปอร์เซ็นต์และ *F. sumatrensis polygramma* แทรกอยู่กับชนิด *F. martensi martensi* โดยมีค่าสนับสนุนที่ 91 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการจำแนกระหว่างการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมพบชนิด *F. sumatrensis polygramma* นั้นสามารถจำแนกออกจากชนิดอื่นได้อย่างชัดเจนโดยการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา แต่ไม่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่นได้อย่างชัดเจนเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม และเมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมโดย 2 วิธี คือ PCR-RFLP และ DNA sequencing พบว่าทั้งสองวิธีสามารถจำแนกชนิด *F. martensi martensi* ออกมาเป็นกลุ่มใหญ่ได้เหมือนกัน

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 จากผลการวิจัย การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR มีความเหมาะสมกับดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับค่า condition ในปฏิกิริยา หรือปรับ PCR profile ให้เหมาะสมกับแต่ละชนิดต่อไป

5.3.2 อาจทำการปรับเปลี่ยนเอนไซม์ ในการตัดมากขึ้น เพื่อทำให้การจำแนกชนิดได้ถูกต้องแม่นยำเพิ่มขึ้น

5.3.3 เพิ่มการศึกษาให้ในแหล่งน้ำอื่นๆ ของประเทศไทย

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์. (2555). *สัตววิทยา*. กรุงเทพฯ: โครงการพัฒนาตำรา กองทุนสนับสนุนกิจกรรมมูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา.

บังอร แถวโนนงิ้ว, นวลอนงค์ นาคคง และ อภิเดช แสงดี. (2548). *ความหลากชนิดและเครื่องหมายทางพันธุกรรมของหอยโข่งพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทย*.

เปรมใจ พัชรี และ ปีติ เสาวนันท์. (2548). *ตำราชีวเคมี*. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. (2545). *หอยเป็นยาตามตำรับการแพทย์แผนไทย*. กรุงเทพฯ: โครงการพัฒนาตำรา กองทุนสนับสนุนกิจกรรมมูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา.

มณีรัตน์ สิริสวัสดิ์. (2558). *ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาช่อนสกุล Channa ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP*. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ลำไย ณีรัตน์พันธุ์, อรุณรัตน์ ฉวีราช และ รุ้งลาวัลย์ สุดมูล. (2555). *ศึกษาการสะสมของโลหะหนักในเนื้อเยื่อและลายพิมพ์ดีเอ็นเอหอยขมชนิด Filopaludina martensi บริเวณน้ำพอง อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น*. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วสุธี วงศ์มณีประทีป และ พรเทพ เนียมพิทักษ์. (2556). การสำรวจพยาธิใบไม้ตับในหอยฝาเดียวและปลาในพื้นที่รับน้ำเหนือ เขื่อนอุบลรัตน์. *แก่นเกษตร*, *41*(1), 438–445.

วัฒนา ดำรงโรจน์, พงษรัตน์ มัจฉาชีพ และ สุรินทรน์ เสนาปินท์. (2544). *การจัดจำแนกชนิดของหอยทากบกสกุล AmphidromusAlber, 1850 จำนวน7 ชนิด โดยเทคนิคมอรโฟเมตริก (Pulmonata : Camaenidae)*.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. (2533). *การเลี้ยงหอยขม*. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์.

สาวิกา กัลปพฤกษ, สิทธิ กุหลาบทอง, ญาณนันท์ สุนทรกิจ. (2559). ความหลากหลายชนิดพันธุ์ของหอยน้ำจืดในระบบนิเวศนาข้าว. *Science and Technology Silpakorn University*, *3*(2), 35–44.

สุชาติ ผึ่งฉิมพลี. (2550). *ชนิด และการแพร่กระจายของหอยน้ำจืดในแม่น้ำป่าสักตอนล่าง*. Retrieved from http://www.fisheries.go.th/sf-saraburi/images/pdf/report.pdf

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. (2539). *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรนภา นาคจินดา. (2551). การใช้ประโยชน์ของหอยน้ำจืดในประเทศไทย. In สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (Ed.). สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. Retrieved from http://chm-thai.onep.go.th/chm/gti/image/release/AW-Mollusca_4_2.pdf

Ram, P. and Sayan, C. (2016). DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin J Biotechnaol Bioeng*, *3*(1).

Allan, M. and Walter, G. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acod. Sci. USA*, *74*, 560–564.

Navdeep, B., Anu, K., and Nugegoda, D. (2017). Assessing multigenerational effects of prednisolone to the freshwater snail, Physa acuta (Gastropoda: Physidae). *Journal of Hazardous Materials*, *339*, 281–291. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.024

Brandt. (1974). *The non-marine aquatic Mollusca of Thailand*. Archiv Molluskenkund.

Carreira, G. P., Mckeown, N. J., Shaw, P. W., & Gonçalves, J. M. A. (2018). A PCR-RFLP method for stock assignment in the endemic Macaronesian gastropod, Patella candei d'Orbigny, and its potential for future conservation strategies. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.11.011

Chantima, K., Suk-ueng, K., & Kampan, M. (2018). Freshwater Snail Diversity in Mae

Lao Agricultural Basin (Chiang Rai, Thailand) with a Focus on Larval Trematode Infections. *Korean J Parasitol*, *56*, 247–257.

Hirano, T., Saito, T., & Chiba, S. (2015). Phylogeny of freshwater viviparid snails in Japan. *Journal of Molluscan Studies*, *81*, 435– 441.

Hu, Y., Mu, X., Luo, D., Xu, M., Yang, Y., Gu, D.,Zhang, J. (2014). Genetic variability of the invasive snail Pomacea canaliculata in South China based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, *57*, 203–209. https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.08.016

Wongtavatchai, J. (2006). *Formulation of clove oil solution as an anesthetic for aquatic animals*.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Lawton, S. P., Allan, F., Hayes, P. M., & Smit, N. J. (2018). DNA barcoding of the medically important freshwater snail Physa acuta reveals multiple invasion events into Africa. *Acta Tropica*, *188*, 86–92.

Noikong, W. (2014). Molecular identification and histolopathological alternation of echinostomes infected in Filopaludina spp. doctor of philosophy biology, (May).

Noikong, W., & Chalobol, W. (2014). Epidemiology and molecular genotyping of echinostome metacercariae in Filopaludinasnails in Lamphun Province, Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 26–29.

Prasankok, P., & Panha, S. (2011). Genetic structure of the common terrestrial pulmonate snail, Cryptozona siamensis (Pfeiffer, 1856), in Thailand. *Biochemical*

Systematics and Ecology, *39*(4–6), 449–457. https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.06.011

Prasankok, P., Tongkerd, P., Sutcharit, C., & Panha, S. (2011). Genetic divergence in the snorkel snail, Rhiostoma housei, a species complex in Thailand (Caenogastropoda: Cyclophoridae). *Biochemical Systematics and Ecology*, *39*(4–6), 834–840. https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.08.005

Puslednik, L., Ponder, W. F., Dowton, M., & Davis, A. R. (2009). Examining the phylogeny of the Australasian Lymnaeidae (Heterobranchia: Pulmonata: Gastropoda) using mitochondrial, nuclear and morphological markers. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.03.033

Sanna, D., Dedola, G. L., Lai, T., Curini-Galletti, M., & Casu, M. (2012). PCR-RFLP: A practical method for the identification of specimens of *Patella ulyssiponensis s.l.* (Gastropoda: Patellidae). *Italian Journal of Zoology*, *79*(1), 50–59. https://doi.org/10.1080/11250003.2011.620988

Sengupta, M. E., Kristensen, T. K., Madsen, H., & Jørgensen, A. (2009). Molecular phylogenetic investigations of the Viviparidae (Gastropoda: Caenogastropoda) in the lakes of the Rift Valley area of Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *52*(3), 797–805. https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2009.05.007

Sivaraman, B., Jeyasekaran, G., Jeya Shakila, R., Alamelu, V., Wilwet, L., Aanand, S., & Sukumar, D. (2018). PCR-RFLP for authentication of different species of processed snappers using mitochondrial D-loop region by single enzyme. *Food Control*. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.02.028

Sor, R., Boets, P., Chea, R., Goethals, P. L. M., & Lek, S. (2017). Spatial organization of macroinvertebrate assemblages in the Lower Mekong Basin. *Limnologica*,

64(November 2016), 20–30. https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.04.001

Kaur, S. (2015). DNA Barcoding and Its Applications. *International Journal of Engineering Research and General Science*, *3*(2).

Tantrawatpan, C., A, Saijuntha, W., B,⇑, N. B., B, Suksavate, W., … A. (2020). Genetic structure and geographical variation ofBithynia siamensis goniomphalossensu lato (Gastropoda: Bithyniidae), the snail intermediate host of Opisthorchis viverrinisensu lato (Digenea: Opisthorchiidae) in the Lower Mekong Basin revealed by mitochondr. *International Journal for Parasitology*, *50*, 55–62.

Thai » Mekong River Commission. (n.d.). Retrieved March 4, 2020, from http://www.mrcmekong.org/thai

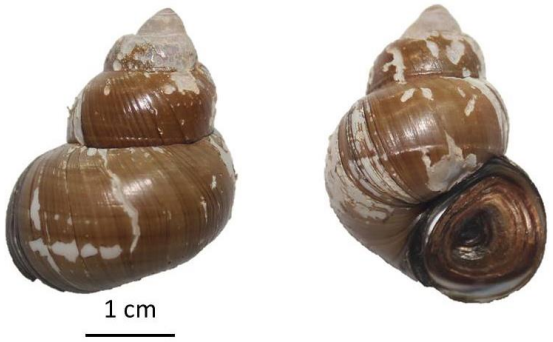
Wang, Y. C., Ho, R. C. Y., Feng, C. C., Namsanor, J., & Sithithaworn, P. (2015). An ecological study of Bithynia snails, the first intermediate host of Opisthorchis viverrini in northeast Thailand. *Acta Tropica*, *141*(Part B), 244–252. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.009

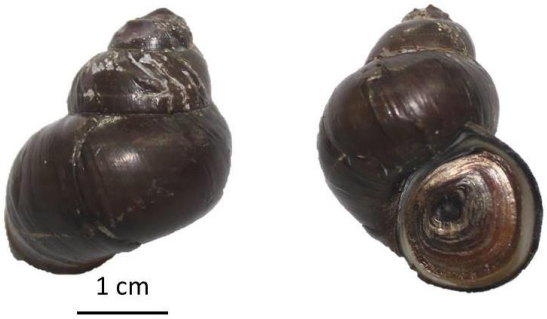
ข้อมูลทั่วไปของแม่น้ำโขง | WWF. (n.d.). Retrieved March 5, 2020, from http://www.wwf.or.th/what_we_do/wetlands_and_production_landscape/mekongriver/

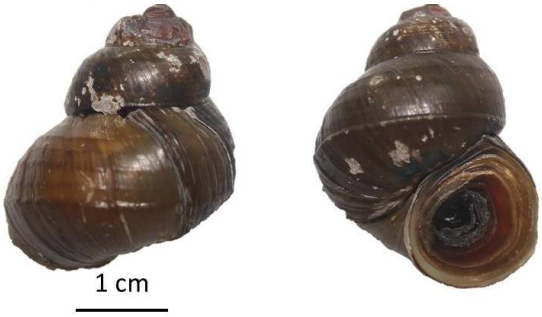
ภาคผนวก

ตาราง 1 ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา

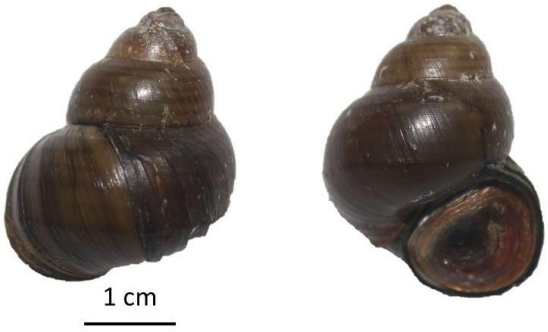
อักษรย่อ	การระบุชนิด	ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา
	Trochotaia trochoides	
SN	*F. martensi cambodjensis*	
KMB	*F. martensi cambodjensis*	
	F. martensi martensi	

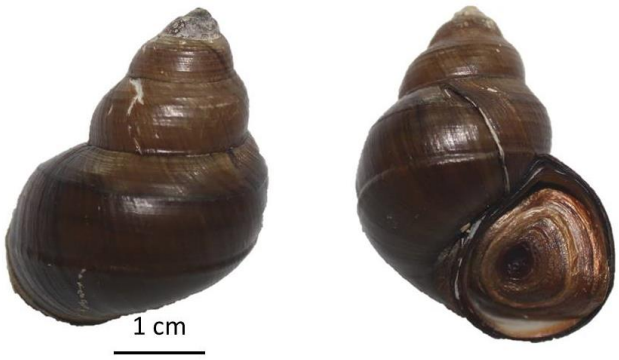
อักษรย่อ	การระบุชนิด	ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา
BBP1	*F. martensi martensi*	
BBP2	*F. martensi cambodjensis*	
TTP	*F. martensi martensi*	
NTP	*F. martensi martensi*	
AMP	*F. martensi martensi*	

อักษรย่อ	การระบุชนิด	ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา
KMP	*F. martensi cambodjensis*	
PBP	*F. martensi martensi*	
PSN	*F. sumatrensis polygramma*	
PPL	*F. martensi martensi*	
CCL1	*F. martensi cambodjensis*	

อักษรย่อ	การระบุชนิด	ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา
SML	*F. martensi martensi*	
NPL	*F. sumatrensis polygramma*	
TTL	*F. martensi martensi*	
MML	*F. martensi martensi*	
CCL2	*F. martensi cambodjensis*	

อักษรย่อ	การระบุชนิด	ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา
NL	*F. martensi cambodjensis*	
PSRN	*F. martensi martensi*	
NTN	*F. sumatrensis polygramma*	
HMN	*F. martensi cambodjensis*	
JPN	*F. martensi cambodjensis*	

อักษรย่อ	การระบุชนิด	ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา
RRN	*F. martensi martensi*	
	F. martensi cambodjensis	
PPB	*F. martensi martensi*	
HHB	*F. martensi cambodjensis*	

อักษรย่อ	การระบุชนิด	ลักษณะภายนอกของเปลือกหอย ซ้าย – ขวา
NAB	*F. martensi martensi*	
NBB	*F. martensi martensi*	
CAB	*F. martensi martensi*	

ตารางที่ 15 ข้อมูลการวัดขนาดของส่วนต่างๆของหอยขม shell length (sl) shell width (sw) last whorl hight (bc) apex to aperture height (ae) spire height (ah) aperture length (ce) aperture width (fg) length from last surture to upper lip (de)

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
SN	SN1	*Trochotaia trochoides*	2.2	2.2	1.1	1.4	0.8	1.3	1.2	0.6
	SN2	*Trochotaia trochoides*	2.2	2.2	1.0	1.3	0.7	1.3	1.2	0.6
	SN3	*F. martensi cambodjensis*	3.3	2.4	1.5	2.0	1.2	1.7	1.3	1.0

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	SN4	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.3	1.5	1.6	0.8	1.7	1.3	0.7
	SN5	*F. martensi martensi*	2.3	2.1	1.3	1.8	1.0	1.5	1.3	0.7
	SN6	*F. martensi martensi*	2.8	2.2	1.4	1.6	0.9	1.6	1.5	0.7
	SN7	*Pila* sp	3.8	3.3	3.0	1.5	0.7	3.0	1.5	0.8
	SN8	*Pila* sp	3.2	3.0	2.1	1.1	0.5	2.7	1.3	0.6
KMB	KMB1	*F. martensi cambodjensis*	3.4	2.7	1.6	2.1	1.3	1.7	1.5	1.0
	KMB2	*F. martensi cambodjensis*	3.4	2.5	1.7	1.8	0.8	1.8	1.5	0.9
	KMB3	*F. martensi cambodjensis*	3.1	2.4	1.5	1.8	1.1	1.7	1.3	0.9
	KMB4	*F. martensi cambodjensis*	3.2	2.8	1.3	2.1	1.1	1.9	1.5	1.2
	KMB5	*F. martensi cambodjensis*	3.3	2.5	1.6	2.0	1.1	1.9	1.5	1.0
	KMB6	*F. martensi cambodjensis*	3.7	2.7	1.8	2.3	1.3	2	1.5	1.1
BBP1	BBP11	*F. martensi martensi*	3.8	2.7	2.2	2.3	1.3	1.9	1.6	1.1
	BBP12	*F. martensi martensi*	3.5	2.7	2.1	2.0	1.0	2.0	1.5	1.1
	BBP13	*F. martensi martensi*	3.0	2.5	1.8	1.8	1.0	1.7	1.4	1.0
	BBP14	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.7	1.9	1.0	1.7	1.4	0.9
	BBP15	*F. martensi martensi*	3.3	2.5	1.8	2.0	1.0	1.8	1.5	0.8
	BBP16	*F. martensi martensi*	2.8	2.5	1.8	1.7	0.8	1.7	1.5	0.8
	BBP17	*F. martensi martensi*	3.5	2.7	2.2	2.0	1.0	1.9	1.5	1.0
	BBP18	*F. martensi martensi*	3.2	2.3	1.8	1.7	0.8	1.9	1.5	0.8
	BBP19	*F. martensi martensi*	3.3	2.5	2.0	1.9	1.0	1.9	1.5	0.9
	BBP10	*F. martensi martensi*	3.5	2.5	2.0	2.2	1.2	1.8	1.4	1.0
BBP2	BBP21	*F. martensi cambodjensis*	3.5	2.5	1.7	2.2	1.2	1.7	1.3	1.0
	BBP22	*F. martensi martensi*	2.4	1.7	1.3	1.4	0.7	0.8	1.0	0.6
	BBP23	*F. martensi martensi*	2.3	1.6	1.1	1.4	0.8	1.2	1.0	0.7
	BBP24	*F. martensi martensi*	2.0	1.2	1.0	1.0	0.6	1.2	1.0	0.5
	BBP25	*F. martensi martensi*	1.8	1.1	1.0	1.0	0.6	1.0	0.9	0.5
	BBP26	*F. martensi martensi*	2.3	2.7	1.0	1.4	0.8	1.2	1.0	0.6
	BBP27	*F. martensi martensi*	2.2	1.1	1.2	1.3	0.7	1.2	1.0	0.6
	BBP28	*F. martensi martensi*	2.3	1.7	1.0	1.5	0.8	1.2	1.0	0.6

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	BBP29	*F. martensi martensi*	2.4	1.7	1.0	1.4	0.8	1.2	1.0	0.7
	BBP20	*F. martensi martensi*	2.3	1.1	1.1	1.4	0.8	1.1	1.0	0.7
TTP	TTP1	*F. martensi martensi*	3.2	2.5	1.8	1.8	1.0	1.7	1.3	0.9
	TTP2	*F. martensi martensi*	2.5	2.2	1.5	1.5	0.8	1.5	1.3	0.7
	TTP3	*F. martensi martensi*	2.3	2.0	1.6	1.3	0.7	1.4	1.2	0.7
	TTP4	*F. martensi martensi*	2.8	2.3	1.8	1.7	1.0	1.5	1.3	0.8
	TTP5	*F. martensi martensi*	2.8	2.3	1.6	1.6	0.8	1.6	1.3	0.8
	TTP6	*F. martensi martensi*	2.7	2.3	1.5	1.7	0.8	1.5	1.3	0.8
	TTP7	*F. martensi martensi*	2.6	2.3	1.7	1.5	0.7	1.5	1.2	0.9
	TTP8	*F. martensi martensi*	3.0	2.4	1.7	1.8	1.0	1.6	1.3	0.8
	TTP9	*F. martensi martensi*	2.8	2.2	1.7	1.7	1.0	1.7	1.4	0.7
	TTP10	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.7	1.1	0.8	1.2	0.9	0.9
NTP	NTP1	*F. martensi martensi*	3.0	1.3	1.2	1.2	1.0	1.6	1.3	0.8
	NTP2	*F. martensi martensi*	2.8	2.0	1.7	1.6	1.0	1.5	1.3	0.8
	NTP3	*F. martensi martensi*	2.5	2.2	1.5	1.5	0.7	1.6	1.2	0.7
	NTP4	*F. martensi martensi*	2.5	2.2	1.5	1.5	0.6	1.5	1.2	0.7
	NTP5	*F. martensi martensi*	2.6	2.0	1.6	1.5	0.8	1.6	1.4	0.8
	NTP6	*F. martensi martensi*	2.5	2.0	1.5	1.4	0.8	1.5	1.2	0.7
	NTP7	*F. martensi martensi*	2.4	2.0	1.5	1.4	0.8	1.5	1.2	0.7
	NTP8	*F. martensi martensi*	2.4	2.0	1.5	1.3	0.8	1.5	1.2	0.7
	NTP9	*F. martensi martensi*	2.4	2.0	1.5	1.3	0.7	1.5	1.2	0.7
	NTP10	*F. martensi martensi*	2.4	2.0	1.5	1.3	0.7	1.5	1.2	0.7
AMP	AMP1	*F. martensi martensi*	2.7	2.1	1.5	1.6	0.8	1.5	1.2	0.8
	AMP2	*F. martensi martensi*	3.0	2.2	1.9	1.7	1.0	1.5	1.2	0.9
	AMP3	*F. martensi cambodjensis*	2.7	2.1	1.3	1.6	0.9	1.4	1.1	0.7
	AMP4	*F. martensi martensi*	2.1	2.0	1.3	1.3	0.6	1.3	1.2	0.8
	AMP5	*F. martensi martensi*	2.6	2.1	1.5	1.6	0.9	1.6	1.2	0.8
	AMP6	*F. martensi martensi*	2.5	2.1	1.3	1.5	0.8	1.5	1.2	0.7
	AMP7	*F. martensi martensi*	2.5	2.1	1.3	1.5	0.8	1.5	1.2	0.7

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	AMP8	*F. martensi cambodjensis*	2.7	2.2	1.4	1.6	0.8	1.5	1.3	0.8
	AMP9	*F. martensi cambodjensis*	2.6	2.2	1.4	1.5	0.8	1.5	1.3	0.8
	AMP10	*F. martensi cambodjensis*	2.6	2.2	1.4	1.5	0.8	1.5	1.3	0.8
KMP	KMP1	*F. martensi martensi*	3.8	3.0	2.0	2.2	1.2	2.1	1.6	1.0
	KMP2	*F. martensi martensi*	3.8	2.7	2.0	2.0	1.3	2.0	1.6	1.0
	KMP3	*F. martensi martensi*	3.7	2.5	1.8	2.0	1.2	2.0	1.5	1.0
	KMP4	*F. martensi martensi*	3.5	2.7	1.8	2.0	1.2	2.0	1.5	1.0
	KMP5	*F. martensi martensi*	3.3	2.5	1.7	2.0	1.2	1.8	1.5	1.0
	KMP6	*F. martensi martensi*	3.5	2.5	1.7	2.0	1.2	1.8	1.5	1.0
	KMP7	*F. martensi martensi*	3.3	2.6	1.7	1.8	1.0	1.8	1.5	0.8
	KMP8	*F. martensi martensi*	3.2	2.4	1.5	1.7	0.8	1.8	1.4	0.8
	KMP9	*F. martensi martensi*	3.3	2.4	1.5	1.8	1.0	1.7	1.4	0.9
	KMP10	*F. martensi martensi*	2.9	2.2	1.5	1.7	0.8	1.6	1.3	0.8
PBP	PBP1	*F. martensi martensi*	3.1	2.3	1.4	1.8	1.0	1.7	1.3	0.8
	PBP2	*F. martensi martensi*	3.1	2.3	1.4	1.7	1.0	1.6	1.3	0.8
	PBP3	*F. martensi martensi*	2.4	2.0	1.3	1.3	0.8	1.5	1.2	0.7
PSN	PSN1	*F. martensi martensi*	3.4	2.6	1.7	2.0	1.2	1.8	1.5	0.9
	PSN2	*F. martensi martensi*	3.3	2.3	1.6	2.0	1.1	1.8	1.4	0.9
	PSN3	*F. martensi martensi*	2.7	2.2	1.3	1.8	1.0	1.7	1.4	0.9
	PSN4	*F. martensi martensi*	2.7	2.1	1.3	1.5	0.9	1.5	1.3	0.7
	PSN5	*F. martensi martensi*	2.7	2.2	1.6	1.7	1.0	1.6	1.3	0.8
	PSN6	*F. martensi martensi*	2.6	2	1.5	1.6	0.8	1.5	1.2	0.8
PPL	PPL1	*F. martensi martensi*	3.4	2.5	1.6	2.1	1.2	1.8	1.5	1.0
	PPL2	*F. martensi martensi*	3.5	2.5	1.7	2.0	1.2	1.8	1.4	1.0
	PPL3	*F. martensi martensi*	2.9	2.2	1.6	1.8	0.9	1.8	1.4	0.8
	PPL4	*F. martensi martensi*	2.7	2.1	1.3	1.2	1.0	1.5	1.2	0.7
	PPL5	*F. martensi martensi*	3.5	2.3	1.7	2.2	1.3	1.7	1.4	1.0
	PPL6	*F. martensi martensi*	3.4	2.4	1.6	2.1	1.3	1.8	1.4	0.9
CCL1	CCL11	*F. martensi martensi*	3.0	2.5	1.6	1.9	1.0	1.7	1.3	0.8

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	CCL12	*F. martensi cambodjensis*	3.8	3.0	1.7	2.5	1.3	2.0	1.5	1.1
	CCL13	*F. martensi martensi*	3.3	2.5	1.5	2.2	1.1	1.7	1.3	0.9
	CCL14	*F. martensi martensi*	3.3	2.4	1.4	2.0	1.2	1.6	1.3	0.8
	CCL15	*F. martensi cambodjensis*	3.3	2.5	1.4	1.8	1.0	1.8	1.5	0.8
	CCL16	*F. martensi martensi*	3.2	2.3	1.5	2.0	1.2	1.7	1.3	0.8
	CCL17	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.6	1.7	0.9	1.7	1.3	0.9
	CCL18	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.6	1.7	0.9	1.7	1.3	0.9
	CCL19	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.6	1.7	0.9	1.7	1.3	0.9
	CCL10	*F. martensi cambodjensis*	3.2	2.3	1.5	2.0	1.2	1.7	1.3	0.8
SML	SML1	*F. martensi martensi*	2.3	1.8	0.8	1.2	0.6	1.2	1.0	0.6
	SML2	*F. martensi martensi*	2.4	2.0	1.3	1.5	0.7	1.5	1.1	0.8
	SML3	*F. martensi martensi*	2.2	1.8	1.2	1.3	0.7	1.4	1.0	0.7
	SML4	*F. martensi martensi*	2.1	1.9	1.3	1.6	0.8	1.5	1.1	0.7
	SML5	*F. martensi martensi*	2.6	2.1	1.5	1.5	0.8	1.5	1.3	0.7
	SML6	*F. martensi martensi*	2.5	2.0	1.5	1.5	0.7	1.5	1.1	0.7
	SML7	*F. martensi martensi*	2.5	1.9	1.3	1.6	0.9	1.5	1.2	0.7
	SML8	*F. martensi martensi*	2.5	1.9	1.3	1.5	0.8	1.4	1.1	0.8
	SML9	*F. martensi martensi*	2.4	1.9	1.4	1.5	0.8	1.5	1.2	0.7
	SML10	*F. martensi martensi*	2.2	1.7	1.2	1.2	0.7	1.3	1.0	0.6
NPL	NPL1	*F. sumatrensis polygramma*	1.7	1.2	0.8	1.0	0.5	1.0	0.7	0.5
	NPL2	*F. sumatrensis polygramma*	1.2	1.3	0.8	1.0	0.5	0.9	0.7	0.5
	NPL3	*F. sumatrensis polygramma*	1.9	1.5	1.2	1.1	0.6	1.0	0.8	0.5
	NPL4	*F. sumatrensis polygramma*	2.0	1.5	1.0	1.1	0.5	1.0	0.8	0.5
	NPL5	*F. sumatrensis polygramma*	1.8	1.5	1.0	1.1	0.6	1.0	0.8	0.5
	NPL6	*F. sumatrensis*	2.0	1.4	1.0	1.3	0.7	1.0	0.8	0.5

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
		polygramma								
		F. sumatrensis								
	NPL7	*polygramma*	1.5	1.0	0.8	0.8	0.5	0.8	0.6	0.4
		F. sumatrensis								
	NPL8	*polygramma*	1.5	1.0	0.8	0.8	0.5	0.8	0.6	0.4
TTL	TTL1	*F. martensi martensi*	3.3	2.2	1.6	2.2	1.2	1.8	1.5	0.9
	TTL2	*F. martensi martensi*	3.3	2.6	1.6	1.9	1.1	1.8	1.5	0.8
	TTL3	*F. martensi martensi*	3.2	2.5	1.6	1.8	1.1	1.8	1.4	0.8
	TTL4	*F. martensi martensi*	3.5	2.7	1.6	2.1	1.3	1.9	1.5	0.9
	TTL5	*F. martensi martensi*	3.0	2.5	1.6	1.8	1.0	1.7	1.4	0.8
	TTL6	*F. martensi martensi*	3.1	2.5	1.5	1.8	1.0	1.6	1.4	0.8
	TTL7	*F. martensi martensi*	3.2	2.4	1.6	2.0	1.0	1.7	1.4	0.8
	TTL8	*F. martensi martensi*	3.2	2.4	1.6	2.0	1.0	1.7	1.4	0.8
	TTL9	*F. martensi martensi*	3.2	2.4	1.6	2.0	1.0	1.7	1.4	0.8
	TTL10	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.5	1.7	1.0	1.5	1.3	0.7
MML	MML1	*F. martensi martensi*	4.0	2.8	2.0	2.5	1.4	2	1.5	1.2
	MML2	*F. martensi martensi*	3.2	2.3	1.7	1.8	1.0	1.7	1.4	1.0
	MML3	*F. martensi martensi*	3.2	2.3	2.0	1.8	1.2	1.8	1.5	0.8
	MML4	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.5	1.6	1.0	1.7	1.3	0.7
	MML5	*F. martensi martensi*	3.7	2.8	2.0	2.2	1.3	2.0	1.5	1.0
	MML6	*F. martensi martensi*	3.2	2.8	1.8	2.0	1.0	2.0	1.6	1.0
	MML7	*F. martensi martensi*	3.3	2.5	1.8	1.8	1.0	1.8	1.5	0.8
	MML8	*F. martensi martensi*	2.8	2.3	1.5	1.7	0.8	1.5	1.3	0.8
	MML9	*F. martensi martensi*	2.8	2.3	1.5	1.6	0.8	1.5	1.3	0.8
	MML10	*F. martensi martensi*	2.8	2.3	1.4	1.7	0.7	1.5	1.3	0.8
CCL2	CCL21	*F. martensi cambodjensis*	3.5	2.7	1.7	2.2	1.2	2.0	1.5	1.0
	CCL22	*F. martensi cambodjensis*	3.4	2.6	1.8	2.0	1.1	2.0	1.5	1.0
	CCL23	*F. martensi cambodjensis*	3.4	2.5	1.7	2.0	1.0	1.8	1.5	0.9
	CCL24	*F. martensi cambodjensis*	3.1	2.4	1.5	1.7	0.9	1.8	1.3	0.8

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	CCL25	*F. martensi cambodjensis*	3.1	2.3	1.5	1.8	1.1	1.7	1.3	0.7
	CCL26	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.2	1.5	1.7	1.0	1.6	1.3	0.8
	CCL27	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.1	1.5	1.5	1.0	1.5	1.2	0.7
	CCL28	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.1	1.5	1.5	1.0	1.5	1.2	0.7
	CCL29	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.1	1.5	1.5	1.0	1.5	1.2	0.7
	CCL20	*F. martensi cambodjensis*	2.6	2	1.3	1.5	0.8	1.4	1.2	0.6
NL	NL1	*F. martensi martensi*	3.1	2.3	1.5	2.0	1.0	1.5	1.3	1.0
	NL2	*F. martensi martensi*	3.0	2.2	1.4	1.7	0.9	1.6	1.3	0.8
	NL3	*F. martensi martensi*	3.0	2.2	1.5	1.8	1.0	1.5	1.2	0.9
	NL4	*F. martensi martensi*	3.0	2.2	1.5	1.8	1.1	1.5	1.3	0.8
	NL5	*F. martensi martensi*	3.2	2.2	1.5	1.8	1.2	1.5	1.3	0.8
	NL6	*F. martensi martensi*	3.0	2.2	1.5	1.6	0.8	1.5	1.2	0.9
	NL7	*F. martensi martensi*	2.5	2.0	1.3	1.3	0.7	1.4	1.2	0.8
	NL8	*F. martensi martensi*	2.5	2.0	1.3	1.3	0.7	1.4	1.2	0.8
	NL9	*F. martensi martensi*	2.5	2.0	1.3	1.3	0.7	1.4	1.2	0.8
	NL10	*F. martensi martensi*	2.2	1.7	1.2	1.3	0.7	1.2	1.0	0.7
PSN	PSN1	*F. sumatrensis polygramma*	2.5	1.7	1.3	1.6	0.8	1.3	1.0	0.8
	PSN2	*F. sumatrensis polygramma*	2.2	1.6	1.2	1.3	0.7	1.2	0.9	0.7
	PSN3	*F. sumatrensis polygramma*	2.2	1.6	1.1	1.3	0.7	1.2	0.9	0.6
	PSN4	*F. martensi martensi*	2.6	2.1	1.9	1.5	1.0	1.5	1.2	0.7
	PSN5	*F. sumatrensis polygramma*	2.2	1.6	1.0	1.3	0.7	1.3	1.0	0.6
	PSN6	*F. sumatrensis polygramma*	2.3	1.6	1.1	1.3	0.8	1.2	1.0	0.7
	PSN7	*F. sumatrensis polygramma*	2.2	1.5	1.0	1.4	0.8	1.1	0.8	0.6
	PSN8	*F. sumatrensis*	2.0	1.4	1.0	1.2	0.6	1.1	0.9	0.6

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
		polygramma								
	PSN9	*F. martensi martensi*	2.6	2.1	1.3	1.8	1.0	1.5	1.2	0.8
	PSN10	*F. martensi martensi*	2.1	1.7	1.0	1.3	0.8	1.3	1.0	0.6
		F. sumatrensis								
NTN	NTN1	*polygramma*	2.4	1.7	1.2	1.5	0.8	1.2	1.0	0.7
		F. sumatrensis								
	NTN2	*polygramma*	2.4	1.7	1.2	1.5	0.8	1.2	1.0	0.7
		F. sumatrensis								
	NTN3	*polygramma*	2.4	1.7	1.2	1.5	0.8	1.2	1.0	0.7
		F. sumatrensis								
	NTN4	*polygramma*	2.2	1.6	1.1	1.4	0.7	1.2	1.0	0.7
		F. sumatrensis								
	NTN5	*polygramma*	2.2	1.6	1.1	1.4	0.7	1.2	1.0	0.7
		F. sumatrensis								
	NTN6	*polygramma*	2.3	1.6	1.1	1.5	0.8	1.2	0.9	0.7
		F. sumatrensis								
	NTN7	*polygramma*	2.6	1.6	1.1	1.3	0.7	1.2	1.0	0.7
		F. sumatrensis								
	NTN8	*polygramma*	2.2	1.5	1.0	1.3	0.8	1.2	1.0	0.6
		F. sumatrensis								
	NTN9	*polygramma*	2.1	1.5	1.1	1.3	0.7	1.2	0.9	0.6
		F. sumatrensis								
	NTN10	*polygramma*	2.1	1.5	1.1	1.3	0.7	1.2	0.9	0.6
HMN	HMN1	*F. martensi martensi*	2	1.8	1.2	1.4	0.6	1.3	1.0	0.6
	HMN2	*F. martensi martensi*	2.8	2.2	1.8	1.7	1.0	1.5	1.3	0.8
	HMN3	*F. martensi martensi*	2.8	2.1	1.5	1.7	1.0	1.5	1.2	0.8
	HMN4	*F. martensi martensi*	2.6	2.0	1.5	1.4	1.2	1.5	1.2	0.8
	HMN5	*F. martensi martensi*	1.4	1.8	1.7	1.5	0.7	1.2	1.0	0.8
	HMN6	*F. martensi martensi*	2.5	1.2	1.5	1.6	0.8	1.4	1.2	0.8
	HMN7	*F. martensi martensi*	2.5	1.3	1.5	1.6	0.8	1.4	1.2	0.8
	HMN8	*F. martensi martensi*	2.8	1.9	1.7	1.7	0.7	1.6	1.3	1.0

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	HMN9	*F. martensi martensi*	2.8	1.3	1.5	1.6	0.9	1.3	1.1	0.8
	HMN10	*F. martensi martensi*	2.6	1.3	1.5	1.5	0.7	1.5	1.2	0.8
JPN	JPN1	*F. martensi martensi*	3.2	2.3	1.5	1.8	0.8	1.7	1.5	0.9
	JPN2	*F. martensi martensi*	3.9	2.9	1.7	2.4	1.3	2.0	1.5	1.2
	JPN3	*F. martensi martensi*	3.3	2.4	1.4	2.0	1.0	1.6	1.4	0.9
	JPN4	*F. martensi martensi*	3.1	2.3	1.5	1.3	0.9	1.8	1.3	1.0
	JPN5	*F. martensi martensi*	4.0	3.0	1.7	2.5	1.5	2.0	1.6	1.1
	JPN6	*F. martensi martensi*	3.5	2.5	1.7	2.0	1.1	1.8	1.4	0.9
	JPN7	*F. martensi martensi*	3.5	2.5	1.7	2.0	1.1	1.8	1.4	0.9
	JPN8	*F. martensi martensi*	3.5	2.5	1.7	2.0	1.1	1.8	1.4	0.9
	JPN9	*F. martensi martensi*	3.2	2.5	1.6	2.0	1.1	1.2	1.4	0.9
	JPN10	*F. martensi martensi*	3.2	2.5	1.6	2.0	1.1	1.2	1.4	0.9
RRN	RRN1	*F. martensi martensi*	3.3	2.7	2.0	2.2	0.8	2.0	1.7	1.0
	RRN2	*F. martensi martensi*	3.5	2.6	1.2	2.0	1.2	2.0	1.7	1.0
	RRN3	*F. martensi cambodjensis*	3.0	2.3	1.2	1.8	1.0	1.6	1.3	0.9
	RRN4	*F. martensi cambodjensis*	2.9	2.2	1.2	1.8	1.0	1.7	1.3	0.8
	RRN5	*F. martensi martensi*	3.1	2.3	1.5	1.9	1.0	1.8	1.3	0.8
	RRN6	*F. martensi martensi*	2.6	2.2	1.5	1.5	0.7	1.6	1.4	0.8
	RRN7	*F. martensi martensi*	2.7	2.2	1.3	1.6	0.9	1.5	1.3	0.7
	RRN8	*F. martensi cambodjensis*	3.0	2.0	1.3	1.8	0.9	1.5	1.2	0.8
	RRN9	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.0	1.5	1.7	1.0	1.5	1.2	0.8
	RRN10	*F. martensi cambodjensis*	2.6	2.0	1.3	1.5	0.8	1.5	1.2	0.8
PPB	PPB1	*F. martensi martensi*	2.6	1.8	1.5	1.5	0.8	1.5	1.2	1.2
	PPB2	*F. martensi martensi*	2.8	2.3	1.5	1.2	1.0	1.6	1.3	0.9
	PPB3	*F. martensi martensi*	2.1	2.0	1.5	1.5	0.8	1.4	1.2	0.7
	PPB4	*F. martensi martensi*	3.0	2.5	1.7	1.7	1.0	1.7	1.3	0.9
	PPB5	*F. martensi martensi*	2.6	1.8	1.8	1.6	0.9	1.4	1.2	1.0
	PPB6	*F. martensi martensi*	2.8	2.1	2.0	1.8	1.0	1.5	1.2	0.8
	PPB7	*F. martensi martensi*	3.0	2.0	1.8	1.8	1.0	1.5	1.2	0.8

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	PPB8	*F. martensi martensi*	2.8	1.8	1.6	1.8	0.9	1.5	1.3	0.8
	PPB9	*F. martensi martensi*	2.6	1.9	1.6	1.5	0.8	1.2	1.2	0.8
	PPB10	*F. martensi martensi*	2.6	2.0	1.6	1.5	0.8	1.2	1.2	0.8
HHB	HHB1	*F. martensi martensi*	3.1	2.5	1.1	1.8	1.0	1.7	1.3	0.8
	HHB2	*F. martensi martensi*	2.5	2.0	1.3	1.5	0.9	1.4	1.3	0.6
	HHB3	*F. martensi martensi*	2.6	2.1	1.3	1.5	0.8	1.5	1.2	0.7
	HHB4	*F. martensi martensi*	2.6	2.1	1.3	1.5	0.8	1.5	1.2	0.7
	HHB5	*F. martensi martensi*	2.5	2	1.3	1.4	0.7	1.4	1.2	0.7
	HHB6	*F. martensi martensi*	2.6	1.8	1.2	1.4	0.8	1.3	1.1	0.7
	HHB7	*F. martensi martensi*	2.2	1.8	1.3	1.3	0.7	1.4	1.2	0.7
	HHB8	*F. martensi martensi*	2.3	2.0	1.3	1.3	0.6	1.4	1.1	0.6
	HHB9	*F. martensi martensi*	2.5	1.9	1.2	1.5	0.8	1.3	1.1	0.8
	HHB10	*F. martensi martensi*	2.2	1.9	1.0	1.3	0.7	1.3	1.1	0.6
NAB	NAB1	*F. martensi martensi*	3.8	3.0	2.0	2.2	1.3	2.0	1.6	1.0
	NAB2	*F. martensi martensi*	3.0	2.5	1.7	1.8	1.0	1.8	1.5	0.8
	NAB3	*F. martensi martensi*	3.0	2.5	1.7	1.8	1.0	1.7	1.4	1.0
	NAB4	*F. martensi martensi*	3.0	2.4	1.6	1.7	1.0	1.7	1.4	1.0
	NAB5	*F. martensi martensi*	4.8	2.7	2.0	2.2	1.2	2.0	1.5	1.0
	NAB6	*F. martensi martensi*	3.1	2.5	1.7	2.1	1.2	1.8	1.5	1.0
	NAB7	*F. martensi martensi*	3.2	2.7	1.8	1.8	1.0	1.9	1.5	1v
	NAB8	*F. martensi martensi*	3.0	2.8	1.6	1.7	1.0	1.6	1.4	0.8
	NAB9	*F. martensi martensi*	3.2	2.3	1.6	1.7	0.9	1.8	1.4	0.8
	NAB10	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.7	1.8	0.8	1.8	1.4	0.8
NBB	NBB1	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.5	1.9	1.2	1.7	1.3	0.7
	NBB2	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.5	1.9	1.2	1.7	1.3	0.7
	NBB3	*F. martensi martensi*	3.4	2.7	2.0	2.0	1.3	2.0	1.7	0.9
	NBB4	*F. martensi martensi*	3.0	2.3	1.5	1.8	1.2	1.7	1.3	0.8
	NBB5	*F. martensi martensi*	4.0	3.0	2.0	2.5	1.5	2.0	1.7	1.2
	NBB6	*F. martensi martensi*	3.8	2.8	1.7	2.4	1.3	1.8	1.5	1.2

อักษรย่อ	ตัวอย่าง	การระบุชนิด	sl	sw	bc	ae	ah	ce	fg	de
	NBB7	*F. martensi martensi*	3.1	2.4	1.6	1.8	1.1	1.8	1.4	0.8
	NBB8	*F. martensi martensi*	3.3	2.4	1.6	1.9	1.0	1.8	1.4	0.9
	NBB9	*F. martensi martensi*	3.2	2.5	1.6	2.0	1.1	1.8	1.5	0.9
	NBB10	*F. martensi martensi*	3.2	2.5	1.6	1.8	1.0	1.7	1.4	0.9
CAB	CAB1	*F. martensi cambodjensis*	1.2	2.2	1.2	2.3	1.4	2.0	1.5	1.0
	CAB2	*F. martensi cambodjensis*	2.7	2.0	1.4	1.6	0.9	1.5	1.2	0.8
	CAB3	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.2	1.5	1.6	0.7	1.5	1.3	0.8
	CAB4	*F. martensi cambodjensis*	3.0	2.3	1.5	1.8	1.0	1.2	1.3	0.8
	CAB5	*F. martensi cambodjensis*	2.8	2.2	1.3	1.8	1.0	1.5	1.2	0.7
	CAB6	*F. martensi cambodjensis*	2.7	2.1	0.9	1.7	0.9	1.4	1.1	0.7
	CAB7	*F. martensi cambodjensis*	2.7	2.0	1.2	1.5	0.8	1.3	1.2	0.7
	CAB8	*F. martensi cambodjensis*	2.1	2.0	1.1	1.4	0.7	1.4	1.2	0.6
	CAB9	*F. martensi cambodjensis*	2.3	2.0	1.3	1.3	0.7	1.4	1.1	0.6
	CAB10	*F. martensi cambodjensis*	2.4	1.8	1.1	1.4	0.8	1.4	1.1	0.6

ตารางที่ 16 ลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (F) ของตัวอย่างหอยขม

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
SF1	TTGGTACTGGATTAAATATTTTGTTCACGCTGAATTAGGTCAATCCGGTACTTTACTAGGTGATG ATCAAATGTATATGGTAAGTGTCACTGCTCAGGCATGAGTTTCAATTTTGTTATGTCAATAATGA TTGGTGGGTTTGGAGATTGATTAATTCCTTTAATGTTAAGTGGTTTTGATATAGCTTTCCATTGAT CAAATAATATAAGTTTCAGGTTATTACCTCCTACTTCATTGCTTCTTTTATCGTCTGTGGCACTTG AGGGGGGTGTGGGGACTGGTCGGACTGTGTATCCTCCTTTGGCTGGGAATTGAGCCCATGTCGG GGGGCTAATCTATTGATTTGGCTATTTTTTCATTGAGTTTTTTTTCATTTTCATTAAATCTATTGA TTTGGCTATTTTTTCATTGCATTTGGCTGGTGCACCATCTATTTTAGGTGCTGTGAATTTTATTAC TACTGTTGTTAATATGCGATGGTGTGGTATGCAGCTAGAACAACTTCCTTTGCGTGGTCAGTAAA AATTACTGCTATTTTATTATTGTTGTCTTTACATGAATTAGCTGGAGCAATTACTATGTTGTGAAC TGATCAAAATTTTAATACTTCTTTTTTGATCCTGCTGGAGGGAGGGATCCTATTATATATCAGCAT TTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCTGAAAGTTTAAAAAAAAATAAGTGGGCA
PSN1	GTTTAATGGTCAGGATAGCATAAAGATATTGGTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTAATGGTCT GGTACTGTTATTAGGTAATGATCAGTTGTATTACGTAATTGTGACAGAAAGGGCGTTGGGGGTAA TTGTTATTNTGGTAATGCCAAGGAGATTTCGTGAGAGTTTAGTTCTCTCCCCCTAACAAGGGTGT

พหน.มฺ.ทิ.ใต ศีล

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
PPL1	TTGGGGCNGGGGAATAANTAAGAAAAGAAANAAAATNAAATGGGCGTGATCGCGGGCTAGCGTC TAATTCTTGTCTGGGGGAGGTGGTCATCGCCCGCCGGGGGCAGAGGTGGAGGTTCAAGGACGTA ATAGAGAAGCGTNTGAATGAAAATACATCTCATTTAATTACGCTAGAGGAAAACACCGTNTCTGG TCTCCTATATGTATTACGGTTTCTCACCAGATTCCTTAGGTATCGAAATATGATATAATAGTTGG NGAAACACATCCCCACCGCAGATCCTCTTAGTACTCGCAAGANNGNNNTTTTACGTAGCTAAAT CAAGNNGCANNNATTGCGTGCAGTTTGAGCGGGGGTGGTCTCGAATCCCAAATACCTAGCTCGG TTCGATTCCGTATGAAGGATGGCGAAAGGCCCTACGTAAGTTAAGTTCGGGCTAGGCTTTACTTC TAACATGAAGGATAGGATGTTCTTTCAACTCGANCTGTTTTACGTAGTNNTCGAGNGGTATNATC AATCCCTGCGCGAAAAGCATANNNCTCGTTNATTGGCTCAGTTATTTCGAAAGTCCCGGNAAC AGGTCGCTTGGAGTTAATGGCTGGGTTGGTTGGTACTGGGTTTGGCTATTTTGATCACGGCAGAA NTAGGACCATCCGGTACTTTGATAGGTGATGATCGATTATATAACGTAAGTGTCACTGCTCATGC ATTTGTAACAATTTTTTTATGGGTAAAGCGATTAATAATTGGGGGGATTGATAATTGATTGATAC GCTAAGCGTTTGAGACTTCGCATTCCACCGTTCAACGTTAATAAATTTCGGGTTTTTGCTTCTTA CTCCATAGTTTGTTTTTCCTTTTATGGTGTGCGGCGGGTGAGAGGGGTCCGGGTACAGTGTNNAC CCTATATCCGCCGTGGAACGGAGAATGTAGCGCGGGCTGGTGGTTCTGTTGATTTAATTTTTTCA TCGTTACATTGTACTGGTGCGTCAACTATATTAGGTTCGGTAAATTTTAGTACTACTGAAATTAAT ATACGGTGGAGGTTAGATACAGTTTAAAGCGTCTACCCCTATTTGTGTGGTCTGTAAGGATTACT GCTATTCTAGTATTATTGTCTTTACCTGTGCTATAAAAGGCGATTACCATATGATTAACTGATCAG AACTTCAATACTTCATTTTGCGAGCCTGCTGGTGGACGGATATCCAATTTTAAATCATCATTTGT ACTGATTCTTTGGTCACCCATCAAAATTAAATATCAGCATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCTGA AGTTTAAG
HHB1	TTAGTTTGGTGTGGTGGTCTGGGTAGGTTGGTGCGGGGTGAGTATTTTGATTCGTGTAGAATTAG GTCAGTCTGGTGCTCTATTAGGTGATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTGACTGCTCGTGCGTTT TGATTATAATCTTTTTTATGGTTATGCCAATAATGATTGGTGGATTCGGCAATTGATAGATGCTTC TGATGTGGCGTGCCTCCGATAGAATATTACGACTTTCGGGTAATCGCCTCCTGCGGTTATTACCT GGGGGGGGATTACTTCTTTTATCTTCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTGCCGGTACTGGTTGGACTGT GTATCCACCGTTGGCTGGGAATTTGGCTCATGCTGGGGGGTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCTT TGCATTTGGCTGGTGCGTCGTCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATATGC GACGGTGTGGTATACAATTTGAGCGTCTTCCTTTATTTGTTTGGTCAGTGAAGATTACTGCTATT TTGCTGTTACTATCTTTGCCTGTGTTGGCTGGGGCTATTACTATATTATTAACTGATCGGAATTTT AATACTTCTTTTTTTGATCCAGCAGGGGGTGGTGACCCAATTTTATACCAGCATTTATTTTGATTT TTTGGTCACCCTGGAAGTTTA
KMB1	ATTTTGTTTGGTGTATGATCTGGGTTGGTTGGTACTGGATTAAGTATTTTAATTCGTGCAGAATT AGGTCAATCCGGTACTTTGCTAGGCGATGATCAATTGTATAAGGAAAGTGTCACTGCTACAGGCA

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
	CGAGTTTCTGTTTTTTTATGTCTATAAGGATTGACAGGTGTGGGAATTGATTATTGCCTGTACCG
	CTAAGTGGTTGTGATNCAGATTTCCATTTTCCAAAGAAAAAAAATTTCAGGTTATTGCCTCTTAC
	ACCATAGCTACTTCTACCTTCTGTGCTACTTGAGGGGAGGGAGGGGTCTGGTCAGACTGTGCATC
	CTATACCCCCTGGGAACGGANAATAGGTCGAGGGNNGGGTGTACTGATTAGGTTACTTTTTCNT
	TGTTTTATTTATCTGTATCAGTAGCTATATTGAGTGCACTAGCTGGACATAGCATTACGATTAGTA
	CACCCTCCCGTTGGNNNTGCGGTNNAACTCTACTAACAATTTTTTGATGTAGGGATGAGAGGGT
	GGCAATACCTTTA
BBP12	CCCGATTTTGGTCCCTGAAGTTAATGGTCAACAAATCATAAAGATATTGGTGATTTTTTGGTCAC
	CCTGAAGTTTAATGGTCAACAAATCATAAAGATATTGGTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTAA
	TGGTCAACAAATCATAAAGATATTGGTGATTTTTTGGTCACCCTGCGGTTGGATTCCGCACACAT
	TATGAGCATCAAGTGCGGCTGTTCGGCGCCTACCTTGCTTGAGTTTCTGAGTTCTCGGCCGGCGC
	GCACCTTCGTTAGGGCGGCTTTTATCATCTGCTGCTGTCGAGGGAGGGGTTGGTACTGGTTGGA
	CTGTGTATCCACCCTTGGCTGGGAATTTGGCTCATGCTGGGGGGTCTGTTGATTTAGCTATTTTT
	TCCTTGCATTTAGCTGGTGCAGCATTTATTTTAGGTGCTGTAGATTTTATTACTACTGTAATTAAT
	ATGCGATGATGTGGTATACAATTTGAGCATCTTCCTTTATTAATATGATTGGTAAAAATTACTGCT
	ATTTTATTGTTATTATCTTTACCTGTATTAGCAGGAGCAGTTACTATGCTGTTGACTGATCGGAAT
	TTTAATACTTCTTTTTTTGACCCCGCACGTGGGGAGATCCAATTTTATATCAGCATTTGTTTTGAT
	TTGTTTAGATTTTTTGGTCACCCAGAATTATTAATGAGGGTGCCCGAGTCAATCAGGATCATAGC
	AATATGAGTAAGGTGTGTCAGGCATCCCATCGGGGGCTGACGAGAGGACTAAACGCACCCACCC
	AACTTGGTTGAGGCGAATCTACGACTCACTAGGGGCNNNACGGGAAACCTCATCACACTCACCC
	NNGAAGAGGGNNGGAGAATCCACTTGGACCACCCTAGGNNGCTGGTTGAAGCCCTC
KMP2	TTCGTTTGGTGTAAGGTCTGGGTTGGTTGGTACTGGATTGAGTATTTTGTTCACGCTGAATTAAG
	TCAATCCGGTACTTTGCTAGGTGATGATCAATTGTATAAGGTAAGTGTCACTGCTCAGGCATGAG
	TTACAATTTTTTTATGGCAATAACGATTGGTGGGTTTGGAGATTGATTAATTCCTTTAACGCTAAG
	TGGTTTTGATGCAGCTTTCCATTGATCAACCTAATATAAGTTTCAGGTTATTACCTCCTACTTTAT
	AGCTTCTTTTATCGTCTGTGGCAGGTGAGGGGGGTGTGGGTACTGGTTAGACTGTGTATCCTCCT
	TTGGCTGGGAATTGAGACCATGTTGGGGGGCGAAGCTACTGATTAGGCTATTTTTTCATTGATTC
	TTTTATTCAGTTGCATCAAATCTATTGAGTGGGCTATTTTTTCATTGCATTGGGCTGGTGCACCAT
	CTATTTTAGATGCTGTGAATTTGATTACTACTGTTGATAATATGCGATGGTGTGGTATGCAGCTA
	GAACAACTTCCTTTGCGTGGGCAGTAAAAATTACTGCTATTATATTAACGTAGTCGTTACATGAA
	TAAACTGGAGCAATTACTATGTTGTGAACTGATCAAAATTTTAATACTTCTTTTTTGATCCTGCTG
	AAGGGAGGGATTCCTATTAAATATCAGCATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCTGGAAGTTTAAAG
TTP1	CAATTTTTTTGTTTGGTGTGTGAGTCGGGATTAGTTGGTACTGGATTGAGTATTTTAATTCGGGC
	AGAATTAGGTCAATCTGGTGCTTTATTAGGTGATGATCAGTTATATAATGTAATTGTGACTGCTC

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
	ATGCATTTGTCATAATTTTTTTTATGGTTATACCAATAATAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAA
	TTCCTTTGATATTAGGTGCTTCTGATATGGCTTTTCCTCGGTTAAATAATATAAGCTTTTGATTGT
	TACCACCTAGATTACTACTTCTTCTATCATCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTGCCGGTACTGGTTGA
	ACTGTATATCCACCATTGGCTAGTAATTTAGCTCATGCTGGTGGATCTGTTGATTTGGCTATTTTT
	TCTTTACATTTAGCTGGTGCATCATCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTGATTAAT
	ATACGATGATACGGTATGCAATTTGAACGTCTTCCATTATTTGTATGGTCGGTGAAAATTACTGC
	TATTTTGTTATTATTGTCTTTACCTGTATTGGCTGGAGCAATTACTATATTATTAACTGATCGAAA
	TTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGGGGGGATCCAGTTTTATATCAACATTTGTTTTG
	ATTTTTTGGTCACCACTGAAAGTTTAAAT
NTN1	TTATTTTGTTTGGTTAAGGAGTCTGGGTTGGTTGGTACTGGGTTAAGTATTTTGATTCATGCAGA
	ATTAGGTCAATCTGGTACTTTATTAGGGTGATGATCATATGTGATAAAGGGAATTGGGACCGGCC
	CATGNTTATGATTTGATTTATGGTTATGCCAAGCATAATTGNGTGGGTTGGGTAATGTCCTCTAA
	TATTAGGTGCTTCTGACATGGCTTTTCCTCGGTTAAATAATATGAGTTTTTGGTTATTATCACCTA
	GTTTATTACTTCTTTTATCATCTGCTGTTGTCGAAGGAGGTGTTGGTACTGCACCCTTGGCTGGG
	AATTGGCTCGTGCTGGGTGGTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCCTTACATTTACCTGGTGCATCAT
	CTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATATGCGATGATGTGGTATACAATTTG
	AGCATCTTCCTTTATTAGTATGATTGGTAAAAATTACTGCTATTTTATTATTATCTTTACATGTAG
	TAGCAGGAGCAATGACTATGCTGTTGACTGATCGGAATTTTAATACTTCTTTTTTGAAAATTTTAT
	ATCAGCATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTAAGACCCGATTTTGAATCAGAAGTTGT
	TTTGATTTTT
RRN2	CAATTNTTTTGTTTGGTGTTGATCAGGATTAGTTGGTACTGGATTGAGTATTTTAATTCGGGCAG
	AATTAGGTCAATCTGGTACTTTATTAGGTGATGATCAGTTATATAATGTAATTGTGACTGCTCAT
	GCATTTGTCATGATTTTTTTTATGGTTATACCAATAATAATTGGTGGATTTGGAAATTGATTAATT
	CCCCTGATATTAGGTGCTTCTGATATGGCTTTTCCTCGGTTAAATAATATAAGCTTTTGATTGTTA
	CCACCTAGATTACTACTTCTTTTATCATCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTGCCGGTACTGGTTGAAC
	TGTATATCCACCATTGGCTAGTAATTTAGCTCATGCTGGTGGATCTGTTGATTTGGCTATTTTTTC
	TTTACATTTAGCTGGTGCATCATCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTGATTAATAT
	ACGATGATACGGTATGCAATTCGAACGTCTTCCATTATTTGTATGGTCGGTGAAAATTACTGCTA
	TTTTGTTATTATTGTCTTTACCTGTATTAGCTGGAGCAATTACTATATTATTAACTGATCGAAATT
	TTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGGGGGGATCCAGTTTTATATCAACATTTGTTTTGAT
	TTTTTGGTCACCTGAAAGTTTAA
JPL1	CCGATTTTGGTCCCTTGAAGTTGAATGGCNGAACAAATCATAGAAGATATTGTGTGATTTTTTGA
	GTCACCGCTGNAAGTTTAATCAGTCAACNTACCATACTGAGAGATGACCAGTTGTATAATGTAAT
	TGTGACTGCTCATGCGTTTGTTATGATTTTCTTTAGGGTTATGCCAATAATGATGGGGGGGTTGG

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
	GAAATTGATTAATTCCTTTAATGTTAGGTGCTTCTGATATAGCTTTCCTTCGATTAAATAATATAC
	TGGTTAGGACATCCCCCCTCAGTGTTTCGTTTCTCTTCTCCTGCACTGCAGGGGGCTGTGGGGAC
	GACTCGGATTGTACAGTCTCCCCCCCTGGGGAAGGAAACCCGGCTCGGGGGGGGGGGCTCTGTAG
	ATTTCTCTATTTTTTCTTCGCTTTTCCCGGGGGATCCCTCTATTTCAGGATCTGTAAATTGTATTG
	CAACTGAATTAAATAGCCGAAAAGATGATACAAATTGAGAGCCACTCCTTAAATGTGTTGGTTCG
	TGAAAACTCACGGCATTTGTGTTATAAGGGTCTTGCCCTGTAAACAGGGGAGCTCTCGCAATCTT
	AAAAANGAACCAAAATCAAAAAAT
SF2	AGGTCTGGGTTGGTTGGTACTGGATTAAGTATTTTAGTTCATGCTGAATTAGGTCAATCCGGTAC
	TTTACTAGGTGATGATCAATTGTATAAGGTAAGTGTCACTGCTACGGCATGAGCGTCTGTTTTTT
	TATGTCTATAAGGATTGACGGGTGTGGAAATTGATTATTGCCTTTACCGCTAAGTGGTTGTGATA
	CAGATTTCCATTGATCACAGAAAATAAATTTCAGGTTATTGCCTCCTACACCATTGCTACTTCTTC
	CTTCTGTGGCACTGGAGGGGGGGGAGGGGACTGGTCGGACTGTGCATCCTCCACTCCCTGGGAA
	GGGAGACTATGTCGGGGGGCGGAGGTATTGAGTTGGCTATTTTTTCATTGAGTTTTTTGTCATTT
	GCATCAACTCTATTGATTTGGCTAGTTTTTCATTGCATTAGGATGGTGCACCATCTATTTTAGGT
	GCTGTGAATTTTATTACTACTGTTGTTAATATGCGATGGTGTGGTATGCATGTTGAACAACTGCC
	TTTGCGTGGGCAATAAAAATTACTGCCATTTTATTATAGTGATCATAACATGAATACTCTGGAGC
	AATTACTATGTTGTGAACTGATCAAAATTTTAATACTTCTTTTTTGATCCTGCTGGAGGGAGGGA
	TCCTATTAAATATCAGCATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCTGAAAGTTTA
CCL12	TTTGTCCCTTGGAGGTTAATGTCTGAACCTAGGCATAGGAACTGGGGTGAGTATTTTGATTCANG
	CTGAATTAGGTCAGTCTGATACTTTGTTAGGTGATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTAACGGCT
	CATGCGTTTGTTATAATTTTTTTTTATGAGTTATACCAATAATAATTGGTGGGTTTGGTAATTGATT
	GATTCCTTTGATGCTAGGTGCTTCTGATATGGCTTTTCCTCGATTGAATAATATAAGTTTTTGGTT
	ATTGCCTCCTAGTTTGTTACTTCTTTTATCTTCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTGCTGGTACTGGCT
	GGACTGTGTACCCACCGTTGGCTGGAAATTTGGCCCATGCTGGGGGGTCTGTTGATTTAGCTATT
	TTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCGTCGTCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATT
	AACATACGATGGTGTGGTATACAACTTGAGCGTCTTCCTTTATTTGTGTGGTCAGTGAAGATTAC
	TGCTATTTTGTTGTTACTATCTTTGCCTGTGTTGGCTGGGGCTATCACTATGCTATTAACTGATCG
	AAATTTTAATACTTCTTTTTTTGACCCGGCAGGGGGTGGTGATCCAATTTTATATCAGCATTTATT
	TTGATTTTTTGGTCACCCTGAAATTTAATA
KMB4	CCAATTTTGGTCCCTTGGAAGTTTNATGGCTCAACAAATCATAGAAGCATAGTNNNTAGATTTTT
	TAGTCACGCTGAATTGGAATCAGTCTGGTGCTTTATTAGGTGATGATCAATTGTATAATGTAATT
	GTGACTGCTCATGCATTTGTTATAATTTTTTTTATGGTTATGCCAATAATAATTGGTGGGTTTGGT
	AATTGATTGAATCCATTAATGTTACGGGCTTCCGATAAAGCTTTCCCTCCGTTAAATAATATAAGT
	TTTTGGATATTACCACCTAACTTATTACTTCTTTTATCGNNNGCTGGAGATGAAAGCGGAGCTGG

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
NTN2	TACAGGGTGGACCGTCTACCCACCATTGGCTGGTAATTTAACGCAGGCTGGTGGGTCTGATGATT TAACTATTTTTTCTCTACACTTGGCGGGTGCCTCATCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACAA CTGTAATCAATATACGATGGTACGGTATACAATTCGAGCGTCTTCCTTAATTTTGGTGGCCATTA AAGATTACTGCTATTTAGTTATTATAATCGTACCCTCTGTAGGCAGGAGCAATCACTATACTATTA ACTGATCTAAATCTTCATACTTCGATTCCACATCCAGCAAGAGGAGATGACCCAANNTTATACCT TCATTTATGTTCATTTTTTGTTCTCACAGCGGAGTAAAACTTTC CCAATTTTGGTTCCCTGAAGGTTAATGGTCAACAAAGCATAGAAGATATTGGNGATTTTTTGNGT CACCGCCGAAGTATAATCAATCTGGTACTTTATTAGGTGATGACCAGTTGTATAATGTAATTGTG ACTGCTCATGCGTTTGTTATGATTTTTTTTTGGGGTAACCCCCAAAAAATTGGGGGATTTGGAAA TTTGATAATTCCCTTAGAGGTAGGGGGCTCCAGATAGATTTTCCCCCCATTAGAAAAATACGATT TTGGGGTTACCACCCCCGATGATACTACTTTTTTCAGCATCTGCTGCTGGGGGGGGGGGTGCTG GCACGGGCAAAACTGTACCCCCCCCGGGGGGCTGAAAATTTCACACGGGGGTGGGGCTCTGGAGA TTTATCTGTTTTNNCTTCATTTTTCGCGGGGGCACCCTCTATTACAGGCACTGTAATTTTTATTAC TCCTGAGATAAATGTGCGAAAATGGGGTATGCATTGCGAGCGTCTTCTTTTATTTGTGTGGCCAG AAAAATTCACCGTTTTTTTATTATTATTGTCTTTGCCTGTGTAAGCGGGGGCTATCCCTATTTTGT AAACAGACCAAATTTTAAATACTTCTTTTTTTGATCCGGCGGGGGGAGGAGACCCAATTTTGTAT CATCATCTATTTTGNTTTTTTGCTCACCCAAAAATAAAAA
RRN3	CAATTTTTTTAATTTGGATGTGAAGGTCTGGTCTAGTTGGTACTGGGTTGAGTATTTTGATTCGT GCAGAGTTAGGTCAGTCTGGTGCTCTATTAGGTGATGACCAATTATATAATGTAATTGTGACTGC TCATGCATTTGTTATAATTTTTTTTTATGGTTATACCAATAATAATCGGTGGGTTTGGTAATTGATT AATTCCATTGATGTTAGGTGCTTCTGATATGGCTTTTCCTCGATTGAATAATATAAGTTTTTGGTT ATTACCTCCTAGTTTATTACTTCTTTTATCTTCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTGCTGGTACTGGTTG GACTGTGTACCCACCGTTGGCTGGGAATTTGGCTCATGCTGGTGGGTCTGTTGATTTAGCTATTT TTTCTTTGCATTTGGCTGGTGCATCGTCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATTA ATATGCGATGGTGTGGTATACAATTTGAGCGTCTTCCTTTATTTGTTTGGTCAGTGAAGATTACT GCTATTTTGCTGTTGCTATCTTTGCCTGTGTTGGCTGGGGCTATTACTATATTATTAACTGATCG GAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCAGGGGGTGGTGATCCAATTTTATACCAGCATTTATT TTGATTTTTTGGTCACCCTGGAAGTTTAAAG
CAB1	ATTTTTGGTCCCTTGGAGGTGTTAAGGTCTGGGTNGCATGGTACTGGTGTTAAATATTTTAATTC CTGCAGAATTAGAGTCAATCTGGTACTTTGTTAGGTGATGACCAGTTGTATAATGTAATTGTGAC TGCTCATGCGTTTGTTATGATTTTTTTTTATGGTTATGCCCATAATGATTGGTGGGTTTGGTAATTG ATTAATTCCATTGATGTTAGGTGCTTCTGATATAGCTTTTCCTCGATTGAATAACACGAGTTTTTG GTTATTACCACTCTATTGATATTACTTCTTTTATCATCTGCTGCTGTTGACGGTGGGGCCTGGGA CTGACTGAAGTGCATATCCGCCTGTGGATGGAAATTTGGCACATGCGGGAGGCTCTGTAGATTTA

พหุน ปณฺฑิโต ภิกฺขุ

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
	TCTATTTTTGCCTAACTTTTAGCTGGAGCATCATCGAGTTCAAGCGCTGTTAAGTGCAGTACAAC
	TGAGAACAACAGGCGATAATGTGCTATGCAATGCTAGCCTCTTCCTTTATTTGCGTGTGCGTGGA
	CAATTACTGCTACTGCATTATTATTGTCGTTGCCTGTGTTAGCAGGAGCTATTACTATGACGATA
	ACTGATCCAAATTTAAATACTTCTTTTTCTGATCCGATCCTGACGAGGTGATCCAATTTTACATCA
	TCACTTATTTTGATTTGATGGTCAGCCTGAACTGTTAATTTAATACAATCCCATAANCAATCAACC
	TTCTCACTCGCGAGNNNNTTTAGCTCTCTCGAGAACCTGGCTATAGTTTCTCTGCTATCCTNNNT
	TCATGNAGTTCCAATCCTGCTCTTGCGACAGA
PSN2	CCGATTTATTTTGTTTGGTTAAGATCTGGGGTTGGTTGGTACTGGATTAAGTATTTTAATTCATGC
	AGAATTAGGTCAATCTGGTACTTTATTAGGTAATGATCCATATGTGATAAAGGAATTGGGACCGG
	CCATGCCTTATAATTTTATTTATGGTTATGCCAATAATAATTAGGTGGGTTTGGTAATGTCCATCT
	AATATTAGGTGCTTCTGACATGGCGCTTTCCTCGGTTAAATAATATGAGTTTTTGGTTATTATCAC
	CTAGTTTATTACTTCTTTTATCATCTGCTGTTGTCGAAGGAGGTGTTGGTACTGCACCCTTGGCT
	GGGAATTGGCTCGTGCTGGGTGGTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCCTTACATTTACCTGGTGCA
	TCATCTATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATATGCGATGATGTGGTATACAA
	TTTGAGCATCTTCCTTTATTAGTATGATTGGTAAAAATTACTGCTATTTTATTATTATCTTTACAT
	GTAGTAGCAGGAGCAATGACTATGCTGTTGACTGATCGGAATTTTAATACTTCTTTTTTGAAAAT
	TTTATATCAGCATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCTGGAAGTTTAAGACCCAATTTTGTATCAGCA
	TTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTAAAA
NBB1	CCGATGNATTTTGTTTGGTGTGTGGATCTGTNCTTGGTTGGTACTGGGATTAAGCTATTTTANAT
	TCAGTGTCAGAATTAGGTCAATCTGGTACTTTGACTCAGGNTGCATGTATCAGAATGTAGATGGG
	GANNTGTGACAGCTCAGGTTTTTGTTACATTTTTATTCCGGGTATTGCGAATGGTATTTGGGGGG
	AGTTGGTAATTCGCTTAAAATCCTTGTGCGTCTGAGGCATTCTCTTTCCTCTGTATGAATAATAT
	GAATATTTACGNGGTATATATCGCCCCTATACTTCATGGTTCCTTTAACCAATCGGTGCTGTTCA
	GAGGGTGTGGGGGCAGTGGGTACTGTGTGAACCCTATATTCCTCTGAATGTATCGCGCGTCAAT
	GCTGGTTGGCGGNNCTCGTTAGAGTTTATGTATATATTTTAATCTATTTCATTCAGCCATTGTAC
	CAGGCGATTTAACGTAGGTGTGGAGATGGGGATAAATTTTAATTATCCAAGTATACTAAGTGACA
	CCGATCATACAATTAGAGAAGTCTAAACTTTATTACCTACTGGTTGATTAAAAATNACTGATGTG
	CTGTTATTGTTGTATTAATCCCNTGTGAGTGTGTCACAATTGATCATGTGTCCAATACTGATCAA
	AATTGCAATACTTGAATACTTCGATACTGCGATGCCGTAGTGGGATGAATGATGGAGGTATATCA
	ACCTTCTATTTTGGATTTATTGTTCACGCAGGGGATCACAATTGAATATCAAGCATTTGTTTTGAT
	TTTTTGGGTCACCCTGGAAGTTTAAAG
HMN2	CAANAATTTAGTTGGTGTGTGGTCTGGGTTAGTTGGTACTGGGTTAAGTATTTTGATTCGTGCAG
	AGTTAGGTCAGTCCGGTGCTTTGTTAGGTGATGACCAATTATATAATGTAATTGTGACTGCCCAT
	GCATTTGTTATGATTTTTTTTATGGTTATGCCAATAATAATTGGTGGGTTTGGTAATTGATTGATT

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
	CCGTTAATGTTGGGTGCTTCTGATATGGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATAAGTTTTTGGTTATTA
	CCTCCTAGTTTGTTGCTTCTTTTATCGTCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTGCTGGTACTGGTTGGAC
	TGTGTATCCTCCGTTGGCTGGTAACTTGGCTCATGCTGGTGGGTCTGTCGATTTAGCTATTTTTT
	CTTTACTTCTACCTGGAGCATCACCTATTTTAGGTGCGGTAAATTTTATTACAACTGTACTTATTA
	TGTGGTGGAGTGGTATGCAATTTGAGG
HMN2	CAANAATTTAGTTGGTGTGTGGTCTGGGTTAGTTGGTACTGGGTTAAGTATTTTGATTCGTGCAG
	AGTTAGGTCAGTCCGGTGCTTTGTTAGGTGATGACCAATTATATAATGTAATTGTGACTGCCCAT
	GCATTTGTTATGATTTTTTTTATGGTTATGCCAATAATAATTGGTGGGTTTGGTAATTGATTGATT
	CCGTTAATGTTGGGTGCTTCTGATATGGCTTTCCCTCGGTTAAATAATATAAGTTTTTGGTTATTA
	CCTCCTAGTTTGTTGCTTCTTTTATCGTCTGCTGCTGTTGAAAGTGGTGCTGGTACTGGTTGGAC
	TGTGTATCCTCCGTTGGCTGGTAACTTGGCTCATGCTGGTGGGTCTGTCGATTTAGCTATTTTTT
	CTTTACTTCTACCTGGAGCATCACCTATTTTAGGTGCGGTAAATTTTATTACAACTGTACTTATTA
	TGTGGTGGAGTGGTATGCAATTTGAGG
SML1	CCAATTAATTTTTGTTTGGGTGTTATGGATCTGGGTTGGTTGGTACTGGGGTTAAGTATTTTAAT
	TCGTGCAGAATTAGGTCAATCTGGTACTTTGCTAGGTGATGACCAGTTGTATAATGTAATTGTGA
	CTGCTCATGCGTTTGTTATGATTTTTTTTATGGTTATGCCAATAATGATTGGTGGGATTTGGAAAT
	TGATTAATTCCTTTAATGTTAGGCGGCTCCGATAAGGCTTCCCCTCTATTAGATTACTATCTGGT
	GATGCCAACCACCTCCATTGGTACTTCTATCATCAGCAGCAGTTGAGGGGGCTGTTGGTACTACT
	TGGACTGAGTACCACCCTCGCCTGGGAATTGAACCCATGTTGCGGGGCTGAGCTATGGATTTGG
	CTATTAATTTGCCTATTTTTTCATTGCATCTGCCTGGTGCACCATCTATTTTAAGTGCTGTAAATT
	TTATAACAACTGATGATGATATGCGATGGTGTGGCATGCACCTTGAACAACTTCCTTGGTGAGGA
	CAATAAAAATTACTGCTATATTATTATTGTTGGCTTTACATGTATTAGCTACAACAATTACTATGT
	AGTGAACTGATCAAAATTCTAATTTTTCTTTTTCGATCCGGCGGGATGGACCGATCCTATATCAT
	ATCATCATTTGTTTTGATTGTCCGGCCACCCAAAAAAATTAAAG
TTL1	GTATTTTGTTTGGTGTGTGGATCTGGGTTGGTTGGTACTGGGTTAAGTATTTTAATTCGTGCAGA
	ATTAGGTCAATCTGGTACTTTATTAGGTGATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTGACTGCTCATG
	CGTTTGTTATAATTTTTTTTATGGATATGCCCATGATGGGTGGGGGGGTTGATTAATTAGTTAAT
	CCCTTAGAGTATGGGGGGTTCCATAGCGCCTTTCCCCCCGGAAAAAAAAAAGGTTTTTGGGTCAT
	ACCCCCTTGCTTCGTTTCTCCTATCACCTGCTGCTGCGGAGGGGGGGGTGGGGGCGGCGGGTGA
	GCCGGTCCACCCCCGGGCGGGGGGANTTTACCACGCCGGCGGGGCGATGGTTTAGCCAATTTTT
	TATTTCCTTTTAGTGGCGGCGCNNCCAATCTTCGGGGGGGGAAATTTATTACTACTGTAATTAAT
	GTACGATGATGTGGTATACAATTTGAGCGTCTTCCTTTATTTGTATGGTCGGGGAAAATTACCGC
	TATGCTGTTGTTATTATCTTTACCTGTATTAGCGTGAACACTAAAGATGATNNNTACTGATCGAC
	ATTTTAAGACTTCTCTTTTAGAACCTCCATGTGGGGGACAGCTAACTAAATCGAAATCTTCATTTT

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
	TCTTTTTTTTGGTCGCCGGGNAGCCGAACAACTATAAGCTAACGGCATGAGTTTTGAGTCACCCG GCACTCTAAAGTTTAAAG

ตารางที่ 17 ลำดับเบสบนนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (R) ของตัวอย่างหอยขม

ตัวอย่าง	ลำดับเบส
SF1	CAAATCTTATTAATTGTTGGACACCTCCCTTCAGGGTGATCAAAAAATAAGCAATAAAATTTTGA TCTGTTAACCAAATAGTAATTGCTCCAGCTAATACATGGAAAGACAACAATAATAAAATAGCCGT AATTTTTACTGACCACACCAAGGAAGTTGTTCAAACTGCATACCACACCATCGCATATTAACAAC AGTAGTAATAAAATTCACAGCACCTAAAATAGATGGTGCACCAGCCAAATGCAATGAAAAAATAG CCAAATCAATAGATTTAATGAAAATGAAAGAAAACTCAATGAAAAAATACGGCAAATCAATAGAT TAGCCCCCCAACATGGGCTAAATTCCCAGCCAAAGGAGGATACACAGTCCAACCAGTACCAACA CCCCCCTCAACTGCCACAGACGATAAAAGAAGCAATGCACTAGGAGGTAATAACCAGANNCTTA TATTATTTAATCAATGGAAAGCTATATCAAAACCACCTAACATTAAAGGAATTAATCAATTTCCAG ACCCACCAATCATTATTGACATAACTATAAAGAAAATCATAACAAACTTATGAGCCATTACAATTA CATTATATCATCACCTAGCAAAGTACCGGATTGACCTAATTCAGCATGAATTAAAATACTTAATC CAGTACCAACCAACCCAGATCATGCACCAAAAAAAATATACAGAGTCCCAATATCTTTATGATTT GGTTGACCAAA
PSN1	CCAATCTTTTGAATTTGTTGACCAATTAAACTTCAGGGNGTTCCGATCAGTCAACAGCATAGTAA TTGCTCCTGCTACTACATGTAAAGATAATAATAAAATAGCAGTAATTTTTTACCAATCATACTAATA AAGGAAGATGCTCAAATTGTATACCACATCATTGCATATTAATTACAGTAGTAATAAAATGTACA GCACCTAAAATAGATGATGCACCAGGTAAATGTAAGGAAAAAATAGCTAAATCAACAGACCACCC AGCATGAGCCAATTCCCAGCCAAGGGTGCAGTACCAACACCTCCTTCGACAGCAGCAGATGATA AAAGAAGTAATAAACTAGGTGATAATAACCAAAAACTCATATTATTTAACCGAGGAAAAGCCATG TCAGAAGCACCTAATATTAGAGGAATTACCAAACCCACCAATTATTATTGGCATAACCATAAAAA AAATTATAACAAACGCATGGGCAGTCACAATTACATTATACAACTGATCATTACCTAATAAAGTA CCAGATTGACCTAATTCTGCATGAATTACAGTACTTCATCCAGTACCAACCAACCCGGATCATAT ACCAAAGAAAATAGACGAAAGCCCCCTATCTTTATGATGTGTTGACCAGCAATTGCAACGATACA TGAGGGCTGTAATGNCATTGCATTTGACCTGTTCTATTGACACAGAAGACCTCCATATCTGCGAG GAGGANNNGATGGCCAAGCCATCCGCTACGGAGCCGGCAAAGT
PPL1	CAATCTTNTGAATTGTTGACACCTCCCTTCCAGGGGCGATCAAAAAATCAACTATTTATTTTTGG TTCAGTTAATAAGATGGAATTCCCCCCTGCAAGCCCAGGCAAGGACACTAAAAATAAATTACCTT AATTCTTTTTGGACCGACCAAAGAAGGTGTTACACTCGCACAGCATCCCATCCCACCGTATCTTC ATTACTGTTTTAATTAACTTTACCGCACCTAGATGGTGTGACAGACCAGTGAACTGTAAGGAAAG

AATAATTAATTCAACTGATGCACCTGCATGCGATGAGTTGCCCGCCGACGGCGGAGATGATGTTC
AACCCGCCACCATNNCCACTTTCCCCCGCCGCAGGCGGTATAAAGTAATAACCAACTAGGGGGT
ACCCCTCAAACTGTCACATTTTTTAAACGAGGAAAGGCTATATCGGGTGCTCCTCACATTCTTGG
ATTCAATCATTTACGGAACCCTCTATTTATTACTGGTATAACCATAAGAAATATTCTTACTCCTGA
CTGGGCAGTTACTATTGCCATAACTATTTGATAATGACCATCATAAAGCACCAGACTGCCCTGAC
CCTGCTCTGATCGCAATACTCAACCCCGTCCTGACCAACCCTCACCACGAACCAAAATATAATAA
ACCAGGACCAACTATCTGAGATGATGTGTCAGACCAGNAANNNATACAGNNGTCCCAATATCTT
TTATGATTTGT

HHB1 CCACCCCCTGCGTGGAGGCATCAAAAGAAGAAGTATTAATNNTTTCTCAGCAGAATAACATCGTA
GTAGTTGCTCCTGCTACTAGAGGCGATGACAACAACAACATGGTAGCAGTCATTTTCGCCGACCC
TACAAATGGAGGACGATGTTCTTGTTGACTACCACGTCATCGATTATTTATTACAGTAGTAATAT
TTTTTGCAGCTCCTATAATCGACGACGCACCCACTAGCTGTGAAGAAAAAAATAACTCAATCAAC
CCACCCGCCGGAGTGAGCCTAATTCCCGGCGGTGGATGTTCAATCCGTCCCGTCCCCGCCCCCC
CTTCAACAGCAGCAGAAGATAAAAGAAGTAATAAACTAGGAGGTAATAACCAAAAACTTATATTA
TTCAATCCAGGAAAAGCCATATACACAAGCACCTAACATCAATGGAATCAATCAATTACCAAACC
CACCAATTAGGATTGGTATAACCATAAAAAAAAATTATAACAAATGCATGAGCAGTCACAATTACA
TTATATAATTGGTCATCATCTAATATAGCACCAGACTGACCTAACTCTGCACGAATCAAAATACT
CAACCCAGTACCCACTATACCAGACCACTCACCAAAAAAAATATATAAAGTTCCAATATCTTTAT
GATTTGTTGACCAAA

KMB1 CAATGTGCTGATTATATTGGATCCTCCCTCCAGCAGGATCAAAAAAGAAATATTAAAATTTTGAT
CCGTTAACTACATAGTAATTGCCCCCGCTAATACATGGAAAAACAACAATAATAAAATTACCATA
ATTTTTACTGACCAAACCAAGGAAGGTGATAAAACTGCACACCACACCATCCCATATTAACAACA
GTACTAAAATAATTCACATCACCTAAAATAGATGGTGCACCAGCCCAATGAAATGAAAAAATAAA
CTAATCAATAGATTTAACGCACATGAATGCGCCTCTTTGAAAAAATAGGGGGGATAATAGGTTAA
CCCCCCCAACATGGGCTAAATTCCCAGCAAAAGGAGGATAAACAGTCCAACCCGGGGGGCACCC
CCCTCAACTGTCAAAAAATATAAAAGAGGCTATACACTATGAGGGGCCAACCAGAAACTTGAATT
ATTTCATCAATGGAAAGCTCCATCTAAACCTCGTAACATTAAAGATATTATATTTTTGTAGTGGCC
GACCAGTCTCTTTAGACATAAATATATAGTAGGCCCGACCACCAATCATCAAAATATAACTTTCG
TGCGCTAGAAC

BBP12 CCATCTTTTGAATTTGTTGACCATTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCACCAATATCTTTATGAT
TTGTTGACCATTAAACTTCAGGGTGACCCAAAAATCACCAATATCTTTATGATTTGTTGACCATTA
AACTTCAGGGGGGCCCAAAAATCTCCAAGATCTTTTTGATTTTTTGACCATCTTCGCTCTCATTG
GTTACAGTAGTTATANNATTTACAGCACCTACAATAGATGACGCACCAGCTACATGTACAGAATG
AAAGGCCTAAATCACCAAATCCCCCGGCCGGCNCGCANTTCCCGGCCTCGGCGGTTAGGCTGGT
TCCACCGTCCCCCCCCCCCCCTCGCCTCCCTCGGGTGATACCAATGATAAAAGGTTTTGTGGCCT

AGGTGGCACCAACCAAAAACTCATATTATTTAAAGAAGGCACGGACATGTCAGAGGCACCTCGAT
ATAAGAGGTTTTACCAACCCCCCGGTTTATTATTGGTATAACCATAAAAAAAATTATAACAAACA
CATGGGCAGTCACAATTACTTTATACAACTGATCATCACCTAACAAAGTACCAGATTGCCCTAAT
TCTGCATGAATTAAAATACTTAATCCCCCACCAACCTACCGAGATCTTACCCAAAACAAAATATA
CGAAGTCCCAATATCTTTATGATTTGATGACCACCCNNNCATACGGNNNGGCGTCGGTGTCNNN
GCCCCCGCCATAGGTATATCGNTGATGAG

KMP2 ACACCTCCCTCCAGGGNGGATCAAAAAATAAGTAATAAAATTTTGATCAGTTTACCANNTAGTAA
TTGCTCCAGGTGATACCTGTAAAGACCACAATAATAAAATCACCATAATTTTTACTGACCTCACC
AAGGAAGGTGTTCAAACAGCATTCCACACCAGCCCACCTTATCTTCAGTAGTGATTTAATTCACT
TCACCTAACATAGATGGTGCAACAGACCAATGCACTGAAAAAATAAACTAATCAATAGATTTAAT
GAACATGCATGAGCTCTCAATTGCANNNAACATACGGCGAGNCAATAGATTAGCCCCCCAACAT
GGGCCCAAATTCCCAGCCAAAGGAGGATACACAGTTCCACACCACGTACCGGCACCCCCCTCAA
CTGCCACAGACGATAAACGAAGCAAGGCACTAGGAGGTACTCCCCAGAAACTTGTATTATTTAAT
CTACGGAAAGCTATATCTAAACCACCTAACACTAAAGGAATTAATCAATTTCCTGACCGACCAAT
CACTATTGCCTTAACTATATGGAAAATCCCAACAAACTTATGAGCCAGTACAATTACTTTATATAA
TCACCTAGCAAAGTACCGGATTGACCTACTTCACCATGAATTAAACTACTTAATCCAGTACCAAC
CAACCCAGATCTTGTCATCACAAAAAATATACAAAGTCCCAATATCTTTATGATTTGGTTGAC

TTP1 AATGTTGATGAAAACTTGGGAATACCCCCCCTCCTGCAGGATCAAAAAAAGAAGTATTAAAATTT
CGATCAGTTAATAATATAGTAATTGCTCCAGCCAATACAGGTAAAGACAATAATAACAAAATAGC
AGTAATTTTCACCGACCATACAAATAATGGAAGACGTTCAAATTGCATACCGTATCATCGTATAT
TAATCACAGTAGTAATAAAATTTACAGCACCTAAAATAGATGATGCACCAGCTAAATGTAAAGAA
AAAATAGCCAAATCAACAGATCCACCAGCATGAGCTAAATTACTAGCCAATGGTGGATATACAGT
TCAACCAGTACCGGCACCACTTTCAACAGCAGCAGATGATAGAAGAAGTAGTAATCTAGGTGGTA
ACAATCAAAAGCTTATATTATTTAACCGAGGAAAAGCCATATCAGAAGCACCTAATATCAAAGGA
ATTAATCAATTTCCAAATCCACCAATTATTATTGGTATAACCATAAAAAAAAATTATGACAAATGCA
TGAGCAGTCACAATTACATTATATAACTGATCATCACCTAATAAAGCACCAGATTGACCTAATTC
TGCCCGAATTAAAATACTCAATCCAGTACCAACTAATCCCGATCACACACCAAACAAAATATATA
AAGTTCCAATATCTTTATGATTGGTTGACCAAA

NTN1 AGTCGTCTTCATAGTCCTTGCTCCTGCTACTACATGTAAAGATCCTACTAAAATAGCAGTAATTTT
TACCAATCATACTACTAAAGGAAGATGCTCACATTGTATACCACGTCGTCGCATATTAATTACAG
TAGTAATAAAATTTACAGCACCTAAAATAGATGATGCACCAGCGTACAATGGTATAGGNNNNAAA
ACTACGCTAATATCAGCAGACCACCCAGCACGAGCCAATTCCCCGCCCAGGGTGGAGTACCAAC
ACCTCCTTCGGCAGGAGCTGATGATAAACGAAGTAATAAACTAGGTGATAATGACCAAAAACTCA
TATTATTTAACCGAGGAAAGGCCTTGTCACAAGCACCTAATATTAGAGGAATTACCAAACCCACC
AATTATTATTGGCATAACCATAGGAAAAATTATAACGCATGGCCCGCCACAATTCCATTGTACAA

TGATCATTACCTAATAAAGTACCGGATTGACCTAATTCTGCATGAATTAAAATACTTAATCCAGTA
CCAACCAACCCAGATCATATACCAAACAAAATATACAAAGTCCCAATATCTTTATGATTTGTTGA
CCACACACACCAAACAAGATATACAAAGTCCCAATATCTTTATGATTTGTTGACCAAAC

RRN2 AAAATGTTGATGTAAACTGGGATCCCCCCCTCCTGCAGGATCAAAAAAAGAAGTATTAAAATTTC
GATCAGTTAATAATATAGTAATTGCTCCAGCTAATACAGGTAAAGACAATAATAACAAAATAGCA
GTAATTTTCACCGACCATACAAATAATGGAAGACGTTCGAATTGCATACCGTATCATCGTATATT
AATCACAGTAGTAATAAAATTTACAGCACCTAAAATAGATGATGCACCAGCTAAATGTAAAGAAA
AAATAGCCAAATCAACAGATCCACCAGCATGAGCTAAATTACTAGCCAATGGTGGATATACAGTT
CAACCAGTACCGGCACCACTTTCAACAGCAGCAGATGATAAAAGAAGTAGTAATCTAGGTGGTAA
CAATCAAAAGCTTATATTATTTAACCGAGGAAAAGCCATATCAGAAGCACCTAATATCAGGGGAA
TTAATCAATTTCCAAATCCACCAATTATTATTGGTATAACCATAAAAAAAAATCATGACAAATGCAT
GAGCAGTCACAATTACATTATATAACTGATCATCACCTAATAAAGTACCAGATTGACCTAATTCT
GCCCGAATTAAAATACTCAATCCAGTACCAACTAATCCTGATCATACACCAAACAAAATATATAA
AGTTCCAATATCTTTATGATTTTGGTTGACCANNAA

JPL1 CAATCTTTTGATTTGTTGACCATTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCACCTATATCTTTATGATT
TGTTGACCATTATACTACTGGGCGCCGCTAAAACTGGCAAAGACAATAATAACAAAATACCAGTA
ATTTTCCCGGACCACCCAAAGAAAGGAAGACGCCCGAATTGCATACCACCGCATCGTATATTAAT
TACTGTAGTAATAAAATTCACCGCACCTAAAATAGATGACGCCCCACCGAAATGTAGAGAAAAAA
TAGCTAATTCACCAGACCCACCATCAGGCGCCAAATTTCGGGCCAACGGCGGGTATACAGTGGA
ACCAATACCAGCTCCACCCTCCACCGCCGCCGACGAGATCAGAAGTAATAAGCTACGGTGGAAT
ATCCGGAGAAAACGATAATTCCTTCGAGGAAAAGCTATATCAGAGGCGCCGAACATCATGGGATT
GAATCAATTACCAANCCCCCCACTTCTCACGGGCTTAACCTTCATAAAATTAAAAAAAAAGCTAA
CGCACGCCCGATTTTTTTTTCATTTTGGATTCCCCCGACAAATATCCCAGAAGGGCCCTGTCTGC
CCTCATTTTAAAAAAATAAACCTATTACACCCAGCCCGAACCCACANCTAACACGGAATGAAAAA
TTTCCAAATTTCTTTTNTTTTTGTTGAAAAAAGACGACAAAACNGNAAATTTTGGCACTAGGCAT
AGGAGANNCATTGCTCACGAAATTTGGAGCGATATTTCCCAAGGAACTTTNAGTAGATGCTGCTA
TCTCCTCTACAGGGGTTCAGGGAATTTCTGAGCGACGGTGAGAGGTCAAGACACTTTGG

SF2 ACCTCCCTTCCAGGGNTGGATCAAAAAATCAAGCAATAAAATTTTGATCCGTTGACCAAGTTGGC
ATTGGCCCAGGTAATACATGGAAAGACAACAATAATAATATTGCCGTAATTTTTACTGACCACAC
CAAGGAAGTTGTGCAAACTGCATACCACACCATCGCATATTATCTTCATTAGTGATATAATTCAC
ATCACCGATGATAGATGGTGCAACAGCCAAGTGCAATGAAAAAATTAACTAGTCAATCCATTTAA
TGAACATGAATGAGAACTCATATGCCAGGGATAGGGGAGTCAATAGGTTCGCCCCCCACCATGG
GCTAAATTCCCAGCCAAAGGAGGATACAGAGTCCAACCGGACGGGCTCCCCCCTCAACTGCCAC
AGACGATAAAAGAAGCAATGCACTAGGGAGGTAATAACCAGAATCTTGTATTATTTAATCAACGG
AAAGCTATATCAAAACCAGCTAACATTAAAGGAATTAATCAATTTCCAAACCGACCAATCATTAT

	TGACATAACTATAAAGAAAATCATAACAAACTTATGAGCCATTACAATTACATTATATCATCACCT
	AGCAAAGTACCGGAATTGACCTAATTCACCATGAATTAAAATACTTAATCCAGTACCAACCAACT
	TTGATCATGNAACCACACAAAAATATACAGAGTCCCAATATCTTTATGATTTGTTGACCAAAA
CCL12	GACACCCAACCTTCAGGGTGATCCAAAAAACAAGTATTTCAATTTCAGTTGATTAACAACATATT
	GATCGGCCCCGCCAACACAGGGAAAGATAGTAACAACTAAATAGCAGTGATCTTCACTGACCACA
	CAAATAAAGGAAGACGCTCAAATTGCATACCACACCATCGTATGTTACTTACAGTAGTAATAAAA
	TTTACAGCACCTAAAGTGGACGACGCACCAGCGGGATGTAAAGAAAAAATAGCTAAATCCACAGA
	CCCACCAGCATGCGCCAAATTCCGAGCCAACGGTGGATACACGGTCCAGCCAGTACCCCCGCCA
	CTTTCCACCGCCGCAGAAGAGAAAAGAAGTAACAAACTAGGAGGCAATAACCAAAAACTTATATT
	ATTCAATCGAGGAAAAGCCATATCAGAAGCCCCTAAAATCAATGGAATCAATCAATTACCAAACC
	CCCCAATTATTATTGGTATAACTATAAAAAAAATTATAAAAAATGCATGAGCAGTCACATTTACCT
	TATACATTTGATCATCCCCTAGTAGGGCACCAGACTGACCTATCTCTGCACGAATCAAAATACTC
	ACCCCAGTACCAACTAGACCAGATCACACACCAAATAAAATATATAAAGTTCCAATATCTTTATG
	ATTTGGNGACCAAAGACCAAAGACCAAAAAA
KMB4	CCAATCTTTTGGAATTTGTTGACCATTCCAACCTTCATGGTGACCCAAAAATACACCAATATCTAT
	TTGATTTGTTGACCAATATACTACTAGGCGCCCCCNNCACTGGCAAAAATGATAATAACAAAANN
	GCAGTAATCTTCACTGACCACACCAATCATGGAAGACGCTCAAATTGTACACCACGCCATCGTCT
	TTTGCTTACAGTAGTAATAAAATTTACAGCACCTACAATAGATGAGGCACCCGCCAAGTGTACAG
	AANNNATAGCTAAATCAACAGACCCACCAGCATGAGCTAAATTACCCGCCAAAGGAGGGTACGC
	AGTCCACCCAGTACCACCACCGCCTTCACCAGCAGCAGACGATAAAAGAAATAATAAACTAGGTG
	GTAATAACCAAAAACTTATATTATTTAACCGAGGGAACGCAATATCAGAAGCGCCTAATATTAAT
	GGAATCAATCAGTTACCACACCCACCAATTATTATTGGGATATCCATAAAAAAAATTTTAACAAA
	TGCANNAGCAGACACTTTTATATTATACACTTGATCTCCGCCTCTGAAAGCGCCAGACTGACCCA
	GCTCTGCACGAATCAAAAAACAATAACCCGGTACCCACTCAACCAGACCACACACCACATAAGAT
	ATATACTGTTCCTCTATCTTTTTGATTTGTTGACCACACCC
NTN2	CCATCTTTTGAATTTGTTGACCATTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCACCATATATCTTTATGA
	TTTGTTGACCATCATACTAATCGCCCCTGCTAACACAGGCAAAGACAATAATAATAAAATAGCAG
	TAATTTTCACTGACCACACAAATAAAGGAAGACGCTCGAATTGCATACCACATCATCGCATATTA
	ATTACAGGAGTAATAAAATTAACAGCACCTAAAATAGGTGATGCACCAGCTAAATGTAAAGAAAA
	AATAGCTAAATCAACAGACCCACCAGCATGTGCCAAATTTCCAGCCAACGGCGGATATACAGTTC
	AGCCAGTACCAGCACCACCCTCAACAGCAGCAGATGATAAAAAAAGTAATATCCTAGGTGGTAAT
	AACCAAAAACTCGTATTATTCAATCGAGGAAAAGATATATCAGAAGCACCTAACATCAATGGAAT
	TAATCAATTACAAAACTCACCAATTATTATGGGTATAACCATAAAAAAAAAACAAAACAAACGCG
	TGAGCTGTCACTTTTACTTTACACAAGTGGTCCTCCCCTAATAAAGTACCAGATTGACCTAATTC
	TGCACGAATCAAAATTCTTANCCCAGTCCCACCCACCCCCAGACCATACCCAAAAAAAAAATATA

AAAAGTTCCAATCTCTTTATANTTTGATGACACACAA

RRN3 CAAATGCTGGNATAAAGTTGGNNACACCACCCCCTGCTGGATCAAAAAAAGAAGTATTAAAATTC
CGATCAGTTAATAATATAGTAATAGCCCCAGCCAACACAGGCAAAGATAGCAACAGCAAAATAGC
AGTAATCTTCACTGACCAAACAAATAAAGGAAGACGCTCAAATTGTATACCACACCATCGCATAT
TAATTACAGTAGTAATAAAATTTACAGCACCTAAAATAGACGATGCACCAGCCAAATGCAAAGAA
AAAATAGCTAAATCAACAGACCCACCAGCATGAGCCAAATTCCCAGCCAACGGTGGGTACACAGT
CCAACCAGTACCAGCACCACTTTCAACAGCAGCAGAAGATAAAAGAAGTAATAAACTAGGAGGTA
ATAACCAAAAACTTATATTATTCAATCGAGGAAAAGCCATATCAGAAGCACCTAACATCAATGGA
ATTAATCAATTACCAAACCCACCGATTATTATTGGTATAACCATAAAAAAAATTATAACAAATGCA
TGAGCAGTCACAATTACATTATATAATTGGTCATCACCTAATAGAGCACCAGACTGACCTAACTC
TGCACGAATCAAAATACTCAACCCAGTACCAACTAGACCAGACCACACACCAAATAAAATATATA
AAGTTCCAATATCTTTATGATTTGTTGACCAAAA

CAB1 AATCTTTAGGAATTTGTTGGACATTCCAACCTTCCAGGGTGACCAAAAAATCAAGAATTACTTTT
TGATTTGTTGACCAACATCCTAGTGGTCGCTCCTGATACTGGCAACAACGATAATAACAACAAGG
TAGTAGTTTTTTTGGCCGACCATACGAATGGAGGAAGACCGTATTGCATACCACCTCATCGTATC
ATAATCACTACAGTAATAAAATTAACCGCAGCTACAAGGTGTGATGCCCCAGCGAAATGATGAGA
AAAAATAATTAATTCATCAAACCAACCATCATGTGCCAAATTTGTGGCCGACTGCGGATATACAC
TTGTACCAGTACCAACTCCTCCCCCCACCCCCGCCGACGGTAGAAGAAGAAATAAGCTACGAGG
TACTAGGCGGTAACTAGTATTATTTGTTCTAGGAGAAGGTAAGTCATATGCACCTAACATCAATG
GAATTAATCAATTACCATTCCCACCACTTATTATGGGTATGGCCTTACTATAAATCATATCCTAAC
CAAGACCAGACCCAATTCCATTATATTACTGGTCTGCACCTCACCTAGCAAAGTACCGAATTGAC
CCTGCTCCAATCGAAATAAAATACCTAATCCCATCCCAACCAAACCATACACCAACACCCAATAT
ATATATGTTCCAGTCATCATTA

PSN2 TGCTGATAATTAGTTGGCCAANCAGAACGTATTAAAGTTCCGATCAGTCAACTGCATAGTCATTG
CTCCTGCTACTACATGTAAAGATAATAATAAAATAGCAGTAATTTTTACCAATCATACTAATAAAG
GAAGATGCTCAAATTGTATACCACGTCATCGCATATTAATTACAGTAGTAATAAAATTTACAGCA
CCTAAAATAGATGATGCACCAGGTAAATGTAAGGAAAAAATAGCTAAATCAACAGACCACCCAGC
ACGAGCCAATTCCCAGCCCAGGGTGGAGTACCAACACCTCCTTCGACAACAGCAGATGATAAAA
GAAGTAATAAACTAGGTGATAATAACCAAAAACTCATATTATTTAACCGAGGAAAAGCCATGTCA
GAAGCACCTAATATTAGAGGAATTACCAAACCCACCAATTATTATTGGCATAACCATAGAAATAA
TTATAACGCATGGACAGTCACAATTACATTATACAATGATCATTACCTAATAAAGTACCAGATTG
ACCTAATTCTGCATGAATTAAAATACTTAATCCAGTACCAACCAACCCAGATCATATACCAAACA
AAATATACAAAGTCCCAATATCTTTATGATTTGTNTGACCACACCCACCAAACAAGATATACNNA
AGTCCAAATATCTTTATGATTTGTTGACCAAAT

NBB1 AAAAATGCTGATTAAAATTGGAATTCCTCCCCTCCGCACGCAGGAATGAAGCAATAAAGTATTAT

TGATTCGTTCACCTGGCAACATTGGAGTTGTCGATGCTGACTCAAGACGAGACGACTATAACAAC
ATAACATTTTTTTGATCTGACCACACAACTAGTGGAAGACGCTCTTCTTGTCGTCCACCACANCC
TATATTAGTAATTACAGTAATAAAACCTTCACTACATCGAGCACAGGAGACGCGCCATGAATGTG
TCGAAAAAAATAACTAATTCATGCAACCNCACCGCGATGTGAGCCAATTTCCAGGCCATTGGGGN
TTCCCAATCCACCCCATGCCCACACCCCCCCTCCACCGGCGTTCAAGATAAGAAGCGATATACTC
TGAGGGGTTATCCCCAAACTTTTATTTTTCTACCCAGGAGAAAAGGCGGTCCTAAGCACCCTCTT
ATAATAGGAATCAACCGTTTCCCAATCCCANAATTATTAATGGGCATACTATTAAACAAAATTTA
TAACAAACGAATGACCGTTACAATTACTTTATAGAATTGATCATCACCTAATAGAGCACCAGACT
GACCTAATTTTGCGCGAATCAAAATCCTTAATCTTGTCCCACCTATCCACGATTCAAAATATACA
AAGTCCTACTATCTTTCTGATTTGTTGACCATTGTTGACCATACAGAGTCCCAATATCTTTATGAT
TTGTTGACCACAT

HMN2 AAAANGCTGATATAAATTGGGGTCACCACCCCCCGCTGGATCAAAAAAAGAAGTATTAAAATTTC
GATCAGTTAATAATATAGTAATAGCCCCAGCCAGCACAGGCAAAGACAATAATAACAAAATAGCA
GTAATCTTTACTGACCATACAAATAAAGGAAGACGCTCGAATTGCATACCACACCATCGCATATT
AATTACAGTAGTAATAAAATTTACAGCACCTAAAATAGATGATGCACCAGCTAGATGTAAAGAAA
AAATAGCTAAATCGACAGACCCACCAGCATGAGCCAAGTTACCAGCCAACGGAGGATACACAGT
CCAACCAGTACCAGCACCACTTTCAACAGCAGCAGACGATAAAAGAAGCAACAAACTAGGAGGT
AATAACCAAAAACTTATATTATTTAATCGAGGGAAAGCCCTATCAGAAGCACCCAACATTAACGG
AATCAATCCATTTCCAAACCCACCCATTATCATTGGTATAACCCTCAACATAACTTCTAACAAA

HMN2 AAAAAATGCTGATTAAAATTGGGAATTCACCCCCTCCAGGCAGGATCANNAAAAGAAGAATTAAA
ATTTCATTCATTTACTAACATATTATTGGCCCCTGCTGACACTGGAAAGAACAATAATAACAAAA
AGGCAGTATTTTTTCTGGCCCACCCAAGGAATGGAAGACGACCGCATTGCATACCACCTCATCGT
ATATTAATTACTGCAGTAATAAAATTAACCGCACCTACAAGATGCGACGCCCCAGCGAAATGAAA
AGAAAAAAAAAATTAATTCAACAAACCCACCAGCAGGCGCCAAATTTGGGGCCAATTCCGAGCCTA
CGGTCGTACCCAGCCCAACTCGTCCCTCCACCCCCCTGAAGGGTAACAGATGATAAAAGAACCG
GGGTATTAGGAGGTAATAACCATAATTTTATTTAGGCAATGGAAAGCCATATTACCCCCACCTAA
TGGGAATGGAATTATTCCATTTCCAACCCCTCCTATCGGTATTGGCCTAACTATAAAGAAAATCC
TAACAAACACATGAGCCATTACAATTACATTATATAACTGCTCATCACCTAGCAAAGTACCGGAT
TGACCTAGTTCATCATGAATTAAAATACTTAACCCAGTACCAACCAACCCAGATCATACACCAAA
AAAAAATATGCTCC

SML1 AAAAAGCTGATTAAAATTGGAATTCCCCCCCCCCCGCCGGGTACCAAAGAATAAATGTTAAAATT
TTGATCTCTTTAAACCGTATAGATTGTGCCCCTTGATATATGGGAAGAGGACAATACAACAATAC
CAGGGATTTTTTCAGTGCCCACACAAGAAGGGGTTCAGGCGGAATTTCACTCCCTCGCCTACTAA
CATCAGTAGTAATAAAATTCACATTACCTGAACCAGAAGGTGAACCAGCCCAAGGCAATGGAAAA
AAAAAAAAATCAATAGATTTAATGAACATGACCAACCTCCCGAGCCAGGGGAGGGTCCAAAGTCG

	GGGCGGCCCCACCCACGGCCCCAACCGCCCCTCCCNGGGAGGAAAGGAATAAACTAACTGGCCA
	TCACGCGGCTCTAATGCCAATCATCCGTTATGAAGCCCTCGGCTAAAGCCGGTTATTACCAGAGG
	CTTTAATTAATTGATCAACCGAAAGCTTAATTTCGGCATCCTTGTACTAAAGGAATTTAACAAATT
	CCTGACCGNCCACTCTTGCTTGATATCACTGTTCATCTGTTACTGACGTACGCTAGTGCCAGACT
	TTTGCATTATTTCATCAACTAGAACAATTACCCACCAACCCATATACACCATGCAGCAAGATATA
	CAAAAAAACAACGTCTATCTCTCTTGATGAATAGNGNNCCATACACAGTGTCCCGATATCTATAA
	GATTTGTGATCTAGTGACCA
TTL1	TAACNATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA
	AGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
	GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCT
	GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCG
	GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTA
	TTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGC
	GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAG
	AACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTT
	TCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
	CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTC
	CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT
	AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
	AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
	AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG
	GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGACAAGAATTTTGG
	TTAAAA

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวประภัสสร ไกรรัตน์
วันเกิด	30 กรกฎาคม 2535
สถานที่เกิด	จังหวัดบึงกาฬ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 111 หมู่ที่ 5 ตำบลบึงกาฬ อำเภอเมืองบึงกาฬ จังหวัดบึงกาฬ
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นิสิต
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2554 การศึกษาบัณฑิต (กศ.บ) ชีววิทยาศึกษา มหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ.2559 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม) ชีววิทยาศึกษา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	โครงการส่งเสริมครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว