



รายงานการวิจัย

ซิสเต็มแมติกและชีวภูมิศาสตร์ของหอยทราย *Mekongia Crosse & Fischer, 1876* ในประเทศไทย
(Systematics and Biogeography of the Freshwater Snails
Mekongia Crosse & Fischer, 1876 in Thailand)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ซิสเต็มแมติกและชีวภูมิศาสตร์ของหอยทวาย *Mekongia Crosse & Fischer, 1876* ในประเทศไทย
(Systematics and Biogeography of the Freshwater Snails
Mekongia Crosse & Fischer, 1876 in Thailand)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผ่องพรรณ ประสารก

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 รหัสโครงการ SUT1-104-58-24-18 นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอกล่าวขอบพระคุณบุคคลดังต่อไปนี้ ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา รองศาสตราจารย์ ดร. จิรศักดิ์ สุจริต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย จิรัฐิติกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บังอร กองอึ้ง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างหอยทวายในลาวและกัมพูชา รวมทั้งบางพื้นที่ในประเทศไทยสำหรับใช้ในงานวิจัยครั้งนี้



บทคัดย่อภาษาไทย

หอยทรายสกุล *Mekongia* เป็นหอยน้ำจืดที่มีการกระจายกว้างในภูมิภาคอินโดจีน พบในประเทศไทยและประเทศข้างเคียง การจัดจำแนกหอยทรายสกุลนี้ในอดีตใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามลักษณะของเปลือกในหอยสกุลนี้มีความแปรปรวนสูง จึงส่งผลให้เกิดความคลุมเครือในการจัดจำแนก ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยยีนไมโทคอนเดรีย 16S rRNA และ CO1 และยีนจากนิวเคลียส 28S rRNA โดยเก็บตัวอย่างหอยทราย 5 ชนิด จำนวน 84 ตัวอย่าง จากพื้นที่ของไทย และประเทศข้างเคียง จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทป์มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ 2 วิธี คือ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference ผลการศึกษา พบว่า หอยทรายสกุลนี้แสดงสายวิวัฒนาการเดี่ยว ภายในสายวิวัฒนาการเดี่ยวนี้แยกออกเป็น 6 สายวิวัฒนาการย่อย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะภูมิศาสตร์ของแม่น้ำ การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของข้อมูลทางพันธุกรรมในบริบททางภูมิศาสตร์ในหอยทรายสนับสนุนการจำแนกก่อนหน้านี้คือ *M. swainsoni*, *M. rattei* และ *M. lamarcki* อย่างไรก็ตามการศึกษาคั้งนี้ไม่สนับสนุนการจำแนกหอยทรายสปีชีส์ *M. pongensis* และระดับซับสปีชีส์ของ *M. swainsoni* นอกจากนี้ผลการศึกษายังได้ค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้น 3 สปีชีส์ภายใน *M. sphaericula* และสนับสนุน *M. sphaericula sphaericula* และ *M. sphaericula extensa* เป็นระดับสปีชีส์ แต่ไม่สนับสนุน *M. sphaericula spiralis* เป็นระดับสปีชีส์

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Genus *Mekongia* is widely distributed in Thailand and nearby countries and are currently identified on the basis of their shell morphology. However, the classification depending on shell morphology could contribute to the over and under estimate of species diversity due to phenotypic plasticity. Phylogenetic analyses of 84 individuals representing five nominal species, plus two related outgroup species, from Thailand and nearby countries were performed using DNA sequence data of nuclear (28S rRNA gene) and mitochondrial (mt)DNA (cytochrome oxidase subunit 1 and 16S rRNA) gene fragments with maximum likelihood and Bayesian inference. The genus *Mekongia* was recovered as monophyletic under all analyses in agreement with the geographic location according to drainages system. The phylogeography confirmed the species level classification of *M. swainsoni*, *M. rattei* and *M. lamarcki*. However, our analyses did not support the validity of *M. pongensis* and subspecies level within *M. swainsoni*. The genetic analyses yielded three cryptic species of *M. sphaericula* supporting the validity of *M. sphaericula sphaericula* and *M. sphaericula extensa* as a distinct species rather than subspecies but did not support *M. sphaericula spiralis* as a valid species.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
ข้อตกลงเบื้องต้น	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเก็บตัวอย่าง.....	8
การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน.....	8
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	9
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ผลการวิจัย	14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
อภิปรายผล	27
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	30
บรรณานุกรม	32
ประวัติผู้วิจัย	40

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง สปีชีส์ ซับสปีชีส์ พื้นที่เก็บตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างและรหัสตัวอย่างของหอยทราয়ที่ใช้ในการวิจัย.....	12
ตารางที่ 2 ความผันแปรทางพันธุกรรมของหอยทราয় จากข้อมูลยีน CO1 16S rRNA และ 28S rRNA ซึ่ง n คือ จำนวนตัวอย่าง; S คือ จำนวนตำแหน่งที่มีความหลากหลาย; Hd คือ ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ และ π คือ ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์.....	23
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรม uncorrected p-distance (%) ของยีน CO1/16S rRNA (ทแยงมุมด้านล่าง) และ 28S rRNA (ทแยงมุมด้านบน) ตามการแบ่งกลุ่มตามสายวิวัฒนาการ.....	24
ตารางที่ 4 จำนวนตัวอย่าง (N) จำนวนแฮพโลไทป์ (N_h) จำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะ (N_u) และการกระจายของแฮพโลไทป์ในแต่ละยีน.....	25

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1	แสดงลักษณะของเปลือกและฝาปิดเปลือกของหอยทราย.....	4
ภาพที่ 2	ถิ่นที่อยู่อาศัยของหอยทราย.....	7
ภาพที่ 3	สปีชีส์และซัปสปีชีส์ของหอยทราย <i>Mekongia</i> ; A = <i>M. swainsoni swainsoni</i> , Ai = <i>M. swainsoni braueri</i> , Aii = <i>M. swainsoni kmeriana</i> , B = <i>M. lamarcki</i> , C = <i>M. sphaericula sphaericula</i> , Ci = <i>M. sphaericula sphaericula</i> , Cii = <i>M. sphaericula extensa</i> , Ciii = <i>M. sphaericula extensa</i> , Civ = <i>M. sphaericula sphaericula</i> , Cv = <i>M. sphaericula sphaericula</i> , D = <i>M. pongensis</i> และ E = <i>M. rattei</i>	9
ภาพที่ 4	แผนที่การเก็บตัวอย่าง ตัวเลขแสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 1 และสีแสดงสปีชีส์และซัปสปีชีส์ของหอยทราย <i>Mekongia</i>	11
ภาพที่ 5	ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทรายสกุล <i>Mekongia</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจาก 28S rRNA+16S rRNA+CO1 สีสอดคล้องกับซัปสปีชีส์และสปีชีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap) และแถบด้านข้างแสดงจำนวนสปีชีส์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABGD และ GMYC.....	17
ภาพที่ 6	ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการและลักษณะทางภูมิศาสตร์ในหอยทรายสกุล <i>Mekongia</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจาก 28S rRNA+16 S rRNA+CO1 สีสอดคล้องกับแม่น้ำและสายวิวัฒนาการ ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap).....	18
ภาพที่ 7	ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทรายสกุล <i>Mekongia</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจาก 16S rRNA+CO1 สีสอดคล้องกับซัปสปีชีส์และสปีชีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap).....	19
ภาพที่ 8	ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทรายสกุล <i>Mekongia</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจาก CO1 สีสอดคล้องกับซัปสปีชีส์และสปีชีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap)....	20
ภาพที่ 9	ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทรายสกุล <i>Mekongia</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจาก 16S rRNA สีสอดคล้องกับซัปสปีชีส์และสปีชีส์ตาม	

ภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap) 21

ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทวายสกุล *Mekongia* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจาก 28S rRNA สีสอดคล้องกับซับสปีซีและสปีซีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap) 22

ภาพที่ 11 โครงข่ายแฮพโลไทป์ (Haplotype network) ของสปีซีส์หอยทวายโดยอาศัยข้อมูลจากยีน (A) CO1 (B) 16S rRNA และ (C) 28S rRNA สีแสดงสปีซีส์และซับสปีซีส์ของหอยทวายและความถี่ของแฮพโลไทป์แสดงโดยขนาดของวงกลม..... 26



บทที่ 1

บทนำ

หอยวงศ์ Viviparidae เป็นหอยฝาเดียวที่พบได้ในระบบนิเวศน้ำจืด มีความสำคัญต่อห่วงโซ่อาหารและสายใยอาหาร พบการกระจายเกือบจะทั่วทั้งโลก เป็นกลุ่มหอยที่ออกลูกเป็นตัวมากกว่าจะวางไข่จึงเป็นที่มาของชื่อวงศ์ มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า หอยแม่น้ำหรือหอยลำธารซึ่งเรียกตามถิ่นที่อยู่อาศัย หอยกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญมากในทางการแพทย์ โดยส่วนใหญ่เป็นโฮสต์กึ่งกลางที่สำคัญของพยาธิ เช่น พยาธิใบไม้ (Brandt, 1974)

หอยน้ำจืดสกุล *Mekongia* Crosse & Fischer, 1876 หรือหอยทรายเป็นหอยที่พบกระจายตัวกว้าง ในประเทศไทยและอินโดจีนยกเว้นบริเวณคาบสมุทรมไทยและมาเลเซีย (Brandt, 1974; Upathum et al., 1983) เป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวางโดยประชาชนในท้องถิ่น และสามารถซื้อขายได้ตามท้องตลาดตลอดปีโดยเฉพาะภาคกลางของประเทศไทย

ในประเทศไทยหอยทรายจำแนกได้ 7 สปีชีส์ ตามการรายงานของ Brandt (1974) ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานในหอยทรายสกุล *Mekongia* โดยอาศัยลักษณะของเปลือกและถิ่นที่อยู่อาศัยตามสาขาของแม่น้ำเป็นหลัก อย่างไรก็ตามการศึกษาทางด้านอื่น เช่น โครงสร้างทางพันธุกรรมของสกุล *Mekongia* นี้ก็มีความจำเป็น เนื่องจากข้อมูลทางด้านนี้สามารถประเมินสถานะภาพของหอยชนิดนี้ในอนาคตได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้นเป็นจำนวนมากซึ่งเป็นการบ่งบอกความหลากหลายของหอยน้ำจืดในภูมิภาคนี้โดยอาศัยข้อมูลการแบ่งแยกทางพันธุกรรม (Prasankok et al., 2009) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการวิเคราะห์ในเชิงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ดีเอ็นเอบาโค้ด ของยีน CO1 16S rRNA และ 28S rRNA เพื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงภูมิศาสตร์ ตลอดจนการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความแตกต่างทางพันธุกรรมในหอยทรายสกุล *Mekongia* ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้จะมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ การบ่งชี้สิ่งมีชีวิตเฉพาะถิ่นทางภูมิศาสตร์ในประเทศไทย องค์ความรู้ทางวิวัฒนาการและเพื่อต่อยอดใช้ประโยชน์จากผลการประเมินโครงสร้างทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อประชาชนในท้องถิ่นนั้น ๆ และเป็นการจัดการทรัพยากรชีวภาพที่มีค่านี้ให้ยั่งยืน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในหอยทราย สกุล *Mekongia* โดยอาศัยข้อมูลดีเอ็นเอบาโค้ด ของยีน CO1 16S rRNA และ 28S rRNA

เพื่อวิเคราะห์ความเป็นมาทางชีวภูมิศาสตร์ในหอยทราย สกุล *Mekongia* ในประเทศไทย โดยอาศัยข้อมูลดีเอ็นเอบาโค้ดของยีน CO1 16S rRNA และ 28S rRNA

เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมในหอยทรายสกุล *Mekongia* ในประเทศไทย

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โครงสร้างทางพันธุกรรมและความเป็นมาทางชีวภูมิศาสตร์ของหอยทราย *Mekongia* ในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาโค้ดของยีน CO1 16S rRNA และ 28S rRNA ทั้งนี้ใช้ผลงานวิจัยและแหล่งรวบรวมตัวอย่างต้นแบบ (Type collection) ของ Brandt (1974) และ Prasankok et al. (2009) เป็นตัวตั้งต้น และผลงานอื่น ๆ ที่ได้อ้างอิงมาแล้วประกอบในการวิจัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ผลงานวิจัยนี้คาดว่าจะตีพิมพ์เผยแพร่สู่นานาชาติและเผยแพร่เป็นภาษาไทยเพื่อให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องโดยตรงคือ กรมประมง สามารถนำข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรมในหอยชนิดนี้ไปใช้ในการวางแผนจัดการให้เกิดประโยชน์ที่ยั่งยืนต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

เนื่องจากหอยทรายเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งซึ่งมีผู้นิยมบริโภค ถึงแม้จะมีรายงานในเชิงอนุกรมวิธานพื้นฐานมาบ้าง ในขณะที่ข้อมูลทางด้านอื่นไม่มี อีกทั้งในปัจจุบันนี้ได้มีการค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้นเป็นจำนวนมากซึ่งเป็นการบ่งบอกความหลากหลายของหอยน้ำจืดในภูมิภาคนี้ นั่นถือว่าการเน้นย้ำว่าประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพที่ลับซับซ้อน นอกจากนี้ทำให้ทราบโครงสร้างทางพันธุกรรมของหอยทรายในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการประเมินสถานะภาพของหอยทรายในประเทศไทย เพื่อต่อยอดใช้ประโยชน์จากผลการประเมินโครงสร้างทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อประชาชนในท้องถิ่นนั้น ๆ

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนอนุรักษ์ และการจัดการทรัพยากรชีวภาพที่มีค่านี้ให้ยั่งยืนและเป็นข้อมูลสำหรับงานวิจัยต่อยอดในอนาคต จึงคาดว่าผลการวิเคราะห์จะมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และองค์ความรู้ทางวิวัฒนาการ ซึ่งหน่วยงานที่ใช้ประโยชน์จากผลการวิจัยนี้คือ กรมประมง และงานวิจัยนี้คาดว่าจะได้เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

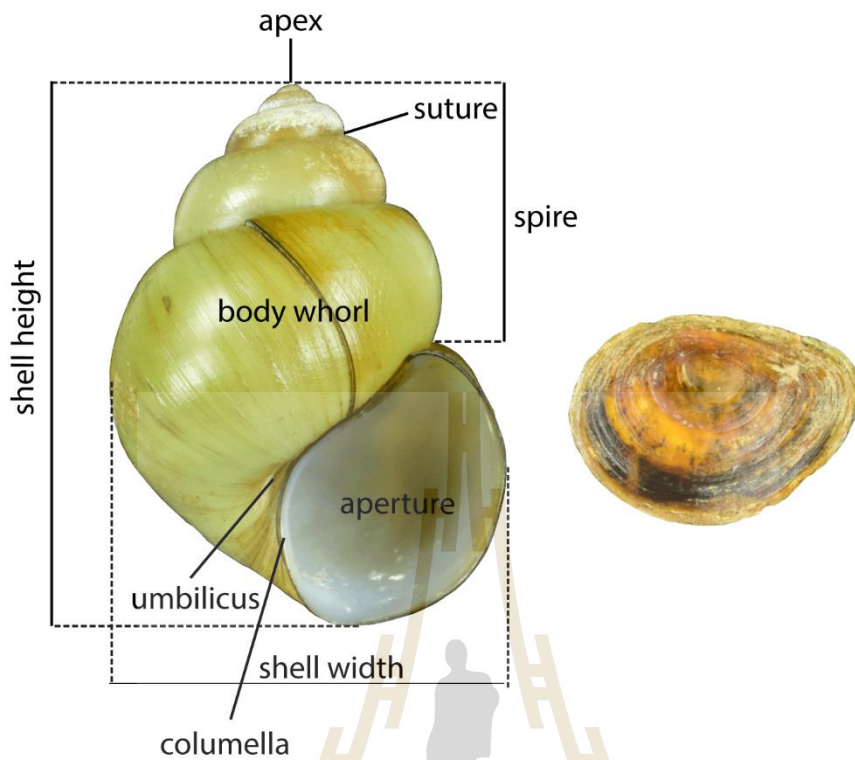
หอยฝาเดียวเป็นกลุ่มหอยที่มีความหลากหลาย จากประวัติทางธรณีวิทยาที่ซับซ้อนของโลกส่งผลให้กลุ่มสิ่งมีชีวิตหอยฝาเดียวประจำถิ่นมีความหลากหลายตามความหลากหลายของธรณีวิทยา เช่น สกกุล *Viviparus* พบกระจายในเขตตอนเหนือของโลก สกกุล *Cipangopaludina* พบกระจายในเอเชียและ สกกุล *Campeloma* เป็นสปีชีส์ประจำถิ่นในอเมริกา

หอยฝาเดียวน้ำจืดจัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อห่วงโซ่อาหารและสายใยอาหารในระบบนิเวศน้ำจืด หอยน้ำจืดเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ต่าง ๆ เช่น ปลา นก และสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม มนุษย์ก็ได้ใช้ประโยชน์จากหอยน้ำจืดในทางเศรษฐกิจเช่นเดียวกัน นอกจากนี้หอยน้ำจืดบางชนิดยังเป็นแหล่งพาหะนำโรคพยาธิที่สำคัญทั้งในคนและสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมอื่น ๆ

สิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน้ำจืดและน้ำกร่อยที่พบมากที่สุดในประเทศไทย คือ หอย ซึ่งมีอยู่ประมาณ 268 สปีชีส์และ 162 สปีชีส์ พบในระบบนิเวศน้ำจืด 96 สปีชีส์พบบริเวณน้ำกร่อย และ 10 สปีชีส์ พบทั้งสองระบบนิเวศ ซึ่งทั้งหมดถูกจำแนกได้ 75 สกกุล 23 วงศ์และ 6 อันดับ มี 3 ชั้นย่อย เป็นพวกแกสโตรพอดหรือหอยฝาเดียว ประกอบด้วย Prosobranchia Opisthobranchia และ Pulmonata ที่พบในประเทศไทย (Upatham et al., 1983)

หอยน้ำจืดสกกุล *Mekongia* หรือหอยทรายเป็นหอยฝาเดียวที่มีฝาปิดเปลือก (operculum) ดังภาพที่ 1 มีอวัยวะในการหายใจหรือแลกเปลี่ยนแก๊ส คือ เหงือก (gill) หอยกลุ่มนี้ในทางวิชาการเรียกว่าโปรโซแบริงค์ (prosobranchs) หมายถึงกลุ่มที่มีหัวใจอยู่ด้านหน้าเหงือก ถูกจำแนกอยู่ในวงศ์ Viviparidae มีการกระจายตัวกว้างตามแม่น้ำต่าง ๆ (ภาพที่ 2 และ 4 และ ตารางที่ 1) พบในประเทศไทยและอินโดจีนยกเว้นบริเวณคาบสมุทรไทยและมาเลเซีย (Brandt, 1974; Upatham et al., 1983) หอยทรายเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวางโดยประชาชนในท้องถิ่น และสามารถซื้อขายตามท้องตลาดตลอดปีโดยเฉพาะภาคกลางของประเทศไทย

หอยทรายมีเปลือกซึ่งเป็นโครงร่างแข็งมีสารพวกแคลเซียมคาร์บอเนตหรือหินปูนเป็นองค์ประกอบหลัก ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เป็นเครื่องป้องกันอันตรายหรือปลางตัวจากศัตรู ป้องกันการสูญเสียน้ำให้กับตัวหอยในช่วงหน้าแล้ง หอยทรายมีเปลือกทรงกรวย รูปไข่ หนา มีสีเขียวยาวไปถึงงอจนถึง เข้ม ดังภาพที่ 1 และ 3 ส่วนยอดแหลม บางชนิดอาจมีสีดำที่วงเปลือกทางด้านล่างใกล้ร่องระหว่างเปลือก เปลือกสูง 3-4 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร มีวงเปลือก 4-5 ชั้น ผิวเปลือกเรียบหรือมีรอยเป็นเกลียวตามวงเปลือก ปากเปลือกเป็นรูปไข่ สะดือปิดเล็กน้อย ผิวเปลือกด้านในมีสีขาว เมื่อโตเต็มวัยขอบปากเปลือกไม่บานออก ฝาปิดเปลือกบางเป็นสารพวกไคติน มีสีน้ำตาลบดงอได้และมีรอยวนเป็นวงกลมค่อนข้างเล็กน้อย ดังภาพที่ 1 หอยทรายมีเพศแยก ออกลูกเป็นตัว



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของเปลือกและฝาปิดเปลือกของหอยทราয়
ที่มา: ภาพโดยผ่องพรรณ ประสารกก

Brandt (1974) ได้จำแนกหอยทราয়ในประเทศไทยโดยอาศัยลักษณะของเปลือกและสีได้ทั้งหมด 7 สปีชีส์ ดังนี้

Mekongia siamensis (Frauenfeld, 1865) พบที่แม่น้ำแม่กลอง

M. pongensis Brandt, 1968 พบที่แม่น้ำโขงและแม่น้ำสงคราม

M. swainsoni (Lea, 1856)

M. swainsoni swainsoni (Lea, 1856) พบที่แม่น้ำเจ้าพระยาตอนบน

M. swainsoni braueri (Kobelt, 1908) พบที่แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำสาขา

M. swainsoni kmeriana (Morlet, 1890) พบที่แม่น้ำปราจีนบุรี

M. swainsoni flavida Brandt, 1974 พบที่แม่น้ำโขง

M. rattei (Crosse & Fischer, 1876) พบที่แม่น้ำโขงในประเทศกัมพูชา

M. lamarcki (Deshayes, 1876) พบที่แม่น้ำโขง

M. sphaericula

M. sphaericula sphaericula (Deshayes, 1876) พบที่แม่น้ำมูล

M. sphaericula spiralis Brandt, 1974 พบที่แม่น้ำชี

M. sphaericula extensa Brandt, 1974 พบที่แม่น้ำสงคราม

M. bocourti พบที่แม่น้ำเพชรบุรี

Prasankok et al. (2009) ได้ทำการศึกษาพันธุกรรมในประชากรหอยทรายสปีชีส์ *M. pongensis* *M. sphaericula* *M. lamarcki* และ *M. swainsoni* ผลการศึกษาพบว่า พบการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ระหว่าง *M. sphaericula extensa* และ *M. sphaericula sphaericula* เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของอัลลีลระหว่างทั้งสองกลุ่มประชากร นอกจากนี้ลักษณะทางภูมิศาสตร์ยังสนับสนุนการแบ่งแยกหอยทรายทั้งสองกลุ่มประชากร กล่าวคือ *M. sphaericula extensa* พบตามลุ่มน้ำสงครามและ *M. sphaericula sphaericula* พบในแม่น้ำมูล

ประเทศไทยตั้งอยู่ในบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง (Myers et al., 2000; Webb et al., 2010) ดังนั้นโอกาสที่จะค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้นและสปีชีส์ใหม่ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จึงมีสูง ได้มีงานวิจัยที่สนับสนุนการค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้นในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น มอลลัส (Prasankok et al., 2007; Prasankok et al., 2008; Prasankok et al., 2011; Jeratthitikul et al., 2019; Köhler et al., 2010; Nantarat et al., 2014a,b) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Yodthong et al., 2014; Matsui et al., 2001; Chan et al., 2011; Aowphol et al., 2013) สัตว์เลื้อยคลาน (Voris, 2000; Lukoschek et al., 2011; Leaché et al., 2009) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Woodruff, 2010) เป็นต้น ดังนั้นการประเมินความหลากหลายทางชีวภาพต่ำจึงส่งผลกระทบต่อการวางแผนอนุรักษ์ในอนาคตเป็นอย่างยิ่ง

ลักษณะทางภูมิศาสตร์ของประเทศไทย ประกอบด้วยภาคกลางซึ่งเป็นพื้นที่ราบลุ่มขนาดใหญ่เรียกว่า ลุ่มน้ำเจ้าพระยาและที่ราบสูงโคราช ลุ่มน้ำเจ้าพระยาเกิดจากแม่น้ำ ปิง วัง ยมและน่าน ไหลจากตอนเหนือซึ่งเป็นแนวเทือกเขามารวมกันยังภาคกลางที่เป็นพื้นที่ลุ่ม เกิดเป็นแม่น้ำเจ้าพระยาและไหลลงสู่อ่าวไทย พื้นที่ราบลุ่มเจ้าพระยานี้ตั้งอยู่ระหว่างที่ราบสูงโคราชซึ่งอยู่ทางทิศตะวันออกและแนวเทือกเขาทางทิศตะวันตกและเหนือ บริเวณที่ราบสูงโคราชเกิดจากการยกตัวของแผ่นเปลือกโลก บริเวณพื้นที่ที่มีการพัฒนาการของกลุ่มน้ำต่าง ๆ เกิดขึ้น โดยแม่น้ำที่สำคัญ คือ แม่น้ำโขงซึ่งไหลผ่านทางทิศเหนือและตะวันออก แม่น้ำสงครามทางทิศเหนือ และแม่น้ำมูลทางทิศใต้

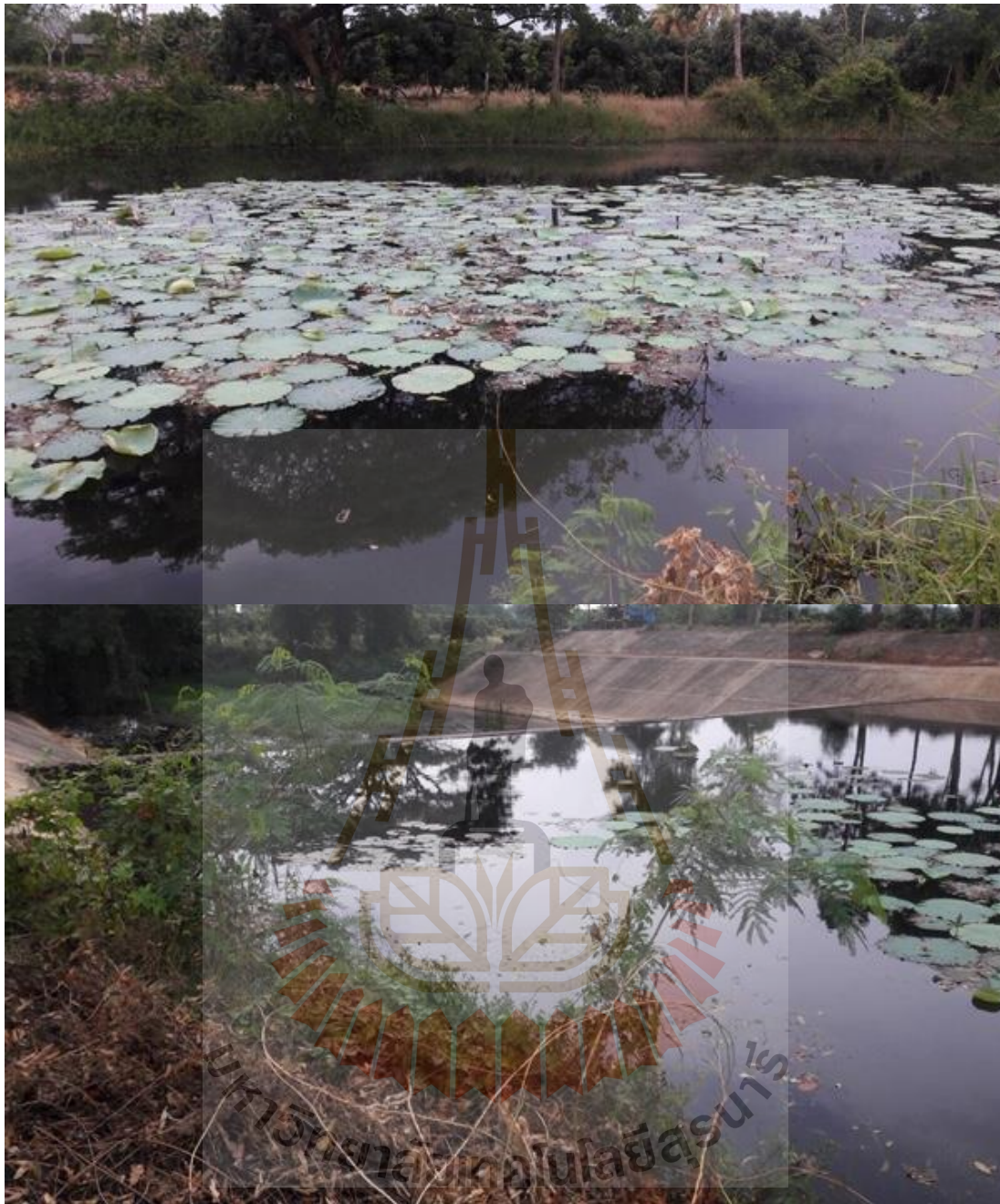
แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขงได้ถูกพิจารณาโดยนักวิทยาศาสตร์ว่าเป็นเครื่องขวางกั้นทางภูมิศาสตร์ อันเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของแผ่นเปลือกโลก ทำให้เกิดลุ่มน้ำต่าง ๆ จากอดีตจนกระทั่งเป็นแม่น้ำต่าง ๆ ในปัจจุบัน การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำทะเลและสภาพอากาศตั้งแต่ยุคซีโนโซอิก ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้ล้วนส่งผลต่อวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิดทั้งบนบกและในน้ำ (Attwood & Johnson, 2001; Hall & Holloway, 1998; Voris, 2000; Inger & Voris, 2001; Woodruff, 2010; Köhler et al., 2010; Dodson et al., 1995; Adamson et al., 2012)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ยอมรับสำหรับการแสดงลักษณะของสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต (Jeratthitikul et al., 2019; Marescaux & Van Doninck, 2013; Huang et al., 2007; Chang et al., 2009) โดยเป็นลำดับดีเอ็นเอมาตรฐานสายสั้นๆ ในจีโนม ส่วนของจีโนมสัตว์ที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ ยีนไมโทคอนเดรีย (cytochrome c oxidase 1 gene, CO1) ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดของสัตว์ เช่น นก แมลง ปลา กุ้งกิ้งกือ หอยทากบก และไส้เดือน ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงได้ใช้ CO1 ร่วมกับ 16S rRNA และ 28S rRNA สำหรับวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหอยทรายสกุล *Mekongia* ในประเทศไทย

เนื่องจากหอยทรายเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งซึ่งมีผู้นิยมบริโภค ถึงแม้จะมีรายงานในเชิงอนุกรมวิธานพื้นฐานมาบ้าง ในขณะที่ข้อมูลทางด้านอื่นไม่มี อีกทั้งในปัจจุบันนี้ได้มีการค้นพบสปีชีส์ซ่อนเร้นเป็นจำนวนมากซึ่งเป็นการบ่งบอกความหลากหลายของหอยน้ำจืดในภูมิภาคนี้ ถือว่าเป็นการเน้นย้ำว่าประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพที่สลับซับซ้อน นอกจากนี้ทำให้ทราบโครงสร้างทางพันธุกรรมของหอยทรายในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการประเมินสถานะภาพของหอยทรายในประเทศไทย เพื่อต่อยอดใช้ประโยชน์จากผลการประเมินโครงสร้างทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อประชาชนในท้องถิ่นนั้น ๆ

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนอนุรักษ์ และการจัดการทรัพยากรชีวภาพที่มีค่านี้ให้ยั่งยืนและเป็นข้อมูลสำหรับงานวิจัยต่อยอดในอนาคต จึงคาดว่าผลการวิเคราะห์จะมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และการบ่งชี้สิ่งมีชีวิตเฉพาะถิ่นทางภูมิศาสตร์ของหอยทรายในประเทศไทย





ภาพที่ 2 ถิ่นที่อยู่อาศัยของหอยทราย

ที่มา: ภาพโดยผ่องพรรณ ประสารกก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างหอยทราয় Mekongia 5 ชนิด ดังนี้

M. pongensis

M. rattei

M. lamarcki

M. swainsoni

M. swainsoni swainsoni

M. swainsoni braueri

M. swainsoni kmeriana

M. sphaericula

M. sphaericula sphaericula

M. sphaericula spiralis

M. sphaericula extensa

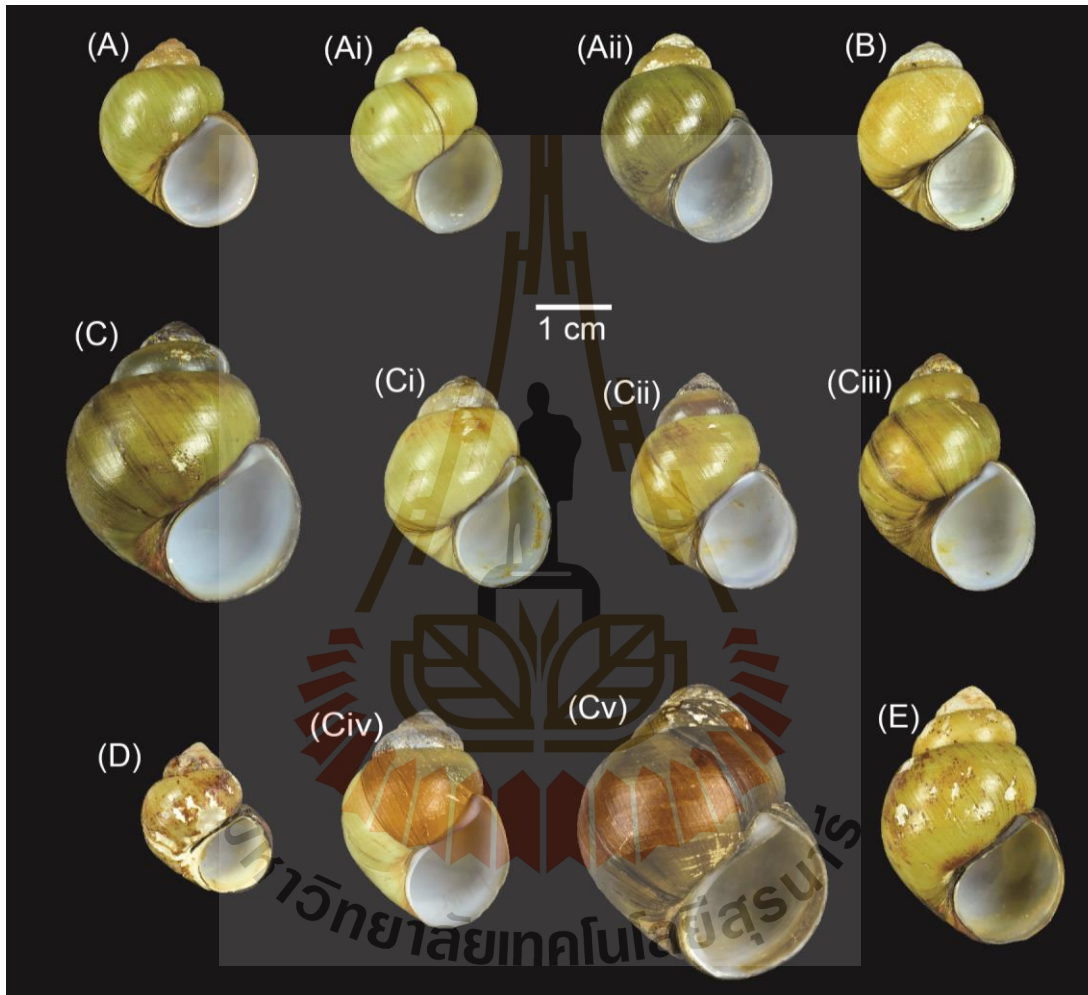
เก็บตัวอย่างให้ทั่วการกระจายของหอยทราয়ในประเทศไทย บางพื้นที่ในประเทศลาวและประเทศกัมพูชา ทั้งหมด 46 พื้นที่ ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 4 จากนั้นคงสภาพตัวอย่างและลงบันทึกในทะเบียนตัวอย่าง ทำการจำแนกสปีชีส์และซบสปีชีส์ของหอยทราয়ตามเอกสารของ Brandt (1974) และ Prasankok et al. (2009) ดังภาพที่ 3

2. การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน

ตัดเนื้อเยื่อของส่วนเท้ามาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย คือ 28S rRNA 16S rRNA และ CO1 จำนวน 84 ตัวอย่างสำหรับหอยทราয় และหอยขม 2 ชนิด คือ *Filopaludina javanica* และ *Filopaludina martensi* จำนวน 3 ตัวอย่าง สำหรับกลุ่มนอก จากนั้นเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้ ยีน CO1 ตาม Folmer et al. (1994) ยีน 16S rRNA ตาม Kessing et al. (1989) และยีน 28S rRNA ตาม Morgan et al. (2002) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้สภาวะ ดังนี้

Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 15 นาที
 Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 Annealing 50-59 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 Extention 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
 Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

} 35 รอบ



ภาพที่ 3 สปีชีส์และซบสปีชีส์ของหอยทราย *Mekongia*; A = *M. swainsoni swainsoni*, Ai = *M. swainsoni braueri*, Aii = *M. swainsoni kmeriana*, B = *M. lamarcki*, C = *M. sphaericula sphaericula*, Ci = *M. sphaericula sphaericula*, Cii = *M. sphaericula extensa*, Ciii = *M. sphaericula extensa*, Civ = *M. sphaericula sphaericula*, Cv = *M. sphaericula sphaericula*, D = *M. pongensis* และ E = *M. rattei*

ที่มา: ภาพโดยฟ่องพรรณ ประสารกก

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง 23 ABI 3730 XLs sequencer (Macrogen) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MUSCLE ใน MEGA6.06 (Tamura et al., 2013) เพื่อจัดเรียงข้อมูลและตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนสำหรับยีน CO1

2. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของยีน 28S rRNA 16S rRNA และ CO1 โดยคำนวณค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity; π) ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (Haplotype diversity; Hd) จำนวนแฮพโลไทป์ (Number of haplotype; h) และจำนวนตำแหน่งที่มีความหลากหลาย (S) ด้วยโปรแกรม DnaSP v 5.10 (Librado & Rozas, 2009)

3. ทดสอบโมเดลทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม jModelTest v. 2.1.4 (Darriba et al., 2012) โดยแบ่งชุดข้อมูลสำหรับวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ออกเป็น 5 ชุดข้อมูล ดังนี้

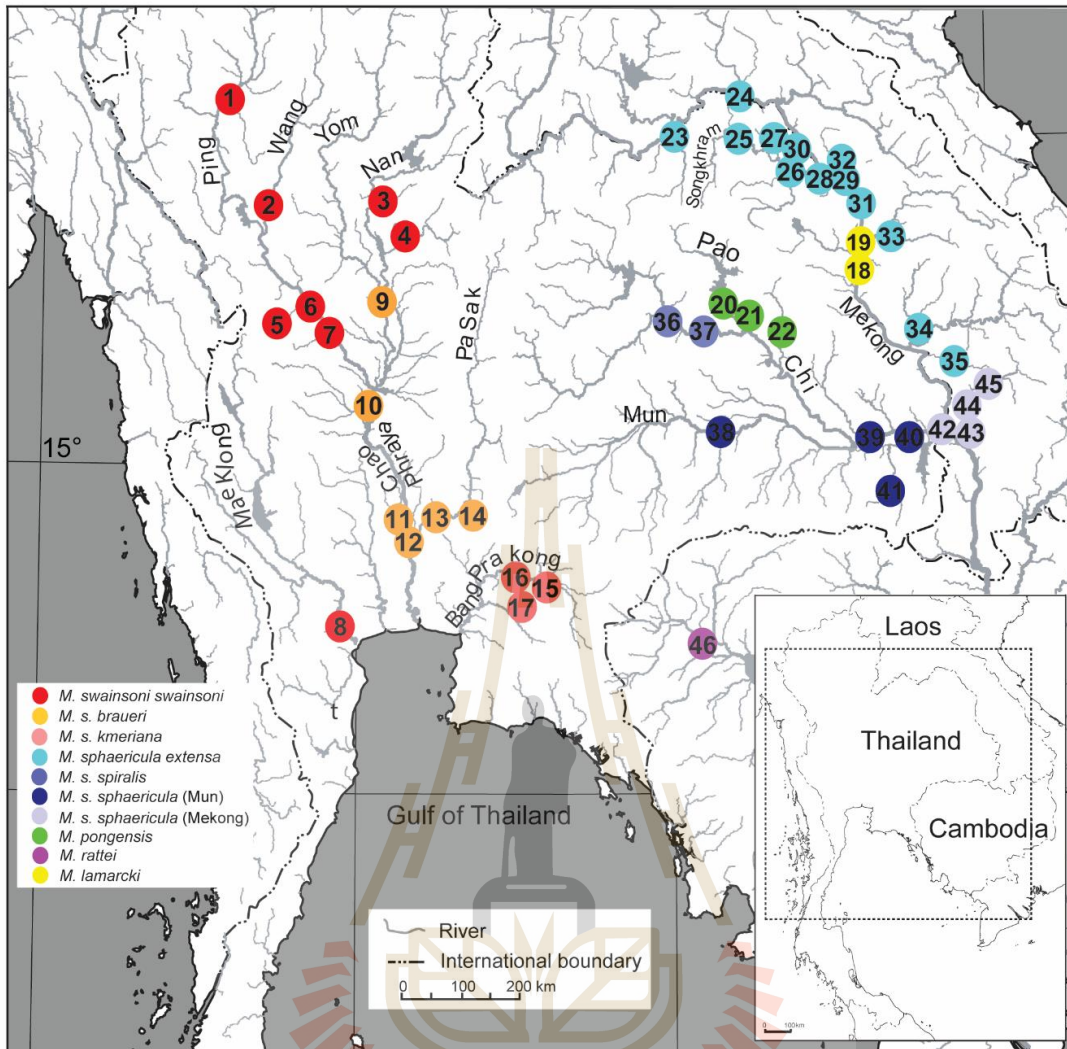
1. 28S rRNA ยีนจากนิวเคลียส
2. 16S rRNA ยีนจากไมโทคอนเดรีย
3. CO1 ยีนจากไมโทคอนเดรีย
4. 16S rRNA + CO1 ยีนจากไมโทคอนเดรีย
5. 16S rRNA + CO1 + 28S rRNA

4. วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) และ Bayesian Inference (BI) ด้วยโปรแกรม RAxML v.7.6.3 (Stamatakis, 2006) และ MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) ตามลำดับ ใน CIPRES (Miller et al., 2010) ในการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นได้ใช้ *Filopaludina javanica* และ *Filopaludina martensi* เป็น กลุ่มนอก โดยแบ่งชุดการวิเคราะห์ข้อมูลตามข้อ 3

5. การวิเคราะห์ความต่างทางวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มประชากรหอยทวาย สามารถวิเคราะห์ได้จากระยะห่างทางพันธุกรรมโดยคำนวณจากค่า uncorrected p-distances ของยีน 28S rRNA 16S rRNA และ CO1 ด้วยโปรแกรม MEGA6.06

6. วิเคราะห์ขอบเขตของสปีชีส์ ทำการวิเคราะห์ขอบเขตของสปีชีส์ของหอยทวายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ด้วยวิธี GMYC (generalized mixed Yule coalescence) ในโปรแกรม BEAUti v2 ใน BEAST v.2.4.0 (Bouckaert et al., 2014) บนเว็บไซต์ <http://species.h-its.org> และวิเคราะห์ด้วยวิธี ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery; Puillandre et al., 2012)

7. วิเคราะห์แฮพโลไทป์เฉพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีน จากนั้นสร้างโครงข่ายของแฮพโลไทป์ด้วยค่า median-joining (Bandelt et al., 1999) ในโปรแกรม Network (<http://www.fluxus-technology.com>)



ภาพที่ 4 แผนที่การเก็บตัวอย่าง ตัวเลขแสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 1 และ สีแสดงสปีชีส์และซับสปีชีส์ของหอยทราวย *Mekongia*

ตารางที่ 1 แสดง สปีชีส์ ซับสปีชีส์ พื้นที่เก็บตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างและรหัสตัวอย่างของหอยทราวัยที่ใช้ในการวิจัย

สปีชีส์	ซับสปีชีส์	เลขที่พื้นที่	รหัสตัวอย่าง	พื้นที่เก็บตัวอย่าง				
<i>M. swainsoni</i>	<i>swainsoni</i>	1	M63 M64	แม่น้ำปิง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย				
		2	M32	แม่น้ำปิง บ้านคณธี อำเภอลองขลุ้ง จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย				
		3	M38	แม่น้ำปิง อำเภอชาณุวรลักษณบุรี จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย				
		4	M06	แม่น้ำน่าน อำเภอวัดโบสถ์ จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย				
		5	M34	แม่น้ำเข็ก อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย				
		6	M61 M62	แม่น้ำแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี ประเทศไทย				
		7	M40	แม่น้ำวังทอง บ้านวังไคร้ อำเภอสางเภา จังหวัดตาก ประเทศไทย				
		8	M30	แม่น้ำปิง อำเภอลองขลุ้ง จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย				
<i>braueri</i>		9	M36	แม่น้ำยม อำเภอสางเภา จังหวัดพิจิตร ประเทศไทย				
		10	M57	แม่น้ำเจ้าพระยา บ้านตานิว อำเภอโกรกพระ จังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทย				
		11	M46 M47 M56	แม่น้ำน้อย อำเภอบางสะเดียง จังหวัดอ่างทอง ประเทศไทย				
		12	MBB	อำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย				
		13	M08 M09 M10 M52 M53	วัดแค อำเภอท่าเรือ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย				
		14	M54 M55 KK1 KK2 MK	แม่น้ำป่าสัก บ้านม่วง อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี ประเทศไทย				
		<i>kmeriana</i>		15	M66 M67 MG	แม่น้ำพระปรง อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ประเทศไทย		
				16	M50 M51	อำเภอประจันตคาม จังหวัดปราจีนบุรี ประเทศไทย		
				17	M48 M49	แม่น้ำพระปรง บ้านท่าตุม อำเภอศรีมหาโพธิ์ จังหวัดปราจีนบุรี ประเทศไทย		
				<i>M. lamarcki</i>		18	M60 M42	แม่น้ำโขง แก่งกะเบา อำเภอวังใหญ่ จังหวัดมุกดาหาร ประเทศไทย
						19	MPN	แม่น้ำโขง พระธาตุพนม จังหวัดนครพนม ประเทศไทย
		<i>M. pongensis</i>		20	M58 M43	แม่น้ำป่า บ้านบัวบาน อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย		
				21	M59	แม่น้ำป่า ลำแพน อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย		
				22	M45	แม่น้ำแพน จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย		
<i>M. sphaericula</i>	<i>extensa</i>	23	M79	แม่น้ำสวย วัดหลวง อำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย ประเทศไทย				
		24	TM1	แม่น้ำโขงที่วัดวิมุตตาราม จังหวัดบึงกาฬ ประเทศไทย				

		TM2	
		MB1	
25	M76	แม่น้ำสงคราม อำเภอคำตากล้า จังหวัดสกลนคร ประเทศไทย	
26	M80	แม่น้ำสงครามที่ท่าคอน อำเภออากาศอำนวย จังหวัดสกลนคร ประเทศไทย	
		M80A	
		M80B	
		M80C	
		M80D	
27	M75	แม่น้ำเมอ อำเภอสรีสงคราม จังหวัดนครพนม ประเทศไทย	
28	M77	แม่น้ำสงครามที่ชัยบุรี อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม ประเทศไทย	
29	M65	แม่น้ำโขง อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม ประเทศไทย	
		MS	แม่น้ำสงคราม อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม ประเทศไทย
30	M12	แม่น้ำอวย อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม ประเทศไทย	
		M13	
		M13-2	
		M14	
31	M15	แม่น้ำโขง จังหวัดนครพนม ประเทศไทย	
		M02	
		M03	
32	M68	แม่น้ำหินปูน แขวงคำม่วน ประเทศลาว	
33	M70	น้ำปากัน แขวงคำม่วน ประเทศลาว	
34	M71	แม่น้ำบางเหียง ประเทศลาว	
35	M69	เซบั้งวล ประเทศลาว	
<i>spiralis</i>	36	M44	แม่น้ำชี อำเภอท่าขอนยาง จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย
	37	M29	บ้านโศกชัย อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย
<i>sphaericula</i>	38	MT	แม่น้ำมูล บ้านปราสาท อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ ประเทศไทย
	39	MW	แม่น้ำมูล อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ประเทศไทย
	40	M81	แม่น้ำโดม อำเภอพิบูลย์รักษ์ จังหวัดอุบลราชธานี ประเทศไทย
	41	M82	แม่น้ำโดม อำเภอเดชอุดม จังหวัดอุบลราชธานี ประเทศไทย
	42	M25	แม่น้ำโขง อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี ประเทศไทย
		M23	
	43	M04-2	แม่น้ำเซดอน บ้านนางค้อย จำปาสัก ประเทศลาว
	44	M72	แม่น้ำเซดอน บ้านโพธิ์ดก ปากเซ ประเทศลาว
	45	M20	แม่น้ำเซดอน ปากเซ ประเทศลาว
		M26	
		M27	
		M28	
<i>M. rattei</i>	46	CA1	แม่น้ำศรีโสภณ ประเทศกัมพูชา
		CA2	
		CA3	
		CA4	
		CA5	
<i>Filopaludina javanica</i>		OM1	คลองสี่เสียด จังหวัดนครนายก ประเทศไทย
<i>Filopaludina martensi</i>		OM2	บ้านวังใหม่ อำเภอวังสมบูรณ์ จังหวัดสระแก้ว ประเทศไทย
		OM3	อำเภอประจันตคาม จังหวัดปราจีนบุรี ประเทศไทย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของหอยทราয়สกุล *Mekongia* ที่เก็บตัวอย่างจาก 46 แห่ง ทั่วประเทศไทย ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า

ยีน 16S rRNA ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 505 คู่เบส มี 31.7% GC มีเบส 380 ตำแหน่งที่ไม่มี ความหลากหลาย มี 125 (24.8%) ตำแหน่งมีความหลากหลาย และมี 99 (19.6%) ตำแหน่งที่ให้ ข้อมูลสำหรับวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ยีน 28S rRNA ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 482 คู่เบส มี 65.5% GC มีเบส 306 ตำแหน่งที่ไม่มี ความหลากหลาย มี 176 (36.5%) ตำแหน่งมีความหลากหลาย และมี 173 (35.9%) ตำแหน่งที่ให้ ข้อมูลสำหรับวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ยีน CO1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 660 คู่เบส มี 34.9% GC มีเบส 422 ตำแหน่งที่ไม่มี ความหลากหลาย มี 238 (36.1%) ตำแหน่งมีความหลากหลาย และมี 226 (34.2%) ตำแหน่งที่ให้ ข้อมูลสำหรับวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ยีน 16S rRNA+CO1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 1,165 คู่เบส มีเบส 793 ตำแหน่งที่ไม่มี ความหลากหลาย มี 356 ตำแหน่งมีความหลากหลาย และมี 319 ตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับ วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ยีน 28S rRNA+16S rRNA+CO1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 1,647 คู่เบส มี 42.6% GC มีเบส 1,116 ตำแหน่งที่ไม่มี ความหลากหลาย มี 531 (32.2%) ตำแหน่งมีความหลากหลาย และมี 491 (29.8%) ตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสำหรับวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

2. ผลการทดสอบโมเดลทางวิวัฒนาการ

โมเดลทางวิวัฒนาการที่วิเคราะห์ได้ตามชุดข้อมูลคือ

1. 28S rRNA คือ JC (Jukes & Cantor, 1969)
2. 16S rRNA คือ HKY (Hasegawa et al., 1985)
3. CO1 คือ JC (Jukes & Cantor, 1969)
4. 16S rRNA+CO1 คือ GTR (Tavaré, 1986)
5. 28S rRNA+16S rRNA+CO1 คือ GTR+I+G

3. แผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ

เมื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี BI และ ML พบว่า รูปแบบแผนภูมิต้นไม้คล้ายกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยชุดข้อมูล 4 ชุดข้อมูล คือ 16S rRNA CO1 16S rRNA+CO1 และ 28S rRNA+16S rRNA+CO1 ดังภาพที่ 5-9 ในขณะที่ชุดข้อมูล 28S rRNA ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำเกินไปทำให้ไม่พบรูปแบบการจัดกลุ่มทางวิวัฒนาการ ดังภาพที่ 10 และตารางที่ 2

ถึงแม้จะมี 4 ชุดข้อมูล สามารถสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ อย่างไรก็ตามรูปแบบแผนภูมิต้นไม้ที่มีค่าสนับสนุน (ML boot strap และ posterior probability) สูงที่สุด คือ ภาพที่ 5 ซึ่งเป็นแผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์ด้วยชุดข้อมูล 28S rRNA+16S rRNA+CO1 ในขณะที่แผนภูมิที่เหลือมีค่าสนับสนุนต่ำหรือปานกลางดังภาพที่ 7-9

แผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์ด้วยชุดข้อมูล 28S rRNA+16S rRNA+CO1 พบว่า หอยทราয়สกุล *Mekongia* แสดงสายวิวัฒนาการเดี่ยว (monophyly) มีค่าสนับสนุนเป็น Bayesian posterior probability และ ML bootstrap (BPP/ML) คือ 1/100 จากนั้นจึงแยกออกเป็น 2 สายวิวัฒนาการ (clade) คือ สายวิวัฒนาการ A-E (1) และสายวิวัฒนาการ F (0.57/79) จากนั้นสายวิวัฒนาการ A-E จึงแยกออกเป็น 2 สายวิวัฒนาการย่อย คือ สายวิวัฒนาการ A (1/99) และสายวิวัฒนาการ B-E (1/70) จากนั้นสายวิวัฒนาการ B-E จึงแยกออกเป็น 2 สายวิวัฒนาการย่อย คือ สายวิวัฒนาการ B และ C (0.99/65) และสายวิวัฒนาการ D และ E (1/90) จากนั้นแต่ละสายจึงแยกออกเป็นสายวิวัฒนาการ B (1/96) และ C (1/90) และสายวิวัฒนาการ D (1.98) และ E (1/99) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาแต่ละสายวิวัฒนาการ พบว่า สายวิวัฒนาการสอดคล้องกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ (ภาพที่ 6) และไม่สอดคล้องและสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาโดย Brandt (1974) โดยแต่ละสายวิวัฒนาการประกอบด้วยตัวอย่าง ดังนี้

1) สายวิวัฒนาการ A ประกอบด้วยหอยทราয়สปีชีส์ *M. swainsoni* และประกอบด้วย 3 ซับสปีชีส์ คือ *M. swainsoni swainsoni* *M. swainsoni braueri* และ *M. swainsoni kmeriana* โดยที่ทั้ง 3 ซับสปีชีส์ไม่มีรูปแบบการจัดกลุ่มทางสายวิวัฒนาการ ในสายวิวัฒนาการนี้พบตามแม่น้ำทางภาคเหนือของประเทศไทย คือ แม่น้ำปิง วัง ยม และน่าน แม่น้ำทางภาคกลาง คือ แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำสาขาของแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำแม่กลอง และแม่น้ำจากภาคตะวันออก เช่น แม่น้ำปราจีนบุรีและคลองสาขา เช่น คลองพระปรัง จากสายวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องและสนับสนุนการจัดจำแนกตาม Brandt (1974) ในระดับสปีชีส์ อย่างไรก็ตามสายวิวัฒนาการ A ไม่สนับสนุนการจัดจำแนกเป็นซับสปีชีส์เนื่องจากรูปแบบของการจัดกลุ่มภายในสายวิวัฒนาการไม่เกิดขึ้น นอกจากนี้ผลการศึกษายังสอดคล้องกับการศึกษาของ Prasankok et al. (2009)

2) สายวิวัฒนาการ B คือ *M. sphaericula extensa* เป็นตัวอย่างจากลุ่มน้ำสงครามและแม่น้ำสาขา รวมทั้งแม่น้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและแม่น้ำสาขาในลาวบริเวณใกล้เคียง สาย

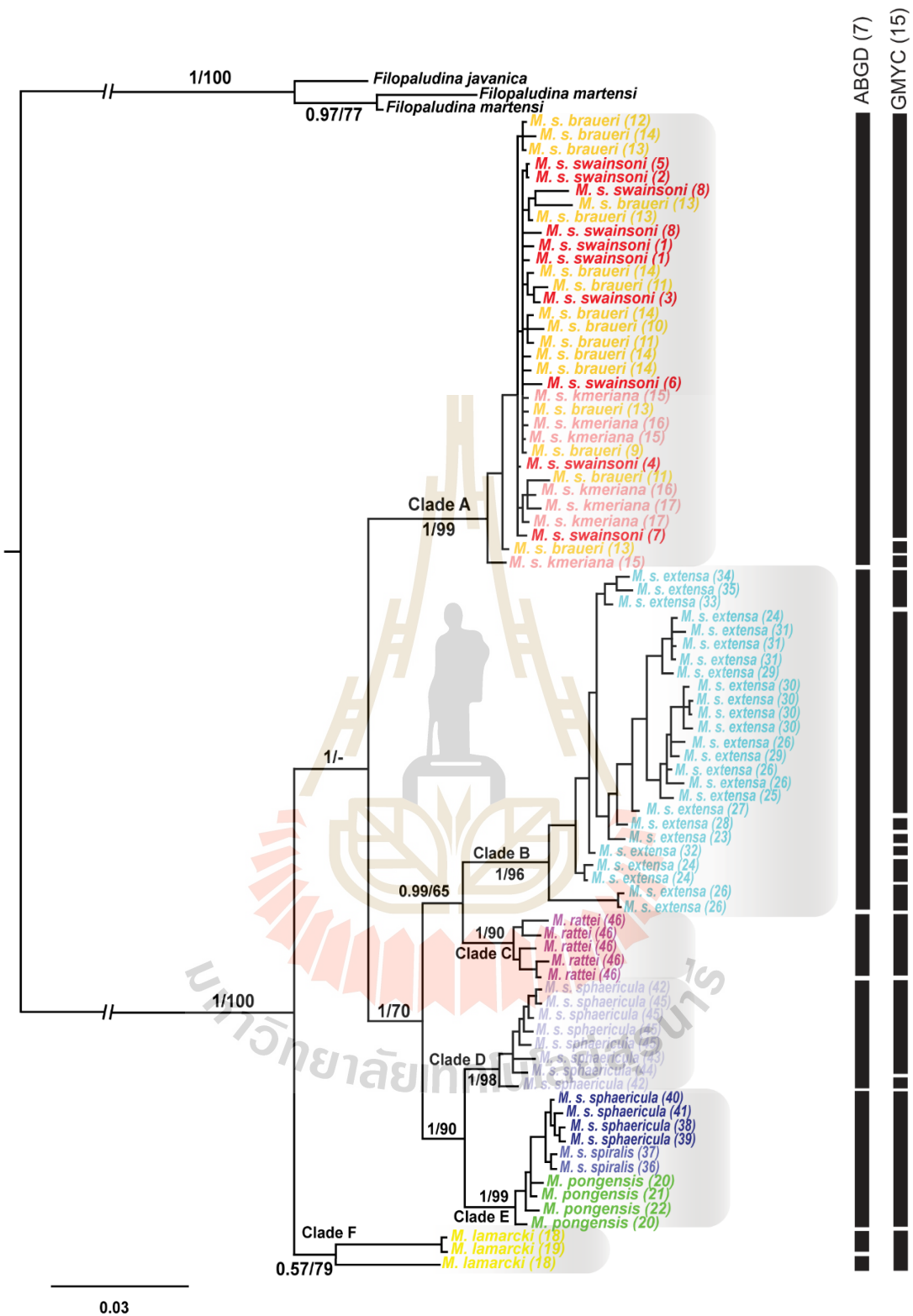
วิวัฒนาการนี้สอดคล้องและสนับสนุนการจัดจำแนกตาม Brandt (1974) ที่จำแนกเป็นซับสปีชีส์ *M. sphaericula extensa* ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Prasankok et al. (2009)

3) สายวิวัฒนาการ C คือ *M. rattei* ประกอบด้วยตัวอย่างจากแม่น้ำตาบัน เมืองศรีโสภณ ประเทศกัมพูชา ซึ่งอยู่ในลุ่มน้ำโตนเลสาป สายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องกับการจำแนกของ Brandt (1974) ที่จำแนกเป็น *M. rattei*

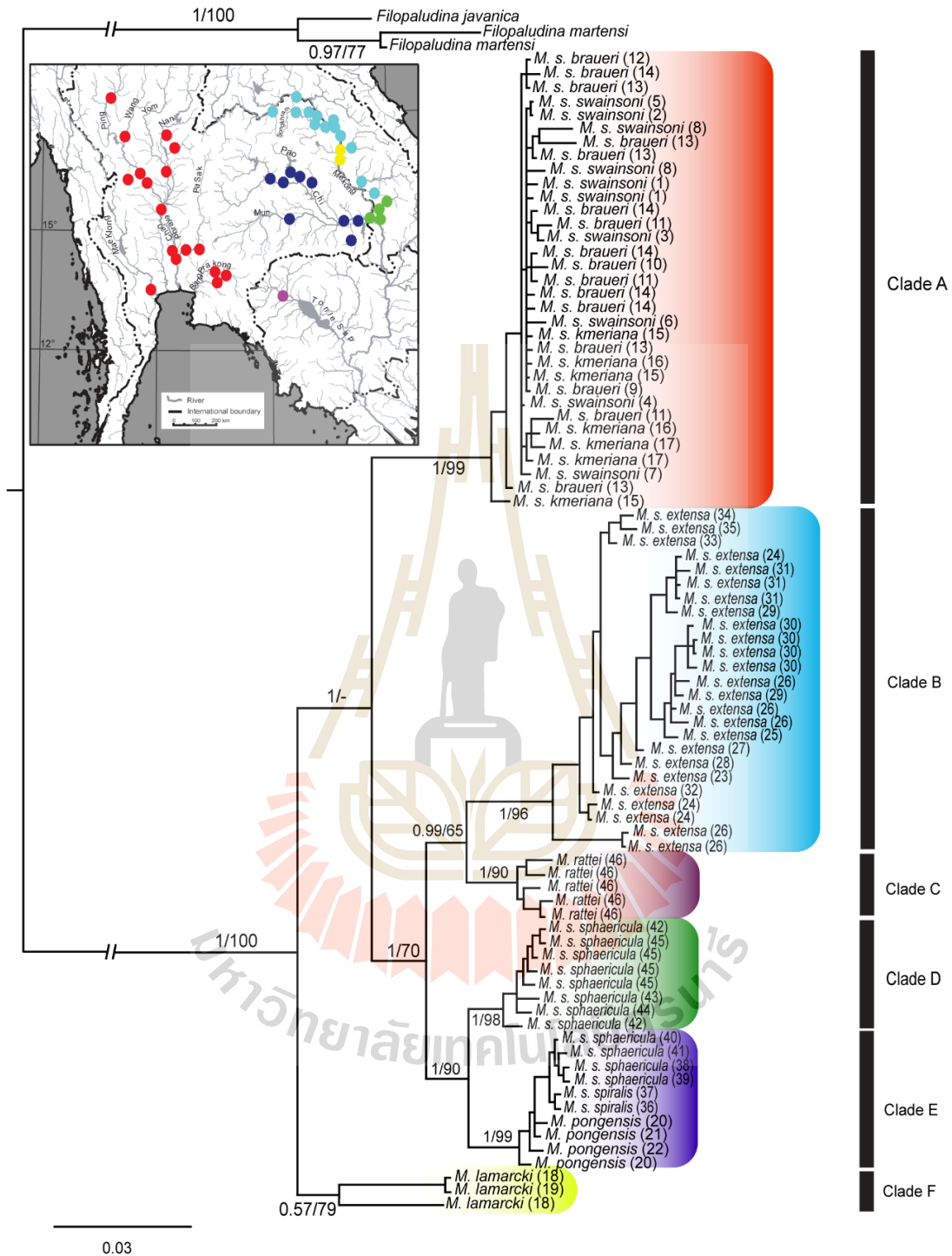
4) สายวิวัฒนาการ D คือ *M. sphaericula sphaericula* ประกอบด้วยตัวอย่างจากแม่น้ำโขงตรงบริเวณแยกที่จะเข้าไปในลาวที่อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี และแม่น้ำโขงในลาว ตรงบริเวณเมืองปากเซ สายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องและสนับสนุนการจัดจำแนกตาม Brandt (1974) ที่จำแนกเป็น *M. sphaericula sphaericula* ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Prasankok et al. (2009)

5) สายวิวัฒนาการ E ประกอบด้วย *M. sphaericula sphaericula* *M. sphaericula spiralis* และ *M. pongensis* สายวิวัฒนาการนี้พบกระจายตัวตามลุ่มน้ำชี ลุ่มน้ำมูล แม่น้ำปาว ตลอดจนแม่น้ำโขงบริเวณใกล้เคียง สายวิวัฒนาการนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Prasankok et al. (2009) แต่ไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกของ Brandt (1974) ซึ่ง Brandt จำแนกหอยทรายในลุ่มน้ำชีเป็น *M. sphaericula spiralis* แม่น้ำปาวเป็น *M. pongensis* และจำแนกหอยทรายในลุ่มน้ำมูลเป็น *M. sphaericula sphaericula*

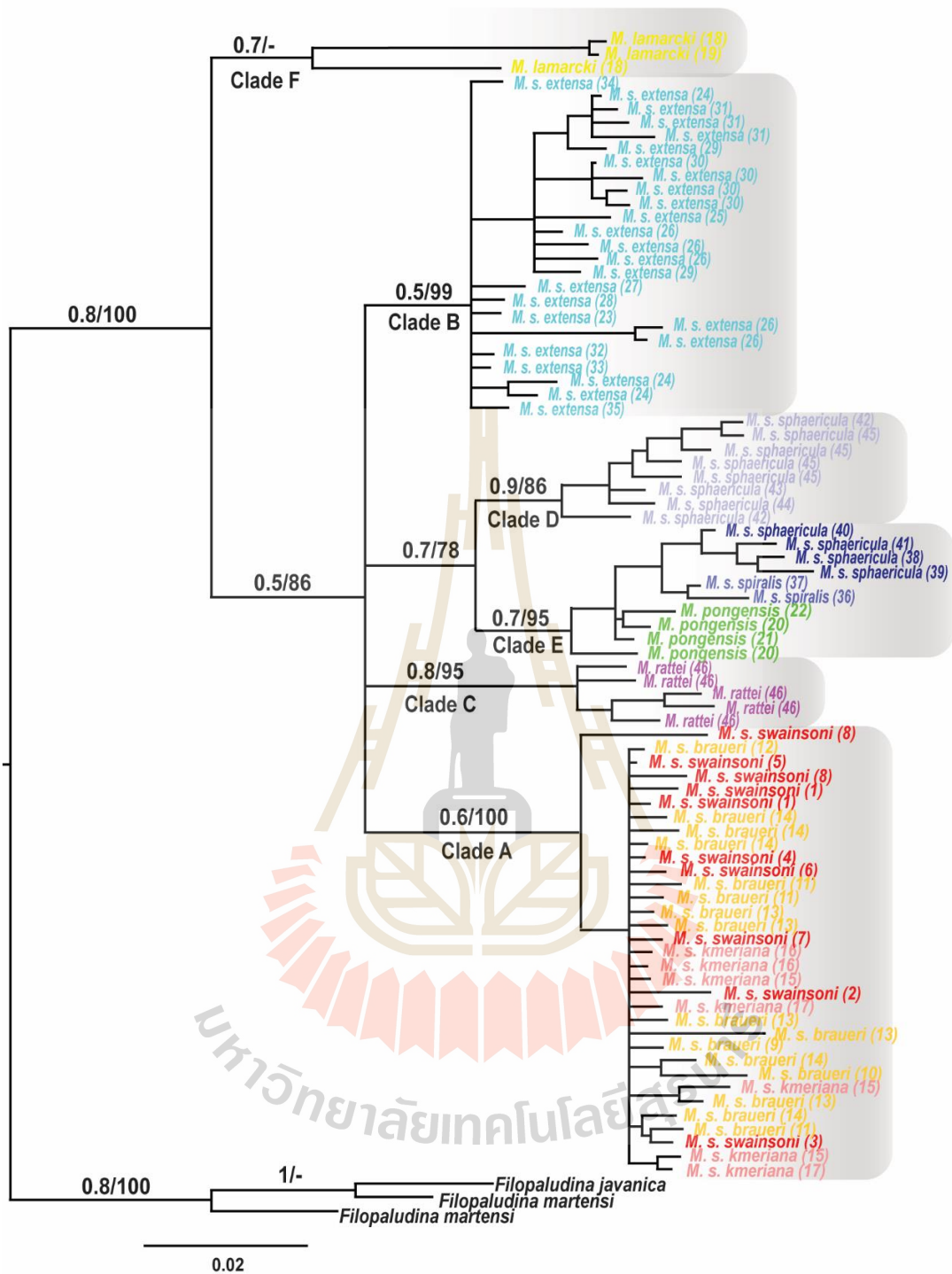
6) สายวิวัฒนาการ F คือ *M. lamarcki* ประกอบด้วยตัวอย่างจากแก่งกะเบาและบริเวณใกล้เคียง สายวิวัฒนาการนี้สนับสนุนการจัดจำแนก ตาม Brandt (1974) ที่จำแนกเป็น *M. lamarcki*



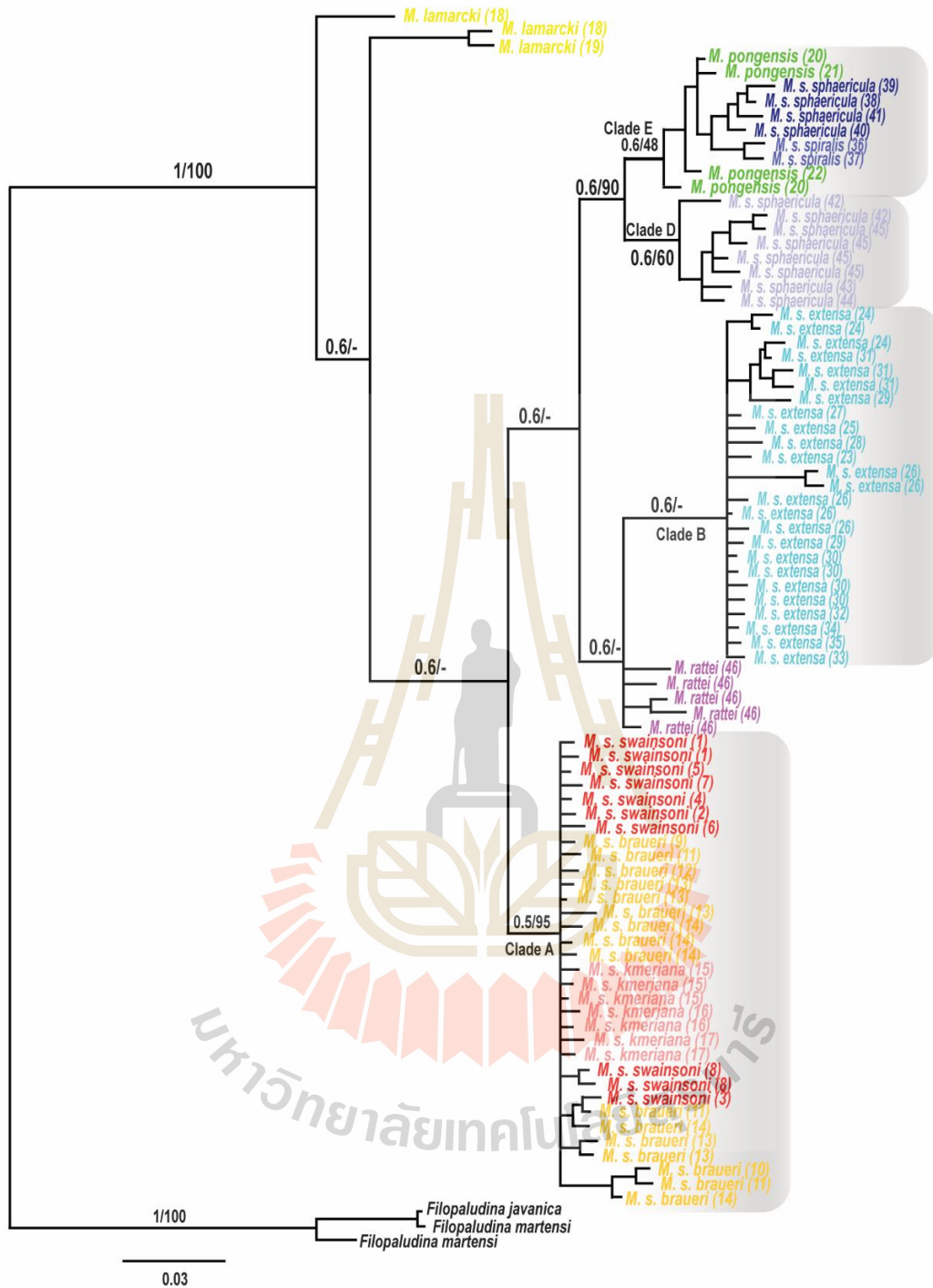
ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทราয়สกุล *Mekongia* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจากยีน 28S rRNA+CO1+16S rRNA สีสอดคล้องกับซิปส์ซีและสปิซีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap) และแถบด้านข้างแสดงจำนวนสปิซีส์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABGD และ GMYC



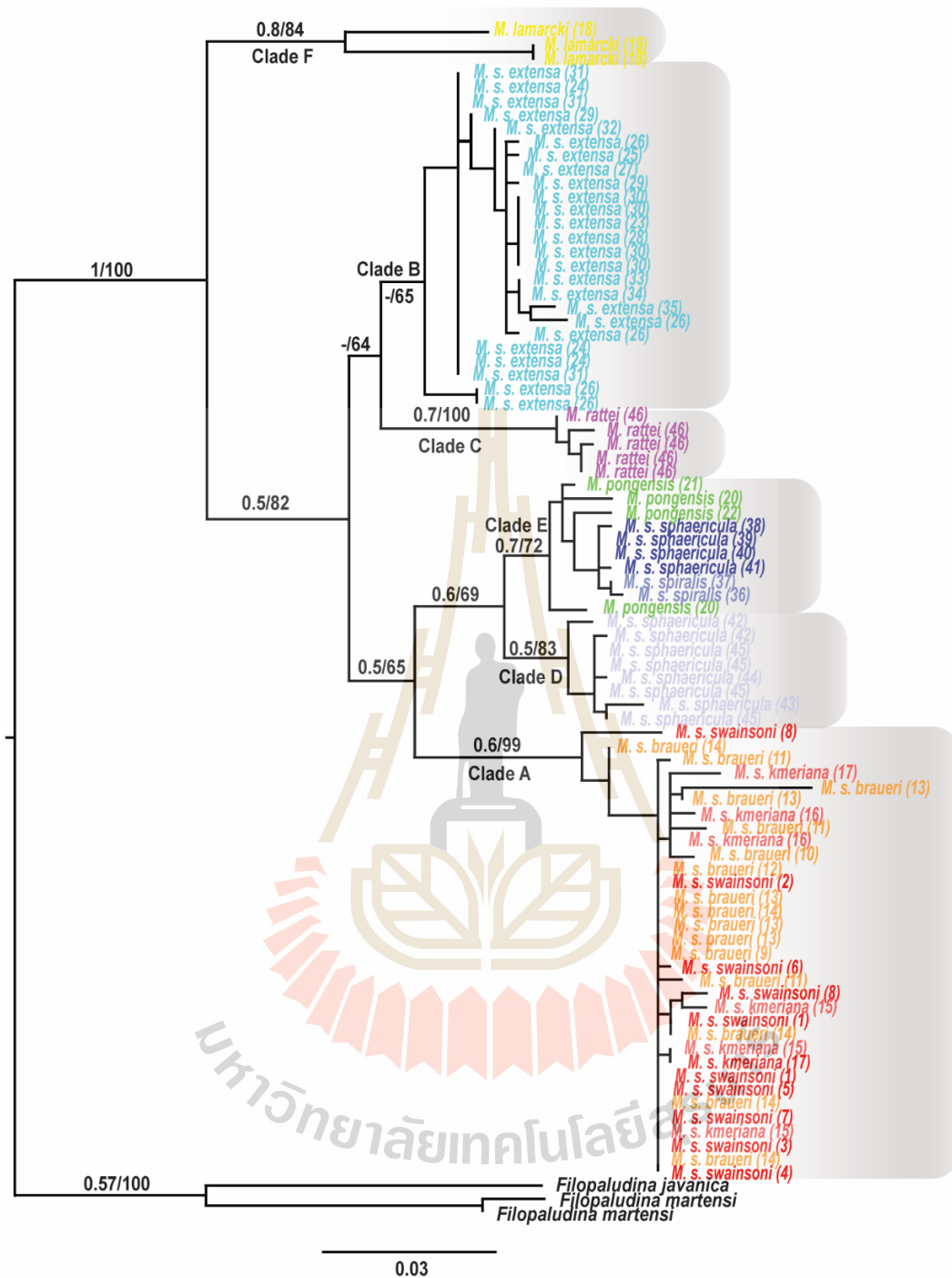
ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการและลักษณะทางภูมิศาสตร์ในหอยทรายสกุล *Mekongia* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจากยีน 28S rRNA+16S rRNA+CO1 สีสอดคล้องกับแม่น้ำและสายวิวัฒนาการ ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap)



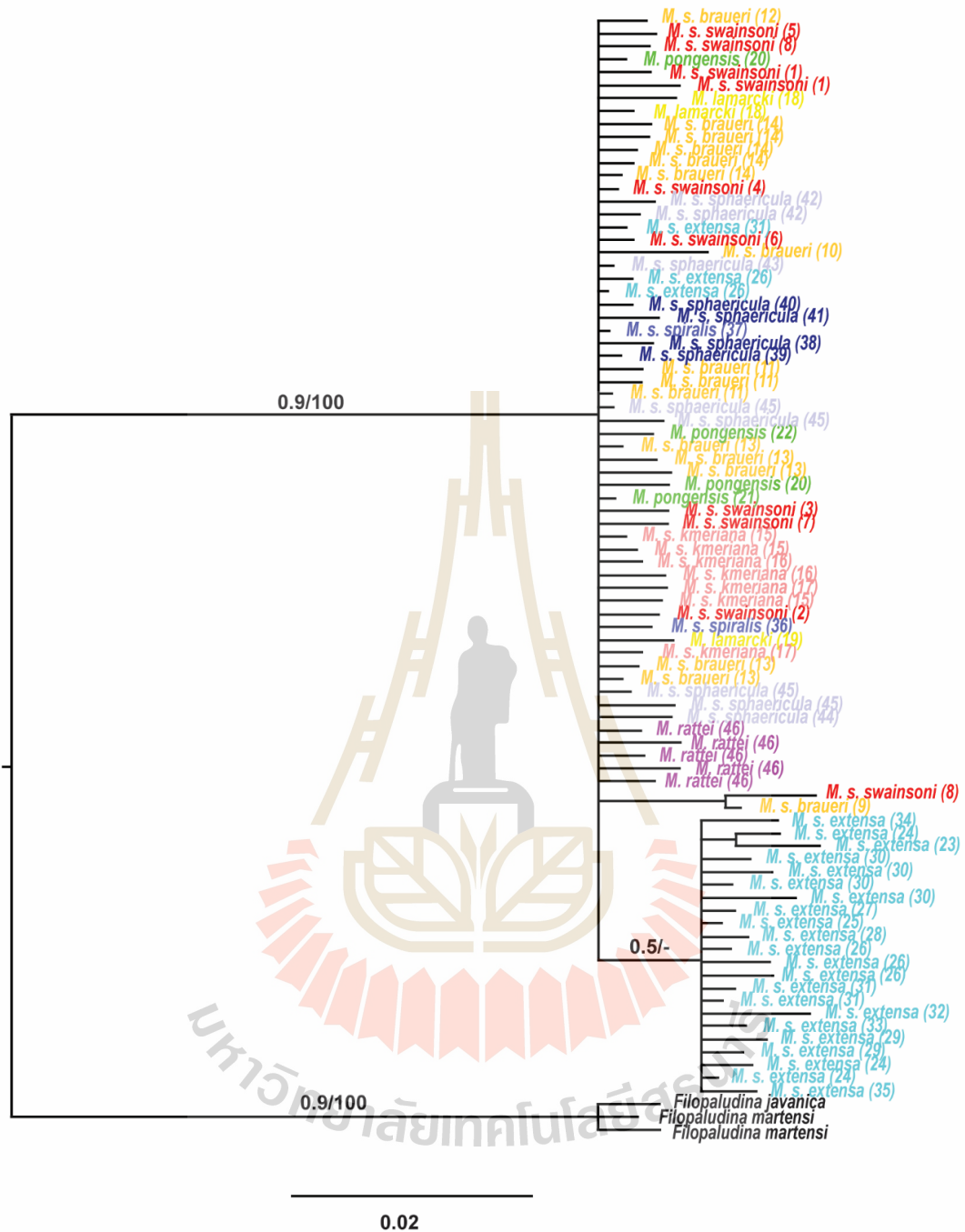
ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทราซสกุล *Mekongia* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจากยีน CO1+16S rRNA สีสอดคล้องกับซัพสปีชีส์และสปีชีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap)



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทรายสกุล *Mekongia* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจากยีน CO1 สีสอดคล้องกับซับสปีชีและสปีชีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยก แสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap)



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทราয়สกุล *Mekongia* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจากยีน 16S rRNA สีสอดคล้องกับซับสปีชีและสปีชีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap)



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในหอยทราয়สกุล *Mekongia* เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี BI โดยอาศัยข้อมูลจากยีน 28S rRNA สีสอดคล้องกับซิปส์ซีและสปิซีส์ตามภาพที่ 4 ตัวเลขตรงจุดแยกแสดงค่าสนับสนุน (posterior probability/ML bootstrap)

4. ค่าความผันแปรทางพันธุกรรม

หอยทราয়มีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมสูงในยีน 16S rRNA และ CO1 และมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำในยีน 28S rRNA ดังนี้

ยีน 16S rRNA มีค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (π) คือ 0.04489 และค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (Hd) คือ 0.959 และจำนวนตำแหน่งที่มีความหลากหลาย (S) คือ 103

ยีน CO1 มีค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 0.06640 และค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ คือ 0.987 และจำนวนตำแหน่งที่มีความหลากหลาย คือ 144

ยีน 28S rRNA มีค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 0.00573 และค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ คือ 0.885 และจำนวนตำแหน่งที่มีความหลากหลาย คือ 15

เมื่อเปรียบเทียบค่าความผันแปรทางพันธุกรรมในแต่ละสายวิวัฒนาการ พบว่า ความผันแปรทางพันธุกรรมสอดคล้องกันในแต่ละสายวิวัฒนาการ กล่าวคือ ในยีน 16S rRNA และ CO1 มีค่าสูง ในขณะที่ค่าความผันแปรทางพันธุกรรมในยีน 28S rRNA มีค่าต่ำ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความผันแปรทางพันธุกรรมของหอยทราয় จากข้อมูลยีน CO1 16S rRNA และ 28S rRNA ซึ่ง n คือ จำนวนตัวอย่าง; S คือ จำนวนตำแหน่งที่มีความหลากหลาย; Hd คือ ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ และ π คือ ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์

สายวิวัฒนาการ	n	S			Hd			π		
		CO1	16S	28S	CO1	16S	28S	CO1	16S	28S
<i>M. swainsoni</i> (A)	33	26	36	5	0.939	0.797	0.837	0.00533	0.00701	0.00385
<i>M. s. extensa</i> (B)	25	48	19	10	0.960	0.897	0.590	0.02147	0.00822	0.00297
<i>M. rattei</i> (C)	5	19	5	0	1.000	0.900	0	0.01515	0.00436	0
<i>M. s. sphaericula</i> (Mekong) (D)	8	21	10	1	0.964	0.893	0.250	0.01006	0.00530	0.00052
<i>M. s. sphaericula</i> (Mun)/ <i>spiralis</i> / <i>pongensis</i> (E)	10	9	17	0	0.978	0.978	0	0.00552	0.00955	0
<i>M. lamarcki</i> (F)	3	53	23	0	1.000	0.667	0	0.05354	0.03036	0
Pooled	84	144	103	15	0.987	0.959	0.885	0.06640	0.04489	0.00573

5. ผลการวิเคราะห์ขอบเขตของสปีชีส์

เมื่อวิเคราะห์ขอบเขตของสปีชีส์ในหอยทราয় พบว่า ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ พบจำนวนชนิดในหอยทราয় 6 ชนิด คือ 1. *M. swainsoni* 2. *M. sphaericula extensa* 3. *M. sphaericula sphaericula* (Mekong) 4. *M. sphaericula sphaericula* (Mun) / *spiralis* / *pongensis* 5. *M. rattei* และ 6. *M. lamarcki* เมื่อวิเคราะห์ขอบเขตของสปีชีส์ด้วยวิธี GMYC พบว่า ในหอยทราয়สกุล *Mekongia* มีจำนวนสปีชีส์ทั้งหมด 15 ชนิด ส่วนวิธี ABGD พบว่า ในหอยทราয়สกุล *Mekongia* มีจำนวนสปีชีส์ทั้งหมด 7 ชนิด ดังภาพที่ 5

6. การประเมินการแบ่งแยกทางวิวัฒนาการระหว่างสายวิวัฒนาการ

เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรม (uncorrected p-distance) ระหว่างสายวิวัฒนาการ ทั้ง 6 สายวิวัฒนาการที่แยกได้จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้ พบว่า

ยีน 28S rRNA สายวิวัฒนาการ ทั้ง 6 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยภายในสายวิวัฒนาการต่ำ (A=0.4%, B=0.3%, C=0.0%, D=0.1%, E=0.0%, F=0.0%) เมื่อเปรียบเทียบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายวิวัฒนาการทั้งหมด พบว่า มีค่าความต่างระหว่างสายวิวัฒนาการต่ำเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3) คือ ระหว่าง 0 – 1%

ยีน 16S rRNA สายวิวัฒนาการ ทั้ง 6 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยภายในสายวิวัฒนาการต่ำ (A= 0.7%, B= 0.7%, C=0.4%, D=0.5%, E=0.9%, F=3.1%) เมื่อเปรียบเทียบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายวิวัฒนาการทั้งหมด พบว่า มีค่าความต่างระหว่างสายวิวัฒนาการปานกลางถึงสูง (ตารางที่ 3) คือ ระหว่าง 2.6 – 7.4%

ยีน CO1 สายวิวัฒนาการ ทั้ง 6 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยภายในสายวิวัฒนาการต่ำ (A=0.5%, B=2.1%, C=1.5%, D=1.0%, E=0.6%, F=5.1%) และเมื่อเปรียบเทียบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายวิวัฒนาการทั้งหมด พบว่า มีค่าความต่างระหว่างสายวิวัฒนาการปานกลางถึงสูง (ตารางที่ 3) คือ ระหว่าง 4.0 – 10.5%

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรม uncorrected p-distance (%) ของยีน CO1/16S rRNA (ทแยงมุมด้านล่าง) และ 28S rRNA (ทแยงมุมด้านบน) ตามการแบ่งกลุ่มตามสายวิวัฒนาการ

สายวิวัฒนาการ	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. <i>M. swainsoni</i> (A)	-	1.0	0.6	0.4	0.4	0.6
2. <i>M. s. extensa</i> (B)	9.8/6.0	-	0.8	0.7	0.6	0.7
3. <i>M. rattei</i> (C)	8.2/5.6	6.3/4.0	-	0.2	0.2	0.4
4. <i>M. s. sphaericula</i> (Mekong) (D)	8.8/4.9	8.1/4.6	4.9/5.1	-	0.0	0.2
5. <i>M. s. sphaericula</i> (Mun) / <i>spiralis</i> / <i>pongensis</i> (E)	8.4/5.7	7.8/4.7	5.1/5.9	4.0/2.6	-	0.2
6. <i>M. lamarcki</i> (F)	9.9/7.4	10.5/7.2	8.8/7.2	9.4/7.1	9.5/6.9	-

7. ผลการวิเคราะห์จำนวนแฮพโลไทป์ จำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะและโครงข่ายแฮพโลไทป์

เมื่อวิเคราะห์จำนวนแฮพโลไทป์และจำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะ พบว่า หอยทราयीมีจำนวนแฮพโลไทป์ ในยีน CO1 = 61 แฮพโลไทป์ ยีน 16S rRNA = 52 แฮพโลไทป์และยีน 28S rRNA = 17 แฮพโลไทป์และจำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะในยีน CO1 = 61 แฮพโลไทป์ ยีน 16S rRNA = 52 แฮพโลไทป์และยีน 28S rRNA = 15 แฮพโลไทป์ ดังตารางที่ 4

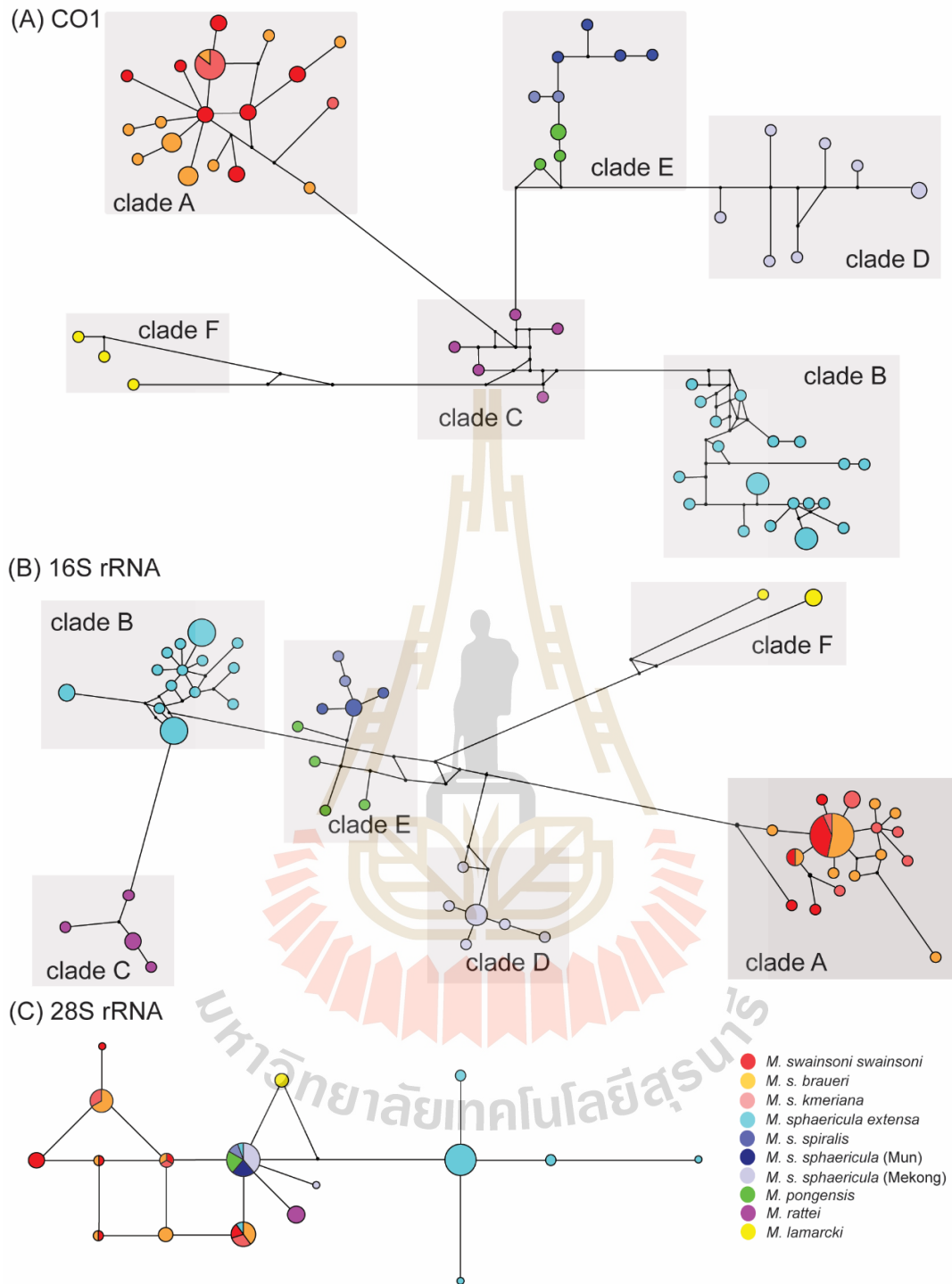
เมื่อวิเคราะห์จำนวนแฮพโลไทป์ และจำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะในแต่ละสายวิวัฒนาการ พบว่า จำนวนแฮพโลไทป์ และจำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะ ในยีน CO1 และ 16S rRNA สูงกว่า ยีน 28S rRNA ในทุกสายวิวัฒนาการ

เมื่อวิเคราะห์จำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะจากตารางที่ 4 และโครงข่ายของแฮพโลไทป์ จากภาพที่ 11 พบว่า ในยีน CO1 และ 16S rRNA สามารถแยกกลุ่มย่อยทรายได้ 6 กลุ่ม เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ด้วยแผนภูมิทางวิวัฒนาการ ดังนี้ 1) *M. swainsoni* (A) มีแฮพโลไทป์เฉพาะ คือ H1-18 ในยีน CO1 และ H1-17 ในยีน 16S rRNA 2) *M. sphaericula extensa* (B) มีแฮพโลไทป์เฉพาะ คือ H19-37 ในยีน CO1 และ H18-31 ในยีน 16S rRNA 3) *M. rattei* (C) มีแฮพโลไทป์เฉพาะ คือ H54-58 ในยีน CO1 และ H47-50 ในยีน 16S rRNA 4) *M. sphaericula sphaericula* (Mekong) (D) มีแฮพโลไทป์เฉพาะ คือ H38-44 ในยีน CO1 และ H32-37 ในยีน 16S rRNA 5) *M. sphaericula sphaericula* (Mun) / *spiralis* / *pongensis* (E) มีแฮพโลไทป์เฉพาะ คือ H45-53 ในยีน CO1 และ H38-46 ในยีน 16S rRNA และ 6) *M. lamarcki* (F) มีแฮพโลไทป์เฉพาะ คือ H59-61 ในยีน CO1 และ H51-52 ในยีน 16S rRNA

เมื่อวิเคราะห์จำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะในยีน 28S rRNA พบว่า ทั้ง 6 กลุ่มมีแฮพโลไทป์ร่วมกัน ยกเว้น *M. lamarcki* และ *M. rattei* ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จำนวนตัวอย่าง (N) จำนวนแฮพโลไทป์ (N_h) จำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะ (N_u) และการกระจายของแฮพโลไทป์ในแต่ละยีน

สายวิวัฒนาการ	N	N_h			N_u			กระจายของแฮพโลไทป์		
		CO1	16S	28S	CO1	16S	28S	CO1	16S	28S
A	33	18	17	8	18	17	7	H1-18	H1-17	H1-8
B	25	19	14	7	19	14	5	H19-37	H18-31	H1, H9, H10-13, H14
C	5	5	4	1	5	4	1	H54-58	H47-50	H16
D	8	7	6	2	7	6	1	H38-44	H32-37	H13, H15
E	10	9	9	1	9	9	0	H45-53	H38-46	H13
F	3	3	2	1	3	2	1	H59-61	H51-52	H17
Total	84	61	52	17	61	52	15	61	52	17



ภาพที่ 11 โครงข่ายแฮพโลไทป์ (Haplotype network) ของสปีชีส์หอยทราวย โดยอาศัยข้อมูลจากยีน (A) CO1 (B) 16S rRNA และ (C) 28S rRNA สีแสดงสปีชีส์และซับสปีชีส์ของหอยทราวย และความถี่ของแฮพโลไทป์แสดงโดยขนาดของวงกลม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของหอยทวาย 5 สปีชีส์ พบว่า หอยทวาย แสดงรูปแบบความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ 6 สายวิวัฒนาการ และสอดคล้องกับลักษณะทาง ภูมิศาสตร์ ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ขอบเขตของสปีชีส์ ด้วยวิธี GMYC (15 สปีชีส์) และ ABGD (7 สปีชีส์) ค่อนข้างประเมินจำนวนสปีชีส์มากเกินไปเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี BI และ ML ซึ่งการประเมินจำนวนสปีชีส์มากเกินไปด้วยวิธี GMYC และ ABGD สามารถพบได้ในงานวิจัย อื่นๆ เช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสปีชีส์และระหว่างสปีชีส์สูงเกินไป (Talavera et al., 2013; Zhang et al., 2013; Lang et al., 2015)

ผลการศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมสนับสนุน 6 สายวิวัฒนาการที่เกิดขึ้น มีรายงาน การศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ในหอยฝาเดียวอื่น ๆ พบว่า ในหอยน้ำจืดสกุล *Margarya* มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ 7.7% สำหรับ 16S rRNA และ 11% สำหรับ CO1 (Du et al., 2013) ในหอยน้ำจืดซึ่งเป็นสปีชีส์ซ่อนเร้น *Indoplanorbis exustus* มีระยะห่างทาง พันธุกรรม 4.4–13.9% สำหรับ CO1 (Gauffre-Autelin et al., 2017) ในหอยน้ำจืดสกุล *Radix* มี ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ 8.6–18.5% สำหรับ CO1 (Schniebs et al., 2013) ในหอยน้ำ จืดสกุล *Paracrostoma* มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ 10.0–11.6% สำหรับ 16S rRNA (Köhler & Glaubrecht, 2007) และในหอยสกุล *Ladislavella* มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ 5.9–6.9% สำหรับ CO1 (Vinarski et al., 2016) จากผลการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าแต่ละ สายวิวัฒนาการของหอยทวายมีการแยกเป็นแต่ละสปีชีส์ ดังนั้นจึงควรมีการทบทวนการจำแนกใน ระดับสปีชีส์ต่อไปเนื่องจากบางสายวิวัฒนาการจำแนกเป็นเพียงระดับซับสปีชีส์เท่านั้น นอกจากนี้จาก ผลการศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน CO1 ยังสามารถใช้เป็นบาค์สำหรับการจัดจำแนก ระดับสปีชีส์ในหอยทวาย *Mekongia* ได้อีกด้วย

ผลการศึกษาจำนวนแฮพโลไทป์เฉพาะและโครงข่ายแฮพโลไทป์ด้วยยีน CO1 และ 16S rRNA พบว่า สามารถแยกกลุ่มหอยทวาย ออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาระยะห่างทาง พันธุกรรมและแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี BI และ ML ในกลุ่มทั้ง 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีแฮพโลไทป์เฉพาะที่ ไม่มีร่วมกันในระหว่างกลุ่ม แสดงว่าไม่มีการเคลื่อนย้ายของยีนระหว่าง 6 กลุ่มนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การแยกตัวทางภูมิศาสตร์ของแม่น้ำร่วมกับแรงกดดันทางธรรมชาติด้านอื่น ๆ ที่อาจทำให้ลักษณะทาง พันธุกรรมของหอยทวายมีการเปลี่ยนแปลงไป จนเกิดกลไกการกีดกันทางการสืบพันธุ์ขึ้นระหว่าง 6 กลุ่มนี้

M. swainsoni เป็นสปีชีส์ที่จำแนกโดย Brandt (1974) ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนการจำแนกโดย Brandt อย่างไรก็ตาม Brandt ได้จำแนกหอยทราย *M. swainsoni* ออกเป็น 3 ซับสปีชีส์ คือ *M. swainsoni swainsoni* *M. swainsoni braueri* และ *M. swainsoni kmeriana* ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้ไม่สนับสนุนการจำแนกระดับซับสปีชีส์ตาม Brandt (1974) และผลการศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Prasankok et al. (2009) เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. swainsoni* พบว่ามีรูปร่างเปลือกเกือบกลม สะดือปิด ส่วนยอดแหลมเป็นรูปโคนสั้น สีเนื้อหรือขาว มีแกนกลางค่อนข้างตรง แสดงว่าลักษณะที่กล่าวมาเป็นลักษณะที่พัฒนามาร่วมกัน (synapomorphy) ใน *M. swainsoni*

เมื่อพิจารณาการกระจายของ *M. swainsoni* (สายวิวัฒนาการ A) พบว่า หอยทรายชนิดนี้กระจายตัวกว้างมากตั้งแต่แม่น้ำทางภาคเหนือของประเทศไทย คือ แม่น้ำปิง วัง ยม และน่าน แม่น้ำทางภาคกลาง คือ แม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำสาขาของแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำแม่กลอง และแม่น้ำจากภาคตะวันออก เช่น แม่น้ำปราจีนบุรีและคลองสาขา เช่น คลองพระปรัง ตามประวัติศาสตร์แม่น้ำเหล่านี้เชื่อมติดกันในอดีตและแม่น้ำเจ้าพระยาจะไหลยาวลงไปในเขตซุนดาแลนด์เมื่อครั้งที่ระดับน้ำทะเลลดลงมากกว่า 100 เมตร จากนั้นแม่น้ำบางสาย เช่น แม่น้ำปราจีนบุรี แม่น้ำแม่กลอง จึงได้แยกออกจนกระทั่งมาเป็นแม่น้ำในปัจจุบัน ดังนั้นการเชื่อมกันของแม่น้ำในอดีตจึงเป็นเหมือนสะพานเชื่อมประชากรที่ไม่เชื่อมติดกันของแม่น้ำในปัจจุบัน (Hall, 1998; Voris, 2000; Sathiamurthy & Voris, 2006; Lukoschek et al., 2011) ส่งผลให้เกิดสายวิวัฒนาการของ *M. swainsoni* และเป็นหลักฐานอธิบายว่า 3 ซับสปีชีส์ *M. swainsoni swainsoni* *M. swainsoni braueri* และ *M. swainsoni kmeriana* จึงไม่มีรูปแบบการจัดกลุ่มทางสายวิวัฒนาการ เนื่องจากมีแอฟโทไพบ์ร่วมกันทั้ง 3 ซับสปีชีส์ ดังแสดงในโครงข่ายของแอฟโทไพบ์ดังภาพที่ 11 นอกจากนี้สายวิวัฒนาการของ *M. swainsoni* ยังสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ศึกษาสิ่งมีชีวิตในบริเวณเดียวกันนี้ เช่นเดียวกัน (Matsui et al., 2001)

M. rattei (สายวิวัฒนาการ C) และ *M. lamarcki* (สายวิวัฒนาการ F) เป็นสปีชีส์ที่จำแนกโดย Brandt (1974) ผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนการจำแนกโดย Brandt และยังสอดคล้องกับลักษณะทางภูมิศาสตร์กล่าวคือ *M. rattei* พบตามแม่น้ำสาขาของแม่น้ำโขงตอนล่างในประเทศกัมพูชา และ *M. lamarcki* พบตามแม่น้ำโขงบริเวณแก่งกะเบา จังหวัดมุกดาหาร *M. rattei* จำแนกโดยมีลักษณะดังนี้ เปลือกทรงกรวย รูปไข่ มีสะดือเปิด แสดงว่าลักษณะนี้เป็นลักษณะที่พัฒนามาร่วมกันใน *M. rattei* ในทำนองเดียวกัน *M. lamarcki* จำแนกโดยมีลักษณะดังนี้ เปลือกยาว เปลือกชั้นสุดท้ายสูงเป็นสองเท่าของวงเปลือกชั้นรองสุดท้าย แสดงว่าลักษณะที่กล่าวมาเป็นลักษณะที่พัฒนามาร่วมกันใน *M. lamarcki*

M. sphaericula ตามการจำแนกของ Brandt (1974) ผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า *M. sphaericula* แยกออกเป็น 3 สายวิวัฒนาการซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ กล่าวคือ สาย

วิวัฒนาการ B พบตามลุ่มน้ำสงครามและแม่น้ำสาขา รวมทั้งแม่น้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและแม่น้ำสาขาในลาวบริเวณใกล้เคียง สายวิวัฒนาการ D พบบริเวณแม่น้ำโขงตรงบริเวณแยกที่จะเข้าไปในลาวที่อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี และแม่น้ำโขงในลาว ตรงบริเวณเมืองปากเซ และสายวิวัฒนาการ E พบตามลุ่มน้ำชี ลุ่มน้ำมูล แม่น้ำปาว ตลอดจนแม่น้ำโขงบริเวณใกล้เคียง ซึ่งรูปแบบของสายวิวัฒนาการเช่นนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตอื่นเช่นเดียวกัน เช่น ปลาช่อน (*Channa striata*) ข้อมูลนี้สนับสนุนการแยกกันในอดีตของพื้นที่ลุ่มน้ำบนพื้นที่ราบโคราชตอนบนและตอนล่าง (Adamson et al., 2012) ในอดีตพื้นที่บริเวณนี้ มีวิวัฒนาการการกำเนิดและการเปลี่ยนแปลงของธรณีที่แยกจากกัน ดังนั้นการเกิดแม่น้ำสายต่าง ๆ จึงมีที่มาต่างกันด้วยก่อนที่จะมาเป็นลุ่มน้ำต่าง ๆ และลุ่มน้ำโขงในปัจจุบัน (Hutchison, 1989; Rainboth, 1996; Attwood & Johnson, 2001; Glaubrecht & Köhler, 2004) หอยทราย *M. sphaericula* สายวิวัฒนาการ B จากลุ่มน้ำสงคราม สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าแม่น้ำโขงเคยแยกจากกันมาก่อนการเกิดแม่น้ำโขงจนมีรูปร่างในปัจจุบัน (Workman, 1977; Attwood & Johnson, 2001; Hutchison, 1989; Rainboth 1996) แม่น้ำโขงในอดีต ตรงบริเวณขอบของที่ราบสูงโคราชทิศเหนือเคยแยกเป็นแม่น้ำอิสระ (แม่น้ำสงครามในปัจจุบัน) ตั้งแต่ช่วงต้นของยุคซีโนโซอิก (Attwood & Johnson, 2001) ก่อนที่จะเชื่อมกันกับแม่น้ำโขงประมาณช่วงปลายไพลโทซีน (Workman, 1977; Attwood & Johnson, 2001) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าพื้นที่ที่แบ่งแยกกันในอดีตส่งผลให้เกิดแม่น้ำที่แยกจากกันอย่างอิสระซึ่งสอดคล้องกับแม่น้ำในปัจจุบัน คือ แม่น้ำสงคราม แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขงในลาวตอนใต้ การแบ่งแยกนี้จึงนำไปสู่การเกิดสายวิวัฒนาการ B D และ E อย่างไรก็ตามไม่สามารถอธิบายได้ว่าเกิดการแบ่งแยกเป็นสปีชีส์ก่อนหรือเกิดจากการกระจายออกไปจากนั้นจึงค่อยแบ่งแยกออกเป็นหลายชนิดในเวลาต่อมา

หอยทราย *M. sphaericula* สายวิวัฒนาการ E จากลุ่มน้ำมูล สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าแม่น้ำมูลในอดีตและแม่น้ำสาขาเคยแยกจากแม่น้ำโขงและแม่น้ำทางตอนเหนือของที่ราบสูงโคราชตั้งแยกยุคซีโนโซอิก (Rainboth, 1996; Attwood & Johnson, 2001) จากนั้นจึงมีการเชื่อมกันระหว่างแม่น้ำมูลและแม่น้ำสงครามด้วยแม่น้ำโขง

M. sphaericula จำแนกโดยอาศัยลักษณะเปลือกสุดท้ายสูงเป็นสามเท่าของเปลือกรองสุดท้าย ยอดเปลือกมีสีม่วง ส่วนยอดป้าน แสดงว่าลักษณะนี้เป็นลักษณะดั้งเดิมไม่เหมาะสมสำหรับจำแนกสปีชีส์เนื่องจากพิสูจน์แล้วว่าภายใต้ลักษณะนี้มี 3 สายวิวัฒนาการ Brandt (1974) จำแนก *M. sphaericula* ออกเป็น 3 ชนิดสปีชีส์ คือ *M. sphaericula spiralis* *M. sphaericula sphaericula* และ *M. sphaericula extensa* จากผลการศึกษารั้งนี้ *M. sphaericula* แสดงสายวิวัฒนาการแบบแยกสาย (polyphyly) เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทั้ง 2 วิธี การวิเคราะห์แฮพโทไทป์เฉพาะและโครงข่ายของแฮพโทไทป์ พบว่า ผลการศึกษานับสนุนการจำแนก *M. sphaericula sphaericula* (สายวิวัฒนาการ D) และ *M. sphaericula extensa* (สายวิวัฒนาการ B) และควรยกระดับจากชนิดสปีชีส์ขึ้นมาเป็นระดับสปีชีส์ คือ *M. sphaericula* และ *M. extensa* ในขณะที่ *M.*

sphaericula spiralis ไม่สนับสนุนการจำแนกเป็นซีสปีชีส์ ซึ่งควรมีการทบทวนการจำแนกระดับซีสปีชีส์ตาม Brandt (1974)

M. sphaericula สายวิวัฒนาการ E ประกอบด้วย *M. sphaericula sphaericula* *M. sphaericula spiralis* และ *M. pongensis* โดย *M. sphaericula sphaericula* Brandt (1974) จำแนกเป็นซีสปีชีส์โดยมีลักษณะดังนี้ ยอดเปลือกต่ำมีขนาดใหญ่ ส่วนยอดบ้าน มีสีม่วง ผิวเรียบ ส่วน *M. pongensis* จำแนกเป็นซีสปีชีส์โดยอาศัยลักษณะดังนี้ ส่วนยอดของเปลือกมีสีม่วงเข้ม และมีขนาดเปลือกไม่เกิน 20 มิลลิเมตร และ *M. sphaericula spiralis* จำแนกเป็นซีสปีชีส์โดยลักษณะของเปลือกมีสันเป็นเกลียว แสดงว่าลักษณะที่ใช้จำแนก *M. sphaericula sphaericula* *M. pongensis* และ *M. sphaericula spiralis* เป็นลักษณะที่มีความแปรปรวนสูงส่งผลให้เกิดความสับสนในการจำแนกเป็นซีสปีชีส์และซีสปีชีส์ ซึ่งลักษณะที่มีความแปรปรวนสูง (Plasticity) พบได้บ่อยในพวกหอยน้ำจืด (Clewing et al., 2015; Van Bocxlaer et al., 2008; Pfennig et al., 2010; Inoue et al., 2013, 2014; Fassatoui et al., 2015) ดังนั้นจึงควรมีการทบทวนการจำแนกระดับซีสปีชีส์ใน *M. pongensis* และระดับซีสปีชีส์ใน *M. sphaericula spiralis* และ *M. sphaericula sphaericula* ตาม Brandt (1974) อย่างไรก็ตามควรมีการทบทวนการจำแนกระดับซีสปีชีส์ในสายวิวัฒนาการ E เช่นเดียวกัน

การนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการอนุรักษ์

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย มีจำนวนซีสปีชีส์ 4 สปีชีส์จากเดิมที่มีการจำแนกไว้เพียง 3 สปีชีส์ โดยเฉพาะใน *M. sphaericula* ซึ่งมีทั้งหมด 3 สปีชีส์หรือที่เรียกว่าซีสปีชีส์ซ่อนเร้น แสดงให้เห็นว่าที่ราบสูงโคราชของไทยเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงกว่าบริเวณอื่น และซีสปีชีส์ค้อยข้างที่จะมีความจำเพาะต่อแม่น้ำซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหอยอื่น ๆ (Rintelen & Glaubrecht, 2006; Graf & Cummings, 2011; McCartney et al., 2016) สปีชีส์ที่มีการกระจายตัวค่อนข้างจำเพาะต่อแม่น้ำ จะตอบสนองไวต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์และการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศสูง (Kier et al., 2009; Randklev et al., 2015; McCartney et al., 2016) ดังนั้นการจำเพาะต่อแม่น้ำของหอยทรายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยควรจะถูกพิจารณาเป็นลำดับแรกสำหรับการอนุรักษ์

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การค้นพบหลักที่สำคัญในครั้งนี้คือ พบซีสปีชีส์ซ่อนเร้นใน *M. sphaericula* ทั้งหมด 3 สปีชีส์ จากเดิมที่มีเพียง 1 ชนิด แสดงให้เห็นว่า มีการประเมินจำนวนซีสปีชีส์ในหอยทรายต่ำ นอกจากนี้

ยังพบว่าลักษณะของเปลือกที่ใช้ในการจำแนกชนิดมีความแปรปรวนสูงซึ่งทำให้ยากต่อการจำแนกชนิด เนื่องจากบางลักษณะมีการเหลื่อมล้ำกันส่งผลให้จำแนกชนิดหอยทราายเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันโดยเฉพาะใน *M. sphaericula* และ *M. pongensis* ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของเปลือกเพิ่มเติมเพื่อหาลักษณะสำหรับจำแนกต่อไป นอกจากนี้ ชนิดของหอยทราয়ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยค่อนข้างที่จะมีความจำเพาะต่อแม่น้ำ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการวางแผนการจัดการลุ่มน้ำต่อไป นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากข้อมูลทางพันธุกรรมในบริบททางภูมิศาสตร์ในหอยทราয়สะท้อนให้เห็นประวัติศาสตร์ทางวิวัฒนาการของลุ่มน้ำในประเทศไทยชัดเจนขึ้น



บรรณานุกรม

- Adamson, E.A.S., Hurwood, D.A. & Mather, P.B. 2012. Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of the chevron snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Basin. *Freshwater Biology*, **57**: 2211–2229.
- Aowphol, A., Rujirawan, A., Taksintum, W., Arsirapot, S. & McLeod, D.S. 2013. Re-evaluating taxonomic status of *Chiromantis* in Thailand using multiple lines of evidence (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Zootaxa*, **3702**: 101–123.
- Attwood, S.W. & Johnson, D.A. 2001. Nucleotide sequence differences reveal genetic variation in *Neotricula aperta* (Gastropoda: Pomatiopsidae), the snail host of schistosomiasis in the lower Mekong Basin. *Biological Journal of the Linnean Society*, **73**: 23–41.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16**: 37–48.
- Brandt, R.A.M. 1974. The non-marine aquatic Mollusca of Thailand. *Archiv für Molluskenkunde*, **105**: 1–423.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Drummond, A.J. 2014. BEAST 2: a software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, **10**: e1003537. DOI:10.1371/journal.pcbi.1003537.
- Burch, J.B. & Upatham, E.S. 1989. Medical important mollusk of Thailand. *Journal of Medical and Applied Malacology*, **1**: 1–9.
- Chan, K.O., Grismer, L.L., Shahrul, A.M.S., Quah, E.S.H., Grismer, J.L., Wood, P.L.JR. & Norhayati, A. 2011. Additions to the herpetofauna of Perlis State Park in northern Peninsular Malaysia with the description of a new species of *Chiromantis* Peter 1854 (Anura: Rhacophoridae). *Russian Journal of Herpetology*, **18**: 253–259.
- Chang, C.H., Rougerie, R. & Chen, J.H. 2009. Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. *Pedobiologia*, **52**: 171–180.

- Clewing, C., Riedel, F., Wilke, T. & Albrecht, C. 2015. Ecophenotypic plasticity leads to extraordinary gastropod shells found on the “Roof of the World”. *Ecology and Evolution*, **5**: 2966–2979.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**: 772.
- Dodson, J.J., Colombani, F. & Ng, P.K.L. 1995. Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of a South-east Asian freshwater fish, *Hemibagrus nemurus* (Siluroidei; Bagridae) and Pleistocene sea-level changes on the Sunda shelf. *Molecular Ecology*, **4**: 331–346.
- Du, L.N., Yang, J.X., Rintelen, T.V., Chen, X.Y. & Aldridge, D. 2013. Molecular phylogenetic evidence that the Chinese Viviparid genus *Margarya* (Gastropoda: Viviparidae) is polyphyletic. *Chinese Science Bulletin*, doi: 10.1007/s11434-012-5632-y.
- Fassatoui, C., Jenhani, A.B.R. & Romdhane, M.S. 2015. Geographic pattern of shell morphology in the endemic freshwater mussel *Unio ravoisieri* (Bivalvia: Unionidae) from northern Tunisia. *Journal of Molluscan Studies*, **81**: 152–160.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 294–299.
- Gauffre-Autelin, P., Rintelen, T.V., Stelbrink, B. & Albrecht, C. 2017. Recent range expansion of an intermediate host for animal schistosome parasites in the Indo-Australian Archipelago: phylogeography of the freshwater gastropod *Indoplanorbis exustus* in South and Southeast Asia. *Parasites & Vectors*, **10**: 126.
- Graf, D.L. & Cummings, K.S. 2011. Freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) richness and endemism in the ecoregions of Africa and Madagascar based on comprehensive museum sampling. *Hydrobiologia*, **678**: 17–36.
- Glaubrecht, M. & Köhler, F. 2004. Radiating in a river: systematics, molecular genetics and morphological differentiation of viviparous freshwater gastropods endemic

- to the Kaek River, central Thailand (Cerithioidea, Pachychilidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **82**: 275-311.
- Hall, R. 1998. The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. In: *Biogeography and geological evolution of SE Asia* (R. Hall & J.D. Holloway, eds), pp. 99–131. Backhuys Publishers, Leiden.
- Hall, R. & Holloway, J.D. 1998. *Biogeography and geological evolution of SE Asia*. Backhuys Publishers, Leiden.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. 1985. "Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA". *Journal of Molecular Evolution*, **22**: 160–174.
- Hutchison, C.S. 1989. *Geological Evolution of South-East Asia*. Clarendon Oxford: UK.
- Huang, J., Xu, Q., Sun, Z.J., Tang, G.L. & Su, Z.Y. 2007. Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia*, **51**: 301–309.
- Inger, R.F. & Voris, H.K. 2001. The biogeographical relations of the frogs and snakes of Sundaland. *Journal of Biogeography*, **28**: 863–891.
- Inoue, K., Hayes, D.M., Harris, J.L. & Christian, A.D. 2013. Phylogenetic and morphometric analyses reveal ecophenotypic plasticity in freshwater mussels *Obovaria jacksoniana* and *Villosa arkansasensis* (Bivalvia: Unionidae). *Ecology and Evolution*, **3**: 2670–2683.
- Inoue, K., McQueen, A.L., Harris, J.L. & Berg, D.J. 2014. Molecular phylogenetics and morphological variation reveal recent speciation in freshwater mussels of the genera *Arcidens* and *Arkansia* (Bivalvia: Unionidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **112**: 535–545.
- Jeratthitikul, E., Phuangphong, S., Sutcharit, C., Prasankok, P., Kongim, B. & Panha, S. 2019. Integrative taxonomy reveals phenotypic plasticity in the freshwater mussel *Contradens contradens* (Bivalvia: Unionidae) in Thailand, with a description of a new species. *Systematics and Biodiversity*, **0**: 1–14.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. 1969. *Evolution of Protein Molecules*. New York: Academic Press. pp. 21–132.

- Kessing, B., Croom, H., Martin, A., McIntosh, C., McMillan, W.O., & Palumbi, S.P. 1989. *The simple fool's guide to PCR Version 1.0.*, Special publication, Honolulu, Department of Zoology, University of Hawaii.
- Kier, G., Kreft, H., Lee, T.M., Jetz, W., Ibsch, P.L., Nowicki, C., Mutke, J. & Barthlott, W. 2009. A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **106**: 9322–9327.
- Köhler, F., Panha, S. & Glaubrecht, M. 2010. Speciation and radiation in a river: assessing the morphological and genetic differentiation in a species flock of viviparous gastropods (Cerithioidea: Pachychilidae). In: *Evolution in action* (M. Glaubrecht, ed.), pp 513-550. Springer-Verlag, Berlin.
- Köhler, F. & Glaubrecht, M. 2007. Out of Asia and into India: On the molecular phylogeny and biogeography of the endemic freshwater gastropod *Paracrostoma* Cossmann, 1900 (Caenogastropoda: Pachychilidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**: 627 – 651.
- Lang, A.S., Bocksberger, G. & Stech, M. 2015. Phylogeny and species delimitations in European *Dicranum* (Dicranaceae, Bryophyta) inferred from nuclear and plastid DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **92**: 217–225.
- Leaché, A.D, Koo, M.S., Spencer, C.L., Papenfus, T.J., Fisher, R.N. & McGuire, J.A. 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *PNAS*, **106**: 12418–12423.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451–1452.
- Lukoschek, V., Osterhage, J.L., Karns, D.R., Murphy, J.C. & Voris, H.K. 2011. Phylogeography of the Mekong mud snake (*Enhydris subtaeniata*): the biogeographic importance of dynamic river drainages and fluctuating sea levels for semiaquatic taxa in Indochina. *Ecology and Evolution*, **1**: 330–342.
- Marescaux, J. & Van Doninck, K. 2013. Using DNA barcoding to differentiate invasive *Dreissena* species (Mollusca, Bivalvia). *ZooKeys*, **365**: 235–244.

- Matsui, M., Nishikawa, K., Khonsue, W., Panha, S. & Nabhitabhata, J. 2001. Allozymic variation in *Rana nigrovittata* (Amphibia: Anura) within Thailand with special reference to the taxonomic status of *R. mortenseni*. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*, **1**: 15–22.
- McCartney, M.A., Bogan, A.E., Sommer, K.M. & Wilbur, A.E. 2016. Phylogenetic analysis of lake Waccamaw endemic freshwater mussel species. *American Malacological Bulletin*, **34**: 109–120.
- McConnell, S.K.J. 2004. Mapping aquatic faunal exchanges across the Sunda shelf, South-East Asia, using distributional and genetic data sets from the cyprinid fish *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1850). *Journal of Natural History*, **38**: 651–670.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, pp. 1–8. New Orleans.
- Morgan, J.A., Dejong, R.J., Jung, Y., Khallaayoune, K., Kock, S., Mkoji, G.M. & Loker, E.S. 2002. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of *Schistosoma* parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**: 477–488.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**: 853–858.
- Nantarat, N., Tongkerd, P., Sutcharit, C., Wade, C.M., Naggs, F. & Panha, S. 2014. Phylogenetic relationships of the operculate land snail genus *Cyclophorus* Montfort, 1810 in Thailand. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **70**: 99–111.
- Nantarat, N., Wade, C.M., Jeratthitikul, E., Sutcharit, C. & Panha, S. 2014. Molecular Evidence for Cryptic Speciation in the *Cyclophorus fulguratus* (Pfeiffer, 1854) Species Complex (Caenogastropoda: Cyclophoridae) with Description of New Species. *PLOS ONE*, **9**: e109785.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D. & Moczek, A.P. 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**: 459–467.

- Prasankok, P., Ota, H., Toda, M. & Panha, S. 2007. Allozyme variation in the camaenid tree snails, *Amphidromus atricallosus* (Gould, 1843) and *A. inversus* (Müller, 1774). *Zoological Science*, **24**: 189-197.
- Prasankok, P., Sutcharit, C., Tongkerd, P. & Panha, S. 2008. Biochemical assessment of the taxonomic diversity of the operculate land snail, *Cyclophorus fulguratus* (Gastropoda: Cyclophoridae), from Thailand. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**: 900-906.
- Prasankok, P., Srikoom, W. & Panha, S. 2009. Genetic variation amongst viviparid snails in the genus *Mekongia* (Prosobranchia: Viviparidae) in Thailand. *Biochemical systematics and Ecology*, **37**: 452-458.
- Prasankok, R., 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**: 834-840.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, **21**: 1864–1877.
- Rainboth, W.J. 1996. *Fishes of the Cambodian Mekong*. FAO, Rome.
- Randklev, C.R., Wang, H.H., Groce, J.E., Grant, W.E., Robertson, S. & Wilkins, N. 2015. Land use relationships for a rare freshwater mussel species endemic to central Texas. *Journal of Fish and Wildlife Management*, **6**: 327–337.
- Rintelen, T. Von & Glaubrecht, M. 2006. Rapid evolution of sessility in an endemic species flock of the freshwater bivalve *Corbicula* from ancient lakes on Sulawesi, Indonesia. *Biology Letters*, **2**: 73–77.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, **61**: 539–542.

- Sathiamurthy, E. & Voris, H.K. 2006. Maps of Holocene sea level transgression and submerged lakes on the Sunda shelf. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University, Supplementary*, **2**: 1–44.
- Schniebs, K., Glöer, P., Vinarski, M.V. & Hundsdoerfer, A.K. 2013. Intraspecific morphological and genetic variability in the European freshwater snail *Radix labiata* (Rossmäessler, 1835) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae). *Contributions to zoology*, **82**: 55–68.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**: 2688–2690.
- Talavera, G., Dinca, V. & Vila, R. 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution*, **4**: 1101–1110.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725–2729.
- Tavaré, S. 1986. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, **17**: 57–86.
- Upatham, E.S., Sornmani, S., Kitikoon, V., Lohachit, C. & Burch, J.B. 1983. Identification key for the fresh and brackishwater snails of Thailand. *Malacological Review*, **16**: 107–132.
- Van Bocxlaer, B., Van Damme, D. & Feibel, C.S. 2008. Gradual versus punctuated equilibrium evolution in the Turkana Basin molluscs: evolutionary events or biological invasion? *Evolution*, **62**: 511–520.
- Vinarski, M.V., Aksenova, O.V., Bepalaya, Y.V., Bolotov, I.N., Gofarov, M.Y. & Kondakov, A.V. 2016. *Ladislavella tumrokensis*: The first molecular evidence of a Nearctic clade of lymnaeid snails inhabiting Eurasia. *Systematics and Biodiversity*, **14**: 276–287.
- Voris, H.K. 2000. Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography*, **27**: 1153–1167.

- Webb, C.O., Slik, J.W.F. & Triono, T. 2010. Biodiversity inventory and informatics in Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation*, **19**: 955–972.
- Woodruff, D.S. 2010. Biogeography and conservation in Southeast Asia: how 2.7 million years of repeated environmental fluctuations affect today's patterns and the future of the remaining refugial-phase biodiversity. *Biodiversity and Conservation*, **19**: 919–941.
- Workman, D.R. 1977. Geology of Laos, Cambodia, South Vietnam and the eastern part of Thailand. *Overseas Geology and Mineral Resources*, **50**: 1–33.
- Yodthong, S. Siler, C.D., Prasankok, P. & Aowphol, A. 2014. Genetic structure of *Chiromantis hansenae* populations in Thailand (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Asian Herpetological Research*, **5**: 179–196.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, **29**: 2869–2876.



ประวัตินักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผ่องพรรณ ประสารก กเกิดวันที่ 11 พฤศจิกายน 2520 จังหวัดสระแก้ว วุฒิมัธยมศึกษา ปี 2538-2541 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2542-2544 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2545-2550 วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีประสบการณ์และผลงานทางวิชาการเกี่ยวกับ ซีสเต็มแมติกส์และชีวภูมิศาสตร์ของมอลลัส สถานที่ที่จะติดต่อได้ คือ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จังหวัด นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 0-4422-4633 หรือ 0-4422-4192 โทรสาร 0-4422-4633 หรือ 0-4422-4185 E-mail; prasankok@sut.ac.th

