

วิธีการศึกษา

พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

1. ศึกษาตัวอย่างที่มีอยู่แล้ว ทั้งเปลือกและตัวอย่างดอง เพื่อให้เห็นความหลากหลายและการแพร่กระจายของหอยในสกุล *Amphidromus* ในประเทศไทยในภาพรวม จากตัวอย่างที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เก็บตัวอย่างใหม่ ทั้งเปลือกและตัวอย่างเป็นตามพื้นที่ที่มีรายงานของ Laidlaw & Solem (1961) Solem (1965) โดยเฉพาะพื้นที่ของตัวอย่างต้นแบบ (type locality) ทั่วประเทศไทย และพื้นที่ซึ่งไม่เคยมีรายงานการสำรวจและศึกษาหอยสกุลนี้ โดยเน้นที่บริเวณเขาหินปูน ตามถิ่นที่อยู่อาศัยหลักและถิ่นที่อยู่อาศัยย่อยของหอยสกุลนี้เช่น ป่าดิบชื้น และป่าดิบแล้ง เพื่อให้เป็นตัวแทนของประชากรหอยชนิดต้นไม้นี้ในแต่ภูมิภาคและแต่ละพื้นที่ของประเทศ
3. เก็บตัวอย่างหอยต้นไม้นี้ที่พบบนถิ่นที่อยู่อาศัยแบบต่างๆ ทั้งลำต้น ใบ กิ่ง ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยและประเทศข้างเคียง เพื่อให้ได้ตัวแทนความหลากหลายของหอยต้นไม้นี้ในสกุล *Amphidromus* และครอบคลุมในขอบเขตการแพร่กระจายในประเทศไทย
4. บันทึกสถานที่เก็บตัวอย่างด้วยพิกัด GPS ลักษณะทางนิเวศวิทยาอื่นๆ เช่น ถิ่นที่อยู่อาศัยย่อย ระดับความสูงของพื้นที่เก็บตัวอย่างจากระดับน้ำทะเลและสภาพภูมิประเทศ เพื่อเข้าใจถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ อันจะมีผลต่อการอยู่อาศัยและดำรงเผ่าพันธุ์ของหอยต้นไม้นี้ในสกุลนี้ในแต่ละพื้นที่
5. ถ่ายภาพหอยทั้งเปลือกและตัวเป็นเพื่อใช้ประกอบในการจำแนก และฐานข้อมูลของหอยต้นไม้นี้ในสกุล *Amphidromus* ของประเทศไทย
6. วัดความสูงและความกว้างเปลือก และนับจำนวนวงเปลือก และศึกษาลวดลายบนผิวเปลือก และบันทึกความผันแปรของลักษณะต่างๆ

การจำแนกสปีชีส์

1. นำตัวอย่างหอยที่ได้มาจำแนกสปีชีส์ในขั้นต้นกับเอกสารอ้างอิงหลัก (Laidlaw & Solem, 1961; Solem, 1965) ซึ่งเป็นการศึกษาจากตัวอย่างในประเทศไทยเป็นส่วนใหญ่ และจากการศึกษาในพื้นที่ข้างเคียงเช่น ประเทศพม่า ลาว กัมพูชา และมาเลเซีย ตามรายงานของ Morelet (1875), Morlet (1891), Bavay & Dautzenberg (1905), Gude (1921) และ Benthem Jutting (1959) เป็นต้น
2. ลงทะเบียนตัวอย่างอ้างอิง และตัวอย่างต้นแบบไว้ในพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ยืนยันการจำแนกสปีชีส์กับตัวอย่างต้นแบบ (type specimens) ที่อยู่ในพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาที่เป็นสถานที่หลักในเก็บรักษาตัวอย่างต้นแบบของหอยทากบกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่น

AMNH, American Museum of Natural History, New York

BMNH, The Natural History Museum, London

MNH, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris

NMNH, National Museum of Natural History, Smithsonian Institute, Washington D.C

NMW, National Museum of Wales, Cardiff

NSMT, National Science Museum and Technology, Tokyo

RBINS, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels

RMBR, Raffles Museum of Biodiversity Research, Singapore

SMF, Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt, a.m.

UMZC, University Museum of Zoology Cambridge, Cambridge

ZMA: Zoological Museum of Amsterdam, Netherland

ZMB, Zoological Museum of Berlin, Berlin

ZMUC, Museum of Zoology, University of Copenhagen, Denmark

การศึกษากายวิภาคศาสตร์

1. ถ่ายภาพหอยขณะมีชีวิตและบันทึกข้อมูลภายนอกเช่น ลวดลาย สีสันบนตัวหอย แผ่นเท้า และลักษณะของปากด้านหน้า (snout) เพื่อใช้ในการบรรยายลักษณะและเปรียบเทียบความแตกต่างและความผันแปรระหว่างประชากร
2. นำตัวอย่างที่ได้มาเก็บรักษาด้วย 70% แอลกอฮอล์เพื่อใช้ศึกษากายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ และตัวอย่างอีกส่วนจะเก็บรักษาไว้ที่ -80 C เพื่อใช้ในการศึกษา DNA และ allozyme ต่อไป
3. ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ สันฐานวิทยาของถุงเก็บสเปิร์ม และส่วนของเนื้อเยื่อสร้างเปลือก ของหอยแต่ละประชากรที่พบ
4. นำตัวอย่างของหอยมาศึกษาสันฐานวิทยาของลวดลายบนเปลือกแรก (proconch) และลวดลายบนผิวเปลือก ด้วยกล้อง SEM (Scanning Electron Microscope) ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะศึกษาร้อนไประหว่างการเจริญเติบโตของหอย
5. สกัดแผ่นฟันด้วย NaOH เพื่อศึกษาสันฐานวิทยา สูตรฟัน และความผันแปรของซี่ฟันในหอยแต่ละแหล่งที่พบด้วยกล้อง SEM (Scanning Electron Microscope) และนำมาหาความแตกต่างและความผันแปรในหอยแต่ละประชากร

6. วาดภาพอวัยวะสืบพันธุ์ ถูเก็บสเปิร์ม และอวัยวะสำคัญต่างๆ เช่น ส่วนลำตัว ส่วนหัว เหงือก เท้า ฝ่าปิดเปลือก และเนื้อเยื่อปกคลุมลำตัว เพื่อประกอบคำบรรยายลักษณะและเปรียบเทียบแตกต่างระหว่างหอยแต่ละสปีชีส์

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

1. สกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ จากเนื้อเยื่อส่วนเท้า (foot tissue) ของตัวอย่างโดยใช้ DNA extraction kit หรือ phenol-chloroform extraction Doyle and Doyle (1987) และตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis
2. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) เพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณของสายดีเอ็นเอเป้าหมาย
- 3 ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา (PCR product) โดย Gel electrophoresis และนำ PCR product ที่มีศักยภาพของแต่ละตัวอย่างไปทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยใช้ PCR Purification kit และทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยวิธี Automated DNA sequencing
4. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W (Thomson et al., 1994) และแปรผลหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony (MP), Neighbor-joining (NJ) และ Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA (Kumar et al., 2008) และ PAUP version 4.10 (Swofford, 2002) นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) ของหอยภายในสปีชีส์เดียวกันด้วย โดยจะทำการวิเคราะห์ทั้งภายในประชากรเดียวกันและระหว่างประชากร โดยจะคำนวณหา mtDNA haplotypes (h), haplotype diversity (hd) (Nei, 1987), nucleotide diversity (π) (Tajima, 1983), total number of mutations (m) and mean number of pairwise nucleotide differences (k) โดยใช้โปรแกรม DnaSp version 4.50.3 (Rozas et al., 2003).