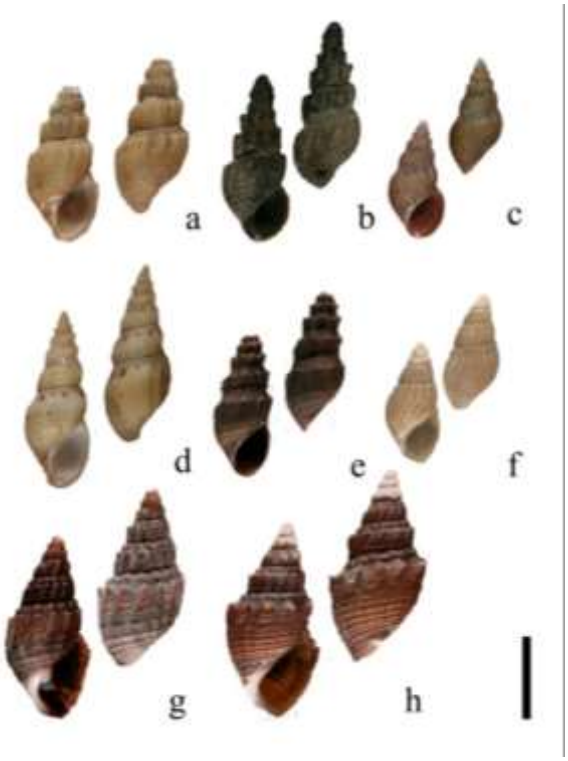
รายงานวิจัย เรื่องที่ 1

รายงานวิจัยเรื่อง ความหลากหลายชนิดพันธุ์และสายวิวัฒนาการของหอยน้ำจืดสกุล *Thiara* Röding, 1798 (Gastropoda: Thiaridae) ในประเทศไทย (Species Diversity and Phylogenetic Tree of Freshwater Snails genus *Thiara* Röding, 1798 (Gastropoda: Thiaridae) in Thailand)

บทนำ

การศึกษาเพื่อตรวจสอบชนิดพันธุ์ของหอยน้ำจืดสกุล *Thiara* Röding, 1798 ในประเทศไทย (รูปที่ 1) ว่ามีสายพันธุ์ อื่นใดนอกจาก *Thiara scabra* หรือไม่ โดยที่การเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของเปลือกในเบื้องต้นนั้น พบว่า หอยที่ตรวจพบในประเทศไทยบางแห่งจากการทำงานของ หน่วยวิจัยปรสิตวิทยาและสังข-วิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อาจเป็นหอยน้ำจืดสกุล *Thiara rudis* ที่มีรายงานว่าพบในประเทศอินเดีย ศรีลังกาและอินโดนีเซีย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ต้องการยืนยันว่าหอยน้ำจืดดังกล่าว นั้นเป็นหอยน้ำจืดชนิดพันธุ์ *Thiara rudis* หรือไม่ โดยวิเคราะห์จากโปรแกรมการวิเคราะห์รูปร่างเปลือก (Geometric morphometric analysis) ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียที่สกัดจากเนื้อหอย โดยใช้ซอฟแวร์ MEGA5, PAUP, PHYML และ Mr. Bayes วิเคราะห์ผลเพื่อจัดแผนผังสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการศึกษา จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (shell morphology) และการเจริญของตัวอ่อน ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยให้เกิดองค์ความรู้ใหม่แก่นักสังขวิทยาและเอื้อต่องานด้านความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยต่อไป



รูปที่ 1 หอยสกุล *Thiara* ที่พบในประเทศไทย
a-e. *Thiara scabra*
f-h. *Thiara cf rudis*
(สเกล = 10 mm)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของรูปร่างของเปลือกหอย (shell morphometric analysis) ของหอยสกุล *Thiara* ที่พบในประเทศไทย
2. เพื่อเป็นการพัฒนาความรู้ด้านสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของหอยสกุล *Thiara* ที่พบในประเทศไทย
3. เพื่อพัฒนาศักยภาพของนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุและอุปกรณ์

สารเคมี

- น้ำที่ปราศจากคลอรีน (dechlorinated tap water)
- น้ำกลั่น (double distilled water)
- 2% Hydrochloric acid (HCL)

- 10% Sodiumhydroxide (NaOH)
- 1X TAE buffer
- Buffer ATL, AE, A, AW1, AW2
- 2% ethidiumbromide
- Absolute alcohol
- 95% alcohol
- Proteinase k
- MgCl2
- DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN, Germany)
- PCR purification kit (QIAGEN, Germany)

เครื่องมือ

- GPS (Garmin, PLUS III, Taiwan)
- Lux meter
- Vernier caliper
- Spectrophotometer (Orbeco-Hellige, 975 MP, USA)
- Stereomicroscope (Olympus, TL3-220P, Taiwan)
- Light microscope (Nikon, E200 Eclipse, Japan)
- Scanning Electron Microscope; SEM (JEOL, JSM- 5410 LV, Japan และ CamScan, Maxim 2000s, England)
- DNA ladder
- Sputter coater (Cressington, 108, England)
- microcentrifuge

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างหอย *Thiara rudis* และเก็บข้อมูลสภาพแวดล้อมในบริเวณจุดสำรวจ

1.1 รวบรวมข้อมูลทางด้านการสำรวจหอยน้ำจืดสกุล *Thiara rudis* ที่พบในประเทศไทยจากหน่วยวิจัยปรสิตวิทยาและสังขวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

1.2 กำหนดจุดสำรวจเพื่อเก็บตัวอย่างหอยน้ำจืดสกุล *Thiara rudis* ที่ต้องการศึกษาโดยตรวจสอบจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก ตรวจสอบค่าพิกัดบริเวณจุดสำรวจด้วยเครื่องมือ GPS (GPS PLUS III, Taiwan)

1.3 เก็บข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทางนิเวศวิทยาบริเวณพื้นที่สำรวจ เช่น บันทึกลักษณะพื้นน้ำเป็นทราย ก้อนกรวด หิน ขนาดเล็ก-ใหญ่ ลักษณะน้ำใส-ขุ่น การเกาะอาศัยของหอยน้ำจืด บริเวณรอบๆลำธารมีพืชชนิดใด และวัดความเข้มของแสงสว่างด้วยเครื่อง Lux meter เพื่อเปรียบเทียบกับลักษณะสภาพแวดล้อมเดิมที่มีการบันทึกไว้

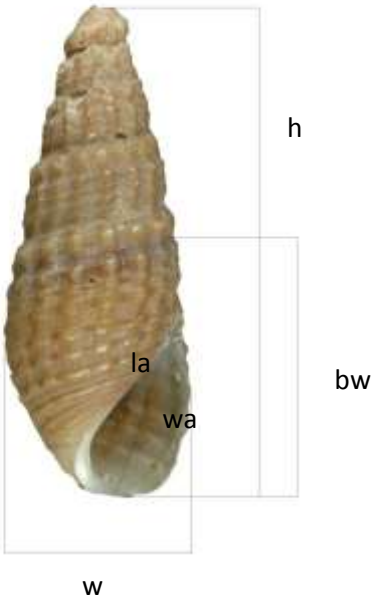
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก

ศึกษาชนิดพันธุ์ของหอยจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก (shell morphology) โดยนำเปลือกหอยในระยะตัวเต็มวัย (adult snail) มาทำความสะอาด และศึกษาลักษณะต่างๆของเปลือกหอย ดังนี้ (รูปที่ 2)

2.1 ศึกษาขนาดของเปลือกโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier caliper)

- ความยาวของเปลือก (length of snail, l)
- ความกว้างของเปลือก (width of snail, w)
- ความยาวของปากเปลือกหอย (length of aperture, la)
- ความกว้างของปากเปลือกหอย (width of aperture, wa)
- ความยาวของบอดีเวิร์ล (body whorl, bw)
- จำนวนเวิร์ล (number of whorl, nw)

2.2 วิเคราะห์ข้อมูลสัณฐานวิทยาด้วยสถิติโดยใช้ One Way ANOVA



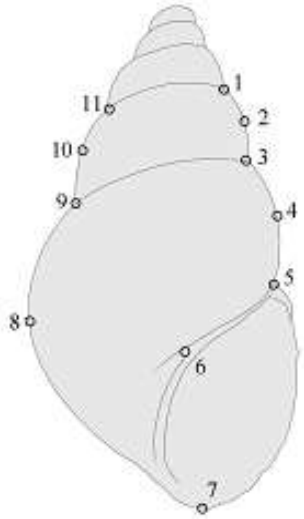
รูปที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหอย
ความยาวของเปลือก (l), ความกว้างของเปลือก(w), ความยาวของปากเปลือกหอย (la), ความกว้างของปากเปลือกหอย (wa), ความยาวของบอดีเวิร์ล (bw), และจำนวนเวิร์ล (number of whorl)

2.3. การวิเคราะห์รูปร่างเปลือกโดยวิธี morphometric analysis

- นำพารามิเตอร์ที่ได้จากส่วนต่างๆของหอยวิเคราะห์ค่าสถิติ ร่วมกับภาพถ่ายรูปหอยจากกล้องถ่ายรูป (digital camera)
- ถ่ายรูปเปลือกหอยด้วยกล้องถ่ายรูปดิจิตอล โดยให้ถ่ายภาพจากหอยที่มีจำนวนมากพอสำหรับการนำไปวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ (ประมาณ 10-20 ตัว ต่อหอยที่เก็บตัวอย่างได้ในแต่

ละพื้นที่ และตรวจสอบลักษณะว่ามีรูปร่างคล้ายคลึงกัน)

- นำรูปที่ได้มาแต่งภาพโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น โปรแกรม Adobe Photoshop
- วิเคราะห์รูปร่างของเปลือกหอยโดยใช้วิธีการจำแนกจากขนาดของเปลือกและรูปร่างเปลือก (shell size and shape) กำหนดจุดลงบนเปลือกหอย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การกำหนดจุดของ การวิเคราะห์เปลือกหอยโดยวิธี morphometric analysis

3. การศึกษาลักษณะของฟันหอย (radula)

ทำการตรวจสอบลักษณะของฟันหอยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และกล้องจุลทรรศ-อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ทำการศึกษาลักษณะของฟันหอยเกี่ยวกับจำนวนแถวของฟันหอย รูปร่าง ขนาด และจำนวนหยักของฟันกลาง ฟันข้าง และฟันริมของหอย

วิธีการเตรียมตัวอย่างฟันหอยเป็นดังนี้

1. วิธีการเตรียมฟันหอยเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์
   - นำตัวอย่างหอยมากะเทาะเปลือกออก หรือนำตัวอย่างหอยที่ตายแล้วมาดึง ตัวหอยออก และทำการย่อยเนื้อหอยเพื่อแยกเอาฟันออกมาด้วยการแช่ 10% NaOH ข้ามคืน
   - แยกฟันหอยออกจากเนื้อหอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วย forcep ปลายแหลมขนาดเล็ก
   - นำฟันหอยที่ได้มาล้าง NaOH ออกด้วยน้ำกลั่น 5 –10 นาที
   - เปลี่ยนมาแช่ฟันหอยใน 2% HCl นาน 5-10 นาที เพื่อล้าง NaOH
   - ล้าง HCl ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งประมาณ 5 –10 นาที
   - ดึงน้ำออกด้วย 50%, 70% และ 95% alcohol ตามลำดับ ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 10 –30 นาที
   - ย้อมฟันหอยด้วยสี 4% Eosin Y ใน 95% alcohol จนกระทั่งฟันหอยติดสี ประมาณ 4-7 วัน
   - ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95% alcohol และ absolute alcohol ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆละ

10–30 นาที

- ใช้ forcep กางฟันหอยให้แผ่ออกมากที่สุดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- ทำให้ตัวอย่างฟันใสด้วยการแช่ xylene 2 ครั้งๆละ 10 นาที
- นำฟันหอยที่ได้มาวางบนสไลด์และปิด cover slip ด้วย DPX และนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

2. วิธีการเตรียมฟันหอยเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
   - ขั้นตอนการเตรียมฟันหอยเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เหมือนกับการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา แต่ตัวอย่างฟันหอยหลังจากแช่ absolute alcohol แล้วจะนำมาวางลงบน stub ที่มีเทปกาวคาร์บอนติดอยู่ (carbon colloidal adhesive) และปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปเคลือบด้วยทองคำใช้เวลาประมาณ 100 - 200 วินาที ด้วยเครื่อง sputter coater (Cressington 108, UK) นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4. การศึกษาการเจริญของตัวอ่อน

4.1 การนับจำนวนตัวอ่อน

- เลือกหอยที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ อย่างน้อยจุดสำรวจละ 6 ตัว มาทำการวัดเปลือกและถ่ายรูปทีละตัว
- ทุบเปลือกให้แตก จากนั้นเอากรรไกรตัดเนื้อเยื่อส่วนแมนเทิลออก แล้วเปิดถุงฟักตัวอ่อน (brood pouch) เขี่ยตัวอ่อนออกมาจนหมด รวมทั้งดูดไข่ออกมาด้วย แล้วทำการวัดขนาดตัวอ่อนด้ว ocular micrometer จดบันทึกขนาดและจำนวน
- เก็บตัวอ่อนทั้งหมดไว้ใน 96% ethanol เพื่อรอถ่าย SEM ต่อไป

4.2 การถ่ายตัวอ่อน (juvenile) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

- นำตัวอย่างติดบน stub ที่มีเทปกาวคาร์บอนติดอยู่ (carbon colloidal adhesive) และปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปเคลือบด้วยทองคำใช้เวลาประมาณ 100 - 200 วินาที ด้วยเครื่อง sputter coater (Cressington 108, UK) นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนตัวอ่อนด้วยสถิติแบบไคสแควร์

5. การศึกษาสายวิวัฒนาการของหอย

5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเท้าหอย (genomic DNA extraction) ด้วย DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany)

1. นำหอยตัวอย่างมากระเทาะเปลือกออกและตัดเนื้อเยื่อเท้าหอยใส่ microcentrifuge tube ประมาณ 25 มิลลิกรัม เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ
2. เติม Buffer ATL 180 µl ลงใน microcentrifuge tube
3. เติม 20 µl Proteinase K นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 56°C เป็น เวลา 1-3 ชั่วโมง
4. vortex เป็นเวลา 15 วินาทีหรือจนกว่าเนื้อเยื่อจะย่อยจนหมด จากนั้นเติม Buffer AL

200 µl นำไป vortex และเติม absolute ethanol 200 µl

5. ดูดสารละลายจาก microcentrifuge tube ใส่ลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายใน collection tube ที่ผ่าน column ทิ้ง
6. เติม Buffer AW1 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายใน collection tube ที่ผ่าน column ทิ้ง
7. เติม Buffer AW2 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 3-5 นาที นำสารละลายใน collection tubeที่ผ่าน column ทิ้ง
8. เปลี่ยนย้าย column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube และเติม Buffer AE 200-300 µl ทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 rpm เพื่อให้ genomic DNA ผ่าน column ลงมายัง microcentrifuge tube
9. นำ microcentrifuge tube ที่บรรจุ genomic DNA ที่ได้จากการสกัดผ่าน column เก็บรักษาในอุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

5.2 การทำปฏิกิริยาสายลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR) ทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 50 µl

1. นำ genomic DNA ที่สกัดได้จากหอยตัวอย่างมาใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) 1 µl, 10x Buffer A 5 µl, 50 mM $Mgcl_2$ 5 µl, 10 mM dNTPs 0.5 µl, Taq polymerase (5 u/ µl) 0.5 µl, forward primer (10 µM) 2.5 µl, reverse primer (10 µM) 2.5 µl และ ddH_2O 35.5 µl เพื่อเพิ่มจำนวน Mitochondrial gene (16S ribosomal RNA gene และ Cytochrome C oxidase I) โดย primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้
   LCO1490: 5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G- 3'
   HCO var: 5'- TTA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA- 3'
   (Folmer *et al.* 1994)
   16S Thia2 : 5'- CTTYCGCACTGATGATAGCTAG -3'
   16S Rvar: 5'CCGGTYTGAACTCAGATCATGT-3'
2. การทำปฏิกิริยาสายลูกโซ่ที่อุณหภูมิดังต่อไปนี้

preheat	94 °C	3	นาที
denaturing temperature	94 °C	30	วินาที
annealing temperature	50°C	1	นาที
extension temperature	72°C	1:30	นาที
final extension	72°C	5	นาที

จำนวน 35 รอบด้วย thermocycler (Flexcycle Block, Twinblock 48)

5.3 วิเคราะห์ผลด้วย agarose gels electrophoresis

1. เตรียมอุปกรณ์สำหรับทำ agarose gels electrophoresis (ใช้ 1% agarose gels สำหรับวิเคราะห์ผล genomic DNA และ 1.5% agarose gels สำหรับวิเคราะห์ผล PCR product)
2. ชั่ง agarose 1 กรัม หรือ 1.5 กรัม ใส่ลงใน 1X TAE buffer 100 ml.
3. นำไปอุ่นจน agarose ละลายเป็นเจลเนื้อเดียวกัน
4. เทเจลลงในถาดเตรียมเจล
5. เสียบ comb ลงบน agarose gel ในแนวตั้งฉากกับแนวระดับทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที

เจลจะแข็งตัวจากนั้นดึง comb ออกโดยยกขึ้นตรงๆ

6. นำเจลที่แข็งตัวแล้ววางลงใน tank electrophoresis และเท 1x TAE buffer ลงให้ท่วมแผ่นเจล
7. load sample DNA หรือ PCR product ลงในช่อง (well) เปรียบเทียบกับ standard marker (1 Kb Plus DNA Ladder) ซึ่งเป็นชุดของ DNA ขนาดต่างๆที่ทราบขนาดของ DNA แต่ละชิ้นแน่นอน ทำให้สามารถนำมาใช้เปรียบเทียบเพื่อประมาณค่าขนาด DNA ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาได้ นำไปrun ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที (MJ-105-S, mini horizontal electrophoresis system)

5.4 การเตรียมตัวอย่างในการ run electrophoresis

1. นำ loading dye 1 µl ผสมกับ sample DNA หรือ PCR product 5 µl บนแผ่น parafilm แล้วหยอดลงในช่องของ agarose gel
2. นำ Standard Marker (1 Kb Plus DNA Ladder) 2.5 µl หยอดลงบน agarose gel

5.5 การย้อมแถบ DNA ด้วย 2% ethidiumbromide

1. นำแผ่นเจลออกจากถาด (tray) ไปแช่ในสารละลาย 2% ethidium bromide เพื่อย้อมสีแถบ DNA เป็นเวลา 5 นาที
2. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที

5.6 วิเคราะห์ผลของแถบ DNA บนแผ่น agarose gel โดยใช้ UV transilluminator (VILBER LOURMAT, Ecx-15.M) หรือ gel documentation (Fujifilm, Thermal Imaging system FTI – 500) ถ่ายรูปเจล

5.7 นำตัวอย่าง PCR product ส่งไปยังบริษัทต่างๆที่มีบริการวิเคราะห์ลำดับเบส เช่น BSU, BIOTEC เป็นต้น

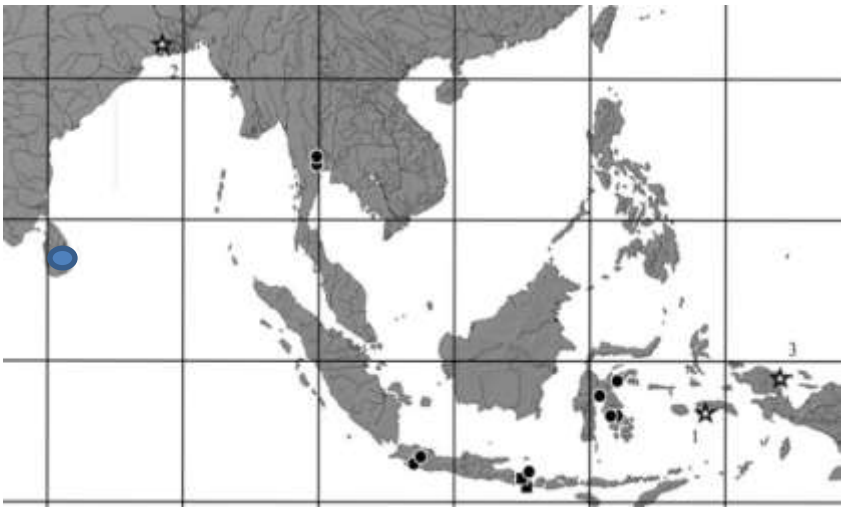
5.8 การสร้างสายวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 5.0

1. เปิดโปรแกรม MEGA 5.0 เลือกเมนู edit/ built alignment -----> create new alignment----- > DNA
2. นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ที่เป็นนามสกุล FASTA โดยการเลือกเมนู Edit ---- > Insert Sequence from file (ทุก sequence ที่ต้องการวิเคราะห์)
3. เลือกเมนู edit ----- > Select All ------ > Alignment (มี 2 algorithym ให้เลือก คือ Clustal W และ MUSCLE) ---- > save ---- > close
4. เลือกเมนู file ----> open alignment -----> phylogeny (มีหลาย algorithym ให้เลือก เช่น Maximum Likelihood, Neighbor Joining, Maximum Parsimony เป็นต้น)

ผลการดำเนินงาน

ศึกษาการกระจายพันธุ์ของหอย Thiara rudis ที่เป็นต้นแบบและที่มีรายงานการพบจากที่ต่างๆ (รูปที่ 4) วิเคราะห์รูปร่างและเลือกเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวสกุล *Thiara* ที่มีรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกแตกต่างกันมาศึกษาเทียบสายพันธุ์ร่วมกับตัวอย่างของหอยฝาเดียวในประเทศต่างๆที่มีอยู่ใน Museum für Naturkunde, Berlin ประเทศเยอรมัน โดยใช้

1. หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศอินโดนีเซีย
   - *Thiara rudis* clade 1 ZMB 191278 สุลาเวสี และ ZMB 191488 บาหลี (รูปที่ 7a, 7b)
   - *Thiara rudis* clade 2 ZMB191279 และ ZMB 106472 บาหลีตอนใต้ (รูปที่ 8a, 8b)
   - Holotype ของ *Thiara rudis* (USNM119778) ที่เกาะโมลุกกะ ประเทศอินโดนีเซีย (รูปที่ 9a)
   - Holotype ของ *Melania aspera* (MNHN210981) ที่ปาปัวนิวกินี ประเทศอินโดนีเซีย (รูปที่ 9c)
2. หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศอินเดีย
   - Paratype ของ *Tarebia microstoma* (USNM119722) กัลกัตตา (รูปที่ 9b)
3. หอยฝาเดียวชนิด *Thiara* spp. ประเทศไทย (รูปที่ 9)
   - *Thiara* sp. (SUT0311020) แบบมีหนาม คลองดอนโฆ อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร
   - *Thiara* sp. (SUT0311044) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร
   - *Thiara* sp. (SUT0311053) แบบไม่มีหนาม คลองดอนโฆ อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร
   - *Thiara* sp. (SUT0312069) แบบมีหนาม สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ. นครปฐม
   - *Thiara* sp. (SUT0312070) แบบไม่มีหนาม สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ. นครปฐม



รูปที่ 4 บริเวณที่พบหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis*

★ 1, 2, 3 หอยฝาเดียวต้นแบบ (type material) ของ *Thiara rudis, Tarebia microstoma* และ *Melania aspera*

หอยฝาเดียว แบบเปลือกแห้ง ● หอยฝาเดียว แบบเปลือกมีลำตัวหอย

■ หอยฝาเดียวชนิด *T. rudis* clade 2

1.พื้นที่เก็บตัวอย่าง หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ในประเทศไทย

1.1 สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ ม.ศิลปากร อ. เมือง จ. นครปฐม

ค่าพิกัด 47P 0612837 (E 100° 02′ 64.5″)

UTM 1527283 (N 13° 48′ 84.2″)

ความสูงจากระดับน้ำทะเล 11 เมตร

เป็นสระน้ำ อยู่ด้านหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ (รูปที่ 5) ความลึก 7 - 21 เซนติเมตร มีก้อนหินขนาดใหญ่เรียงเป็นแนวขอบตลิ่ง พบหอยเกาะตามก้อนหินริมตลิ่ง ลักษณะน้ำขุ่น สภาพแวดล้อมมีต้นไม้ขนาดกลางและขนาดใหญ่ปกคลุม มีความเข้มของแสง 200 - 603 Lux อุณหภูมิเหนือน้ำ 26 - 33 °C อุณหภูมิใต้น้ำ 24 - 32 °C ความเป็นกรดด่างของน้ำ 7.36 - 8.50 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 7.27 - 13.70 mg/l น้ำนิ่ง

รูปที่ 5 สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ.นครปฐม

1.2 คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร

ค่าพิกัด 47 P 0617255 (E 100° 05′ 03.0″)

UTM 1507564 (N 13° 38′ 08.0″)

ความสูงจากระดับน้ำทะเล 7 เมตร

เป็นคลองขุดขนาดเล็ก เพื่อส่งน้ำเข้าสวนผลไม้ (รูปที่ 6) ความลึก 13 - 43 เซนติเมตร พบหอยฝังตัวในดินเลน ลักษณะน้ำขุ่น สภาพแวดล้อม มีต้นไม้สองฝั่งปกคลุม มีความเข้มของแสง 2,400 - 59,000 Lux อุณหภูมิเหนือน้ำ 28 - 34 °C อุณหภูมิใต้น้ำ 27 - 30 °C ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ 6.89 - 7.40 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 7.80 - 9.84 mg/l น้ำนิ่ง

รูปที่ 6 คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร

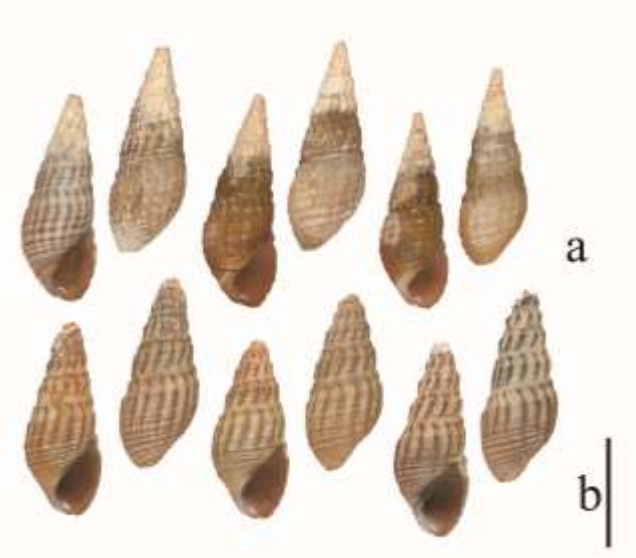
2. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis*

- ลักษณะรูปร่างเปลือก (shell)

เปลือกมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ทรงกรวยยาว ขนาดปานกลาง ปลายยอดมักสึกกร่อน บอดีเวิร์ลใหญ่ ผิวเปลือกมีตุ่ม (tubercle) เรียงกันเป็นระเบียบ เป็นแนววนตามเปลือก ปากเปลือกแคบ ร่องซูเชอร์ไม่ชัดเจน (รูปที่ 7, 8, 9)

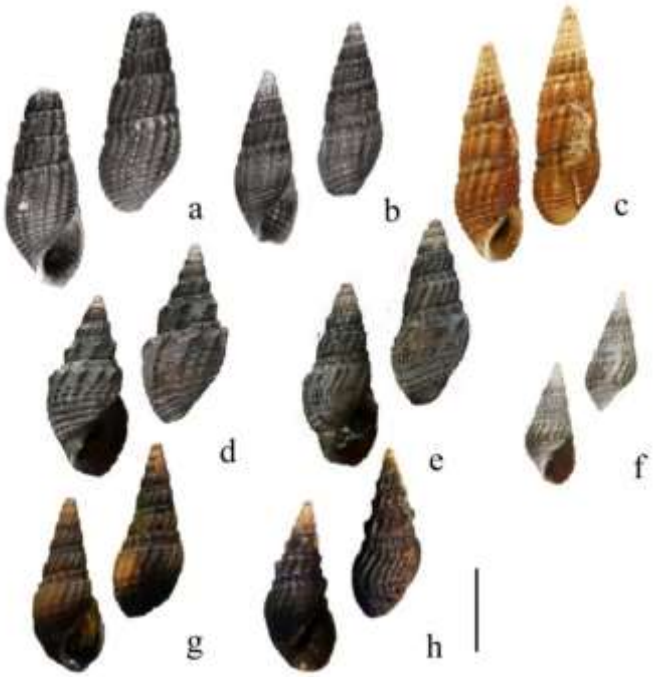
- แผ่นปิดปากเปลือก (operculum)

เป็นรูปไข่ บาง เป็นมัน มีลวดลายวนต่อกันเป็นวงเล็กๆแบบพอซิสไปรัล (Paucispiral)



รูปที่ 7 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศอินโดนีเซีย Clade 1
a. ZMB 191278 b. ZMB 191488
(สเกล = 10 mm)

รูปที่ 8 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศอินโดนีเซีย Clade 2
a. ZMB191279 b. ZMB106472
(สเกล = 10 mm)



รูปที่ 9 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara* spp. ประเทศต่างๆและประเทศไทย

a. Holotype ของ *Thiara rudis*

b. Paratype ของ *Tarebia microstoma*

c. Holotype ของ *Melania aspera*

d. *Thiara* sp. คลองดอนโฆ แบบมีหนาม (SUT0311020)

e. *Thiara* sp. คลองดอนโฆ (SUT0311044)

f. *Thiara* sp. คลองดอนโฆ แบบไม่มีหนาม (SUT0311053)

g. *Thiara* sp. สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ ม.ศิลปากร แบบไม่มีหนาม (SUT0312070)

h. *Thiara* sp. สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ ม.ศิลปากร แบบมีหนาม (SUT0312069)

(สเกล = 10 mm)

2.1 ผลการวัดขนาดของเปลือกหอย (ตารางที่ 1)

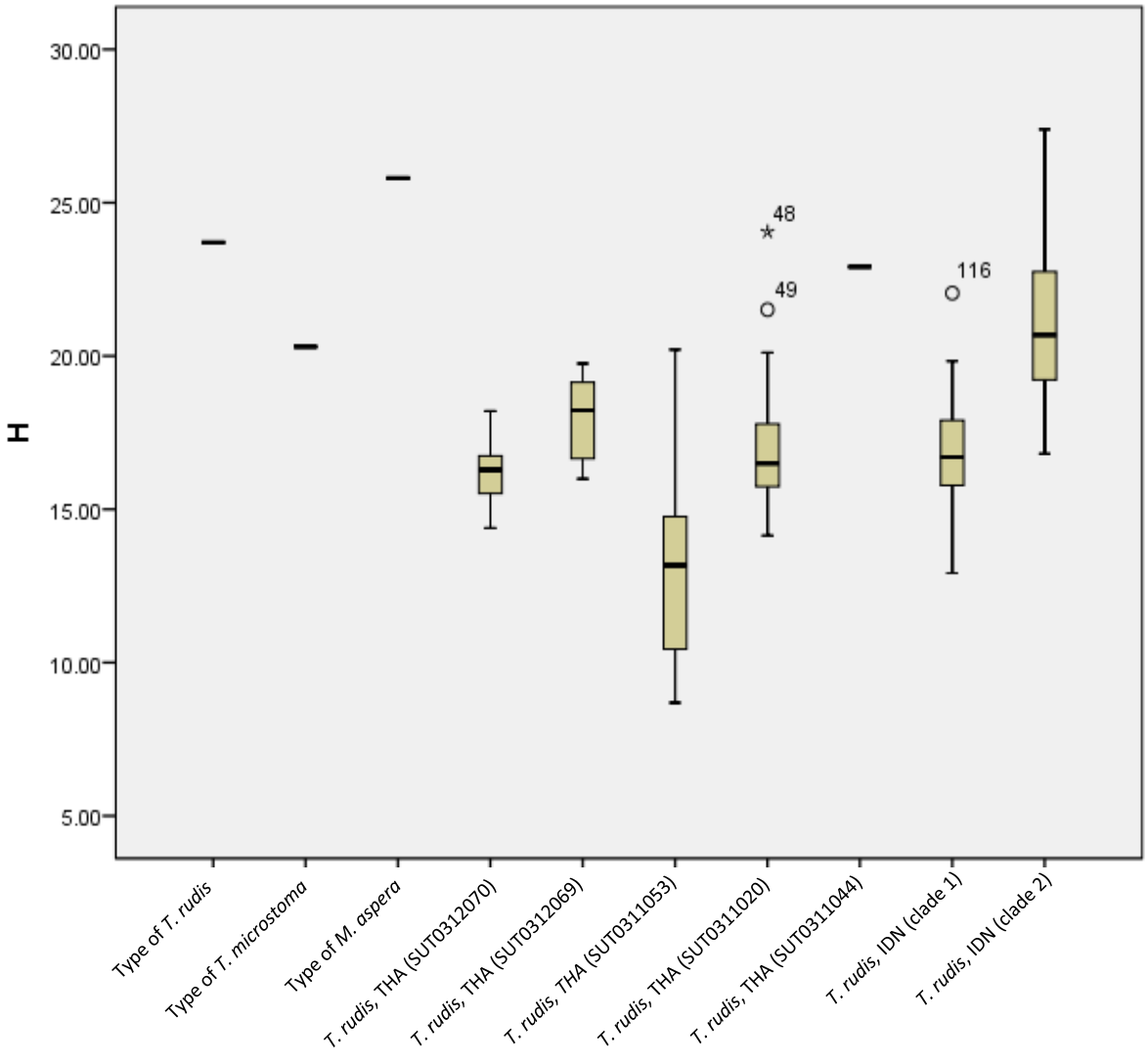
1. ความสูงของเปลือกหอย

หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* จากประเทศอินโดเซีย Clade 2 มีความสูงของเปลือกมากกว่าหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ที่พบในประเทศไทย และประเทศอินโดนีเซีย Clade 1 อย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05) และหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* จากคลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร แบบที่ไม่มีหนาม (SUT0311053) มีความสูงที่น้อยกว่าหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* จากบริเวณอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05) และ เมื่อเปรียบเทียบกับ Type Material พบว่าหอยชนิด Indonesia Clade 2 นั้นมีขนาดใกล้เคียงกับ type material มากที่สุด (รูปที่ 10)

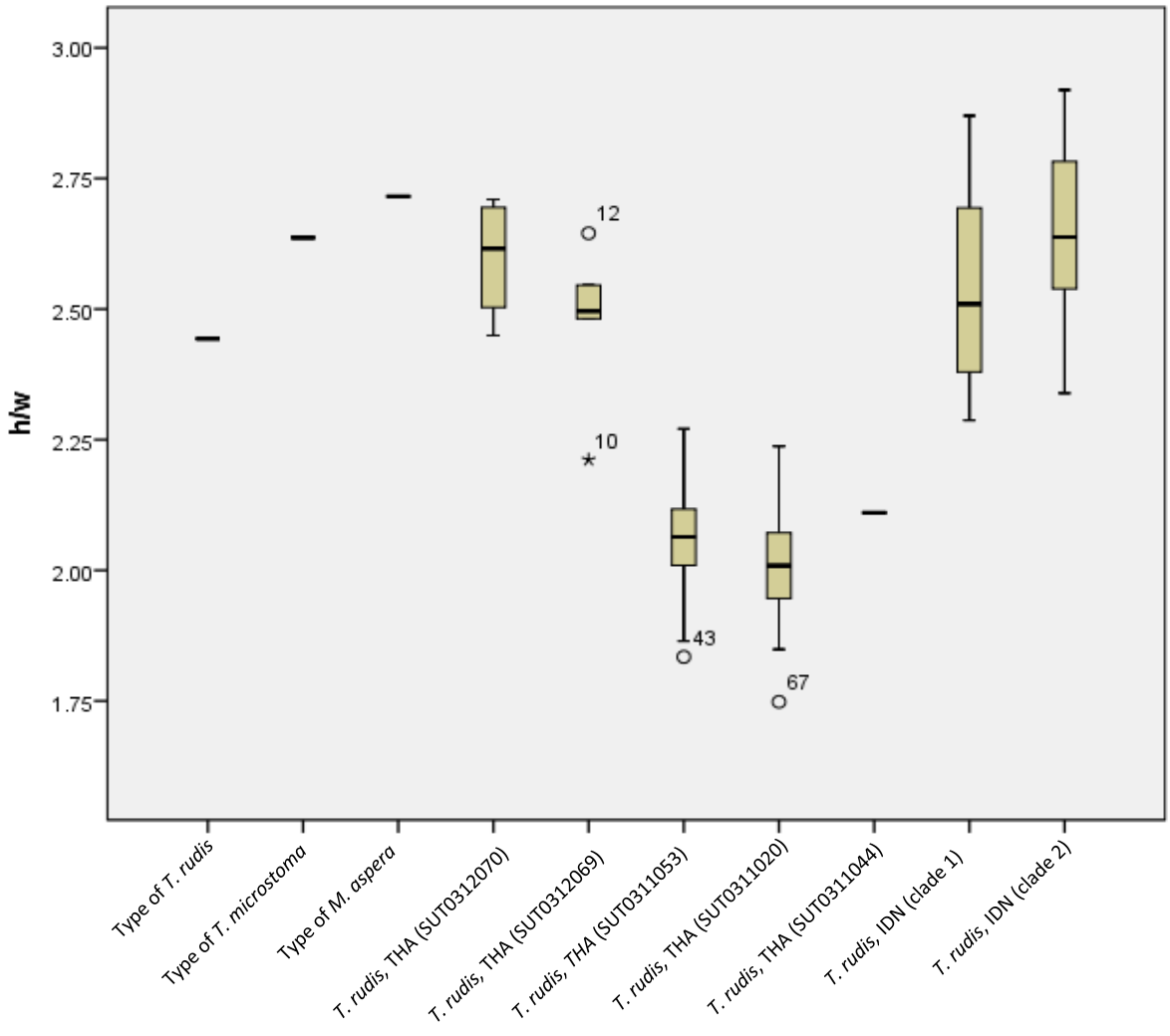
2. size Index (h/w)

size index เป็นค่าที่บอกลักษณะรูปร่างของเปลือกว่าเป็นทรงกรวยยาวหรือทรงกรวยสั้น จึงเป็นการเปรียบเทียบรูปทรงกับหอยต้นแบบ (type material) ผลการศึกษาพบว่าหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ที่พบในคลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร มีรูปทรงแตกต่างจากหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ต้นแบบ (type material) และหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ที่พบจากบริเวณอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (P-value < 0.05) ส่วนหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ที่พบในสระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร มีรูปทรงใกล้เคียงกับหอยฝาเดียวต้นแบบ (type material) และหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* จากประเทศอินโดนีเซียทั้ง Clade 1 และ 2 (รูปที่ 11)

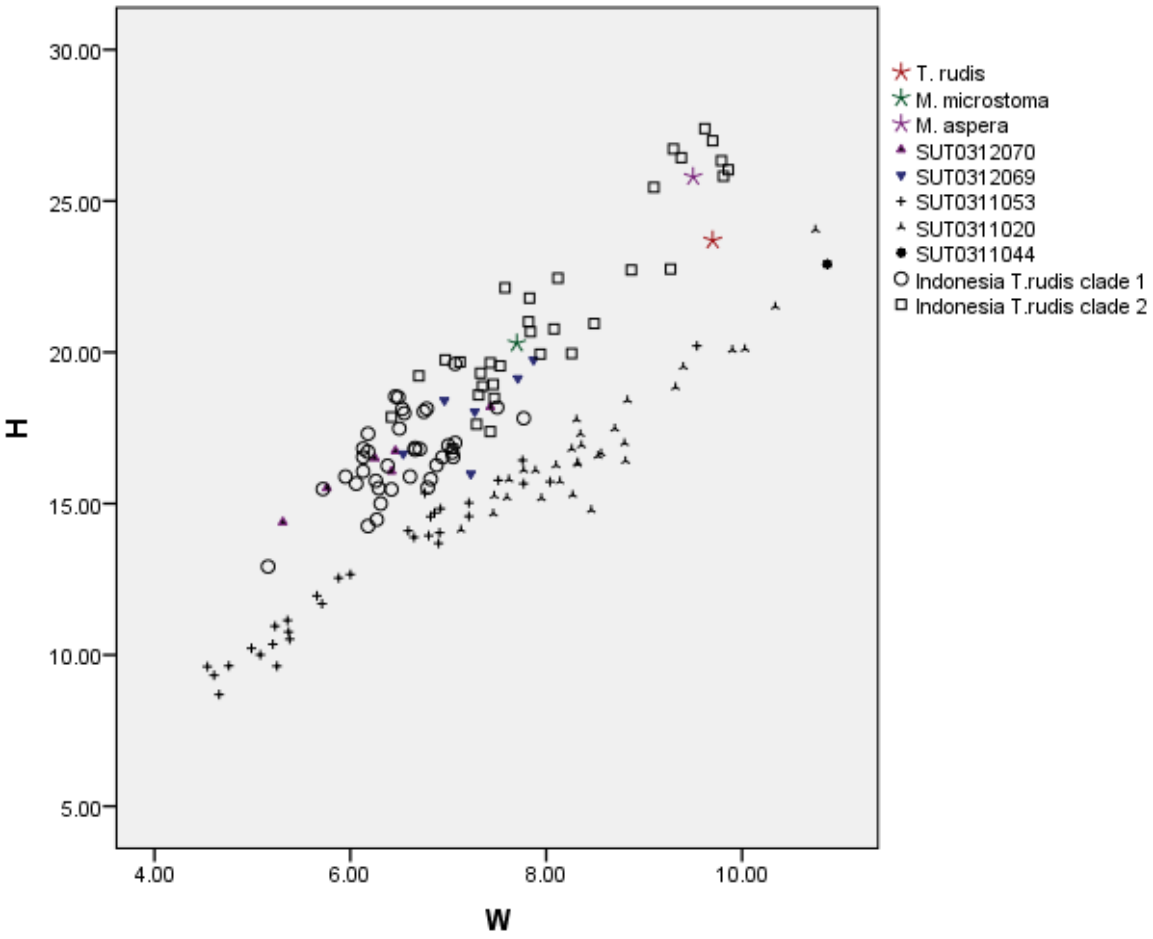
ผลจากการสร้าง scatter plot ให้ผลเช่นเดียวกับ box plot ของ h/w คือ หอยฝาเดียวจากสระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์และหอยฝาเดียวจากประเทศอินโดนีเซียมีรูปร่างคล้ายกับหอยฝาเดียวต้นแบบ (type material) มากกว่าหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ที่คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาครทั้งสามแบบ (รูปที่ 12)



รูปที่ 10 ภาพแสดง box plot ของความสูง (height) ของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* (THA = Thailand, IDN = Indonesia)



รูปที่ 11 ภาพแสดง box plot ของ size index (h/w) ของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis*



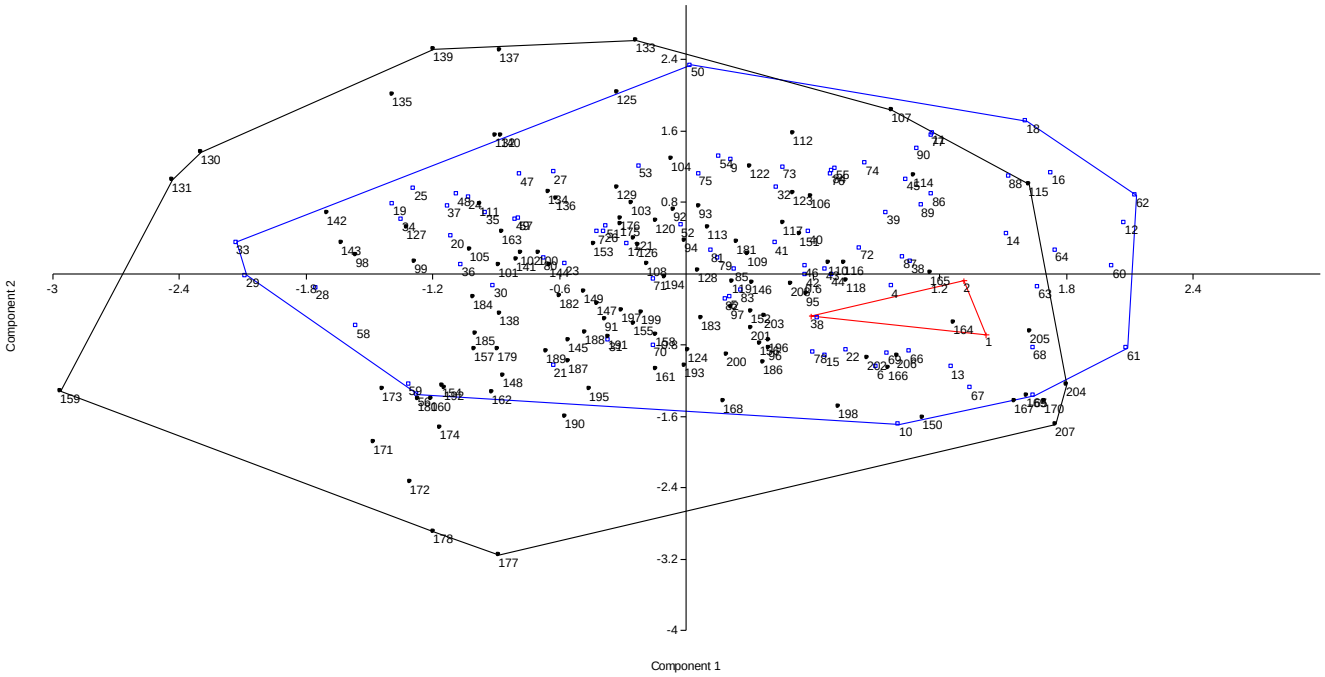
รูปที่ 12 ภาพแสดง scatter plot ระหว่างความสูง (h) และความกว้าง (w) ของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis*

ตารางที่ 1 ขนาดเปลือกของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* จากแต่ละจุดสำรวจ

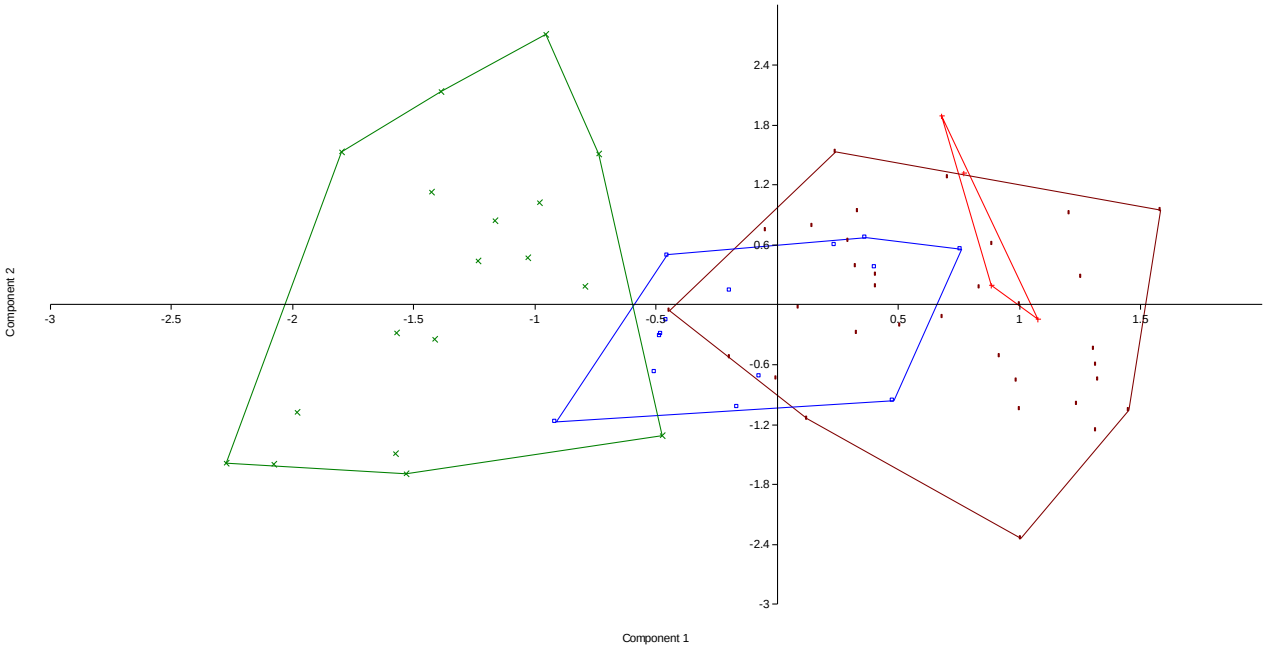
		Shell parameters					
Voucher		h	w	al	aw	bw	whorl
T. rudis USNM 119778 โมลุกกะ, อินโดนีเซีย, n = 1		23.7	9.7	8.8	4.1	15.5	4
'Melania' microstoma, USNM 119722 กัลกัตตา,อินเดีย, n = 1		20.3	7.7	7.1	3.3	12.3	6
'Melania' apsera Holotype, MNHN 21089 เวสท์ปาปัว, อินโดนีเซีย, n = 1		25.0	7.77	6.67	2.68	12.53	7
T. rudis (clade 1) SUT0312070 นครปฐม, ไทย, n = 6	range av sd	15.99/19.75 15.97 1.67	6.54/7.87 6.60 0.67	7.03/8.63 6.93 1.00	2.49/3.59 2.91 0.47	9.81/11.97 8.59 0.90	5-8
T. rudis (clade 1) SUT0311020 สมุทรสาคร, ไทย, n = 25	range av sd	12.45/24.8 18.43 3.23	7.43/11.13 8.82 1.23	7.29/12.25 8.98 1.23	3.19/4.89 4.16 0.60	9.47/16.15 12.43 1.90	6-7
T. rudis (clade 1) SUT0311044 สมุทรสาคร, ไทย, n = 1		22.91	10.78	10.45	4.78	15.22	6
T. rudis (clade 1) SUT0311053 สมุทรสาคร, ไทย, n = 25	range av sd	8.69/20.21 12.9 2.77	4.66/9.54 6.27 1.24	4.39/9.83 6.29 1.39	2.86/7.21 4.71 1.08	5.39/13.72 8.67 1.90	4-7
T. rudis (clade 1) ZMB191488 บาหลี, อินโดนีเซีย, n = 2	range av sd	19.83/22.05 20.94 1.57	8.26/9.44 8.85 0.83	8.02/8.84 8.43 0.58	4.10/4.73 4.42 0.45	12.80/14.50 13.65 1.20	5
T. rudis (clade 2) ZMB191279 บาหลี, อินโดนีเซีย, n = 19	range av sd	16.81/26.99 22.85 3.75	7.04/9.70 8.70 3.75	7.9/12.02 9.92 1.39	3.27/5.14 4.31 0.57	10.96/17.23 14.53 2.13	4-6
T. rudis (clade 2) ZMB106472 บาหลี, อินโดนีเซีย, n = 16	range av sd	17.86/22.75 20.09 1.43	6.42/9.27 7.53 0.64	7.20/10.61 8.46 0.86	3.11/5.01 3.84 0.43	11.35/16.24 19.41 2.59	4-7
T. rudis (clade 1) ZMB191278 สุลาเวสี, อินโดนีเซีย, n = 20	range av sd	14.26/18.18 15.93 1.61	6.18/7.5 6.79 0.39	6.13/8.86 7.26 0.65	3.14/3.92 3.59 0.24	9.31/12.01 10.53 0.74	4-5
T. rudis (clade 1) ZMB107377 สุลาเวสี, อินโดนีเซีย, n = 6	range av sd	15.23/20.34 16.75 2.06	5.46/7.46 6.45 0.69	4.75/7.30 6.17 0.78	2.73/3.99 3.35 0.41	7.89/11.73 9.61 1.27	4-5
T. rudis (clade 1) ZMB107378 สุลาเวสี, อินโดนีเซีย, n = 19	range av sd	12.92//19.62 16.94 1.48	5.16/7.07 6.28 0.41	5.00/7.79 6.30 0.66	2.64/3.94 3.19 0.36	7.67/11.22 9.86 0.84	4-5

2.2 ผลการทดลองการศึกษารูปร่างของเปลือกด้วยวิธี Geometric Morphometric (GM)

จากการวิเคราะห์รูปร่างพบว่า *T. rudis* ทั้งสองกลุ่มนั้นมีรูปร่างทรงเดียวกับ type specimens (รูปที่ 13) โดยที่รูปร่างของ *T. rudis* ทั้งสองกลุ่มมีรูปร่างที่คล้ายกัน สำหรับ *T. rudis* จากประเทศไทยนั้นมีรูปร่างคล้ายกับ *T. rudis* clade 1 จากประเทศอินโดนีเซีย ในขณะที่ *T. rudis* clade 2 จากประเทศอินโดนีเซียนั้นมีรูปร่างคล้ายกับ *T. winteri* (รูปที่ 14)



รูปที่ 13 รูปแสดงผลการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของเปลือกของหอยน้ำจืด *Thiara rudis* ด้วยวิธี Geometric Morphometric analysis (สีแดง คือ morphospace ของ type specimens ได้แก่ *Thiara rudis, 'Melania' microstoma* และ *'Melania' aspera*, สีน้ำเงิน คือ morphospace ของ *Thiara rudis* clade 1 และ สีดำ คือ morphospace ของ *Thiara rudis* clade 2)



รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์รูปร่างเปลือกหอย *Thiara rudis* จากประเทศไทยเปรียบเทียบกับ *T. rudis* จากประเทศอินโดนีเซีย (สีแดง = *Thiara winteri*, สีเขียว= *Thiara rudis* of Thailand, สีน้ำเงิน = *Thiara rudis* clade 1และสีน้ำตาล = *Thiara rudis* clade 2)

3. ลักษณะของฟัน (radula)ของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

พบมีลักษณะรูปร่างและจำนวนซีฟันของฟันกลาง ฟันข้างและฟันริม ดังนี้ (ตารางที่ 2)

3.1 หอยฝาเดียวชนิด*Thiara cf rudis* เปลือกไม่มีหนาม (SUT0312070) สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ ม.ศิลปากร (รูปที่ 15a, 15b)

พบว่ามีลักษณะฟันเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ

- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp) ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 4-6 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะฟันแหลม และหยักข้าง 4-5 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal teeth) 1 ซี่มีหยัก 7-8 หยักและฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth)1 ซี่ มีหยัก 7-8 หยัก

3.2.หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* เปลือกมีหนาม (SUT0312069) สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ ม.ศิลปากร (รูปที่ 15c, 15d)

พบว่ามีลักษณะฟันแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ

- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp) ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 3 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะแหลม และหยักข้าง 3 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal teeth) 1 ซี่มีหยัก 9-10 หยัก และฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 9-10 หยัก

3.3 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* เปลือกไม่มีหนาม (SUT0311053) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร (รูปที่ 15e, 15f)

พบว่ามีลักษณะฟันเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ

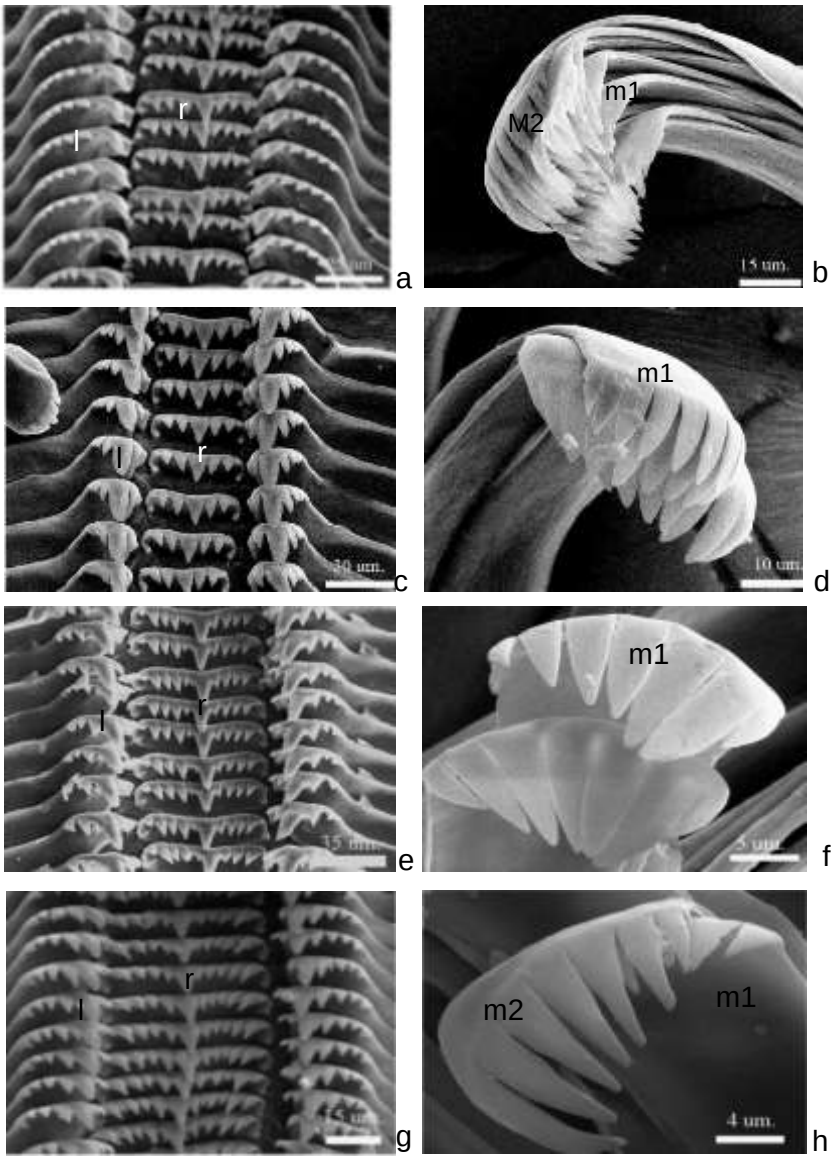
- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp) ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 4-6 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะฟันแหลม และหยักข้าง 3-4 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal teeth) 1 ซี่มีหยัก 6-7 หยักและฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 8 หยัก

3.4 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* เปลือกมีหนาม (SUT0311020) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว

จ. สมุทรสาคร (รูปที่ 15g, 15h)

พบว่ามีลักษณะฟันเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ

- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp)ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 4-6 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะฟันแหลม และหยักข้าง 3-5 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal teeth) 1 ซี่มีหยัก 7-8 หยักและฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 8-9 หยัก



รูปที่ 15 ลักษณะฟันกลาง ฟันข้างและฟันริมของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศไทย
(r: ฟันกลาง l: ฟันข้าง m1: ฟันริมด้านใน m2: ฟันริมด้านนอก)
a-b : *Thiara rudis* (SUT0312070) สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ ม.ศิลปากร
c-d : *Thiara rudis* (SUT0312069) สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ ม.ศิลปากร
e-f : *Thiara rudis* (SUT0311053) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร
g-h : *Thiara rudis* (SUT0311020) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร

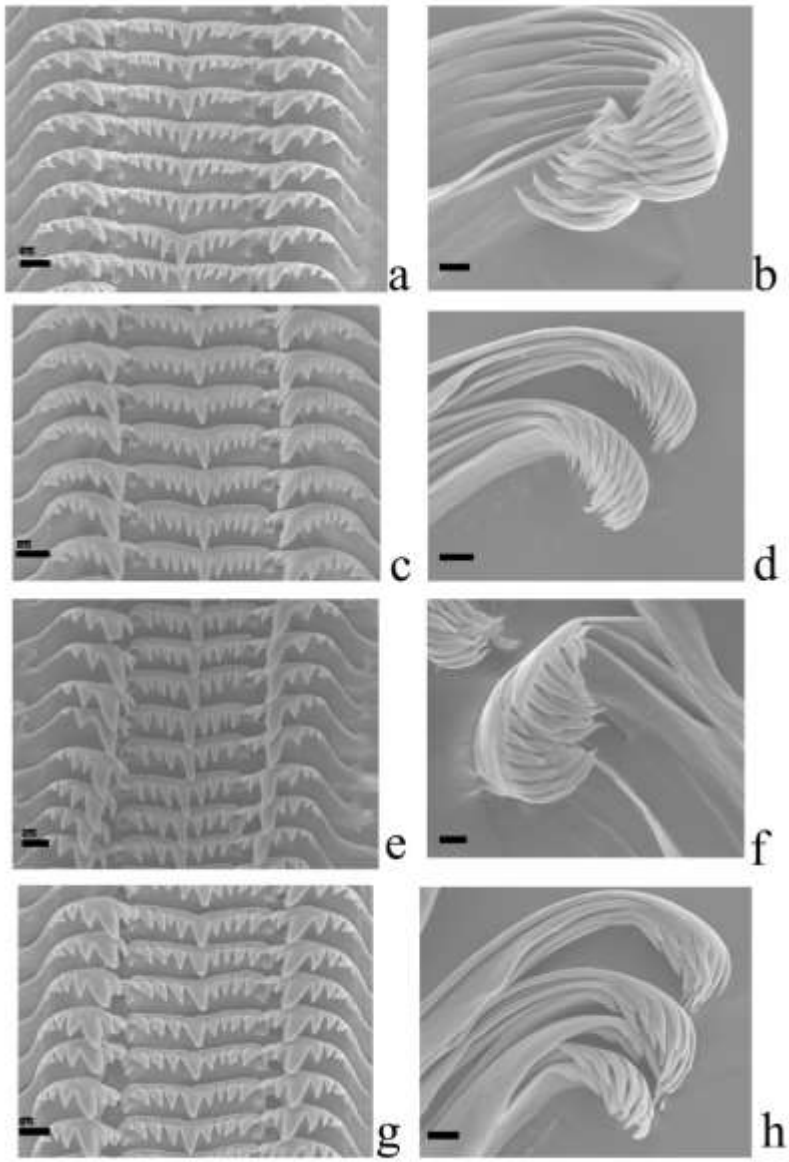
3.5 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara cf rudis* clade 1 (ZMB 191278) สุลาเวสี ประเทศอินโดนีเซีย (รูปที่ 16a, 16b)
พบว่ามีลักษณะฟันเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ
- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp) ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 3 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะฟันแหลม และหยักข้าง 3 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 7-8 หยักและฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 7-8 หยัก

3.6 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara cf rudis* clade 1 (ZMB 191488) บาหลี ประเทศอินโดนีเซีย (รูปที่ 16c, 16d)
พบว่ามีลักษณะฟันเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ
- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp) ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 6 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะฟันแหลม และหยักข้าง 6 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 10 หยักและฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 10 หยัก

3.7 หอยฝาเดียวชนิด *Thiara cf rudis* clade 2 (ZMB 191279) บาหลีตอนใต้ ประเทศอินโดนีเซีย (รูปที่ 16e, 16f)
พบว่ามีลักษณะฟันเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ
- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp)ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 4-5 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะฟันแหลม และหยักข้าง 4 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 6-7 หยักและฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 6-7 หยัก

3.8 หอยฝาเดียวน้ำจืด *Thiara cf rudis* clade 2 (ZMB 106472) บาหลีตอนใต้ ประเทศอินโดนีเซีย (รูปที่ 16g, 16h) พบว่ามีลักษณะฟันเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (Taenioglossa) และมีสูตร (dentition formula) เป็น 2:1:1:1:2 คือ
- ฟันกลาง (central, rhachidian teeth) มี 1 ซี่ ลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบประกอบด้วยหยัก (cusp) ใหญ่อยู่ตรงกลางลักษณะแหลม และหยักข้าง 4 หยักทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันข้าง (lateral teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลาด้านละ 1 ซี่ ประกอบด้วยหยักใหญ่อยู่ตรงกลางมีลักษณะฟันแหลม และหยักข้าง 3 หยัก ทั้ง 2 ข้างเท่าๆกัน
- ฟันริม (marginal teeth) มีทั้ง 2 ข้างของแรดูลา มีลักษณะ 2 แบบ คือ ฟันริมด้านใน (inner marginal

teeth) 1 ซี่ มีหยัก 6-7 หยักและฟันริมด้านนอก (outer marginal teeth) 1 ซี่ มีหยัก 6-7 หยัก



รูปที่ 16 ลักษณะฟันกลาง ฟันข้าง ฟันริมของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศอินโดนีเซีย (สเกล = 10 µm)

a-b : *Thiara rudis* clade 1(ZMB191278) สุลาเวสี

c-d : *Thiara rudis* clade 1 (ZMB 191488) บาหลี

e-f : *Thiara rudis* clade 2 (ZMB 191279) บาหลีตอนใต้

g-h : *Thiara rudis* clade 2 (ZMB 106472) บาหลีตอนใต้

ตารางที่ 2 สูตรฟันของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis*

Population		marginal teeth	lateral teeth left	lateral teeth right	rachidian
a.	Thailand, Samut Sakhon (ZMB127536) (n = 4)	6-8	3-1-3	3-1-3	4-5/1/4-5
b.	Thailand, Samut Sakhon (ZMB127535a) (n=4)	6-8	3-1-3	3-1-3	4-5/1/4-5
c.	Thailand, Nakhon Pathom (ZMB127534) (n=2)	7-10	5-1-5	4-1-4	4/1/4
d.	Indonesia, Sulawesi (ZMB191278) (n=2)	7-8	3-1-3	3-1-3	4/1/4
e.	Indonesia, Bali (ZMB191279) (n=3)	6-7	4-1-4	4-1-4	4-5/1/4-5
f.	Indonesia, Bali (ZMB106472) (n=2)	6-7	3-1-3	3-1-3	4/1/4
g.	Indonesia, Bali (ZMB191488) (n=1)	10	6-1-6	6-1-6	6/1/5

4. ตัวอ่อนของหอยฝาเดียว *Thiara rudis*

การจำแนกตัวอ่อน (Juvenile) ของหอยฝาเดียว Glaubrecht (1996) แบ่งได้เป็น

4.1 ตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือก (juvenile without shell) มี 2 แบบ คือ

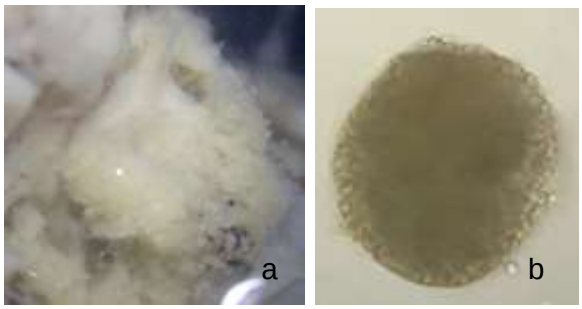
: early embryo เป็นตัวอ่อนที่มีลักษณะรูปร่างกลม

: lately embryo เป็นตัวอ่อนที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายตัว U

4.2 ตัวอ่อนที่มีเปลือก (juvenile with shell) แบ่งตามขนาด

พบว่ารูปแบบการเจริญพัฒนาตัวอ่อนของหอยฝาเดียวสกุล Thiaridae เป็นแบบ r-strategy คือ มีแต่ตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือก และ k-strategy คือมีทั้งตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกและตัวอ่อนที่มีเปลือก (รูปที่ 17) หอยฝาเดียว *T. rudis* จากประเทศไทยมีรูปแบบการเจริญพัฒนาตัวอ่อนทั้งสองแบบ คือ ทั้ง r-strategy และ k-strategy โดยมี

1. แบบ r-strategy (รูปที่ 17) ได้แก่ *T. rudis* (SUT0312069) และ *T. rudis* (SUT0312070) สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ. นครปฐม

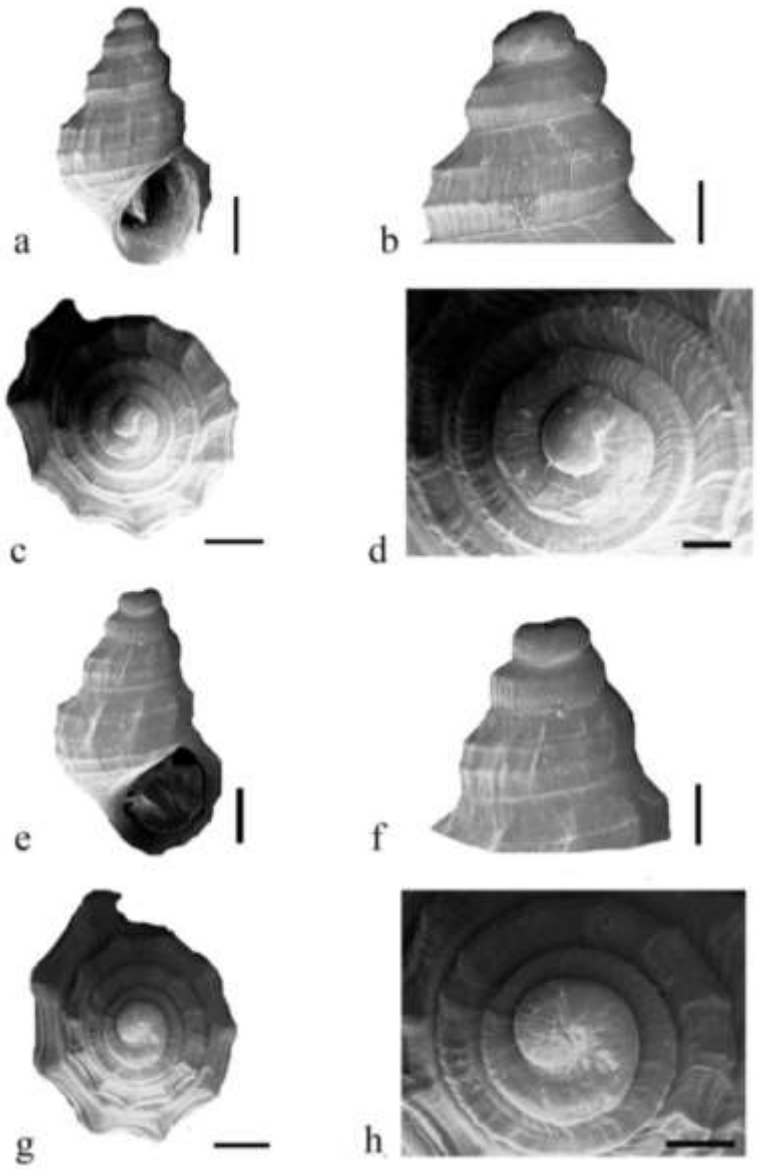


รูปที่ 17 ตัวอ่อนแบบไม่มีเปลือก (juvenile without shell) ในถุงฟักตัวอ่อน (brood pouch) ของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ภายใต้กล้องสเตอริโอ

a. ถุงพักตัวอ่อนของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* สระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ.นครปฐม

b. ภาพขยายตัวอ่อนของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* แบบกลม

2. แบบ k-strategy (รูปที่ 18) ได้แก่ *T. rudis* (SUT0311020) และ *T. rudis* (SUT0311053) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร

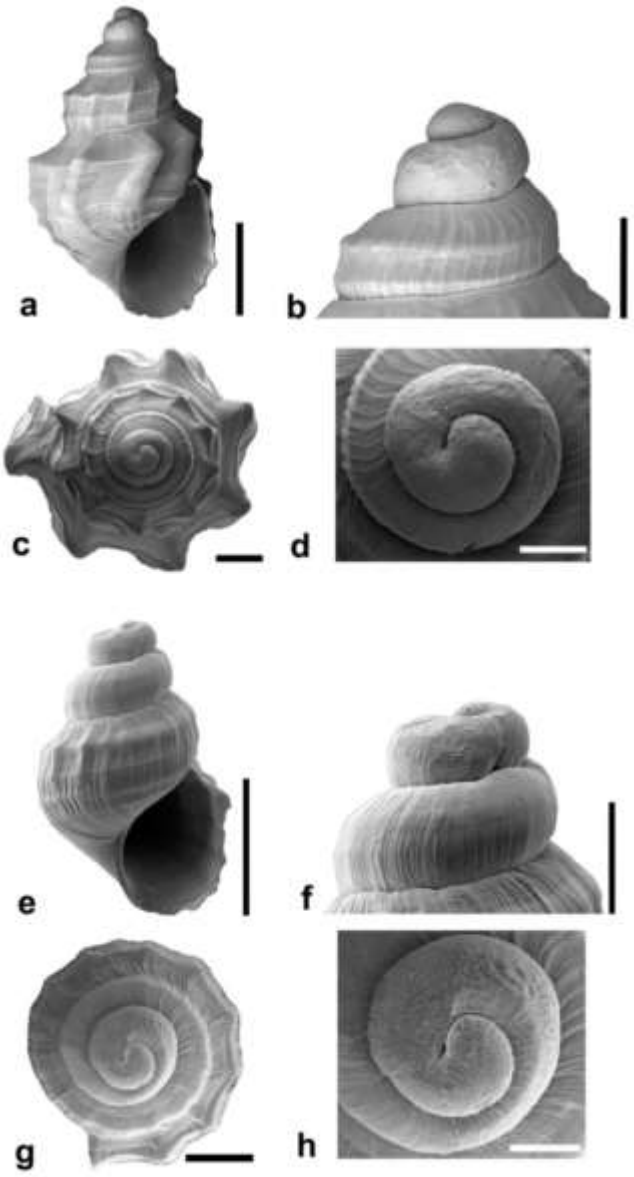


รูปที่ 18 ตัวอ่อนแบบมีเปลือกของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศไทย
a-d: *Thiara rudis* (SUT0311053) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร (สเกล: a = 500 µm, b & c = 200 µm และ d = 100 µm)
e-h: *Thiara rudis* (SUT0311020) คลองดอนโฆ อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร (สเกล: e = 500 µm, f & g = 200 µm และ h = 100 µm)

ส่วนหอยฝาเดียว *T. rudis* ประเทศอินโดนีเซียมีการสืบพันธุ์รูปแบบ r-strategy และ k-strategy เช่นเดียวกันโดยมี : การสืบพันธุ์ตัวอ่อนรูปแบบ r-strategy ได้แก่ *T. rudis* Clade 2 (ZMB 106472) และ *T. rudis* Clade 2 (ZMB 191279) เกาะบาหลี ประเทศอินโดนีเซีย

: การสืบพันธุ์ตัวอ่อนรูปแบบ k-strategy (รูปที่ 19) ได้แก่ *T. rudis* Clade 1 (ZMB191278) สุลาเวสีและ *T. rudis* Clade 1 (ZMB191488) บาหลี ประเทศอินโดนีเซีย

: ในขณะที่หอย *T. rudis* จากประเทศออสเตรเลียพบว่ามีรูปแบบเดียว คือ k-strategy



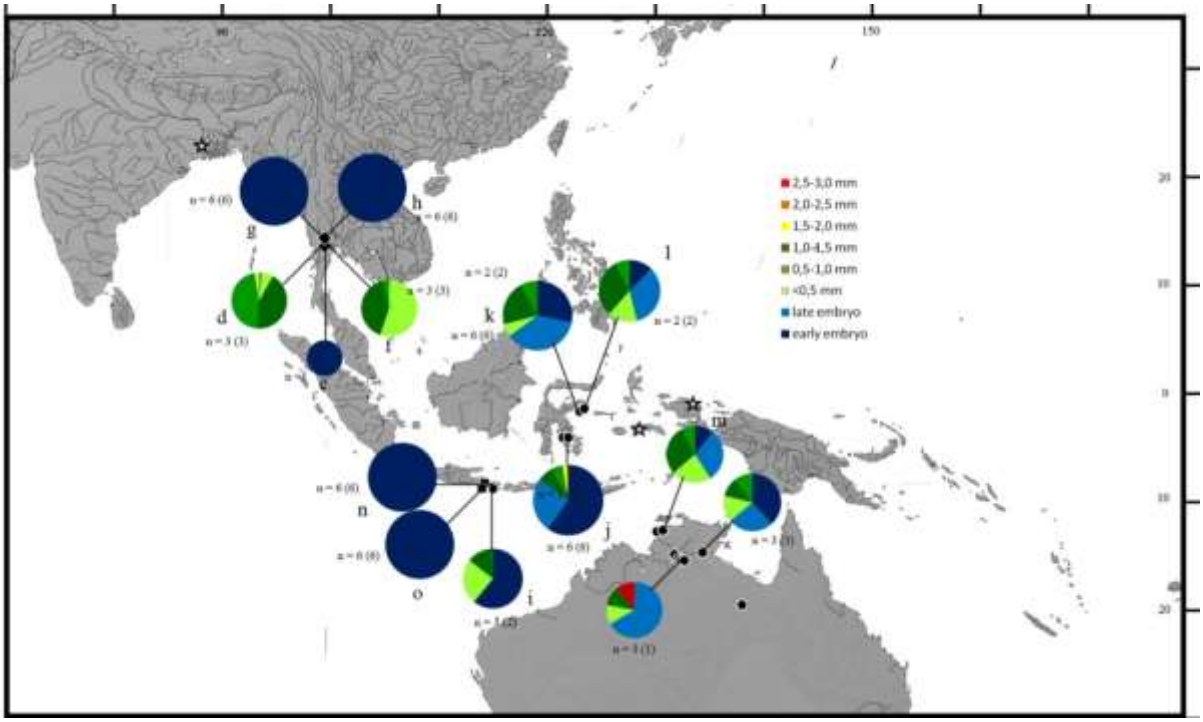
รูปที่ 19 ตัวอ่อนแบบมีเปลือกของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis* ประเทศอินโดนีเซีย
a-d: *Thiara rudis* Clade 1 (ZMB191278) สุลาเวสี
(สเกล: a = 500 µm, b & c = 200 µm และ d = 100 µm)
e-h: *Thiara rudis* clade 1 (ZMB 191488) บาหลี
(สเกล: e = 500 µm, f & g = 200 µm และ h = 100 µm)

ตัวอ่อนที่อยู่ถุงฟักตัวอ่อน (brood pouch) ของ *T. rudis* มีขนาดตั้งแต่ 1-4 เวิร์ล เปลือกมีลวดลายและสันนูน โดย โพรโทคอนช์ (protoconch) ของตัวอ่อนจากทุกจุดสำรวจมีลวดลายที่เป็นลักษณะเฉพาะของหอยในกลุ่ม thiarid และลวดลายของตัวอ่อนนั้นมีความแตกต่างกันไปตามตัวเต็มวัยของแต่ละพื้นที่ โดยที่ความสูงของตัวอ่อนอยู่ระหว่าง 48-72 µm ความกว้างอยู่ระหว่าง 95-120 µm และเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 202-394 µm (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ขนาด protoconch ของตัวอ่อนหอยน้ำจืด *Thiara rudis* (µm)

Location		height	width	diameter
a. *T. rudis,* Thailand, Samut Sakhon (ZMB127536) , n=3	range	48.00 - 63.16	96.0 - 120.0	312.68 - 394.74
	average	53.95	106.74	352.80
	SD	8.08	12.20	41.60
b. *T. rudis,* Thailand, Samut Sakhon (ZMB127535a), n= 2	range	56.34 - 71.43	107.04 - 114.29	354.29 - 366.20
	average	63.88	110.66	352.8
	SD	10.67	12.20	41.06
c. *T. rudis,* Indonesia, Sulawesi (ZMB 191278), n= 2	range	34.0 - 72.41	76.0 - 91.10	202 - 252.41
	average	53.21	84.55	227.21
	SD	27.16	12.09	35.64
d. *T. rudis* Indonesia, Bali (ZMB 191488), n = 1		83.33	95.23	259.52

การเจริญพัฒนาของตัวอ่อนในถุงฟักของ *T. rudis* ในแต่ละจุดสำรวจนั้นมีความแตกต่างกันโดยหอย *T. rudis* จากประเทศไทยนั้นจุดสำรวจบริเวณสระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พบแต่ตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกในถุงฟัก (รูปแบบ r-strategy) ในขณะที่หอย *T. rudis* จากจุดสำรวจคลองดอนโฆพบทั้งตัวอ่อนที่มีเปลือกและไม่มีเปลือกในถุงฟัก (รูปแบบ k-strategy) เช่นเดียวกับ หอย *T. rudis* จากประเทศอินโดนีเซียที่บางจุดพบแต่ตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกในถุงฟัก แต่บางจุดกลับพบตัวอ่อนที่มีเปลือกและไม่มีเปลือกในถุงฟัก ส่วนหอย *T. rudis* จากประเทศออสเตรเลียทุกจุดสำรวจพบตัวอ่อนที่มีเปลือกและไม่มีเปลือกในถุงฟัก (รูปที่ 20)

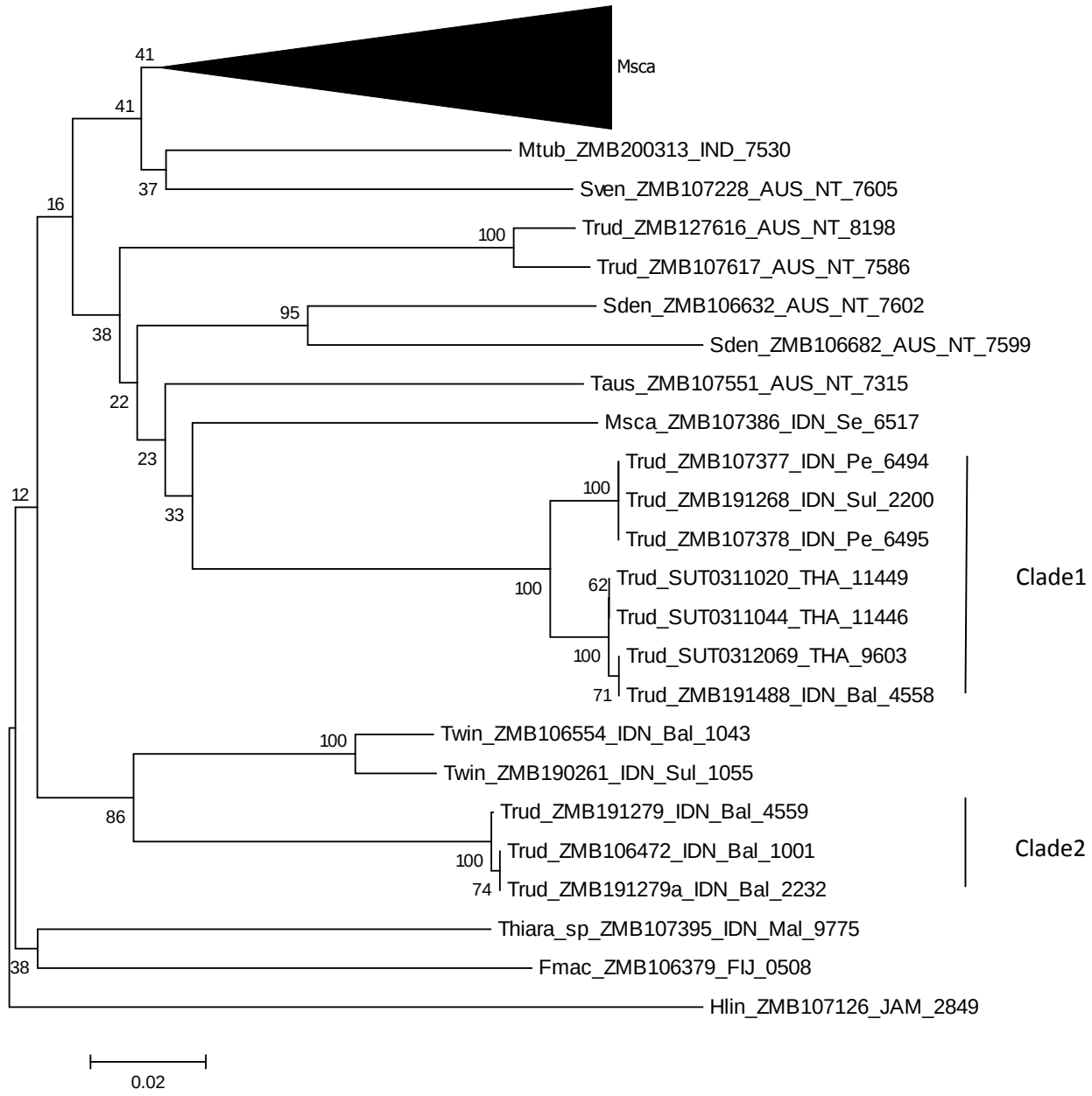


รูปที่ 20 รูปแบบการสืบพันธุ์ของหอย *T. rudis* จากจุดสำรวจต่างๆ

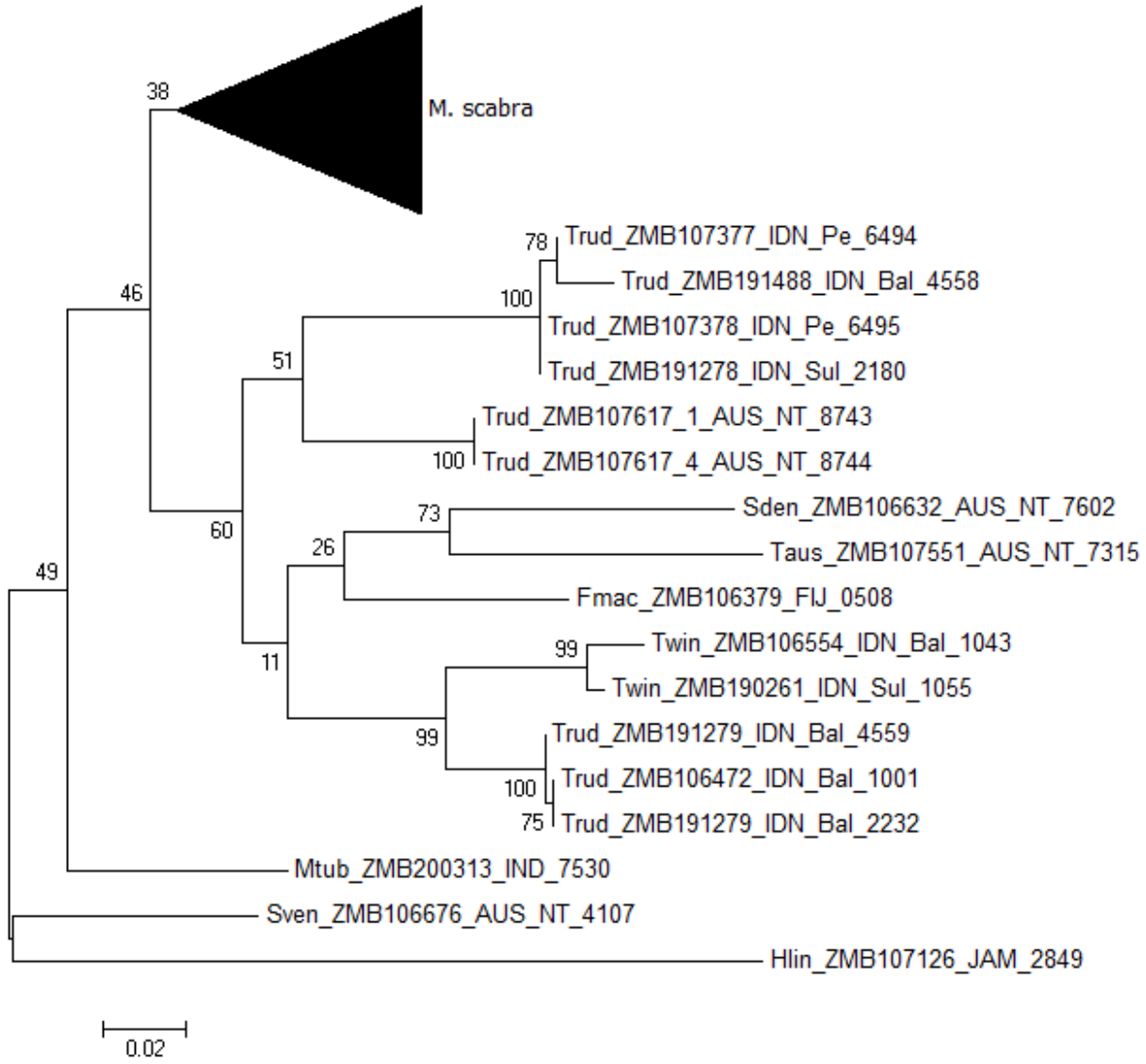
5. สายวิวัฒนาการของหอยฝาเดียวชนิด *Thiara rudis*

สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ถูกสร้างจากยีน Cytochrome C oxidase I (COI) (รูปที่ 21) ความยาว 660 คู่เบสโดยที่สายวิวัฒนาการของหอยน้ำจืด *T. rudis* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหอยน้ำจืด *T. rudis* นั้นแยกจากหอยน้ำจืดในวงศ์ Thiaridae อย่างชัดเจน ไม่ว่าจะเป็น *Thiara winteri, Mieniplotia scabra, Melanoides tuberculata, Sermyla venustula* ผลการศึกษาดีเอ็นเอทำให้ทราบว่าหอย *T. rudis* จากประเทศไทย ได้แก่ SUT0311020, SUT0312070, SUT0311044 นั้นเป็น *T. rudis* โดยที่ *T. rudis* จากประเทศไทยนั้นอยู่ใน clade เดียวกับ *T. rudis* clade I จากประเทศอินโดนีเซียและประเทศออสเตรเลีย โดยการสร้างสายวิวัฒนาการนี้ มี *Hemisinus* sp. เป็น outgroups

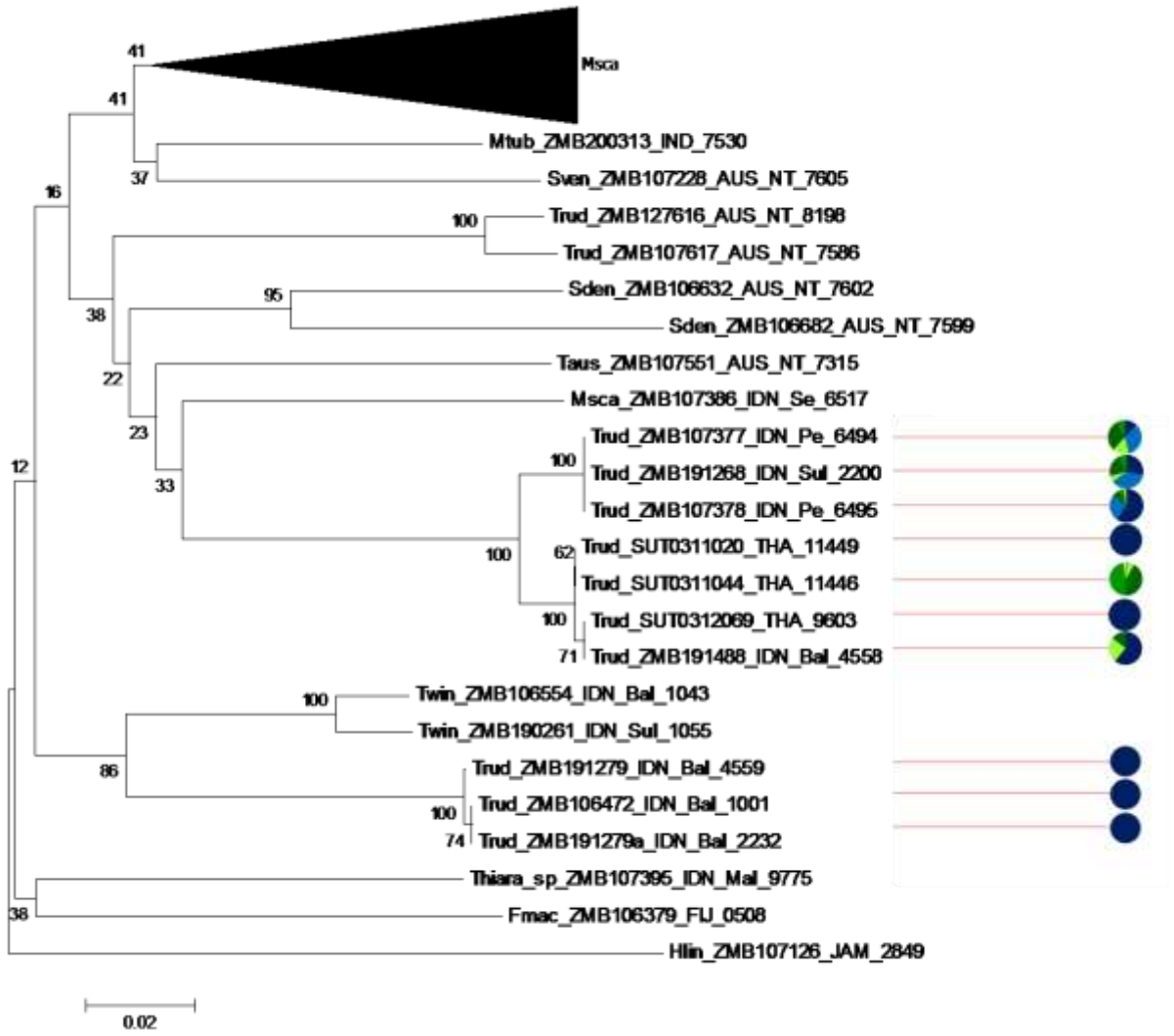
สายวิวัฒนาการที่สร้างจากยีน 16s ribosomal (รูปที่ 22) ให้ผลเช่นเดียวกับยีน COI คือ *T. rudis* นั้นแยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Clade 1 และ Clade 2 โดย Clade 2 นั้นมี sister taxon คือ *T. winteri* โดย *T. rudis* ใน Clade 1 นั้นพบได้ในประเทศไทย อินโดนีเซียและออสเตรเลีย ในขณะที่ *T. rudis* Clade 2 พบได้ที่เกาะบาหลี ประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น เมื่อนำผล reproductive strategy มาวิเคราะห์ร่วมกับสายวิวัฒนาการ (รูปที่ 23) พบว่า *T. rudis* clade 2 นั้นมีการเจริญของตัวอ่อนแบบ r-strategy ในขณะที่ *T. rudis* clade 1 มีการเจริญของตัวอ่อนแบบ k-strategy



รูปที่ 21 สายวิวัฒนาการของหอยน้ำจืด *Thiara rudis* สร้างจากยีน Cytochrome C oxidase I (COI) ด้วยโปรแกรม MEGA 5.0 โดย algorithm ที่ใช้ alignment คือ ClustalW (Boot strap value = 1,000) และ algorithm ที่ใช้สร้างสายวิวัฒนาการ คือ Neighbor Joining (NJ)



รูปที่ 22 สายวิวัฒนาการของหอยน้ำจืด *Thiara rudis* สร้างจากยีน 16s ribosomal gene (16s) ด้วยโปรแกรม MEGA 5.0 โดย algorithm ที่ใช้ alignment คือ MUSCLE (Boot strap value = 1,000) และ algorithm ที่ใช้สร้างสายวิวัฒนาการ คือ Maximum Likelihood (ML)



รูปที่ 23 สายวิวัฒนาการของหอยน้ำจืด *Thiara rudis* สร้างจากยีน Cytochrome C oxidase I (COI)

วิเคราะห์ผลการศึกษา

T. rudis Lea, 1850**, *T. microstoma* and *T. aspera* ?**

Lea (1850) เป็นนักสังขวิทยาคนแรกที่บรรยายเกี่ยวกับ *Thiara rudis* โดยในตอนแรกได้ตั้งชื่อเป็น *Melania rudis* ต่อมาได้เปลี่ยนเป็น *Tarebia rudis* นอกจากนี้ Lea ยังได้บรรยายเกี่ยวกับ *Tarebia microstoma* โดยตอนแรกได้ตั้งชื่อเป็น *Melania microstoma* เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Brot (1877) ได้กล่าวถึง *T. rudis* ในหนังสือของเขาว่าเขาไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *T. rudis* และ *T. microstoma* และยังได้ตั้งข้อสังเกตว่า *Melania aspera* อาจเป็นชื่อซ้ำของ *T. rudis* สำหรับ หอย *M. aspera* ถูกบรรยายครั้งแรก โดย Lesson ในปี ค.ศ.1831 (Glaubrecht & Podlacha, 2010)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้ศึกษา type specimen ของหอยทั้งสามชนิด คือ *Thiara rudis, "Tarebia" microstoma* และ *"Melania" aspera* จากผลการศึกษา biometry พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งความสูง ความกว้างและ size index แต่ไม่มีความแตกต่างในเรื่องลวดลายและตุ่มบนเปลือก ดังนั้นจึงไม่สามารถนำผลการศึกษาในเรื่องเกี่ยวกับลักษณะของเปลือกมาระบุความเหมือนหรือความแตกต่างของชนิดพันธุ์หอยได้ เช่นการระบุว่าหอยทั้งสามชนิดนั้นเป็นหอยชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน ซึ่งวิธีที่จะทดสอบเรื่องนี้ได้ คือ ancient DNA technique ที่สามารถเพิ่มปริมาณจำนวน DNA จากเปลือกแห้งได้ ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อแก้ปัญหาเรื่อง type specimen (Glaubrecht, unpublished data) ตัวอย่างเช่น ความสับสนระหว่างชนิดพันธุ์ของหอยน้ำจืด *Melanoides tuberculata, Stenomelania denisoniensis* และ *Neoradina prasongi* เนื่องจากหอยทั้งสามชนิดมีรูปร่างและลวดลายคล้ายกัน โดยเฉพาะ *Neoradina prasongi* ที่พบในประเทศไทยเท่านั้น จาก Ancient DNA technique ให้ผลยืนยันว่า *N. prasongi* ไม่ใช่ทั้ง *M. tuberculata* หรือ *S. denisoniensis*

ฟัน (radula)

ฟันของ *T. rudis* จากทุกจุดสำรวจในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเป็นแบบ Taenioglossa ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของหอยในวงศ์ Thiaridae และพบว่ามีความแตกต่างกันบ้างในเรื่องของจำนวนฟันและรูปร่าง แต่ Glaubrecht et al. (2009) ได้ให้ข้อเสนอไว้ว่าความหลากหลายที่พบในฟันของหอยวงศ์ Thiaridae ไม่เพียงพอที่จะใช้จำแนกชนิดพันธุ์

การศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาด้านการเจริญพัฒนาของตัวอ่อน พบว่าหอยน้ำจืดในวงศ์ Thiaridae นั้นมีถุงฟักตัวอ่อน (brood pouch) ซึ่งลูกหอยจะพัฒนาตัวอ่อน (embryo) และ juvenile รูปแบบการพัฒนาของตัวอ่อนของหอยในวงศ์นี้มี 2 แบบ คือ ovo-viviparity และ eu-viviparity โดยที่ ovo-viviparity นั้น ในถุงฟักตัวอ่อนของหอยเพศเมียจะพบเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกเท่านั้น และ eu-viviparity นั้นจะพบทั้งตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกและมีเปลือกในถุงฟักตัวอ่อน (Glaubrecht, 1996) ซึ่งหอย *M. tuberculata, T. granifera, S. riqueti, S. venustula, M. scabra, M. onca,* และ *S. denisoniensis* ที่มีรูปแบบการพัฒนาตัวอ่อนแบบ eu-viviparity ในขณะที่ *T. amarula, S. aspiran, T. winteri , T. cancellata* และ *T. mirifica* มีรูปแบบการพัฒนาตัวอ่อนแบบ ovo-viviparity (Glaubrecht et al., 2009)

สำหรับ *T. rudis* นั้นมีความเชื่อว่าเป็นหอยที่มีรูปแบบการพัฒนาตัวอ่อนแบบ eu-viviparity ถึงแม้ว่าบางจุดสำรวจจะพบแต่ตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกในถุงฟักตัวอ่อนเท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อมได้ เช่นเดียวกับ *M. scabra* ที่เชื่อกันว่าเป็น eu-viviparity แต่บางจุดสำรวจพบแต่ตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกในถุงฟักตัวอ่อนเท่านั้น

เมื่อวิเคราะห์ผลการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ แม้นว่าจะระบุว่าหอย *Thiara* sp. มีการสืบพันธุ์แบบ Parthenogenesis แต่การเจริญของตัวอ่อนยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจาก type material (Hab. Amboyna, Indonesian) เป็นแค่เปลือกแห้ง ทำให้ไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่า *T. rudis* ที่แท้จริงมีการเจริญแบบใด แต่ *Thiara* spp.ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ จะพบเฉพาะตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกเท่านั้น (r-strategy) ซึ่งสอดคล้องกับหอย *T. rudis* ที่พบจากเกาะบาหลี ประเทศอินโดนีเซีย (Kohler & Glaubrecht, 2005) ขณะที่ หอย *T. rudis* บางกลุ่ม จะพบตัวอ่อนที่มีเปลือก (k-strategy) ในบริเวณหมู่เกาะชวา, หมู่เกาะสุลาเวสี และหมู่เกาะบาหลี ดังนั้นจึงสามารถพบการเจริญของตัวอ่อนของหอยชนิดนี้ได้ทั้ง 2 แบบ คือ r-strategy และ k-strategy การดำเนินงานวิจัยนี้ได้ดำเนินการตรวจสอบสายพันธุ์ต่อเนื่องในด้านชีวโมเลกุล เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลร่วมกัน

การศึกษาด้านชีวโมเลกุล สามารถสร้างสายวิวัฒนาการของตัวอย่างหอยที่เก็บได้ โดยสายวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นมาจากลำดับดีเอ็นเอบางส่วนในยีน Cytochrome C oxidase I (COI) และ 16s ribosomal gene พบว่า *T. rudis* ในการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากหอยชนิดพันธุ์อื่นๆในวงศ์ Thiaridae แต่ *T. rudis* เองกลับแบ่งออกเป็น 2 clade ในสายวิวัฒนาการทั้งสองยีน โดยที่หอย *T. rudis* จากประเทศไทยนั้นอยู่ใน clade 1 เช่นเดียวกับที่ได้จากประเทศอินโดนีเซียและออสเตรเลีย ในขณะที่ *T. rudis* Clade 2 พบได้ที่เกาะบาหลี ประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น (Glaubrecht & Rintelen, 2003; Glaubrecht et al., 2009, Maaβ & Glaubrecht, 2012)

อย่างไรก็ตามสายวิวัฒนาการของหอย *T. rudis* ที่สร้างจากยีน Histone 3 (H3) ซึ่งเป็นยีนในนิวเคลียสแสดงให้เห็นว่า *T. rudis* เป็น monophyletic คือ *T. rudis* ทั้งหมดอยู่ด้วยกัน (Gimnich & Glaubrecht, unpulished data) การทดลองนี้เป็นที่น่าสนใจว่า nuclear DNA นั้นเป็นแนวทางหนึ่งที่ให้ผลน่าเชื่อถือมากกว่า mitochondrial DNA (Shaw, 2002) เนื่องจากในมอลลัสก์ nuclear DNA นั้นมีวิวัฒนาการที่ช้ากว่า mitochondrial DNA ดังนั้นเพื่อความน่าเชื่อถือในการศึกษาครั้งต่อๆไปควรจะศึกษาทั้ง nuclear DNA และ mitochondrial DNA

สรุปผลการดำเนินงาน

พบหอย *Thiara rudis* บริเวณจุดสำรวจได้แก่ คลองดอนโฆ จังหวัดสมุทรสาคร และสระน้ำหน้าคณะอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม เป็นการรายงานการพบหอยชนิดนี้ครั้งแรกในประเทศไทย

บรรณานุกรม

Brandt, R. A. M. (1974). The non-marine aquatic Mollusca of Thailand. *Archiv für Mollukunde*. 105, 1-423.

Brot, A. (1877). Die Melaniaceen (Melanidae) in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen. In Koster, H. C. (ed.). *Systematisches Conchylien-Cabinet* von Martini und Chemnitz, Bd. 2, No.24, Bauer & Raspe, Nornberg, 488 pages.

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.

Glaubrecht, M. (1996). Evolutionsökologie und Systematik am Beispiel von Süβ – und Brackwasserschnecken (Mollusca: Caenogastropoda: Cerithioidea): Ontogenese-Strategien, paläontologische Befunde und Historische Zoogeographie. Leiden: Backhuys Publishers. (In German with extended English abstract).

Glaubrecht, M., Brinkmann, N., & Pöppe, J. (2009). Diversity and disparity 'down under': Systematics, biogeography and reproductive modes of the 'marsupial' freshwater Thiaridae (Caenogastropoda, Cerithioidea) in Australia. *Zoosystematics and Evolution*, 85 (2),199–275.

Glaubrecht, M., & Podlacha, K. (2010). Freshwater gastropods from early voyages into the Indo-west Pacific: The 'melaniids' (Cerithiodea, Thiaridae) from the French 'La Coquille' circumnavigation, 1822-1825, *Zoosystematics & Evolution*, 86 (2), 185-211.

Glaubrecht, M., & Rintelen, T. V. (2003). Systematics, molecular genetics and historical zoogeography of the viviparous freshwater gastropod Pseudopotamis (Cerithioidea, Pachychilidae): relic on the torres Strait Islands, Australia. *Zoologica Scripta*, 32, 415–435.

Kohler, F., & Glaubrecht, M. (2005). Fallen into oblivion — the systematic affinities of the enigmatic Sulcospira Troschel, 1858 (Cerithioidea: Pachychilidae), a genus of viviparous freshwater gastropods from Java. *The Nautilus*, 119, 15-26.

Maaβ, N., & Glaubrecht, M. (2012). Comparing the reproductive biology in three "maruspial", eu-viviparous freshwater gastropods (Cerithioidea, Thiaridae) from drainages of Australia's monsoonal north. – *Zoosystematics and Evolution*, 88 (2), 293–315.

Shaw, L. K. (2002). Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals adn conceals about mode of speciation in Hawaiian crickets. *PNAS*, 99, 16122-16127.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biololgy and Evolution*, 28, 2731–2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research,* 22, 4673–4680.