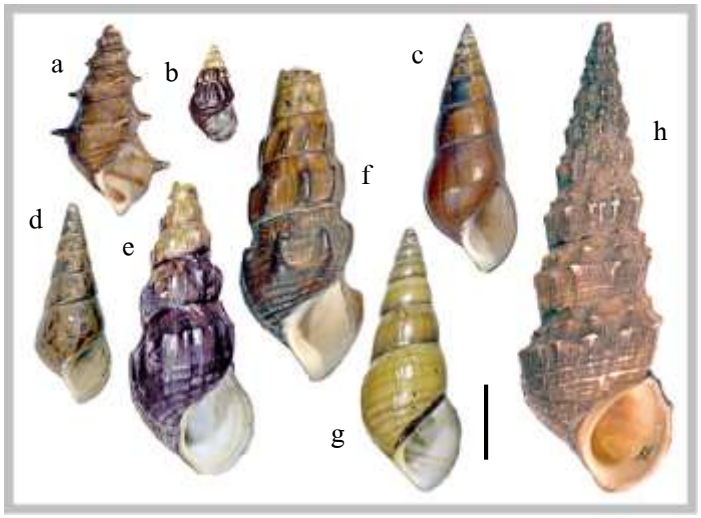
รายงานวิจัย เรื่องที่ 3

รายงานวิจัยเรื่อง สัณฐานวิทยาของเปลือก, การพัฒนาตัวอ่อน, และพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ของหอยน้ำจืดสกุล *Brotia* Adams, 1866 (Cerithioidea, Pachychilidae) ในประเทศไทย: เพื่อตรวจทานความหลากชนิดพันธุ์ และความเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้

บทนำ

หอยในวงศ์ Pachychilidae Troschel, 1857 (Family Pachychilidae) เป็นกลุ่มหอยฝาเดียวที่มีการกระจายชนิดพันธุ์อยู่อย่างหลากหลายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia) จัดอยู่ใน Superfamily Cerithioidea Férussac, 1819 (Glaubrecht, 1996; Lydeard *et al*., 2002; Köhler *et al*., 2004; Köhler & Dames, 2009) ซึ่งหอยเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันแม้ว่าจะอยู่ภายในสกุลเดียวกันก็ตาม เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก (Shell Morphology) การพัฒนาตัวอ่อน (Ontogeny) และชีวโมเลกุล (Molecular DNA) พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล เช่น *Brotia pagodula*, *B. verbecki*, *Sulcospira schmidti*, *S. housei*, *B. sumatrensis*, *B. episcopalis*, *B. citrina*, *Jagora asperata* เป็นต้น (รูปที่ 1)

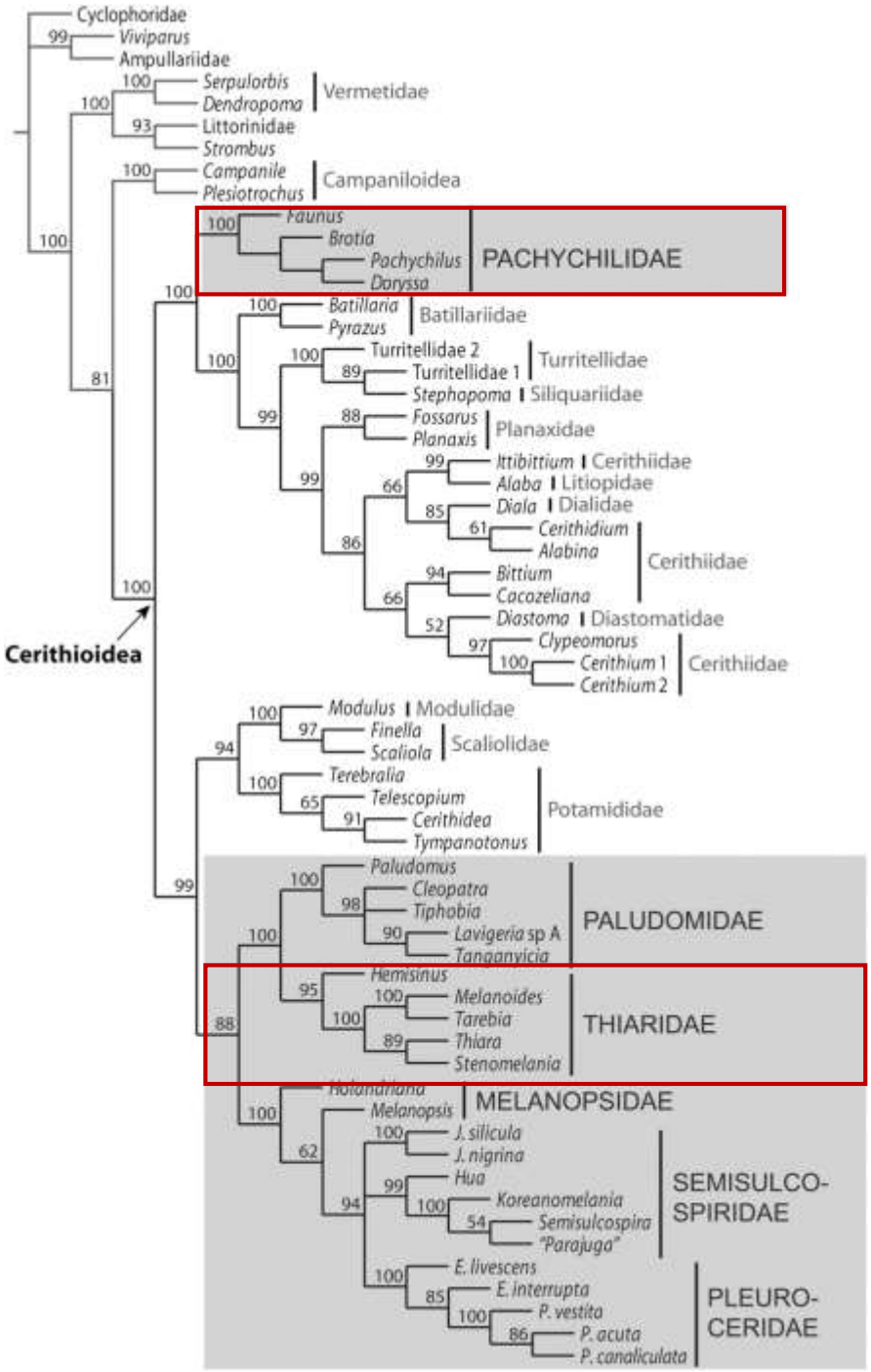


รูปที่ 1 ลักษณะเปลือกหอยในวงศ์ Pachychilidae Troschel, 1867
(a) *Brotia pagodula*; (b) *Brotia verbecki*; (c) *Sulcospira schmidti*;
(d) *Sulcospira housei*; (e) *Brotia sumatrensis*; (f) *Brotia episcopalis*;
(g) *Brotia citrine*; (h) *Jagora asperata* (scale = 1 cm)
(ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:Pachychilidae_shells.jpg)

หอยในวงศ์ Pachychilidae จะมีลักษณะเปลือกทรงกรวย รูปไข่ ขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 20-120 มิลลิเมตร เปลือกมีสีน้ำตาล น้ำตาลแดง หรือน้ำตาลออกดำ สีเขียวมะกอก มีลวดลายบนผิวเปลือก อาจมีหนามตุ่ม อยู่ในแต่ละเวิร์ล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของหอย มีแผ่นปิดปากเปลือกวนเป็นวงต่อกันหลายวง (multispiral) จำนวนเวิร์ลมีประมาณ 8-16 เวิร์ล ปัจจุบันหอยในวงศ์นี้แบ่งออกเป็น 12 genera ดังนี้

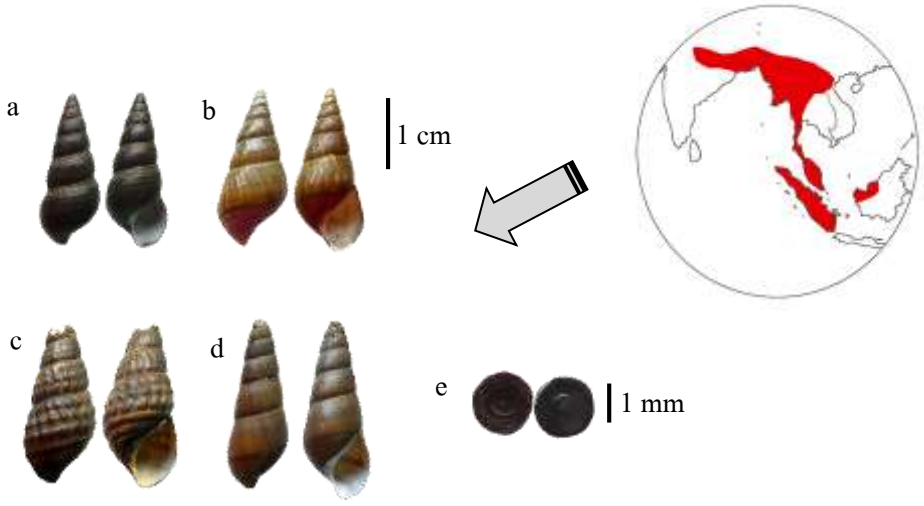
1. *Brotia* Adams, 1866
2. *Doryssa* Swainson, 1840
3. *Faunus* de Montfort, 1810 เฉพาะ *Faunus ater* Linnaeus, 1758
4. *Jagora* Köhler & Glaubrecht, 2003
5. *Madagasikara* Köhler & Glaubrecht, 2010
6. *Melanatria* Bowdich, 1822
7. *Pachychilus* I Lea & HC Lea, 1851
8. *Paracrostoma* Cossmann, 1900
9. *Potadoma* Swainson, 1840
10. *Pseudopotamis* Martens, 1894
11. *Sulcospira* Troschel, 1858
12. *Tylomelania* Sarasin & Sarasin, 1897

ในอดีตหอย *Brotia* Adams, 1866 ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Thiaridae (Family Thiaridae) (Brandt, 1974 เช่นเดียวกันกับหอยในสกุล *Thiara*, *Melanoides*, *Tarebia*, *Semyla*, *Neoradina* เนื่องจาก Brandt (1974) ทำการศึกษาเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ลักษณะเปลือก, สีเปลือก, ลวดลายบนผิวเปลือก, ฝาปิดปากเปลือก) สีรงควัตถุของโครงสร้างลำตัวภายนอก และรูปแบบฟันเท่านั้น ซึ่งเป็นการจัดจำแนกชนิดพันธุ์หอยในเบื้องต้น แต่ในปัจจุบันหอยสกุลนี้ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Pachychilidae (Köhler & Glaubrecht, 2006) โดยอาศัยการจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก (Morphology) ฝาปิดปากเปลือก (Operculum) กายวิภาคศาสตร์ (Anatomy) และชีวโมเลกุล (Molecular Biology) ในการจัดอนุกรมวิธานหอยวงศ์ Pachychilidae ขึ้นมาใหม่ ซึ่งจากรายงานของ Köhler & Glaubrecht (2006) พบว่าหอยกลุ่มนี้แยกออกมาจากวงศ์ Thiaridae อย่างชัดเจนจากผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม โดยใช้ยีนจากไมโทคอนเดรียขนาด 16S และ 28S (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แผนผังการจัดลำดับสายวิวัฒนาการของหอยวงศ์ Pachychilidae และวงศ์ Thiaridae โดยใช้ยีนจากไมโทคอนเดรีย (16S และ 28S) โดยใช้ Bayesian analysis (Strong et al., 2011)

หอยน้ำจืดสกุล *Brotia* เป็นหอยฝาเดียวจัดอยู่ใน Phylum Mollusca, Class Gastropoda, Superfamily Cerithioidea และ Family Pachychilidae ลักษณะที่สำคัญของหอยสกุลนี้คือ เปลือกหอยโดยทั่วไปจะมีรูปร่างยาวรี มีขนาดหนาและใหญ่ ยาวประมาณ 20-75 มิลลิเมตร ผิวเรียบหรือมีสันเป็นเกลียว สันของเปลือกอาจประดับด้วยปุ่มกลมเล็กๆ หรือนาม ส่วนยอดของเปลือกมีลักษณะกร่อน หอยมีปากเปลือกกว้างซึ่งมีรูปร่างคล้ายรูปไข่ และมีแนวการขดวนเป็นวงของเปลือกหอยจะเป็นไปในทิศทางตามเข็มนาฬิกาหรือวนขวา (dextral) ฝาปิดปากเปลือก (operculum) จะมีรูปร่างกลมและวนเป็นวงต่อกันหลายวง (multispiral) (รูปที่ 3) (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538) หอยชนิดนี้ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์จากไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจากตัวผู้ (parthenogenesis) และหอยเพศเมียจะออกลูกเป็นตัว (viviparous) โดยจะมีถุงฟักตัวอ่อนอยู่ภายในด้านบนส่วนหัว และมักอาศัยอยู่ในน้ำไหลที่มีการหมุนเวียนของออกซิเจนได้ดี เช่น บริเวณแม่น้ำหรือในทะเลสาบ พบการแพร่กระจายมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศอินเดีย, พม่า, บังคลาเทศ, ไทย, ลาว, เวียดนาม, จีน, กัมพูชา, มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ลักษณะเปลือก (morphology) และฝาปิดเปลือก (operculum) หอยน้ำจืดจีนัส *Brotia* ในบริเวณแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
(a, b) *Brotia (Brotia) costula costula* (c) *Brotia (Brotia) baccata*
(d) *Brotia (Brotia) citrine* (e) Operculum
(ดวงเดือน ไกรลาศ และคณะ, 2552)
(ที่มา : แผนที่ http://en.wikipedia.org/wiki/File:Brotia_distribution.jpg)

ปัจจุบันหอยสกุล *Brotia* มีการรายงานไว้ทั้งหมด 39 ชนิดพันธุ์ ตามรายงานการอ้างอิงของ Brandt (1974), Klinhom (1989) Glaubrecht & Köhler (2004), Köhler & Glaubrecht (2006), Köhler *et al*. (2010), Köhler & Deein (2010), ดวงเดือน ไกรลาศ และคณะ (2552) (ตารางที่ 1)

ในประเทศไทย Brandt (1974) ได้รายงานการพบ หอยสกุล *Brotia* 14 ชนิดพันธุ์ได้แก่ *Brotia pagodula* Gould, 1847; *B. binodosa binodosa* Blanford, 1903; *B. binodosa subgloriosa* Brandt, 1968; *B. binodosa spiralis* Brandt, 1974; *B. insolita* Brot, 1868; *B. pseudoasperata* Brandt, 1968; *B. baccata* Gould, 1847; *B. citrina* Brot, 1868; *B. manningi*, Brandt, 1968; *B. microsculpta* Brandt, 1968; *B. costula costula* Rafinesque, 1833; *B. varicose costula* Troschel, 1837; *B. costula peninsularis* Brandt, 1974; *B. wykoffi* Brandt, 1974 และมีรายงานหอยสกุล *Paracrostoma* อีก 6 ชนิดพันธุ์ ได้แก่ *Paracrostoma pseudosulcospira pseudosulcospira* Brandt, 1968; *P. pseudosulcospira armata* Brandt, 1968; *P. solemiana* Brandt, 1968; *P. paludiformis paludiformis* Yen, 1939; *P. paludiformis dubiosa* Brandt, 1974; *P. morrisoni* Brandt, 1974 หลังจากนั้น Kohler et al. (2010) ได้ให้ความเห็นไว้ว่าหอยในสกุล *Paracrostoma* ที่ Brandt (1974) ได้รายงานไว้ในประเทศไทยนั้น เป็นสกุล *Brotia* ทั้งหมดโดยได้ทำการศึกษาหอย *Brotia* บริเวณลำน้ำเข็ก จังหวัดพิษณุโลก และเพชรบูรณ์ อย่างไรก็ดีหอยใน genus *Brotia* นี้ ไม่ได้มีรายงานอยู่เพียงลำน้ำเข็ก เท่านั้น ยังมีการรายงานการพบหอย *Brotia* แพร่กระจายพันธุ์ในบริเวณภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทยไว้หลายพื้นที่ เช่น ลุ่มแม่น้ำเข็ก, แม่น้ำแควน้อย, แม่น้ำพอง, และแม่น้ำป่าสัก หอยกลุ่มนี้มีลักษณะที่น่าสนใจ คือ มักพบการแพร่กระจายพันธุ์ในบริเวณสายแม่น้ำย่อย ก่อนสายน้ำเหล่านั้นจะไหลไปรวมกันลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยา ซึ่งช่วยส่งผลให้พบความหลากหลายของชนิดพันธุ์ *Brotia* เพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อตรวจทานชนิดพันธุ์หอย *Brotia* ในประเทศไทยอีกครั้ง ทั้งทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยา, การพัฒนาตัวอ่อน, พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (16S และ 28S) นอกจากนี้ หอย *Brotia* ยังมีรายงานการเป็นโฮสต์กึ่งกลางตัวที่ 1 (First intermediate host) ของพยาธิใบไม้ เช่น การเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิไม้ปอด ในประเทศฟิลิปปินส์ (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538) และ ความสามารถเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้หลายชนิด ของหอย *B. costula*, *B. citina*, *B. wykoffi* ได้แก่ พยาธิใบไม้ *Haplorchis pumilio*, *Acanthatrium hitaense*, *Loxogenoides bicolor*, *Haematoloechus similus*, *Philophthalmus* sp. (ดวงเดือน ไกรลาศ และคณะ, 2552) การตรวจทานชนิดพันธุ์หอย *Brotia* ในครั้งนี้จึงได้ดำเนินการควบคู่ไปกับการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ด้วย

ตารางที่ 1 รายงานการพบหอยสกุล *Brotia* จำนวน 39 ชนิดพันธุ์

	ชนิดพันธุ์	แหล่งอ้างอิง
1.	*Brotia varicosa*	Troschel, 1837
2.	*Brotia annamita*	Köhler *et al*., 2009
3.	*Brotia armata*	Brandt, 1874
4.	*Brotia assamensis*	Nevill, 1885
5.	*Brotia baccata*	Gould, 1847
6.	*Brotia binodosa*	Blanford, 1903
7.	*Brotia boenana*	Brot, 1881
8.	*Brotia borneensis*	Schepman, 1896
9.	*Brotia citrina*	Brot, 1868
10.	*Brotia costula*	Rafinesque, 1833
11.	*Brotia dautzenbergiana*	Köhler & Glaubrecht, 2006
12.	*Brotia episcopalis*	I Lea & HC Lea, 1851
13.	*Brotia godwini*	Brot, 1875
14.	*Brotia herculea*	Gould, 1846
15.	*Brotia hoabinhensis*	Köhler *et al*., 2009
16.	*Brotia indragirica*	von Martens, 1900
17.	*Brotia insolita*	Brot, 1868
18.	*Brotia iravadica*	Blanford, 1869
19.	*Brotia jullieni*	Deshayes, 1874
20.	*Brotia laodelectata*	Köhler, 2008
21.	*Brotia manningi*	Brandt, 1968
22.	*Brotia mariae*	Köhler, 2008
23.	*Brotia microsculpta*	Brandt, 1968
24.	*Brotia pagodula*	Gould, 1847
25.	*Brotia paludiformis*	Solem, 1966
26.	*Brotia peninsularis*	Brandt, 1974
27.	*Brotia persculpta*	Ehrmann, 1922
28.	*Brotia praetermissa*	Köhler & Glaubrecht, 2002

29.	*Brotia pseudoasperata*	Brandt, 1968
30.	*Brotia pseudosulcospira*	Brandt, 1968
31.	*Brotia siamensis*	Brot, 1886
32.	*Brotia solemiana*	Brandt, 1968
33.	*Brotia spinata*	Godwin-Austen, 1872
34.	*Brotia subgloriosa*	Brandt, 1968
35.	*Brotia sumatrensis*	Brot, 1875
36.	*Brotia torquata*	von dem Busch, 1842
37.	*Brotia verbecki*	Brot, 1886
38.	*Brotia wykoffi*	Brandt, 1974
39.	*Brotia yunnanensis*	Köhler, Du & Yang, 2010

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบชนิดพันธุ์หอยสกุล *Brotia* ในประเทศไทย
2. เพื่อตรวจสอบชนิดพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียในหอย สกุล *Brotia* ในประเทศไทย
3. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ขนาดรูปร่าง (geometrics morphometric) กายวิภาคศาสตร์ (anatomy) แรดูลา (radula pattern) การพัฒนาตัวอ่อน (ontogeny) และชีวโมเลกุล (Molecular DNA)
4. เพื่อเปรียบเทียบการจัดลำดับสายวิวัฒนาการหาความสัมพันธ์ของหอยวงศ์ Thiaridae และ Pachychilidae ในประเทศไทยและต่างประเทศ
5. เพื่อส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพให้กับนักสังขวิทยาและเยาวชนรุ่นใหม่ให้มีการสร้างเครือข่ายงานวิจัยกับผู้เชี่ยวชาญในต่างประเทศ

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

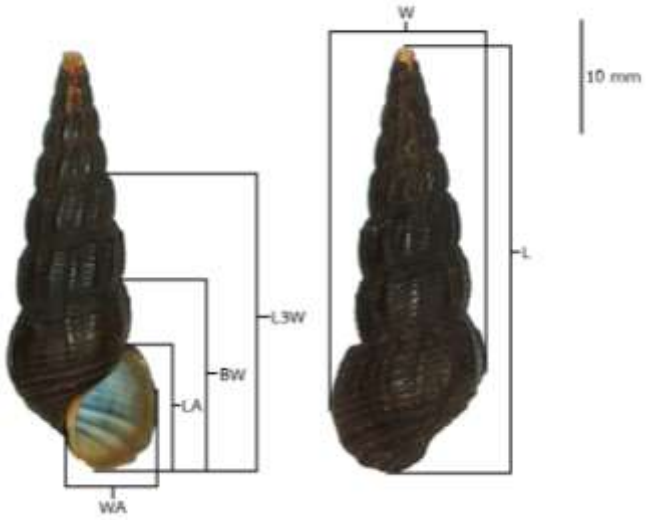
1. รวบรวมหอยน้ำจืดสกุล *Brotia* ในประเทศไทย
   รวบรวมข้อมูลทางด้านการสำรวจหอยน้ำจืดสกุล *Brotia* ที่พบในประเทศไทย จากหน่วยวิจัยปรสิตวิทยาและสังขวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. การเก็บตัวอย่าง
   ผู้เก็บตัวอย่างเดินสุ่มเก็บตัวอย่างหอยด้วยมือ (hand picking) หรือใช้กระชอน (scooping)
3. บันทึกข้อมูลสภาพแวดล้อมในบริเวณจุดสำรวจ
   ศึกษาโดยการวัดค่าพิกัดและวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำในบริเวณจุดสำรวจ ดังนี้
   3.1 วัดค่าพิกัดด้วยเครื่องมือ GPS (Garmin Taiwan, GPS 12 XL) เพื่อบันทึกพิกัดของจุดสำรวจ
   3.2 เก็บข้อมูลสภาพแวดล้อมโดยทั่วไปในบริเวณแหล่งน้ำที่พบหอยน้ำจืดสกุล *Brotia*
   3.3 ทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำของจุดสำรวจ
   3.4 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ
   - วัดอุณหภูมิเหนือน้ำ - ใต้น้ำ
   - วัดความเร็วของกระแสน้ำ โดยใช้ Flow meter (2030 General Oceanic, USA)
   - วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำโดยใช้ pH meter (Water Quality Checker U-10, Japan)

- วัดปริมาณออกซิเจนในน้ำโดยใช้ oxygen meter (Water Quality Checker U-10, Japan)

4. การตรวจหาตัวอ่อนของพยาธิระยะเซอร์คาเรียในหอยด้วยวิธี Shedding
นำหอยใส่ในถ้วยแก้วหรือถ้วยพลาสติกใสที่มีน้ำกรองประมาณครึ่งหนึ่งของถ้วยวางทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาตรวจหาตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก
ศึกษาชนิดพันธุ์ของหอยจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก (shell morphology) โดยนำเปลือกหอยในระยะตัวเต็มวัย (adult snail) มาทำความสะอาด และศึกษาลักษณะต่างๆ ของเปลือกหอย ดังนี้
ศึกษาขนาดของเปลือกโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier caliper) (รูปที่ 4)

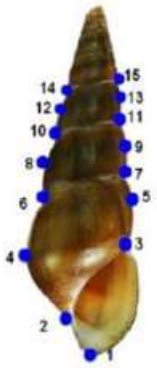
- ความยาวของเปลือก (length of snail, L)
- ความกว้างของเปลือก (width of snail, W)
- ความยาวของปากเปลือกหอย (length of aperture, LA)
- ความกว้างของปากเปลือกหอย (width of aperture, WA)
- ความยาวของบอดีเวิร์ล (body whorl, BW)
- ความยาวของเวิร์ลที่สาม (last three whorl, L3W)
- จำนวนเวิร์ล (number of whorl, N)



รูปที่ 4 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก (Gallego, 2015)
ความยาวของเปลือก (L), ความกว้างของเปลือก (W), ความยาวของปากเปลือกหอย (LA), ความกว้างของปากเปลือกหอย (WA), ความยาวของบอดีเวิร์ล (BW), ความยาวของเวิร์ลที่สาม (L3W) และจำนวนเวิร์ล (N)

6. การวิเคราะห์รูปร่างเปลือกโดยวิธี Geometric Morphometric (GM)

การศึกษา Geometric morphometrics เพื่อจัดจำแนกขนาดรูปร่างของหอยกลุ่มตัวอย่างว่ามีขนาดรูปทรง/รูปร่างที่เหมือนหรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใดในกลุ่มประชากรเดียวกัน (รูปที่ 5) โดยใช้โปรแกรม tpsUTIL, tpsDIG, tpsRlw และ PAST (Hammer et al., 2001; Rohlf, 2010)



รูปที่ 5 การกำหนดจุด Landmark สาหรับเปลือกหอยสกุล *Brotia* spp.

7. การศึกษากายวิภาคหอย (Anatomy)

7.1 นำตัวอย่างหอยที่ยังมีชีวิตอยู่ มาทำการ relax ด้วย 0.1% เมนทอล ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้หอยมีการยืดออกในส่วนของเทนทาเคิล (tentacle, หนวด) ขณะเคลื่อนไหวในน้ำ จะสังเกตเห็นได้โดยหอยจะมีการยืดแผ่นเท้าและหนวดออกมามากกว่าปกติ

7.2 หลังจากนั้นนำหอยมากะเทาะเปลือกออก แล้วศึกษาโครงสร้างลำตัวภายนอก (ส่วนหัว, ส่วนคอ, แผ่นเท้า, และแมนเทิลของหอย) และโครงสร้างลำตัวภายใน (รูปร่าง, ขนาด, การจัดเรียงตัวของอวัยวะภายใน, ระบบทางเดินอาหาร, ระบบขับถ่าย, ระบบสืบพันธุ์) (Davis, 1981; Davis et al., 1985; Houbrick, 1981)

8. การศึกษาลักษณะของฟันหอย (radula) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำหอยมากะเทาะเปลือกแล้วดึงส่วน buccal mass มาทำการศึกษา ดังนี้

- แช่ 10% NaOH 1 คืน
- แยกฟันหอยออกจากเนื้อหอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วย forcep ปลายแหลมขนาดเล็ก
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 5-10 นาที
- แช่ 2% HCl 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 5-10 นาที
- ทำการดึงน้ำออกด้วย 50%, 70%, และ 95% Alcohol ตามลำดับ ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 20 นาที
- ย้อมฟันหอยด้วยสี 4% Eosin Y ใน 95% Alcohol 2-3 นาที
- ล้างสีส่วนเกินด้วย 95% Alcohol และ absolute alcohol ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 20 นาที
- วางฟันหอยลงบน stub แล้ว คลี่ฟันให้กางออกโดยใช้เข็มปักแมลง (Insect pins)

- นำตัวอย่าง code ด้วยทองคำในเครื่อง ion sputter ประมาณ 4 นาที
- ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
- ตรวจสอบจากลักษณะรูปร่างฟันหอย (radula)

9. การศึกษาการเจริญพัฒนาของตัวอ่อน

การศึกษาตัวอ่อนระยะ embryo และ juvenile จากหอยเพศเมีย โดยการนำหอยมากะเทาะเปลือกออก และดูตัวอ่อนที่อยู่ใน brood pouch ซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงหุ้มตัวอ่อนอยู่บริเวณด้านบนส่วนหัว และมีวิธีการศึกษาดังนี้

9.1 การนับจำนวนตัวอ่อนหอย ศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอโดยมีระยะตัวอ่อนที่ทำการศึกษา ดังนี้

- Early embryo
- Late embryo
- Juvenile ขนาด <0.5 mm
- Juvenile ขนาด 0.5-1.0 mm
- Juvenile ขนาด 1.0-1.5 mm
- Juvenile ขนาด 1.5-2.0 mm
- Juvenile ขนาด 2.0-2.5 mm
- Juvenile ขนาด 2.5-3.0 mm
- Juvenile ขนาด >3.0 mm

9.2 การศึกษาตัวอ่อนของหอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

- นำตัวอ่อนระยะ juveniles (6ตัว/1ชนิดพันธุ์) ติดลงบน stub ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- นำไป code ด้วยทองคำในเครื่อง ion sputter ประมาณ 4 นาที
- ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
- ศึกษารูปร่างเปลือก และลวดลายบนเปลือกตัวอ่อน
- วัดขนาดตัวอ่อน โดยวัด protoconch ของเปลือกตัวอ่อน ดังนี้ ความยาวเปลือก (Length, L), ความกว้างเปลือก (Width, W), ส่วนที่กว้างที่สุดของเวิร์ลที่หนึ่ง (maximum diameter at one whorl, D)

10. การศึกษาในลำดับชีวโมเลกุล (Molecular DNA)

10.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเท้าหอย (genomic DNA extraction) ด้วย CTAB buffer

- นำหอยตัวอย่างมากะเทาะเปลือกออก และตัดเนื้อเยื่อเท้าหอยใส่ 1.5 ml microcentrifuge tube ประมาณ 1 มิลลิกรัม
- เติม proteinase K และ 2-mercaptoethanol จากนั้นนำตัวอย่างไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 ºC เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง
- เติมสารผสม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 8,000xg 10 นาที
- ดูดส่วนใสที่ได้ใส่ 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ แล้วเติม Absolute ethanol ในอัตราส่วน 1:2 (ส่วนใสที่ได้: Absolute ethanol) กลับหลอดไปมา

- นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง 12,000 x g 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
- เติม 70% ethanol เพื่อล้างตะกอน DNA นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000xg 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำอีกครั้ง)
- Air dry ตะกอน DNA ให้แห้ง แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย ddH_2O หรือ TE buffer เก็บที่ -20° C จนกว่าจะใช้

10.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 16S ribosomal DNA ยีน (16S) ที่มีขนาด 826 bp และ Cytochrome Oxidase (COI) ยีน ของ mitochondrial DNA ที่มีขนาด 646 bp โดยมีขั้นตอนดังนี้

- เตรียมปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 ml ประกอบไปด้วย 17.8 µl ของ ddH2O, 2.5 µl ของ 10X *Taq* buffer, 1.0 µl ของ 50 mM $MgCl_2$, 0.5 µl ของ 10 mM of dNTPs 1 µl ของ 10mM forward และ reverse primers, 1 µl DNA extract, 0.2 µl ของ 2.5 U *Taq* polymerase
- โดย primers ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ 16SF 5'-CCGCACTTAGTGATAGCTAGTTTC-3' (Wilson et al., 2004) และ H3059-Inv 5'-CGGTYTGAACTCAGATCATGT-3' (Palumbi et al., 1991) สำหรับยีน 16S และใช้ primers LCO 1490 5'-GCTCAACAAATCATAAAGATATT-3' และ HCO2198 var. 5'-TAWACTTCTGGGTGKCCAAARAAAT-3' (Folmer et al., 1994, A. B. Wilson) สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน COI
- การทำปฏิกริยาสายลูกโซ่ที่อุณหภูมิต่อไปนี้

preheat temperature	94°c	3 นาที
denaturing temperature	94°c	0.5 นาที
annealing temperature	40-48°c	1 วินาที
extension temperature	72°c	1.5 นาที
final extension	72°c	5 นาที

10.3 การทำ PCR products ให้บริสุทธิ์

ใช้ NucleoSpin Extract II Kits (Macherey–Nagel, เยอรมนี) ขั้นตอนตามเอกสารที่แนบมาพร้อมกับน้ำยา

10.4 การหาลำดับ DNA ของยีน COI และยีน 16S

ทำการส่ง PCR products ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วแก่บริษัท AITbiotech (AITbiotech Pte Ltd, สิงคโปร์) เพื่อทำการหาลำดับ DNA ของยีน COI และยีน 16S ยีน

10.5 การวิเคราะห์ลำดับสายวิวัฒนาการจากยีน COI และยีน 16S

นำ sequences ของ COI ยีนและ 16S ยีน มาทำการ aligned ด้วย Clustal W algorithm โดยในการวิเคราะห์แต่ละครั้งจะกำหนดค่า 1000 bootstrap วิเคราะห์ลำดับสายวิวัฒนาด้วยวิธี Neighbor joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 และนำ sequences ของ COI ยีนและ 16S ยีน มาทำการ aligned อีกครั้งด้วย MUSCLE algorithm โดยในการวิเคราะห์แต่ละครั้งจะกำหนดค่า 1000 bootstrap วิเคราะห์ลำดับสายวิวัฒนาด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0