BRT 539003

คาริโอไทป์ของหอยหากบกบางชนิดในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน และเขาสอยดาว

นายชนกนต มัธยัสถ์สุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-838-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

An 37

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
ค/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

RECEIVED
23 W.A. 2540

คาริโอไทป์ของหอยทากบกบางชนิดในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน และเขาสอยดาว

นายนฤดล มัธยัสถ์สุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-838-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KARYOTYPE OF SOME LAND PULMONATE SNAILS IN KHAO ANG RUE NAI AND KHAO SOI DAO WILDLIFE SANCTUARIES

Mr.Narudon Mattayassook

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-635-838-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คาริโอไทป์ของหอยทากบกบางชนิดในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขาสอยดาว
โดย	นายนฤดล มัธยัสถ์สุข
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ มีเวที

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ มีเวที)

_____ กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กัมพล อิศรางกูร ณ อยุธยา)

_____ กรรมการ
(ดร.ชวาล ทัพหิกรณ์)

BRT 539003

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นฤดล มัธยัสถ์สุข: คาริโอไทป์ของหอยทากบกบางชนิดในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขาสอยดาว (KARYOTYPE OF SOME LAND PULMONATE SNAILS IN KHAO ANG RUE NAI AND KHAO SOI DAO WILDLIFE SANCTUARIES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สมศักดิ์ ปัญหา อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร.อำนาจ มีเวที , 70 หน้า. ISBN 974-635-838-3

ได้ทำการศึกษาไมโอติกโครโมโซมของหอยทากบก 3 ครอบครัว 8 สปีชีส์จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว โดยเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อ ovotestis โดยเทคนิค warm-drying ผลการศึกษาพบว่าจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมของหอยครอบครัว Ariophantidae มีค่าระหว่าง 16-60 โดยหอยชนิด *Macrochlamys hepbagyla* มีค่า 2n=20 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 5 คู่ ชนิด submetacentric 1 คู่ และชนิด telocentric 4 คู่ หอยชนิด *M. splendens* มีค่า 2n=20 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 8 คู่ และชนิด submetacentric 2 คู่ หอยชนิด *Hemiplecta distincta* มีค่า 2n=60 ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 9 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 21 คู่ หอยชนิด *H. weinkauffiana* มีค่า 2n=58 หอยชนิด *Dyakia salangana* มีค่า 2n=50-54 หอยชนิด *Cryptozona siamensis* มีค่า 2n=16 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 4 คู่ ชนิด submetacentric 1 คู่ ชนิด subtelocentric 1 คู่ และชนิด telocentric 2 คู่ ในครอบครัว Camaenidae ศึกษา 1 สปีชีส์คือ *Amphidromus atricallosus* แบบ A และ B โดยจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมของแบบ A มีค่าเท่ากับ 48 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 5 คู่ ชนิด submetacentric 6 คู่ ชนิด subtelocentric 2 คู่ และชนิด telocentric 11 คู่ ส่วน *A. atricallosus* แบบ B มีค่าดิพพลอยด์ระหว่าง 48-50 ในครอบครัว Achatinidae ศึกษา 1 สปีชีส์คือ *Achatina fulica* มีค่าดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 30 ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 8 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 7 คู่

การศึกษาคาริโอไทป์นั้นทำให้การจำแนกสปีชีส์ของหอยทากบกมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นดังเช่นหอยทากบก *Macrochlamys hepbagyla* และ *M. splendens* ซึ่งมีค่าจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันแต่สามารถจำแนกได้ชัดเจนด้วยคาริโอไทป์ และการศึกษาครั้งนี้พบว่าจำนวนโครโมโซมของหอยทากบกบางสปีชีส์มีค่าแตกต่างจากรายงานที่ผ่าน ๆ มา ได้แก่ครอบครัว Ariophantidae (*Cryptozona siamensis*) ครอบครัว Achatinidae (*Achatina fulica*)

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นฤดล มัธยัสถ์สุข

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C625247: MAJOR ZOOLOGY

KEY WORD : KARYOTYPE / LAND PULMONATE SNAILS / KHAO ANG RUE NAI / KHAO SOI DAO

NARUDON MATTAYASSOOK: KARYOTYPE OF SOME LAND PULMONATE SNAILS IN KHAO ANG RUE NAI AND KHAO SOI DAO WILDLIFE SANCTUARIES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. SOMSAK PANHA. THESIS CO-ADVISER: ASSIST. PROF. DR. UMNAT MEVATEE. 70 pp.

ISBN 974-635-838-3

The meiotic chromosomes from ovotestis of 8 species from 3 families of land pulmonate snails from Khao Ang Rue Nai and Khao Soi Dao wildlife sanctuaries were analyzed using warm-drying techniques. The diploid chromosome numbers of the Family Ariophantidae are between 16-60 (*Macrochlamys hepbagyla*, 2n=20 with 5 metacentric pairs, 1 submetacentric pair and 4 telocentric pairs; *M. splendens*, 2n=20 with 8 metacentric pairs and 2 submetacentric pairs; *Hemiplecta distincta*, 2n=60 with 9 pairs of large chromosomes and 21 pairs of small chromosomes; *H. weinkauffiana*, 2n=58; *Dyakia salangana*, 2n=50-54; *Cryptozona siamensis*, 2n=16 with 4 metacentric pairs, 1 submetacentric pair, 1 subtelocentric pair and 2 telocentric pairs). In Camaenidae, only one species of snail, *Amphidromus atricallosus* types A and B, was investigated. The diploid number of type A is 48 with 5 metacentric pairs, 6 submetacentric pairs, 2 subtelocentric pairs and 11 telocentric pairs while the type B diploid number is in the range of 48-50. In Achatinidae, *Achatina fulica* was studied. The diploid chromosome number is 30 with 8 pairs of large chromosomes and 7 pairs of small chromosomes.

Karyotype analysis can ease the difficulty of snail identification. For example, *Macrochlamys hepbagyla* and *M. splendens*, with the same diploid number, are distinctly discriminated by karyotype. This study found different chromosome numbers for two families [Family Ariophantidae (*Cryptozona siamensis*), Family Achatinidae (*Achatina fulica*)] that reported formerly.

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นายนรดน มัตยัสสุก

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจาย์ ดร.อำนาจ มีเวที อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือ สนับสนุน ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดต่าง ๆ ของการวิจัยตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อเขียนในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.กัมพูล อิศรางกูร ณ อยุธยา และ ดร.ชวาล ทัพหิกรณ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบคุณ อาจารย์ภาควิชาชีววิทยาทุก ๆ ท่านที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้และให้ความเมตตาต่อศิษย์เสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ/สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ BRT 539003) ที่ได้ร่วมให้ทุนในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.ชวาล ทัพหิกรณ์ ส่วนวิจัยสัตว์ป่า กรมป่าไม้ คุณพงษ์ศักดิ์ พลเสนา คุณไสว วังหงษาและคุณณรงค์ คูณขุนทด ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยสัตว์ป่าฉะเชิงเทรา ทุกท่านที่ให้ความสะดวกด้วยดีระหว่างการเก็บตัวอย่างหอยทากบกที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกและให้การต้อนรับด้วยดีระหว่างทำการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณกัมปนาท ธาราภูมิ ที่ช่วยถ่ายภาพในบางส่วน คุณชุติมา มัธยัสถ์สุข คุณพวงผกา แก้วกรมและคุณรังสิมันต์ บัวทอง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้คอมพิวเตอร์

ขอขอบคุณ คุณวิเชฏฐ์ คนซื่อ คุณหนึ่ง บัวพุทธ คุณลำปาง โวเบ้า ตลอดจน พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ อีกหลาย ๆ ท่าน ที่ได้ร่วมเป็นเพื่อนเดินทางในการเก็บตัวอย่างหอยทากบก

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสเข้ามาศึกษาในสถาบันอันเป็นที่รัก ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแห่งนี้

ท้ายสุดนี้ข้าพเจ้าต้องขอขอบคุณ คุณพ่อและคุณแม่ของข้าพเจ้าเองที่ช่วยเป็นกำลังใจและสนับสนุนทางด้านการศึกษาด้วยดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย _____ ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ _____ จ

กิตติกรรมประกาศ _____ ฉ

สารบัญตาราง _____ ช

สารบัญภาพ _____ ฌ

คำย่อ _____ ฎ

บทที่

1. บทนำ _____ 1

2. สอบสวนเอกสาร _____ 3

3. อุปกรณ์และวิธีการศึกษา _____ 12

4. ผลการศึกษา _____ 25

5. อภิปรายผลการศึกษา _____ 58

6. สรุปผลการศึกษา _____ 62

รายการอ้างอิง _____ 64

ประวัติผู้เขียน _____ 70

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 15 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla* (2n=20) _____ 27

2 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 15 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens* (2n=20) _____ 31

3 แสดงค่าเฉลี่ยของความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร จาก 19 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta* (2n=60) ____ 35

4 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 3 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis* (2n=16) _____ 43

5 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 12 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A (2n=48) _____ 47

6 แสดงค่าเฉลี่ยของความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร จาก 17 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากแอฟริกันชนิด *Achatina fulica* (2n=30)___ 55

7 แสดงจำนวนโครโมโซมของหอยทากบกบางชนิดในบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว _____ 57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงแผนที่แสดงที่ตั้งของป่าตะวันออก	11
2	กล่องเลี้ยงหอยทากบกขนาดต่าง ๆ	20
3	แสดงอวัยวะภายในของหอยทากบก	21
4	แสดงการเลี้ยงเซลล์ใน laminar flow hood	22
5	แสดงขวดสำหรับใช้เลี้ยงเซลล์	23
6	แสดงรูปร่างของโครโมโซมแบบต่าง ๆ ซึ่งกำหนดโดยตำแหน่งเซนโทรเมียร์	24
7	หอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla*	25
8	แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla*	26
9	แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla*	26
10	แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla*	28
11	หอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*	29
12	แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*	30
13	แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*	30
14	แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*	32
15	หอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta*	33
16	แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta*	34
17	แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta*	34
18	หอยทากบกชนิด *Hemiplecta weinkauffiana*	37
19	แสดงโครโมโซมระยะ diakinesis ของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta weinkauffiana*	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

20 แสดงโครโมโซมระยะ diakinesis ซึ่งเรียงตามลำดับจากขนาดใหญ่ไปหาขนาดเล็ก ของหอยทากบก *Hemiplecta weinkauffiana* ---------- 38

21 หอยทากบกชนิด *Dyakia salangana* ---------- 39

22 แสดงโครโมโซมระยะ diakinesis ของหอยทากบกชนิด *Dyakia salangana* ---------- 40

23 หอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis* ---------- 41

24 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของ *Cryptozona siamensis* ---------- 42

25 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของ *Cryptozona siamensis* ---------- 42

26 แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis* ---------- 44

27 หอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A ---------- 45

28 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของ *Amphidromus atricallosus* แบบ A ---------- 46

29 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A ---------- 46

30 แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A ---------- 50

31 หอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ B ---------- 51

32 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ B ---------- 52

33 หอยทากแอฟริกันชนิด *Achatina fulica* ---------- 53

34 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากแอฟริกัน *Achatina fulica* ---------- 54

35 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากแอฟริกัน *Achatina fulica* ---------- 54

36 แสดง colony ของเซลล์ที่แบ่งตัวจากเนื้อเยื่อแมนเทิลในขวดเลี้ยงเซลล์ ---------- 56

คำย่อ

ml	=	มิลลิลิตร (millilitre)
m	=	เมตาเซนตริกโครโมโซม (metacentric chromosome)
sm	=	ซับเมตาเซนตริกโครโมโซม (submetacentric chromosome)
st	=	ซับเทโลเซนตริกโครโมโซม (subtelocentric chromosome)
t	=	เทโลเซนตริกโครโมโซม (telocentric chromosome)
LS	=	ความยาวของแขนสั้น (Length of short arm)
LL	=	ความยาวของแขนยาว (Length of long arm)
TL	=	ความยาวของโครโมโซมแต่ละตัว (Total chromosome length)
A.R.	=	อัตราส่วนระหว่างความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาวต่อความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Arm ratio)

บทที่ 1

บทนำ

หอยทากบก (land pulmonate snails) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในไฟลัมมอลลัสกา (Mollusca) ถูกจัดอยู่ในชั้น (Class) หอยฝาเดียว (Gastropoda) ชั้นย่อย (Subclass) หอยมีปอด (Pulmonata) ที่อาศัยอยู่บนบกได้อย่างสมบูรณ์ หอยทากบกเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญมากทั้งในระบบนิเวศ ในทางเศรษฐกิจ ทางการแพทย์และอื่น ๆ อีก มากมาย ในทวีปยุโรปมีการนำหอยทากมาทำเป็นอาหารที่มีชื่อเสียงมาก หอยดังกล่าวมีชื่อทางการค้าว่า "Escargot" เป็นหอยในครอบครัว Helicidae ในประเทศไทยนั้นมีการนำหอยทากบกบางชนิดเข้ามาเพื่อที่จะนำไปใช้เป็นอาหาร โดยทำการวิจัยเพาะเลี้ยงหอยทากแอฟริกัน *Achatina fulica* เพื่อเป็นการค้า (Upatham et al., 1988) และมีการนำหอยทากบกจากยุโรป *Helix aspersa* เข้ามาทำวิจัยเพื่อเพาะเลี้ยงเป็นการค้าเช่นกัน (ธนพันธุ์ ปัทมานนธุ์, 2538)

ในทางการแพทย์พบว่าหอยทากบกบางครอบครัวเป็นโฮสท์กึ่งกลางให้กับพยาธิหลายชนิด เช่น หอยทากบกครอบครัว Succineidae, Zonitidae และ Helicidae เป็นโฮสท์กึ่งกลางให้กับพยาธิใบไม้ที่พบในนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Ever,1964) พยาธิตัวกลม *Angiostrongylus cantonensis* ที่ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดอิโอซิโนฟิลล์สูง มีหอยทากบก *Hemiplecta distincta* เป็นโฮสท์กึ่งกลาง (Panha, 1991)

ในสภาพธรรมชาติหอยทากบกหลายชนิดกินใบพืชตลอดจนเศษซากพืชเป็นอาหาร มีรายงานว่าหอยทากบกหลายชนิดเป็นตัวทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่นในปี พ.ศ.1986 ผลผลิตข้าวโพดทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศฝรั่งเศสกว่าครึ่งถูกทำลายโดยหอยทากบกและทากดิน(slug) (Dussart, 1989) สำหรับในประเทศไทยมีหอยทากแอฟริกัน *Achatina fulica* ถูกนำเข้ามาจากต่างประเทศและเป็นตัวทำลายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานที่น่าสนใจเกี่ยวกับหอยทากบกสปีชีส์ *Hemiplecta distincta* ซึ่งเป็นหอยทากบกที่พบหลายพื้นที่ในประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน หอยชนิดนี้จะกินเห็ดหลายชนิดแม้แต่เห็ดเมาหรือเห็ดพิษเป็นอาหาร (Panha,

1994) ความสำคัญทางนิเวศวิทยาพบว่าในห่วงโซ่อาหารนั้น งูหลายชนิดกินหอยทากบกเป็นอาหาร (Shea, 1994) และจากการศึกษาของ Panha (1996) พบว่านกเงือกกินหอยทากบกเป็นอาหารเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดกินหอยทากบกเป็นอาหาร (Kerney and Cameron,1979) จะเห็นได้ว่าหอยทากบกมีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมเป็นอย่างยิ่ง

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับหอยทากบกในประเทศไทยนั้นมีการศึกษาน้อยมาก ที่ผ่านมาได้แก่งานของ Solem ในปี พ.ศ.1966 รายงานการศึกษาอนุกรมวิธานของหอยทากบกในเขตภาคเหนือและภาคกลางบางจังหวัด พบหอยทากบกถึง 40 สปีชีส์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการสำรวจหอยทากบกในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนของสมศักดิ์และคณะในปี พ.ศ.2537 และการรวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับหอยทากบกของประเทศไทยและศึกษาเพิ่มเติมในปัจจุบัน มีรายงาน พบหอยทากบกทั้งหมด 14 ครอบครัว 136 สปีชีส์ (Panha, 1994; 1996)

หอยทากบกเป็นสัตว์ที่มีความหลากหลายของสปีชีส์สูงมาก จนถึงปัจจุบันนี้มีรายงานว่าพบแล้วมากกว่า 30,000 สปีชีส์ทั่วโลก งานทางด้านอนุกรมวิธานของสัตว์ในกลุ่มนี้นั้นแต่เดิมจะพิจารณาข้อมูลเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของเปลือกและกายวิภาคศาสตร์เป็นส่วนใหญ่ในการจัดจำแนกหอยชนิดต่าง ๆ ทำให้บางครั้งอาจเกิดปัญหาในการจัดจำแนกได้ เพราะว่าหอยทากบกหลายสปีชีส์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก การศึกษาถึงระดับโครโมโซมเป็นสิ่งที่จะช่วยให้งานทางด้านอนุกรมวิธานของหอยทากบกมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยงานทางด้านโครโมโซมของหอยทากบกที่ผ่านมาส่วนใหญ่ผลการศึกษาที่ได้จะทราบเพียงจำนวนโครโมโซมเท่านั้น (Patterson and Burch, 1978) ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มขึ้นและนำไปสู่การศึกษาในระดับคาริโอไทป์ต่อไป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการหาความรู้เกี่ยวกับโครโมโซมของหอยทากบก โดยหอยทากบกที่นำมาศึกษาอยู่ในอันดับ Stylommatophora ซึ่งได้มาจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาวซึ่งอยู่บริเวณรอยต่อ 5 จังหวัด ได้แก่จังหวัดฉะเชิงเทรา สระแก้ว ชลบุรี ระยองและจันทบุรี ผลการศึกษาจะทำให้งานด้านอนุกรมวิธานสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนเป็นข้อมูลสำคัญในเชิงความหลากหลายทางชีวภาพ ที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาด้านอื่นต่อไป

บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

การศึกษาทางด้านโครโมโซมของสัตว์ในไฟลัมมอลลัสกาพบว่าในชั้นหอยฝาเดียวมีการศึกษามากกว่ากลุ่มอื่น เช่น ในรายงานของ Burch et al. (1964) ศึกษาโครโมโซมของหอยในอันดับ Basommatophora จำนวน 10 สปีชีส์ในแหล่งน้ำจืดของญี่ปุ่น ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมอยู่ระหว่าง 32-36 ซึ่งการศึกษาในปีถัดมาโดย Burch and Natarajan (1965) ได้ศึกษาโครโมโซมของหอยน้ำจืดในอันดับ Basommatophora ครอบครัว Lymnaeidae ซึ่งเก็บจากแหล่งน้ำในไต้หวัน ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 32-34

Burch (1965) ได้ศึกษาโครโมโซมของหอยในครอบครัว Ancylidae ชนิด *Ferrisia japonica* จากแหล่งน้ำจืดในประเทศญี่ปุ่น ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 36 ซึ่งจำนวนโครโมโซมที่ได้นี้แตกต่างกันมากกับหอย *F. parallela* และ *F. tarda* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่พบในสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีค่าดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 60

Patterson (1965) ศึกษาโครโมโซมของหอยขม *Tulotoma angulata* ในครอบครัว Viviparidae จากเมืองอลาบามา สหรัฐอเมริกา ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 26 แบ่ง เป็นโครโมโซมชนิด metacentric 3 คู่ ชนิด submetacentric 7 คู่ ชนิด acrocentric 2 คู่ และอีก 1 คู่เป็นโครโมโซมเพศ โดยในเพศผู้เป็น XY ส่วนในเพศเมียเป็น XX

Inaba (1969) ศึกษาโครโมโซมของหอยในครอบครัว Lymnaeidae จำนวน 16 สปีชีส์ จาก 22 แหล่งอาศัยที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาพบแฮพพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 16-19 โดยโครโมโซมที่เตรียมได้ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ diakinesis

Raghunathan(1976) ศึกษาโครโมโซมของหอยขด *Biomphalaria grabrata* ซึ่งเป็นโฮสท์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้ในเลือด *Schistosoma mansoni* ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์

โครโมโซมเท่ากับ 36 เมื่อนำมาจัดคาริโอไทป์ ได้เป็นโครโมโซมชนิด metacentric 10 คู่ ชนิด submetacentric 4 คู่ ชนิด acrocentric 2 คู่ และชนิด telocentric 2 คู่

Vitturi et al. (1986) ศึกษาโครโมโซมของหอยฝาเดียวใน Superfamily Littorinoidea 3 สปีชีส์จากอิตาลี ผลการศึกษาพบจำนวนแฮพพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 13 ถึง 16 ซึ่งโครโมโซมส่วนใหญ่อยู่ในระยะ diakinesis

Komatsu (1988) ศึกษาโครโมโซมของหอยนมสาว *Omphalius rustious* ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 36 และเมื่อนำมาจัดคาริโอไทป์ จะเป็นโครโมโซมชนิด metacentric 11 คู่ ชนิด submetacentric 6 คู่ และชนิด subtelocentric 1 คู่

Thiriot-Quievreux (1988) ศึกษาโครโมโซมของหอยฝาเดียวในชั้นย่อย (subclass) opisthobranchia บางชนิดจากทะเลเมดิเตอริเนียน ประเทศฝรั่งเศส ผลการศึกษาพบว่า 7 สปีชีส์ในอันดับ Thecosomata มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมอยู่ระหว่าง 20-34 และอันดับ Gymnosomata จำนวน 2 สปีชีส์ มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 32

Vitturi et al. (1988) ศึกษาโครโมโซมในครอบครัว Littorinidae ของหอยชนิด *Littorina neritoides* จากแหล่งน้ำในประเทศอิตาลี ผลการศึกษาในเพศผู้พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 33 โดยโครโมโซมเพศคือคู่ที่ 17 เป็น XO เมื่อนำมาจัดคาริโอไทป์จะเป็นโครโมโซมชนิด metacentric 10 คู่ ชนิด submetacentric 3 คู่ ชนิด subtelocentric 3 คู่ และชนิด acrocentric 1 คู่

Birstein and Mikhailova (1990) ศึกษาโครโมโซมของหอยในครอบครัว Littoirinidae ชนิด *Littorina saxatilis* บริเวณคาบสมุทรโคล่าในรัสเซีย ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 34 เช่นเดียวกับที่ศึกษากันในอังกฤษและสวีเดน (Janson, 1983)

Park (1994) ศึกษาโครโมโซมของหอยฝาเดียวที่อยู่ในแหล่งน้ำจืดของเกาหลีจำนวน 3 ครอบครัว ได้แก่ Pleuroceridae 8 สปีชีส์ Bithyniidae 1 สปีชีส์ Physidae 1 สปีชีส์ และ Planorbidae 1 สปีชีส์ ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าอยู่ระหว่าง 34-38

Vitturi et al. (1995) ศึกษาโครโมโซมของหอยในครอบครัว Littoirinidae สกุล *Littorina*

ผลการศึกษาพบว่า *Littorina saxatilis* และ *L. (Melaraphe) punctata* จากทะเลเมดิเตอริเนียนมีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 34 แต่คาริโอไทป์มีความแตกต่างกัน ส่วน *L. neritoides* ซึ่งเก็บจากทะเลสาบเมืองเวนิช ประเทศอิตาลี พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 33 เช่นเดียวกับในรายงานของ Vitturi et al. (1988)

ในกลุ่มหอย 2 ฝา มีการศึกษาโครโมโซมในหลายกลุ่มที่น่าสนใจ เช่น ในพวกหอยแมลงภู่ *Mytilus edulis* มีการศึกษาโครโมโซมของหอยสปีชีส์นี้ซึ่งเก็บจากแหล่งน้ำหลาย ๆแห่งทั่วโลก พบว่ามีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 28 เช่นเดียวกับในงานที่ศึกษาในสหรัฐอเมริกา โดย Ahmed and Sparks (1970) ศึกษาในญี่ปุ่นโดย Ieyama and Inaba (1974) และที่ศึกษาในไอร์แลนด์โดย Moynihan and Mahon (1983)

งานทางด้านอนุกรมวิธานบางครั้งต้องการข้อมูลถึงระดับคาริโอไทป์ เช่น Ahmed and Spark (1970) พบว่าจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมของหอยแมลงภู่ *Mytilus edulis* และ *M. californianus* มีค่าเท่ากับ 28 เหมือนกัน แต่เมื่อศึกษาถึงระดับคาริโอไทป์แล้ว พบว่า 2 สปีชีส์นี้มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

Wada (1978) ศึกษาโครโมโซมของหอย 2 ฝา จำนวน 3 สปีชีส์ในอันดับ Pterioida ผลการศึกษา พบว่าหอยในครอบครัว Isognomonidae ชนิด *Isognomon alatus* และหอยในครอบครัว Pteriidae ชนิด *Pinctada imbricata* ซึ่งทั้ง 2 สปีชีส์นี้จากฟลอริดามีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 28 แต่คาริโอไทป์มีความแตกต่างกัน ส่วนหอยในครอบครัว Pectinidae ชนิด *Argopecten irradians irradians* ซึ่งเก็บจาก Long Island นิวยอร์ค มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 32

Vitturi et al. (1983) ศึกษาโครโมโซมหอยในครอบครัว Teredinidae ชนิดหอยไชไม้ *Teredo utriculus* ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 38 นำมาจัดคาริโอไทป์ได้เป็นโครโมโซมชนิด metacentric 3 คู่ ชนิด subtelocentric 2 คู่ และชนิด telocentric 14 คู่

Borsa and Thiriot-Quievreux (1990) ศึกษาโครโมโซมของหอย 2 ฝา จำนวน 3 สปีชีส์ ในครอบครัว Veneridae สกุล *Ruditapes* จากทะเลเมดิเตอริเนียน พบว่าทั้ง 3 สปีชีส์คือ *Ruditapes philippinarum, R. aureus* และ *R.decussatus* มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 38 แต่มี

คาริโอไทป์ต่างกัน

Cornet and Soulard (1990) ศึกษาโครโมโซมของหอยเสียบ *Donax trunculus* ในครอบครัว Donacidae จากถิ่นอาศัยบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแอตแลนติค ประเทศฝรั่งเศส ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 38

Insua and Thirot-Quievreux (1991) ศึกษาโครโมโซมของหอยนางรม *Ostrea denselamellosa* ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 นำมาจัดคาริโอไทป์ได้เป็น โครโมโซมชนิด metacentric 7 คู่ และชนิด submetacentric 3 คู่

Thiriot-Quievreux et al.(1991) ศึกษาโครโมโซมของหอย 2 ฝา จำนวน 5 สปีชีส์ จากถิ่นอาศัย บริเวณอ่าว Morbihan หมู่เกาะ Kerguelen ผลการศึกษาพบว่าในครอบครัว Malletiidae หอยชนิด *Malletia gigantea* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 38 เป็นโครโมโซมชนิด metacentric 6 คู่ ชนิด submetacentric 7 คู่ ชนิด subtelocentric 5 คู่ และชนิด telocentric 1 คู่ ในครอบครัว Yoldidae หอยชนิด *Yoldia (Aequiyoldia) woodwardi* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 38 เป็นโครโมโซมชนิด metacentric 10 คู่ ชนิด submetacentric 6 คู่ และชนิด subtelocentric 3 คู่ ในครอบครัว Limidae หอยชนิด *Limatula pygmaea* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 38 เป็นชนิด metacentric 6 คู่ ชนิด submetacentric 11 คู่ และชนิด subtelocentric 2 คู่ ในครอบครัว Carditidae หอยชนิด *Cyclocardia asturtoides* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 30 เป็นชนิด metacentric 5 คู่ และชนิด telocentric 10 คู่ ในครอบครัว Laternulidae หอยชนิด *Laternula elliptica* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 40 เป็นชนิด metacentric 2 คู่ ชนิด submetacentric 1 คู่ ชนิด subtelocentric 2 คู่ และชนิด telocentric 15 คู่

ในเรื่องของเทคนิคในการศึกษาโครโมโซมของหอยทากบกเริ่มเป็นที่สนใจกันตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 (Patterson and Burch, 1978) ในกลุ่มหอยทากบกนั้นในระยะเริ่มแรกนั้นจะศึกษาโครโมโซมโดยการทำ paraffin section เป็นการนำเอาเนื้อเยื่อมาตัดให้บางมาก ๆ และศึกษาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่วิธีการเช่นนี้มีข้อเสียเพราะโครโมโซมอาจถูกตัดขาดทำให้ผลที่ศึกษาอาจผิดพลาดได้ ต่อมาได้มีการศึกษาโครโมโซมโดยใช้เทคนิคการบี้ (squash technique) เป็นการกดเซลล์ทำให้เซลล์อยู่ในลักษณะแบนราบและโครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน นอกจากนี้แรงกดยังทำให้โครโมโซมกระจายจากกันง่ายต่อการนับจำนวน ในเวลาเดียวกันนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค

โดยใช้สาร colchicine สารดังกล่าวเป็นพวกอัลคาลอยด์ชนิดหนึ่ง สารนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fiber โดยที่โมเลกุลของสารดังกล่าวจะไปอุดตามปลายท่อต่าง ๆ ของ microtubule ภายในเซลล์ ทำให้ microtubule ไม่สามารถต่อกันเป็นสายใย spindle ในการช่วยดึงโครโมโซมในระยะเมตาเฟสให้แยกออกจากกันได้ทำให้เตรียมโครโมโซมได้ดีขึ้น มีผลทำให้สะดวกต่อการศึกษาโครโมโซม นอกจากสาร colchicine แล้วยังมีสารตัวอื่นที่นิยมใช้เป็นสารยับยั้งการสร้าง spindle fiber ได้แก่ velban และ colcemide เป็นต้น อย่างไรก็ตามการนับจำนวนโครโมโซมก็ยังมีปัญหาเพราะการกระจายของโครโมโซมในระยะเมตาเฟสที่เตรียมได้ยังไม่ดี ในหอยสปีชีส์ที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยจะนับได้ถูกต้อง แต่ถ้ามีจำนวนโครโมโซมมาก ๆ เช่น ในหอยทากบกบางสปีชีส์มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมากกว่า 80 การนับจำนวนอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ นอกจากนี้ยังมีปัญหาอื่น ๆ ประกอบอีก เช่น การเลือกเนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษา การใช้สารละลาย hypotonic ที่มีผลให้เซลล์ขยายตัวทำให้เซลล์แตกและเตรียมเมตาเฟสโครโมโซมได้ดียิ่งขึ้น ปัจจุบันวิธีการเลี้ยงเซลล์ก็เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถเตรียมได้เมตาเฟสโครโมโซมตามที่ต้องการ

งานด้านโครโมโซมของหอยทากบกที่น่าสนใจ เช่น Patterson and Burch (1966) ได้ศึกษา chromosome cycle ในกลุ่มหอยทากบก โดยเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อ ovotestis ของหอยทาก *Catinella vermeta* จากเมืองมิชิแกน สหรัฐอเมริกา หอยทากสปีชีส์นี้มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมต่ำคือมีค่าเท่ากับ 12 ผลการศึกษาพบว่า chromosome cycle ของหอยทากบกไม่ต่างจากของสัตว์อื่น ๆ

Butot and Kiauta (1967) ศึกษาโครโมโซมของหอยทากในครอบครัว Succineidae ชนิด *Catinella arenaria* ของประเทศอังกฤษ พบว่ามีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 12

Kiauta and Butot (1968) ศึกษาโครโมโซมของหอยทากในครอบครัว Succineidae *Succinea (Succinella) oblonga* พบว่ามีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 24

Patterson and Burch(1978) ได้รวบรวมงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโครโมโซมของหอยทากบกอันดับ Stylommatophora ซึ่งเป็นอันดับของหอยทากบกทั้งหมด จำนวน 35 ครอบครัว ผลการศึกษาพบว่าโครโมโซมที่เตรียมได้ส่วนใหญ่จะมีค่าดิพพลอยด์โครโมโซมอยู่ระหว่าง 10-88 ซึ่งผลการศึกษาในหลายกลุ่มที่น่าสนใจมีดังนี้ใน suborder Heterurethra ครอบครัว Succineidae

จำนวน 48 สปีชีส์ พบดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 10-50

ในครอบครัว Anthoraccophoridae พบว่าหอยทากบกในสกุล *Aneitea* และ*Triboniophorus* เป็นหอยที่มีจำนวนโครโมโซมสูงสุดในกลุ่มหอยทากบกเท่าที่มีรายงานจนถึงปัจจุบันคือมีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 88 ใน suborder Orthurethra จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมของ 4 สปีชีส์ ในครอบครัว Achatinellidae มีค่าระหว่าง 40-46 ครอบครัว Chondrinidae จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 60 ส่วนในครอบครัว Enidae, Cionellidae, Pyramidulidae, Valloniidae และ Partulidae มีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมอยู่ระหว่าง 48-58 ใน suborder Mesurethra ที่มีการศึกษาโครโมโซมแล้ว 3 ครอบครัว พบว่าจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 48-64 ใน suborder Sigmurethra จากที่มีการศึกษาแล้วพบจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 40-68 ซึ่งมีหลายครอบครัวที่น่าสนใจดังนี้ ครอบครัว Arionidae จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 50-58 ในกลุ่มพวกทากดิน (land slugs) ครอบครัว Limacidae จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 48-62 ส่วนในครอบครัว Milacidae จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 66-68 ครอบครัว Zonitidae จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 56-60 ยกเว้นหอยทากบกในสปีชีส์ *Vitrea diaphana* ซึ่งมีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 40 ในครอบครัว Ariophantidae จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 50-64 ใน infraorder Holopoda ครอบครัว Polygyridae มีการศึกษาโครโมโซมแล้วทั้งหมด 20 สปีชีส์ พบว่าจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 52-62 ครอบครัว Camaenidae มีการศึกษาโครโมโซมแล้ว 30 สปีชีส์ จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่า ระหว่าง 54-58 และในครอบครัว Helicidae จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 42-62

Ramos and Aparicio (1985) ศึกษาโครโมโซมของหอยทากบกครอบครัว Helicidae จำนวน 11 สปีชีส์ ของประเทศสเปนและโปรตุเกส ผลการศึกษาพบจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 42-60

Kawano and Leme (1994) ศึกษาโครโมโซมของหอยทากบก 3 สปีชีส์ ในครอบครัว Megalobulimidae ของประเทศบราซิล ซึ่งอยู่ในสกุล *Megalobulimus* ผลการศึกษาพบว่าหอยทากบกทั้ง 3 สปีชีส์ คือ *Megalobulimus paranaguensis*, *M. granulosus* และ *M. oblongus* มีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 62 แต่ชนิดของโครโมโซมแต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างกัน

ในประเทศไทยงานด้านการศึกษาโครโมโซมของสัตว์ในไฟลัมมอลลัสกายังมีน้อยมาก จากการตรวจสอบเอกสารพบว่ามีเพียงงานของกลุ่มวิจัยหอยทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งทำในกลุ่มหอย 2 ฝา ได้แก่งานของ กตัญญู รักมิตร (2535) ที่ศึกษาโครโมโซมของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis ovina* ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 32 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 8 คู่ ชนิด ชนิด submetacentric 6 คู่ ชนิด acrocentric 1 คู่ และชนิด telocentric 1 คู่ วิชุวรรณ ตั้งพงศ์ปราชญ์ (2536) ศึกษาโครโมโซมของหอยในกลุ่มหอยนางรม 3 สปีชีส์ คือ หอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*, หอยตะโกรมกรามดำ *Crassostrea lugubris* และหอยตะโกรมกรามขาว *C. belcheri* ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 20 แท่ง เป็นชนิด metacentric 4 คู่ และชนิด submetacentric 6 คู่ เหมือนกันทั้ง 3 สปีชีส์ และงานของ ปวีณา ชูชื่น (2538) ศึกษาโครโมโซมของหอยมือเสือ *Tridacna squamosa* ผลการศึกษาพบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 36 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 2 คู่ ชนิด submetacentric 14 คู่ และชนิด telocentric 2 คู่ สำหรับโครโมโซมของหอยทากบกในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดเคยศึกษามาก่อน

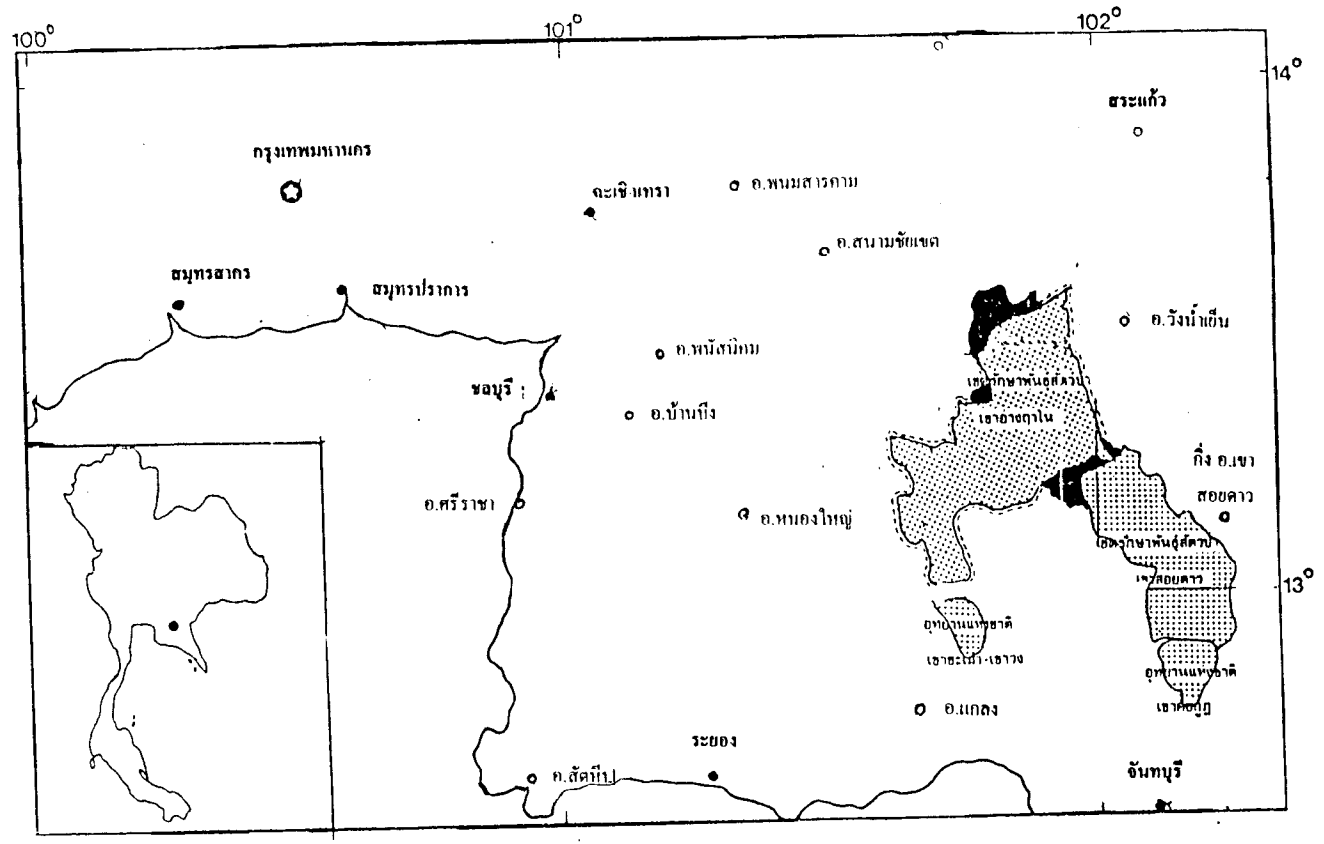
การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างหอยทากบกจากบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาวซึ่งทั้ง 2 แห่งนี้อยู่ในบริเวณเขตป่ารอยต่อ 5 จังหวัด (ดังรูปที่ 1)

ป่ารอยต่อ 5 จังหวัด มีเนื้อที่ประมาณ 600,000 กว่าไร่ครอบคลุมอาณาเขตในบางส่วนของจังหวัดสระแก้ว ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง และจันทบุรี เป็นป่าดงดิบลุ่มต่ำผืนสุดท้ายของประเทศไทย พื้นที่ส่วนใหญ่มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 30-150 เมตร สามารถจำแนกป่าที่พบในบริเวณนี้ได้ 4 ประเภทคือ ป่าดิบแล้ง (dry-evergreen forest) ป่าดงดิบชื้น (moist-evergreen forest) ป่าเบญจพรรณชื้น (moist mixed decidous forest) และป่าเต็งรัง (dyr-dipterocarp forest) โดยพื้นที่ประมาณ 95 % ของพื้นที่ป่าทั้งหมดเป็นป่าดิบแล้ง (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2536)

เขตป่ารอยต่อ 5 จังหวัด เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของแหล่งที่อยู่อาศัยสูงแหล่งหนึ่ง มีลักษณะพื้นที่ทั้งที่เป็นป่า ทุ่งหญ้า เป็นแหล่งต้นน้ำที่สำคัญของภาคตะวันออกคือ แม่น้ำบางปะกง ในด้านภูมิอากาศนั้น เขตป่ารอยต่อ 5 จังหวัดจะมีลักษณะภูมิอากาศแบบสะวันนา (savanna climate) ทางตะวันตกของพื้นที่ โดยบริเวณนี้จะมีอุณหภูมิสูงเกือบตลอดปี โดยมีความ

แตกต่างระหว่างฤดูต่าง ๆ อย่างชัดเจนซึ่งในบริเวณนี้จะมีปริมาณน้ำฝนน้อย ส่วนบริเวณทางด้านตะวันออกของเขตป่ารอยต่อ 5 จังหวัด ลักษณะภูมิอากาศจะเป็นแบบมรสุมเขตร้อนจากการที่ได้รับอิทธิพลของลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งพัดพาความชื้นจากทะเลจีนใต้ และลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ซึ่งพัดพาความชื้นจากอ่าวไทย ทำให้มีลักษณะชุ่มชื้นคล้ายภาคใต้ของประเทศ บริเวณนี้จึงมีความหลากหลายของสปีชีส์สูงทั้งพืชและสัตว์

ที่ผ่านมาพื้นที่แห่งนี้ได้มีการสำรวจข้อมูลความหลากหลายของสัตว์ในกลุ่มต่าง ๆ พบว่ามีสัตว์อาศัยอยู่ 104 ครอบครัว (families) 255 สกุล (genera) 346 ชนิด (species) แยกเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 57 ชนิด นก 201 ชนิด สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) 17ชนิด สัตว์เลื้อยคลาน 48 ชนิด และปลา 24 ชนิด แต่ข้อมูลของสัตว์ในกลุ่มหอยยังไม่มีผู้ใดเคยศึกษามาก่อน



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงที่ตั้งป่าตะวันออก (ดัดแปลงจาก พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2536)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ก.อุปกรณ์เกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างหอยทากบก

1.กล่องเลี้ยงหอยขนาดต่าง ๆ (ดังภาพที่ 2) ซึ่งกล่องทุกใบจะทำการเจาะรูเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก

2.อาหารที่ใช้เลี้ยงหอยทากบก ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง มะเขือเทศ มะเขือยาว มันเทศ เห็ดนางฟ้า

ข.อุปกรณ์และสารเคมีเกี่ยวกับการศึกษาและเตรียมโครโมโซม

1.สัตว์ที่นำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่หอยทากบกในอันดับ Stylommatophora ซึ่งเก็บจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2537-เดือนกรกฎาคม 2539

2.อุปกรณ์

- บีกเกอร์ขนาดปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- syringe ขนาดปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- slide และ cover glass
- เครื่องมือผ่าตัด
- coplin jar
- ขวดสำหรับดองสัตว์
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร
- AUTOFLOW CO_2 Water-Jacked Incubator
- Hot air oven
- Laminar Flow Hood
- Phase contrast microscope

- light microscope
- Centrifuge
- filter pore size 0.22 micrometers
- pasteur pipette

3.สารเคมี

- สารละลาย colcemide 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Seromed)
- 0.075 M KCl
- สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9%
- Phosphate buffer pH = 7.0
- สี Giemsa (MERCK)
- Weise buffer pH 7.0
- เมธานอล
- เอธานอล
- Glacial acetic acid
- สารละลาย RPMI 1640 (Seromed)
- สารละลาย colchicine 0.01% (Fluka)
- สารละลาย trypsin 0.025%
- สารละลาย HAM F10 (Sigma)
- fetal calf serum (Seromed)
- Streptomycin
- Ampicilin
- Kanamycin
- โซเดียมไบคาร์บอเนต

4.อุปกรณ์ที่เกี่ยวกับการถ่ายภาพ

- กล้องถ่ายรูปชนิดเลนส์เดี่ยวพร้อมเลนซ์ซูม
- กล้องถ่ายรูปชนิดติดกับกล้องจุลทรรศน์
- ฟิล์มสไลด์ ISO 100
- ฟิล์ม negative 100
- เครื่องคอมพิวเตอร์โปรแกรม IKAROS 3 Karyotyping ของ Carl Zeiss

การดำเนินการทดลองแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

ก. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างหอยทากบกในบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2537- กรกฎาคม 2539 โดยทำการเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่ในฤดูฝนทั้งเวลากลางวันและกลางคืน บริเวณบนต้นไม้ ตามพื้นดิน ใต้ใบไม้ เปลือกไม้ ตามซอกหิน ตามโพรงดิน โดยจะเก็บหอยทากบกที่พบชนิดละประมาณ 20 ตัว

ข. ขั้นตอนการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์(Identification)

นำหอยทากบกที่เก็บได้มาตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์โดยใช้เอกสารต่อไปนี้ คือ

- Solem (1966)
- Abbott (1989)
- Panha (1996)
- Panha and Thanamitramanee (1997)

นอกจากนั้นหอยทากบกบางสปีชีส์จำแนกโดยรองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา เนื่องจากยังไม่มีเอกสารการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยทากบกในประเทศไทยฉบับใดที่สมบูรณ์

ค. ขั้นตอนการศึกษาโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมในครั้งนี้ศึกษาจากเนื้อเยื่อ ovotestis และ เนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle) โดยผ่านกระบวนการเลี้ยงเซลล์ก่อนเพื่อให้เซลล์มีโอกาสอยู่ในสารละลาย colchicine นานขึ้น ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Mevatee(1975), Raghunathan(1976) และ Park(1994) ดังนี้

-<u>วิธีการเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์</u>

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ สารละลาย RPMI 1640 จำนวน 80 มิลลิลิตร ผสมกับ Fetal calf serum 20 มิลลิลิตร และน้ำยาที่ใช้ล้างเซลล์คือสารละลาย HAM F10 ซึ่งส่วน

ประกอบของน้ำยาเลี้ยงเซลล์และน้ำยาล้างเซลล์นี้ต้องเตรียมโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

สารละลาย RPMI 1640 เตรียมโดยละลายผงสำเร็จรูป RPMI 1640 น้ำหนัก 10.4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate) 2 กรัม เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) 0.03 กรัม และ สเตร็บโตมัยซิน (Streptomycin) 0.1 กรัม กรองน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ด้วย Sterile filter ขนาด 0.22 ไมครอน แยกบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ ขวดละ 80 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมกานามัยซินลงไป 0.1 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

Fetal calf serum แยกจากขวดใหญ่มาบรรจุใส่ขวดเล็กที่ปราศจากเชื้อ ขวดละ 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

สารละลาย HAM F10 เตรียมโดยละลายผงสำเร็จรูป HAM F10 น้ำหนัก 9.8 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate) 2 กรัม เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) 0.03 กรัม และสเตร็บโตมัยซิน (Streptomycin) 0.1 กรัม กรองสารละลาย HAM F10 ที่เตรียมได้ด้วย Sterile filter ขนาด 0.22 ไมครอน แยกบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อขวดละ 100 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมกานามัยซินลงไป 0.2 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

กานามัยซิน (Kanamycin) ละลายผงกานามัยซิน 1 ขวด ขนาดบรรจุ 1 กรัม ด้วยสารละลาย RPMI 1640 จำนวน 10 มิลลิลิตร เป็น stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^0C แล้วเตรียมเป็น working solution โดยใช้ stock solution 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย RPMI 1640 จำนวน 9 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^0C

-วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเตรียมโครโมโซม

สารละลาย colchicine 0.01% เตรียมได้โดยชั่ง colchicine ผงน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

สารละลาย colcemide 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้จาก stock solution

สารละลาย trypsin 0.025% เตรียมได้โดย เตรียมเป็น stock โดยชั่ง trypsin 3 กรัม ละลายในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9% ปริมาณ 120 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 2.5% และทำการเจือจาง 2.5% trypsin ให้เป็น 0.025% trypsin ด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9% โดยใช้สูตร $m_1v_1 = m_2v_2$

เมื่อ m_1 = ความเข้มข้นของ stock นั่นคือ 2.5% trypsin

v_1 = ปริมาตรของ stock 2.5% trypsin (มิลลิลิตร)

m_2 = ความเข้มข้นที่ต้องการ นั่นคือ 0.025% trypsin

v_2 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ที่ใช้ในการเจือจาง (มิลลิลิตร)

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% เตรียมได้โดย ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย Phosphate buffer pH 7.0 เตรียมได้โดยละลายสารเคมีดังต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4 (anhydrous)	0.92	กรัม
KH_2PO_4 (anhydrous)	0.2	กรัม

สารละลาย Hypotonic solution 0.075 M KCl เตรียมได้โดยละลายผง KCl 5.62 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย Carnoy' s fixative เตรียมได้โดยผสม absolute methanol กับ glacial acetic acid ด้วยอัตราส่วน 3:1 และอัตราส่วน 2:1 เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C

-การเตรียมสารละลายที่ใช้ย้อมโครโมโซม

สารละลาย Weise buffer pH 7.0 เตรียมได้โดยละลายสารเคมีต่อไปนี้ ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

KH_2PO_4	0.49	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1.14	กรัม

Giemsa 10% เตรียมได้โดยใช้สี Giemsa stock solution 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Weise buffer pH 7.0 จำนวน 45 มิลลิลิตร ใน coplin jar.

-การเลี้ยงเซลล์

ทำการกระเทาะเปลือกหอย หลังจากนั้นตัดเนื้อเยื่อ ovotestis และเนื้อเยื่อแมนเทิล มาล้างด้วยสารละลาย HAM F10 และใช้กรรไกตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี medium เป็น RPMI 1640 และ 20% fetal calf serum และ antibiotics หลังจากนั้นนำไปใส่ตู้ที่ปรับอุณหภูมิ 30°C

การเตรียมโครโมโซม

เติม 0.5-1.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย colchicine 0.01% หรือ 80-300 ไมโครลิตรของสารละลาย colcemide (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ในชั่วโมงที่ 10 และนำไปเข้าตู้ที่ปรับอุณหภูมิ 30°C เช่นเดิม หลังจากนั้น 45 นาทีถึง 15 ชั่วโมง ดูดเอา medium ที่ เลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ใส่สารละลาย trypsin 0.025% ลงไปให้ท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลาย trypsin ออก นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปเข้าตู้อบที่ปรับอุณหภูมิ 37 °C อีก 10 นาที ช่วงนี้เซลล์จะเริ่มแยกกันและหลุด จากพื้น ขวด หลังจากนำขวดเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้อบ เติมสารละลาย HAM F10 ประมาณ 5 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ออกจากขวดให้หมดและนำไปใส่หลอดแก้วที่เตรียมไว้แล้วนำไปผ่านขั้นตอนดังนี้

1. นำไปปั่นที่ประมาณ 1000 รอบ/นาที นาน 8-10 นาที แล้วดูดเอาส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป เหลือส่วนล่างทิ้งไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร (การปั่นในขั้นตอนต่อ ๆ ไปทำเหมือนข้อ 1)

2. เติม 0.025% ของสารละลาย trypsin 1 มิลลิลิตร และสารละลาย phosphate buffer 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนของตะกอน นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที

3. นำออกจากตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C มาปั่น แล้วดูดเอาส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลาย phosphate buffer 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เหลือ นำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไป เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร

5. เติม 0.075 M KCl (เป็น hypotonic solution) 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เหลือ นำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ 1.5 มิลลิลิตร

6. ทำซ้ำข้อ 5

7. เติม 0.075 M KCl 4 มิลลิลิตร อีกครั้ง ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนตะกอน นำไปเข้าตู้อบที่อุณภูมิ 37°C เป็นเวลาตั้งแต่ 45 นาที ถึง 3 ชั่วโมง 50 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร

8. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 3:1(methanol 3 ส่วน : acetic acid 1 ส่วน) ซึ่งเตรียมใหม่และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C ประมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เป็นตะกอน นำไปไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไป เหลือส่วนที่เป็นตะกอนไว้ 1.5 มิลลิลิตร

9. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 2:1(methanol 2 ส่วน : acetic acid 1 ส่วน) ซึ่งเตรียมใหม่และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ -20°C ประมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เป็นตะกอน นำไปไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที

10. นำออกจากตู้เย็นไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง เหลือไว้ 1.5 มิลลิลิตร

11. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 3:1 อีกประมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนของตะกอน นำไปปั่นแล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง

12. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 3:1 3-5 หยด หรือมากกว่า ผสมให้เข้ากันดี และนำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์เพื่อตรวจหาโครโมโซมต่อไป

<u>-ขั้นตอนการทำสไลด์เพื่อตรวจหาโครโมโซม</u>

หยดเซลล์ซึ่งอยู่ในสารละลาย Carnoy's fixative ลงบนแผ่นสไลด์ซึ่งสะอาดและแห้ง 1 หยด แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือเอาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60-65°C หรืออาจจะหยดสารละลาย Carnoy's fixative 3:1 หรือ 2:1 ลงบนแผ่นสไลด์เพิ่มอีก 1-2 หยด หรือมากกว่าก็ได้ แล้วจึงนำเข้าตู้อบ เราจะได้โครโมโซมซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในระยะเมตาเฟสกระจายอยู่เป็นกลุ่ม ๆ บนแผ่นสไลด์ และนำแผ่นสไลด์ไปย้อมด้วยสี Giemsa ในสารละลาย weise buffer (pH=7.0) นาน 45 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปตรวจหาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทำการถ่ายภาพเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์โครโมโซมต่อไป

<u>-การจัดคาริโอไทป์ของหอยทากบก</u>

ทำการจัดคาริโอไทป์โดยดัดแปลงจากวิธีการ Nakamura (1986) โดยคัดเลือกฟิล์มที่มีเมตาเฟส โครโมโซมที่กระจายดีที่สุดในแต่ละสปีชีส์มาสปีชีส์ละ 15-20 เซลล์ มาจัดคาริโอไทป์โดยอัดเป็นภาพขยายขนาด 1980 เท่า และนำภาพเมตาเฟสโครโมโซมที่ได้มาถ่ายรูปอีกครั้งด้วย

ฟิล์มสไลด์ นำฟิล์มสไลด์ที่ได้ไปฉายบนจอภาพ วัดความยาวของแขนสั้น (Length of short arm, LS) และความยาวของแขนยาว (Length of long arm, LL) โดยวัดจากตำแหน่ง centromere ไปยังปลายโครโมโซมทั้ง 2 ข้าง แล้วจัดคู่โดยอาศัยลักษณะที่คล้ายกันมากที่สุด ประกอบกับค่า A.R. (Arm ratio) และความยาวเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด เรียงลำดับตามความยาว และแบ่งชนิดของโครโมโซม โดยใช้ค่า Arm ratio (A.R.) ประกอบในการพิจารณาโดย

A.R. = LL/LS ดังต่อไปนี้

1.โครโมโซมชนิด metacentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่กลางแท่งพอดี ทำให้แขนยาวและแขนสั้นมีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก

โครโมโซม ชนิดนี้ A.R. มีค่าระหว่าง 1.00-1.69

2.โครโมโซมชนิด submetacentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่ค่อนไปทางปลายแต่ยังใกล้จุดกึ่งกลางอยู่ทำให้แขนยาวมีความยาวมากกว่าแขนสั้นอย่างเห็นได้ชัด

โครโมโซมชนิดนี้ A.R. มีค่าระหว่าง 1.70-2.99

3.โครโมโซมชนิด subtelocentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่ค่อนไปทางปลายแท่งทำให้แขนสั้นมีขนาดสั้นมาก

โครโมโซมชนิดนี้ A.R. มีค่าระหว่าง 3.00-6.99

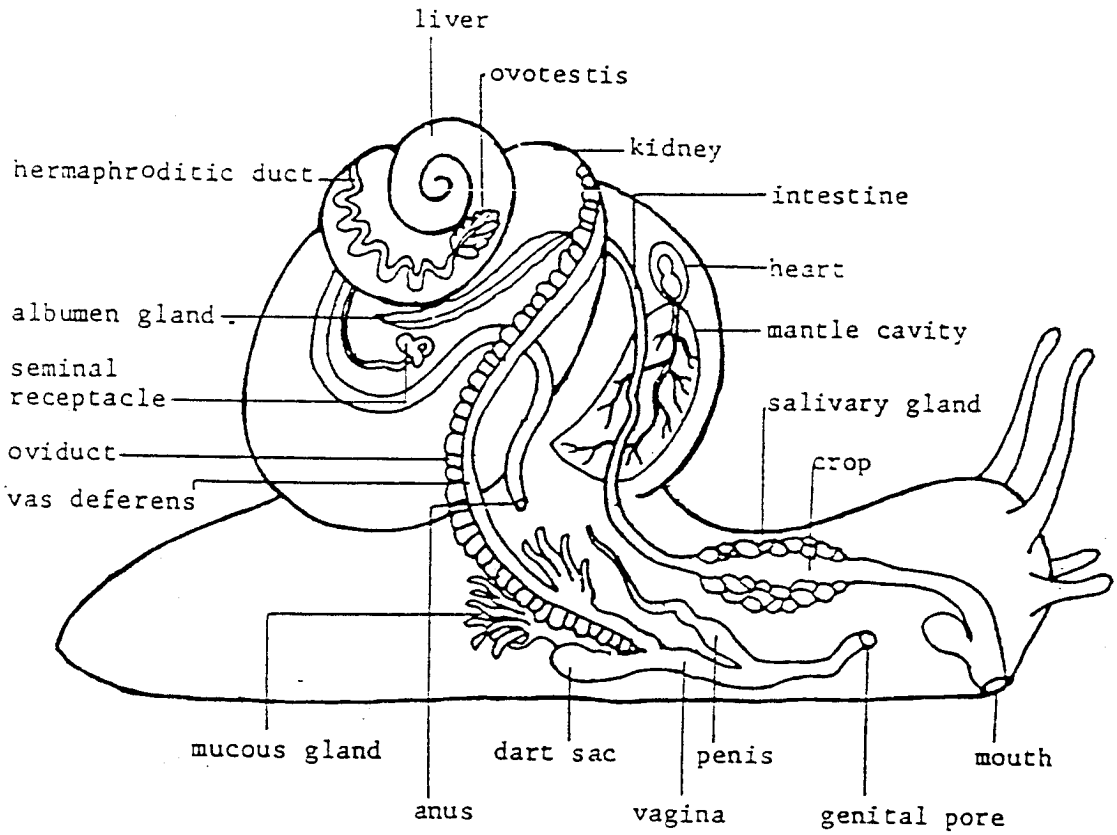
4.โครโมโซมชนิด telocentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่ปลายแท่งพอดี

โครโมโซมชนิดนี้ A.R. มีค่ามากกว่า 7.00

ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคำนวนโดยใช้สูตร S.D. = $\sqrt{\sum(X_i-X)^2/N}$ (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2539)

นอกจากนั้นเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกบางชนิดไม่สามารถจัดคาริโอไทป์ได้เนื่องจากไม่สามารถเห็นตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ จากการสรุปของ Inaba (1969) พบว่าโครโมโซมของหอยทากในอันดับ Stylommatophora ที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อ ovotestis มักจะได้โครโมโซมที่มีลักษณะเป็นแท่ง ซึ่งไม่สามารถเห็นตำแหน่งเซนโทรเมียร์ได้ชัดเจนจึงสรุปว่าเป็นลักษณะโครโมโซมของสัตว์ในกลุ่มนี้ การศึกษาครั้งนี้จึงจัดแบ่งขนาดของโครโมโซมเป็น 2 พวก คือ โครโมโซมขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ตามวิธีของ Ullerich (1966) ที่ศึกษาในโครโมโซมของสัตว์ในกลุ่มสะเทินน้ำสะเทินบก โดยที่โครโมโซมขนาดใหญ่มีขนาดความยาวเกินครึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด ส่วนที่เหลือจัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก

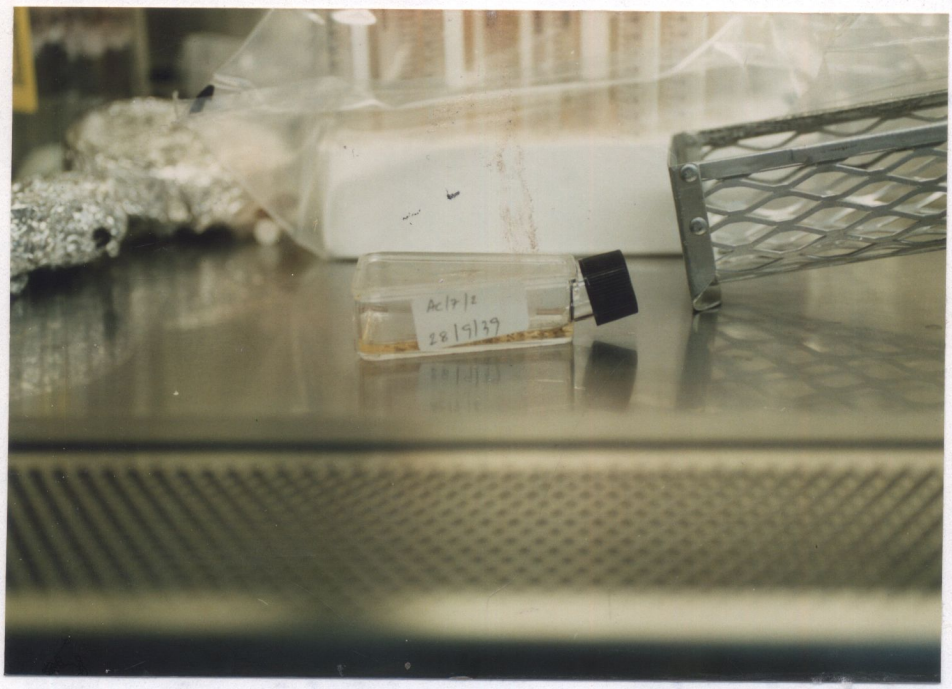
ภาพที่ 2 กล่องเลี้ยงหอยทากบกขนาดต่าง ๆ



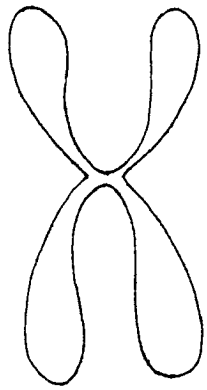
ภาพที่ 3 แสดงอวัยวะภายในของหอยทากบก

(จาก Hegner, 1961)

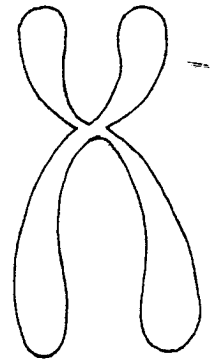
ภาพที่ 4 แสดงการเลี้ยงเซลล์ใน laminar flow hood



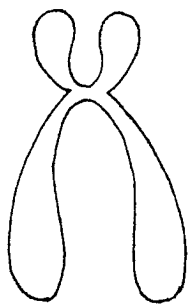
ภาพที่ 5 แสดงขวดสำหรับใช้เลี้ยงเซลล์



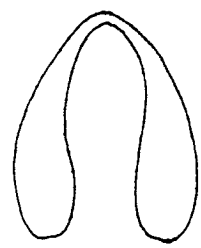
เมตาเซนตริกโครโมโซม
(metacentric chromosome)



ซับเมตาเซนตริกโครโมโซม
(submetacentric chromosome)



ซับเทโลเซนตริกโครโมโซม
(subtelocentric chromosome)



เทโลเซนตริกโครโมโซม
(telocentric chromosome)

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะของโครโมโซมชนิดต่าง ๆ ซึ่งกำหนดโดยตำแหน่งเซนโตรเมียร์ (Nakamura, 1986)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การศึกษาคาริโอไทป์ของหอยทากบกในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างหอยทากบกในอันดับ Stylommatophora จาก 3 ครอบครัว 6 สกุล 8 สปีชีส์ ซึ่งมีผลการศึกษาดังนี้

ครอบครัว Ariophantidae

1.หอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla* (ภาพที่ 7)

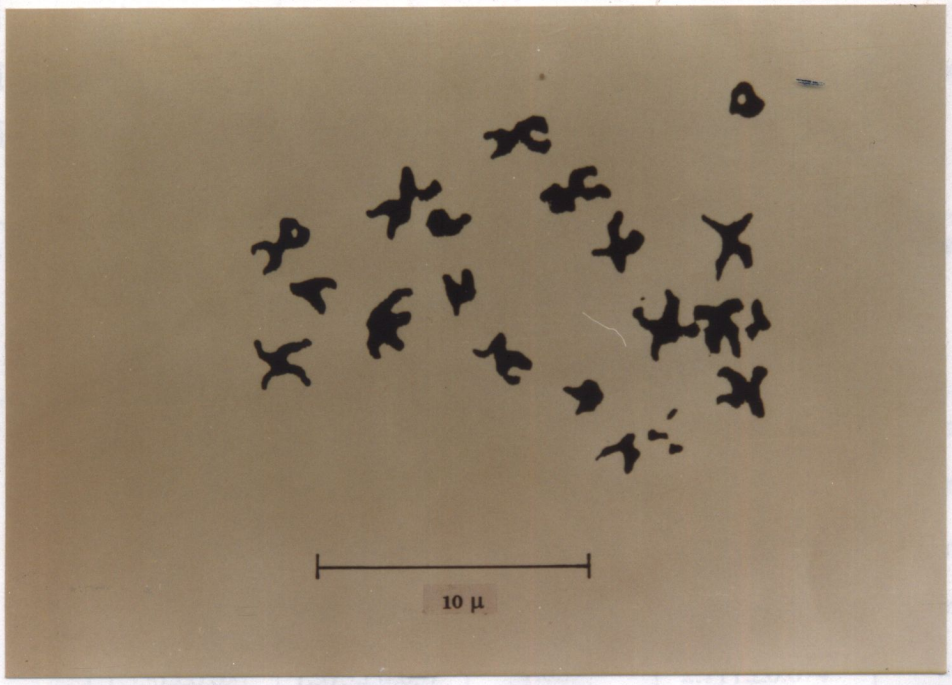
1.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

1.2 พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 20 จากจำนวน 15 เมตาเฟส (ภาพที่ 8)

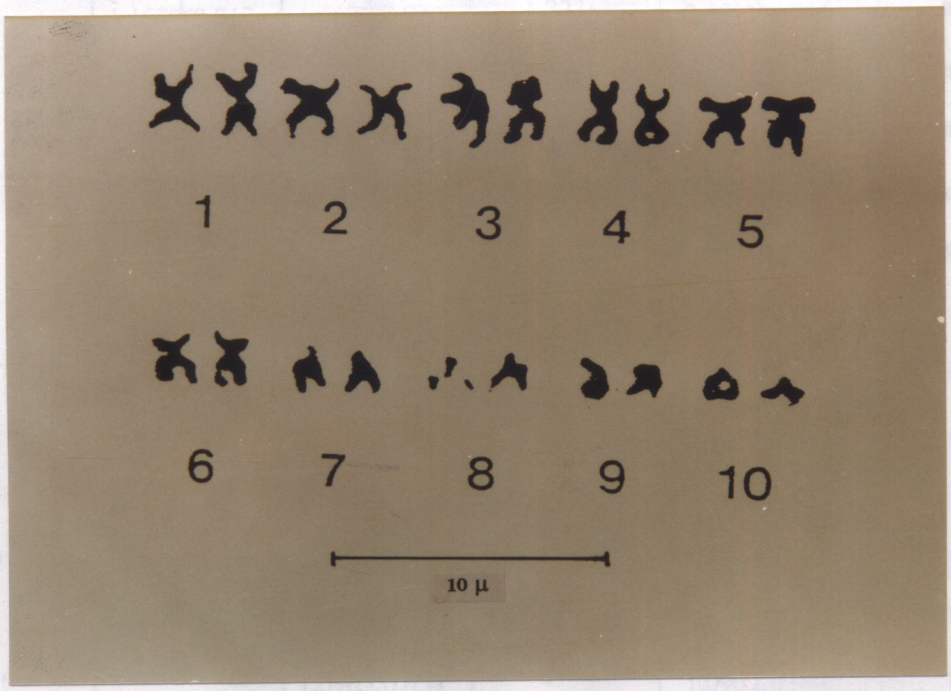
1.3 ชนิดของโครโมโซมมีจำนวน metacentric 5 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1,2,3,4 และ 5 submetacentric 1 คู่ ได้แก่คู่ที่ 6 และ telocentric 4 คู่ ได้แก่คู่ที่ 7,8,9 และ 10 (ภาพที่ 9; ตารางที่ 1)

1.4 ชนิดของโครโมโซม แบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ ได้แก่คู่ที่ 1-6 โครโมโซมขนาดเล็กได้แก่คู่ที่ 7-10

ภาพที่ 7 หอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla*



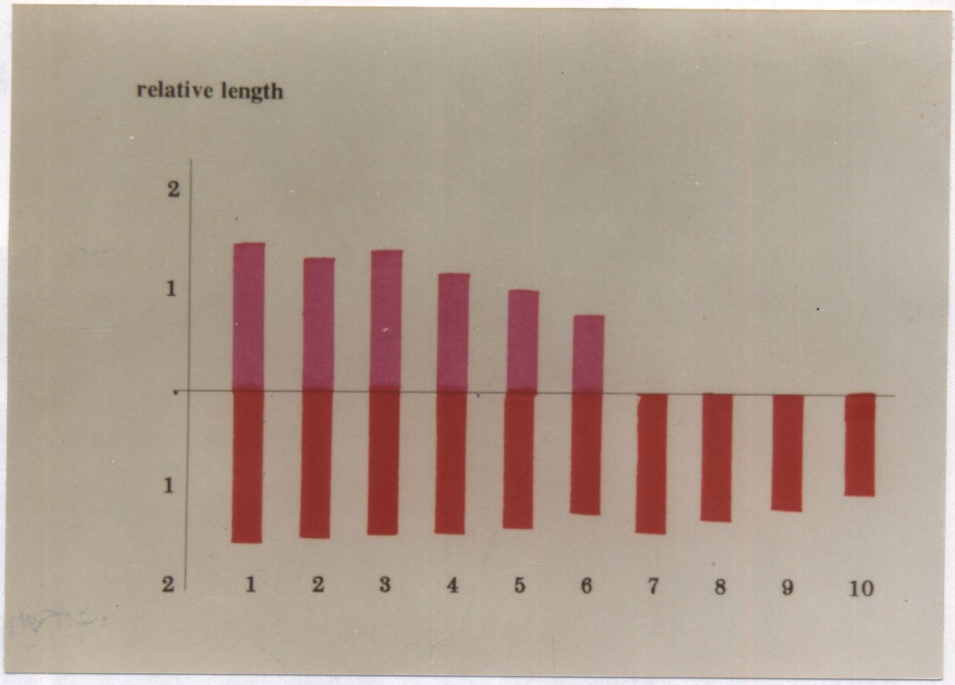
ภาพที่ 8 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla*



ภาพที่ 9 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla*

ตารางที่ 1 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 15 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys hepbagyla* (2n=20)

โครโมโซมคู่ที่	LS $\bar{X} \pm$ S.D.	LL $\bar{X} \pm$ S.D.	A.R.	TL $\bar{X} \pm$ S.D.	ชนิด
1	1.468±0.025	1.621±0.008	1.104	3.089±0.017	m
	1.429±0.031	1.545±0.022	1.081	2.974±0.009	m
2	1.293±0.022	1.487±0.016	1.149	2.779±0.037	m
	1.203±0.029	1.561±0.020	1.297	2.764±0.040	m
3	1.336±0.037	1.375±0.037	1.029	2.711±0.074	m
	1.298±0.025	1.408±0.026	1.085	2.706±0.042	m
4	1.123±0.035	1.490±0.029	1.327	2.613±0.028	m
	1.163±0.017	1.427±0.012	1.227	2.590±0.026	m
5	1.150±0.041	1.378±0.029	1.198	2.527±0.074	m
	1.068±0.029	1.371±0.033	1.283	2.441±0.062	m
6	0.649±0.025	1.278±0.020	1.969	1.944±0.104	sm
	0.613±0.033	1.184±0.022	1.931	1.828±0.246	sm
7	-	1.490±0.037	-	1.490±0.037	t
	-	1.446±0.040	-	1.446±0.040	t
8	-	1.360±0.045	-	1.360±0.045	t
	-	1.289±0.033	-	1.289±0.033	t
9	-	1.114±0.043	-	1.114±0.043	t
	-	1.403±0.052	-	1.403±0.052	t
10	-	1.090±0.034	-	1.090±0.034	t
	-	1.078±0.024	-	1.078±0.024	t



ภาพที่ 10 แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบก
ชนิด *Macrochlamys hepbagyla*

2. หอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens* (ภาพที่ 11)

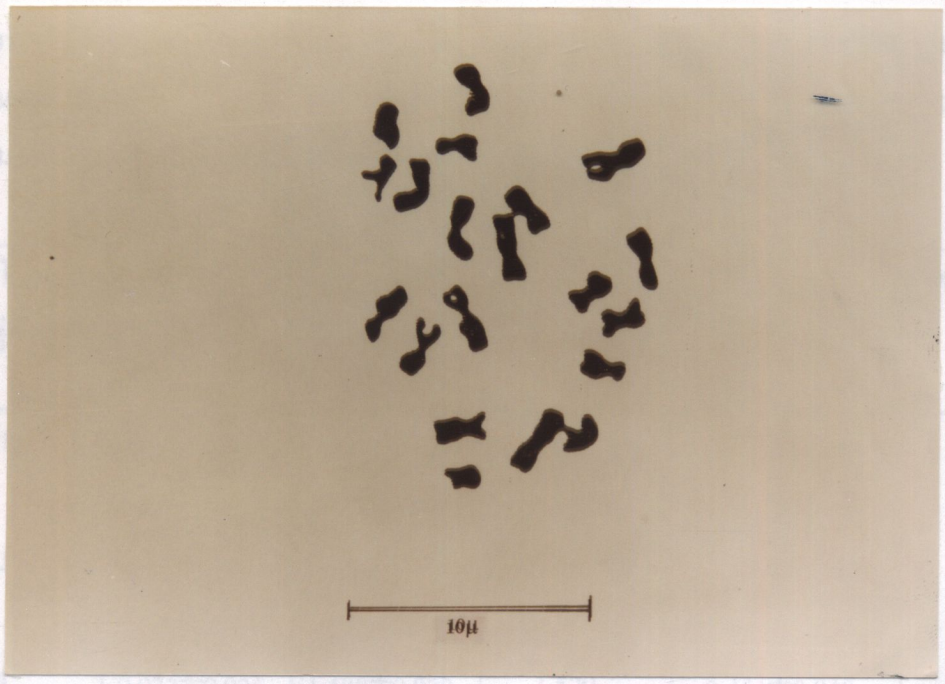
2.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

2.2 จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 20 จากจำนวน 15 เมตาเฟส (ภาพที่12)

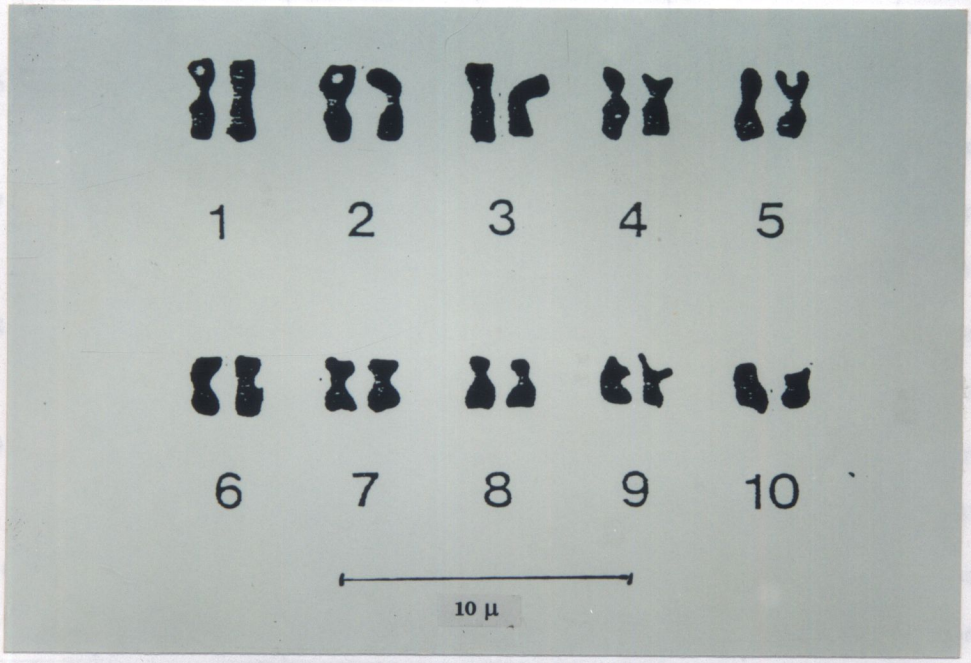
2.3 ชนิดของโครโมโซม มีจำนวน metacentric 8 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,4,5,6 และ 9 submetacentric 2 คู่ ได้แก่ 8 และ10 (ภาพที่ 13; ตารางที่ 2)

2.4 ชนิดของโครโมโซม แบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ ได้แก่คู่ที่ 1-9 ส่วนโครโมโซมขนาดเล็กได้แก่คู่ที่ 10

ภาพที่ 11 หอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*



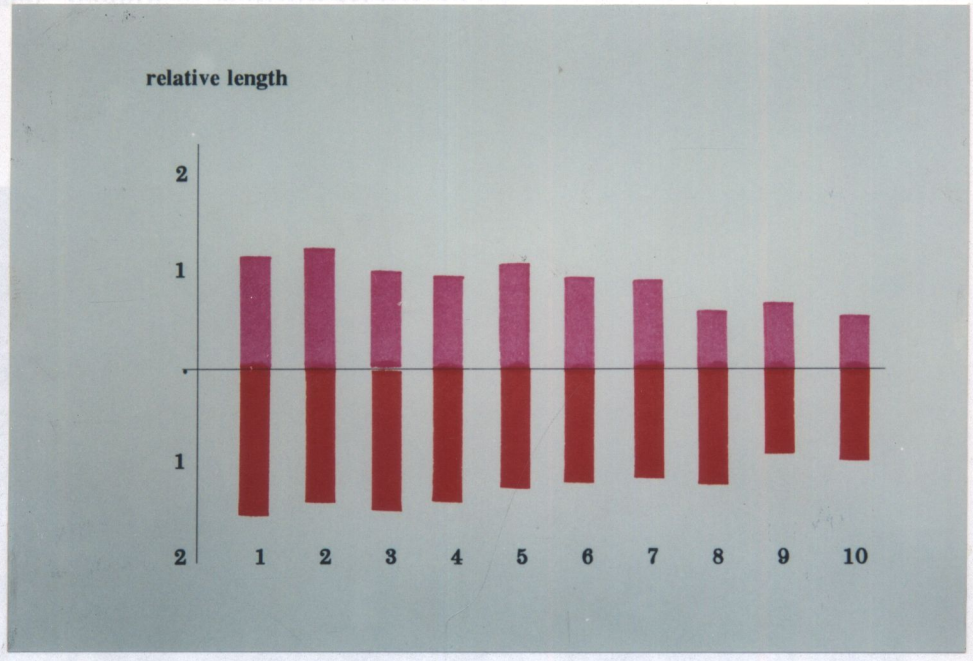
ภาพที่ 12 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*



ภาพที่ 13 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*

ตารางที่ 2 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 15 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens* (2n=20)

โครโมโซมคู่ที่	LS $\bar{X} \pm$ S.D.	LL $\bar{X} \pm$ S.D.	Arm ratio	TL $\bar{X} \pm$ S.D.	ชนิด
1	1.013±0.029	1.579±0.025	1.558	2.592±0.040	m
	1.112±0.037	1.473±0.045	1.325	2.585±0.082	m
2	1.202±0.019	1.316±0.022	1.095	2.518±0.023	m
	1.203±0.026	1.292±0.022	1.073	2.495±0.031	m
3	0.973±0.025	1.488±0.029	1.529	2.461±0.048	m
	0.893±0.033	1.445±0.022	1.618	2.338±0.038	m
4	0.918±0.024	1.382±0.016	1.505	2.301±0.022	m
	0.829±0.029	1.348±0.020	1.626	2.177±0.038	m
5	0.974±0.040	1.177±0.017	1.208	2.150±0.052	m
	1.029±0.026	1.101±0.025	1.070	2.130±0.012	m
6	0.785±0.020	1.202±0.029	1.532	1.986±0.008	m
	0.879±0.037	1.035±0.009	1.178	1.914±0.046	m
7	0.771±0.041	0.996±0.022	1.292	1.768±0.052	m
	0.730±0.026	1.006±0.022	1.378	1.736±0.037	m
8	0.568±0.026	1.153±0.029	2.029	1.720±0.050	sm
	0.552±0.037	1.159±0.033	2.099	1.711±0.061	sm
9	0.719±0.012	0.747±0.012	1.038	1.466±0.016	m
	0.539±0.025	0.704±0.037	1.306	1.243±0.055	m
10	0.411±0.029	0.818±0.025	1.989	1.231±0.014	sm
	0.358±0.022	0.812±0.045	2.268	1.170±0.065	sm



ภาพที่ 14 แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Macrochlamys splendens*

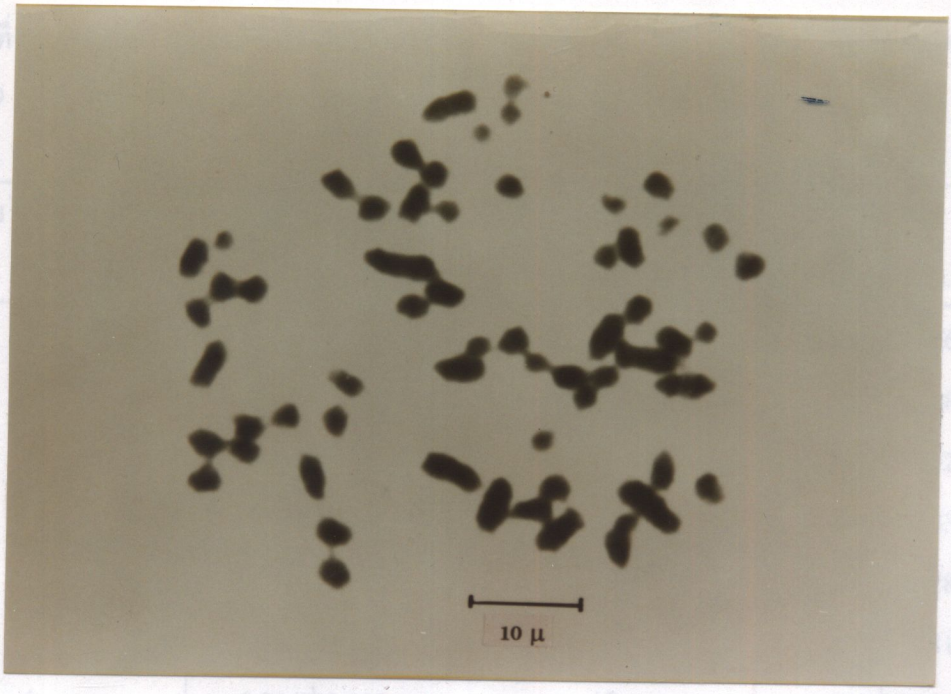
3. หอยทากบก *Hemiplecta distincta* (ภาพที่ 15)

3.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

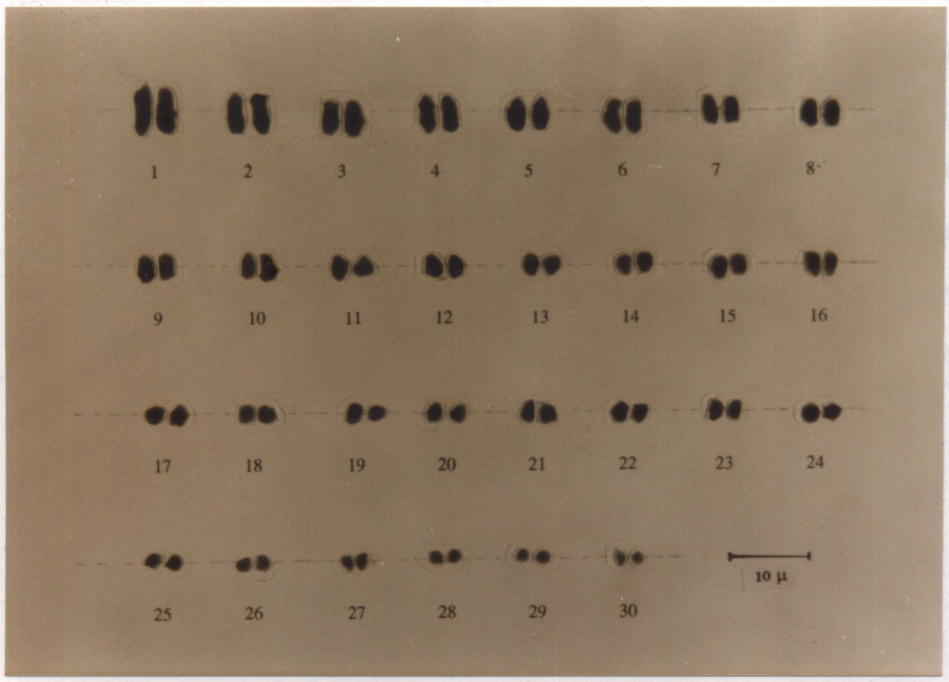
3.2 จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 60 (ภาพที่ 16) จากจำนวน 19 เมตาเฟส จากหอยทากบกที่ทำการศึกษา 16 ตัว

3.3 ชนิดของโครโมโซม แบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ ได้แก่คู่ที่ 1-9 และโครโมโซมขนาดเล็ก ได้แก่คู่ที่ 10-30 (ภาพที่ 17; ตารางที่ 3)

ภาพที่ 15 หอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta*



ภาพที่ 16 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta*



ภาพที่ 17 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta*

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร จาก 19 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta distincta* (2n=60)

โครโมโซมคู่ที่	TL $\overline{X} \pm$ S.D.	โครโมโซมคู่ที่	TL $\overline{X} \pm$ S.D.
1	8.109±0.015	9	4.202±0.026
	7.957±0.020		4.192±0.048
2	6.882±0.019	10	3.929±0.032
	6.654±0.008		3.902±0.043
3	6.089±0.025	11	3.778±0.028
	5.939±0.031		3.718±0.081
4	5.724±0.033	12	3.535±0.062
	5.685±0.040		3.533±0.059
5	5.267±0.042	13	3.382±0.040
	5.246±0.029		3.340±0.027
6	5.044±0.050	14	3.166±0.023
	5.034±0.040		3.165±0.034
7	4.749±0.025	15	3.064±0.049
	4.634±0.050		3.058±0.040
8	4.340±0.052	16	2.974±0.050
	4.308±0.048		2.963±0.032

ตารางที่ 3 (ต่อ)

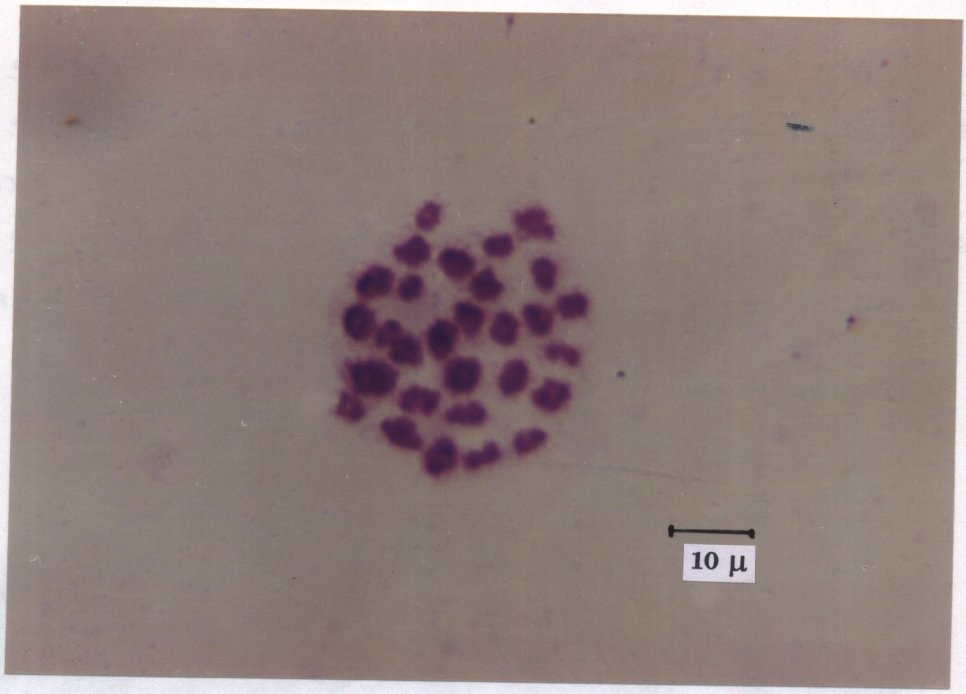
โครโมโซมคู่ที่	TL $\overline{X} \pm$ S.D.	โครโมโซมคู่ที่	TL $\overline{X} \pm$ S.D.
17	2.855±0.042	24	2.296±0.046
	2.823±0.085		2.242±0.025
18	2.705±0.054	25	2.242±0.031
	2.702±0.037		2.210±0.015
19	2.636±0.027	26	2.164±0.025
	2.634±0.029		2.163±0.033
20	2.590±0.025	27	2.099±0.033
	2.570±0.023		2.074±0.041
21	2.498±0.053	28	1.966±0.037
	2.489±0.042		1.963±0.058
22	2.404±0.031	29	1.883±2.765
	2.374±0.045		1.862±0.032
23	2.348±0.031	30	1.708±0.051
	2.334±0.031		1.705±0.041

4. หอยทากบก *Hemiplecta weinkauffiana* (ภาพที่ 18)

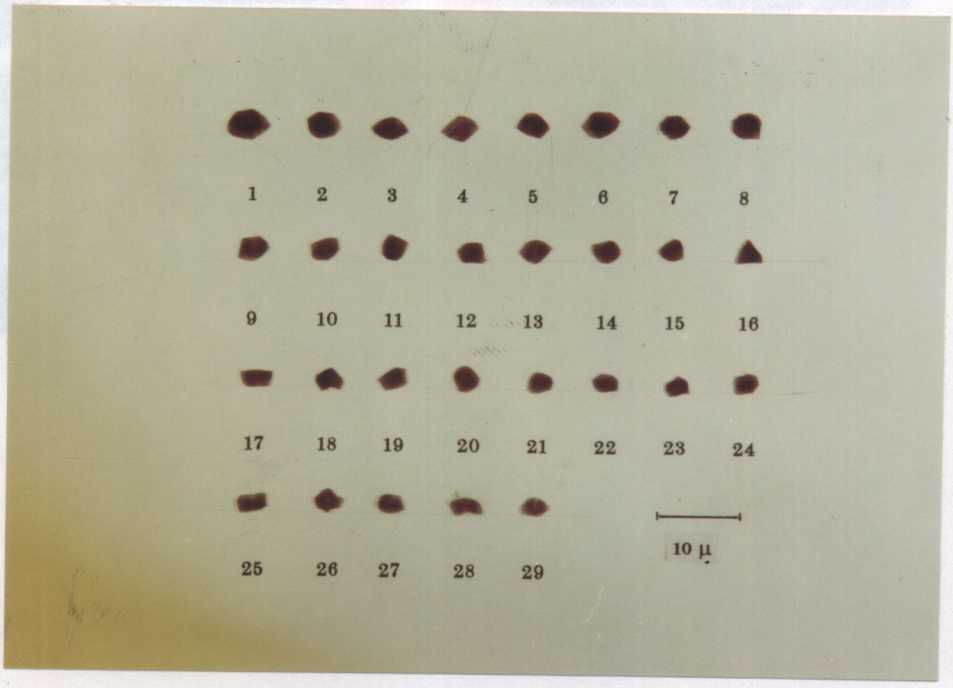
4.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน

4.2 โครโมโซมที่พบอยู่ในระยะ diakinesis จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 58 (ภาพที่ 19) จากจำนวนเซลล์ที่นับ 11 เซลล์ จากหอยทากบกที่ศึกษาจำนวน 8 ตัว

ภาพที่ 18 หอยทากบกชนิด *Hemiplecta weinkauffiana*



ภาพที่ 19 แสดงโครโมโซมระยะ diakinesis ของหอยทากบกชนิด *Hemiplecta weinkauffiana*



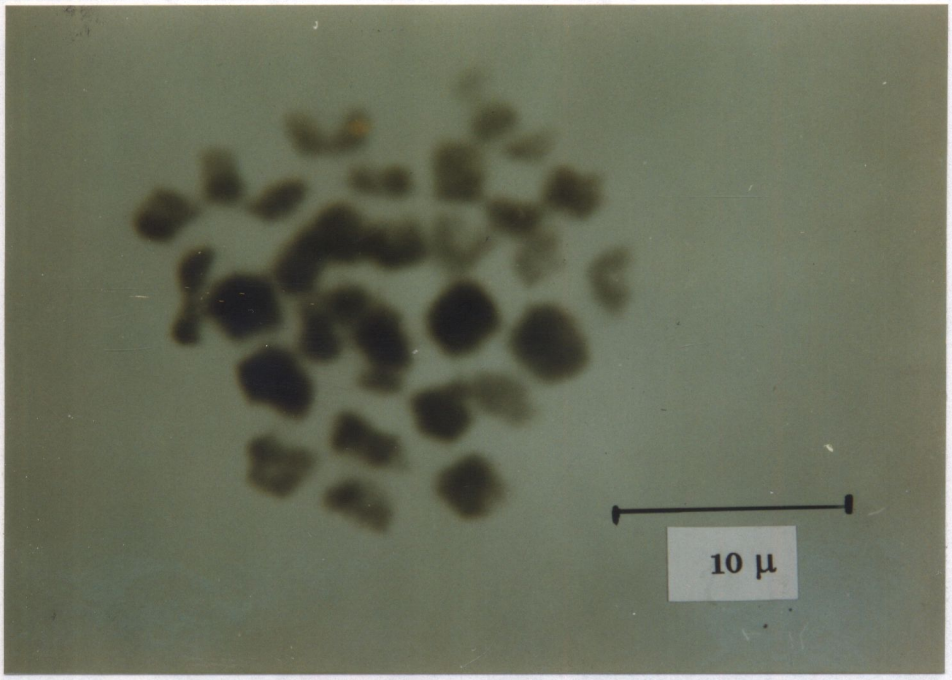
ภาพที่ 20 แสดงโครโมโซมระยะ diakinesis ซึ่งเรียงตามลำดับจากขนาดใหญ่ไปหาขนาดเล็ก ของหอยทากบก *Hemiplecta weinkauffiana*

5. หอยทากบก *Dyakia salangana* (ภาพที่ 21)

5.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

5.2 โครโมโซมที่เตรียมได้และพอจะนับได้คือเซลล์ในระยะ diakinesis ซึ่งนับจากเซลล์ทั้งหมด 5 เซลล์ พบมีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมอยู่ระหว่าง 50-54 (ภาพที่ 22)

ภาพที่ 21 หอยทากบกชนิด *Dyakia salangana*



ภาพที่ 22 แสดงโครโมโซมระยะ diakinesis
ของหอยทากบกชนิด *Dyakia salangana*

6. หอยทากบก *Cryptozona siamensis* (ภาพที่ 23)

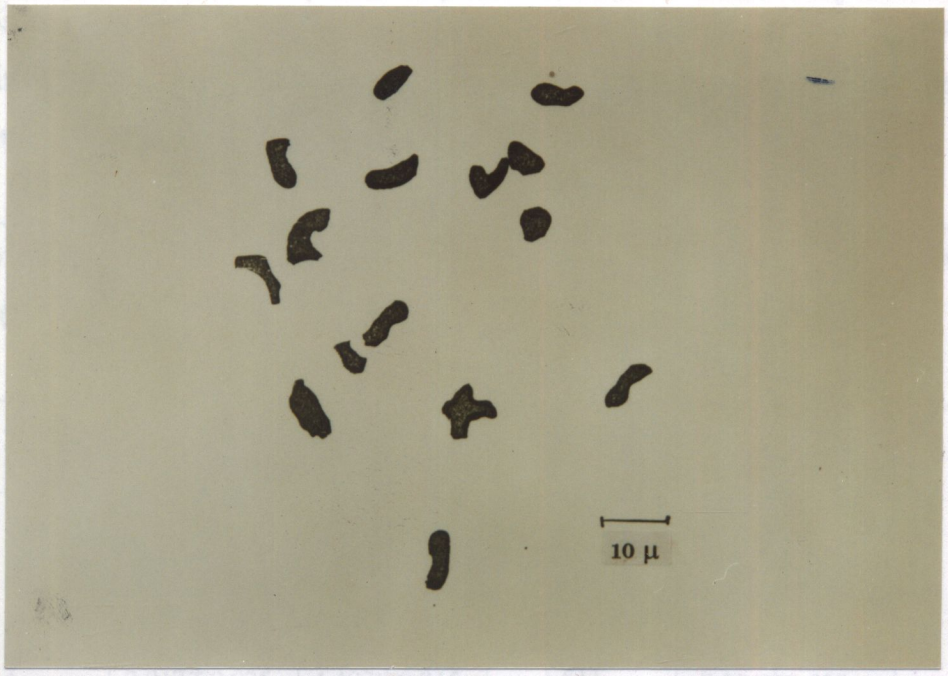
6.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

6.2 จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 16 จากจำนวน 3 เมตาเฟส (ภาพที่ 24) จากหอยทากบกที่ทำการศึกษา 3 ตัว

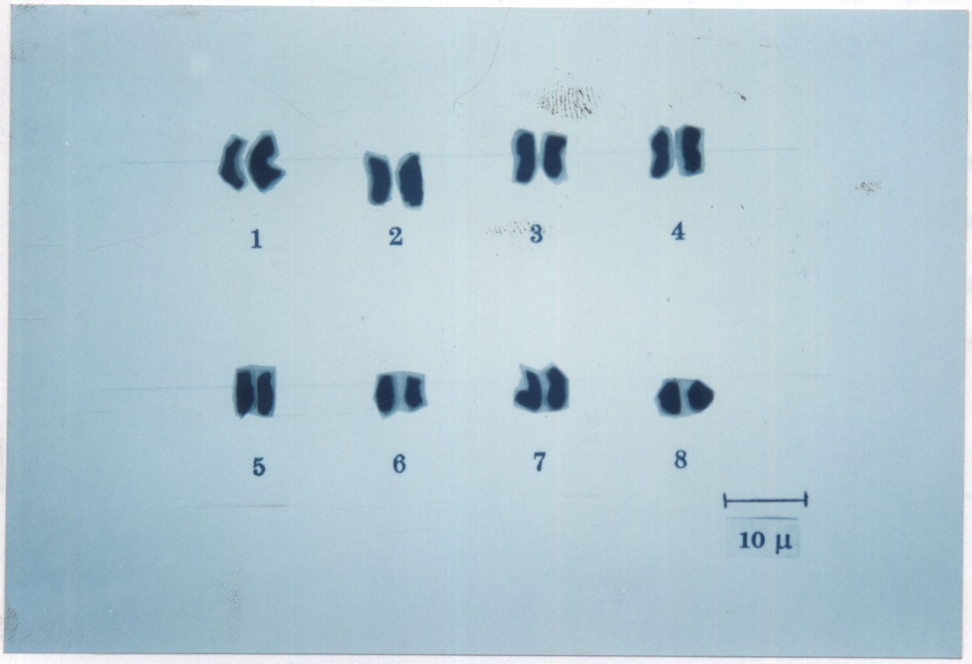
6.3 ชนิดของโครโมโซม มีจำนวน metacentric 4 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1,3,4 และ 5 ชนิด submetacentric 1 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 7 ชนิด subtelocentric 1 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 6 และชนิด telocentric 2 คู่ ได้แก่คู่ที่ 2 และ คู่ที่ 8 (ภาพที่ 25; ตารางที่ 4)

6.4 ชนิดของโครโมโซม เป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ทั้งหมด

ภาพที่ 23 หอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis*



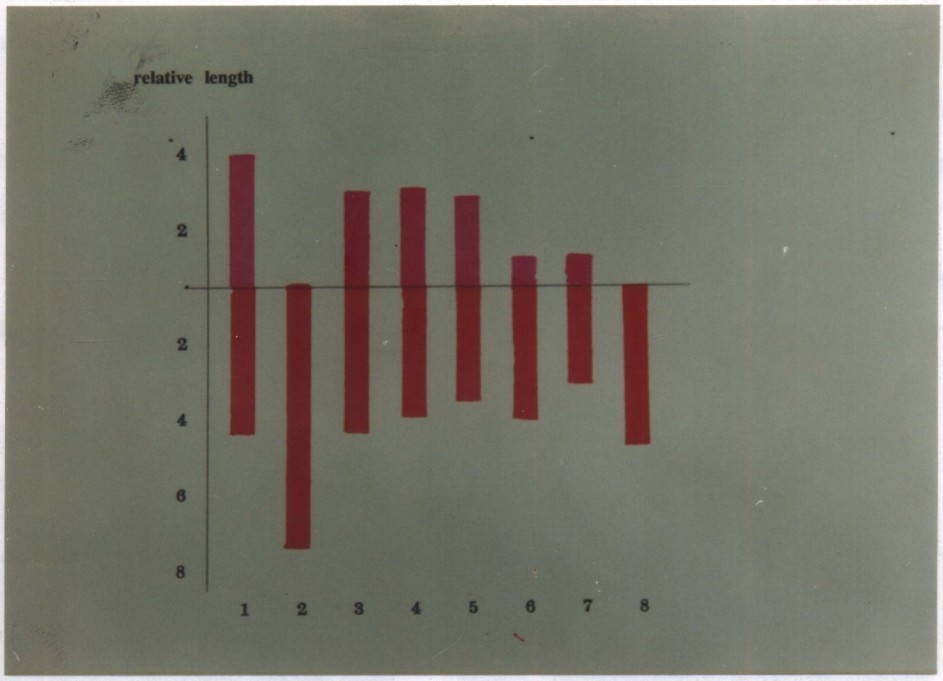
ภาพที่ 24 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis*



ภาพที่ 25 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis*

ตารางที่ 4 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 3 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis* (2n=16)

โครโมโซมคู่ที่	LS $\bar{X} \pm$ S.D.	LL $\bar{X} \pm$ S.D.	Arm ratio	TL $\bar{X} \pm$ S.D.	ชนิด
1	4.195±0.019	4.351±0.020	1.037	8.546±0.017	m
	3.873±0.016	4.145±0.359	1.070	8.0182±0.034	m
2	-	7.538±0.036	-	7.538±0.036	t
	-	7.456±0.025	-	7.456±0.025	t
3	2.917±0.025	4.407±0.015	1.511	7.324±0.029	m
	3.079±0.021	4.142±0.008	1.345	7.221±0.107	m
4	3.043±0.015	3.667±0.016	1.205	6.710±0.029	m
	2.933±0.008	4.028±0.015	1.373	6.961±0.019	m
5	2.899±0.008	3.505±0.013	1.209	6.404±0.011	m
	2.757±0.019	3.439±0.022	1.247	6.196±0.031	m
6	1.107±0.015	3.964±0.013	3.580	5.071±0.011	st
	1.081±0.008	4.138±0.018	3.828	5.219±0.019	st
7	1.265±0.016	3.129±0.016	2.473	4.394±0.007	sm
	1.232±0.008	2.901±0.016	2.355	4.133±0.015	sm
8	-	4.649±0.011	-	4.649±0.011	t
	-	4.486±0.025	-	4.486±0.025	t



ภาพที่ 26 แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของ
หอยทากบกชนิด *Cryptozona siamensis*

ครอบครัว Camaenidae

1. หอยทากบก *Amphidromus atricallosus* แบบ A (ภาพที่ 27)

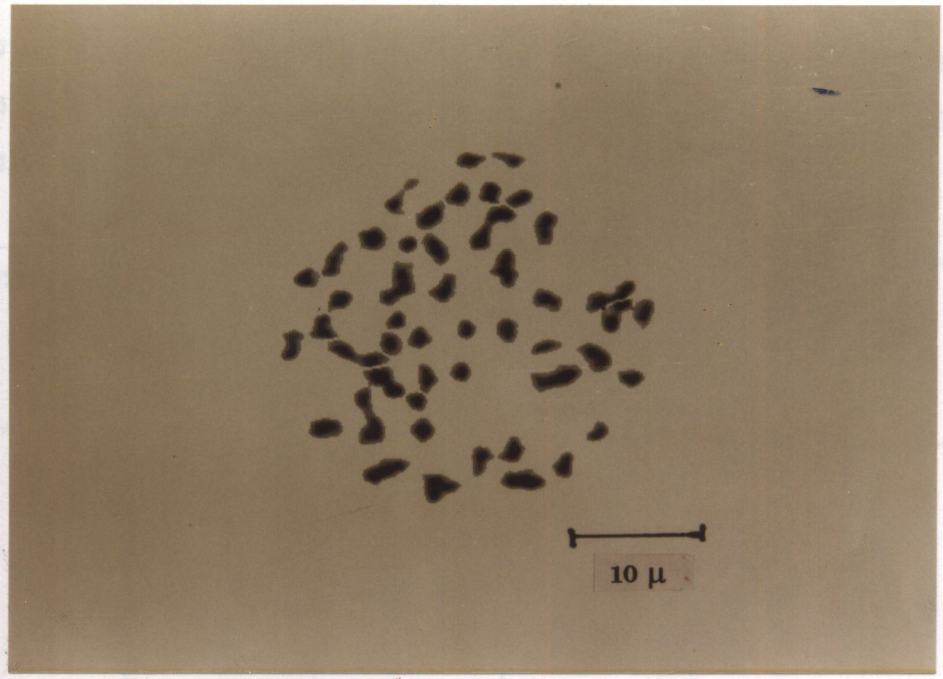
1.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

1.2 จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 48 (ภาพที่ 28) จากจำนวน 12 เมตาเฟส จากหอยทากบกที่ทำการศึกษา 5 ตัว และนำมาจัดคาริโอไทป์โดยคอมพิวเตอร์โปรแกรม IKAROS 3 Karyotyping ของ Carl Zeiss (ภาพที่ 29)

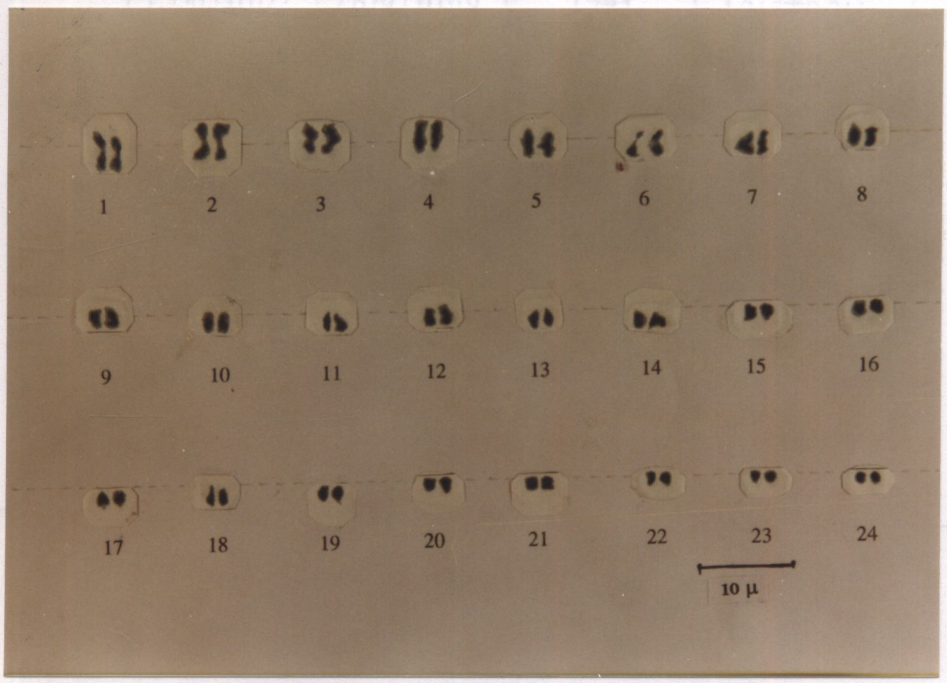
1.3 ชนิดของโครโมโซม มีจำนวน metacentric 5 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1,2,3,5 และ 12 ชนิด submetacentric 6 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 4,6,7,8,11 และ18 ชนิด subtelocentric 2 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 9 และ 13 และชนิด telocentric 11 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 10,14,15,16,17,19,20,21,22,23 และ 24

1.4 ชนิดของโครโมโซม แบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ ได้แก่คู่ที่ 1-12 และโครโมโซมขนาดเล็ก ได้แก่ คู่ที่ 13-24

ภาพที่ 27 หอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A



ภาพที่ 28 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A



ภาพที่ 29 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A

ตารางที่ 5 แสดงค่าความยาวเฉลี่ยของแขนสั้น (LS), แขนยาว (LL), ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร และค่า Arm ratio (A.R.) จาก 12 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* Type A (2n=48)

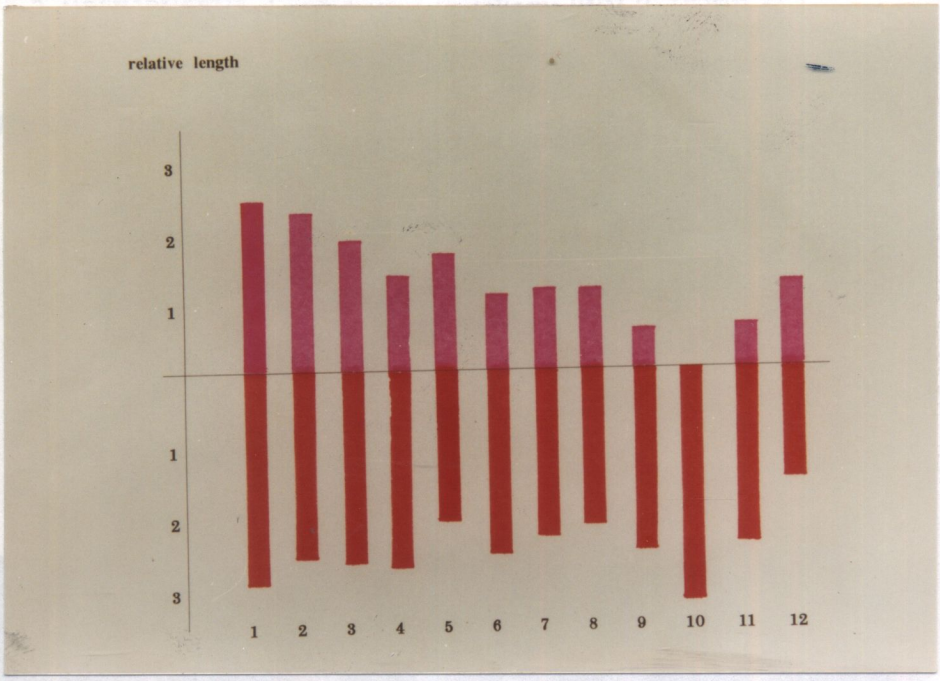
โครโมโซมคู่ที่	LS $\bar{X} \pm$ S.D.	LL $\bar{X} \pm$ S.D.	Arm ratio	TL $\bar{X} \pm$ S.D.	ชนิด
1	2.559±0.011	2.983±0.019	1.166	5.542±0.018	m
	2.513±0.022	2.744±0.022	1.092	5.257±0.030	m
2	2.203±0.023	2.582±0.027	1.172	4.785±0.455	m
	2.277±0.015	2.500±0.021	1.098	4.777±0.025	m
3	1.961±0.016	2.627±0.025	1.340	4.588±0.036	m
	1.909±0.016	2.622±0.024	1.374	4.531±0.029	m
4	1.479±0.025	2.761±0.023	1.867	4.240±0.048	sm
	1.536±0.022	2.679±0.019	1.743	4.215±0.011	sm
5	1.833±0.018	1.968±0.029	1.073	3.801±0.046	m
	1.844±0.022	1.903±0.019	1.032	3.747±0.033	m
6	1.169±0.025	2.464±0.021	2.106	3.633±0.033	sm
	1.167±0.021	2.379±0.011	2.093	3.546±0.030	sm
7	1.227±0.023	2.218±0.158	1.807	3.445±0.027	sm
	1.177±0.019	2.262±0.022	1.922	3.439±0.039	sm
8	1.227±0.015	2.091±0.025	1.703	3.318±0.016	sm
	1.119±0.015	2.197±0.023	1.963	3.316±0.036	sm

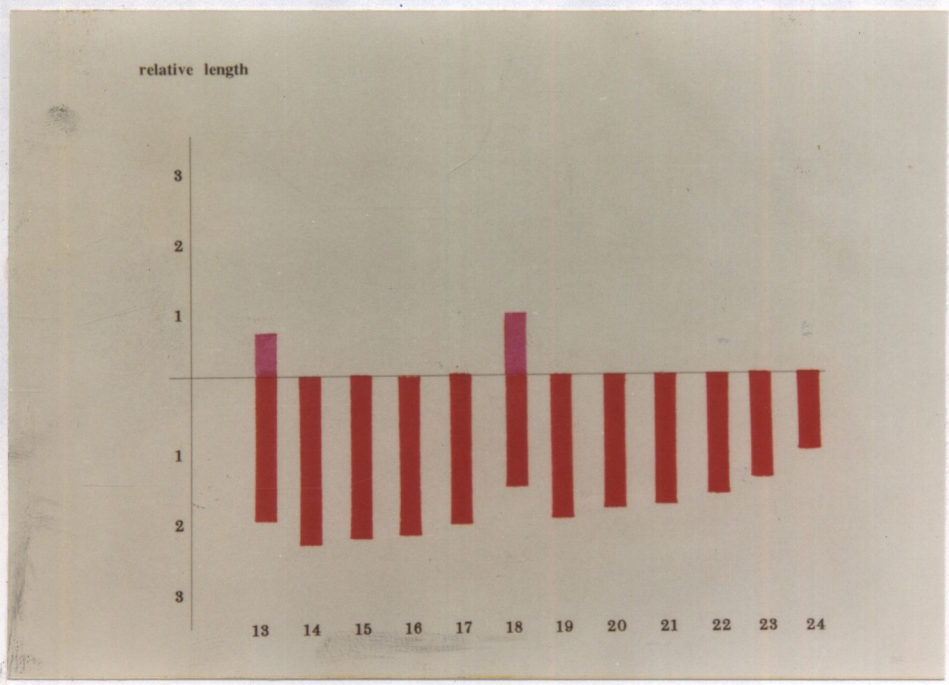
ตารางที่ 5 (ต่อ)

โครโมโซมคู่ที่	LS $\bar{X} \pm$ S.D.	LL $\bar{X} \pm$ S.D.	Arm ratio	TL $\bar{X} \pm$ S.D.	ชนิด
9	0.745±0.019	2.448±0.021	3.280	3.193±0.032	st
	0.761±0.027	2.388±0.031	3.138	3.149±0.050	st
10	-	3.054±0.022	-	3.054±0.022	t
	-	3.049±0.024	-	3.049±0.024	t
11	0.807±0.019	2.198±0.029	2.723	3.005±0.043	sm
	0.801±0.019	2.197±0.021	2.742	2.998±0.027	sm
12	1.403±0.012	1.492±0.027	1.063	2.895±0.029	m
	1.353±0.013	1.476±0.030	1.091	2.829±0.033	m
13	0.580±0.023	1.910±0.022	3.294	2.490±0.019	st
	0.505±0.020	1.969±0.016	3.897	2.747±0.019	st
14	-	2.321±0.027	-	2.321±0.027	t
	-	2.319±0.022	-	2.319±0.022	t
15	-	2.280±0.018	-	2.280±0.018	t
	-	2.261±0.027	-	2.261±0.027	t
16	-	2.212±0.025	-	2.212±0.025	t
	-	2.152±0.026	-	2.152±0.026	t

ตารางที่ 5 (ต่อ)

โครโมโซมคู่ที่	LS $\bar{X} \pm$ S.D.	LL $\bar{X} \pm$ S.D.	Arm ratio	TL $\bar{X} \pm$ S.D.	ชนิด
17	-	2.145±0.025	-	2.145±0.025	t
	-	2.080±0.040	-	2.080±0.040	t
18	0.748±0.023	1.349±0.016	1.803	2.097±0.019	sm
	0.712±0.015	1.292±0.020	1.814	2.004±0.019	sm
19	-	1.915±0.010	-	1.915±0.010	t
	-	1.897±0.016	-	1.897±0.016	t
20	-	1.776±0.625	-	1.776±0.625	t
	-	1.730±0.021	-	1.730±0.021	t
21	-	1.709±0.023	-	1.709±0.023	t
	-	1.706±0.011	-	1.706±0.011	t
22	-	1.667±0.022	-	1.667±0.022	t
	-	1.534±0.018	-	1.534±0.018	t
23	-	1.397±0.021	-	1.397±0.021	t
	-	1.359±0.020	-	1.359±0.020	t
24	-	1.118±0.029	-	1.118±0.029	t
	-	1.070±0.018	-	1.070±0.018	t





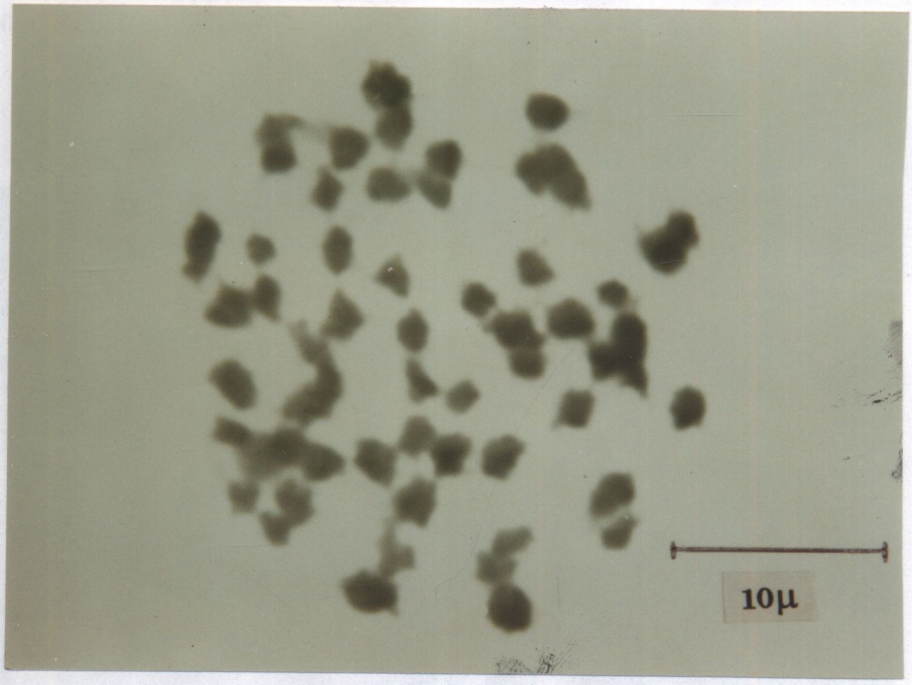
ภาพที่ 30 แสดงอิดิโอแกรมจากเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ A

2. หอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ B (ภาพที่ 31)

2.1 สถานที่พบ ภายในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

2.2 โครโมโซมในระยะเมตาเฟสที่เตรียมได้กระจายไม่ดี มีโครโมโซมซ้อนทับกันหลายอัน เมตาเฟสเซลล์ที่พอจะนับได้มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมระหว่าง 48-50 (ภาพที่ 32)

ภาพที่ 31 หอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ B



ภาพที่ 32 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบกชนิด *Amphidromus atricallosus* แบบ B

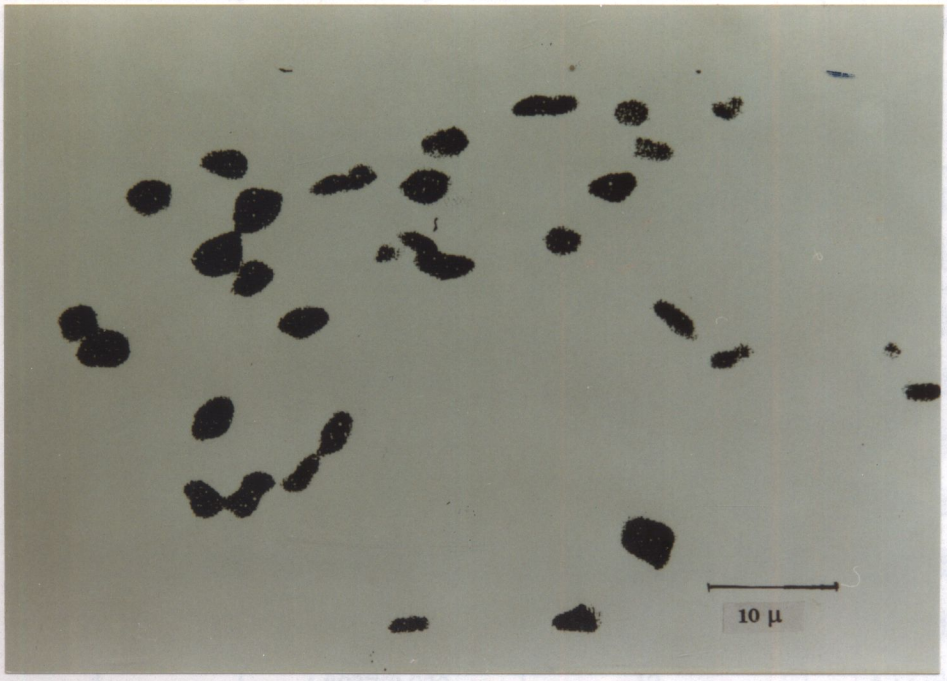
ครอบครัว Achatinidae

1.หอยทากแอฟริกันชนิด *Achatina fulica* (ภาพที่ 33)

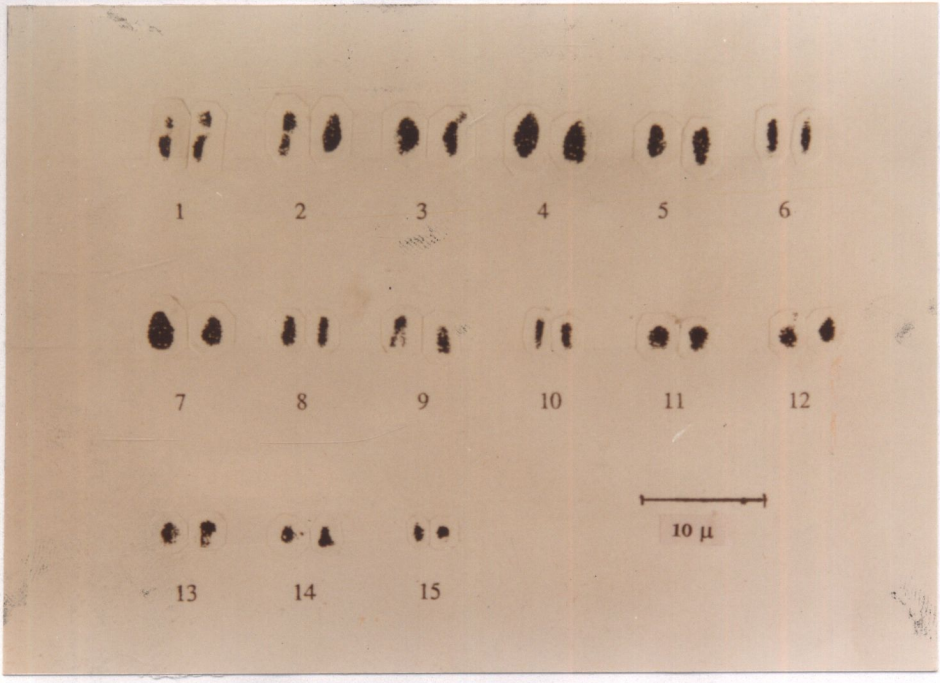
1.1 สถานที่พบ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

1.2 จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าเท่ากับ 30 จากจำนวน 17 เมตาเฟส (ภาพที่ 34) และนำมาจัดคาริโอไทป์โดยคอมพิวเตอร์โปรแกรม IKAROS 3 Karyotyping ของ Carl Zeiss (ภาพที่ 35) ซึ่งโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่ง ๆ ไม่สามารถเห็นตำแหน่งเซนโทรเมียร์ชัดเจน ชนิดของโครโมโซมแบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ ได้แก่ คู่ที่ 1-8 และโครโมโซมขนาดเล็ก ได้แก่คู่ที่ 9-15 (ภาพที่ 35; ตารางที่ 6)

ภาพที่ 33 หอยทากบกชนิด *Achatina fulica*



ภาพที่ 34 แสดงโครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากแอฟริกัน
ชนิด *Achatina fulica*

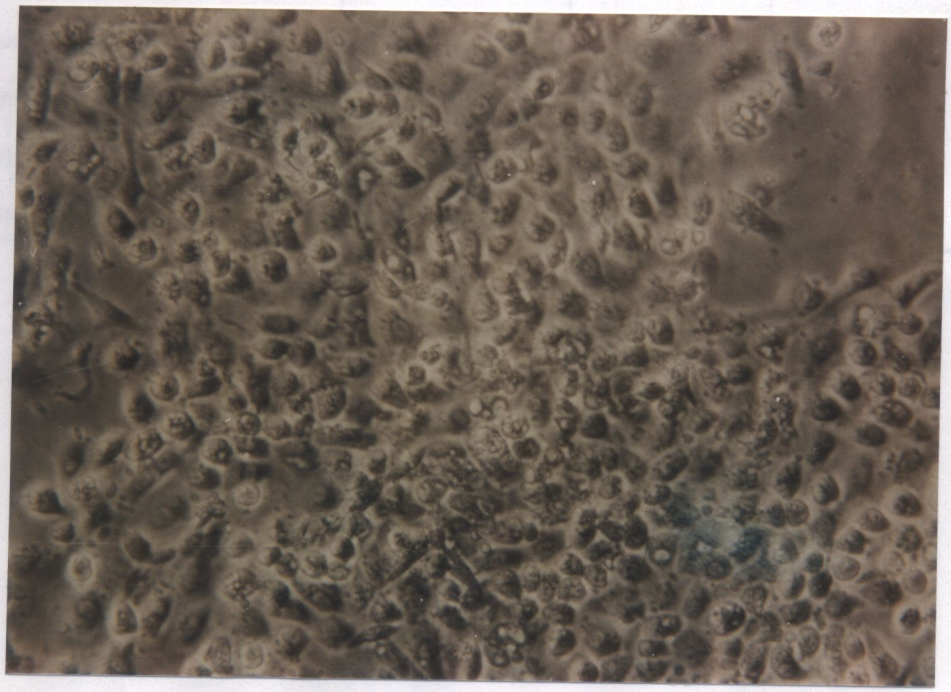


ภาพที่ 35 แสดงคาริโอไทป์จากโครโมโซมของหอยทากแอฟริกัน
ชนิด *Achatina fulica*

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละตัว (TL) เป็นไมโครเมตร จาก 17 เมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากแอฟริกันชนิด *Achatina fulica* ($2\bar{n}$=30)

โครโมโซมคู่ที่	TL $\bar{X} \pm$ S.D.	โครโมโซมคู่ที่	TL $\bar{X} \pm$ S.D.
1	5.971±0.028	9	2.501±0.031
	5.968±0.026		2.492±0.044
2	5.097±0.039	10	2.383±0.044
	5.031±0.035		2.364±0.061
3	4.931±0.043	11	2.268±0.049
	4.927±0.036		2.248±0.063
4	4.803±0.032	12	2.164±0.032
	4.834±0.029		2.156±0.040
5	4.465±0.060	13	2.053±0.046
	4.392±0.040		2.050±0.044
6	3.936±0.025	14	1.998±0.035
	3.924±0.048		1.967±0.038
7	3.697±0.058	15	1.300±0.048
	3.670±0.040		1.268±0.045
8	3.303±0.035		
	3.292±0.033		

เนื่องจากการเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อ ovotestis มักได้โครโมโซมที่รูปร่างไม่เหมาะกับการจัดคาริโอไทป์ จึงได้พยายามเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่ออื่นเพื่อให้ได้โครโมโซมที่ดีขึ้น การศึกษาโครโมโซมโดยวิธีการเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle) พบว่าหลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเริ่มมีเซลล์มาเกาะบริเวณที่พื้นขวดเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 35) หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 72 หลังจากเริ่มเลี้ยงเซลล์ ในขวดเลี้ยงเซลล์จะเริ่มมีการปนเปื้อน (contaminate) สังเกตได้จากการที่ medium ในขวดเริ่มขุ่น และเมื่อนำเซลล์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาเพื่อทำการเตรียมโครโมโซม จากการทดลองหลายครั้งปรากฏว่าไม่สามารถจะทำให้เซลล์แตก จึงไม่สามารถนำโครโมโซมมาจัดคาริโอไทป์ได้ อย่างไรก็ตามถ้าสามารถหาวิธีที่ทำให้เซลล์แตกได้หรือทดลองกับเนื้อเยื่ออื่นอีกในอนาคตก็จะสามารถเตรียมโครโมโซมจากเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ได้และนำมาจัดคาริโอไทป์ได้ดียิ่งขึ้น



ภาพที่ 36 แสดง colony ของเซลล์ที่แบ่งตัวจากเนื้อเยื่อแมนเทิลในขวดเลี้ยงเซลล์ .

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนโครโมโซมของหอยทากบกบางชนิดในบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

สปีชีส์	จำนวนโครโมโซม		สถานที่พบ
	n	2n	
1. Ariophantidae			
Macrochlamys hepbagyla	10	20	#,*
Macrochlamys splendens	10	20	#,*
Hemiplecta distincta	15	30	#,*
Hemiplecta weinkauffiana	29	58	#
Dyakia salagana	25-27	50-54	#,*
Cryptozona siamensis	8	16	*
2. Camaenidae			
Amphidromus atricallosus ชนิด A	24	48	#,*
Amphidromus atricallosus ชนิด B	24-25	48-50	#,*
3.Achatinidae			
Achatina fulica	15	30	*

* เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน

\# เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษาทางอนุกรมวิธานของสัตว์ในกลุ่มหอยทากบกที่ผ่านมาจะพิจารณาจากสัณฐานวิทยาของเปลือกตลอดจนรูปร่างภายนอกและลักษณะทางกายวิภาคเป็นหลัก เช่นในงานของ Aparicio (1982), Solem (1983), Tillier (1989), Giusti et al. (1992), Falniowski et al. (1993), Prieto et al. (1993) และ Naggs (1994) แต่ในบางครั้งพบว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกเพียงอย่างเดียว บางครั้งไม่สามารถตัดสินได้ว่าเป็นหอยชนิดใด เพราะว่าหอยทากบกหลายสปีชีส์มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมาก จึงจำเป็นจะต้องใช้ข้อมูลด้านอื่นมาช่วยในการวิเคราะห์ ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้พยายามศึกษาในระดับลึกลงไปเพื่อต้องการหาความรู้ในระดับโครโมโซม เพื่อจะทำให้ข้อมูลทางอนุกรมวิธานของหอยทากบกมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การศึกษาครั้งนี้เป็นสิ่งที่ต้องใช้ความพยายามเป็นอย่างมาก เริ่มจากในการเก็บตัวอย่างหอยทากบกในป่าซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถเก็บตัวอย่างได้เฉพาะในฤดูฝนและในเวลากลางคืนจะเก็บได้ดีที่สุด การเตรียมโครโมโซมในหอยทากบกหลายสปีชีส์ต้องมีการปรับเปลี่ยนระยะเวลาในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้ได้เมตาเฟสโครโมโซมที่สวยงาม การศึกษาครั้งนี้มีหอยทากบางสปีชีส์ที่พยายามเตรียมโครโมโซมแต่ก็ได้ผลที่ไม่สมบูรณ์ การอภิปรายผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้

โดยสภาพธรรมชาติแล้วพบว่าหอยทากบกจะออกหากินในเวลากลางคืน และส่วนใหญ่จะเก็บได้ในฤดูฝน ซึ่งจะต้องใช้ระยะเวลาหลายเดือนเพื่อให้ได้ตัวอย่างหอยทากบกที่มากพอสำหรับการทำวิจัย

การศึกษาที่ผ่านมานั้นการเตรียมโครโมโซมของหอยทากบกจะเตรียมจากเนื้อเยื่อ ovotestis เท่านั้น เช่นงานของ Butot and Kiauta (1967), Kiauta and Butot (1968) และ Kawano and Leme (1994) หรือในงานด้านโครโมโซมของกลุ่มหอยทากน้ำจืดในอันดับ Basommatophora ได้แก่งานของ Burch (1961), Burch et al. (1964), Burch (1965), Burch and Natarajan (1965) Natarajan

et al. (1965) และ Park (1994) การศึกษาครั้งนี้ได้พยายามทำการทดลองเรื่องการเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อจากหลาย ๆ อวัยวะของหอยทากบกเพื่อเตรียมโครโมโซม โดยใช้เนื้อเยื่อในส่วนของแมนเทิล กล้ามเนื้อเท้า ลำไส้ และ ovotestis ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเนื้อเยื่อแมนเทิลมาทำการเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์ของเนื้อเยื่อแมนเทิลจะแบ่งตัวเร็วกว่าเนื้อเยื่อชนิดอื่น โดยในชั่วโมงที่ 10 หลังจากเริ่มเลี้ยงเซลล์จะเห็นเซลล์เริ่มเกาะเป็นโคโลนี (colony) บริเวณพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นประมาณชั่วโมงที่ 24 จึงนำเซลล์ที่ได้ไปเตรียมโครโมโซม โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าถ้าเลี้ยงโครโมโซมต่อไปหลังจาก 72 ชั่วโมงจะเริ่มตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียและราในขวดเลี้ยงเซลล์ด้วย สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะอาจมีการปนเปื้อนมากับเนื้อเยื่อของหอย ในการเตรียมโครโมโซมนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการเติมสารละลาย colchicine โดยกำหนดระยะเวลาเป็น 30 นาที, 45 นาที, 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเพิ่มเวลาครั้งละ 30 นาที จนถึง 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณสารละลาย colchicine ที่เติมในขวดเลี้ยงเซลล์นั้นจะใช้ปริมาณตั้งแต่ 0.005 % จนถึง 0.02 % ในขั้นตอนการใช้สารละลายที่ทำให้เซลล์บวมนั้นได้ทดลองใช้สารละลายหลาย ๆ ชนิด ได้แก่ 1% โซเดียมซิเตรต 0.01% โซเดียมคลอไรด์ และ 0.075 M KCl โปตัสเซียมคลอไรด์ โดยกำหนดระยะเวลาในการแช่เป็น 30 นาที, 45 นาที, 1 ชั่วโมง และเพิ่มเวลาครั้งละ 15 นาที จนถึง 4 ชั่วโมง ส่วนในขั้นตอนการหยุดการทำงานของเซลล์ (fixation) นั้นได้ทดลองใช้สารละลาย Carnoy's fixative ในอัตรส่วนของเมธานอลต่อกรดอะซิติคเข้มข้นที่ 3:1, 2:1 และ 1:1 ซึ่งหลังจากผ่านขั้นตอนต่าง ๆ แล้ว นำเซลล์ที่ได้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ปรากฏว่าไม่พบเซลล์ในระยะเมตาเฟส ปัญหาที่เกิดขึ้นและค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง การศึกษาเกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์จึงยกเลิกไป การศึกษาโดยวิธีการเลี้ยงเซลล์นี้พบว่ามีความสำเร็จในสัตว์พวกปลา เช่นในงานของ Hartly (1989) ในกลุ่มนก เช่นในงานของ Belterman and De Boer (1984), De Boer and Sinoo (1984) และ Van Dongen and De Boer (1984) ซึ่งสามารถเตรียมเมตาเฟสโครโมโซมที่สวยงามได้

ส่วนเนื้อเยื่อ ovotestis นั้นจุดมุ่งหมายในการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ก็เพื่อให้มีเวลาอยู่ในสารละลาย colchicine ได้นานขึ้นโดยเซลล์ไม่ตาย ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมโครโมโซมนั้น ระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย colchicine จะทดลองใช้ระยะเวลาตั้งแต่ 30 นาที, 40 นาทีและเพิ่มเวลาครั้งละ 10 นาที จนถึง 4 ชั่วโมง และระดับความเข้มข้นของสารละลาย colchicine ใช้ในปริมาณเช่นเดียวกับที่ทดลองในเนื้อเยื่อแมนเทิล และยังทดลองใช้เนื้อเยื่อ ovotestis แช่ในสารละลาย colcemide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยแช่ในระยะเวลาเหมือนสารละลาย colchicine ปรากฏว่าเนื้อเยื่อ ovotestis ของหอยทากบกแต่ละสปีชีส์จะมีระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้

แช่ในสารละลายที่ใช้ยับยั้งการแบ่งเซลล์และชนิดของสารละลายที่ใช้ยับยั้งการแบ่งเซลล์ไม่เหมือนกัน

ผลการศึกษาโครโมโซมในครอบครัว Ariophantidae พบว่าในสกุล *Macrochlamys* นั้นหอยชนิด *Macrochlamys hepbagyla* และ *M. splendens* มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 20 แท่ง แต่มีคาริโอไทป์ต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อศึกษาดูจากลักษณะภายนอกของเปลือกแล้วจะเหมือนกันอย่างมากและเมื่อดูที่ระบบกายวิภาคจะพบว่าลักษณะของกลุ่มอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของทั้งสองสปีชีส์นี้แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (Panha, 1996) ดังนั้นคาริโอไทป์จึงสามารถใช้ในการจำแนกหอยสกุลนี้ในระดับสปีชีส์ได้อย่างสมบูรณ์ จะเห็นได้ว่าการศึกษาอนุกรมวิธานในลักษณะของ Classical Taxonomy นั้นมีความน่าเชื่อถือได้ในกรณีที่ยกตัวอย่างมานี้

ในสกุล *Hemiplecta* จากการศึกษาหอย 2 สปีชีส์คือ *Hemiplecta distincta* และ *H. weinkauffiana* พบว่าจำนวนโครโมโซมมีความแตกต่างกัน โดย *H. distincta* มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 60 ส่วนหอยทากบก *H. weinkauffiana* มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 58 กรณีนี้ก็สอดคล้องกับกรณีแรกคือหอยในสกุลเดียวกันมีความใกล้เคียงกันในเรื่องของจำนวนโครโมโซม เช่นเดียวกับงานของ Vitturi et al.(1995) ที่ศึกษาหอยในกลุ่มหอยขี้นก(Littorinoidea) สกุล *Littorina* จำนวน 2 สปีชีส์ จากทะเลเมดิเตอริเนียน พบว่าหอยทั้ง 2 สปีชีส์ มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 34 ส่วนอีก 2 สปีชีส์ได้แก่หอยทากบก *Dyakia salangana* มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมระหว่าง 50-54 และ *Cryptozona siamensis* มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 16 ซึ่งผลการศึกษาในหอย *Cryptozona siamensis* นี้มีความขัดแย้งกับข้อสรุปของ Patterson and Burch (1978) ที่สรุปว่าหอยทากบกในครอบครัว Ariophantidae พบว่ามีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมอยู่ระหว่าง 50-64

ในครอบครัว Camaenidae ศึกษาในสปีชีส์ *Amphidromus atricallosus* ใน แบบA และแบบ B ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีความแปรผันมากในเรื่องสีของเปลือก จากการศึกษา พบว่าแบบ A มีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 48 ส่วนแบบ B เมตาเฟสโครโมโซมที่เตรียมได้กระจายตัวไม่ดีแต่จากการนับ จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมจะมีค่าระหว่าง 48-50 จากรายงานของ Patterson and Burch (1978) หอยทากบกในครอบครัว Camaenidae ที่มีการศึกษาไปแล้วมีจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมระหว่าง 54-58

ในหอยทากแอฟริกันชนิด *Achatina fulica* ผลการศึกษานี้ได้จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมต่างจากสรุปของ Burch (1967) ที่ว่าหอยทากบกในครอบครัว Achatinidae นั้นมีค่าดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 60 ผลการศึกษาที่ได้มีความแตกต่างจากรายงานดังกล่าวค่อนข้างมาก ทั้งนี้ได้มีการศึกษาในหอยเป็นจำนวนมากและทำซ้ำหลายครั้งเนื่องจากหอยสปีชีส์นี้หาได้ง่าย ผลการศึกษาดังกล่าวจึงเป็นความรู้ใหม่ที่จะได้นำลงพิมพ์ในวารสารวิชาการเพื่อเผยแพร่ต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้โครโมโซมที่ได้นั้นส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นแท่งกลมหรือโค้งซึ่งเป็นไปตามข้อสรุปของ Inaba (1969) แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าหอยชนิด *Macrochlamys hepbagyla* และ *M. splendens* สามารถเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อ ovotestis แล้วได้โครโมโซมที่เป็นคู่ที่สามารถมองเห็นเซนโทรเมียร์อย่างชัดเจน ทำให้การศึกษาครั้งนี้สามารถค้านข้อสรุปดังกล่าวได้แต่ผลการศึกษาที่ได้ส่วนใหญ่ยังคงเป็นไปตามข้อสรุปเดิม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีหอยบางชนิดที่สามารถนำมาเตรียมโครโมโซมได้ดีสามารถจัดคาริโอไทป์ได้ อันเป็นข้อมูลที่จะใช้เป็นแนวทางในการศึกษาคาริโอไทป์ของหอยทากบกชนิดอื่น ๆ ต่อไป เพื่อให้มีข้อมูลเกี่ยวกับคาริโอไทป์ของหอยทากบกในประเทศไทยให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ การศึกษาโครโมโซมในระดับต่อไป ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านการย้อมแถบสี(Banding) บนโครโมโซม เช่น แถบสี-ซี (C-Banding), แถบสี-จี (G-Banding) และ แถบสี-คิว (Q-Banding) เป็นต้น (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2536) เพื่อให้สามารถจัดคาริโอไทป์ได้ถูกต้อง ซึ่งจะทำให้สามารถศึกษาอนุกรมวิธานได้ละเอียดถึงระดับวิวัฒนาการของหอยทากบกทุก ๆ ครอบครัวได้อย่างสมบูรณ์

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาคาริโอไทป์ของหอยทากบกในอันดับ Stylommatophora จำนวน 8 สปีชีส์ ซึ่งเก็บจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว ได้ผลดังนี้

1. ครอบครัว Ariophantidae

1.1 ในสกุล *Macrochlamys* ศึกษาจำนวน 2 สปีชีส์ พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากันคือ 20 โดย *Macrochlamys hepbagyla* มีจำนวนโครโมโซมชนิด metacentric 5 คู่ ชนิด submetacentric 1 คู่ และชนิด telocentric 4 คู่ โครโมโซมแบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 6 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 4 คู่ ส่วน *M. splendens* มีจำนวนโครโมโซมชนิด metacentric 8 คู่ และชนิด submetacentric 2 คู่ โครโมโซมแบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 9 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 1 คู่

1.2 สกุล *Hemiplecta* ศึกษา 2 สปีชีส์ได้แก่ *Hemiplecta distincta* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซม 60 แบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 9 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 21 คู่ ส่วน *H. weinkauffiana* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 58

1.3 สกุล *Dyakia* ศึกษา 1 สปีชีส์คือ *Dyakia salangana* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมระหว่าง 50-54

1.4 สกุล *Cryptozona* ศึกษา 1 สปีชีส์คือ *Cryptozona siamensis* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 16 จัดเป็นโครโมโซมชนิด metacentric 4 คู่ ชนิด submetacentric 1 คู่ ชนิด subtelocentric 1 คู่ และชนิด telocentric 2 คู่ และเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ทั้งหมด

2. ครอบครัว Camaenidae

ศึกษาในสกุล *Amphidromus* ได้แก่ *Amphidromus atricallosus* แบบ A และแบบ B ผลการศึกษา แบบ A พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 48 จัดเป็นโครโมโซมชนิด

metacentric 5 คู่ ชนิด submetacentric 6 คู่ ชนิด subtelocentric 2 คู่ และชนิด telocentric 11 คู่ ชนิดของโครโมโซมแบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 12 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 12 คู่ ส่วนแบบ B จำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมมีค่าระหว่าง 48-50

3. ครอบครัว Achatinidae

ศึกษา 1 สปีชีส์ คือ *Achatina fulica* พบจำนวนดิพพลอยด์โครโมโซมท่ากับ 30 ชนิดของโครโมโซมแบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 8 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 7 คู่

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กตัญญู รักมิตร. 2535. **การศึกษาโครโมโซมในหอยโข่งทะเลของไทยชนิด *Haliotis ovina* (Gmelin,1790).** ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กัลยา วานิชย์บัญชา. 2539. **หลักสถิติ.** พิมพ์ครั้งที่ 3 . กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนพันธุ์ ปัทมานนธุ์. 2528. **วงจรชีวิตและการเจริญเติบโตของหอยเอสคาร์โกต์ (*Helix aspersa* Muller 1774) ที่เลี้ยงในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปวีณา ชูชื่น. 2538. **คาริโอไทป์ในหอยมือเสือชนิด *Tridacna squamosa*.** ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พงษ์ศักดิ์ พลเสนา. 2536. **ป่ารอยต่อ 5 จังหวัด: ป่าดงดิบที่ลุ่มต่ำผืนสุดท้ายของไทย.** เอกสารต่อการสัมมนา "ป่าไม้และชุมชน" วันที่ 30 กันยายน - 1 ตุลาคม 2536 ศูนย์อบรมวนศาสตร์ชุมชนแห่งภูมิภาคเอเชียแปซิฟิค มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชุวรรณ ตั้งพงศ์ปราชญ์. 2536. **การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของหอยนางรมชนิดหอยนางรมปากจีบ, หอยตะโกรมกรามดำและหอยตะโกรมกรามขาว.** ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: เจ้าพระยาการพิมพ์.

สมศักดิ์ ปัญหา, นฤคล มัธยัสถ์สุข, พงษ์ศักดิ์ พลเสนา และ Daan Smits.2537. หอยทากบกที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน. **เอกสารประกอบการสัมมนาสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 15** 14-16 ธันวาคม พ.ศ.2537 ณ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Abbot, R. T. 1989. **Compendium of land shells.** American Malacologist, Inc, Melbourue, Australia.

Ahmed, M. and Sparks, A. K. 1970. Chromosome number,structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. **The Biological Bulletin.** 138(1): 1-13.

Aparicio, M. T. 1982. Observations on the anatomy of some Helicidae from central Spain. **Malacologia.** 22(1-2): 621-626.

Belterman, R. H. R. and De Boer, L. E. M. 1984. A karyological study of 55 species of birds, including karyotypes of 39 species new to cytology. **Genetica.** 65:39-82.

Birstein, V. J. and Mikhailova, N. A. 1990. On the karyology of trematodes of the genus Microphallus and this intermediate host,*Littorina saxatilis* II. karyological study of *Littorina saxatilis* (Gastropoda:Prosobranchia). **Genetica.** 58: 93-107.

Borsa, P. and Thiriot-Quievreux, C. 1990. Karyological and allozymic characterization of *Ruditapes philippinarum, R.aureus* and *R. decussatus* (Bivalvia,Veneridae). **Aquaculture.** 90: 209-227.

Burch, J. B. 1961. The chromosome of *Planorbarius corneus* (Linnaeus),with a discussion on the value of chromosome numbers in snail systematics. **Basteria.** 25(4): 45-76.

Burch, J. B. 1965. Cytotaxonomic studies of freshwater limpets (Gastropoda: Basommatophora) **Malacologia.** 2(2): 253-258.

Burch, J. B. 1967. Cytological relationships of some Pacific gastropods. **Venus.** 25(3-4): 118-135.

Burch, J. B. and Natarajan, R. 1965. Cytological studies of Taiwan freshwater pulmonate snails **Bulletin Institute of Zoology., Academia Sinica.** 4: 11-17.

Burch, J. B., Williams, J.E., Hishinuma, Y. and Natarajan, R. 1964. Chromosome of some Japanese freshwater snails(Basommatophora:Branchiopulmonata). **Malacologia.** 1(3): 403-415.

Butot, L. J. M. and Kiauta, B. 1967. The chromosomes of *Catinella arenaria*

(Bouchard-Chantereaux,1837) with a review of the cytological conditions within the genus *Catinella* and considerations of the phylogenetic position of the Succineoidea ord. nov. (Gastropoda: Euthyneura. **Beaufortia.** 14(174): 157-164.

Cornet, M. and Soulard, C. 1990. Chromosome number and karyotype of *Donax trunculus* L. (Mollusca: Bivalvia, Tellinacea). **Genetica.** 82: 93-97.

De Boer, L. E. M. and Sinoo, R. P. 1984. A karyological study of Accipitridae (Aves: Falconiformes), with karyotypic descriptions of 16 species new to cytology. **Genetica.** 65: 89-107.

Dussart, G. 1989. Slugs and snails and scientists tales. **New Scientist.** 22 July 1989, pp. 37-41.

Ewer, M. 1964. An analysis of the molluscan hosts of the trematodes of birds and mammals and some speculations on host-specificity. **Parasitology.** 54: 571-578.

Falniowski, A., Kozik, A., Szarowska, M., Rapata-Kozik, M. and Turyna, I. 1993. Morphological and allozymic polymorphism and differences among local populations in *Bradybaena fruticum* (O.F. Muller, 1777)(Gastropoda: Stylommatophora: Helicoidea). **Malacologia.** 35(2): 371-388.

Giusti, F., Manganelli, G. and Crisci, J.V. 1992. A new problematical Hygromiidae from the Aeolian islands (Italy)(Pulmonata: Helicoidea). **Malacologia.** 34(1-2): 107-128.

Hartley, S. E. 1989. Chromosomes and constitutive heterochromatin distribution in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) (Pisces: Salmonidae). **Genetica.** 79: 161-166.

Hegner, R. W. 1961. **Invertebrate Zoology.** Mcmillan, New York.

Ieyama, H. and Inaba, A. 1974. Chromosome numbers of ten species in four families of Pteriomorphia (Bivalvia). **Venus.** 33(3): 129-137.

Inaba, A. 1969. Cytotaxonomic studies of lymnaeid snails. **Malacologia.** 7(2-3): 143-168.

Inaba, A. 1969. Some chromosome of Stylommatophora. **Journal Science of Faculty of Science, Hiroshima University.** 146-162.

Insua, A. and Thiriot-Quievreux, C. 1991. The characterization of *Ostrea* denselamellosa (Mollusca,Bivalvia) chromosomes: karyotype,constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. **Aquaculture.** 97: 317-325.

Janson, K. 1983. Chromosome number in two phenotypically distinct populations of

Littorina saxatilis Olivi, and in specimens of the *Littorina obtusata* (L.) species complex. **Journal of Molluscan Studies.** 49: 224-227.

Kawano, T. and Leme, J. L. M. 1994. Chromosomes of three species of *Megalobulimus* (Gastropoda: Mesurethra: Megalobulimidae) from Brazil. **Malacological Review.** 27: 47-52.

Kerny, M. P. and Cameron, R. A. D. 1979. **A field guide to the land snails of Britain and north-west Europe.** Glasgow: William Collins Sons and Co Ltd.

Kiauta, B. and Butot, L. J. M. 1968. The chromosomes of *Succinea (Succinella) oblonga* Draparnaud,1801,with considerations on the status of subgenus *Succinella* Mabille,1870 (Gastropoda, Euthyneura: Succineoidea). **Beaufortia.** 16(210): 1-11.

Komatsu, S. 1988. Karyotype of *Omphalius rusticus* (Gmelin) (Gastropoda: Trochidae). **Venus.** 47(1): 57-61.

Mevatee, U. 1975. **Chromosome polymorphism in the Thai population.** M.S.Thesis Mahidol University.

Moynihan, E. P. and Mahon, G.A.T. 1983. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis* L. **Aquaculture.** 33: 301-309.

Naggs, F. 1994. The reproductive anatomy of *Paropeas achatinaceum* and a new concept of *Paropeus* (Pulmonata: Achatinoidea: Subulinidae). **Journal of Molluscan Studies.** 60: 175-191.

Nakamura, H. K. 1986. Chromosomes of Archaeogastropoda (Mollusca: Prosobranchia), with some remarks on their Cytotaxonomy on Phylogeny. **The Seto Marine Biological Laboratory.** 31(3/6): 191-267.

Natarajan, R., Burch, J. B. and Gismann, A. 1965. Cytological studies of Planorbidae (Gastropoda: Basommatopho) II. some African Planorbinae,Planorbininae and Bulininae. **Malacologia.** 2(2): 239-251.

Panha, S. 1988. Breeding data of a Thai edible land snail,*Hemiplecta distincta*. **Venus.** 46(1):25-34.

Panha, S . 1991. Natural infection of the rat lungworm *Angiostrongyrus cantonensis*

in a Thai edible land snail,*Hemiplecta distincta*. **The Papustyla.** 5(5): 9-10.

Panha, S . 1994. Biology of Thai edible land snail *Hemiplecta distincta*(Pfeiffer,1850) (Gastropoda:Ariophantidae). **The Papustyla** 8(5): 4-15.

Panha, S . 1996. A checklist of land pulmonate snails of Thailand. **Walkerana.** 8(in press).

Panha, S. and Thanamitramanee, P. 1997. Land snails of Philu National Park, Thailand . **The Papustyla.** 11(2): 1-3.

Park, G. M. 1994. Cytotaxonomy studies of gastropods in Korea. **Malacological Review.** 27: 23-41.

Patterson, C. M. 1965. The chromosome of *Tulotoma angulata* (Streptonura: Viviparidae) **Malacologia.** 2(2): 259-265.

Patterson, C. M. and Burch, J. B. 1966. The chromosome cycle in the land snail *Catinella vermata* (Stylommatophora: Succineidae). **Malacologia.** 3(3): 309-325.

Patterson, C. M. and Berch, J. B. 1978. Chromosome of pulmonate molluscs.**In V.Fretter and J.Peake eds., Pulmonate.** vol 2,171-217. Academic Press, New York.

Prieto, C. E., Puente, A. I., Altonaga, K. and Gomez, B. J. 1993. Genital Morphology of *Caracollina lenticula* (Michaud, 1831), with a new proposal of classification of Helicodontoid genera (Pulmonata: Hygromioidea). **Malacologia.** 35(1): 63-77.

Thiriot-Quievreux, C. 1988. Chromosome studies in pelagic opisthobranch molluscs. **Canadian Journal of Zoology.** 66: 1460-1473.

Thiriot-Quievreux, C., Albert, P. and Soyer, J. 1991. Karyotypes of five Subantarctic bivalve species. **Journal of Molluscan Studies.** 57: 59-70.

Raghunathan, L. 1976. The karyotype of *Biomphalaria glabrata*,the snail vector of *Schistosoma mansoni*. **Malacologia.** 15(2): 447-450.

Ramos, M. A. and Aparicio, M. T. 1985. A cytotaxonomic studies of some Spainish and Portuguese Helicidae (Pulmonata: Geophila). **Malacological Review.** 18: 73-82.

Shea, M. 1994. Snail and slug eating snakes,part 1. **The Papustyla.** 8(6): 6-8.

Solem, A. 1966. Some non-marine mollusks from Thailand, with notes on classification of the Helicarionidae. **Journal Spolia Zoolologica Musei Hauniensis.** 24: 114 pp.

Solem, A. 1983. First record of *Amphidromus* from Austraria anatomical notes on several species (Mollusca: Pulmonata: Camaenidae). **Record of the Australian Museum.** 35: 153-166.

Tillier, S. 1989. Comparative morphology, Phylogeny and classification of land snails and slugs (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). **Malacologia.** 30(1-2): 1-303. 30(1-2): 1-303.

Ullerich, F. H. 1966. Karyotype and DNS-gehalt von *Bufo bufo, B. viridis* and *B.calamita* (Amphibian, Anura). **Chromosoma.** 18: 316-342.

Upatham, E. S., Kruatrachue, M. and Baidikul, V. 1988. Cultivation of the giant African snail, *Achatina fulica.* **Journal of The Science Society of Thailand.** 14: 25-40.

Van Dongen, M. W. M. and De Boer, L. E. M. 1984. Chromosome studies of the families Cacatuidae and Psittacidae (Aves: Psittaciformes). **Genetica.** 65: 109-117.

Vitturi, R., Catalano, E. and Macaluso, M. 1986. Chromsome studies in three species of the gastropod Superfamily Littorinoidea. **Malacological Review.** 19: 53-60.

Vitturi, R., Catalano, E., Macaluso, M. and Zava, B. 1988. The karyology of *Littorina neritoides* (Linnaeus,1758)(Mollusca, Prosobranchia). **Malacologia.** 29(2): 319-324.

Vitturi, R., Libertini, A., Panozzo, M. and Mezzapelle, G. 1995. Karyotype analysis and genome size in three Mediterranean species of periwinkles (Prosobranchia: Mesogastropoda). **Malacologia.** 37(1): 123-132.

Vitturi, R., Maiorca, A. and Catalano, E. 1983. The karyology of *Teredo utriculus* (Gmelin) (Mollus; Pelecypoda). **Biological Bulletin.** 165: 450-457.

Wada, K. 1978. Chromosome karyotypes of three bivalves: the oysters, *Isognomon alatus* and *Pinctada imbricata*, and the bay scallop, *Argopecten irradians irradians.* **Biological Bulletin.** 155: 235-245.

Solem, A. 1983. First record of *Amphidromus* from Austraria anatomical notes on several species (Mollusca: Pulmonata: Camaenidae). **Record of the Australian Museum.** 35: 153-166.

Tillier, S. 1989. Comparative morphology, Phylogeny and classification of land snails and slugs (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). **Malacologia.** 30(1-2): 1-303. 30(1-2): 1-303.

Ullerich, F. H. 1966. Karyotype and DNS-gehalt von *Bufo bufo, B. viridis* and *B.calamita* (Amphibian, Anura). **Chromosoma.** 18: 316-342.

Upatham, E. S., Kruatrachue, M. and Baidikul, V. 1988. Cultivation of the giant African snail, *Achatina fulica.* **Journal of The Science Society of Thailand.** 14: 25-40.

Van Dongen, M. W. M. and De Boer, L. E. M. 1984. Chromosome studies of the families Cacatuidae and Psittacidae (Aves: Psittaciformes). **Genetica.** 65: 109-117.

Vitturi, R., Catalano, E. and Macaluso, M. 1986. Chromsome studies in three species of the gastropod Superfamily Littorinoidea. **Malacological Review.** 19: 53-60.

Vitturi, R., Catalano, E., Macaluso, M. and Zava, B. 1988. The karyology of *Littorina neritoides* (Linnaeus,1758)(Mollusca, Prosobranchia). **Malacologia.** 29(2): 319-324.

Vitturi, R., Libertini, A., Panozzo, M. and Mezzapelle, G. 1995. Karyotype analysis and genome size in three Mediterranean species of periwinkles (Prosobranchia: Mesogastropoda). **Malacologia.** 37(1): 123-132.

Vitturi, R., Maiorca, A. and Catalano, E. 1983. The karyology of *Teredo utriculus* (Gmelin) (Mollus; Pelecypoda). **Biological Bulletin.** 165: 450-457.

Wada, K. 1978. Chromosome karyotypes of three bivalves: the oysters, *Isognomon alatus* and *Pinctada imbricata*, and the bay scallop, *Argopecten irradians irradians.* **Biological Bulletin.** 155: 235-245.

ประวัติผู้เขียน

นายนฤดล มัธยัสถ์สุข เกิดเมื่อวันที่ 24 พฤศจิกายน 2512 ที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สำเร็จการศึกษาได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีครินทรวิโรฒประสานมิตร ในปีการศึกษา 2534 ทำงานในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ฝ่ายผลิตเยื่อกระดาษที่ บริษัท ฟินิค พัลพ แอนด์ เปเปอร์ จำกัด ระหว่าง เดือน กรกฎาคม 2535- เดือน พฤษภาคม 2536 เข้าศึกษาต่อขั้น ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2536 ระหว่างการศึกษาได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ/ สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ BRT 539003)