

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของหอยเชอรี่ที่แพร่ระบาดในเขตภาคกลางของ
ประเทศไทยในระดับโมเลกุลโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

บทคัดย่อ
ของ
สมณรัตน์ จันท์ขาว

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

สมณรัตน์ จันทรขาว. (2547). การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของหอยเชอรี่ที่แพร่

ระบาดในเขตภาคกลางของประเทศไทยในระดับโมเลกุลโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ
เรส. ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรวัฒน์
ศุภศิริ, รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี วัฒนโกคาสิน, รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ สร้างปิน.

เนื่องจากการระบาดของหอยเชอรี่ (Golden Apple Snail) ในพื้นที่เกษตรกรรมในเขต
ภาคกลาง ได้ก่อความเสียหายในวงกว้างทั้งทางด้านการเกษตร ตลอดจนผลกระทบทางด้าน
เศรษฐกิจ อันเนื่องมาจากการสูญเสียของผลผลิตทางการเกษตร การศึกษาครั้งนี้จึงเก็บรวบรวม
หอยเชอรี่ในเขตภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา และ
กรุงเทพฯ ซึ่งสามารถแยกหอยเชอรี่ตามลักษณะทางกายภาพได้ 5 ลักษณะ คือ 1) ลักษณะตัวดำ-
เปลือกดำ มีลาย 2) ลักษณะเปลือกดำ-ตัวดำ ไม่มีลาย 3) ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวดำ 4)
ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวเหลือง 5) ลักษณะเปลือกดำ ตัวเหลือง จากนั้นทำการสกัด DNA จากไข่
ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่
พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ตำแหน่งยีน 18S rRNA จากนั้นหาลำดับเบสของหอยเชอรี่ทั้ง
5 ลักษณะ และทำ sequence alignment ของ 18S rRNA เปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม Clustal
W พบลำดับเบสบางส่วนของหอยเชอรี่ที่เหมือนกัน ในสัดส่วนที่ไม่เท่ากันแล้วสร้าง phylogenetic
trees พบว่า หอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ มีความเหมือนและแตกต่างกันของเบสหลายตำแหน่ง และ
พบว่า หอยเชอรี่ลักษณะที่ 2 และหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกัน (72%)

Study of biodiversity of golden apple snail in central part of Thailand by
polymerase chain reaction

AN ABSTRACT
BY
SAMONRUT CHANKAO

Presented in partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

Samonrut Chankao. (2004). *Study of biodiversity of golden apple snail in central part of Thailand by polymerase chain reaction*. Master thesis, M.Ed (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc.Prof.Dr.Thararat Supasiri, Assoc.Prof.Dr.Yuwadee Watanapokasin, Assoc.Prof.Dr.Somsak Sarunkbin.

Golden apple snail are plant pest which spread in many regions of Thailand and spacious damage farming including effect to economic system because the products of farming are lose. This work is to collect Golden apple snail from the central region of Thailand including example Pratumtani, Ayutthaya and Bangkok. From phenotype selection can be divided into 5 types 1) black trunk-black shell and banded shell 2) black trunk-black shell no banded shell 3) black trunk and yellow shell 4) yellow trunk and black shell 5) yellow trunk and yellow shell. DNA from egg of Golden apple snail was extracted. Then DNA extraction was carried out prior to PCR amplification using primer for 18s ribosomal DNA .PCR products were obtained and sequenced. The nucleotide sequences of 18s rRNA were aligned against Golden apple snail into 5 types using Clustal W program.Phylogenetic analyses were accomplished using PHYLIP version3.573c program . Result showed that DNA sequences of Golden apple snail are different and Golden apple snail type 2 and Golden apple snail type 4 show 72% homology

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่ง
จาก รศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศลสิน ,รศ.ดร.สมศักดิ์ สว่างสิน และรศ.ดร.ธรรวรัตน์ ศุภศิริ ผู้วิจัยขอกราบ
ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
และห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณา
ให้ใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสารเคมี

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้ความสนใจมาโดยตลอด

สมณรัตน์ จันทรวง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
3 วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	24
อุปกรณ์และสารเคมี	24
วิธีดำเนินการ.....	26
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	32
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	49
สรุปและอภิปรายผลการศึกษาค้นคว้า.....	49
ข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก.....	58
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	60

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ความเข้มข้นของ agarose ที่ใช้ในการวิเคราะห์ DNA ขนาดต่าง ๆ กัน	14
2 Buffer สำหรับ electrophoresis	17
3 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction.....	30
4 ปริมาณ GC ของหอยเชอร์รี่ทั้ง 5 ลักษณะ.....	49
5 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 2,3,4,5 เมื่อ เปรียบเทียบกับหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 1.....	50
6 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 3,4,5 เมื่อ เปรียบเทียบกับหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 2.....	50
7 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 4,5 เมื่อ เปรียบเทียบกับหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 3.....	51
8 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 5 เมื่อ เปรียบเทียบกับหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 4.....	51

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

จากอดีตจนถึงปัจจุบัน เป็นที่ทราบดีว่าประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและปลูกข้าวเลี้ยงคนทั้งประเทศ และยังส่งออกต่างประเทศ เป็นพืชเศรษฐกิจอีกด้วย จะเห็นได้ว่าข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย มีการทำนาปลูกข้าวกันอยู่ทั่วไป ปัญหาที่สำคัญของการทำนาปลูกข้าวที่มีอยู่หลายอย่าง เช่น ลมฟ้าอากาศ แร่ธาตุในดิน และศัตรูพืช ศัตรูของข้าวมีอยู่หลายชนิด เช่น หนูนา หนูนก ที่กัดกินข้าว ทำให้ข้าวได้รับความเสียหายมากมาย แต่ก็ยังไม่เท่ากับศัตรูข้าวที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง ซึ่งมีรายงานว่าเป็นปี 2531 พบหอยชนิดหนึ่ง (นันทิยา โพธิ์สวัสดิ์, 2543 : 15) เป็นหอยที่กัดกินต้นข้าว นั่นคือ หอยเชอรี่ ทำให้ชาวนาไทยประสบปัญหาหนักกว่าเดิม

หอยเชอรี่ (Golden Apple Snail) มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า หอยโข่งอเมริกาใต้ หรือเป้าฮื้อน้ำจืด หอยเชอรี่ไม่ใช่หอยประจำถิ่นฐานของประเทศไทย แต่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ เข้ามาในประเทศไทยโดยมีผู้นำเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่น และฟิลิปปินส์ โดยในปี 2523 ประเทศญี่ปุ่นได้มีการเลี้ยงฟาร์มหอยเชอรี่ทางตอนใต้ของประเทศ แต่ไม่เป็นที่นิยมจึงไม่มีตลาดรองรับ อีกทั้งหอยเชอรี่ก็เจริญเติบโตและสืบพันธุ์ได้เร็วมาก เพราะหอยเชอรี่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีมาก จึงมีการปล่อยหอยเชอรี่ทิ้งลงสู่แหล่งน้ำต่าง ๆ นำมาซึ่งความเสียหายแก่ต้นข้าว และพืชน้ำต่าง ๆ ในปี 2526 กระทรวงเกษตรของประเทศไทย จึงมีประกาศให้หอยเชอรี่เป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่ง และห้ามนำเข้ามาในประเทศไทย ต่อมาในปี 2529 พบว่าหอยเชอรี่ได้แพร่กระจายไปทั่วประเทศ ในปี 2523-2526 ประเทศฟิลิปปินส์มีการนำเข้าหอยเชอรี่จากประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศไต้หวัน เพื่อมาเลี้ยงเป็นอาหาร แต่หอยเชอรี่ได้แพร่กระจายอย่างรวดเร็วลงสู่แหล่งน้ำ จนกระทั่งได้รับความเสียหายแก่ต้นข้าว ในบางพื้นที่เสียหายสูงถึง 93% ในฮ่องกงมีการนำเข้าหอยเชอรี่เข้าประเทศในปี 2528 และเวียดนามมีการนำเข้าหอยเชอรี่เข้าประเทศในปี 2531 ซึ่งปัจจุบันประเทศเหล่านี้ได้รับความเสียหายอันเนื่องมาจากหอยเชอรี่กันอย่างมากมาย เช่นเดียวกับประเทศไทยโดยพบว่าในปี 2525-2526 มีการนำเข้าหอยเชอรี่เข้ามาจากประเทศญี่ปุ่นและประเทศฟิลิปปินส์ เพื่อนำมาเลี้ยงส่งขายญี่ปุ่น และเลี้ยงเป็นหอยสวยงามตามตู้ปลา ในปี 2530 พบว่ามีการแพร่ระบาดของหอยเชอรี่ที่แปลงทดลองของสถานีทดลองข้าว บางเขน กรมวิชาการเกษตร ในปี 2531 มีการรายงานการระบาดของหอยเชอรี่ครั้งแรกในนาข้าว ท้องที่หมู่ 7 ต. ศรีชะชะจะเข้ อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ (พูลสุข หุทัยธนาสันต์, 2542 : 150) ปัจจุบันพบว่าหอยเชอรี่ระบาดและทำลายนาข้าวไปเกือบทั่วประเทศแล้ว นอกจากนี้ หอยเชอรี่ยังเป็นโฮสต์ตัวกลาง (intermediate host)

ของพยาธิใบไม้ *Echinostoma ilocanum* เช่นเดียวกับหอยโข่งบ้านเรา (Keawjam. 1986 : 63) และยังเป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิตัวกลม *Angiostrongylus cantanensis* (ปัทมา แซ่กิม. 2543 : 19) ซึ่งจะเข้าสู่ร่างกายของคนที่เป็นโรคเนื้อหอยดิบ ๆ ถ้าหอยมีพยาธิอยู่ ตัวอ่อนของพยาธิจะเข้าสู่ร่างกายคน หากไปอยู่ที่สมองจะเกิดมีอาการเยื่อหุ้มสมองบวมอักเสบ มีอาการปวดศีรษะ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน คอแข็ง ถ้าพยาธิไชเข้าลูกตาทำให้ตาบอดได้ (ชมพูนุช จรรยาเพศ; ทักษิณ อาชาวาคม; และ ทรงทัพ แก้วตา. 2534 : 98)

ในปัจจุบันหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้เข้ามาช่วยเหลือเกษตรกร ในการหาทางกำจัดหอยเชอรี่ โดยกองกัญและสัตววิทยาได้ให้คำแนะนำวิธีที่ได้ผลมีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม คือ การป้องกันและกำจัดแบบวิธีผสมผสาน หลักการก็คือให้ใช้วัสดุกันทางที่ให้น้ำเข้านา ทำลายไข่และตัวหอย และควบคุมระดับน้ำร่วมกับการใช้สารฆ่าหอย เพื่อทำลายหอยที่จำศีลอยู่ในนา คำแนะนำของกองกัญและสัตววิทยาได้นำไปเผยแพร่ใช้ในช่วงการระบาดของหอยเชอรี่เมื่อปี 2538 แต่ยังไม่ได้ดีเท่าที่ควร ทั้งนี้มีสาเหตุหลายประการ สาเหตุหนึ่งที่สำคัญคือความสามารถในการแพร่พันธุ์ของหอยสูงมาก และความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมของหอยเชอรี่เองและการจำศีล จึงมีการศึกษาป้องกันและกำจัดอื่น ๆ นอกเหนือจากคำแนะนำของกองกัญและสัตววิทยา เป็นต้นว่า การนำหอยมาใช้ประโยชน์ (สมศักดิ์ เพ็ชรปานกัน. 2542 : 9-3) การจัดการทางสรีรวิทยาและชีววิทยา การใช้สารสกัดจากพืช (นิตยา เลาหะจินดา; และคนอื่นๆ. 2542 : 2-1) และการใช้ตัวห้ำ คือมวนแมงดาสวน (สยาม อรุณศรีมรกต. 2542 : 10-1) ขณะเดียวกันชาวนาพยายามคิดค้นวิธีกำจัดหอยด้วยตนเอง และได้เลือกใช้ endosulfan ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงในการฆ่าหอย และได้มีการบอกต่อ ๆ กัน จนมีการใช้อย่างแพร่หลายจึงเป็นการใช้สารฆ่าแมลงผิดประเภทและไม่ใช้สารตามคำแนะนำของหน่วยงานราชการ โดยไม่คำนึงถึงอันตรายที่เกิดจากการใช้สารชนิดนี้ ที่มีพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำ เพราะมีความเป็นพิษต่อปลาสูงมาก (Hartley; & Hamish. 1991 : unpagged) สำหรับการป้องกันสิ่งมีชีวิตในน้ำ ในประเทศไทย สาร endosulfan ได้ขึ้นทะเบียนเป็นสารกำจัดแมลงที่ใช้กับพืชไร่เท่านั้น แต่ในปัจจุบัน หอยเชอรี่ยังเป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกร เนื่องจากยังขาดการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่อย่างจริงจังและต่อเนื่องของเกษตรกร แต่อย่างไรก็ตาม การพัฒนาการกำจัดหอยเชอรี่ให้หมดไป โดยใช้ทางด้าน DNA น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีได้

การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่นิยมศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยา ซึ่งวิธีการนี้ต้องใช้เวลานานและผู้เชี่ยวชาญสูง นอกจากนี้การศึกษาทางสัณฐานวิทยาเป็นการศึกษาลักษณะภายนอก (phenotype) ที่ปรากฏ ซึ่งได้รับอิทธิพลที่มีความสามารถจากยีน หรือสารพันธุกรรมร่วมกับสิ่งแวดล้อม แต่ลักษณะที่พบเห็นจากรูปลักษณะภายนอกนี้ไม่ใช่ตัวบ่งชี้ถึงความแตกต่างระหว่างชนิดและรูปลักษณะภายใน (genotype) ชนิดของสิ่งแวดล้อมโดยตรง ปัจจุบันมีการนำเทคนิคต่าง ๆ หลาย

วิธีมาใช้เพื่อการบ่งชี้ และจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุล หรือระดับยีน เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความละเอียดและถูกต้องสูง ซึ่งข้อมูลในระดับโมเลกุลนี้ เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของลักษณะภายนอก โดยอาศัยหลักการจัดเรียงตัวของลำดับเบสใน rRNA สิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ (species) มีลักษณะที่เฉพาะในสายพันธุ์นั้น ๆ rRNA จัดเป็น species specific marker คือจะมีลำดับการเรียงตัวของเบสเหมือนกันในสายพันธุ์เดียวกัน และแตกต่างกันในต่างสายพันธุ์ จึงสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ (ปัทมาภรณ์ ศิริมา; และสุนันทา พวยแก้ว. 2541:4)

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. ศึกษาและรวบรวมสายพันธุ์ของหอยเชอรี่ที่พบในภาคกลางของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของหอยเชอรี่ที่พบในภาคกลางของประเทศไทย
3. เพื่อจำแนกชนิดของหอยเชอรี่โดยใช้เทคนิค PCR

ความสำคัญของการวิจัย

1. เป็นแนวทางในการบ่งชี้ชนิดของหอยเชอรี่ที่พบในภาคกลาง
2. ทราบถึงความหลากหลายในระดับโมเลกุลของหอยเชอรี่
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาวิธีการควบคุมปริมาณหอยเชอรี่ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. จำแนกหอยเชอรี่ตามลักษณะภายนอกที่เห็น
2. ทำการเพิ่มปริมาณของ DNA โดยเทคนิคของ PCR ในช่วงของยีนที่สนใจ
3. เปรียบเทียบผลผลิตภัณท์ของการทำ PCR ระหว่างหอยเชอรี่แต่ละลักษณะว่ามีความเหมือนหรือต่างกันอย่างไรด้วยการหาลำดับเบส
4. จำแนกสายพันธุ์ของหอยเชอรี่

นิยามศัพท์เฉพาะ

BSU = Bioservice unit เป็นหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยเชอรี่เป็นหอยทากน้ำจืด (freshwater snail) ชื่อสามัญคือ Golden Apple Snail แบ่งตามหลักอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum	Mollusca
Class	Gastropoda
Subclass	Prosobranchia
Order	Mesogastropoda
Superfamily	Viviparoidea
Family	Ampullariidea
Genus	Pomacea

การแบ่ง species ยังไม่แน่นอน ขณะนี้ในประเทศไทยมีหอยเชอรี่ระบาดอยู่ในนาข้าว 3 ชนิด ได้แก่ *Pomacea canaliculata*, *Pomacea leporidivillensis* และ *Pomacea* sp. (ชมพูนุช จรรยาเพศ; ทักษิณ อาชาวาคม; และ ทรงทัพ แก้วตา. 2534 : 94)

ลักษณะทั่วไปของหอยเชอรี่

หอยเชอรี่เป็นหอยฝาเดียว รูปร่างค่อนข้างกลม ใหญ่ เปลือกเรียบ การหมุนของเปลือกเป็นเกลียววนขวา แต่ลวดของเปลือกจะแยกกันเห็นได้ชัดเจนตรงรอยต่อ ที่มีลักษณะเป็นรอยเว้าลึกลงไป ส่วนที่มีขนาดเล็กที่สุด เรียกว่า ยอดเปลือก (apex) เกลียววงล่างสุดจะมีขนาดใหญ่ที่สุด เรียกว่า วงลำตัว ซึ่งเป็นที่อยู่ของอวัยวะภายในต่าง ๆ ปลายด้านหนึ่งของเปลือกจะมีช่องเปิดขนาดใหญ่ เรียกว่า วงปาก ให้ส่วนเท้าและส่วนหัวยื่นออกมาได้ บริเวณวงปากนั้นจะมีฝาปิด (operculum) เป็นแผ่นแข็งสีน้ำตาลใส ขนาดเมื่อโตเต็มที่จะมีความสูงประมาณ 83 มิลลิเมตร น้ำหนัก 165 กรัม (ปัทมา แซ่กิม. 2543 : 10) หอยเชอรี่มีรูปร่างและขนาดคล้ายกับหอยโข่ง ซึ่งเป็นหอยประจำถิ่นของไทย แต่มีข้อแตกต่างระหว่างหอยเชอรี่และหอยโข่ง ที่สามารถสังเกตได้จากลักษณะทั่วไปภายนอก คือ เปลือกของหอยเชอรี่จะบางกว่า และความลึกของร่องเปลือกของหอยเชอรี่จะลึกมากกว่า ทำให้ก้นหอยของหอยเชอรี่นูนสูงกว่า ฝาปิดของหอยโข่งแข็งและหนากว่า และมีมุกเคลือบทำให้เห็นเป็นสีขาว และส่วนวงปากของหอยเชอรี่จะกลมกว้างกว่าหอยโข่ง



ภาพประกอบ 1 แสดงลักษณะของหอยเชอริ

อวัยวะภายนอกของหอยเชอริ

ส่วนหัว อยู่ปลายสุดทางด้านหน้าของลำตัว ประกอบด้วยช่องปากอยู่ตรงกลางค่อนข้างทางด้านท้อง มีริมฝีปากที่มีลักษณะเป็นแผ่นยื่นออกมาทางด้านข้างทั้ง 2 ข้าง ภายในปากมีกรามขนาดใหญ่ 1 คู่ ใช้กัดกินอาหาร ถัดจากกรามเข้าไปข้างในเป็น radula ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นบางคล้ายโซ่ที่เต็มไปด้วยฟันซี่เล็กแหลมคม สีแดง จำนวนหลายฟันซี่ เรียงเป็นแถวขวาง 5 แถว ทำหน้าที่ในการบดอาหาร โดยจะขยับไปมาขูดบนอาหาร หอยเชอริมีหัวขนาดสั้นประกอบด้วยหนวด 2 คู่ คู่ที่ 2 อยู่ติดกับตาและยาวกว่าคู่แรก หนวดมีรูปร่างเพรียว ส่วนปลายเรียวเล็กลง ทำหน้าที่ในการรับรู้ความรู้สึก หนวดสามารถหดสั้นและแบนลงได้



ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะส่วนหัวของหอยเชอริ

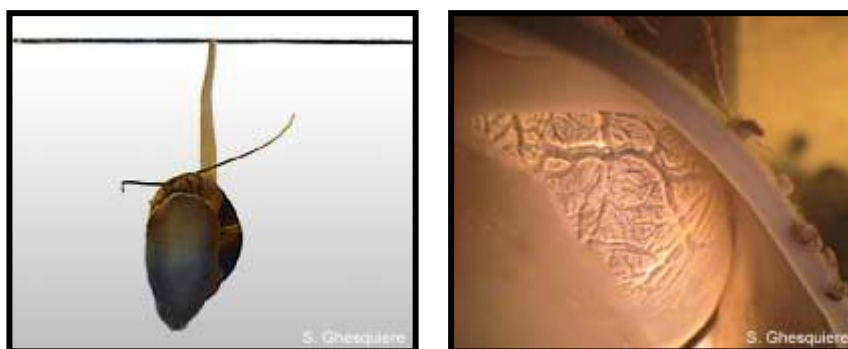
ส่วนเท้า มีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อหนารูปสามเหลี่ยม ปลายแหลมชี้ไปข้างหลัง ผิวหยาบ สามารถยืดยาวและกว้างแบนได้ทำหน้าที่ในการคืบคลานเพื่อเคลื่อนที่มีช่องเปิดของต่อมเหงือก (pedal gland) ที่ทำหน้าที่ผลิตเมือกเพื่อช่วยหล่อลื่นขณะที่หอยเคลื่อนที่ นอกจากนี้ส่วนเท้ายังประกอบด้วย ระบบทางเดินอาหารส่วนต้น ระบบสืบพันธุ์ และระบบประสาท

อวัยวะภายในของหอยเชอร์รี่

ระบบย่อยอาหาร ประกอบด้วย ท่อทางเดินอาหาร ต่อมน้ำลาย และต่อมสร้างน้ำย่อย

ระบบการหมุนเวียนโลหิต ประกอบด้วย หัวใจ เส้นเลือดแดง โพรงเลือด และเส้นเลือดดำ

ระบบหายใจ ประกอบด้วย เหงือก (actinia) ปอด (lung) และท่อหายใจ (respiratory siphon) มีลักษณะคล้ายหลอด สามารถโค้งพับและยืดหดได้ สามารถยืดได้ยาวถึง 6-7 เซนติเมตร ทำหน้าที่เป็นท่อยืดขึ้นไปเหนือผิวน้ำเพื่อเอาออกซิเจนจากอากาศมาใช้ในการหายใจ ระบบหายใจของหอยเชอร์รี่มี 2 ระบบ คือ การหายใจโดยใช้เหงือก และการหายใจโดยใช้ปอด ซึ่งทำให้หอยเชอร์รี่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำและบนบก เมื่อหอยอยู่ในน้ำ การหายใจจะเกิดขึ้นโดยน้ำจะเข้าทางท่อหายใจ ด้านซ้ายและไหลผ่านไปยังเหงือก จะมีการแลกเปลี่ยนก๊าซเกิดขึ้นที่เหงือก จากนั้นน้ำจะไหลผ่านออกไปทางท่อหายใจด้านขวา เมื่อหอยลอยตัวขึ้นมาอยู่ผิวน้ำ การหายใจจะเกิดขึ้นโดย ท่อหายใจ ด้านซ้ายจะยื่นยาวออกมาเหนือผิวน้ำ แล้วอากาศจะผ่านเข้าไปในท่อไปที่ปอด จะมีการแลกเปลี่ยนก๊าซที่ปอด ดังนั้นหอยเชอร์รี่จึงอาศัยอยู่ได้ในน้ำที่ไม่มีออกซิเจนละลายอยู่เลย และถ้าหอยขึ้นมาอยู่บนบก มันจะรับอากาศโดยตรงเข้าไปที่ปอดทางช่องแมนเดิล โดยไม่ใช้ท่อหายใจ การเคลื่อนตัวเข้าออกของหัวและเท้าจะเป็นการช่วยนำอากาศผ่านเข้าไปในปอด การหายใจโดยใช้ปอดนี้จะเกี่ยวข้องกับการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อบริเวณผนังปอด เมื่อกล้ามเนื้อหดตัวผิวของปอดจะโค้งขึ้น ทำให้ช่องว่างภายในปอดมีพื้นที่เพิ่มขึ้น อากาศจะผ่านเข้าไปภายในปอด เลือดในเส้นเลือดฝอยในปอดจะดึงเอาออกซิเจนจากอากาศ พร้อมทั้งปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์กลับออกมา และเมื่อกล้ามเนื้อคลายตัว ช่องว่างภายในปอดจะลดลง และอากาศภายในจะถูกดันออกมา การหายใจโดยใช้ปอดนั้น ส่วนมากจะเกิดขึ้นในระหว่างที่หอยพักตัวในช่วงฤดูแล้ง



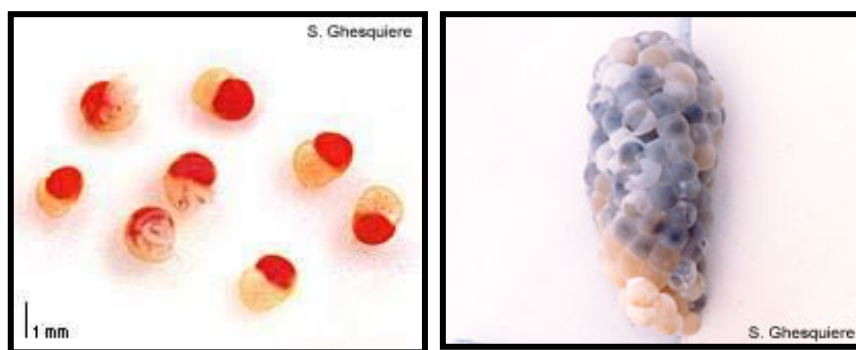
ภาพประกอบ 3 ลักษณะภายใน และ ท่อหายใจของหอยเชอรี่

ระบบขับถ่าย ประกอบด้วยไต ทำหน้าที่ในการกรองของเสียพวกไนโตรเจนออกจากเลือด โดยในขณะที่หอยอยู่ในน้ำ จะขับของเสียออกมาในรูปของสารประกอบแอมโมเนียและยูเรีย แต่ในช่วงที่หอยอยู่บนบก จะขับของเสียออกมาในรูปกรดยูริก

ระบบช่องท้อง (mantle cavity) แบ่งเป็น 2 ส่วน (พูลสุข หฤทัยธนาสันต์. 2542 : 151) ช่องทางขวา เป็นส่วนของเหงือก ทำหน้าที่ในการดึงออกซิเจนจากน้ำมาใช้ในการหายใจ ในขณะที่หอยเชอรี่อยู่ในน้ำ ช่องทางซ้าย เป็นส่วนของปอด (lung) ทำหน้าที่ในการหายใจโดยใช้ออกซิเจนจากอากาศ ซึ่งทำให้หอยเชอรี่สามารถอาศัยอยู่บนบกได้บางเวลา

การเจริญเติบโตของหอยเชอรี่

ลูกหอยเชอรี่ที่ฟักออกมาจากไข่จะมีรูปร่างเหมือนกับตัวแม่ทุกประการ ต่างกันเพียงลูกหอยจะมีขนาดเล็กมาก การเจริญเติบโตของหอยเชอรี่นั้นไม่มีทั้งระยะ metamorphosis และการลอกคราบ มีเพียงการเพิ่มขึ้นของขนาดตัวโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแต่อย่างใด การเพิ่มขนาดของหอยเชอรี่ทำโดย การสร้างเปลือกต่อจากเดิมทางด้านตรงข้ามกับยอดแหลม การสร้างเปลือกเกิดจากการทำงานของเนื้อเยื่อ mantle ซึ่งอยู่ติดกับเปลือกรอบ ๆ mantle cavity



ภาพประกอบ 4 ลักษณะการเจริญเติบโตของหอยเชอริ

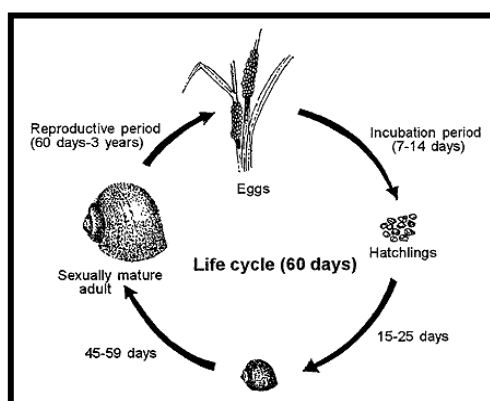
การขยายพันธุ์

หอยเชอริมีเพศแยกกัน (dioecious) การแยกเพศของหอยเชอริสามารถดูได้จากความหนาของแผ่นฝาปิด โดยเพศผู้จะมีความหนาของแผ่นฝาปิดมาก และมีขนาดตัวเล็กกว่าเพศเมีย อวัยวะช่วยในการผสมพันธุ์ (copulatory organ) ของเพศผู้จะมีการพัฒนาดี แต่ในเพศเมียนั้นจะไม่มีการพัฒนา อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ประกอบด้วย อัณฑะ (testis) ท่อนำน้ำเชื้อ (vasa efferentia) ฟินิส (penis) และต่อมใต้เหงือก (hypobranchial gland) อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ประกอบด้วย รังไข่ (ovary) ท่อนำไข่ (oviduct) มดลูก (uterus) หอยพร้อมที่จะขยายพันธุ์ในช่วงอายุประมาณ 3 เดือน โดยหอยเพศผู้จะมีอวัยวะสืบพันธุ์เดียว มีอัณฑะลักษณะเป็นท่อยืดออกได้ เพื่อใช้สอดส่ง sperm เข้าไปผสมกับไข่ก่อนที่ไข่จะมีการสร้างเปลือก หลังจาก 1-2 วัน หอยเพศเมียจะวางไข่ โดยส่วนมากหอยตัวเมียจะวางไข่ในเวลากลางคืน โดยคลานขึ้นไปวางไข่ตามที่แห้งเหนียว เช่น ตามกิ่งไม้ที่ปักอยู่ในน้ำ เวลาที่ใช้ในการวางไข่ตั้งแต่ 1-6 ชั่วโมง ไข่จะเคลื่อนออกมาที่ละใบบนกล้ามเนื้อเท้าซึ่งขยับเป็นระลอก ดันส่งไข่ให้ขึ้นไปซ้อนเข้าได้ใบที่ออกมาก่อนเป็นชั้นๆ ไข่ที่ออกมาใหม่ๆ จากร่างกายจะอ่อนนิ่มและมีเมือกติดทุกใบ แต่ครั้งจะประกอบด้วยไข่จำนวน 388-3,000 ฟอง ไข่จะมีสีชมพูสดและซีดจางลงจนเกือบเป็นสีขาวภายใน 7-14 วัน อัตราการฟักของไข่ 77-91% ที่อุณหภูมิ 34 °C จากนั้นเปลือกไข่จะแตกออก ลูกหอยที่ออกมาใหม่ ๆ จะมีขนาดประมาณหัวเข็มหมุดเล็ก ๆ มีลักษณะทุกประการเหมือนกับหอยที่โตเต็มที่แล้ว เพียงแต่เปลือกของลูกหอยจะยังนิ่มอยู่ แต่ภายหลังออกจากไข่ประมาณ 2 วัน เปลือกก็จะแข็ง สามารถกินอาหารได้ทันที ส่วนแม่หอยนั้นหลังจากที่วางไข่แล้ว ทั้งช่วงห่าง

ประมาณ 4-10 วัน ก็จะสามารถวางไข่ได้อีก และสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี แม่หอยสามารถวางไข่ได้จนถึงอายุ 2-3 ปี



ภาพประกอบ 5 แสดงการขยายพันธุ์ของหอยเชอรี



ภาพประกอบ 6 แสดงวงจรชีวิตของหอยเชอรี

การกินอาหาร

หอยเชอรี่กินพืชน้ำได้เกือบทุกชนิดที่มีลักษณะใบอ่อนนุ่ม เช่น แหน่ จอก สาหร่าย ต้นข้าว ต้นหญ้าริมน้ำ รวมทั้งซากพืชซากสัตว์ที่เน่าเปื่อยในน้ำ หอยเชอรี่สามารถกินได้รวดเร็วเฉลี่ยวันละ 50% ของน้ำหนักตัว และสามารถกินได้ตลอดเวลา ในเวลากลางวันที่มีแดดจัดจะหลบอยู่ใต้เงาร่มของพืชน้ำต่าง ๆ แล้วกินอาหารตลอดเวลา วิธีการกินอาหารของหอยเชอรี่ จะใช้ส่วนขากรรไกรกัดแล้วส่งเข้าไปในช่องปาก กล้ามเนื้อรอบ ๆ จะทำงานให้ส่วน radular ซึ่งเป็นเส้นบางคล้ายโซ่เติมไปด้วยฟันแหลมขยับไปมาขูดไปบนอาหาร

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอสายใหม่ จาก ดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation (สำนักงานส่งเสริมวิทยาศาสตร์, 2543 : ออนไลน์) ซึ่งการเพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจนี้ จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของยีนที่สนใจบางส่วนด้วยเพื่อที่จะสามารถสร้างไพรเมอร์ (primer) มาจับกับยีนนั้น และเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ในหลอดทดลอง เทคนิค PCR มีหลัก และวิธีการที่ง่าย และสามารถตรวจสอบได้ทันทีโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) การเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการศึกษาโดยวิธี PCR นี้ จะกระทำในหลอดทดลองที่ประกอบด้วย ส่วนประกอบที่สำคัญ 4 อย่างได้แก่

1. DNA template ซึ่งเป็น DNA สายคู่ ที่สกัดมาจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจศึกษา
2. เอนไซม์ Taq DNA Polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และทำหน้าที่สร้างสาย DNA ที่อุณหภูมิสูง ๆ ได้ดี (thermostable DNA polymerase) เอนไซม์นี้แยกมาจากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus*
3. Deoxynucleotide ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP
4. Oligonucleotide primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 20-30 bases อาจเรียกว่า เป็น forward และ reverse primers สำหรับจับ DNA template ทั้ง 2 สาย นอกจากนี้ยังมีสารที่จำเป็นต่อการทำ PCR อื่น ๆ เช่น เกลือ $MgCl_2$ ใน PCR buffer

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลาย รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ DNA template ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ อุณหภูมิประมาณ 90-95 C

2. annealing เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าไปจับกับ DNA บริเวณที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary base) จะเกิดที่อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยขึ้นกับปริมาณของเบส GC ถ้าปริมาณ GC มาก จะทำให้ annealing temperature สูงตามไปด้วย โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 40-60 C

3. extension เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่ต่อจาก primer โดยอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 C

วิธี PCR จะเริ่มด้วยการแยก DNA เกลียวคู่ออกเป็น DNA สายเดี่ยวด้วยความร้อน เมื่อ อุณหภูมิลดลง primer ซึ่งถูกออกแบบให้มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA template จะจับกับ DNA template ในตำแหน่งที่กำหนดได้จำเพาะ เพื่อการเพิ่มจำนวนขึ้น DNA นั้น ๆ ต่อไป โดย deoxynucleotide ช่วยเติมจำนวนเบสที่ปลายข้าง 3'-end ของ primer เกิด DNA เส้นคู่ชุดใหม่จำนวน 2 ชุด และเมื่อถูกความร้อน DNA 2 ชุด ก็จะแยกออกจากกัน เป็น DNA สายเดี่ยว 4 เส้น ซึ่งจะเป็น แม่แบบในการสร้าง DNA คู่สายใหม่ในรอบถัดไป ทำให้ได้ DNA เพิ่มขึ้นเป็น 4 ชุด และเมื่อรอบถัดไปก็ จะได้จำนวน DNA เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในลักษณะที่คูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้น ถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ DNA 2^{20} ชุด หรือ ประมาณ 1 ล้านเท่าของ DNA ตั้งต้นนั่นเอง

อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

Electrophoresis เป็นวิธีที่ใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันบางประการของโมเลกุลในการแยก เช่น ขนาด รูปร่าง ประจุ เป็นต้น (จริยา ชมวารินทร์. 2540 : 4-3) ในการเคลื่อนที่ของสารให้แยกออกจากกันต้องอาศัยความต่างศักย์ ของกระแสไฟฟ้าและตัวกลางชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสม วิธีการนี้สามารถนำไปใช้ในการแยกวิเคราะห์ และทำให้สารบริสุทธิ์ได้ เมื่อทำการแยกแล้ว สามารถตรวจดูตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารต่าง ๆ ได้ ด้วยการย้อมสี

อัตราการเคลื่อนที่ในการทำ electrophoresis ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างดังต่อไปนี้

1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดและปริมาณของประจุ จะเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลใน สนามไฟฟ้า โดยโมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบและโมเลกุลที่มีประจุมาก เช่น -3 จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุน้อยกว่า เช่น -1 เป็นต้น

1.2 ขนาดของโมเลกุลอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

1.3 รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันการเคลื่อนที่จะมีอัตราเร็วที่ต่างกันด้วย

2. สนามไฟฟ้า อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ

กระแสไฟฟ้า ระยะเวลาในการทำ electrophoresis และความต่างศักย์ไฟฟ้า แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า การใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงจะช่วยให้การเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเร็วขึ้น แต่ถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนขึ้น อาจทำให้สารเสียสภาพธรรมชาติได้ แต่ถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไปก็จะทำให้การใช้เวลาในการทำ electrophoresis นานเกินไป กระแสไฟฟ้าที่ใช้ทำ electrophoresis มักจะให้ในลักษณะที่กระแสไฟฟ้าคงที่ (current constant) หรือความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ (voltage constant)

3. บัฟเฟอร์ (buffer) buffer มีหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-เบสของตัวกลางค้ำจุน และมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า โดยความเป็นกรด-เบส มีผลต่อการแตกตัวของหมู่ที่มีประจุของโมเลกุล ดังนั้น buffer ที่ใช้จึงควรมี pH คงที่เพื่อจะทำให้การแยกนั้นเป็นไปด้วยดี และสม่ำเสมอ ในการทำ electrophoresis ของ DNA นั้น DNA จะมีประจุสุทธิเป็นลบเสมอ เนื่องจากมีหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) จึงทำ electrophoresis ใน buffer ที่มีสภาวะค่อนข้างเป็นเบสเล็กน้อย เพราะ DNA จะคงตัวได้ดีกว่า

4. ตัวกลางค้ำจุน ตัวกลางค้ำจุนมีความสำคัญต่อการแยกสารโดยวิธี electrophoresis เป็นอย่างมาก ลักษณะที่ดีของตัวกลางค้ำจุนคือ ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้รวดเร็ว สามารถแยกสารเป็นส่วน ๆ ได้ง่าย และชัดเจน ตัวกลางไม่ควรจะมีประจุเพราะจะมีผลต่อการวิ่งของ DNA ในกระแสไฟฟ้าและไม่ไวในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น การเลือกตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมจะทำให้การแยกโดยวิธี electrophoresis ได้ผลดี ตัวกลางที่นิยมใช้ในงานทั่วไปคือ agarose gel ซึ่งมักใช้ในการแยก DNA และ RNA ส่วน polyacrylamide gel มักใช้ในการแยกสารประกอบโปรตีน เป็นต้น

agarose เป็นสารที่แยกได้จากผนังเซลล์สาหร่ายทะเล เป็น polysaccharide ซึ่งประกอบด้วย galactose และอนุพันธ์ สาย agarose จะพันไขว้กัน (crosslinked) ทำให้เจลมีลักษณะเป็นรูพรุน

agarose gel electrophoresis เป็นวิธีมาตรฐานในการแยกวิเคราะห์ DNA และ RNA โดยเมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลาง DNA หรือ RNA ที่มีประจุลบใน buffer ที่มี pH ค่อนข้างเป็นเบสเล็กน้อยจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าบวก DNA หรือ RNA ขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก ทำให้สามารถแยกออกได้ตามขนาด การติดตามตำแหน่งของแถบ DNA หรือ RNA หลังจากทำ

electrophoresis ทำได้โดยการย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสง UV จะเห็นแถบ DNA มีแสงวาวสีส้ม วิธีนี้สามารถตรวจหา DNA ปริมาณต่ำ ๆ ได้

การเคลื่อนที่ของ DNA ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ หลายประการที่เกี่ยวข้อง คือ

1. ขนาดของ DNA

ถ้าเปรียบเทียบ DNA ปลายเปิด (linear DNA) เมื่อเคลื่อนที่ผ่านเจลในสนามไฟฟ้าจะพบว่าอัตราการเคลื่อนที่มีค่าผกผันกับค่า $\log$ ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของ DNA คือถ้า DNA ขนาดใหญ่การเคลื่อนที่จะช้ากว่า DNA ขนาดเล็ก

2. ความเข้มข้นของ agarose gel

linear DNA จะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนภายในเจลด้วยอิทธิพลของสนามไฟฟ้า เมื่อความเข้มข้นของ agarose gel ต่ำ รูพรุนจะมีขนาดใหญ่ DNA จะเคลื่อนที่ได้เร็ว ตรงกันข้าม ถ้าใช้ agarose gel ความเข้มข้นสูง ๆ ขนาดของรูพรุนจะเล็กกว่า การเคลื่อนที่ของ DNA จะช้าลง ดังนั้น การแยก DNA ขนาดต่าง ๆ ต้องเลือกความเข้มข้นของ agarose ให้เหมาะสมดังตาราง 1

ตาราง 1 ความเข้มข้นของ agarose ที่ใช้ในการวิเคราะห์ DNA ขนาดต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของ agarose (%)	ขนาดของชิ้น DNA (กิโลเบส , kb)
0.3	5.0 - 60
0.6	1.0 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

แม้ว่า agarose gel สามารถใช้แยกวิเคราะห์ชิ้น DNA สายคู่ที่มีขนาด 70 basepairs (0.07kb) ด้วยความเข้มข้น 3% agarose ถึงขนาด 80,000 bp (80 kb) ด้วยความเข้มข้น 0.1% agarose แต่ไม่ค่อยนิยมใช้ เพราะความเข้มข้นของ agarose ที่มากกว่า 1.5% gel ค่อนข้างแข็งเกินไป และความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.5% agarose จะมีความเปราะบางมาก โดยทั่วไปมักใช้ความเข้มข้นระหว่าง 0.7–1.2%

3. รูปร่างของ DNA (conformation of DNA)

การเคลื่อนที่ของ DNA ในสนามไฟฟ้าขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลโดยตรง DNA ขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่า DNA ขนาดเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบ DNA ในรูปร่างแบบเดียวกัน DNA ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่รูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ต่างกัน เช่น รูปของ supercoil จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่ารูป linear และรูป relaxed ตามลำดับ

Supercoil

Relaxed

Linear

ภาพประกอบ 7 แสดงโครงรูปของ DNA

4. ความต่างศักย์ไฟฟ้า

อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของ linear DNA จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความต่างศักย์ ณ ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ ก็คือ DNA เคลื่อนที่เร็วขึ้นเมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้ามากขึ้น (ประมาณ 1 โวลต์ ต่อเซนติเมตร) แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของ linear DNA โมเลกุลใหญ่ ๆ จะ

เพิ่มมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและเมื่อเพิ่มความต่างศักย์มากขึ้น ประสิทธิภาพในการแยก DNA ใน agarose gel จะลดลง ในกรณีที่ขนาด DNA ใหญ่กว่า 2 กิโลเบสและต้องการจะให้ได้การแยกที่ชัดเจนที่สุด ควรใช้ความต่างศักย์ต่ำ ๆ คือไม่เกิน 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร ที่นิยมจะใช้ประมาณ 1 โวลต์ต่อเซนติเมตร ซึ่งปกติ agarose gel electrophoresis จะใช้ความต่างศักย์ในช่วง 0.5-5 โวลต์ต่อเซนติเมตรอยู่แล้ว ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับขนาดของเจล แต่ถ้า DNA เล็กกว่า 2 กิโลเบสควรใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้ามากกว่า 1 โวลต์ต่อเซนติเมตร เพื่อลดการแพร่ของแถบ DNA เพราะเวลาที่ใช้จะน้อยลง

5. ส่วนประกอบของเบสและอุณหภูมิ (base composition and temperature)

ส่วนประกอบของเบสและอุณหภูมิไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของ DNA ใน agarose gel ณ ช่วงอุณหภูมิ 4 - 30 °C ดังนั้น การทำ electrophoresis จึงมักทำที่อุณหภูมิห้อง

6. บัฟเฟอร์ (buffer)

การเคลื่อนที่ของ DNA ในสนามไฟฟ้าขึ้นอยู่กับความเป็นกรด - เบส ส่วนประกอบของ buffer ถ้ามีการเตรียมความเข้มข้นของ buffer ผิด เช่น เจือจางมาก ตัวนำกระแสไฟฟ้าจะนำกระแสไฟฟ้าได้ไม่ดีและ DNA จะเคลื่อนที่ช้ามาก และในกรณีที่เตรียมความเข้มข้นของ buffer สูงเกินไป (เช่น ใช้ 10 เท่าของปกติ เนื่องจากเตรียมผิดพลาด) จะทำให้การนำกระแสไฟฟ้ามีประสิทธิภาพดี แต่ความร้อนจะเพิ่มมากขึ้นจนเจลละลายและ DNA สูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) buffer ที่ใช้ต้องปรับ pH ให้สองข้างเท่ากันเพราะเมื่อทำ electrophoresis ไประยะหนึ่ง ขั้วบวกมักจะมี pH สูงขึ้นและขั้วลบจะมี pH ต่ำลง ดังนั้นจึงนิยมใช้ buffer ที่มีความจุ (capacity) สูง buffer ที่ใช้มีหลายชนิด และมักเตรียมในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้จริง 10 เท่า (10X) หรือ 50 เท่า (50X) เมื่อต้องการใช้จึงนำมาทำให้เจือจางลงให้ได้ความเข้มข้นปกติ ตัวอย่าง buffer ที่นิยมใช้

6.1 Tris-acetate (TAE) เป็น buffer ที่มีความจุต่ำ ดังนั้น ระหว่างการ electrophoresis ต้องคอยผสม buffer ระหว่างขั้วทั้งสองให้เข้ากัน (โดยใช้เครื่องมือช่วยในการถ่ายเทหมุนเวียน) การจะเก็บ buffer นี้ให้ได้นานต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ก่อน และเก็บในอุณหภูมิ 4 °C เพราะมิฉะนั้น จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้

6.2 Tris-borate (TBE) เป็น buffer ที่มีความจุสูง แถบ DNA ที่แยกได้จะชัดคมและเล็ก เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้น 10 เท่า สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโต เนื่องจากมี boric acid เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อ

6.3 Tris-phosphate (TPE) เป็น buffer ที่มีความจุสูง แถบ DNA ชัดเจนเช่นเดียวกับ TBE แต่สารละลาย 10 เท่า จุลินทรีย์ยังสามารถเจริญได้และไม่ค่อยนิยมในงานทั่วไป

ตาราง 2 Buffer สำหรับ electrophoresis

Buffer	เตรียมสำหรับ 1 ลิตร (10X stock)
TAE	48.4 g Tris-base , 11.4 ml glacial acid 20.0 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) Final pH 7.6
TBE	108.0 g Tris-base , 55.0 g boric acid 9.3 g EDTA Final pH 8.3-8.4
TPE	108.0 g Tris-base , 15.5 ml 85% phosphoric acid 40.0 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) Final pH 8.0

การหาลำดับเบส

การหาลำดับเบสใน DNA เป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ทราบโครงสร้างยีน และข้อมูลทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ หรือยีนที่สนใจ ในปี ค.ศ. 1977 (สจวร์นทรี ปิยะโชดณากุล. 2543 : 68) ได้มีผู้พัฒนาเทคนิคการหาลำดับเบสขึ้นมา 2 วิธี คือ วิธีทางเอนไซม์ โดย เฟรดเดอริก แซงเกอร์ เรียกว่า วิธีแซงเกอร์ และวิธีทางเคมี โดยอลัน แมกแซม และวอลเทอร์ กิลเบิร์ต เรียกว่า วิธีแมกแซม-กิลเบิร์ต ซึ่งวิธีทางเคมีนิยมใช้น้อยกว่าวิธีทางเอนไซม์ เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ค่อนข้างมีพิษ และวิธีปฏิบัติจะยุ่งยากกว่า

อย่างไรก็ตามวิธีทั้งสองมีหลักการคล้ายคลึงกัน คือ ให้มีการสร้าง DNA สายใหม่ขึ้นจากสาย DNA ที่ต้องการหาลำดับ จากนั้นทำให้การสร้าง DNA นี้หยุดลงที่เบส A, T, C หรือ G แล้วแต่ตัวยับยั้ง (วิธีแซงเกอร์) หรือสารเคมี (วิธีแมกแซม-กิลเบิร์ต) ที่เติมลงไป ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะได้ชุดของชิ้นส่วน DNA 4 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วยชิ้นส่วนของ DNA ขนาดไม่เท่ากัน แต่ทุกชิ้นส่วนมีเบสลงท้ายเป็น

ชนิดเดียวกันทั้งหมด คือเป็นชุดที่ลงท้ายด้วยเบส A ชุดหนึ่ง เบส G ชุดหนึ่ง เบส C ชุดหนึ่ง และเบส T ชุดหนึ่ง เมื่อรวมชิ้นส่วนของ DNA ทั้งหมด 4 ชุดเข้าด้วยกัน จะพบว่า DNA แต่ละชิ้นมีขนาดแตกต่างกันเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ ขั้นตอนต่อไปนำชิ้นส่วนของ DNA ทั้งหมดไปแยกออกตามขนาดโดย agarose gel electrophoresis จากนั้นอ่านผลของแถบที่แยกได้จากที่มีขนาดเล็กที่สุด (ซึ่งวิ่งไปได้ไกลที่สุด) ไปจนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (ซึ่งวิ่งได้ใกล้จุดเริ่มต้นที่สุด) เมื่อทราบลำดับเบสใน DNA สายหนึ่งก็จะทราบลำดับเบสใน DNA สายคู่สม

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการหาลำดับเบสโดยใช้คอมพิวเตอร์เข้ามาช่วย ซึ่งโดยหลักการพื้นฐานแล้ว เครื่อง Automated DNA Sequencer ใช้หลักการวิธีแซงเกอร์

ขั้นที่ 1 สร้าง DNA สายใหม่ขึ้นจากสาย DNA ที่ต้องการหาลำดับ

เริ่มจากการแยก DNA สายคู่เป็นสายเดี่ยว แล้วนำสายเดี่ยวนี้มาสายหนึ่งซึ่งเป็นสายที่ต้องการหาลำดับ มาเชื่อมต่อกับ DNA template ซึ่งเป็นสายสั้น ๆ ที่ทราบลำดับเบสแล้ว (โดยต่อ DNA template เข้าทางปลาย 3'-ของ DNA ที่ต้องการหาลำดับเบส) DNA template นี้จะจับกับ DNA สายสั้น ๆ ที่เป็นสายคู่สม ซึ่งทำหน้าที่ เป็น DNA ตั้งต้น หรือ primer ของการสร้าง DNA สายใหม่จากปลาย 5' → 3' โดยเอนไซม์ Taq DNA polymerase การสร้างสาย DNA ต้องการ deoxynucleotide ทั้ง 4 ชนิด (dNTP) เป็นวัตถุดิบ คือ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP และเพื่อสามารถติดตามชิ้นส่วนของ DNA ที่ถูกสร้างขึ้นจึงติดฉลาก dNTP ด้วยสารกัมมันตรังสี

ขั้นที่ 2 ยับยั้งการสร้าง DNA สายใหม่

จากขั้นที่หนึ่งจะทำให้มีการสร้าง DNA สายใหม่ขึ้นจากสายที่ต้องการหาลำดับ ในขั้นที่สองจะทำให้หยุดการสร้าง DNA โดยเติมตัวยับยั้งแบบแข่งขัน ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งลงไป คือ 2',3'-ไดดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ ไทรฟอสเฟต (2',3'- dideoxyribonucleoside triphosphate, ddNTP) ตัวยับยั้งนี้จะไปแย่งที่กับนิวคลีโอไทด์ตัวถัดไป เข้ามาเชื่อมต่อไม่ได้จึงหยุดการสร้าง DNA ณ จุดนั้น เช่น ตัวยับยั้ง 2',3' - ไดดีออกซีแอดิโนซีนไทรฟอสเฟต (2',3' - dideoxyadenosine triphosphate, ddATP) มีโครงสร้างคล้ายกับ dATP จึงไปแย่งที่กับ dATP ทำให้สามารถแทนที่ตรงเบส A ได้ ถ้าใช้ ddATP จำนวนเล็กน้อยก็จะยับยั้งปฏิกิริยาไม่หมด การสร้างสาย DNA บางสายจึงไม่หยุดที่เบส A แต่สามารถเลยไปหยุดที่เบส A ในลำดับอื่น ๆ ที่อยู่ถัดไป ทำให้ได้สาย DNA เป็นชิ้นส่วนสั้น ๆ หลายชิ้น ขนาดแตกต่างกันที่เบสตัวสุดท้าย (ปลาย 3') เป็น ddA (แทนที่เบส A) ต่อมาทำปฏิกิริยาซ้ำเช่นนี้อีก 3 รอบ แต่ละรอบใช้ตัวยับยั้งต่างกันคือ ddCTP, ddGTP และ ddTTP ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย dCTP, dGTP และ dTTP ตามลำดับ ก็ได้ผลิตผลเป็นชิ้นส่วนสั้น ๆ ของ DNA อีก 3 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วยชิ้นส่วนที่มีเบสลงท้ายเป็น ddC (แทนที่เบส C) ddG (แทนที่เบส G) และ ddT (แทนที่เบส T) ตามลำดับ

ขั้นที่ 3 แยกชิ้นส่วน DNA สร้างใหม่ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจลอะกาโรส

นำผลิตภัณฑ์ของ DNA ทั้งหมดจากขั้นที่สองไปแยกด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งจะแยก DNA ตามขนาด DNA มีประจุลบเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก ยิ่ง DNA มีขนาดใหญ่ขึ้นประจุลบก็จะมากขึ้น ดังนั้นเมื่อคิดอัตราส่วนของประจุต่อมวล DNA จึงคงที่ นั่นคือ DNA ทุกตัวจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าด้วยแรงเคลื่อนเดียวกัน เป็นผลให้การแยก DNA ขึ้นกับขนาดของโมเลกุล นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถแยก DNA ที่มีขนาดเท่ากันแต่มีรูปร่างต่างกัน ได้ คือ DNA ที่เป็น supercoil จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าพวก linear ส่วนพวก relaxed จะเคลื่อนที่ได้ช้าสุด

ภายหลังการแยกยังไม่เห็นตำแหน่งของชิ้น DNA สามารถหาตำแหน่งโดยวิธีออโตเรดิโอกราฟี (autoradiography) คือใช้ฟิล์มเอกซเรย์ มาแนบแผ่นเจล จะปรากฏเป็นสีดำบนแผ่นฟิล์ม เนื่องจากสารกัมมันตรังสีใน DNA แถบทั้งหมดบนแผ่นฟิล์มจะเรียก ออโตเรดิโอแกรม (autoradiogram)

ขั้นที่ 4 อ่านลำดับเบสจากออโตเรดิโอแกรม

แถบที่ปรากฏใน autoradiogram จะเป็นแถบของ DNA 4 ชุด ชุดละ 1 แถว ในแต่ละแถวจะมีหลายแถบ แต่ละแถบจะเป็นชิ้นของ DNA ที่ลงท้ายด้วยเบสนั้น ๆ การอ่านลำดับเบสจาก DNA ที่สร้างใหม่ ทำโดยเริ่มจากชิ้น DNA ที่เล็กที่สุดไปหาชิ้นที่ใหญ่ที่สุดตามตำแหน่งที่ปรากฏ ซึ่งชิ้นที่อยู่ถัดไปจะต่างกันอยู่ 1 นิวคลีโอไทด์ ชิ้นใดอยู่ในแถวใดก็เป็นเบสนั้น ด้วยวิธีนี้จะทำให้ทราบลำดับเบสใน DNA สายที่สร้างใหม่จากปลาย 5' → 3' ซึ่งเป็นสายคู่สมกับสายที่ถูกใช้หาลำดับต่อไปก็สามารถหาลำดับเบสของสาย DNA ที่ถูกใช้หาลำดับได้ โดยอาศัยหลักการของเบสคู่สม

ปัจจุบันสามารถหาลำดับเบสของ DNA แบบอัตโนมัติ โดยพัฒนามาจากวิธีของแซงเกอร์ คือติดตาม DNA ด้วยสารเรืองสีต่าง ๆ แทนสารกัมมันตรังสีเดิม และมีวิธีการอ่านผลและบันทึกผลแบบอัตโนมัติ วิธีนี้สามารถอ่านลำดับเบสของ DNA เป็นจำนวนนับพันนิวคลีโอไทด์ภายในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง

ปัจจัยที่มีผลต่อการหาลำดับเบสจาก PCR product

1. primer เป็นสิ่งที่สำคัญมากทั้งในปฏิกิริยา PCR และ sequencing ควรเลือก sequence ของ primer จาก unique sequence DNA เพื่อลด non-specific product sequence ของ primer และไม่สามารถเกิด primer-dimer ได้ primer ควรมีขนาดประมาณ 20-24 เบส เพื่อให้มี specific annealing และทำให้มี T_m ที่สูงพอเหมาะ ถ้าเป็นไปได้ควรจะใช้ primer สำหรับหาลำดับเบสคนละตัวกับที่ใช้ทำ PCR

2. เนื่องจาก PCR product เป็น DNA เส้นคู่ที่มี complementary strand การเตรียม asymmetric PCR แม้ว่า DNA ส่วนใหญ่จะเป็น DNA เส้นเดี่ยว แต่ก็อาจมี DNA เส้นคู่ที่ได้ในรอบแรก ของ PCR ปนอยู่และเกิด reassociation ขึ้น นอกจากนั้นก็อาจมี primer เหลืออยู่ภายหลังการทำ PCR primer เหล่านี้ก็จะแย่งจับ กับ DNA template ที่ต้องการหาลำดับเบส ปัจจัยเหล่านี้จะทำให้มี DNA template มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดเป็น background อยู่ในทุกช่องของปฏิกิริยา ทำให้อ่านผล ยาก หรืออ่านไม่ได้เลย

3. ถ้า PCR product ประกอบด้วย DNA มากกว่า 1 ชนิด (non-specific product) และใช้ primer สำหรับตรวจหาลำดับเบสตัวเดียวกับ PCR primer จะทำให้ primer นี้ไปจับกับ non-specific DNA ทำให้อ่านลำดับเบสไม่ถูกต้องหรืออ่านไม่ได้ นอกจากนั้นยังทำให้ intensity ของ band ที่ ต้องการอ่านลำดับเบสลดลงด้วย

4. primer และ free dNTPs ที่เหลือจากปฏิกิริยา PCR มีผลต่อการตรวจหาลำดับเบส จึง ควรเตรียม DNA template สำหรับหาลำดับเบสให้บริสุทธิ์เสียก่อน ซึ่งอาจทำได้โดยการทำ spin dialysis ด้วย microconcentrator การตกตะกอน DNA ด้วย ammonium acetate/2-propanol หรือ การทำ electrophoresis เพื่อแยกชิ้นของ DNA ที่ต้องการหาลำดับเบสออกมา (ปราวณี พุเจริญ. 2539 : 5-4)

การใช้คอมพิวเตอร์วิเคราะห์ข้อมูลและสร้าง Phylogenetic tree

Phylogenetic analysis หรืออาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทาง วิวัฒนาการ เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาด้านวิวัฒนาการ ไม่ว่าจะเป็นในระดับสิ่งมีชีวิตหรือระดับ โมเลกุล ซึ่งผลการศึกษาในกรณีหลังมักจะมีชื่อเรียกว่า molecular phylogeny หรือ molecular phylogenetics ด้วยเหตุที่ว่าเทคโนโลยีได้รับการพัฒนาและถูกนำมาใช้มากขึ้นส่งผลให้แหล่งพันธุกรรม ของสิ่งมีชีวิตในโลกจำนวนมากกำลังสูญหายไป องค์การต่าง ๆ ในหลายประเทศเริ่มต้นตัวในการ อนุรักษ์ และศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพอย่างจริงจัง เพื่อคงไว้ซึ่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ได้มี การก่อตั้งสมาคม หรือองค์กรรับผิดชอบโดยตรง การประชุมกลุ่ม และการจัดเก็บรวบรวมข้อมูลที่ เกี่ยวข้องมาทำเป็นระบบฐานข้อมูล ซึ่งสามารถติดต่อสื่อสาร ค้นหา แลกเปลี่ยนข้อมูลหรือถ่ายโอน ข้อมูลได้อย่างสะดวกรวดเร็วผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต นอกจากนี้ยังมีการเขียนโปรแกรม คอมพิวเตอร์เพื่อช่วยเก็บรวบรวมข้อมูล รักษาข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลและแสดงผลการวิเคราะห์ หลากหลายรูปแบบ เพื่อช่วยนักวิจัย หรือผู้ที่สนใจมีความเข้าใจลึกซึ้งมากขึ้น

สำหรับรายละเอียดเกี่ยวกับสมาคม หรือองค์กรที่รับผิดชอบเกี่ยวกับความหลากหลายทาง ชีวภาพ อาทิเช่น Society for Molecular Biology and Evolution, International Society for

Evolution Protistology หรือ Biodiversity Information Network สามารถค้นหาได้จากระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต <http://www.ucmp.berkeley.edu/subway/phylo/phyloorg.html> ที่ website นี้ยังรวบรวมชื่อฐานข้อมูลที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับงานวิจัยด้านนี้ไว้ ทั้งฐานข้อมูลทั่วไปประเภท Genbank, Ribosomal Database Project, SEQNET หรือ ฐานข้อมูลที่จะแจ้งถึงการจำแนกสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่น PLANT Projects Database, International Code of Zoological Nomenclature, Hierarchical Classification System, Index Virum เป็นต้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บิริกิตต้าและคณะ (Birgitta; et al. 1993) ได้ทำการสกัด DNA จากสัตว์ไฟลัม Mollusca เป็นการสกัดที่มีความยากลำบากโดยปรับปรุงวิธีการสกัด DNA มาจากการสกัด DNA จากพืช สัตว์ที่ใช้ในการสกัด DNA นี้เป็นสัตว์ที่อยู่ในไฟลัม Mollusca ซึ่งมีทั้งหมด 6 classes คือ Bivalvia, Gastropoda, Scaphopoda, Cephalopoda, Polyplacophora และ Solenogastres โดยแบ่งส่วนต่าง ๆ เพื่อให้ในการสกัด เช่น ส่วนกล้ามเนื้อที่ใช้เคลื่อนไหว ส่วนของต่อมเพศ เนื้อเยื่อส่วนกระเพาะ ส่วนของไข่ วิธีการสกัด คือ นำเนื้อเยื่อส่วนที่จะสกัดมาบดในครกด้วย liquid nitrogen จากนั้นเติม CTAB buffer บ่มที่อุณหภูมิ 60 C เป็นเวลา 30 นาที เติม chloroform : isoamylalcohol 1 เท่าตัว centrifuge 10 นาที นำตะกอนที่ได้เติม isopropanol กลับหลอดไปมาอย่างเบา ๆ ทั้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น นำมา centrifuge 10 นาที จะได้ DNA เกิดขึ้น ล้าง DNA ด้วย 76% ethanol และ 10 mM ammonium acetate 30 นาที centrifuge เพื่อนำตะกอนมาเติม 0.1 mM EDTA จะเห็นสาย DNA เกิดขึ้น นำ DNA ที่สกัดได้ไปตรวจสอบโดยใช้วิธี electrophoresis พบว่า ส่วนของไข่จะให้คุณภาพของ DNA ได้ดีที่สุด

แอนเดอสันและแอลลาด (Anderson; & Adlard. 1994) ได้ทำการสกัด DNA จากหอยนางรม 2 ชนิด คือ *Saccostrea commercialis* เป็นหอยที่พบตามฝั่งทะเลของประเทศออสเตรเลีย และ *S. glomerata* ซึ่งเป็นหอยนางรมที่พบที่ประเทศนิวซีแลนด์ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ช่วง 18S rRNA ต่อมาหาลำดับเบสโดยใช้ adsDNA cycle sequencing kit ลำดับเบสที่ได้ของหอยนางรมทั้ง 2 ชนิด ไปทำ phylogeny พบว่า หอยนางรมทั้ง 2 มีความสัมพันธ์กัน 94%

โคจิมาและคณะ (Kojima; et al. 2001) ได้หาความหลากหลายของหอยประจำถิ่นของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นหอยที่อยู่ใน genus *Batillaria* มีอยู่ทั้งหมด 4 species ที่มีลักษณะเปลือกภายนอกที่คล้ายกัน นั่นคือ

B. multiformi, *B. cumingi*, *B. zonalis* และ *B. flectosiphonata* ขั้นแรกทำการสกัด DNA โดยใช้ sodium dodecyl sulfate และ phenol-chloroform ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) ด้วย primer ที่เป็นส่วนของยีน mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) พบว่า *B. multiformis* มีความคล้ายคลึงกับ *B. flectosiphonata* มากที่สุดถึง 86%

ริช (Rice. 1990) ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง 18S rRNA จากหอยสเกลลอป โดยการสกัด DNA จากหอยสเกลลอป จากส่วนเท้าของหอย จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ช่วง 18S rRNA หลังจากนั้นทำการ clone ใน pUC18 แล้วหาลำดับเบส โดยใช้วิธีทางเอนไซม์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับเบส กับหอยต่าง ๆ ที่มีคนทำอยู่แล้ว พบว่า ลำดับเบสของหอยสเกลลอปมีส่วนเหมือนกับหอยทะเลตัวยาว *Cryptochiton stelleri* 89.6 % มีส่วนเหมือนกับหอย *Spisula solidissima* 88.6 % มีส่วนเหมือนกับหอย *Mya arenaria* 87.2 % และมีส่วนเหมือนกับหอย *Anisodoris nobilis* 85.9 % และเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของหอยกาบ พบว่า หอยสเกลลอปมีความเหมือนกับหอยกาบถึง 93.3 %

ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ (2542) ทำการศึกษาคความหลากหลายของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa* sp.) โดยการสกัด DNA จากหนอนเยื่อไผ่จากต้นไผ่ทั้ง 5 ชนิด จากนั้น เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ช่วง 18S rRNA จากนั้นนำไปแยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 2% agarose gel จากนั้นนำไป clone ใน pUC 19 vector แล้วนำไปหาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง DNA Sequencer จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) โดยใช้โปรแกรม DNASIS จาก GEN Bank Database โดยใช้วิธี neighbor-joining พบว่า การศึกษาลำดับ nucleotide โดยใช้วิธี PCR แสดงให้เห็นว่า หนอนเยื่อไผ่ที่อาศัยอยู่ในต้นไผ่ที่แตกต่างกันทั้ง 5 ชนิด อยู่ใน species เดียวกัน คือ

O. fuscidentalis และจากการศึกษา phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า *O. fuscidentalis* อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Spodoptera* sp. , *Manduca* sp. , *Antheraea* sp. มีความคล้ายคลึงกัน 76 %

ฐิตา บุญภักดี (2543) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำที่พบในประเทศไทย ทำการศึกษาในม้าน้ำ 3 ชนิด คือ *Hippocampus spinosissimus*, *H. kuda* และ *H. trimaculatus* โดยเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากเลือดของม้าน้ำด้วยวิธีเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในบัฟเฟอร์ TNE-Urea เมื่อวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำในบริเวณยีน 18S rRNA พบว่า *H. spinosissimus* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 และ 650 คู่เบส *H. kuda* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 1 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ *H. trimaculatus* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 1 แถบ และจาง 3 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และต่ำกว่า 500 คู่เบส ตามลำดับ การศึกษาคความ

หลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ทำโดยวิเคราะห์ชิ้นส่วนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตั้งแต่บริเวณยีน cytochrome b จนถึง 12S rRNA ของม้าน้ำจาก จ.ชลบุรี , จ.ระยอง และ จ.ตราด โดยย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเอนไซม์ EcoRI, HindIII, KpnI, HaeIII, HhaI, MspI และ TaqI เมื่อใช้ TaqI พบความแตกต่างทางพันธุกรรมในม้าน้ำจาก จ.ระยอง ซึ่งเกิดขึ้นภายในแหล่งเดียวกันและต่างจากแหล่งอื่นด้วย ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. kuda* ทำการศึกษาม้าน้ำจาก จ.ชลบุรี และ จ.ตราด โดยวิเคราะห์ในบริเวณยีน ATPase ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอและทดสอบเช่นเดียวกับม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. kuda*

ปัทมาภรณ์ ศิริมา; และ สุนันทา พรายแก้ว (2541) ทำการศึกษาหาลำดับเบสของ Ribosomal DNA ที่ตำแหน่ง ITS2 ของยุง *Anopheles maculatus* กลุ่ม B และ E ในประเทศไทย โดยการเพิ่มปริมาณ genomic DNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ได้ DNA ขนาดประมาณ 450 bp จากนั้นนำชิ้น DNA ที่ได้เชื่อมต่อกับชิ้น DNA พาหะ pCR 2 เมื่อได้ clone ที่มีชิ้น DNA ที่ต้องการแล้วจึงทำการหาลำดับเบส โดยวิธี enzymatic DNA Sequencing เมื่อเปรียบเทียบลำดับของเบสที่ตำแหน่ง ITS 2 ระหว่างยุงกลุ่ม B และ E แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันของเบสหลายตำแหน่ง อย่างไรก็ตามลำดับเบสที่ได้จากการศึกษานี้มีความแตกต่างกับลำดับเบสของยุงชนิดเดียวกันซึ่งได้มีการศึกษาไว้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

การดำเนินการศึกษาค้นคว้าแบ่งได้เป็น 6 ขั้นตอน ดังนี้

1. รวบรวมสายพันธุ์หอยเชอรี่ที่พบในภาคกลางของประเทศไทย
2. การสกัด DNA ของหอยเชอรี่
3. การเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการ โดยใช้เทคนิค PCR
4. การตรวจตำแหน่งของ PCR product โดยใช้วิธี Electrophoresis
5. หาลำดับเบสของ PCR product โดยใช้เครื่อง DNA Sequencer
6. ทำ Phylogenetic tree เพื่อจำแนกชนิดของหอยเชอรี่

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ที่ใช้ในการศึกษา

หอยเชอรี่ที่เก็บในเขตภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จ.ปทุมธานี จ.พระนครศรีอยุธยา และ กรุงเทพฯ

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารทางพันธุกรรม
- 2.2 เครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเลต
- 2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก
- 2.4 ไมโครเวฟ
- 2.5 เครื่องเขย่า
- 2.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
- 2.7 เครื่องชั่งวางน้ำหนักด้านบน
- 2.8 เครื่องอิเล็กทรอนิกส์
- 2.9 เครื่องดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ
- 2.10 กระตักน้ำแข็ง
- 2.11 อ่างเลี้ยงหอยเชอรี่

3. สารเคมี

3.1 ไนโตรเจนเหลว

3.2 Tris-HCl

3.3 EDTA

3.4 NaCl

3.5 N-Laurylsarcosine sodium salt

3.6 Phenol-Chloroform

3.7 Proteinase K

3.8 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

3.9 2-propanol

3.10 Agarose

3.11 Deionized water

3.12 Ethidium bromide

3.13 PCR kit

3.14 High Pure PCR Template Preparation kit

4. วัสดุภัณฑ์

4.1 Microtube ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

4.2 Mortar and pestle

4.3 Erlenmeyer flask

4.4 Cylinder

4.5 Pipette tip

4.6 Beaker ขนาดต่าง ๆ

5. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ตำแหน่งยีน 18S rRNA (หน่วยบริการพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ)

A1-AACCTGGTGATCCTGCCAGT

B1-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC

วิธีดำเนินการ

ดำเนินการโดยภาพรวม

ในภาคสนาม

เก็บหอยเชอรี่ในเขตภาคกลางของประเทศไทย

ในห้องปฏิบัติการ

เลี้ยงหอยเชอรี่ในอ่างโดยแยกตามลักษณะภายนอก

ไข่หอยเชอรี่

DNA extraction

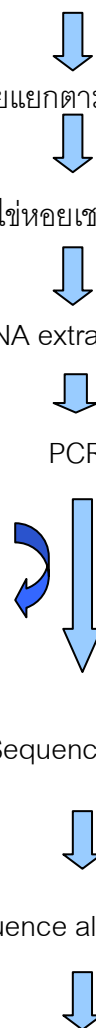
PCR

Electrophoresis

Sequencing

Sequence alignment

Phylogenetic tree reconstruction



1. การเลี้ยงหอยเชอรี่

1. เก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ที่มีรูปร่างลักษณะต่างๆ มาเลี้ยงไว้ในอ่างโดยแยกลักษณะต่าง ๆ ในแต่ละอ่าง

2. เลี้ยงหอยจนแน่ใจว่าหอยที่เลี้ยงไว้มีรูปร่างลักษณะเช่นดั้งเดิมทุกรุ่นที่หอยออกลูก โดยเริ่มใช้หอยในรุ่นที่ 3

2. การสกัด DNA

นำไข่ของหอยเชอรี่บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลว

↓
เติม Extraction buffer 8 mL

↓
ผสมโดยกลับหลอดไปมา ที่ 37 C จนเป็นเนื้อเดียวกัน

↓
Incubate ที่ 4 C นาน 30 นาที

↓
เติม Phenol : Chloroform 5 mL

↓
เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที

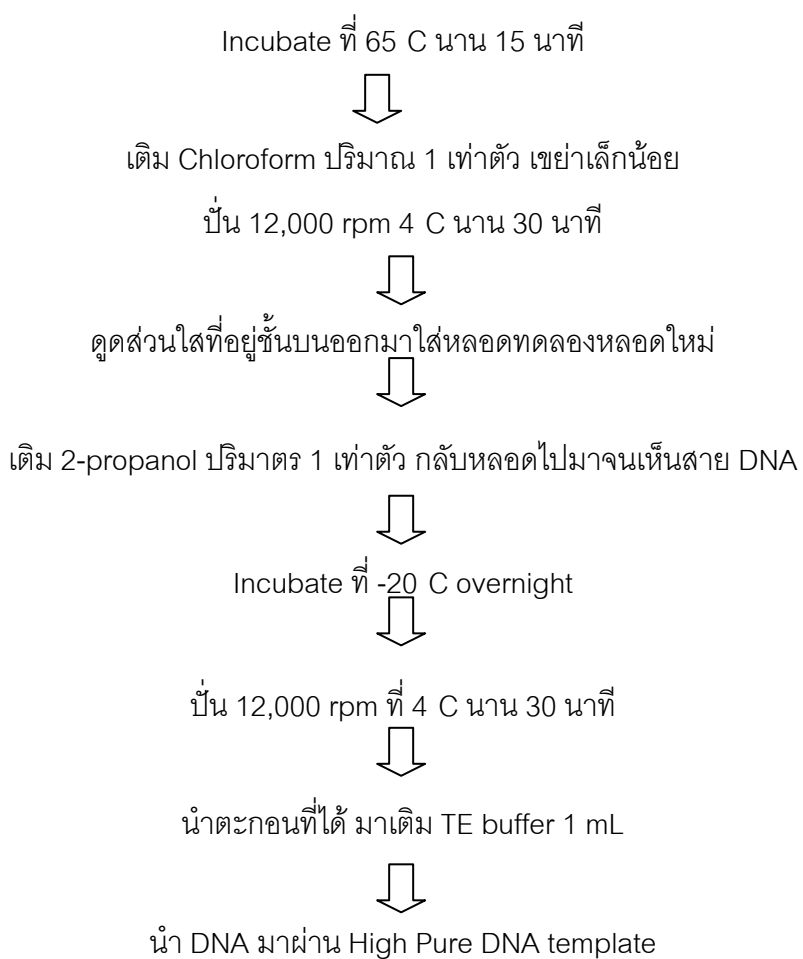
↓
ปั่น 12,000 rpm ที่ 4 C นาน 30 นาที

↓
เติม Proteinase K 40 L ในตะกอนที่ได้

↓
Incubate ที่ 65 C นาน 15 นาที

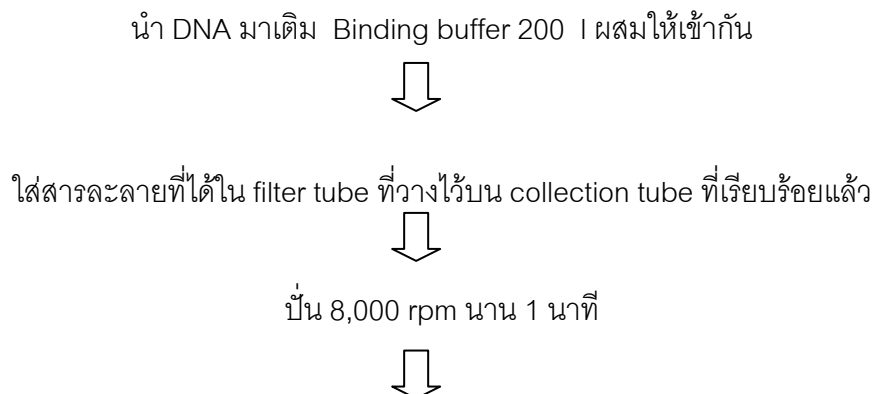
↓
เติม 5M NaCl และ CTAB อย่างละ 500 L

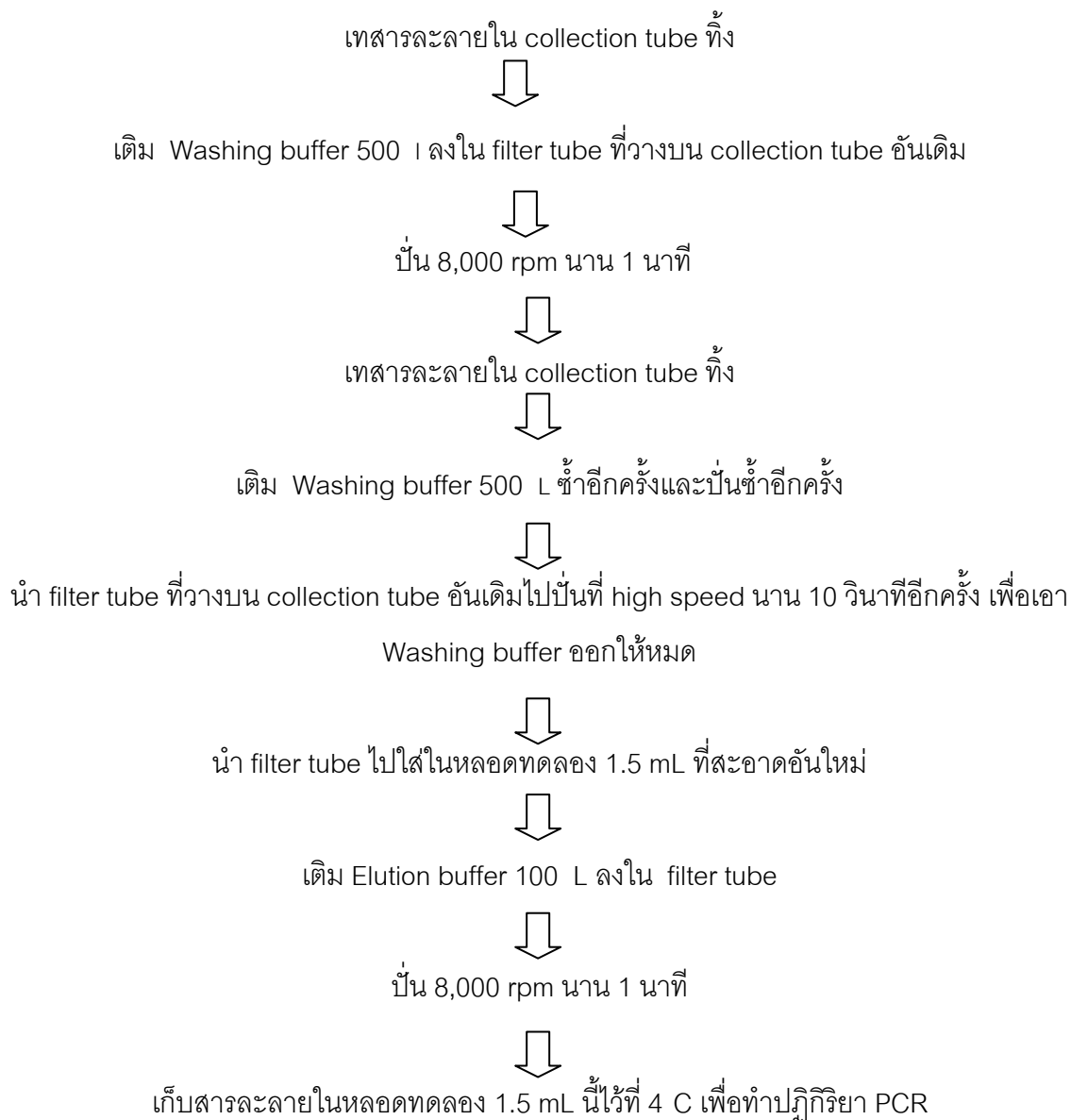




High Pure DNA Template Preparation kit ประกอบด้วย

- 1.1 Binding buffer
- 1.2 Washing buffer
- 1.3 Elution buffer
- 1.4 Filter tubes
- 1.5 Collection tube





3. การเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ 18S rRNA โดยใช้เทคนิค PCR

ในการทำ PCR มีส่วนประกอบที่สำคัญ 4 ส่วน คือ

- DNA template คือ DNA สายคู่ที่ได้จากการสกัด DNA จากหอยเชอรี่
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase
- deoxynucleotide triphosphates ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- oligonucleotide primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ

ตาราง 3 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction

สาร	ปริมาตรที่ใช้ (L)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA	1.0	
10X Buffer PCR	2.5	
Primer A1	1.0	50.0 mM
Primer B1	1.0	50.0 mM
MgCl ₂	1.5	1.5 mM
Taq Polymerase	0.2	5.0 U
dNTPs	2.0	2.5 mM
Sterile distilled water	15.8	
รวม	25.0	

นำ microtube ที่มีส่วนผสมดังข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation step	95 C	เวลา 1 นาที
Annealing step	60 C	เวลา 1 นาที
Extention step	72 C	เวลา 1 นาที

ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 C นาน 5 นาที และ 72 C นาน 10 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ

- จากนั้นนำ PCR product ที่ได้เก็บไว้ที่ 4 C

- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน

- นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบส ที่ BSU

4. การเตรียม Agarose Gel electrophoresis และการทำ electrophoresis

1. ชั่ง agarose ใส่ใน TBE buffer ให้มีความเข้มข้น 1% agarose
2. ให้ความร้อนจนกระทั่ง agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกันใน buffer
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 C นำไปเทใน gel chamber ที่มีช่องสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอตั้งอยู่เรียบร้อยแล้ว
4. ทิ้งไว้จน agarose แข็งตัวจึงดึง comb ออก
5. เท TBE buffer จนท่วมเจลประมาณ 1 mm
6. ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 2 L กับ loading dye 5 L แล้วหยอดลงในช่องของเจล
7. ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ โดยให้กระแสไฟวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที
8. หลังจากปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟแล้ว นำเจลไปย้อมด้วยด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 g/mL ประมาณ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
9. ล้างสีของ ethidium bromide โดยการแช่ในน้ำกลั่น ประมาณ 30 นาที
10. นำ เจลไปส่องด้วย UV-source ในเครื่อง UV transilluminator เพื่อดูขนาดของ DNA เทียบกับ DNA มาตรฐาน

5. หาลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้จากหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ มาทำ Sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W จาก website <http://ebi.ac.uk/> ของ The European Molecular Biology Laboratory (EMBL, U.K.) จากนั้นจึงสร้าง phylogenetic tree

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บตัวอย่างหอยเชอรี่

จากการเก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ในเขตภาคกลาง สามารถจำแนกหอยเชอรี่ตามลักษณะภายนอกได้ทั้งหมด 5 ลักษณะ ดังภาพประกอบ 8-12



ภาพประกอบ 8 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวดำ มีลาย



ภาพประกอบ 9 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย



ภาพประกอบ 10 หอยเชอร์รี่ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวดำ



ภาพประกอบ 11 หอยเชอร์รี่ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวเหลือง

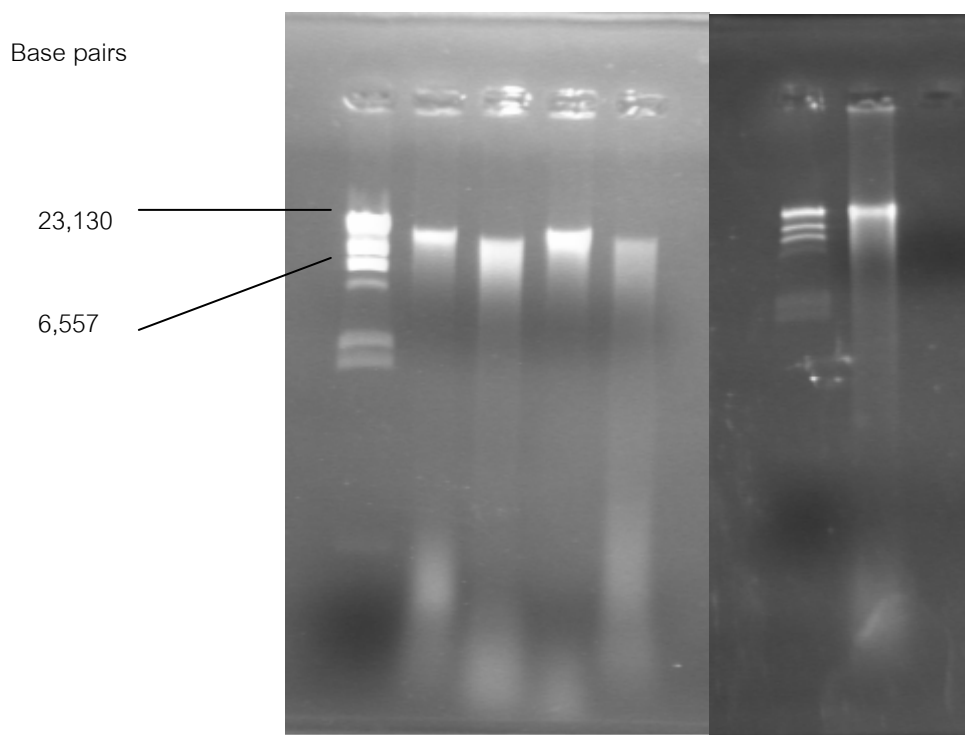


ภาพประกอบ 12 หอยเชอร์รี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวเหลือง

2. การสกัด DNA หอยเชอร์รี่ทั้ง 5 ลักษณะ

ผลจากการสกัด DNA ของหอยเชอร์รี่ทั้ง 5 ลักษณะ สามารถตรวจสอบคุณภาพของ DNA จากการทำ Agarose gel electrophoresis ได้ขนาดของ DNA ประมาณ 20,000 bp ดังภาพประกอบ 13

M 1 2 3 4 M 5



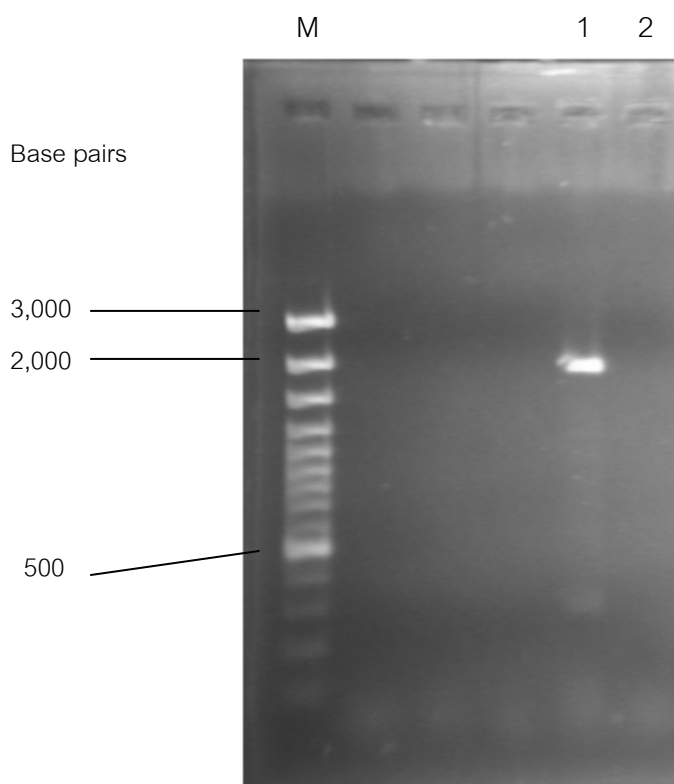
M = Lambda DNA-Hind III Marker

- 1 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 1
- 2 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 2
- 3 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 3
- 4 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 4
- 5 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 5

ภาพประกอบ 13 แสดงคุณภาพของ DNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ

3. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 18S rRNA ด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบส ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ

หลังจากสกัด DNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะและทำ PCR โดยใช้ primer บริเวณ 18S rRNA ได้ผลการทดลอง ดังภาพประกอบ 14-18 โดยพบว่า PCR product ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะมีขนาดใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 2000 bp



M = 100 bp DNA Ladder

1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 1
(เปลือกดำ ตัวดำ มีลาย)

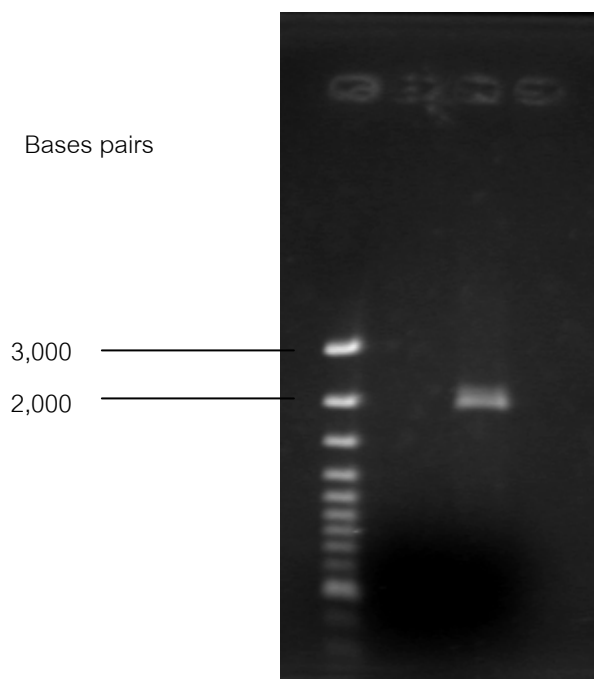
2 = Negative control

**ภาพประกอบ 14 แสดงผล PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 1
(เปลือกดำ ตัวดำ มีลาย)**

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 1 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	ACTCCTNAGACTTTTACTTCCTCTAAACGATCAAGTTNGAGCGTCTTCTC	50
51	GACCAGCGGGCGCCGCCCGTGNAAAGGGCGGGCCGAGACCAATCCGAGGCC	100
101	CTCACTAAACCGTTCATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGG	150

151	CAGGGACGTAATCAACGCGAGCTTATGACTCGCGCTTACTGGGAATTCCT	200
201	CGTTCATGGGGAAGAATTTCAAGCCCCAATCCCTATCACGAAGGAGATTC	250
251	AAGGGGTTTCCCACTCTTTTCAAAGCAGGGACACATCCACGTTGATTCT	300
301	TCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCCCGGACATCTAAGGGCATCACAGACCTG	350
351	TTATTGCTCAATCTCGTGTGGCTAAACGCCACTTGTCCCTCTAAGAAGTT	400
401	AGCACCGACGCGTGAAGAATCGGTGAACTATTTAGCAGGCTAGAGTCTCG	450
451	TTCGTTATCGGAATTAACCAGACAAATCGCTCCCCCACTAAGAACGGCC	500
501	ATGCACCACCACCCACCGAATCNAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCT	550
551	TACAGAGTCCGGACCGGGTGAGTTTTCCCGTGTTGAGTCAATTAAGCCGC	600
601	ANGCTCCACTCCTGGTGGTGGCCCTTTCTTCAATTCCCTTTAAGTTTCAG	650
651	CTTTGTCAACCATACTTTCCCCCGGGAAACCCNAAAACTTTGGTTTTCC	700
701	CCTGAANCCTGCCCCGCAATAGTCCAATGNAACCNACCCCCCNGCGGAAT	750
751	CCCTTATTTGGNCATCGTTTTATTGGGCCANAACTACGNACNGGCAATT	800
801	TNGATCNNTCTTTCCAAAANCTCNTGNCCTTTCNGTTCTNTGANTNNANT	850
851	AAAAAANTNCCTTNGGANAATNCCNNTTNTCCACTTGTTCCCTTNTTGCG	900
901	NATGGATTCCANGAAATTTTNCNNNTNATCACCGCCAATACNGNNTGCC	950
951	CCCGGCATGGNCCCCTTAAATAATNCCCCCGNGTCCCGAAAACCGCCA	1000
1001	AAATTANC	1008



M = 100 bp DNA Ladder

1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2
(เปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย)

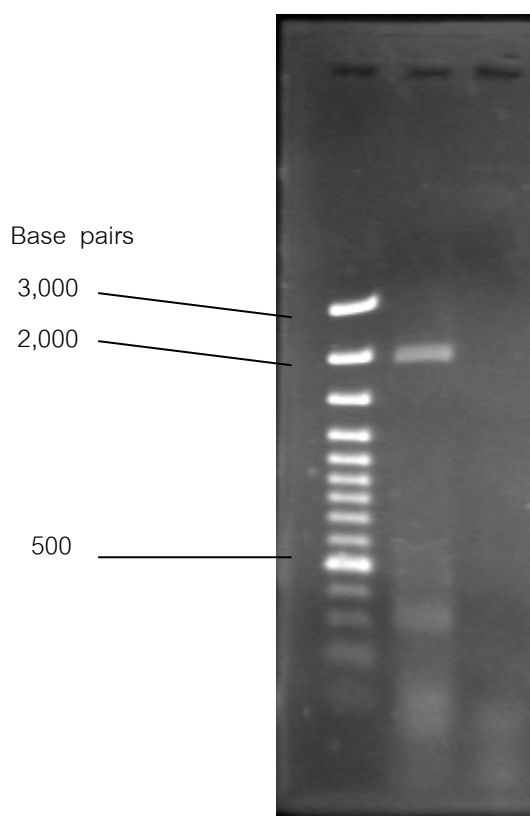
2 = Negative control

ภาพประกอบ 15 แสดงผล **PCR product** ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2
(เปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย)

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	TNNTTNNNNNTTCCNNNNATCATANCTNCNACAAAGATTANGCCATGCAT	50
51	GTCTAAGTTCACACCCTCGTACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATC	100

101	AGTCGAGGTTTCCTTAGATGATCCATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATT	150
151	CTAGAGCTAATACATGCAAACCAGCTCCGACCCGGTGTCAAAGCCGGGAA	200
201	AGAGCGCTTTTATTAGTTCAAACCAGTCGGGGTTTCGGCCCCGTCCCTT	250
251	TTGGTGA CTCTGGATAACTTTGTGCCGATCGCATGGCCTCGAGCCGGCGA	300
301	CGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGG	350
351	CCTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGA	400
401	GGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	450
451	CTTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGAA	500
501	CTCTTTTGAGGCTCCGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCCTTTAACN	550
551	AGGATCTATTGGANGGCAAGTCTGGTGNCCANCANCCNCNGNAATTCCNG	600
601	CTCCNATANCGNATATTAAAGTTGTTGCNATTNANAAGCTCNNANTTGA	650
651	TCTCNGGNATNNCCNCGGTCCNNCCNCNACGGTNACTGNNNNAACCTN	700
701	GGNTNGNNCCGNTTCTTCCCCGNGNCNNCNCNGNTTTTNGGCCNNCCATCN	750
751	CTCCNTTATNTNCGGNNTTCTCCNNCCNTGNGCNTTTNCCTNAACNTTA	800
801	TTGGCCGGNCNGNACCNTTTACCTTTCAANAAATNANANNGNNNANNNNNN	850
851	GNNTNTNCNNNCNNAATTATNGNNCCNNGNNANTCANGNNATANNNNCCCN	900
901	NNNCNNNTTTTNNNNNNNTNCTNNNANCNCNNGNNNTNNTTNNNANNNNNN	950
951	NNNNNNNNNCNNCCCNNTNCNCCNNNTTNNNCNNNNNNNTNNTTNNCNNNC	1000
1001	TNNNNNNNNCANNNNNNNNNNANNNNTTNCNCANCCCC	1038



M = 100 bp DNA Ladder

1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3
(เปลือกเหลือง ตัวดำ)

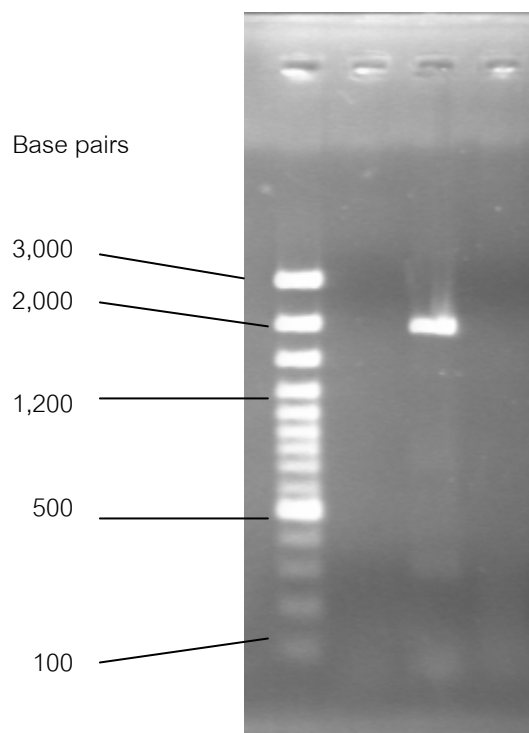
2 = Negative control

ภาพประกอบ 16 แสดงผล **PCR product** ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3
(เปลือกเหลือง ตัวดำ)

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	CGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCA	50
51	CATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCAGCTCGGGGA	100

101	GGTAGTGACNAAAAATAACAATACGGAACCTCTTTGAGGCTCCGTAATTG	150
151	GAATGAGTACACTTTAAACCCCTTTAACNAGGATCTATTGGAGGGCAAGTN	200
201	TNTTGNTTGTCTNNAGATTAGNCATGCATGTCTAAGTTACACCCTNGTAC	250
251	GGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGTCGAGGTTCCCTTAGATGATC	300
301	CATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACC	350
351	AGCTCCGACCCGGTGTCAAAGCCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGTTCAAA	400
401	TGCCGATCGCATGGCCTCGAGCCGGCGACGCATCTTCAAATGTCTGCCC	450
451	ACCAGTCGGGGTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTG	500
501	TATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGGCCTACCATGTTGACTACGGGTAA	550
551	TGGTGCCANCAACCCCCGGTAATTCCANCTCCAATAGCGTATAATTAAAG	600
601	TTTGNTGCGATTTAAAAANCCCNANTTGGATCTTCAGGCATGGGCGTGN	650
651	CGGNCCCTNCTNGCCGACNGTCACTGTGCCNAAACCNGGGCCTNGCCGCC	700
701	GGCCTCTTCTNGGGGTCCNCNNTTCNNGTTTTTTNGGGCGTTNCCNNTCC	750
751	CTCCCCTTTTATCTTCCNGGGCCTTCTTCCNNTCCAATGGTGNCTTTTTC	800
801	NNTTNACCCTTNTTGGGGCGGGCNGGGAANCTTTTACTTTTNTAANAAA	850
850	ANTNANAANCNTTCNAAAAACNANGCTNCCTCAACCCCTNANTTAATGGN	900
901	NCCCNNTGNNAATAAANGGGAATTTGGAACCCCN	935



M = 100 bp DNA Ladder

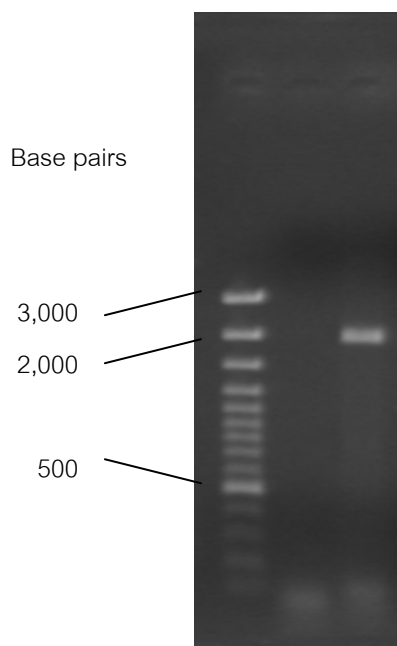
1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4
(เปลือกเหลือง ตัวเหลือง)

2 = Negative control

**ภาพประกอบ 17 แสดงผล PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4
(เปลือกเหลือง ตัวเหลือง)**

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	ATCATANNCTTCTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACCC	50
51	TCGTACGGTGGAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGTCGAGGTTCCCTTA	100
101	GATGATCCATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACAT	150
151	GCAAACCAGCTCCGACCCGGTGTCAAAGCCGGGAAAGAGCGCTTTTATTA	200
201	GTTCAAAACCAGTCGGGGTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGAT	250
251	AACTTTGTGCCGATCGCATGGCCTCGAGCCGGCGACGCATCTTTCAAATG	300
301	TCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGGCCTACCATGTTGACTA	350
351	CGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACG	400
401	GCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCAGC	450
451	TCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGAACTCTTTTGAGGCTCC	500
501	GTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGG	550
551	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTNCAATAGCGTATAT	600
601	TAAAGTTGTTGCGNATTA AAAAGCTCGTAGTTGGATCTCANGCATGGGCG	650
651	TGCNGTCCGTTCTCGCNACGGTCACTNCGCGAAANCCTGGGCTNNGCGCG	700
701	GCTCNTTCTCGGGGTCNCNNTCNGTTTTTTGGCCTTCCCATCCTCCCCTT	750
751	TATCTTCCGTCCTCTCCNNCCCCATNGTGCTCCTNCTCTCACCGTTTTG	800
801	GGCNGGNCGGAAACTNCTNCTTTGAAGAAAATTAAAANGGTTCAANCNA	850
851	GGCCNNTTCAGNCCTGNAATAATNGGGGCATNGGANNAANTGGAAATAAN	900
901	GANCCTCCGNNTCTATTTNTGCTTGGTTTTNCGGANCCCNACAGNTAAATG	950
951	NTTATANAAGGACCTCAACNGCGGGNCACCCCTCNTTTNCGGGNGTTNN	1000
1001	AAGNNNAATTCTCTNCCT	1020



M = 100 bp DNA Ladder

1 = Negative control

2 = PCR product ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 5
(เปลือกดำ ตัวเหลือง)

**ภาพประกอบ 18 แสดงผล PCR product ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 5
(เปลือกดำ ตัวเหลือง)**

นำ PCR product ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 5 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1

GNAGNNNNNNNTGGGGGGGNNGGAGACCTGCGACGGATGCTCCAGGGTN

50

51	CTTGAAAAAGTAGAGGTAGTAGGTGAACCTGCAAGAAGGATCAACCACGG	100
101	TNAATCAGTCGAGGTTCTTAGATGATCCATTTCTACTTGGNTAACTGTG	150
151	GCAATTCTAGAGCTAATNCATGCAAACCAGCTCCGNCCCGGTGTCAAAGC	200
201	CGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGNTCAAACCAGNCGGGGTTTTGGCCCC	250
251	GTCCCTTTTGGTGA CTCTGGATAACTTTGTGCCGAACGCATGGACTCGAGC	300
301	CGGCGACGATCTTCAAATGACTGCCCTATCAAATGTCGATGGTNCGTGA	350
351	TAGGCCTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCG	400
401	GAGAGGGAGCATGAGAAACGGCANNACCACANCCAAGGNAGGNAGCAGGCG	450
451	CGNAACNTTANCCCACTCCAGCNTCGGGGAGGGNANGTGACNAANAAAAA	500
501	NCNAATACCGGAACCTNTTTTNGNGGCTTCGTATTTNGGNANNNGGTACA	550
551	CCTTTTAAACCCCTTTTAACCGAGGANTNTTATTTGGGGGGCAAGGNTTT	600
601	GGGGGCCAGCAGCCCCNTTAATTTCCAGCCTCCAATAGCCGTTTTTTTA	650
651	AAAGGNTGNTGGNGATTAAAAAAGGNTCGTNNGGTTGAGTCTTNAGCCNN	700
701	TNGGNNGGNCNNGNCCCGNTTTTNGNGNCGGNTTNCCTGCCCCCNAGCCT	750
751	TGGGCTTNGGCNNGGCTCTTTNNGCGGGGTCCCCGGGTGGNTTTTTTT	800
801	GGGCCCCGCCCNNTTCTTTTCGTATTTTTTTCCGGGTTTTTTCCGNGCCNN	850
851	GGGGGGNTCTTNGGTTNGGGGGNNNNTGGGGGNGGGCCCGGAAACNNTTT	900
901	NNTTTTGGANNAANTTTAGNNGGTNTTNANAANAGNNGGTTTTTAACCTT	950
951	TAAAAAAGGGGNCNNNNGAAAAANTTGAAANANGACCCCCGGCTTTTTTTN	1000
1001	CCNNGGGTTTNGGGCCCCCGGGGTTTTTTTTTAAGNGGNCCCGCCGGGN	1050
1051	CNCTTCCTTTTTTG	1065

4. การทำ sequence alignment ของ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะด้วยโปรแกรม Clustal W

ผลการทำ sequence alignment ของ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ ด้วยโปรแกรม Clustal W พบลำดับเบสบางส่วนของหอยเชอรี่ที่เหมือนกัน ในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ดังข้อมูล

```

T4      -----ATCAT-ANNCTTCTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAG 41
T2      ---TNNTTNNNNNTTCCNNNNATCATANCTNCNACAAAGATTANGCCATGCATGTCTAAG 57
T5      GNAGNNNNNNNTGGGGGGGNGGAGACCTGCGACGGATGCTCCAGGGTNCCTTGAAAAAG 60
T3      -----CGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACAT 53
T1      -----ACTCCTNAGACTTTTACTTCTCTAAACGATCAAGTTNGAGCGTCTTCTCGA 52
              *

T4      TTCACACCCTCGTACGGTGGAACCGCGAATGGCTCAT--TAAATCAGTCGAGGTTTCCTT 99
T2      TTCACACCCTCGTACGGTG-AAACCGCGAATGGCTCAT--TAAATCAGTCGAGGTTTCCTT 114
T5      TAGAGGTAGTAGGTGAACCTGCAAGAAGGATCAACCACGGTNAATCAGTCGAGGTTTCCTT 120
T3      CCAAGGAAGGCAGCAGGCG-----CGCAACTTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGT-- 106
T1      CCAGCGGCGCCGCCCGTG-----NAAGGGCGGGCCGAGACCAATCCGAGGCCCTCACTA 107
              *      *      *      *      *

T4      AGATGATCCATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACCAG 159
T2      AGATGATCCATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACCAG 174
T5      AGATGATCCATTTCTACTTGGNTAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATNCATGCAAACCAG 180
T3      -GACNAAAAATAACAATACGGAACCTCTTTTGAGGCTCCGTAATTGGAATGAGTACACT-- 163
T1      AACCGTTCAATCGGTA-GTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAA- 165
              **      *      *      *      *      *      *      *      *

T4      CTCCGACCCGGTGTCAAAG--CCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGTTCAAACACAGTCGGG 217
T2      CTCCGACCCGGTGTCAAAG--CCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGTTCAAACACAGTCGGG 232
T5      CTCCGNCCCGGTGTCAAAG--CCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGNTCAAACACAGNCGGG 238
T3      -TTAAACCCCTTAAACNAGGATCTATTGGAGGGCAAGTNTNTTGNNT-----GTCTNN 214
T1      -CGCGAGCTTATGACTCGCGCTTACTGGGAATT--CCTCGTTCATGGGGAAGAATTTCAA 222
              *      *      *      **

T4      GTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGATCGCATGGCC--TC 275
T2      GTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGATCGCATGGCC--TC 290
T5      GTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGAACGCATGGAC--TC 296
T3      AGATTAGNCATGCATGTCTAAGTTACACCTNGTACGGTGAAACCG-CGAATGGCTCATT 273
T1      GCCCAATCCCTATCACGAAGGAGATTCAAGGGGTTTCCCACTCTTTTCAAAGCAGGGAC 282
              *      *      *      *      *      *      *

T4      GAGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTGCGATGGTACGTGATAGGC 335
T2      GAGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTGCGATGGTACGTGATAGGC 350
T5      GAGCCGGCGACG-ATCTTTCAAATGACTGCCCTATCAAATGTGCGATGGTNCGTGATAGGC 355
T3      AAATCAGTCGAG-GTTCCTTAGATGAT--CCATTTCTACT-TGGATAAC-TGTGGCAATT 328
T1      ACATCCACGTTGATTCCTTCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCCGGACATCTAAGGGCATCA 342
              *      *      *      *      *      *      **      *      *

T4      CTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAG 395
T2      CTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAG 410
T5      CTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAG 415
T3      CTA--GAGCTAAT-----ACATGCAAACACAGCTCCGAC-CCGGTGTCAAAGC-CGGG 376
T1      CAGACCTGTTATTGCTCAATCTCGTGTGGCTAAACGCCACTTGTCCCTCTAAGAAGTTAG 402
              *      *      *      *      *      *      *

T4      AAACGGCTA-CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGC---AACTT--ACCCACTCCCAG 449
T2      AAACGGCTA-CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGC---AACTT--ACCCACTCCCAG 464
T5      AAACGGCANNACCACANCCAAGGNAGGNAGCAGGCGCGN---AACNTTANCCCACTCCAGC 472
T3      AAAGAGCG--CTTTTATTAGTTCAAATGCCGATCGCAT--GGCCTCGAGCCGGCGACGC 431

```

T1	CACCGACGCGTGAAGAATCGGTGAACTATTTAGCAGGCTAGAGTCTCGTTCGTTATCGGA	462
	* * * * *	
T4	CTCGGGGAGGTA---GTGACGAAAAATAAC--AATAC-GGAAC--TCTTTTGAGGCTCC	500
T2	CTCGGGGAGGTA---GTGACGAAAAATAAC--AATAC-GGAAC--TCTTTTGAGGCTCC	515
T5	NTCGGGGAGGGNA--NGTGACNAANAAAAANCNAATACCGGAACCTNTTTTNGNGGCTTC	530
T3	ATCTTTCAAATG--TCTGCCCACCAAGTCGG--GGTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGAC	486
T1	ATTAACCAGACAAATCGCTCCCCCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCACCGAATC	522
	* * * * *	
T4	GTAATTGG--AATGAGTACAC---TTTAAACCC--TTTAACGAGGATCTATT---GG--	547
T2	GTAATTGG--AATGAGTACAC---TTTAAACCC--TTTAACNAGGATCTATT---GG--	562
T5	GTATTTNNGNANNNGGTACACCT-TTTAAACCCCTTTTAACCGAGGANTNTTATTTGG--	587
T3	TC--TGGATAACTTTGTATCAAA-TGTCGATGGTACGTGAT--AGGCCTACCATGTTG--	539
T1	NAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTTACAGAGTCCGGACCGGTGAGTTTTCCCGTG	582
	* * * * *	
T4	--AGGGCAAG--TCTGGTGCC-AGCAGCCGCGGTAA--TTCCAGC-TNCAATAGCGTATA	599
T2	--ANGGCAAG--TCTGGTGNCCANCANCCNCNGNAA--TTCCNGC-TCCNATANCNATA	615
T5	--GGGGCAAGGNTTTGGGGGCCAGCAGCCCCCNTTAATTTCCAGCCTCCAATAGCCGTTT	645
T3	--ACTACGGG-TAATGGTGCCANCAACCCCCCGGTAA--TTCCANC-TCCAATAGCGTATA	593
T1	TTGAGTCAATTAAGCCGCANGCTCCACTCCTGGTGGTGGCCCTTTCTTCAATTCCTTTA	642
	* * * * *	
T4	TT---AAAGTTGTTGCGNATTA AAAAGCTCGTAGTTGGATCT-CANGCATGGGCGT-GC	653
T2	TT---AAAGTTGTTGCNA-TTNANAAGCTC NNANTTGGATCT-CNGGNATNNCC-C-NC	667
T5	TTTTAAAAGGNTGNTGGNGATTTAAAAAAGGNTCGTNNGGTTG-AGTCTTNAGCCNN-TN	703
T3	ATT--AAAGTTTGTGCGATTTAAAAANCCNTANTTGGATCTTCAGGCATGGGCGTGNC	651
T1	AGTTTCAGCTTTGT--CAACCATACTTTCCCCGGGAAACCCNAAAAACTTTGGTTTTCC	700
	* ** *	
T4	NGTCCGTTCTCGCN-ACGGTCACTNCGCGAAANCCTGGGCTNGGCGCGGCTCNTTCTCGG	712
T2	GGTCCNN-CCCNCN-ACGGTNACTGNNNNAA--CCTNNGNTNGNNCCGNTTCTTCCCCGN	723
T5	GGNNGGNCNGGNC-CCGNTTTTGNNGCGGNTTNCCTGCC--CNAGCCTTGGGCTTNG	760
T3	GGNCCCTNCTNGCCGACNGTCACTGTGCCNAAACNNGGGCCTNGCC-----	697
T1	CCTGAANCCTGCCCGCAATAGTCCAATGNAACCNACCCCCCNGCGGAATCCCTTATTG	760
	* * *	
T4	GGTCNCNNTCNGTTTTTTGGCCTTCCCATCCTCCCCTTTATCTTCCGTCTCTCCNNCCC	772
T2	G--NCNNCNCNGNTTTTNGGCCNNCC-ATCNCCTCCTTTATNTNCGGNNTTCTCCNNCCN	780
T5	G-CNNGGCTCTTTNNGCGGGGGTCCC--CGGGTTGGNTTTTTTTGGGCCCCGCCCTTCT	817
T3	--GCCGGCTCTTCTNNGGGGGTCCN--CNTTCNGGTTTTTTTNGGGGCTTNCNNNTCCCT	752
T1	--GNCATCGTTTTATTGGGCCANAACCTACGNACNGGCAATTTNGATC NNTCTTTCCAA	817
	**	
T4	CATNGTGCTCCTNCTCTTACCGTTTTTGGGCGNGNCGGAACNCTNCTTTGAAGAAAAT	832
T2	----TGNGCNTTTNCCTNAACNTTATTGGCCGGNCNGNACCNTTACCTTTCAANAAAT	835
T5	TTTCGTATTTTTTTCCGGGTTTTTCCGNGCCNNGGGGGGNTCTTNGGTTNNGGGGNNNN	877
T3	CCCCTTTTATCTTCCNNGGGCCTTCTTCCNNTCCAATGGTGNC TTTTNCNNTTNACCCTT	812
T1	AANCTCNTGNCCTTTTCNG---TTCTNTGANTNNANTAAAAAANTNCCCTTNGGANAATNC	873
T4	TAAAANGGTTTNAANCNAGGCCNNTTCA-----GNCCTGNAATAATNGGGGCATN	882
T2	NANANNNGNNANNNNNNGNNTNTNCNNNCNNAATTATNGNNCCNNGNNANTCANGNNATA	895
T5	TGGGGGNGGGCCCGGAAACNNTTTNNTT-----TTGGANNAANTTTAGNNGGTN	926
T3	NTTGGGGCGGGCNGGGAANCTTTTACTT-----TTNTAANAAAAANTNANAANCN	861

T1	CNNTTNTCCACTTGTTCCCTTNTTGCNATG-----GATTCCANGAAATTTTNCNNNT	927
T4	GGANNAANTGGAAATAA--NGANCCTCCGNNTCTATTTNTG--CTTGTTTTTNCGGANCC	938
T2	NNNNCCNNNNCNNNTT--TTNNNNNTNCTNNNANCNCNNGNNNTNNTTNNNNNNNNNN	953
T5	TTNANAANAGNNGGGTT--TTAACCTTTAAAAAAGGGGNCNNNGAAAAANTTGAAANANG	984
T3	TTCNAAAACNANGCTNCCTCAACCCCTNANTTAATGGNNCCCNTTGNNATAAANGGGA	921
T1	NATCACCGCCAATACNG--NNTGCCCCGGCATGGNCCCCTTAAATAATNCCCCCGNGTT	985
T4	CNCAGNTAAATGNTTTATANAAGGACCTCAACNGCGGGNCACCCCTCNTTTNCGGGNGTT	998
T2	NNNNNNNNNNCNCNNNTTNCNCCNNNTTNNNCNNNNNTNNTTNNCNNCTNNNNNNNNNC	1013
T5	ACCCCGGGCTTTTTTTNCCCNGGGTTTNGGGCCCCCGGGGGTTTTTTTTTAAGGNGGNCC	1044
T3	ATTTGGAACCCCN-----	935
T1	CCCGAAAACCNGCCAAAATTANC-----	1008
T4	NNAAGNNNAAATTCCTCTNCCT-----	1020
T2	ANNNNNNNNNNNNNNTTNCNCANCCCC	1041
T5	CGCCGGGNCNCTTCCTTTTTTTGG-----	1067
T3	-----	
T1	-----	

- T1 หอยเชอรีลักษณะที่ 1 (เปลือกดำ ตัวดำ มีลาย)
- T2 หอยเชอรีลักษณะที่ 2 (เปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย)
- T3 หอยเชอรีลักษณะที่ 3 (เปลือกเหลือง ตัวดำ)
- T4 หอยเชอรีลักษณะที่ 4 (เปลือกเหลือง ตัวเหลือง)
- T5 หอยเชอรีลักษณะที่ 5 (เปลือกดำ ตัวเหลือง)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

การดำเนินการศึกษาค้นคว้าแบ่งได้เป็น 6 ขั้นตอน ดังนี้

1. รวบรวมสายพันธุ์หอยเชอรี่ที่พบในภาคกลางของประเทศไทย
2. การสกัด DNA ของหอยเชอรี่
3. การเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการ โดยใช้เทคนิค PCR
4. การตรวจตำแหน่งของ PCR product โดยใช้วิธี Electrophoresis
5. หาลำดับเบสของ PCR product โดยใช้เครื่อง DNA Sequencer
6. ทำ Phylogenetic tree เพื่อจำแนกชนิดของหอยเชอรี่

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ที่ใช้ในการศึกษา

หอยเชอรี่ที่เก็บในเขตภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จ.ปทุมธานี จ.พระนครศรีอยุธยา และ กรุงเทพฯ

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารทางพันธุกรรม
- 2.2 เครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเลต
- 2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก
- 2.4 ไมโครเวฟ
- 2.5 เครื่องเขย่า
- 2.6 เครื่องนั่งฆ่าเชื้อ
- 2.7 เครื่องชั่งวางน้ำหนักด้านบน
- 2.8 เครื่องอิเล็กทรอนิกส์
- 2.9 เครื่องดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ
- 2.10 กระติกน้ำแข็ง
- 2.11 อ่างเลี้ยงหอยเชอรี่

3. สารเคมี

- 3.1 ไนโตรเจนเหลว
- 3.2 Tris-HCl

3.3 EDTA

3.4 NaCl

3.5 N-Laurylsarcosine sodium salt

3.6 Phenol-Chloroform

3.7 Proteinase K

3.8 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

3.9 2-propanol

3.10 Agarose

3.11 Deionized water

3.12 Ethidium bromide

3.13 PCR kit

3.14 High Pure PCR Template Preparation kit

4. วัสดุภัณฑ์

4.1 Microtube ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

4.2 Mortar and pestle

4.3 Erlenmeyer flask

4.4 Cylinder

4.5 Pipette tip

4.6 Beaker ขนาดต่าง ๆ

5. โพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ตำแหน่งยีน 18S rRNA (หน่วยบริการพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ)

A1-AACCTGGTGATCCTGCCAGT

B1-TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC

วิธีดำเนินการ

ดำเนินการโดยภาพรวม

ในภาคสนาม

เก็บหอยเชอรี่ในเขตภาคกลางของประเทศไทย

ในห้องปฏิบัติการ

เลี้ยงหอยเชอรี่ในอ่างโดยแยกตามลักษณะภายนอก

ไข่หอยเชอรี่

DNA extraction

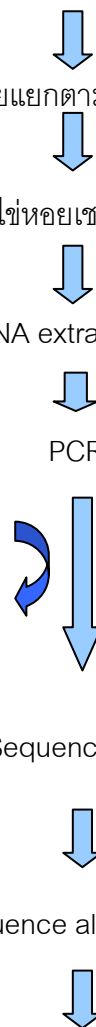
PCR

Electrophoresis

Sequencing

Sequence alignment

Phylogenetic tree reconstruction



1. การเลี้ยงหอยเชอรี่

1. เก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ที่มีรูปร่างลักษณะต่างๆ มาเลี้ยงไว้ในอ่างโดยแยกลักษณะต่าง ๆ ในแต่ละอ่าง

2. เลี้ยงหอยจนแน่ใจว่าหอยที่เลี้ยงไว้มีรูปร่างลักษณะเช่นดั้งเดิมทุกรุ่นที่หอยออกลูก โดยเริ่มใช้หอยในรุ่นที่ 3

2. การสกัด DNA

นำไข่ของหอยเชอรี่บดในโถร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลว



เติม Extraction buffer 8 mL



ผสมโดยกลับหลอดไปมา ที่ 37 C จนเป็นเนื้อเดียวกัน



Incubate ที่ 4 C นาน 30 นาที



เติม Phenol : Chloroform 5 mL



เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที



ปั่น 12,000 rpm ที่ 4 C นาน 30 นาที



เติม Proteinase K 40 L ในตะกอนที่ได้

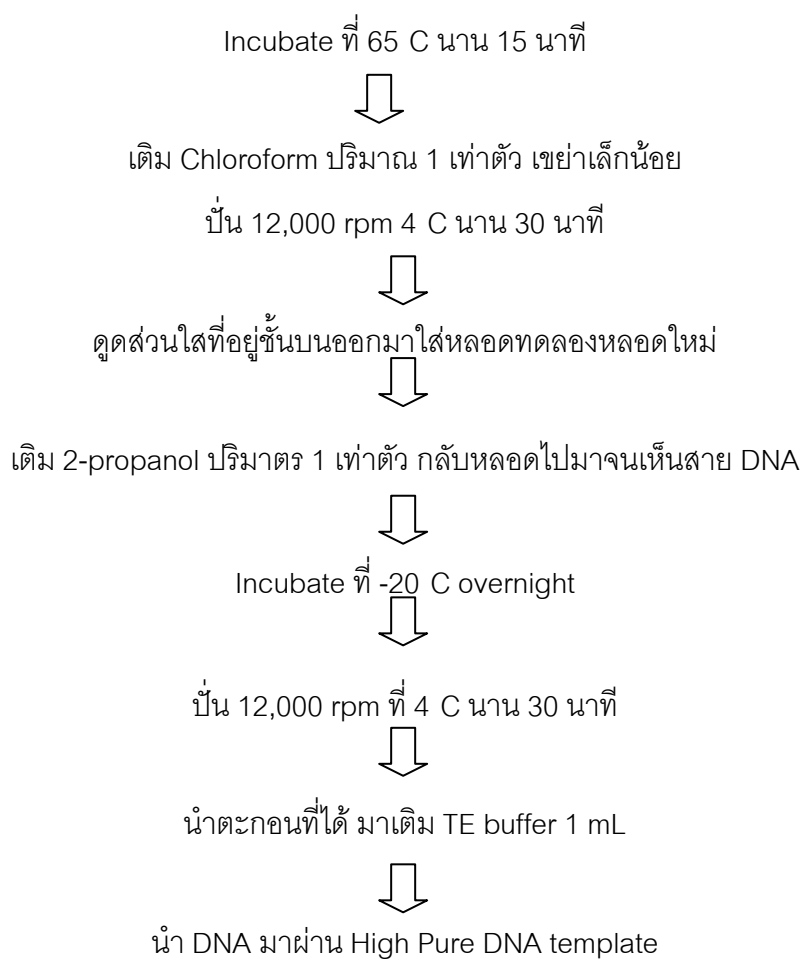


Incubate ที่ 65 C นาน 15 นาที



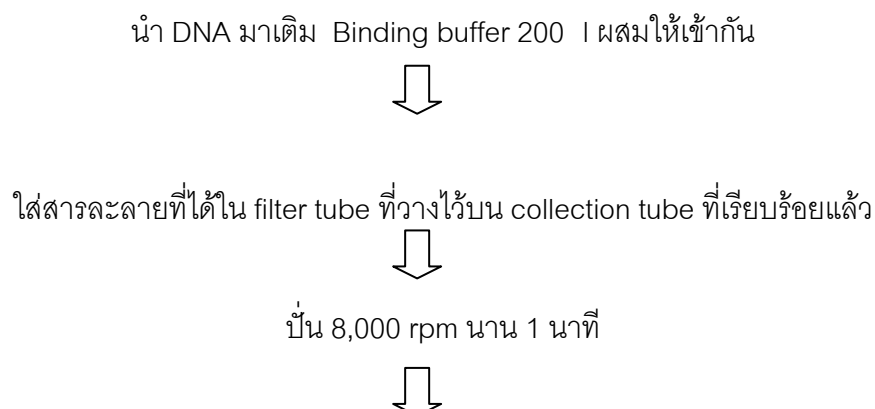
เติม 5M NaCl และ CTAB อย่างละ 500 L

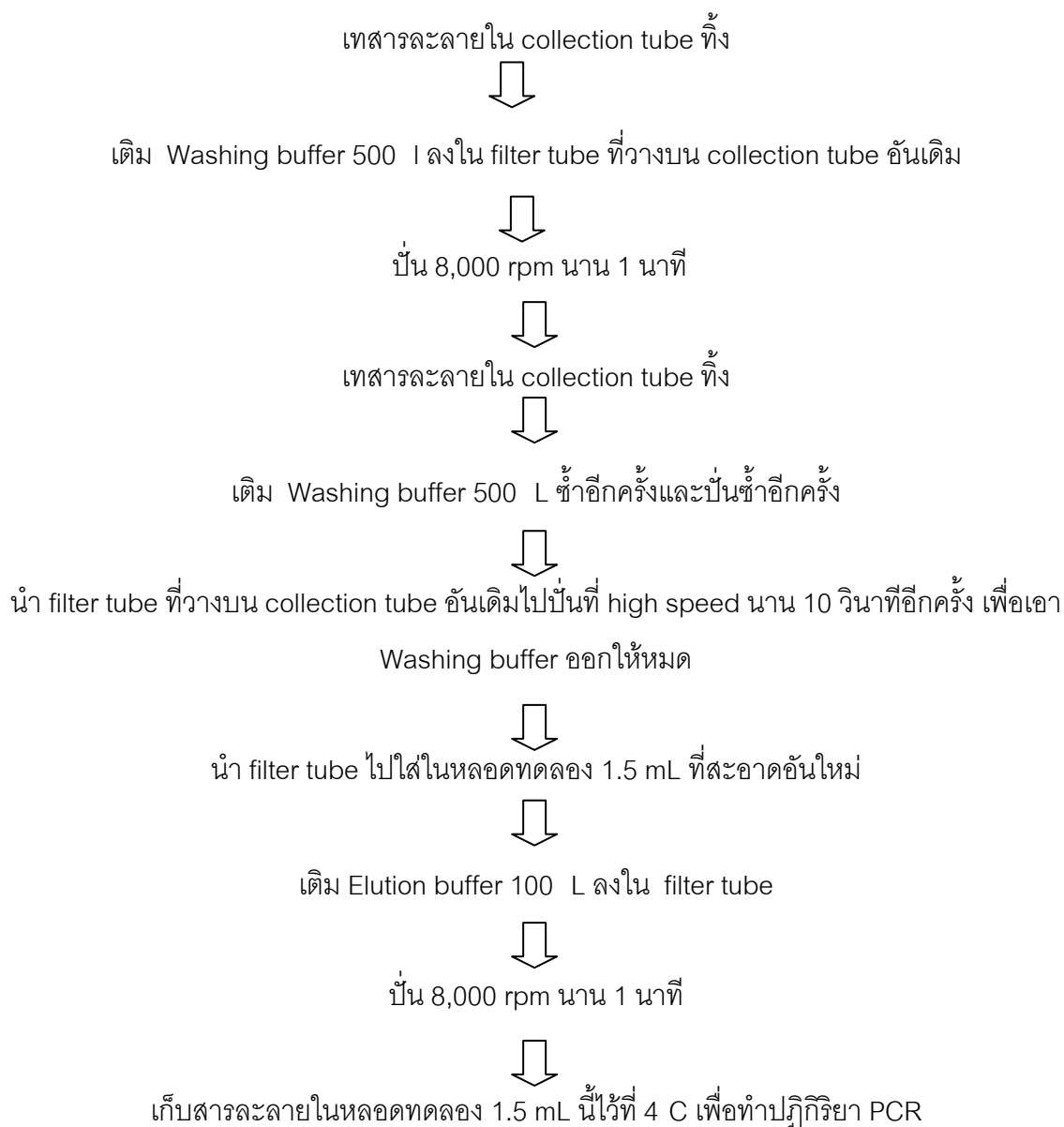




High Pure DNA Template Preparation kit ประกอบด้วย

- 1.1 Binding buffer
- 1.2 Washing buffer
- 1.3 Elution buffer
- 1.4 Filter tubes
- 1.5 Collection tube





3. การเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ 18S rRNA โดยใช้เทคนิค PCR

ในการทำ PCR มีส่วนประกอบที่สำคัญ 4 ส่วน คือ

- DNA template คือ DNA สายคู่ที่ได้จากการสกัด DNA จากหอยเชอรี่
- เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase
- deoxynucleotide triphosphates ทั้ง 4 ตัว ได้แก่ dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- oligonucleotide primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ

ตาราง 3 แสดงส่วนผสมของ PCR reaction

สาร	ปริมาตรที่ใช้ (L)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA	1.0	
10X Buffer PCR	2.5	
Primer A1	1.0	50.0 mM
Primer B1	1.0	50.0 mM
MgCl ₂	1.5	1.5 mM
Taq Polymerase	0.2	5.0 U
dNTPs	2.0	2.5 mM
Sterile distilled water	15.8	
รวม	25.0	

นำ microtube ที่มีส่วนผสมดังข้างต้นไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge ประมาณ 30 วินาที นำส่วนผสมที่ได้ไปใส่ในเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Denaturation step	95 C	เวลา 1 นาที
Annealing step	60 C	เวลา 1 นาที
Extention step	72 C	เวลา 1 นาที

ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 C นาน 5 นาที และ 72 C นาน 10 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ

- จากนั้นนำ PCR product ที่ได้เก็บไว้ที่ 4 C
- นำ PCR product บางส่วนมาตรวจดูโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับ DNA มาตรฐาน
- นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบส ที่ BSU

4. การเตรียม Agarose Gel electrophoresis และการทำ electrophoresis

1. ชั่ง agarose ใส่ใน TBE buffer ให้มีความเข้มข้น 1% agarose
2. ให้ความร้อนจนกระทั่ง agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกันใน buffer
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 C นำไปเทใน gel chamber ที่มีช่องสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอตั้งอยู่เรียบร้อยแล้ว
4. ทิ้งไว้จน agarose แข็งตัวจึงดึง comb ออก
5. เท TBE buffer จนท่วมเจลประมาณ 1 mm
6. ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 2 L กับ loading dye 5 L แล้วหยอดลงในช่องของเจล
7. ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ โดยให้กระแสไฟวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที
8. หลังจากปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟแล้ว นำเจลไปย้อมด้วยด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 g/mL ประมาณ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
9. ล้างสีของ ethidium bromide โดยการแช่ในน้ำกลั่น ประมาณ 30 นาที
10. นำ เจลไปส่องด้วย UV-source ในเครื่อง UV transilluminator เพื่อดูขนาดของ DNA เทียบกับ DNA มาตรฐาน

5. หาลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้จากหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ มาทำ Sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W จาก website <http://ebi.ac.uk/> ของ The European Molecular Biology Laboratory (EMBL, U.K.) จากนั้นจึงสร้าง phylogenetic tree

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บตัวอย่างหอยเชอรี่

จากการเก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ในเขตภาคกลาง สามารถจำแนกหอยเชอรี่ตามลักษณะภายนอกได้ทั้งหมด 5 ลักษณะ ดังภาพประกอบ 8-12



ภาพประกอบ 8 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวดำ มีลาย



ภาพประกอบ 9 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย



ภาพประกอบ 10 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวดำ



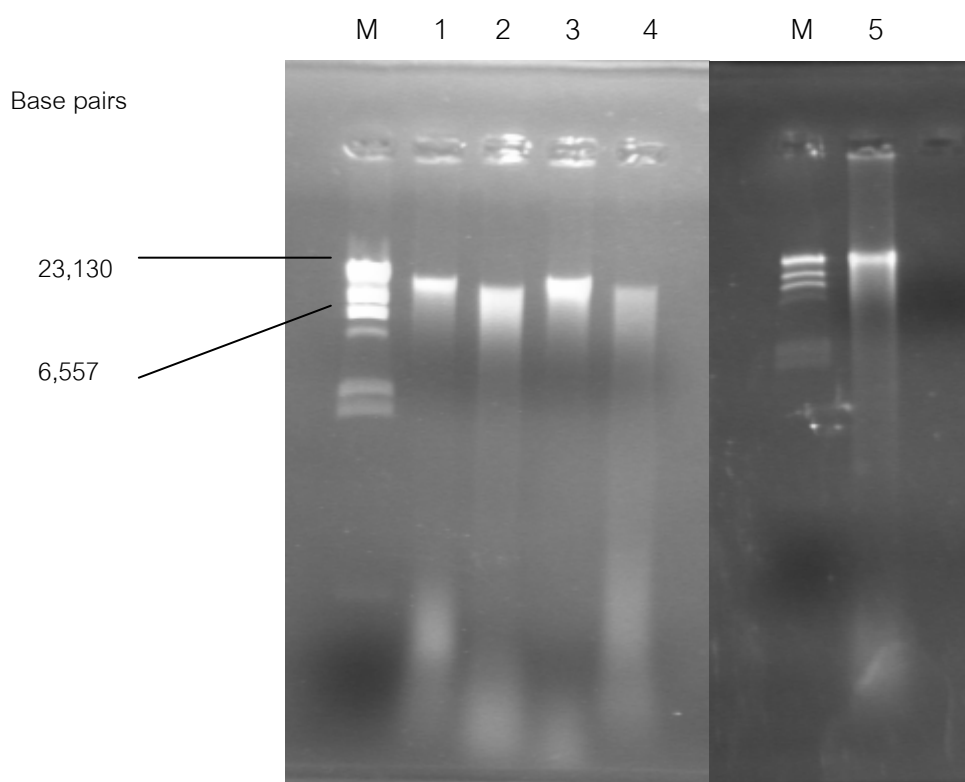
ภาพประกอบ 11 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวเหลือง



ภาพประกอบ 12 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวเหลือง

2. การสกัด DNA หอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ

ผลจากการสกัด DNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ สามารถตรวจสอบคุณภาพของ DNA จากการทำ Agarose gel electrophoresis ได้ขนาดของ DNA ประมาณ 20,000 bp ดังภาพประกอบ 13



M = Lambda DNA-Hind III Marker

1 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 1

2 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 2

3 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 3

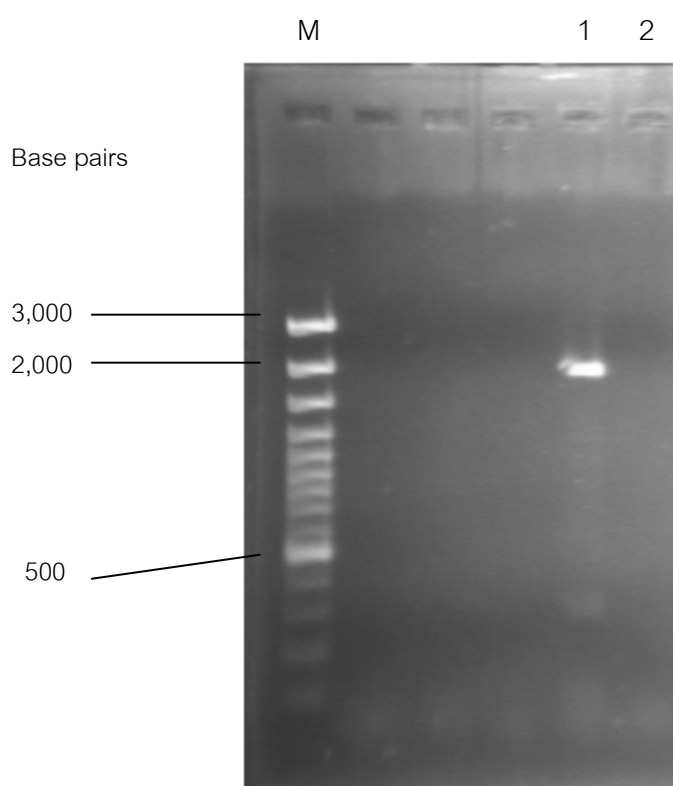
4 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 4

5 = แสดงคุณภาพของ DNA ที่ได้จากหอยลักษณะที่ 5

ภาพประกอบ 13 แสดงคุณภาพของ DNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ

3. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ 18S rRNA ด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบส ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ

หลังจากสกัด DNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะและทำ PCR โดยใช้ primer บริเวณ 18S rRNA ได้ผลการทดลอง ดังภาพประกอบ 14-18 โดยพบว่า PCR product ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะมีขนาดใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 2000 bp



M = 100 bp DNA Ladder

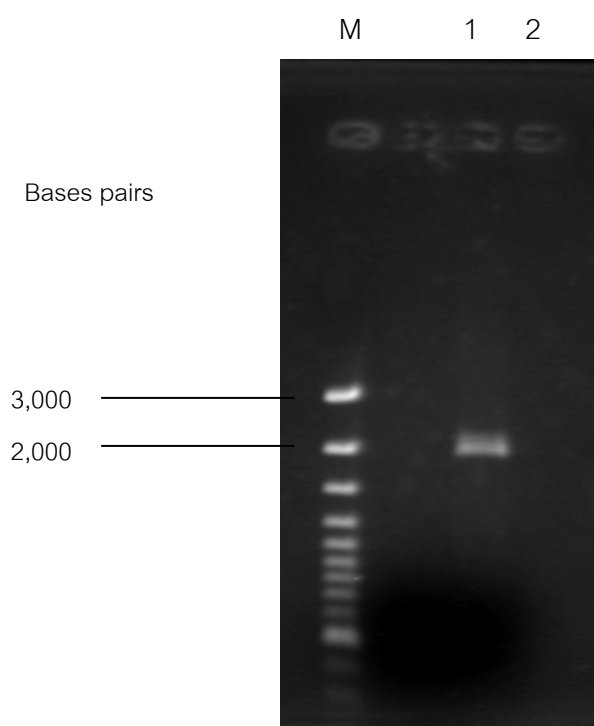
1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 1
(เปลือกดำ ตัวดำ มีลาย)

2 = Negative control

ภาพประกอบ 14 แสดงผล **PCR product** ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 1
(เปลือกดำ ตัวดำ มีลาย)

นำ PCR product ของหอยเชอร์รี่ลักษณะที่ 1 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	ACTCCTNAGACTTTTACTTCCTCTAAACGATCAAGTTNGAGCGTCTTCTC	50
51	GACCAGCGGCGCCGCCCGTNAAGGGCGGGCCGAGACCAATCCGAGGCC	100
101	CTCACTAAACCGTTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGG	150
151	CAGGGACGTAATCAACGCGAGCTTATGACTCGCGCTTACTGGGAATTCCT	200
201	CGTTCATGGGGAAGAATTTCAAGCCCCAATCCCTATCACGAAGGAGATTC	250
251	AAGGGGTTTCCCACTCTTTTCAAAGCAGGGACACATCCACGTTGATTCCT	300
301	TCAGTGTAGCGCGCGTGC GGCCCCGGACATCTAAGGGCATCACAGACCTG	350
351	TTATTGCTCAATCTCGTGTGGCTAAACGCCACTTGTCCCTCTAAGAAGTT	400
401	AGCACCGACGCGTGAAGAATCGGTGAACTATTTAGCAGGCTAGAGTCTCG	450
451	TTCGTTATCGGAATTAACCAGACAAATCGCTCCCCCACTAAGAACGGCC	500
501	ATGCACCACCACCCACCGAATCNAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCT	550
551	TACAGAGTCCGGACCGGGTGAGTTTTCCCGTGTTGAGTCAATTAAGCCGC	600
601	ANGCTCCACTCCTGGTGGTGGCCCTTTCTTCAATTCCCTTTAAGTTTCAG	650
651	CTTTGTCAACCATACTTTCCCCCGGGAAACCCNAAAACTTTGGTTTTCC	700
701	CCTGAANCCTGCCCCGCAATAGTCCAATGNAACCNACCCCCCNGCGGAAT	750
751	CCCTTATTTGGNCATCGTTTTATTGGGCCANAACTACGNACNGGCAATT	800
801	TNGATCNNTCTTTCCAAAANCTCNTGNCCTTTCNGTTCTNTGANTNNANT	850
851	AAAAAANTNCCTTNGGANAATNCCNNTTNTCCACTTGTTCCCTTNTTGCG	900
901	NATGGATTCCANGAAATTTTNCNNNTNATCACCGCCAATACNGNNTGCC	950
951	CCCGGCATGGNCCCCTTAAATAATNCCCCGNGTTC CGAAAACNGCCA	1000
1001	AAATTANC	1008



M = 100 bp DNA Ladder

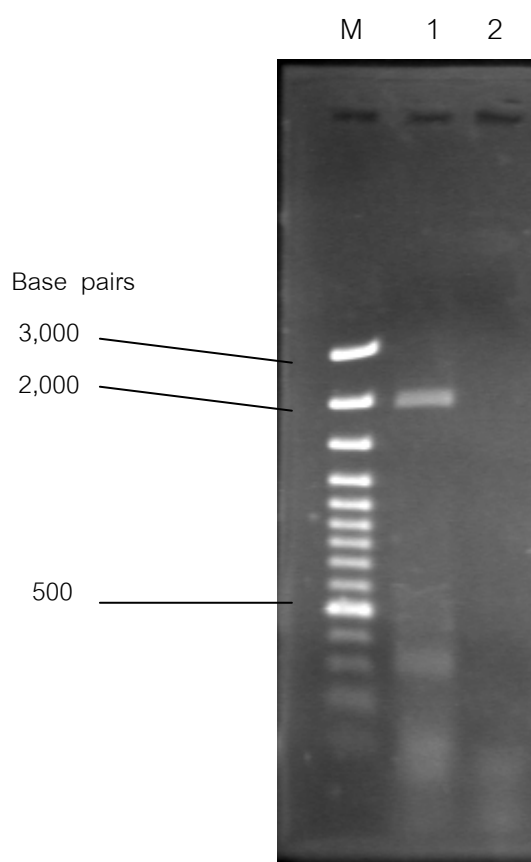
1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2
(เปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย)

2 = Negative control

ภาพประกอบ 15 แสดงผล **PCR product** ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2
(เปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย)

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	TNNTTNNNNNTTCCNNNNATCATANCTNCNACAAAGATTANGCCATGCAT	50
51	GTCTAAGTTCACACCCTCGTACGGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAAATC	100
101	AGTCGAGGTTCCCTTAGATGATCCATTCTACTTGGATAACTGTGGCAATT	150
151	CTAGAGCTAATACATGCAAACCAGCTCCGACCCGGTGTCAAAGCCGGGAA	200
201	AGAGCGCTTTTATTAGTTCAAACCAGTCGGGGTTTCGGCCCCGTCCCTT	250
251	TTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGATCGCATGGCCTCGAGCCGGCGA	300
301	CGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGG	350
351	CCTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGA	400
401	GGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	450
451	CTTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGAA	500
501	CTCTTTTGAGGCTCCGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCCTTTAACN	550
551	AGGATCTATTGGANGGCAAGTCTGGTGNCCANCANCCNCNGNAATTCCNG	600
601	CTCCNATANCGNATATTAAAGTTGTTGCNATTNANAAGCTCNNANTTGGA	650
651	TCTCNGGNATNNCCNCGGTCCNNCCNCNACGGTNACTGNNNNAACCTN	700
701	GGNTNGNNCCGNTTCTTCCCCGNGNCNNCNCNGNTTTTNGGCCNNCCATCN	750
751	CTCCNTTATNTNCGGNNTTCTCCNNCCNTGNGCNTTTNCCTNAACNTTA	800
801	TTGGCCGGNCNGNACCNTTTACCTTTCAANAAATNANANNNGNNANNNNNN	850
851	GNNTNTNCNNNCNNAATTATNGNNCCNNGNNANTCANGNNATANNNNCCCN	900
901	NNNCNNNTTTTNNNNNTNCTNNNANCNCNNGNNNTNNTTNNNANNNNNN	950
951	NNNNNNNNNCNNCCCNNTNCNCCNNNTTNNNCNNNNNTNNTTNNCNNNC	1000
1001	TNNNNNNNNNCANNNNNNNNNNANNNNTTNCNCANCCCC	1038



M = 100 bp DNA Ladder

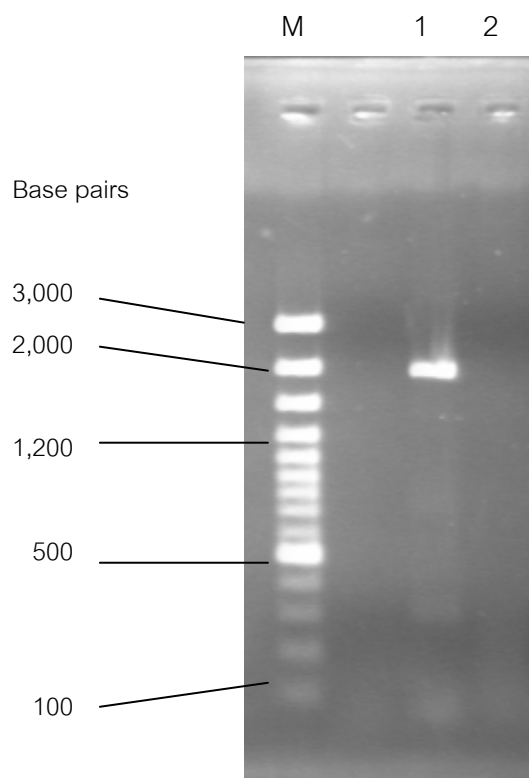
1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3
(เปลือกเหลือง ตัวดำ)

2 = Negative control

ภาพประกอบ 16 แสดงผล **PCR product** ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3
(เปลือกเหลือง ตัวดำ)

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	CGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCA	50
51	CATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCAGCTCGGGGA	100
101	GGTAGTGACNAAAAATAACAATACGGAACCTCTTTGAGGCTCCGTAATTG	150
151	GAATGAGTACACTTTAAACCCTTTAACNAGGATCTATTGGAGGGCAAGTN	200
201	TNTTGNTTGTCTNNAGATTAGNCATGCATGTCTAAGTTACACCCTNGTAC	250
251	GGTGAAACCGCGAATGGCTCATTAATCAGTCGAGGTTCTTAGATGATC	300
301	CATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACC	350
351	AGCTCCGACCCGGTGTCAAAGCCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGTTCAAA	400
401	TGCCGATCGCATGGCCTCGAGCCGGCGACGCATCTTCAAATGTCTGCCC	450
451	ACCAGTCGGGGTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGA CTCTGGATAACTTTG	500
501	TATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGGCCTACCATGTTGACTACGGGTAA	550
551	TGGTGCCANCAACCCCCGGTAATTCCANCTCCAATAGCGTATAATTAAAG	600
601	TTTGNTGCGATTTAAAAANCCCNANTTGGATCTTCAGGCATGGGCGTGN	650
651	CGGNCCCTNCTNGCCGACNGTCACTGTGCCNAAACCNGGGCCTNGCCGCC	700
701	GGCCTCTTCTNGGGGGTCCNCNTTCNGGTTTTTTNGGGCGTTNCCNNTCC	750
751	CTCCCCTTTTATCTTCCNGGGCCTTCTTCCNNTCCAATGGTGNCTTTTTC	800
801	NNTTNACCCTTNTTGGGGCGGGCNGGGAANCTTTTACTTTTNTAANAAA	850
850	ANTNANAANCNTTCNAAAAACNANGCTNCCTCAACCCCTNANTTAATGGN	900
901	NCCCNNTGNNAATAAANGGGAATTTGGAACCCCN	935



M = 100 bp DNA Ladder

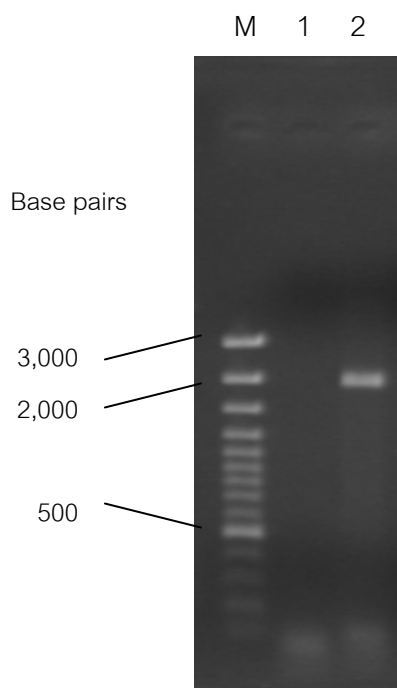
1 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4
(เปลือกเหลือง ตัวเหลือง)

2 = Negative control

ภาพประกอบ 17 แสดงผล PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4
(เปลือกเหลือง ตัวเหลือง)

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	ATCATANNCTTCTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTTCACACCC	50
51	TCGTACGGTGGAACCGCGAATGGCTCATTAAATCAGTCGAGGTTCTTA	100
101	GATGATCCATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACAT	150
151	GCAAACCAGCTCCGACCCGGTGTCAAAGCCGGGAAAGAGCGCTTTTATTA	200
201	GTTCAAAACCAGTCGGGGTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGA CTCTGGAT	250
251	AACTTTGTGCCGATCGCATGGCCTCGAGCCGGCGACGCATCTTCAAATG	300
301	TCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGGCCTACCATGTTGACTA	350
351	CGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACG	400
401	GCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAACTTACCCACTCCCAGC	450
451	TCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGA ACTCTTTTGAGGCTCC	500
501	GTAATTGGAATGAGTACACTTTAAACCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGG	550
551	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTNCAATAGCGTATAT	600
601	TAAAGTTGTTGCGNATTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCANGCATGGGCG	650
651	TGCNGTCCGTTCTCGCNACGGTCACTNCGCGAAANCCTGGGCTNNGCGCG	700
701	GCTCNTTCTCGGGGTCNCNNTCNGTTTTTTGGCCTTCCCATCCTCCCCTT	750
751	TATCTTCCGTCCTCTCCNNCCCCATNGTGCTCCTNCTCTTCACCGTTTTG	800
801	GGCNGGNCGGAAACTNCTNCTTTGAAGAAAATTAAAANGGTTCAANCNA	850
851	GGCCNNTTCAGNCCTGNAATAATNGGGGCATNGGANNAANTGGAAATAAN	900
901	GANCTCCGNNTCTATTTNTGCTTGGTTTTNCGGANCCCN CAGNTAAATG	950
951	NTTATANAAGGACCTCAACNGCGGGNCACCCCTCN TTTNCGGGNGTTNN	1000
1001	AAGNNNAAATTCCTCTNCCT	1020



M = 100 bp DNA Ladder

1 = Negative control

2 = PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 5
(เปลือกดำ ตัวเหลือง)

ภาพประกอบ 18 แสดงผล **PCR product** ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 5
(เปลือกดำ ตัวเหลือง)

นำ PCR product ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 5 ที่ได้ไปหาลำดับเบส และได้ผลดังนี้

1	GNAGNNNNNNNTGGGGGGGNNGGAGACCTGCGACGGATGCTCCAGGGTN	50
51	CTTGAAAAAGTAGAGGTAGTAGGTGAACCTGCAAGAAGGATCAACCACGG	100
101	TNAATCAGTCGAGGTTCTTAGATGATCCATTTCTACTTGGNTAACTGTG	150
151	GCAATTCTAGAGCTAATNCATGCAAACCAGCTCCGNCCCGGTGTCAAAGC	200
201	CGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGNTCAAACCAGNCGGGGTTTTGGCCCC	250
251	GTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGAACGCATGGACTCGAGC	300
301	CGGCGACGATCTTCAAATGACTGCCCTATCAAATGTCGATGGTNCGTGA	350
351	TAGGCCTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCG	400
401	GAGAGGGAGCATGAGAAACGGCINNACCACANCCAAGGNAGGNAGCAGGCG	450
451	CGNAACNTTANCCCACTCCAGCNTCGGGGAGGGNANGTGACNAANAAAAA	500
501	NCNAATACCGGAACCTNTTTTNGNGGCTTCGTATTTNGGNANNNGGTACA	550
551	CCTTTTAAACCCCTTTTAACCGAGGANTNTTATTTGGGGGGCAAGGNTTT	600
601	GGGGGCCAGCAGCCCCCNTTAATTTCCAGCCTCCAATAGCCGTTTTTTTA	650
651	AAAGGNTGNTGGNGATTAAAAAAGGNTCGTNNGGTTGAGTCTNAGCCNN	700
701	TNGGNNGGNCNNGNCCCGNTTTTGNNGCGGNTTNCCTGCCCCNAGCCT	750
751	TGGGCTTNGGCNNGGCTCTTTNNGCGGGGGTCCCCGGGTGGNTTTTTTT	800
801	GGGCCCCCCCCNTTCTTTTCGTATTTTTTTCCGGGTTTTTTCCGNGCCNN	850
851	GGGGGGNTCTTNGGTTNGGGGNNNNNTGGGGGNGGGCCCGGAAACNNTTT	900
901	NNTTTTGGANNAANTTTAGNNGGTNTTNANAANAGNNGGGTTTTAACCTT	950
951	TAAAAAAGGGGNCNNNNGAAAANTTGAAANANGACCCCCGGCTTTTTTTN	1000
1001	CCCNNGGTTTNGGGCCCCCGGGGTTTTTTTTTAAGGNGGNCCCGCCGGGN	1050
1051	CNCTTCCTTTTTTGG	1065

4. การทำ sequence alignment ของ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะด้วยโปรแกรม Clustal W

ผลการทำ sequence alignment ของ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ ด้วยโปรแกรม Clustal W พบลำดับเบสบางส่วนของหอยเชอรี่ที่เหมือนกัน ในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ดังข้อมูล

```

T4      -----ATCAT-ANNCTTCTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAG 41
T2      ---TNNTTNNNNNTTCCNNNNATCATANCTNCNACAAAGATTANGCCATGCATGTCTAAG 57
T5      GNAGNNNNNNNTGGGGGGGNGGAGACCTGCGACGGATGCTCCAGGGTNCCTTGAAAAAG 60
T3      -----CGGGGAATCAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACAT 53
T1      -----ACTCCTNAGACTTTTACTTCCTCTAAACGATCAAGTTNGAGCGTCTTCTCGA 52
              *

T4      TTCACACCCTCGTACGGTGGAACCGCGAATGGCTCAT--TAAATCAGTCGAGGTTTCCTT 99
T2      TTCACACCCTCGTACGGTG- AAACCGCGAATGGCTCAT--TAAATCAGTCGAGGTTTCCTT 114
T5      TAGAGGTAGTAGGTGAACCTGCAAGAAGGATCAACCACGTTNAATCAGTCGAGGTTTCCTT 120
T3      CCAAGGAAGGCAGCAGGCG-----CGCAACTTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGT-- 106
T1      CCAGCGGCGCCGCCCGCTG-----NAAGGGCGGGCCGAGACCAATCCGAGGCCCTCACTA 107
              *      *      *      *      *

T4      AGATGATCCATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACCAG 159
T2      AGATGATCCATTTCTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACCAG 174
T5      AGATGATCCATTTCTACTTGGNTAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATNCATGCAAACCAG 180
T3      -GACNAAAAATAACAATACGGAACCTTTTTGAGGCTCCGTAATTGGAATGAGTACACT-- 163
T1      AACCGTTCAATCGGTA-GTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAA- 165
              **      *      *      *      *      *      *      *      *

T4      CTCCGACCCGGTGTCAAAG--CCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGTTCAAAACCAGTCGGG 217
T2      CTCCGACCCGGTGTCAAAG--CCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGTTCAAAACCAGTCGGG 232
T5      CTCCGNCCCGGTGTCAAAG--CCGGGAAAGAGCGCTTTTATTAGNTCAAAACCAGNCGGG 238
T3      -TTAAACCCTTTAACNAGGATCTATTGGAGGGCAAGTNTNTTGNTT-----GTCTNN 214
T1      -CGCGAGCTTATGACTCGCGCTTACTGGGAATT--CCTCGTTCATGGGGAAGAATTTCAA 222
              *      *      *      *      *      *

T4      GTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGATCGCATGGCC--TC 275
T2      GTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGATCGCATGGCC--TC 290
T5      GTTTTGGCCCCGTCCCTTTTGGTGACTCTGGATAACTTTGTGCCGAACGCATGGAC--TC 296
T3      AGATTAGNCATGCATGTCTAAGTTACACCCTNGTACGGTGAAACCG-CGAATGGCTCATT 273
T1      GCCCAATCCCTATCACGAAGGAGATTCAAGGGGTTTCCCACTCTTTTCAAAGCAGGGAC 282
              *      *      *      *      *      *      *

T4      GAGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGGC 335
T2      GAGCCGGCGACGCATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAAATGTCGATGGTACGTGATAGGC 350
T5      GAGCCGGCGACG-ATCTTTCAAATGACTGCCCTATCAAATGTCGATGGTNCGTGATAGGC 355
T3      AAATCAGTCGAG-GTTCCTTAGATGAT--CCATTTCTACT-TGGATAAC-TGTGGCAATT 328
T1      ACATCCACGTTGATTCTTCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCCCGGACATCTAAGGGCATCA 342
              *      *      *      *      *      *      *      *      *

T4      CTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAG 395
T2      CTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAG 410
T5      CTACCATGTTGACTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAG 415
T3      CTA--GAGCTAAT-----ACATGCAAACAGCTCCGAC-CCGGTGTCAAAGC-CGGG 376
T1      CAGACCTGTTATTGCTCAATCTCGTGTGGCTAAACGCCACTTGTCCCTCTAAGAAGTTAG 402
              *      *      *      *      *      *      *

```

T4	AAACGGCTA-CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGC---AACTT--ACCCACTCCCAG	449
T2	AAACGGCTA-CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGC---AACTT--ACCCACTCCCAG	464
T5	AAACGGCANNACCACANCCAAGGNAGGNAGCAGGCGCGN---AACNTTANCCCACTCCAGC	472
T3	AAAGAGCG--CTTTTATTAGTTCAAATGCCGATCGCAT---GGCCTCGAGCCGGCGACGC	431
T1	CACCGACGCGTGAAGAATCGGTGAACTATTTAGCAGGCTAGAGTCTCGTTTCGTTATCGGA	462
	* * * *	
T4	CTCGGGGAGGTA---GTGACGAAAAATAAC--AATAC-GGAAC--TCTTTTGAGGCTCC	500
T2	CTCGGGGAGGTA---GTGACGAAAAATAAC--AATAC-GGAAC--TCTTTTGAGGCTCC	515
T5	NTCGGGGAGGGNA--NGTGACNAANAAAAANCNAATACCGGAACCTNTTTTNGNGGCTTC	530
T3	ATCTTTCAAATG--TCTGCCCCACCGATCGG--GGTTTCGGCCCCGTCCCTTTTGGTGAC	486
T1	ATTAACCAGACAAATCGCTCCCCCACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCACCGAATC	522
	* * * *	
T4	GTAATTGG--AATGAGTACAC---TTTAAACCC--TTTAACGAGGATCTATT---GG--	547
T2	GTAATTGG--AATGAGTACAC---TTTAAACCC--TTTAACNAGGATCTATT---GG--	562
T5	GTATTTNGGNANNGGTACACCT-TTTAAACCCCTTTTAACCGAGGANTTTATTTGG--	587
T3	TC--TGGATAACTTTGTATCAAA-TGTCGATGGTACGTGAT--AGGCCTACCATGTTG--	539
T1	NAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTTACAGAGTCCGGACCGGGTGAGTTTTCCCGTG	582
	* * *	
T4	--AGGGCAAG--TCTGGTGCC-AGCAGCCGCGGTAA--TTCCAGC-TNCAATAGCGTATA	599
T2	--ANGGCAAG--TCTGGTGNCCANCANCCNCNGNAA--TTCCNGC-TCCNATANCGNATA	615
T5	--GGGGCAAGGNTTTGGGGGCCAGCAGCCCCCNTTAATTTCCAGCCTCCAATAGCCGTTT	645
T3	--ACTACGGG-TAATGGTGCCANCAACCCCCGGTAA--TTCCANC-TCCAATAGCGTATA	593
T1	TTGAGTCAATTAAGCCGCANGCTCCACTCCTGGTGGTGGCCCTTTCTTCAATTCCTTTA	642
	* * *	
T4	TT---AAAGTTGTTGCGNATTA AAAAGCTCGTAGTTGGATCT-CANGCATGGGCGT-GC	653
T2	TT---AAAGTTGTTGCNA-TTNANAAGCTCNNANTTGGATCT-CNGGNATNNCC-C-NC	667
T5	TTTTAAAGGNTGNTGGNGATTTAAAAAAGGNTCGTNNGGTTG-AGTCTTNAGCCNN-TN	703
T3	ATT--AAAGTTTGTGCGATTTAAAAANCCCNANTTGGATCTTCAGGCATGGGCGTGNC	651
T1	AGTTTCAGCTTTGT--CAACCATACTTTCCCCGGGAAACCCNAAAACTTTGGTTTTCC	700
	* ** *	
T4	NGTCCGTTCTCGCN-ACGGTCACTNCGCGAAANCCTGGGCTNNGCGCGGCTCNTTCTCGG	712
T2	GGTCCNN-CCNCN-ACGGTNACTGNNNNAA--CCTNNGNTNGNNCCGNTTCTTCCCCGN	723
T5	GGNNGGNCNGGNC-CCGNTTTTNGNGCGGNTTNCCTGCCCC--CNAGCCTTGGGCTTNG	760
T3	GGNCCCTNCTNGCCGACNGTCACTGTGCCNAAACCGGGCCTNGCC-----	697
T1	CCTGAANCCTGCCCCGCAATAGTCCAATGNAACCNACCCCCNGCGGAATCCCTTATTTG	760
	* * *	
T4	GGTCNCNNTCNGTTTTTTGGCCTTCCCATCCTCCCCTTTATCTTCCGTCTCTCCNNCCC	772
T2	G--NCNNCNCNGNTTTTNGGCCNNCC-ATCNCCTCCTTTATNTNCGGNNTTCTCCNNCCN	780
T5	G-CNNGGCTCTTTNNGCGGGGGTCCC--CGGGTTGNTTTTTTTGGGCCCCGCCCTTCT	817
T3	---GCCGGCCTCTTCTNNGGGGGTCCN--CNTTCNGGTTTTTTNNGGGCGTTNCCNNTCCCT	752
T1	---GNCATCGTTTTATTGGGCCANAACCTACGNACNGGCAATTTNGATC NNTCTTTCCAA	817
	**	
T4	CATNGTGCTCCTNCTCTTCACCGTTTTTGGGCNGGNCGGAAACTNCTNCTTTGAAGAAAAT	832
T2	----TGNGCNTTTNCCTNAACNTTATTGGCCGGNCNGNACCNTTTACCTTTCAANAAAT	835
T5	TTTCGTATTTTTTCCGGGTTTTTCCGNGCCNNGGGGGGNTCTTNGGTTNNGGGGNNNN	877
T3	CCCCTTTTATCTTCCNNGGCCTTCTTCCNNTCCAATGGTGNC TTTTTCNNTTNACCCTT	812
T1	AANCTCNTGNCCTTTCNG---TTCTNTGANTNNANTAAAAAANTNCCTTNGGANAATNC	873

T4	TAAAANGGTTTCAANCNAGGCCNNTTCA-----GNCCTGNAATAATNGGGGCATN	882
T2	NANANNGNNNNNNNNNGNNTNTNCNNNCNNAATTATNGNNCCNNGNNANTCANGNNATA	895
T5	TGGGGGNGGGCCCGGAAACNNTTTNNTT-----TTGGANNAANTTTAGNNGGTN	926
T3	NTTGGGGCGGGCNGGGAANCCTTTTACTT-----TTNTAANAAAAANTNANAANCN	861
T1	CNNTTNTCCACTTGTTCCCTTNTTGCGNATG-----GATTCCANGAAATTTTNCNNNT	927
T4	GGANNAANTGGAAATAA--NGANCCTCCGNNTCTATTTNTG--CTTGTTTTNCGGANCC	938
T2	NNNNCCNNNNCNNNTT--TTNNNNNTNCTNNNANCNCNNGNNNTNNTTNNNNNNNNN	953
T5	TTNANAANAGNNGGGTT--TTAACCTTTAAAAAGGGGNCNNNGAAAAANTTGAAANANG	984
T3	TTCNCAAAACNANGCTNCCTCAACCCCTNANTTAATGGNNCCCTTGNNAAATAAANGGGA	921
T1	NATCACCGCCAATACNG--NNTGCCCCCGGCATGGNCCCTTAAATAATNCCCCCGNGTT	985
T4	CNCAGNTAAATGNTTTATANAAGGACCTCAACNGCGGGNCACCCCTCNTTTNCGGNGTT	998
T2	NNNNNNNNNCNNCCNNTNCNCCNNNTTNNNCNNNNNTNNTTNNCNNNCTNNNNNNNNC	1013
T5	ACCCCCGGCTTTTTTTNCCCNNGGGTTTNGGGCCCCCGGGGTTTTTTTTTAAGNGGNCC	1044
T3	ATTTGGAACCCCN-----	935
T1	CCCGAAAACCNGCCAAAATTANC-----	1008
T4	NNAAGNNNAATTCCTCTNCCT-----	1020
T2	ANNNNNNNNNNNNNNNNTTNCNCANCCCC	1041
T5	CGCCGGGNCNCTTCCTTTTTTGG-----	1067
T3	-----	
T1	-----	

- T1 หอยเชอรีลักษณะที่ 1 (เปลือกดำ ตัวดำ มีลาย)
- T2 หอยเชอรีลักษณะที่ 2 (เปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย)
- T3 หอยเชอรีลักษณะที่ 3 (เปลือกเหลือง ตัวดำ)
- T4 หอยเชอรีลักษณะที่ 4 (เปลือกเหลือง ตัวเหลือง)
- T5 หอยเชอรีลักษณะที่ 5 (เปลือกดำ ตัวเหลือง)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผล และอภิปรายผลการศึกษา

จากการรวบรวมหอยเชอรี่ในเขตภาคกลางในประเทศไทย พบว่า มีหอยเชอรี่ที่สามารถแบ่งตามลักษณะทางกายภาพได้ทั้งหมด 5 ลักษณะ คือ

ลักษณะที่ 1 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวดำ มีลาย

ลักษณะที่ 2 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวดำ ไม่มีลาย

ลักษณะที่ 3 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวดำ

ลักษณะที่ 4 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกเหลือง ตัวเหลือง

ลักษณะที่ 5 หอยเชอรี่ลักษณะเปลือกดำ ตัวเหลือง

เมื่อนำลำดับเบสของหอยเชอรี่ ทั้ง 5 ลักษณะ มาหาปริมาณเบส G+C โดยใช้โปรแกรม DNASIS (DNA and protein sequence analysis system) version 2.5 ได้ผลดังตารางที่ 4 ซึ่งจะเห็นได้ว่า หอยเชอรี่ลักษณะที่ 1 (ตัวดำ เปลือกดำ ไม่มีลาย) มีปริมาณเบส G+C มากที่สุดในหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ แสดงให้เห็นว่า โอกาสในการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ทางโมเลกุลของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 1 มีโอกาสที่จะเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด (Sanson; et al. 2002 : 170)

ตาราง 4 ปริมาณ G + C ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ

ชนิด	ปริมาณเบส G + C
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 1	48.11%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 2	39.37%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 3	46.30%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 4	47.15%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 5	47.13%

จากการทำ sequence alignment ของ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่า หอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะมีความแตกต่างกันของเบสที่ตำแหน่ง 18S rRNA จริง จากความแตกต่างดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำอนุกรมวิธานของหอยเชอรี่ต่อไปได้ (Hajime. 1977 : 1)

จากการทำ sequence alignment บริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ เปรียบเทียบกันทั้ง 5 ลักษณะ โดยใช้โปรแกรม DNASIS version 2.5 พบ homology ของลำดับเบส ดังตาราง 5-8

ตาราง 5 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2, 3, 4, 5 เมื่อเปรียบเทียบกับหอยเชอรี่ลักษณะที่ 1

ชนิด	Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA เมื่อเปรียบเทียบกับ หอยเชอรี่ลักษณะที่ 1
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 2	43%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 3	49%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 4	48%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 5	43%

ตาราง 6 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3, 4, 5 เมื่อเปรียบเทียบกับหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2

ชนิด	Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA เมื่อเปรียบเทียบกับ หอยเชอรี่ลักษณะที่ 2
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 3	39%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 4	72%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 5	58%

ตาราง 7 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4, 5 เมื่อเปรียบเทียบกับหอยเชอรี่ลักษณะที่ 3

ชนิด	Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA เมื่อเปรียบเทียบกับ หอยเชอรี่ลักษณะที่ 3
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 4	46%
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 5	43%

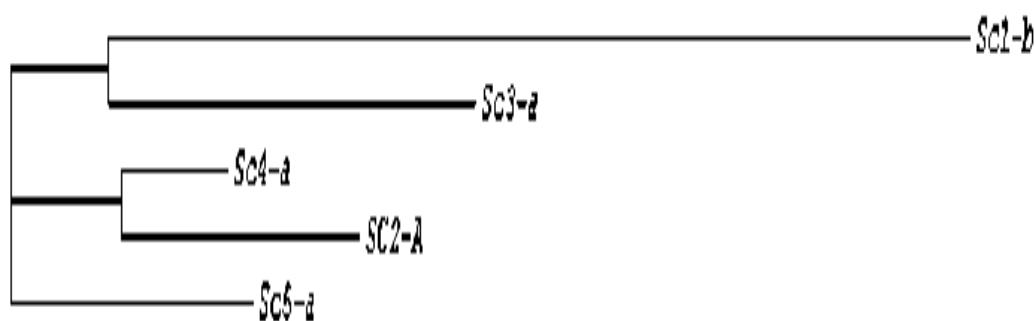
ตาราง 8 Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ลักษณะที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4

ชนิด	Homology ของลำดับเบสบริเวณ 18S rRNA เมื่อเปรียบเทียบกับ หอยเชอรี่ลักษณะที่ 4
หอยเชอรี่ลักษณะที่ 5	65%

จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบ Homology ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ พบว่า หอยเชอรี่ลักษณะที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันทางโมเลกุลกับหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4 มากที่สุดถึง 72% แสดงว่าหอยเชอรี่ลักษณะที่ 2 เป็นหอยที่มีความสัมพันธ์ทางโมเลกุลกับหอยเชอรี่ลักษณะที่ 4 มากที่สุดในบรรดาหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ ซึ่งอาจจะเป็นหอยเชอรี่ที่มาจากสายพันธุ์เดียวกัน แต่มีลักษณะทางกายภาพที่ต่างกัน อันเนื่องมาจาก ถิ่นที่อยู่ และการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม เหมือนกับหอยนางรมของประเทศออสเตรเลีย ที่มีลักษณะของเปลือก ที่แตกต่างไปจากหอยนางรมของประเทศนิวซีแลนด์ แต่มีความเหมือนกันทางโมเลกุลถึง 94% (Anderson; & Adlard. 1994 : 196) และจากการนำลำดับเบสของหอยเชอรี่เข้าไป Blast ใน www.ncbi.nlm.nih.gov พบว่า หอยเชอรี่ลักษณะที่ 2 มีความคล้ายกับ *Pomacea bridgesi* ซึ่งเป็นหอยเชอรี่ที่พบการระบาดมากทางอเมริกาใต้

(Cazzaniga. 2002 : 73) แต่ในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าพบหอยเชอรี่สายพันธุ์นี้ ส่วนหอยลักษณะที่ 4 มีความคล้ายกับ *Pomacea canaliculate* ซึ่งเป็นหอยเชอรี่ที่มีการรายงานว่ามีการระบาดอยู่ในประเทศไทยในขณะนี้ (ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชมพูนุช จรรยาเพศ. 2542)

เมื่อนำ sequence alignment บริเวณ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ทั้ง 5 ลักษณะ มาสร้าง phylogenetic tree ได้ปรากฏดังภาพ



จากผลการศึกษารั้วนี้เป็นข้อมูลสำคัญทางชีววิทยา ทำให้ทราบแน่ชัดว่า หอยเชอรี่ที่มีลักษณะทางกายภาพที่ต่างกันทั้ง 5 ลักษณะ และมีการกระจายอยู่ในบริเวณเขตภาคกลางของประเทศไทยนี้ เป็นหอยเชอรี่ที่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะภายนอก และแตกต่างกันในระดับโมเลกุลด้วย ซึ่งถือว่าเป็นข้อมูลที่สำคัญและไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนั้นข้อมูลนี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับผู้วิจัยเกี่ยวกับการกำจัดหอยเชอรี่ต่อไปได้ รวมทั้งยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางวิวัฒนาการของหอยเชอรี่ และยังสามารถนำไปเปรียบเทียบสายวิวัฒนาการกับหอยชนิดอื่น ทำให้รู้ลำดับวิวัฒนาการของหอยเชอรี่อีกด้วย

หอยเชอรี่แม้จะเป็นหอยที่มีถิ่นอาศัยเดิมในต่างประเทศ แต่เมื่อมาอยู่ในประเทศไทย ก็สามารถดำรงชีวิตได้อย่างสะดวกสบายในภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมของเรา จึงมีแนวโน้มว่าจะกลายเป็นหอยประจำถิ่นได้ในอนาคต ทั้งนี้เพราะปัจจัยต่าง ๆ ในการดำรงชีวิตและสายพันธุ์ของมันเหมาะสม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเรื่องการป้องกันกำจัดควบคู่ไป ด้วยเนื่องจากพบแน่ชัดแล้วว่าหอยเชอรี่เป็นศัตรูข้าวที่ร้ายกาจและสำคัญยิ่งชนิดหนึ่ง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ลำดับเบสของ 18S rRNA ของหอยเชอรี่ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วางแผนว่าจะ submit ข้อมูลลำดับเบสนี้เข้าไปใน database (ฐานข้อมูล) ของ GenBank ต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จริยา ชมวารินทร์. (2540). เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับ DNA, Gel Electrophoresis of DNA. ใน *PCR Technology and Application*. หน้า (4-1)-(4-22). ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ชมพูนุช จรรยาเพศ; ทักษิณ อาชาวาคม; และทรงทัต แก้วตา. (2534). ชีววิทยาของเซอรี. ใน *รายงานประจำปีกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร*. หน้า 94-102. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- ฐตา บุญภักดี. (2543). *การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำในประเทศไทยโดยใช้ RFLR*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ชลบุรี: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยบูรพา. ถ่ายเอกสาร.
- ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ. (2542). *การศึกษาความหลากหลายของหนอนเยื่อไม้ (Omphisa sp.) โดยใช้ DNA Fingerprint Technique*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นันทิยา โพธิ์สวัสดิ์. (2543). *การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากกากชาและโล่ตั้นในการกำจัดหอยเซอรี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.
- นิตยา เลหาะจินดา; และคนอื่น ๆ. (2542). การป้องกันและควบคุมหอยเซอรีโดยการจัดการทางสรีรวิทยาและชีววิธี. ใน *เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา เรื่องหอยเซอรี*. หน้า (2-1)-(2-3). ขอนแก่น.
- ปราณี พู่เจริญ. (2539). การหาลำดับเบสจาก PCR product. ใน *การประชุมเชิงปฏิบัติการพันธุ์วิศวกรรม เรื่อง เทคนิคการหาลำดับเบสของยีน และการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์*. หน้า (5-1)-(5-6). กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา และหน่วยปฏิบัติการพันธุ์วิศวกรรมด้านวิศวกรรมด้านจุลินทรีย์ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- ปราสาททอง พรหมเกิด; และ ชมพูนุช จรรยาเพศ. (2542). ผลกระทบของความแห้งแล้งต่อเนื้อเยื่อหอยเซอรี. *การประชุมวิชาการอรัญญาพิชแห่งชาติ ครั้งที่ 4*. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

- ปัทมา แซ่กิม. (2543). ผลของการสกัดจากสาบเสือต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทำลายพิษในหอยเชอรี่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- ปัทมาภรณ์ ศิริมา; และ สุนันทา พรายแก้ว. (2541). การหาลำดับเบสของ Ribosomal DNA ที่ตำแหน่ง internal transcribed spacer ที่ 2 (IT2) ของยุง *Anopheles maculates* กลุ่ม B และ E ในประเทศไทย. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. (เทคนิคการแพทย์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.
- พูลสุข หุตยธนาสันดี. (2542, ตุลาคม). หอยเชอรี่: สัตว์ศัตรูที่สำคัญของไทย. *วัดภูมิพิษ*. (4) : 149-154.
- สมศักดิ์ เพ็ชรปานกัน. (2542). การใช้หอยเชอรี่บดตากแห้งทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารไก่ไข่. ใน เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาเรื่องหอยเชอรี่. หน้า (9-1)-(9-17). ขอนแก่น.
- สยาม อรุณศรีมรกต. (2542). ชีววิทยาและประสิทธิภาพของมวนแมงดาสวนในการกำจัดหอยโข่งอเมริกาใต้. ใน เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาเรื่องหอยเชอรี่. หน้า (10-1)-(10-10). ขอนแก่น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2543). พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anderson, Timothy J. (1994). Nucleotide sequence of a rDNA internal transcribed spacer support synonymy of *Saccostrea commercialis* and *S.glomerata*. *J Moll.Stud*. (60) : 196-197.
- D.Hartley; & K.Hamish. (1991). Endosulfan. *The Agrochemicals Handbook*. London.
- F.O.Sanson, Gerdine; et al. (2002). Experimental Phylogeny of Neutrally Evolving DNA Sequence Generated by a Bifurcate Series of Nested Polymerase Chain Reactions. *Mol.Biol.Evol*. 19(2) : 170-178.
- Hajime, I. (1977). Evolution of ribosomal RNA. *Biochem.Physiol*. 58 : 1-7.
- J.Cazzaniga, Nestor. (2002). Old species and new concepts in the taxonomy of *Pomacea*. *Biocell*. 26(1) : 71-81.
- L.Rice, Ellen. (1990). Nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from the Atlantic sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *Nucleic Acids Research*. 18(18) : 5551.

- Kojima Shigeaki; et al. (2001). Molecular phylogeny of Japanese gastropods in the genus *Batillaria*. *J.Moll.Stud.* (67) : 377-384.
- S.Keawjam Rojana. (1986). The Apple Snails of Thailand Distribution,Habitats and Shell Morphology. *Malacological Review.* (19) : 61-81.
- Winnepeninckx B.; et al. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from mollusks. *Molecular Techniques in Taxonomy.* 12(9) : 407.

ภาคผนวก

วิธีเตรียมสารเคมี

Extraction buffer = 20 mM Tris-HCl

25 mM EDTA (pH 8.0)

250 mM NaCl

0.5 % Lauroylsarcosine sodium salt

Binding buffer = 6 M guanidine-HCl

10 mM Urea

10 mM Tris-HCl

20% Triton X-100 (v/v) pH 4.4 (25 C)

Washing buffer = 80% Ethanol

20 mM NaCl

2 mM Tris-HCl pH 7.5 (25 C)

Elution buffer = 10 mM Tris pH 8.5 (25 C)

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวสมณรัตน์ จันทร์ขาว
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 19 มิถุนายน 2521
สถานที่เกิด	อำเภอบ้านหมอ จังหวัดสระบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	403 หมู่ 6 ตำบลบ้านครัว อำเภอบ้านหมอ จังหวัดสระบุรี รหัสไปรษณีย์ 18270
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสระบุรีวิทยาคม
พ.ศ. 2543	การศึกษาระดับปริญญาตรี เอกเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2546	การศึกษาระดับปริญญาโท เอกเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ