

ความแปรผันทางลักษณะพื้นฐานและพันธุกรรมของหอยตลับ
(*Meretrix* spp.) บริเวณอ่าวไทย

MOPHOLOGY AND GENETIC VARIATION OF HARD CLAM
(*Meretrix* spp.) IN THE GULF OF THAILAND



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการจัดการทรัพยากรทางน้ำ

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2568

KMITL-2025-AG-M-081-456

MOPHOLOGY AND GENETIC VARIATION OF HARD CLAM
(*Meretrix* spp.) IN THE GULF OF THAILAND



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN AQUACULTURAL TECHNOLOGY AND AQUATIC
RESOURCE MANAGEMENT

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2025

KMITL-2025-AG-M-081-456



COPYRIGHT 2025

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความแปรผันทางลักษณะสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับ (*Meretrix spp.*) บริเวณอ่าวไทย
MORPHOLOGY AND GENETIC VARIATION OF HARD CLAM (*Meretrix spp.*) IN THE GULF OF THAILAND

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐธิดา ศรีนุ่น

รหัสประจำตัว 64604009

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการจัดการทรัพยากรทางน้ำ


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.วัลย์ลดา กลางนุรักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.ธรรมศักดิ์ ยี่มิน	
ศ.ดร.สุนีรัตน์ เรืองสมบุรณ์	
รศ.ดร.รุ่งตะวัน ยมหล้า	
ผศ.ดร.วัลย์ลดา กลางนุรักษ์	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 16 มิถุนายน 2568

สถานที่สอบ A 209 ชั้น 2 อาคารเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร


(ผศ.ดร.รัชชัย พุฒทองศิริ)
คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
วันที่ 25 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2568

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความแปรผันทางลักษณะสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับ
(*Meretrix* spp.) บริเวณอ่าวไทย
นักศึกษา นางสาวณัฐธิดา ศรีนุ่น
รหัสประจำตัว 64604009
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการจัดการทรัพยากรทางน้ำ
พ.ศ. 2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. วลัยลดา กลางนุรักษ์

บทคัดย่อ

หอยตลับ (*Meretrix* spp.) พบได้ตามบริเวณชายฝั่งทะเลอินโด-แปซิฟิก รวมถึงบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย ลักษณะภายนอกของหอยตลับมีสีเปลือกที่หลากหลาย อีกทั้งลักษณะของเปลือกภายนอกและภายในยังมีการรายงานที่ชัดเจน และข้อมูลความหลากหลายของหอยกลุ่มนี้ยังขาดแคลน การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการแพร่กระจายและวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย โดยวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับในแต่ละชนิดพันธุ์โดยการใช้ลักษณะของเปลือกภายนอกและภายใน รวมถึงวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยยีน Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) เพื่อยืนยันการจำแนกชนิดพันธุ์และสร้างความเข้าใจถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยตลับ จากการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล พบหอยตลับสองชนิดพันธุ์ คือ *Meretrix meretrix* และ *Meretrix astricta* ซึ่ง *M. meretrix* นั้นไม่พบบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง และ *M. astricta* จะไม่พบบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก สามารถแบ่งกลุ่มหอยตลับจากลักษณะของเปลือกภายนอกได้ชนิดพันธุ์ละ 5 กลุ่ม ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าตัวอย่าง *M. meretrix* ในการศึกษาครั้งนี้มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของหอยตลับชนิดเดียวกันมากกว่า 90% ในขณะที่ตัวอย่าง *M. astricta* มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทป์ของหอย 2 ชนิดคือ *M. lyrate* และ *M. meretrix* ด้วยความคล้ายคลึงที่น้อยกว่า 81% และยังไม่พบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. astricta* ในฐานข้อมูล อีกทั้งผลการศึกษาระเบียงกลุ่มตามวิวัฒนาการด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการทำให้ทราบว่าตัวอย่าง *M. astricta* นั้นไม่ใช่ทั้ง *M. lyrate* และ *M. meretrix* ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. astricta* ไปบันทึกในฐานข้อมูล NCBI จากนั้นวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมพบว่า *M. meretrix* มี 3 แฮพลอไทป์ ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดพันธุ์อยู่ในช่วง

0.002 - 0.007 และ *M. astricta* มี 4 แอพลอไทป์ ระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.002 - 0.021 การจำแนกชนิดพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลร่วมกับลักษณะสัณฐานภายนอกทำให้เข้าใจการแพร่กระจายของชนิดพันธุ์ที่ถูกต้อง และเป็นข้อมูลเพื่อใช้ในการจัดการทรัพยากรในระบบนิเวศที่ยั่งยืน



Thesis	Morphology and genetic variation of hard clam <i>Meretrix</i> spp. in the Gulf of Thailand
Student	Miss Nattida Srinun
Student ID.	64604009
Degree	Master of Science
Program	Aquacultural Technology and Aquatic Resource Management
Year	2024
Thesis Advisor	Asst. prof. Wanlada Klangnuruk, Ph.D

ABSTRACT

Asian hard clams (*Meretrix* spp.) are widely distributed along the coastal areas of the Indo-Pacific region, including the coastal waters of Thailand. These clams exhibit a variety of shell colors and have well-documented external and internal shell characteristics. However, information on the diversity within this group remains limited. This study aimed to investigate the distribution patterns and analyze the morphological differences of hard clams in the Gulf of Thailand. Morphological characteristics were assessed using both external and internal shell features, while genetic analysis based on the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene was performed to confirm species identification and elucidate evolutionary relationships among *Meretrix* species. Based on morphological and molecular analyses, two species were identified: *Meretrix meretrix* and *Meretrix astricta*. *M. meretrix* was not found in the lower Gulf of Thailand, while *M. astricta* was not found along the eastern Gulf. Each species could be grouped into five distinct shell morphotypes according to their external shell characteristics. Comparison of nucleotide sequences with those in the NCBI database showed that *M. meretrix* in this study had over 90% sequence similarity with the same species. In contrast, *M. astricta* sequences showed less than 81% similarity to both *M. lyrata* and *M. meretrix*. Additionally, there were no prior nucleotide sequence records for *M. astricta* in the database. Phylogenetic analysis using evolutionary tree construction confirmed that the *M. astricta* were distinct from both *M. lyrata* and *M. meretrix*. Therefore, the nucleotide sequences of *M. astricta* identified in this study were

registered in the NCBI database. Genetic variation analysis revealed that *M. meretrix* comprises three haplotypes, with intraspecific genetic distances ranging from 0.002 to 0.007, while *M. astricta* has four haplotypes, with genetic distances ranging from 0.002 to 0.021. The use of molecular techniques in combination with external morphological characteristics for species identification improves the accuracy of understanding species distribution and provides essential data to support sustainable ecosystem management.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วัลย์ลดา กลางนุรักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ ดร. เขาวลิต วิทยานนท์ ที่คอยให้คำปรึกษาในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของหอยตลับ อีกทั้งขอขอบคุณ รศ.ดร. มณฑล แก่นมณี และ ศ.ดร. สุรินทร์น์ เรืองสมบูรณ์ กรรมการสอบหัวข้อโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิศวกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการจัดการทรัพยากรทางน้ำ ที่ให้คำแนะนำด้านการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ นักศึกษาปริญญาโทใน Molecular Ecology Lab คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิทยาศาสตร์การประมง และคุณภานุพงศ์ พุทศรี ที่ช่วยเก็บตัวอย่าง และคอยช่วยเหลือ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ รวมทั้งกองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาเพื่อทำงานวิจัยนี้

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้บิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

นางสาวณัฐธิดา ศรีนุ่น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
สารบัญตัวย่อ.....	ต
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของปัญหา.....	2
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา.....	2
1.4 ทฤษฎีหรือแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย	3
1.5 ขอบเขตการวิจัย	3
1.6 ขั้นตอนการศึกษา.....	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 การอนุกรมวิธานของหอยตลับ	5
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับ	6
2.2.1 ลักษณะภายนอก.....	6
2.2.2 การศึกษาการจำแนกหอยตลับด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา	7
2.3 วิทยาศาสตร์บางประการของหอยตลับ <i>Meretrix</i> spp.....	19
2.3.1 การกินอาหาร.....	20
2.3.2 การหายใจ.....	20
2.3.3 การสืบพันธุ์การพัฒนาของตัวอ่อน.....	20
2.3.3.1 ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตลับ	21
2.3.3.2 การพัฒนาระยะของตัวอ่อนหอยตลับ	24
2.4 นิเวศวิทยาของหอยตลับ.....	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 การแพร่กระจายของหอยตลับ.....	27
2.6 เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ในการศึกษาการจำแนกชนิดพันธุ์.....	30
2.6.1 ข้อมูลทางพันธุกรรม.....	30
2.6.2 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	31
2.6.3 เทคนิคDNA Sequencing และการทำ DNA barcoding.....	32
2.6.4 เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis).....	34
2.6.5 การจำแนกชนิดพันธุ์หอยตลับด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์.....	34
2.6.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	40
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	41
3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก.....	43
3.2.1 การศึกษาลักษณะภายนอก.....	43
3.2.2 การวิเคราะห์มอร์โฟเมตริก.....	43
3.2.2.1 การวัดลักษณะเชิงตัวเลข.....	43
3.2.2.2 การวิเคราะห์เชิงรูปร่าง.....	45
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม.....	47
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	50
4.1 การแพร่กระจายของหอยตลับ <i>Meretrix</i> spp.....	50
4.2 ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของหอยตลับ <i>Meretrix</i> spp.....	57
4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม.....	63
4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	63
4.3.2 การศึกษาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing).....	77
4.3.3 ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance).....	82
4.3.4 การตรวจสอบชนิดพันธุ์ด้วยเทคนิคซีวโมเลกุล.....	84
4.3.5 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยตลับ <i>Meretrix</i> spp.....	87

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	90
5.1 สรุปผลการศึกษา.....	90
5.2 ข้อเสนอแนะ	91
บรรณานุกรม.....	92
ประวัติผู้เขียน.....	100



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับที่ใช้ในการศึกษา 12
2.2	ตำแหน่งที่ใช้วัดลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับ..... 14
2.3	การรายงานการแพร่กระจายของชนิดพันธุ์หอยตลับ (<i>Meretrix spp.</i>) ที่พบเจอในประเทศไทย 29
3.1	สถานีเก็บตัวอย่างหอยตลับที่ใช้ในการศึกษา บริเวณอ่าวไทย..... 42
3.2	การอธิบายตำแหน่งในการวัดตำแหน่งลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับ 44
4.1	สถานีเก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างหอยตลับที่พบเจอบริเวณอ่าวไทย ทั้ง 5 จังหวัด..... 51
4.2	ลักษณะของเปลือกภายนอก ขนาดความสูง ความยาว และความหนาของเปลือก..... 57
4.3	ลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะต่าง ๆ ต่อความยาวเปลือก วิเคราะห์ one way ANOVA ด้วยวิธี Tukey's HSD ของรูปแบบของสีเปลือก..... 59
4.4	สรุปผลการการสกัดดีเอ็นเอการปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา..... 65
4.5	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้ยีนตำแหน่งยืนไมโทคอนเดรียในการศึกษา ... 76
4.6	ตำแหน่งความผันแปรของตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างหอยตลับ <i>M. meretrix</i> และ <i>M. astricta</i> ที่เก็บรวบรวมได้บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จำนวนแฮพลอไทป์เปรียบเทียบกันระหว่างแฮพลอไทป์ MA_H ตัวเลขบนลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงถึงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ (ขนาด 428 bp) จุดบ่งบอกถึงการเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ และตัวเลขที่ใสวงเล็บ เป็นสัดส่วนของจำนวนของตัวอย่าง..... 79
4.7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างหอยตลับ <i>M. meretrix</i> และ <i>M. astricta</i> ที่เก็บรวบรวมได้บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จำนวนแฮพลอไทป์ทั้งหมด เปรียบเทียบกันระหว่างแฮพลอไทป์..... 80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้าที่
4.8	ความสอดคล้องระหว่างแฮพลอไทป์และรูปแบบของเปลือกภายนอกของหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์..... 82
4.9	เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (เหนือเส้นทแยงมุม) และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่คำนวณโดย Tamura-Nei model (ใต้เส้นทแยงมุม)..... 83
4.10	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันในหอยตลับชนิดพันธุ์ <i>Meretrix</i> spp. ในแต่ละของแฮพลอไทป์ <i>M. meretrix</i> จำนวน 3 แบบ และแฮพลอไทป์ <i>M. astricta</i> จำนวน 4 แบบ ที่วิเคราะห์โดยวิธีการ BLAST..... 85
4.11	Similarity Matrix ระหว่าง <i>M. meretrix</i> และ <i>M. astricta</i> ในการศึกษาครั้งนี้ กับลำดับ COI ของชนิดพันธุ์ <i>Meretrix</i> จำนวน 8 ลำดับที่เลือกจากฐานข้อมูล GenBank (NCBI) ซึ่งใช้สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ..... 86

สารบัญรูป

รูปที่	หน้าที่
1.1	ขั้นตอนการศึกษาความแปรผันทางลักษณะสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับ <i>Meretrix</i> spp. บริเวณอ่าวไทย 4
2.1	ตัวอย่างเปลือกหอยสองฝาด้านซ้ายและเปลือกหอยด้านขวา ของ <i>Mercenaria mercenaria</i> 6
2.2	ลักษณะโครงสร้างส่วนต่าง ๆ ของเปลือกหอยตลับ <i>Meretrix</i> (A) ลักษณะของเปลือกด้านหลัง (B) ลักษณะของเปลือกด้านใน. 7
2.3	ลักษณะของเปลือกหอยตลับ <i>Meretrix</i> sp. บริเวณบาตูลูรา ประเทศอินโดนีเซีย.. 9
2.4	ลักษณะเปลือกภายในและภายนอกของหอยตลับ <i>Meretrix</i> ที่พบเจอในประเทศไทย (A) <i>M. meretrix</i> (B) <i>M. planisalcata</i> 10
2.5	ลักษณะเปลือกภายใน และภายนอกของหอยตลับ <i>Meretrix</i> ที่พบเจอในประเทศไทย (C) <i>M. casta</i> (D) <i>M. ovum</i> 11
2.6	การวัดตำแหน่งของเปลือกหอย <i>Meretrix</i> spp. 11
2.7	ลักษณะภายนอกของเปลือก และรูปแบบของ pallial sinus ของ (A) <i>Meretrix lyrata</i> (B) <i>M. meretrix</i> (C) <i>M. lusoria</i> 13
2.8	ตำแหน่งที่ใช้วัดหอยตลับ 9 ตำแหน่ง ของเปลือกหอยด้านขวา 14
2.9	ลักษณะภายนอกของ <i>M. cf. meretrix</i> ที่ทำการสุ่มเก็บบริเวณ Tong Fuk Miu Wan และ หาด Shui Han ที่เกาะ Lantau ฮ่องกง 16
2.10	รูปร่างลักษณะภายนอกของ <i>M. cf. meretrix</i> 16
2.11	ลักษณะภายในของ <i>M. cf. meretrix</i> ที่ทำการสุ่มเก็บบริเวณ Tong Fuk Miu Wan และ หาด Shui Han ที่เกาะ Lantau ฮ่องกง (AAM; Anterior adductor muscle, ACT; Anterior cardinal tooth, ALT; Anterior lateral tooth, ALTS; Anterior lateral tooth and socket, APRM; Anterior pedal retractor muscle, CSL; Calcareous shell layer, L; Ligament, LU; Lunule, PAM; Posterior adductor muscle, PCT; Posterior cardinal tooth, PL; Pallial line, PLTS; Posterior lateral tooth and socket, PPRM; Posterior pedal retractor muscle, PS; Pallial sinus, U; Umbo) 17

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้าที่
2.12	การกำหนด Landmark จำนวน 15 จุด ที่ใช้ในการอธิบายลักษณะทาง สัณฐานภายในของเปลือกหอยสองฝาทั้งข้าง เปลือกด้านซ้าย (A) และเปลือกด้านขวา (B) ของหอยสกุล <i>Venerid</i> สามชนิด ได้แก่ <i>Meretrix lyrata</i> (รูปบน), <i>Mercenaria mercenaria</i> (รูปกลาง), และ <i>Venerupis philippinarum</i> (รูปล่าง) โดยการวางตำแหน่ง (C)..... 18
2.13	Relative warp box plot และฮิสโตแกรม แสดงการแปรผันในเปลือก หอยด้านซ้าย (a) และเปลือกหอยด้านขวา (b) ของเปลือกหอยภายใน ของ: (A) <i>Meretrix lyrata</i> (B) <i>Mercenaria mercenaria</i> และ(C) <i>Venerupis philippinarum</i> 19
2.14	ลักษณะโครงสร้างภายในของหอยสองฝา..... 19
2.15	ช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยตลับ <i>M. lyrata</i> จากการคำนวณ ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) ค่าดัชนีสมบูรณ์เพศหลังจากการหักน้ำหนัก รังไข่ (MGSI) และ ค่าดัชนีโดบริยัล (DI)..... 22
2.16	ระยะการพัฒนาของหอยตลับ (<i>M. lyrata</i>) ในประเทศมาเลเซีย..... 23
2.17	ระยะการพัฒนาของหอยตลับ (<i>M. meretrix</i>) ในประเทศไทย..... 24
2.18	ระยะการพัฒนาของตัวอ่อนหอยตลับ <i>M. lyrata</i> 25
2.19	ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของหอยตลับ <i>Meretrix</i> sp. จาก ประเทศไต้หวันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Meretrix</i> sp. ชนิดพันธุ์อื่น ๆ กับฐานข้อมูลใน NCBI..... 36
2.20	แฮพโทไทป์ของหอยตลับ <i>Meretrix</i> sp. ที่เก็บได้จากเกาหลี จีน และไต้หวัน..... 37
2.21	การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของ <i>M. lusoria</i> และ <i>M. petechialis</i> (A) การวิเคราะห์โดยใช้ mitochondrial COI และ (B) วิเคราะห์ด้วยการใช้ nucleus <i>ITS-1</i> 38
3.1	บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างหอยตลับ <i>Meretrix</i> spp. บริเวณอ่าวไทย..... 41
3.2	อุปกรณ์การทำประมงหอยตลับของชาวประมงพื้นบ้าน (A) การทำประมง หอยตลับบริเวณสุราษฎร์ธานี (B) คราดหอยเครื่องมือประมงหอยตลับ จังหวัดเพชรบุรี..... 43

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้าที่
3.3	พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดหอยตลับของเปลือกด้านขวา 13 ตำแหน่ง (SL=shell length; SH=shell height; SW=shell width; LL=ligament length; UL=umbo length; PL=posterior length; AL=anterior length; LCT=length of cardinal tooth; AW=anterior adductor scar width; PW=posterior adductor scar width; LPAS= length of posterior adductor scar to anterior adductor scar; PVM= pallial line scar to ventral margin; PS= pallial sinus length)..... 43
3.4	การวางตำแหน่ง (Landmark) 52 ตำแหน่งบนเปลือกหอยตลับด้านขวา ในโปรแกรม tpsDig2..... 47
4.1	การแพร่กระจายของ <i>M. meretrix</i> และ <i>M. astricta</i> บริเวณอ่าวไทย (A) สัตว์ส่วนหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์ที่พบเจอในบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด (B) สัตว์ส่วน <i>M. meretrix</i> ที่พบเจอในบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด และ (C) สัตว์ส่วน <i>M. astricta</i> ที่พบเจอในบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด..... 52
4.2	ลักษณะของเปลือกภายในและรูปแบบของสีเปลือกภายนอก <i>M. meretrix</i> 53
4.3	ลักษณะของเปลือกภายในและรูปแบบของสีเปลือกภายนอก <i>M. astricta</i> 55
4.4	Principal Component Analysis (PCA) ของ 10 ลักษณะ Morphometric ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง <i>M. meretrix</i> และ <i>M. astricta</i> 60
4.5	canonical variate analysis (CVA) จากการวัดรูปร่างโดยการลงตำแหน่ง Landmark ลงบน <i>M. meretrix</i> และ <i>M. astricta</i> 61
4.6	Warped outline drawings ของรูปทรง (A) <i>M. meretrix</i> และ (B) <i>M. astricta</i> . โดยเส้นในสีฟ้าแสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และเส้นในสีน้ำเงินเข้มแสดงรูปร่างเฉลี่ย 62
4.7	ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถอ่านผลและนำมาใช้ได้..... 78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้าที่
4.8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สามารถอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 78
4.9	แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการถูกสร้างขึ้นโดยใช้วิธี Maximum Likelihood และแบบจำลอง Tamura-Nei สำหรับแฮพโลไทป์ <i>M. meretrix</i> จำนวน 3 แบบ และแฮพโลไทป์ <i>M. astricta</i> จำนวน 4 แบบ ร่วมกับลำดับของ <i>Meretrix</i> sp. อื่น ๆ..... 88



สารบัญตัวย่อ (ต่อ)

อักษรย่อ	ชื่อเต็ม
bp	Base pair
<i>COI</i>	Cytochrome c oxidase subunit 1 mitochondrial gene
SL	Shell length
SH	Shell height
SW	Shell width
LL	Ligament length
UL	Umbo length
AL	Anterior length
PL	Posterior length (PL)
LCT	Length of cardinal tooth
LPAS	Length of posterior adductor scar to anterior adductor scar
PW	Posterior adductor scar width scar
AW	Anterior adductor scar width scar
PVM	pallial line scar to ventral margin anterior
PS	pallial sinus open scar

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หอยตลับ *Meretrix* spp. เป็นหอยสองฝาที่จัดอยู่ในครอบครัว Veneridae หอยตลับถือว่ามี ความสำคัญต่อระบบนิเวศชายฝั่งและระบบนิเวศปากแม่น้ำ (Morton *et al.*, 2021) มีความสำคัญ ทางเศรษฐกิจ (Huang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2017) รวมถึงสามารถใช้เป็น ตัวชี้วัดทางชีววิทยาที่ชี้วัดระดับมลพิษสิ่งแวดล้อมทางทะเล (Lin *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2015) มีการรายงานพบหอยตลับทั่วโลก 17 ชนิดพันธุ์ (MolluscaBase, 2022) ส่วนในประเทศไทย มีรายงานหอยตลับบริเวณชายฝั่งครั้งแรก 4 ชนิดพันธุ์ โดย Yoosukh and Matsukuma (2001) ได้แก่ *Meretrix casta* (Gmelin, 1791) *Meretrix lyrata* (G.B. Sowerby II, 1851) *Meretrix meretrix* (Linnaeus, 1758) และ *Meretrix planisulcata* (G.B. Sowerby II, 1854) นอกจากนี้ยังมีการรายงานโดย Huber (2010) *Meretrix astricta* และมีการ รายงานล่าสุดในปี 2021 โดย Wells *et al.* (2021) คือ *Meretrix petechialis* (Lamarck, 1818) รายงานการสำรวจหอยตลับ *Meretrix* spp. บริเวณอ่าวไทยนั้นจำกัดอยู่บริเวณชายฝั่งทะเล อ่าวไทยตอนบน และอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จังหวัดเพชรบุรี สมุทรสงคราม ชลบุรี และตราด ทั้งนี้ยังไม่ปรากฏผลการสำรวจหอยตลับในพื้นที่อ่าวไทยตอนล่าง ตั้งแต่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ไปจนถึงปัตตานี ซึ่งมีลักษณะพื้นที่ รวมถึงการได้รับอิทธิพลจากลมมรสุม การรับลมพายุ โดยตรง แตกต่างจากพื้นที่ อ่าวไทยตอนบน และอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ความหลากหลายชนิดพันธุ์ของหอยตลับ *Meretrix* spp. จึงยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของชนิดพันธุ์ และเพิ่มพื้นที่ศึกษาให้ ครอบคลุมทั้งอ่าวไทย

ภาวะโลกร้อนและการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่ดำรงอยู่บริเวณชายฝั่ง ทะเลและบริเวณปากแม่น้ำ ซึ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศของมหาสมุทร เช่นการเกิดพายุ ที่ส่งผลโดยตรงต่อระบบนิเวศและสรีรวิทยาของสัตว์หน้าดินและนำไปสู่การ เปลี่ยนแปลงในเรื่องของความซุกซุ่ม และสภาพภูมิประเทศ ความหลากหลายทางชีวภาพและการ เปลี่ยนแปลงความซุกซุ่มของหอยสองฝาในช่วงระยะเวลามากกว่า 10 ปี ที่มีการรายงานในอ่าวปีเต อร์มหาราช ที่ประเทศญี่ปุ่น จำนวนของหอยสองฝานั้นลดลงเป็นครั้งหนึ่ง และมีความหนาแน่นลดลง จาก 1.9 เป็น 9.8 เท่า นอกจากนี้ก็ยังมีเปลี่ยนแปลง

แปลงของหอยสองฝาที่เป็นชนิดพันธุ์เด่น (Oleynik and Moshchenko, 2004) การติดตามหอยสองฝาอย่างต่อเนื่องจึงมีความสำคัญในการทำความเข้าใจการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมทางน้ำ และระบบนิเวศ

หอยตลับ *Meretrix* spp. มีลักษณะของรูปร่างและสีของเปลือกที่คล้ายคลึงกันระหว่างชนิด มักทำให้เกิดการจำแนกชนิดพันธุ์ผิดอยู่บ่อยครั้ง การระบุชนิดพันธุ์มักใช้ข้อมูล DNA มาใช้ในการจำแนกชนิดพันธุ์ (Kim and Yoon, 2014; Torii *et al.*, 2010; Yamakawa *et al.*, 2008) เนื่องจากหอยตลับ *Meretrix* มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จึงทำให้มีการศึกษาและทำความเข้าใจเกี่ยวกับข้อมูลทางพันธุกรรม โดยข้อมูลส่วนใหญ่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรงตำแหน่งยีน cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) ช่วยเพิ่มความแม่นยำในการระบุชนิดพันธุ์ และช่วยแก้ไขปัญหการจำแนกชนิดที่ผิดพลาดจากลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมยังช่วยในการติดตามการแพร่และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตลับในแต่ละพื้นที่

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อยืนยันจำนวนของชนิดพันธุ์หอยตลับที่มีการแพร่กระจายตามแนวชายฝั่งทะเลอ่าวไทย และศึกษาลักษณะความแตกต่างของหอยตลับแต่ละชนิดพันธุ์ โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้ไม่เพียงแต่เป็นข้อมูลที่เพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับหอยตลับแต่ละชนิดพันธุ์ แต่ยังเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปวางแผนเกี่ยวกับการจัดการทรัพยากร และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบจำนวนชนิดพันธุ์ของหอยตลับที่แพร่กระจายตามแนวชายฝั่งทะเลอ่าวไทย โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกเพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ และศึกษาลักษณะสัณฐานที่ช่วยในการจัดจำแนกชนิดเพิ่มเติมอีกทั้งยังจำแนกหอยตลับโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *COI* มาช่วยในการจัดจำแนกชนิดหอยตลับบริเวณอ่าวไทยให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยตลับ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในความหลากหลายของชนิด สามารถขยายผลไปสู่การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อใช้ในการจัดการทรัพยากรต่อไปได้

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

ขอบเขตการแพร่กระจายของหอยตลับ *Meretrix* spp. บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ลักษณะสัณฐานวิทยา และความแปรผันทางพันธุกรรม มีความแตกต่างกันระหว่างหอยตลับแต่ละชนิดพันธุ์

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

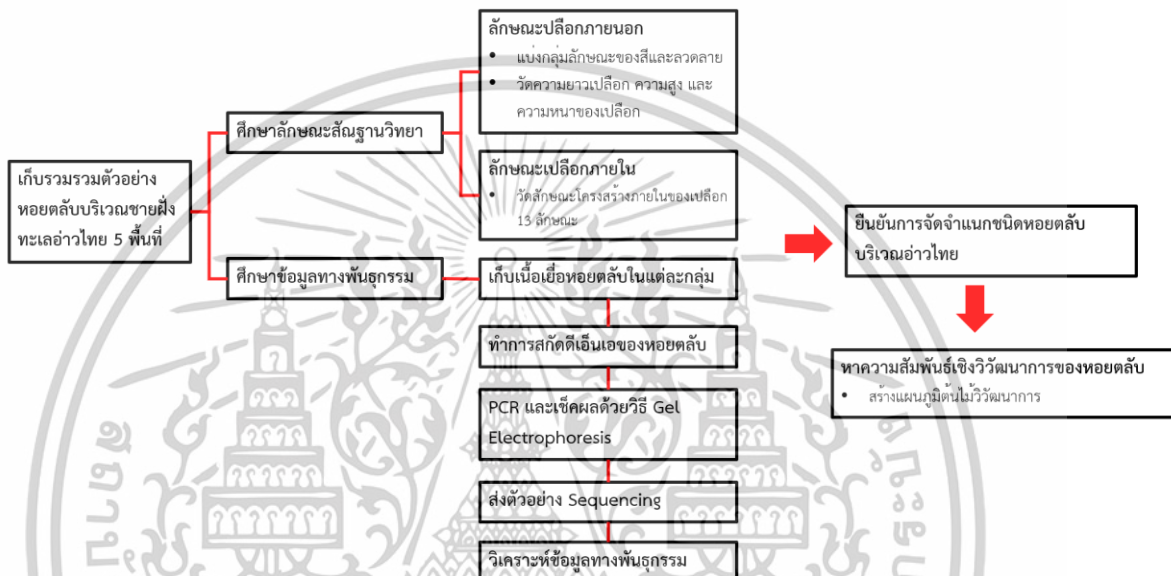
ความหลากหลายของหอยตลับ *Meretrix spp.* เกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรหอยตลับในแต่ละพื้นที่ ซึ่งอาจมีผลมาจากการแยกตัวทางภูมิศาสตร์และสภาพแวดล้อมทำให้ประชากรลดโอกาสการแลกเปลี่ยนยีน ส่งผลให้หอยตลับมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม นอกจากนี้ประชากรหอยตลับที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะมีโอกาสรอดและสืบพันธุ์ได้มากขึ้น ทำให้ลักษณะเหล่านั้นถ่ายทอดสู่รุ่นถัดไปและเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละพื้นที่ นอกจากนี้พันธุกรรมที่อาจแตกต่างกันระหว่างพื้นที่แล้ว ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่นรูปร่างของเปลือกหอย หอยที่อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำตื้นอาจมีเปลือกที่บางและกว้าง เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการกรองอาหารและเคลื่อนที่ได้สะดวก ขณะที่หอยในน้ำลึกอาจมีเปลือกหนาและแข็งแรง เพื่อป้องกันแรงกดดันจากน้ำ สภาพของพื้นทะเล เช่น พื้นทราย พื้นโคลน หรือพื้นโคลนปนทราย มีผลต่อรูปร่างและโครงสร้างของเปลือกหอยเช่น หอยที่อาศัยบนพื้นทรายอาจมีเปลือกเรียวยาวเพื่อช่วยในการฝังตัว ขณะที่หอยบนพื้นโคลนอาจมีเปลือกกลมและหนากว่าเพื่อเพิ่มความมั่นคง (Gosling, 2003; Seed, 1969) ซึ่งส่งผลต่อการอยู่อาศัย การแพร่กระจายและความหนาแน่นของหอยตลับแต่ละชนิด อีกทั้งการแพร่กระจายของตัวอ่อนมักเกิดในบริเวณใกล้เคียงกับแหล่งวางไข่และพื้นที่ที่อยู่อาศัยเดิม ส่งผลให้ประชากรหอยตลับแต่ละชนิดมีการกระจายตัวแบบกลุ่มและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพื้นที่ต่างกัน

1.5 ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาความแปรผันทางลักษณะสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับ บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลร่วมกับชาวประมงในพื้นที่จากอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ได้แก่ จังหวัดตราด อ่าวไทยตอนใน ได้แก่ จังหวัดชลบุรี และจังหวัดเพชรบุรี อ่าวไทยตอนกลาง ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี และอ่าวไทยตอนใต้ ได้แก่ จังหวัดปัตตานี โดยใช้การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของลักษณะเปลือกภายนอก วัดความกว้าง ความสูงและความหนาของเปลือก รวมถึงสี และลวดลายของเปลือก จากนั้นศึกษาลักษณะเปลือกภายในทั้งหมด 13 ลักษณะ อีกทั้งยังศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมโดยใช้ยีน *COI* เพื่อศึกษาความแตกต่างทางลักษณะทางพันธุกรรม โดยรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรม ร่วมกับแผนภูมิวิวัฒนาการ รวมถึงรายงานการแพร่กระจายของหอยตลับแต่ละชนิดพันธุ์ในอ่าวไทยเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา

1.6 ขั้นตอนของการศึกษา

การศึกษาความแปรผันทางลักษณะสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับบริเวณอ่าวไทยนั้น ทำโดยการรวบรวมเก็บตัวอย่างหอยตลับตามแนวชายฝั่งทะเลอ่าวไทย มาศึกษาลักษณะของสัณฐานที่แตกต่างกันของเปลือกทั้งภายในและภายนอก และศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม มายืนยันการจัดจำแนกชนิดพันธุ์และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยตลับ



รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการศึกษาความแปรผันทางลักษณะสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับ *Meretrix* spp. บริเวณอ่าวไทย

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของหอยตลับ

หอยตลับ หรือที่เรียกว่าหอยตลับลาย หอยขาว มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า hard clam หรือ Asian hard clam มีการจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Mollusca

Class Bivalvia

Subclass Autobranchia

Superorder Imparidentia

Order Venerida

Family Veneridae

Subfamily Meretricinae

Genus *Meretrix*

Species *Meretrix astricta* (Reeve, 1864)

Meretrix attenuata Dunker, 1863

Meretrix aurora Hornell, 1917

Meretrix casta (Gmelin, 1791)

Meretrix lagiensis Thach, 2023

Meretrix lamarckii Deshayes, 1853

Meretrix lusoria (Röding, 1798)

Meretrix lyrata (G. B. Sowerby II, 1851)

Meretrix marisarabicum C. Martin & Matsukuma, 2020

Meretrix meretrix (Linnaeus, 1758)

Meretrix morphina (Lamarck, 1818)

Meretrix petechialis (Lamarck, 1818)

Meretrix planisulcata (G. B. Sowerby II, 1854)

Meretrix subtrigona (Dunker, 1857)

Meretrix taiwanica S.-T. Hsiao & S.-C. Chuang, 2023

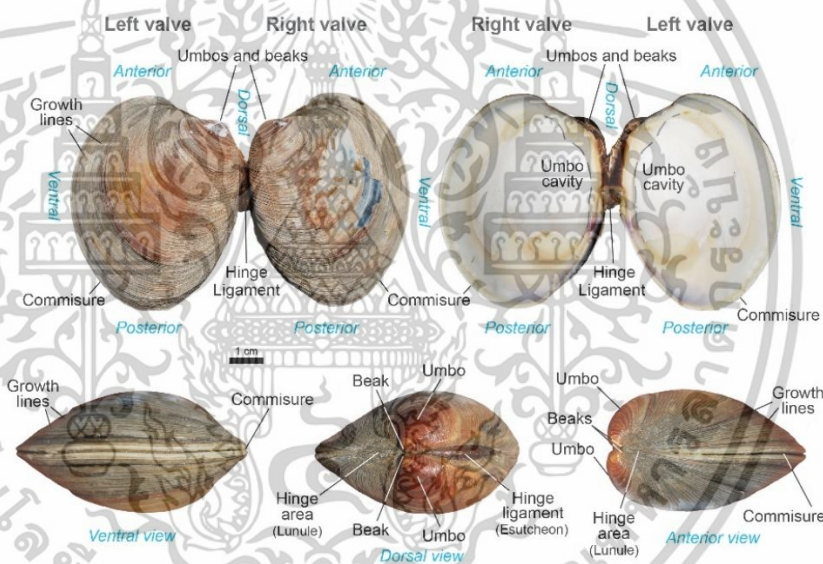
Meretrix tigris K.-Y. Lai & Y.-G. Nien, 2008

Meretrix vestita (Reeve, 1864)

2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับ

2.2.1 ลักษณะภายนอก

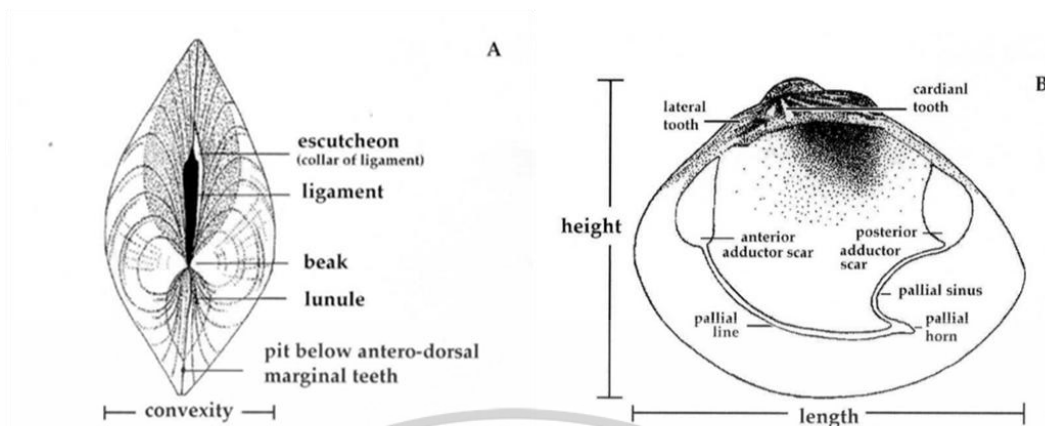
หอยตลับ *Meretrix* เป็นหอยในกลุ่มหอยสองฝา หอยสองฝามีลักษณะสมมาตรแบบกระจก (bilaterally symmetrical) เมื่อพับฝาทั้งสองเข้าหากัน โดยจะมีเปลือกสองฝาประกบกัน เปลือกฝาด้านซ้ายและฝาด้านขวาของหอยสองฝาส่วนใหญ่จะมีรูปร่างและขนาดที่เท่ากัน แต่ในบางชนิดอาจมีความแตกต่างกันมาก โดยการคูเปลือกหอยสองฝาด้านซ้ายหรือด้านขวา สามารถทำได้โดยวางเปลือกหอยให้บานพับ (hinge) และจุดยอดของเปลือกหอย (umbo หรือ beak) ซึ่งเป็นจุดสังเกตหลักอยู่ด้านบน และขอบที่เปลือกเปิดออก (commissure) อยู่ด้านล่าง จุดยอดของเปลือกหอยอยู่ห่างจากตัวเราไปทางด้านหน้า-ด้านหลังของหอย (dorsal-anterior side) และตำแหน่งนี้ ฝาเปลือกด้านขวาจะอยู่ทางขวามือเรา และฝาเปลือกด้านซ้ายจะอยู่ทางซ้ายมือ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างเปลือกหอยสองฝาด้านซ้ายและเปลือกหอยด้านขวา ของ *Mercenaria mercenaria*

ที่มา: Bivalves parts (n.d.)

นอกจากนี้ลักษณะรูปร่างของเปลือกหอยตลับเป็นรูปสามเหลี่ยมมนคล้ายรูปไข่ ส่วนที่ถูกสร้างขึ้นก่อนและเป็นส่วนที่แก่ที่สุดของเปลือกเรียกว่าจะงอยเปลือก beak อยู่ทางด้านบนก่อนไปทางด้านหน้าของเปลือก (รูปที่ 2.2) ด้านหน้าของ beak มีรอยเป็นรูปวงรี เรียกว่า lunule ด้านหลังของ beak มีแฉ่งตื้น ๆ เรียกว่า esutcheon เปลือกสองฝาประกบติดกันด้วย มีเอ็นยึด ligament ที่เหนียว เอ็นยึดมีสีน้ำตาลเข้ม



รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างส่วนต่าง ๆ ของเปลือกหอยตลับ *Meretrix* (A) ลักษณะของเปลือกด้านหลัง (B) ลักษณะของเปลือกด้านใน

ที่มา: Yoosukh and Matsukuma (2001)

ตรงตำแหน่งกลางของเปลือกมักมีลักษณะเป็นฟัน เรียกว่าฟันคาร์ดินัล (cardinal tooth) ซึ่งจำนวนของซี่ฟันมี 3 ซี่ ทำหน้าที่สำคัญในการช่วยยึดและเสริมความแข็งแรงของการเชื่อมต่อระหว่างฝาเปลือกทั้งสองข้าง การเปิดปิดของฝามีลักษณะคล้ายบานพับ (hinge) เมื่อกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) คลายตัว เ็นจะเป็นตัวยึดให้ฝาเปิด และการหดตัวของกล้ามเนื้อยึดเปลือกทำให้ฝาปิดเข้าหากัน ซึ่งด้านในของเปลือกจะพบรอยของกล้ามเนื้อต่าง ๆ โดยกลุ่มแรกคือรอยของกล้ามเนื้อยึดฝา (adductor muscle scar) จะมี 2 รอย รอยที่อยู่ด้านหน้าจะเรียกว่า anterior adductor scar และรอยที่อยู่ด้านหลังเรียกว่า posterior adductor scar และกลุ่มที่สองคือเส้นแพลเลียล (pallial line) เป็นรอยที่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งอยู่ทางด้านล่างสุดของเปลือกด้านใน ซึ่งแสดงถึงส่วนของแมนเทิล (mantle) ที่ติดกับเปลือกและเชื่อมระหว่างรอยกล้ามเนื้อทางด้านหน้าและด้านหลัง และมีส่วนที่เว้าเข้าไปเรียกว่า pallial sinus (Poutiers, 1998; Yoosukh and Matsukuma, 2001)

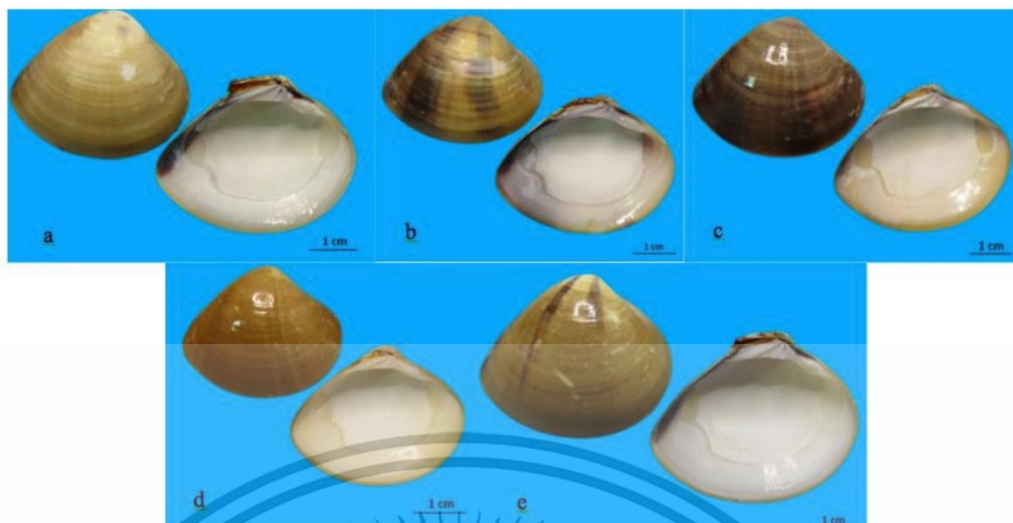
2.2.2 การศึกษาการจำแนกหอยตลับด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

การจัดจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยานี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาตั้งแต่อดีต โดยในหอยสองฝาสามารถใช้ รูปร่างของเปลือกภายนอกได้ นอกจากนี้สิ่งที่จำเป็นในการระบุชนิดพันธุ์ของหอยสองฝานั้นคือเปลือกหอยด้านใน สิ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกคือ รอย pallial sinus ด้านในเปลือก (ถ้ามี) รอยยึดกล้ามเนื้อด้านหลัง และลักษณะเอ็นยึด ligament ภายนอกเมื่อยึดไปตามด้านหนึ่งของด้านหลัง (beak) แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่กล่าวมา ใช้ไม่ได้กับหอยสองฝาทุกชนิดพันธุ์ และบางครั้งก็ต้องใช้เกณฑ์อื่นๆร่วมด้วย (Poutiers, 1998) เช่นสีสัน และขนาดของตัว แต่หอยตลับมีความหลากหลายของสีเปลือกที่มาก และรูปร่างของหอยตลับในแต่ละชนิดพันธุ์ที่มีรูปร่างที่คล้ายกัน จนทำให้เกิดความสับสน

ส้นในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ได้ อีกทั้งบริเวณที่อยู่อาศัยของหอยกลุ่มนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย และมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา อาจทำให้เกิดความผันแปรของลักษณะสัณฐานวิทยาได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาความผันแปรของลักษณะสัณฐานในหลายบริเวณ

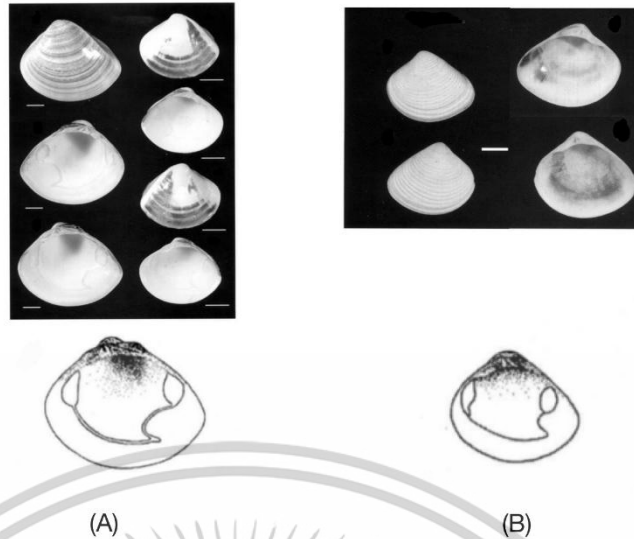
นอกจากนี้การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphometry) หรือการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา (morphometric analysis) เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลโดยอาศัยข้อมูลการวัดขนาด ระยะ และอัตราส่วนของลักษณะสำคัญทางสัณฐานวิทยาของการจัดจำแนกร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติของพหุตัวแปร (multivariate analysis) เช่น การวัดทางสัณฐานมาตรฐาน (standard morphometric) เป็นการวัดค่าของโครงสร้างหรืออวัยวะ ที่อ้างอิงบนระนาบแนวแกนของร่างกาย (body-axis plane) โดยมีการใช้ตำแหน่งหรือจุดปลายของโครงสร้างหรืออวัยวะนั้นเป็นจุดเริ่มต้นหรือจุดสิ้นสุดของการวัด ทำให้จุดบางจุดถูกใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการวัดค่าหลายค่า และค่าที่ได้จากการวัดจะสัมพันธ์กับความยาวหรือความลึกของร่างกาย ส่วนการวัดสัณฐานเรขาคณิต (geometric analysis) เป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเรขาคณิต โดยจะช่วยวิเคราะห์และจำแนกรูปร่างของอวัยวะหรือโครงสร้างต่าง ๆ เช่น กะโหลก กระดูก หรือครีบ จากการสร้างแบบจำลองทางเรขาคณิตของข้อมูลการวัดความโค้ง ความยาว หรือพื้นที่ผิว (Rohlf, 1999) เทคนิคนี้สามารถใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของรูปร่างระหว่างสายพันธุ์ หรือศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างในกระบวนการวิวัฒนาการได้อย่างแม่นยำ

มีการศึกษาความแตกต่างทางลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Meretrix* sp. บริเวณบาดูชรา ประเทศอินโดนีเซีย (Ambarwati *et al.*, 2021) โดยหอยทั้งหมดถูกนำมาจัดจำแนกโดยการสังเกตลักษณะภายนอกและภายในของเปลือก โดยหอยตลับที่พบในแม่น้ำบันคารานมีเพียง 1 ชนิดพันธุ์ คือ *Meretrix cf. aurora* แต่มีลักษณะภายนอกที่มีลักษณะต่างกัน 5 แบบ ดังตัวอย่างใน รูปที่ 2.3 จะเห็นว่าลักษณะของสีเปลือกด้านนอกมีความแตกต่างกัน โดยลักษณะ 2.3a สีของเปลือกหอยจะไม่มีลวดลายมีสีค่อนข้างขาวคล้ายกับลักษณะ 2.3d ที่มีสีของเปลือกหอยเป็นสีน้ำตาล ส่วน 3 แบบที่เหลือคือ 2.3b 2.3c และ 2.3e จะมีแถบของสีดำบนสีเปลือกของหอย โดยลักษณะ 2.3b จะมีแถบสีดำที่กว้างอย่างเห็นได้ชัดและสีของเปลือกเป็นสีน้ำตาล ในขณะที่ลักษณะ 2.2e มีแถบสีดำที่แคบกว่าลักษณะ 2.3b และ 2.3c ที่มีสีของเปลือกสีดำเทาค่อนข้างออกสีม่วง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากลักษณะภายนอกของเปลือกโดยมีพารามิเตอร์ คือ ความยาวของเปลือก ความสูงของเปลือก และความหนาของเปลือก พบว่าหอยที่มีความแตกต่างของสีเปลือกทั้ง 5 แบบไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งการจำแนกในครั้งนี้อาจยังไม่ชัดเจนจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของหอยตลับให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น เพื่อยืนยันการจัดจำแนกชนิดพันธุ์หอยชนิดนี้



รูปที่ 2.3 ลักษณะของเปลือกหอยตลับ *Meretrix* sp. บริเวณบาดูชรา ประเทศอินโดนีเซีย
ที่มา: Ambarwati *et al.* (2021)

การศึกษาของ Yoosukh and Matsukuma (2001) เป็นการศึกษาหอยตลับ *Meretrix* spp. ที่พบในประเทศไทย ทั้งทะเลอันดามัน และอ่าวไทย โดยทำการศึกษานุกรมวิธานของหอยตลับในประเทศไทย พบหอยตลับ *Meretrix* จำนวน 4 ชนิดพันธุ์ที่ คือ *M. meretrix* *M. casta* *M. planisalcata* และ *M. ovum* การจัดแนกหอยตลับในแต่ละชนิดพันธุ์จะสังเกตจาก pallial line ดังรูปที่ 2.4 จะเห็นว่า *M. meretrix* และ *M. planisalcata* ลักษณะด้านในของเปลือก pallial line ตรง pallial sinus มีลักษณะที่มีความเว้าเหมือนกัน แต่ *M. meretrix* จะเว้าลึกกว่าเกือบเป็นครึ่งวงกลมและมีลักษณะคล้ายตะขอ (horn) เรียกว่า pallial horn และเป็นหอยมีเปลือกใหญ่กว่า ส่วน *M. planisalcata* เปลือกหอยจะมีขนาดเล็กมาก เปลือกด้านนอกจะเป็นซี แข็ง ๆ ขอบภายในทั้งหมดอาจมีสีขาวแต่เป็นสีดำ ลักษณะภายในเปลือกตรง pallial sinus จะตื้นไม่ลึกเท่า *M. meretrix* ซึ่งมีการตรวจสอบและเก็บหอยตลับ *M. planisalcata* นี้บนชายหาด รายละเอียดของแหล่งที่อยู่และขนาดของตัวโตเต็มวัยไม่สามารถบอกได้อย่างชัดเจน

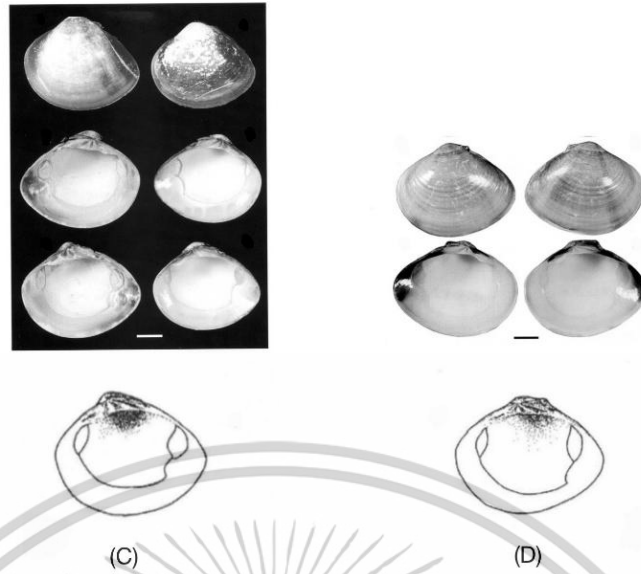


รูปที่ 2.4 ลักษณะเปลือกภายในและภายนอกของหอยตลับ *Meretrix* ที่พบเจอในประเทศไทย (A)

M. meretrix (B) *M. planisalcata*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Yoosukh and Matsukuma (2001)

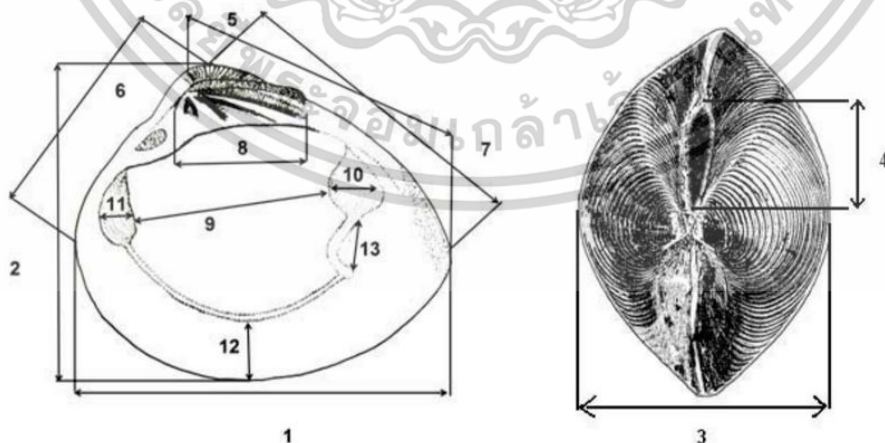
ส่วนหอยตลับ *M. casta* และ *M. ovum* มี pallial sinus ไม่เว้าลึก มีลักษณะมน ไม่เป็นลักษณะของ pallial horn สีของสีเปลือก *M. casta* จะมีตั้งแต่สีน้ำตาลอมเขียวไปจนถึงสีน้ำตาลไหม้ ส่วน *M. ovum* จะมีสีน้ำตาลไหม้ ไปถึงสีน้ำตาลดำ สิ่งที่จำแนกหอยตลับ 2 ชนิดพันธุ์นี้ได้ คือ โครงร่างภายนอกของเปลือกหอย โดย *M. ovum* จะรีมากกว่า *M. casta* (รูปที่ 2.5) ถึงแม้ลักษณะคล้ายกันมาก และภายในเปลือกตรง anterior adductor scar และตรง posterior adductor scar มีเส้นขอบที่ยาวยื่นออกมามากกว่าชนิดพันธุ์อื่น นอกจากนี้แหล่งที่พบ *M. casta* จะมีความชุกชุมตรงบริเวณปากแม่น้ำ บริเวณพื้นที่ที่เป็นทรายผสมโคลน ซึ่งสีและเปลือกของหอยตลับชนิดพันธุ์นี้จะมีความแตกต่างกันมากขึ้นอยู่กับความแตกต่างของแหล่งที่อยู่ในแต่ละพื้นที่ ส่วน *M. ovum* จะพบเจอบริเวณพื้นผิวที่เป็นโคลนบริเวณปากแม่น้ำ



รูปที่ 2.5 ลักษณะเปลือกภายใน และภายนอกของหอยตลับ *Meretrix* ที่พบเจอในประเทศไทย (C) *M. casta* (D) *M. ovum*

ที่มา: ดัดแปลงจาก Yoosukh and Matsukuma (2001)

นอกจากนั้น Hamli *et al.* (2016) ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของเปลือกหอยตลับ *Meretrix* spp. ที่แตกต่างกัน โดยเก็บรวบรวมหอยตลับบริเวณชาราวัก ประเทศมาเลเซีย ทั้งหมด 3 ชนิดพันธุ์ได้แก่ *M. lyrata* *M. lusoria* และ *M. meretrix* โดยทำศึกษาลักษณะภายนอก และลักษณะสัณฐานภายในตามวิธี Poutiers (1998) โดยวัดลักษณะของเปลือกทั้งหมด 13 ตำแหน่งตามรูปที่ 2.6 (ตารางที่ 2.1)



รูปที่ 2.6 การวัดตำแหน่งของเปลือกหอย *Meretrix* spp.

ที่มา: Hamli *et al.* (2016)

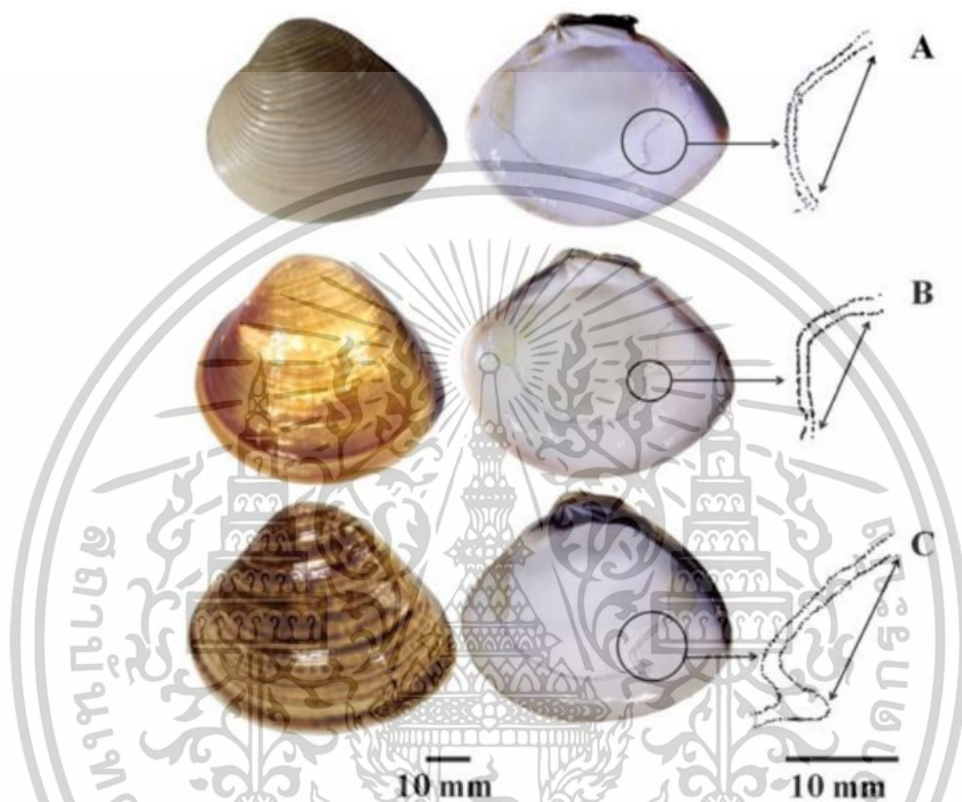
ตารางที่ 2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	ลักษณะที่ใช้ในการวัด	ตัวย่อ
1.	shell length	SL
2.	Shell height	SH
3.	Shell width	SW
4.	Ligament length	LL
5.	umbo length	UL
6.	anterior length	AL
7.	posterior length (PL)	PL
8.	length of cardinal tooth	LCT
9.	length of posterior adductor scar to anterior adductor scar	LPAS
10.	posterior adductor scar width scar	PW
11.	anterior adductor scar width scar	AW
12.	pallial line scar to ventral margin anterior	PVM
13.	pallial sinus open scar	PS

ที่มา: Hamli *et al.* (2016)

จากการศึกษาลักษณะภายนอกของหอยตลับทั้ง 3 ชนิดพันธุ์ พบว่ามีรูปร่างเป็นรูปสามเหลี่ยมมนรูปไข่เหมือนกัน จัดจำแนกด้วยลักษณะรูปร่างไม่ได้ แต่หอยตลับแต่ละชนิดพันธุ์มีสีและรูปแบบของเปลือกที่มีลักษณะเฉพาะ ชนิดพันธุ์ที่จำแนกลักษณะภายนอกที่ง่ายที่สุด คือ *M. lyrata* เนื่องจากผิวเปลือกด้านนอกมีลักษณะเป็นร่อง ริว ๆ อีกทั้งความยาวด้านหน้าของเปลือก (AL) นั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับ *M. meretrix* และ *M. lusoria* เนื่องจาก *M. lyrata* มีความยาวด้านหน้าของเปลือกที่สั้นกว่า ในส่วนชนิดพันธุ์ *M. meretrix* และ *M. lusoria* ที่ผิวเปลือกด้านนอกจะเรียบ *M. meretrix* เปลือกเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ส่วน *M. lusoria* จะมีเปลือกที่ค่อนข้างขาว โดย *M. lusoria* และ *M. meretrix* มีความกว้างของเปลือก (SW) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งความกว้างของเปลือก *M. meretrix* จะมีความกว้างของเปลือกกว้างกว่า *M. lusoria* หากใช้เพียงลักษณะภายนอกอาจจำแนกผิดพลาดได้ง่าย เนื่องจากพื้นผิวของเปลือกมีความแตกต่างกันของสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับสปีชีส์ *M. meretrix* และ *M. lusoria* ที่มีลักษณะของผิวเปลือกด้านนอกที่เรียบเหมือนกัน รวมถึงปัจจัยสิ่งแวดล้อมยังมีผลต่อสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยและรูปร่างของหอยสองฝา เช่น ละติจูด ความลึก กระแสน้ำ และประเภทของพื้นผิวของแหล่งที่อยู่อาศัย แต่การใช้ลักษณะภายในเปลือกพบว่า pallial sinus แต่ละชนิดพันธุ์จะมีลักษณะแตกต่างกัน posterior adductor muscle scar ของ *M. lusoria* คล้ายกับรูปแบบของตัว L เนื่องจาก pallial

ยี่ตยาวออกจาก pallial sinus ส่วน *M. meretrix* และ *M. lyrata* ตรง pallial sinus ของทั้งสองชนิดจะมีลักษณะคล้ายกับไฮโฟโบลา แต่ *M. lyrata* จะมีขนาดที่เป็นทรงและใหญ่กว่า *M. meretrix* ดังนั้น pallial sinus สามารถใช้จำแนกหอยตลับทั้งสามชนิดพันธุ์ได้ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 ลักษณะภายนอกของเปลือก และรูปแบบของ pallial sinus ของ (A) *Meretrix lyrata* (B) *M. meretrix* (C) *M. lusoria*

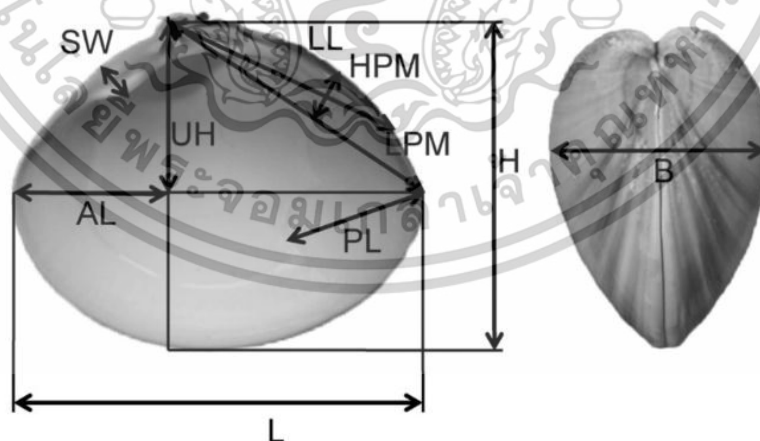
ที่มา: Hamli et al. (2016)

เช่นเดียวกับ Torii et al. (2010) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมและลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก ระหว่าง *M. lusoria* และ *M. petechialis* ในประเทศญี่ปุ่น อ่าว Mutsu (MT) อ่าว Sendai (SN) ทะเล Aso (AS) อ่าว Ise (IS) อ่าว Yuya (YY) อ่าว Kafuri (KF) และอ่าว Ariake (AR) และในประเทศเกาหลีอ่าว Sacheon (SC) อ่าว Gangjin (GJ) Baeksu (BK) และ Saemangeum (SM) หอยตลับทั้งสองชนิด ถือเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของทั้งสองประเทศ ประเทศญี่ปุ่นซึ่งมี *M. lusoria* ที่เป็นหอยท้องถิ่น แต่มีการนำเข้าและปัญหาการปนเปื้อน รวมทั้งในเกาหลีตรงบริเวณ Saemangeum ที่เป็นแหล่งผลิต *M. petechialis* มีการนำเข้าหอยตลับเช่นเดียวกัน จึงทำให้หอยตลับทั้งสองชนิดนี้ลดลงอย่างมาก และมีการรายงานว่าหอยตลับทั้งสองชนิดมีการผสมพันธุ์กันระหว่างสองชนิดพันธุ์ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งข้อมูลหรือการอธิบายถึงลักษณะ

ของให้ตลับในแต่ละชนิดพันธุ์ มักทำให้เกิดความสับสน เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกัน และมีการระบุที่ผิดพลาดมากมายในหนังสือ รายงาน และบทความต่าง ๆ จำนวนมาก จึงได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการวัดลักษณะต่างๆทั้งหมด 10 ตำแหน่ง (อธิบายตำแหน่งการวัดในตารางที่ 2.2) แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.8

ตารางที่ 2.2 ตำแหน่งที่ใช้วัดลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยตลับ

ชื่อย่อ	พารามิเตอร์ที่ใช้วัดลักษณะสัณฐาน
L	shell length
H	shell height
B	shell breadth
PL	pallial sinus length
LL	ligament length
SW	socket width
AL	anterior shell length
UH	upper shell height
LPM	length of posterior-dorsal margin
HPM	height of posterior-dorsal margin

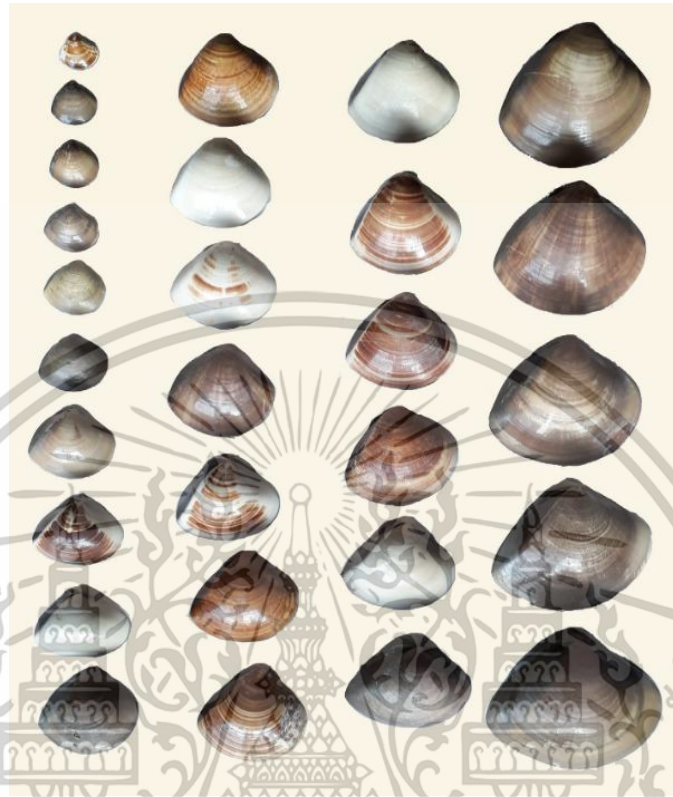


รูปที่ 2.8 ตำแหน่งที่ใช้วัดหอยตลับ 9 ตำแหน่ง ของเปลือกหอยด้านขวา
ที่มา: Torii *et al.* (2010)

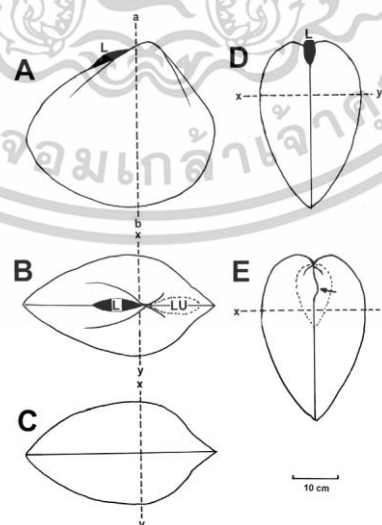
การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของเปลือกในหลายตัวแปร พบว่า *M. lusoria* จากทุกชายฝั่งทะเลของญี่ปุ่น และจากชายฝั่งทะเลทางตอนใต้และตะวันตกเฉียงใต้ของเกาหลีจะมีลักษณะของ pallial line ที่เป็นเส้นตรงมากกว่า ความกว้างของ socket ที่แคบ และความกว้างของเปลือกที่กว้างกว่า *M. petechialis* ที่บริเวณชายฝั่งทะเลตะวันตกเกาหลี เมื่อได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่ใช้จำแนกและชนิดพันธุ์โดยใช้ canonical discriminant analysis (CDA) พบว่ามี 5 ตำแหน่งที่ใช้จำแนกความแตกต่างระหว่าง *M. lusoria* และ *M. petechialis* คือ ความยาวของเปลือก (L) ความกว้างของเปลือก (B) ความกว้างของ socket (SW) ความยาวด้านหลังของเปลือก (LPM) และความสูงด้านหลังของเปลือก (HPM) มีความแม่นยำถึง 98.89 %

จากการศึกษาชีววิทยาและลักษณะสัณฐานวิทยาของ หอยตลับ *Meretrix cf. meretrix* ที่ฮ่องกง (Morton *et al.*, 2021) เก็บตัวอย่างที่ Tong Fuk Miu Wan และ หาด Shui Han ที่เกาะ Lantau ฮ่องกง เนื่องจากบริเวณนี้มีการทำประมงและเป็นพื้นที่ท่องเที่ยวจึงคาดว่า *M. cf. meretrix* จะลดลง โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ศึกษารูปแบบของเปลือกความสัมพันธ์ระหว่าง morphometric และ shell polymorphism โดยพบว่าหอยมีความยาวเปลือกขนาดเล็กและใหญ่ที่สุดเท่ากับ 22.2 มิลลิเมตร และ 90.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ เห็นได้ว่าหอยตลับแต่ละตัวจะมีรูปแบบของเปลือกที่เหมือนกัน แต่ในแง่ของสีนั้นมีความแตกต่างกันสูง (รูปที่ 2.9) ยังไม่มีการอธิบายถึงลักษณะของสีเปลือกหอยที่แตกต่างกันได้ เพราะลวดลายของสีหอยตลับที่พบเจอต่างกันทุกขนาด มีการวิเคราะห์ morphometric แสดงให้เห็นถึงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกแต่ละลักษณะ (phenotypic correlation coefficient) ในกลุ่มของตัวอย่าง *M. cf. meretrix* ที่สุ่มได้บริเวณ Tong Fuk Miu Wan มีความสัมพันธ์ไปทางบวก โดยพบว่าความสูง ความกว้าง และความหนา มีความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือถ้ามีความสูงของเปลือกหอยที่เพิ่มขึ้น ความกว้างและความหนาของเปลือกหอยตลับจะเพิ่มขึ้นไปด้วย เมื่อนำหอยมาวาดลักษณะของรูปร่างภายนอกพบว่า *M. cf. meretrix* เมื่อมองจากเปลือกขวามีลักษณะที่เรียบและด้านหลังมนขึ้น ขนาดของเปลือกหอยจะกวัดจากจุด a ถึง b ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสูงและความกว้าง (รูปที่ 2.10A) เมื่อมองจากด้าน Dorsal เปลือกหอยแสดงให้เห็นถึงการเชื่อมต่อของ opisthodetic ligament และ anterior lunula ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญในการศึกษาการเปิดและการปิดของเปลือก (รูปที่ 2.10B) อีกทั้งมุมจากด้าน Ventral จะเห็นความกว้างที่ใหญ่ที่สุดของเปลือกหอย เมื่อวัดความกว้างจากจุด x ถึง y (รูปที่ 2.10C) และจะเห็นว่าเมื่อเปลือกหอยปิดสนิท การเชื่อมต่อระหว่างฝาของเปลือก (valves) มีการเชื่อมกันระหว่าง ฝาของเปลือกหอยแต่ละข้าง เมื่อหอยตลับปิดเป็นเส้นตรงที่ปิดสมบูรณ์ (รูปที่ 2.10D) เปลือกหอย จะพบว่า ขอบของฝาเปลือก (valve margins) มีลักษณะโค้งเล็กน้อยในรูปแบบ S-shape ซึ่งหมายความว่าเมื่อปิดเปลือกหอยจากด้านหน้า ขอบของฝาเปลือกจะไม่ได้ตรง แต่จะมีลักษณะโค้งเป็นรูป S เล็กน้อย (รูปที่ 2.10B) เมื่อลองดูเปลือกภายในที่เส้น pallial line จะมี pallial sinus (PS) กล้ามเนื้อยึดสองตำแหน่ง ด้านหน้าและด้านหลัง (กล้ามเนื้อยึดด้านหน้าและกล้ามเนื้อยึดข้างหลัง) เป็นการประมาณขนาดได้ ภายในทั้งสองมีรอย pedal retractor muscles ที่ทำหน้าที่ดึง

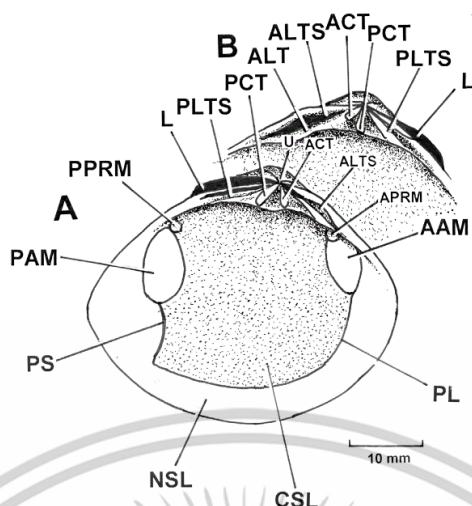
เท้ากลับเข้ามาในเปลือก (จะประกอบด้วยส่วนที่ดึงเท้ากลับด้านหน้า (APRM) และส่วนที่ดึงเท้ากลับด้านหลัง (PPRM)) (รูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.9 ลักษณะภายนอกของ *M. cf. meretrix* ที่ทำการสุ่มเก็บบริเวณ Tong Fuk Miu Wan และหาด Shui Han ที่เกาะ Lantau ฮองกง
ที่มา: Morton *et al.* (2021)



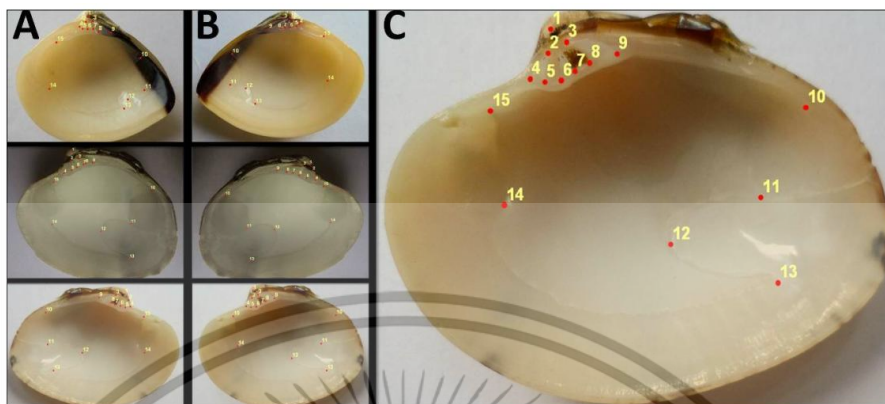
รูปที่ 2.10 รูปร่างลักษณะภายนอกของ *M. cf. meretrix*
ที่มา: Morton *et al.* (2021)



รูปที่ 2.11 ลักษณะภายในของ *M. cf. meretrix* ที่ทำการสุ่มเก็บบริเวณ Tong Fuk Miu Wan และหาด Shui Han ที่เกาะ Lantau ฮองกง (AAM; Anterior adductor muscle, ACT; Anterior cardinal tooth, ALT; Anterior lateral tooth, ALTS; Anterior lateral tooth and socket, APRM; Anterior pedal retractor muscle, CSL; Calcareous shell layer, L; Ligament, LU; Lunule, PAM; Posterior adductor muscle, PCT; Posterior cardinal tooth, PL; Pallial line, PLTS; Posterior lateral tooth and socket, PPRM; Posterior pedal retractor muscle, PS; Pallial sinus, U; Umbo)
ที่มา: Morton *et al.* (2021)

นอกจากนี้จากการศึกษาลักษณะสัณฐานเรขาคณิต (geometric morphometric) ยังเป็นหนึ่งในวิธีการในการจำแนกชนิดพันธุ์ โดยมีหลักการนี้จะมี 2 วิธี ได้แก่ การวิเคราะห์รูปร่าง หรือโครงร่าง (shape/outline) ของเปลือกหอย โดยใช้การวิเคราะห์ที่เส้นขอบรอบนอกเปลือกของตัวอย่าง และการวิเคราะห์โดยการวางตำแหน่งอ้างอิง (landmark) ไว้ตามจุดเด่นของโครงร่างเปลือกแล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งของการวางจุดของแต่ละตัวอย่าง ซึ่งทั้งสองหลักการนี้จะนำเสนอในรูปแบบของข้อมูลที่ต่างกัน และสามารถนำไปใช้ในสถานการณ์ที่แตกต่างกันได้ มีการศึกษาของ Moneva *et al.* (2014) ที่ทำการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของเปลือกหอยสองฝา 3 ชนิดพันธุ์คือ *M. lyrata*, *Mercenaria mercenaria* และ *Venerupis philippinarum* โดยใช้การกำหนด Landmark จำนวน 15 จุด (รูปที่ 2.12) แล้ววิเคราะห์ลักษณะสัณฐานเรขาคณิตด้วย relative warp analysis (RWA) พบว่าหอยสองฝาทั้งสามชนิดนั้นมีรูปร่างของลักษณะของเปลือกภายในแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความแตกต่างที่ชัดเจนในลักษณะของเปลือกหอยในแต่ละชนิด ได้แก่ ตำแหน่งของจุดยอดของเปลือกหอย (umbo) และรอยที่เกิดจากการยึดติดกล้ามเนื้อ

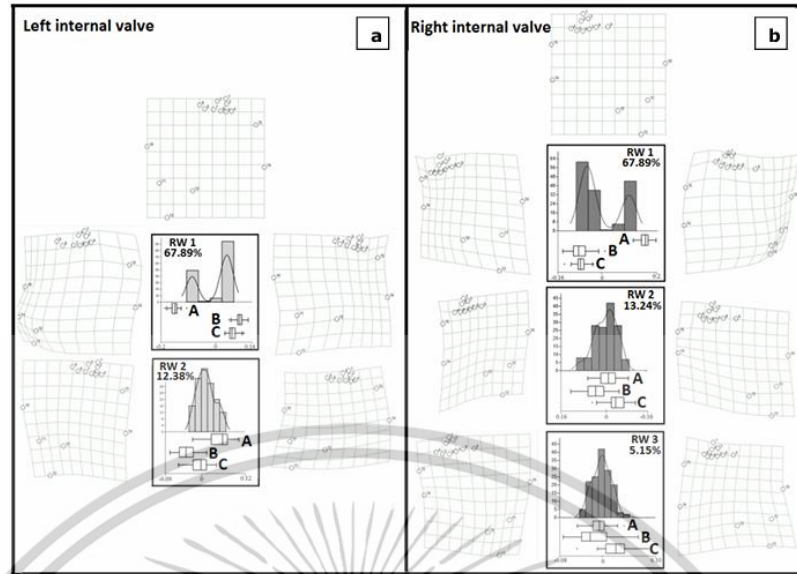
ภายในเปลือกหอย (muscle scars) ความยาวของเส้นที่แสดงตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่หุ้มภายในของเปลือกหอย (pallial line) และความยาวรอยเว้าในเปลือกหอย (pallial sinus)



รูปที่ 2.12 การกำหนด Landmark จำนวน 15 จุด ที่ใช้ในการอธิบายลักษณะทางสัณฐานภายในของเปลือกหอยสองฝาทั้งข้าง เปลือกด้านซ้าย (A) และเปลือกด้านขวา (B) ของหอยสกุล Venerid สามชนิด ได้แก่ *Meretrix lyrata* (รูปบน), *Mercenaria mercenaria* (รูปกลาง), และ *Venerupis philippinarum* (รูปล่าง) โดยการวางตำแหน่ง (C)

ที่มา: Moneva *et al.* (2014)

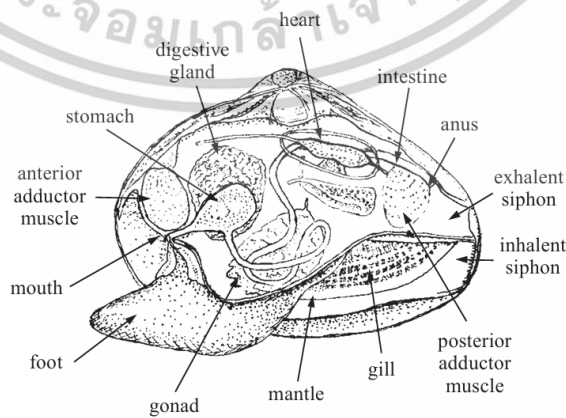
และผลที่ได้จากการใช้ RWA มีการแบ่งผลออกเป็น Relative Warps (RW1, RW2, RW3) ที่มีการแปรผันอย่างมีนัยสำคัญ โดยแต่ละ RW แสดงถึงความแตกต่างของมิติหลักในลักษณะทางรูปร่างของเปลือกหอย (รูปที่ 2.13) พบว่า RW1 อธิบายความแปรผันในเปลือกหอยด้านซ้ายได้ถึง 67.89% และ 68.78% ในเปลือกหอยด้านขวา หมายความว่า RW1 นี้ครอบคลุมการแปรผันที่สำคัญที่สุดในข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา จากการใช้ RWA แสดงให้เห็นว่า *M. lyrata* มีการแปรผันทางรูปร่างที่แตกต่างจาก *M. mercenaria* และ *V. philippinarum* โดยเฉพาะในเรื่องของ pallial sinus ที่ตื้นกว่า ส่วน *M. mercenaria* และ *V. philippinarum* มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าในลักษณะของรูปร่างโดยรวม ซึ่งความลึกและลักษณะของ pallial sinus มักจะสัมพันธ์กับลักษณะการขุดดินของหอย โดยหอยที่สามารถขุดดินได้ดีก็อย่าง *M. mercenaria* และ *V. philippinarum* จะมี pallial sinus ที่เว้าลึกและมีพื้นที่มากพอที่จะรองรับ siphon ที่ยาวขึ้น ส่วน *M. lyrata* ที่ขุดดินได้ตื้นกว่าจะมี pallial sinus ที่เว้าตื้นกว่า



รูปที่ 2.13 Relative warp box plot และฮิสโตแกรม แสดงการแปรผันในเปลือกหอยด้านซ้าย (a) และเปลือกหอยด้านขวา (b) ของเปลือกหอยภายในของ: (A) *Meretrix lyrate* (B) *Mercenaria mercenaria* และ(C) *Venerupis philippinarum*
ที่มา: Moneva *et al.* (2014)

2.3. ชีวิตภายในของหอยตลับ *Meretrix* spp.

หอยตลับ *Meretrix* มีโครงสร้างภายในที่พัฒนาเพื่อการดำรงชีวิตในแหล่งที่อยู่ที่เป็นดินโคลน และทราย โดยใช้ในการขุดและฝังตัวในการหาแหล่งที่อยู่อาศัย มีอวัยวะภายในจะประกอบไปด้วย ระบบย่อยอาหาร ระบบหมุนเวียนเลือด ระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์ และมีแมนเทิล (mantle) ที่เป็นเนื้อเยื่อห่อหุ้มอวัยวะต่าง ๆ ภายใน (รูปที่ 2.14) ช่องระหว่างเยื่อแมนเทิลกับอวัยวะภายในแมนเทิลนั้นมีเหงือก (gill)



รูปที่ 2.14 ลักษณะโครงสร้างภายในของหอยสองฝา
ที่มา: <ftp://ftp.fao.org>

2.3.1 การกินอาหาร

หอยตลับเป็นหอยสองฝาที่กินอาหารด้วยการกรองอาหารจากน้ำทะเล (filter feeder) โดยจะเปิดเปลือกเพื่อให้น้ำไหลเข้ามาในช่องแมนเทิล (Mantle cavity) น้ำที่ดูดเข้ามาจะถูกกรองผ่านเหงือก (gill) เหงือกของหอยตลับทำหน้าที่กรองอนุภาคอาหารจากน้ำ เซลล์ขนเล็ก ๆ (cilia) ที่อยู่บนเหงือกจะสร้างกระแสและดักจับอนุภาคอาหาร โดยอนุภาคอาหารที่กรองได้จะถูกส่งต่อไปยัง กลีบบปาก (labial Palps) หลังจากนั้นก็จะส่งต่ออาหารเข้าสู่ปาก ซึ่งอาหารจะเข้าสู่ระบบย่อยอาหาร กระเพาะอาหารที่มี คริสตัลไลน์สไตล์ (crystalline Style) จะช่วยหมุนและบดอาหารให้ละเอียดก่อนเข้าสู่ลำไส้ ใน ลำไส้ (intestine) อาหารจะถูกย่อยและดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกาย ส่วนของเสียที่ไม่สามารถย่อยได้จะถูกขับออกทาง ทวารหนัก (anus) (Gosling, 2003)

2.3.2 การหายใจ

หอยตลับใช้เหงือก (gills) เป็นอวัยวะหลักในการแลกเปลี่ยนก๊าซ และอาศัยการไหลเวียนของน้ำที่ผ่านช่องว่างระหว่างเยื่อแมนเทิล (mantle cavity) เพื่อดึงออกซิเจนจากน้ำและขับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออก โดยการดูดน้ำเข้าสู่ช่องแมนเทิล น้ำจะถูกดูดเข้าสู่ร่างกายผ่านท่อไซฟอนดูดน้ำ (Incurrent Siphon) จากนั้นน้ำจะไหลเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเยื่อแมนเทิลกับลำตัว การไหลของน้ำจะช่วยนำออกซิเจนเข้าสู่ระบบหายใจและลำเลียงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป หลังจากนั้นเหงือกของหอยตลับมีโครงสร้างเป็นแผ่นบางและมีเซลล์ขนเล็ก ๆ (cilia) ที่ช่วยในการสร้างกระแสให้น้ำไหลผ่าน และเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกมีความสามารถในการดูดซับออกซิเจนจากน้ำและปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่กระแสน้ำ กระบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซเกิดขึ้นโดยการแพร่ (diffusion) ระหว่างน้ำและเลือดที่ไหลเวียนผ่านเหงือก และหลังจากนั้นจะมีการขับน้ำออกโดยน้ำที่ผ่านการแลกเปลี่ยนก๊าซแล้วจะถูกปล่อยออกจากร่างกายผ่าน ท่อไซฟอนขับถ่าย (excurrent siphon) พร้อมกับของเสียที่ไม่ต้องการกระแสน้ำที่ไหลผ่านช่วยรักษาสมดุลของอุณหภูมิและลดการสะสมของสารพิษในร่างกาย (Gosling, 2003)

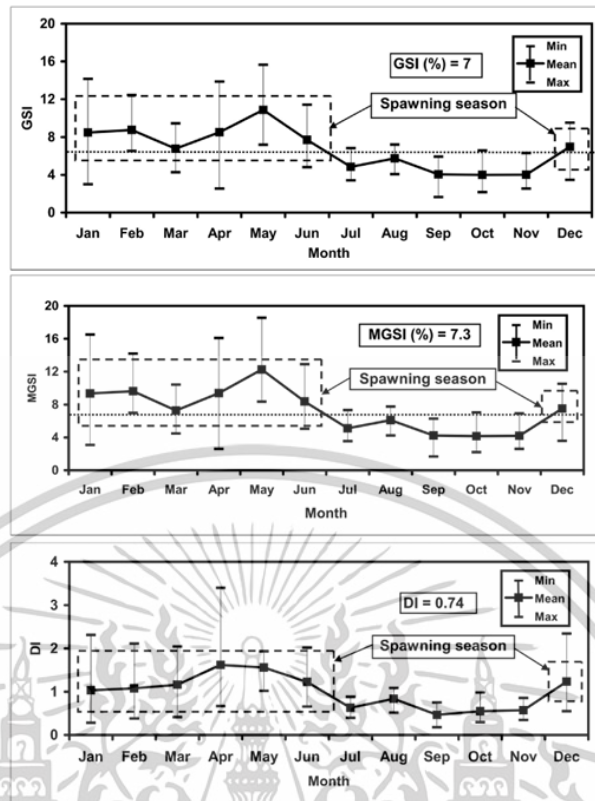
2.3.3 การสืบพันธุ์และการพัฒนาของตัวอ่อน

หอยตลับมีการสืบพันธุ์แบบแบบอาศัยเพศ (sexual Reproduction) โดยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียลงในน้ำเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิ โดยกระบวนการนี้เกิดขึ้นผ่าน การปฏิสนธิภายนอก (external Fertilization) กระบวนการสืบพันธุ์มีลักษณะเฉพาะที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในดินโคลนหรือทราย โดยหอยตลับจะมีเพศแยก (gonochoristic) โดยเพศผู้จะมีอัณฑะ (testes) ที่ใช้ในการผลิตสเปิร์ม และ เพศเมียจะมีรังไข่ (ovaries) การสืบพันธุ์มักเกิดขึ้นในช่วงฤดูผสมพันธุ์หรือเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น อุณหภูมิหรือความเค็มของน้ำที่พอเหมาะ

หลังการปฏิสนธิ เซลล์ไข่จะพัฒนาเป็นตัวอ่อน (Larva) ซึ่งลอยอยู่ในน้ำในระยะเริ่มต้น และตัวอ่อนจะเติบโตและพัฒนารูปร่าง จนสามารถกระทั้งสามารถฝังตัวลงในพื้นดินตะกอนหรือทรายได้ (เสถียรพงษ์ ขาวหิต และคณะ, 2558; Gosling, 2003)

2.3.3.1 ชีวิตวิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตลับ

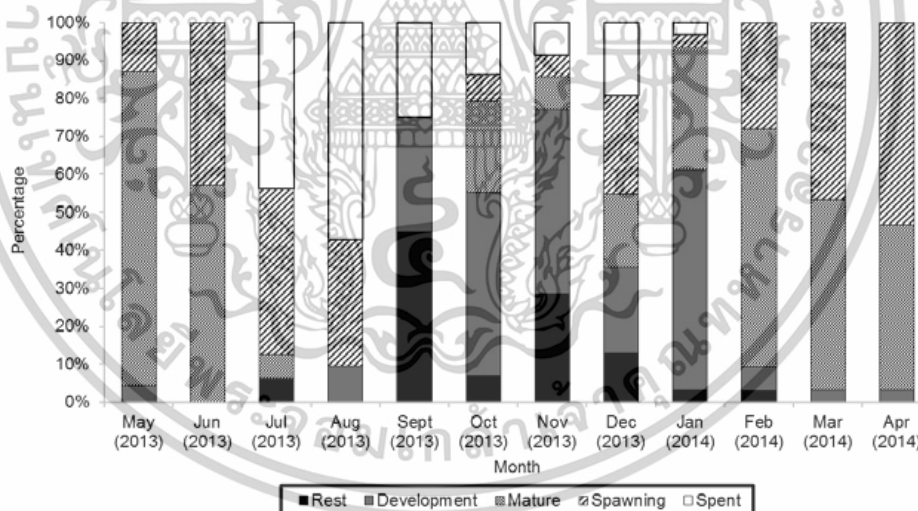
การศึกษาเกี่ยวกับชีวิตวิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตลับโดย Hossain *et al.* (2023) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกชนิดพันธุ์และชีวิตวิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตลับ *M. lyrata* บริเวณอ่าวเบงกอล ประเทศบังกลาเทศ โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างหอยตลับในแต่ละเดือน ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม 2020 ประเมินขนาดแรกเริ่มสืบพันธุ์ (size at first sexual maturity, SL_m) และประเมินขนาดที่ประชากรหอย 50% มีความสมบูรณ์ทางเพศ (length at which 50% of specimens are mature, SL_{50}) โดยใน *M. lyrata* พบ SL_m และ SL_{50} อยู่ที่ 4.2 เซนติเมตร และยังพบว่าหอยตลับ *M. lyrata* ตัวเมียที่มีขนาดเล็กที่สุดและมีความสมบูรณ์ทางเพศคือ 1.7 เซนติเมตร ซึ่งการประเมินขนาดแรกเริ่มในการสืบพันธุ์เป็นเรื่องยาก เนื่องจากมีความแตกต่างระหว่างสตั๊กที่มีความหลากหลายในชนิดพันธุ์เดียวกัน และความแตกต่างของขนาดหอยที่มีความยาวแรกเริ่มในการสืบพันธุ์นั้นอาจเกิดจากการทำการประมง หรือจากปัจจัยอื่น ๆ ทั้งนี้ยังได้รับอิทธิพลของ ขนาด อายุ และลักษณะของภูมิศาสตร์ และพบว่าช่วงการวางไข่และการวางไข่สูงสุดของหอยตลับ *M. lyrata* (รูปที่ 2.15) จะอยู่ในช่วงมกราคม ถึงมิถุนายน และธันวาคม โดยมีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic Index, GSI), ค่าดัชนีสมบูรณ์เพศหลังจากการหักน้ำหนักรังไข่ (modified gonadosomatic index, MGSI) และค่าดัชนีโดบริยัล (Dobriyal index, DI) เพิ่มขึ้นและพบว่าในเดือนพฤษภาคม เป็นช่วงที่การปล่อยไข่สูงสุดในฤดูวางไข่



รูปที่ 2.15 ช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยตลับ *M. lyrata* จากการคำนวณค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) ค่าดัชนีสมบูรณ์เพศหลังจากการหักน้ำหนักรังไข่ (MGSI) และค่าดัชนีโอบริยัล (DI) ที่มา: Hossain *et al.* (2023)

นอกจากนี้ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมยังมีความสัมพันธ์กันกับดัชนีความสมบูรณ์เพศ โดยพบว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อม 5 พารามิเตอร์จะมีหน้าที่ไปกระตุ้นการวางไข่และการสืบพันธุ์ของหอย นั่นคืออุณหภูมิ, pH, DO, ความเค็ม และปริมาณน้ำฝน โดยพบว่าปริมาณ ค่า DO และความเค็ม นั้นมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับค่า GSI และต่อฤดูการวางไข่ของ *M. lyrata* ในเดือนพฤษภาคม จะมี DO สูง (6 mg/l) และความเค็มสูง (34 ppt) ซึ่งมัก ซึ่งเป็นฤดูการวางไข่ของหอยชนิดนี้ เนื่องจากมีค่า GSI สูง และพบ DO ต่ำ (2.9 mg/l) และความเค็มปานกลาง (15 ppt) ในเดือนกรกฎาคม ซึ่งค่า GSI ก็ต่ำในเดือนนี้เช่นกัน แสดงว่าหอยจะไม่ปล่อยไข่ในช่วงเดือนดังกล่าว (เสถียรพงษ์ ขาวหิต และคณะ, 2558) นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับวงจรการสืบพันธุ์ของหอยตลับ *M. lyrata* ในประเทศมาเลเซีย โดยใช้ข้อมูลทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าหอยตลับ *M. lyrata* มีเพศแยก โดยอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย เท่ากับ 1 : 0.78 จะโดยเพศผู้จะเด่นกว่า (Hamli *et al.*, 2015) ในขณะที่หอยอีกชนิด *M. meretrix* จะมีอัตราส่วนเพศเท่ากับ 1 : 1.14 โดยมีเพศเมียที่เด่น (เสถียรพงษ์ ขาวหิต และคณะ, 2559) อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียที่ต่างกันในหอยสองฝานั้นเป็นเพราะว่าหอยสองฝามีเพศแยก โดยเพศถูกกำหนดโดยอัลลีล (allele) บนยีนบางตำแหน่ง นอกจากนี้หอยสองฝามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สูง จึงทำให้สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของ

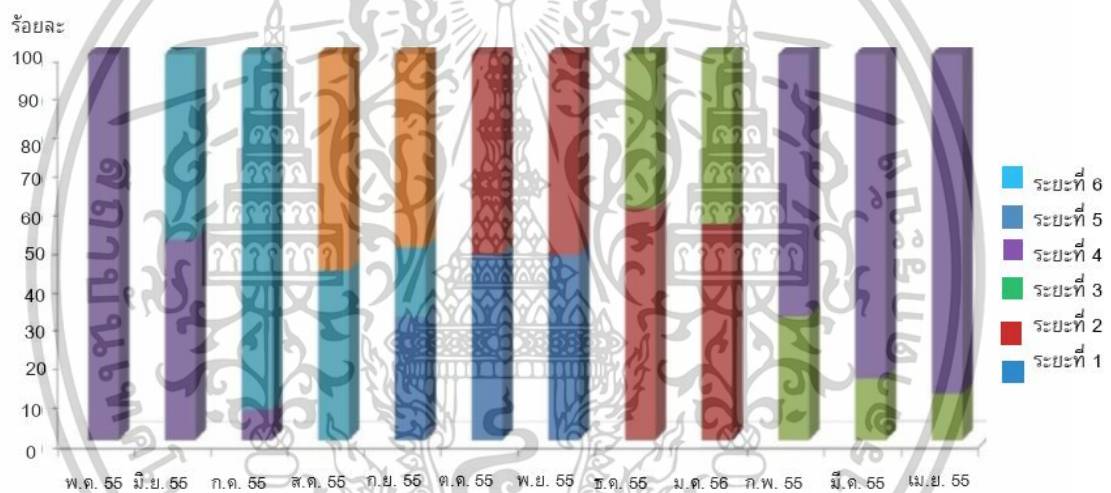
สิ่งแวดล้อมได้ดี ส่งผลให้อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในประชากรไม่คงที่และเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมนั้น ๆ และปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลโดยตรงต่อการกำหนดเพศเพศของหอยสองฝา คือ อุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่ต่างกันจะส่งผลต่อการหลั่งฮอร์โมนเพศ ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย และการศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการวางไข่ของหอยตลับ (*M. lyrata*) ในประเทศมาเลเซีย (Hamli *et al.*, 2015) ที่แบ่งระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ได้ 5 ระยะคือ ระยะก่อนการพัฒนา (rest stage) ระยะกำลังพัฒนา (developmental stage) ระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก (mature stage) ระยะวางเซลล์สืบพันธุ์ (spawning Stage) และระยะหลังวางเซลล์สืบพันธุ์ (spent stage) เห็นได้ว่าเดือนธันวาคมจะพบระยะไข่เริ่มพัฒนา และเดือนมกราคมจะพบระยะกำลังพัฒนาที่มาก เดือนพฤษภาคม (รูปที่ 2.16) จะพบเซลล์สืบพันธุ์สุกเป็นส่วนมาก ซึ่งช่วงการปล่อยไข่คือเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน มีการวางไข่สูง ซึ่งช่วงนี้จะเป็นฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่ความเค็มและอุณหภูมิไม่ต่ำหรือสูงเกินไป เพราะมีผลต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์และการวางไข่ และความเค็มมีผลต่อการ metabolism ของหอยสองฝา และฤดูฝนเป็นช่วงที่มีอาหารเพียงพอที่จะทำให้หอยพัฒนาเนื้อเยื่อและส่งผลทำให้การวางไข่ของหอยสองฝาในช่วงฤดูฝนสูงไปด้วย และเสถียรพงษ์ ขาวหิต และคณะ (2558) ทำการศึกษาวางจร



รูปที่ 2.16 ระยะการพัฒนาของหอยตลับ (*M. lyrata*) ในประเทศมาเลเซีย
ที่มา: Hamli *et al.* (2015)

สืบพันธุ์ของหอยตลับ (*M. meretrix*) ในประเทศไทยพบว่า การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์แบ่งเป็น 6 ระยะ คือ ระยะก่อนการพัฒนา (prefollicular development stage) ระยะเริ่มพัฒนา (initial development stage) ระยะกำลังพัฒนา (developing stage) ระยะระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก (mature stage) ระยะวางเซลล์สืบพันธุ์ (spawning stage) และ ระยะหลังวางเซลล์สืบพันธุ์ (spent

stage) โดยพบว่าในช่วงการสืบพันธุ์เริ่มเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน เป็นช่วงฤดูฝน (รูปที่ 2.17) ทำให้มีการชะล้างน้ำทิ้งจากกิจกรรมชุมชนในพื้นที่ศึกษา และมีการชะล้างของดินตะกอน ทำให้มีธาตุอาหารไหลมารวมกันบริเวณหน้าชายฝั่งทะเลบริเวณที่ศึกษาจึงส่งผลให้มีปริมาณแพลงก์ตอนพืชที่สูง โดยหอยตลับกินอาหารด้วยการกรองกินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร ซึ่งปริมาณอาหารที่เหมาะสม จะสนับสนุนให้หอย 2 ฝา นำไปใช้ในรูปไกลโคเจนค่อนข้างสูงเพื่อพัฒนาเนื้อเยื่อของเพศผู้หรือเพศเมีย ทำให้มีการพัฒนาต่อมเพศหรือทำให้วงจรการสืบพันธุ์ของหอยสองฝาเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ในช่วงฤดูฝนหอยสองฝามีไกลโคเจนที่สูงทำให้มีการพัฒนาเนื้อเยื่อทำให้การวางไข่หอยสองฝาในช่วงฤดูฝนตามไปด้วย นอกจากนี้อุณหภูมิยังเป็นตัวกำหนดลักษณะเพศของหอยสองฝาจะมีต่อมไรท่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่สร้างเนื้อเยื่อหรือหลังฮอร์โมน แล้วส่งไปยังเซลล์เป้าหมาย คือต่อมเพศเพื่อกำหนดเพศผู้หรือเพศเมีย ความเค็มจะมีผลต่อกลไกเมตาบอลิซึมของหอยสองฝา ในเรื่องของการกรองกินอาหาร การย่อยอาหาร การหายใจ การขับถ่าย และความเครียด



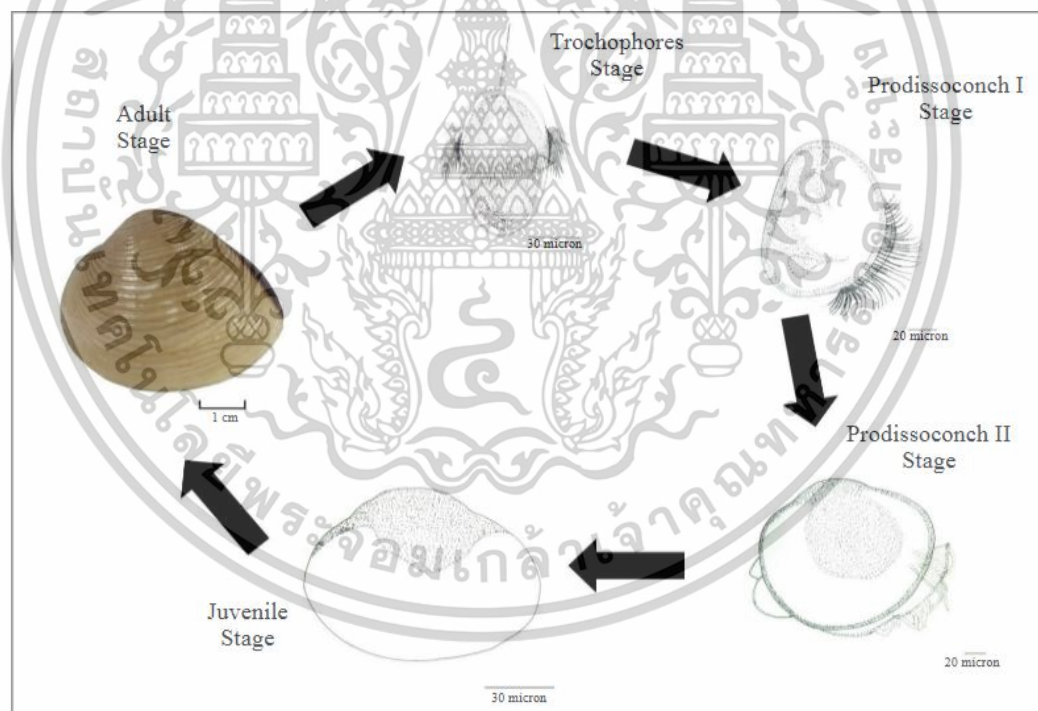
รูปที่ 2.17 ระยะเวลาการพัฒนาของหอยตลับ (*M. meretrix*) ในประเทศไทย

ที่มา: เสถียรพงษ์ ขาวหิโต และคณะ (2558)

2.3.3.2 การพัฒนาระยะของตัวอ่อนหอยตลับ

เมื่อหอยตลับเริ่มพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์จนถึงช่วงฤดูสืบพันธุ์ โดยหอยตลับเพศผู้และเพศเมียปล่อยสเปิร์มและไข่ลงสู่น้ำทะเล (รูปที่ 2.18) เกิดการปฏิสนธิกันจนกลายเป็นไซโกต (zygote) มีการแบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะแรก (trochopros stage) ตัวอ่อนระยะนี้จะมีลักษณะเป็นเซลล์กลมขนาดเล็ก จะมีระยะเวลาอยู่ 6 - 12 ชั่วโมงระยะสั้น ๆ หลังจากนั้นจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ Veliger ในช่วงแรกของระยะนี้ เรียกว่า prodissoconch I โดยตัวอ่อนในระยะนี้ เปลือกจะเริ่มพัฒนาขึ้นบาง ๆ และมีลักษณะที่โปร่งใสมีโครงสร้างที่เรียกว่า velum ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ในการว่ายน้ำและหาอาหาร ระยะนี้จะมีเวลาอยู่ประมาณ 1 - 2 วัน หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ prodissoconch

II ในระยะนี้เปลือกจะมีความหนามากขึ้น และเริ่มพัฒนารูปร่างของเปลือกชัดเจนขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้น ระยะนี้ยังคงใช้ velum ในการว่ายน้ำและหาอาหาร เวลาของตัวอ่อนในระยะนี้ประมาณ 5 – 10 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและสภาพแวดล้อม ก่อนจะเข้าระยะ pediveliger ระยะนี้จะมีเท้า (foot) ปรากฏขึ้น เรียกช่วงเวลานี้ว่าระยะเวลาลอยในน้ำ (larval stage) ระยะนี้เป็นระยะที่สำคัญก่อนจะเข้าสู่ระยะฝังตัว (settlement) ในสภาพแวดล้อม ระยะ pediveliger จะมีการพัฒนาของเท้า ซึ่งจะช่วยให้สามารถเคลื่อนที่ไปยังพื้นที่ที่ตัวอ่อนต้องการฝังตัวในแหล่งที่อยู่อาศัย มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีขนาดใหญ่ขึ้น ตัวอ่อนในระยะนี้จะเริ่มยึดเกาะกับพื้นผิวทราย หรือเปลือกหอยจะใช้เวลาประมาณ 1 – 2 วัน ก่อนจะเข้าสู่การฝังตัวในแหล่งที่อยู่อาศัยเป็นหอยเล็ก (spat) หรือระยะลงพื้น (settlement หรือ benthic stage) ระยะนี้จะมีการพัฒนาเปลือกให้แข็งแรงขึ้น และมีระบบอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งระยะนี้จะใช้เวลาไม่นานในการพัฒนาไปเป็นระยะ juvenile ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม หลังจากเป็น spat เติบโตไปเป็น juvenile ในที่สุดจะกลายเป็น adult stage เมื่อถึงมีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์จนพร้อมที่จะสืบพันธุ์ได้ (Thiet and Kumar, 2008)



รูปที่ 2.18 ระยะการพัฒนาของตัวอ่อนหอยตลับ *M. lyrata*

ที่มา: Hamli *et al.* (2019)

2.4 นิเวศวิทยาของหอยตลับ

หอยตลับเป็นหอยสองฝาที่พบได้บริเวณชายฝั่งทะเลและบริเวณปากแม่น้ำ โดยอาศัยอยู่ในพื้นที่ชายฝั่งทะเลที่มีทรายปนโคลนหรือดินตะกอน มักฝังตัวอยู่ในระดับความลึก 5-15 เซนติเมตร ปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการแพร่กระจายและการเติบโตของหอยตลับ โดยพบว่าหอยตลับมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำ ถ้าคุณภาพน้ำที่ดีจะส่งผลให้หอยตลับมีความหนาแน่นสูงขึ้น ในขณะที่คุณภาพน้ำที่ไม่ดี เช่น ความเค็มและความขุ่น มีผลโดยตรงต่อจำนวนหอยตลับในพื้นที่ที่ศึกษา โดยเฉพาะความขุ่นของน้ำและความเค็มมีความสัมพันธ์เชิงลบ (negative correlation) คือ เมื่อค่าความขุ่นหรือความเค็มในน้ำสูงขึ้น จะส่งผลให้หอยตลับลดจำนวนลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการอาศัยอยู่ของหอย เช่น น้ำที่ขุ่นสูง เนื่องจากหอยสองฝาจะกินอาหารด้วยการกรองกินกรองเอาสารอาหาร เช่น แพลงก์ตอนพืช หรืออนุภาคอาหารขนาดเล็ก ออกจากน้ำเพื่อใช้เป็นอาหาร ในขณะที่หอยสองฝาก็ใช้เหงือกในการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนกับน้ำ เพื่อหายใจ ดังนั้นน้ำที่มีความขุ่นสูงจะมีตะกอนหรือสารแขวนลอยมาก ทำให้น้ำที่หอยสองฝากรองมีคุณภาพต่ำ หรือมีสิ่งสกปรกมากเกินไป ส่งผลให้กรองน้ำได้ยากขึ้น กระบวนการหายใจและการดูดอาหารจึงมีประสิทธิภาพลดลงในขณะที่ความเค็มที่สูงอาจส่งผลให้หอยตลับต้องเกิดการเครียดจากการปรับสมดุลน้ำในร่างกาย ทำให้ลดการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของหอยตลับ ในขณะเดียวกันคุณภาพของดินตะกอน เช่น อินทรีย์วัตถุ แคลเซียม โพแทสเซียม และ แมกนีเซียม มีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) กับการเจริญเติบโตและปริมาณหอยตลับที่พบในพื้นที่นั้น ๆ โดยอินทรีย์วัตถุและแร่ธาตุเหล่านี้ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมกับการเติบโตของหอยตลับ ทั้งในด้านการให้เป็นแหล่งอาหาร (เช่น สารอาหารที่ละลายในดินและน้ำ) และการปรับสภาพของดินให้เหมาะสมกับแหล่งอาศัยของหอยโดยที่แคลเซียม โพแทสเซียม และแมกนีเซียมเป็นแร่ธาตุที่สำคัญต่อการสร้างเปลือกของหอยตลับ รวมถึง การสร้างเปลือก และการควบคุมกระบวนการเคมีในร่างกายของหอย ซึ่งหากพื้นดินมีแร่ธาตุเหล่านี้ในระดับที่เหมาะสม จะช่วยให้หอยตลับในการเติบโตและเพิ่มจำนวนของหอยในพื้นที่นั้น ๆ ได้ (เสถียรพงษ์ ขาวหิต และเกษม จันทร์แก้ว, 2559) หอยตลับถือว่ามีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ เนื่องจากมีหน้าที่เป็นผู้กรองอาหาร ทำให้น้ำสะอาดและช่วยควบคุมปริมาณแพลงก์ตอน และมีส่วนช่วยสร้างสมดุลในระบบนิเวศชายฝั่งโดยการหมุนเวียนสารอาหารในดินตะกอนหรือทราย

นอกจากนี้หอยตลับยังมีวงจรชีวิต โดยมีการเติบโตและจะเข้าช่วงระยะสืบพันธุ์เมื่อมีอายุ 6 ถึง 12 เดือน โดยจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิและแหล่งอาหารที่เพียงพอในพื้นที่ของแหล่งที่อยู่อาศัย (เสถียรพงษ์ ขาวหิต และคณะ, 2558)

2.5 การแพร่กระจายของหอยตลับ

หอยตลับ (*Meretrix* spp.) เป็นสัตว์หน้าดินกลุ่มหอยสองฝา ที่พบการแพร่กระจายอยู่บริเวณชายฝั่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบในประเทศไทย ฟิลิปปินส์ สิงคโปร์ เวียดนาม อินโดนีเซีย ตามชายฝั่งเอเชียใต้และมหาสมุทรอินเดีย พบในอินเดีย ศรีลังกา ชายฝั่งเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ จีน เกาหลี ญี่ปุ่น และไต้หวัน หอยตลับสามารถพบได้บริเวณชายฝั่งทะเลหาดทราย หาดทรายปนโคลน และบริเวณปากแม่น้ำในเขตน้ำขึ้น-ลง โดยฝังตัวอยู่ใต้พื้นทรายลึกประมาณ 5 - 10 ซม. กินอาหารโดยการกรองกินอาหารขนาดเล็ก ได้แก่ พวกแพลงก์ตอนพืช สามารถพบเจอได้ทั่วไปตามชายฝั่งทะเล

Jayawickrema and Wijeyaratne (2009) ศึกษาการแพร่กระจายและพลวัตประชากรหอยตลับ *M. casta* โดยเก็บรวบรวมหอยตลับตามแนวชายฝั่งในคลองดัตช์ ประเทศศรีลังกา พบว่าการแพร่กระจายของหอยตลับ *M. casta* ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารอินทรีย์ และปริมาณอนุภาคขนาดทราย ทรายแป้ง และดินเหนียว ในตะกอนดิน โดยพบว่าปริมาณของสารอินทรีย์ และปริมาณอนุภาคขนาดทราย ทรายแป้ง และดินเหนียวในดินตะกอน ที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ความชุกของ *M. casta* เพิ่มขึ้นไปด้วย และปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณคลอโรฟิลล์ในน้ำ ไม่มีความสัมพันธ์กับความชุกชุมของหอยตลับกลุ่มนี้ แต่ความเค็มจะมีผลต่อความชุกชุมของ *M. casta* ซึ่งความเค็มที่มากกว่า 40 ppt หรือความเค็มที่น้อยกว่า 3 ppt จะทำให้ *M. casta* มีความชุกชุมน้อยลง เนื่องจากความเค็มผลต่อการ เปิดปิดฝาเปลือกของหอย (vales) โดยเมื่อมีความเค็มต่ำสุด และสูงสุด *M. casta* จะทำการปิดฝาเปลือกอย่างสนิท เพื่อปรับตัวให้อยู่รอดและรักษาสมดุลในร่างกาย

ศึกษาการแพร่กระจายและการเคลื่อนที่ระหว่างแหล่งที่อยู่ในการเติบโตของหอยตลับ *M. lusoria* บริเวณปากแม่น้ำ ชีราคาวา มิโดริคาวา ประเทศญี่ปุ่น Hashiguchi *et al.* (2014) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความยาวเปลือกในการแพร่กระจายหอยตลับ ระยะตัวอ่อน (ความยาวเปลือกน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร) และระยะที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์ (ความยาวเปลือก 5-20 มิลลิเมตร) จะพบระยะตัวอ่อนและระยะที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์ชุกชุมตรงบริเวณปากแม่น้ำ ตรงข้ามกันกับระยะตัวเต็มวัย (ความยาวเปลือกมากกว่า 20 มิลลิเมตร) ที่พบการแพร่กระจายอยู่ที่พื้นที่ราบที่มีน้ำขึ้นน้ำลง บริเวณชายฝั่งทะเลที่ไม่ได้รับอิทธิพลของแม่น้ำ อาจเป็นไปได้ว่าระยะตัวอ่อนและระยะที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์มีการรวมตัวกันตรงใกล้กับบริเวณปากแม่น้ำที่เป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมในการเติบโต แต่พอโตขึ้นเคลื่อนย้ายไปบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง นั้นเป็นเพราะว่าเป็นการเอาตัวรอดของหอยชนิดนี้ เนื่องจากบริเวณปากแม่น้ำมักมีการสะสมของตะกอนโคลนที่มาก โดยเฉพาะระยะหลังจากที่ฝนตก และอาจเป็นเพราะว่าหลีกเลี่ยงการกินอาหารของหอยสองฝาชนิดอื่นที่มีการกินแพลงก์ตอนพืชเหมือนกัน หอยตลับมีการเติบโตที่ช้า แต่สามารถทนความเค็มในช่วงกว้าง จึงทำให้พบการแพร่กระจายตั้งแต่บริเวณปากแม่น้ำไปจนถึงตามบริเวณชายฝั่งทะเล

นอกจากนี้มีการศึกษาการแพร่กระจายของหอยตลับในประเทศไทย โดย รัตนา มั่นประสิทธิ์ และคณะ (2552) ศึกษาปัจจัยการอยู่อาศัยของหอยตลับ (*Meretrix* spp.) บริเวณแหลมกลัด จังหวัด

ตราด โดยเก็บตัวอย่างชายตลับตลอดชายฝั่งแหลมกลัด พบการแพร่กระจายของหอยตลับ 2 ชนิด คือ *M. casta* และ *M. meretrix* ปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของหอยตลับเป็นอย่างมาก โดยปัจจัยที่สำคัญเป็นอย่างแรกในการแพร่กระจายที่เป็นตัวบ่งบอกถึงแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยตลับคือ ดินตะกอน เนื่องจากหอยตลับมีการสัมผัสอยู่กับดินทรายตลอดเวลา โดยพบว่าความชุกชุมของ *M. casta* ตรงบริเวณที่มีดินตะกอนเป็นพื้นโคลน พบมากตรงปลายแหลมกลัดซึ่งอยู่ติดกับพื้นที่ป่าชายเลน และ *M. meretrix* จะชุกชุมบริเวณท้ายบ้านคลองสนที่เป็นบริเวณชายทราย ซึ่งสอดคล้องกันกับความสัมพันธ์ของปริมาณ silt-clay ในดินตะกอน ที่ *M. casta* มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ ปริมาณ silt-clay ในดินตะกอน และ *M. meretrix* มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ ปริมาณ silt-clay ในดินตะกอน และปัจจัยสิ่งแวดล้อมอีกหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์นี้ คือ ความเค็มของน้ำ จะเห็นได้ว่า *M. casta* ชอบอยู่ในแหล่งที่มีความเค็มต่ำ ดังที่พบมีความชุกชุมมากที่บริเวณน้ำกร่อยใกล้กับป่าชายเลน ส่วน *M. meretrix* จะแพร่กระจายในบริเวณที่ไม่ได้มีอิทธิพลจากแหล่งน้ำจืดมากนัก นอกจากนี้ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำ เช่น ปริมาณธาตุอาหาร คลอโรฟิลล์เอ และออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ที่มีมากขึ้นในระดับหนึ่ง ยังส่งผลต่อความชุกชุมที่เพิ่มมากขึ้นของ *M. casta* เช่นกัน

มีการรายงานชนิดพันธุ์ของหอยตลับ *Meretrix* ที่ทั่วโลกมีทั้งหมด 17 ชนิดพันธุ์ (MolluscaBase, 2022) ได้แก่ *M. astricta* (Reeve, 1864) *M. attenuata* Dunker, 1863 *M. aurora* Hornell, 1917 *M. casta* (Gmelin, 1791) *M. lagiensis* Thach, 2023 *M. lamarckii* Deshayes, 1853 *M. lusoria* (Röding, 1798) *M. lyrata* (G. B. Sowerby II, 1851) *M. marisarabicum* C. Martin & Matsukuma, 2020 *M. meretrix* (Linnaeus, 1758) *M. morphina* (Lamarck, 1818) *M. petechialis* (Lamarck, 1818) *M. planisulcata* (G. B. Sowerby II, 1854) *M. subtrigona* (Dunker, 1857) *M. taiwanica* S.-T. Hsiao & S.-C. Chuang, 2023 *M. tigris* K.-Y. Lai & Y.-G. Nien, 2008 และ *M. vestita* (Reeve, 1864) และในประเทศไทยสามารถพบหอยตลับ 6 ชนิดพันธุ์ Yoosukh and Matsukuma (2001) รายงานชนิดพันธุ์หอยตลับที่พบ 3 ชนิดพันธุ์ ได้แก่ *M. meretrix* (Linnaeus, 1758) *M. casta* (Gmelin, 1791) และ *M. planisulcata* (G. B. Sowerby II, 1854) นอกจากนี้ Huber (2010) ได้แก่ *M. astricta* และมีการรายงานในปี 2021 ได้แก่ *M. lyrata* (G. B. Sowerby II, 1851) และ *M. petechialis* (Lamarck, 1818) Wells *et al.* (2021) ซึ่งจากการรายงานการศึกษาหอยตลับในประเทศไทยที่พบเจอบ่อย *M. meretrix* *M. casta* และ *M. lyrata* บริเวณชายฝั่งทะเลตั้งแต่อ่าวไทยฝั่งตะวันออกไปจนถึงอ่าวไทยตอนกลางรวมถึงชายฝั่งทะเลอันดามัน (ตารางที่ 2.3) และมี 2 ชนิดพันธุ์ ที่มีการรายงานว่าพบเจอในประเทศไทยแต่ยังไม่ได้รายงานว่ามีพบเจอตรงบริเวณชายฝั่งทะเล *M. astricta* และ *M. petechialis*

ตารางที่ 2.3 การรายงานการแพร่กระจายของชนิดพันธุ์หอยตลับ (*Meretrix* spp.) ที่พบเจอในประเทศไทย

ลำดับ	ชนิดพันธุ์	บริเวณที่พบ	อ้างอิง
1	<i>M. astricta</i>	ประเทศไทย	Huber (2010)
2	<i>M. casta</i>	สมุทรสงคราม	ภมรพรรณ ฉัตรภูมิและคณะ (2564)
		เพชรบุรี	เสถียรพงษ์ ขาวหิต และคณะ (2558)
		ระนอง	มนตรี สุมนทาและคณะ (2562)
		ตราด	รัตนา มั่นประสิทธิ์ และคณะ (2552)
		สุราษฎร์ธานี พังงา ระยอง ตรัง	Yoosukh and Matsukuma (2001)
3	<i>M. lyrata</i>	ประเทศไทย	Huber (2010)
		ประเทศไทย	Wells <i>et al.</i> (2021)
		เพชรบุรี	สาวิกา และสิทธิ (2556)
		ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา ตรัง สตูล	Suppapan <i>et al.</i> (2021)
4	<i>M. meretrix</i>	ประเทศไทย	Huber (2010)
		สมุทรสงคราม	ณัฐนันท์ และคณะ มมป.
		ชลบุรี	ขวัญภิรมย์ นกเทศ และคณะ (2562)
		ชลบุรี	วิภูษิต มั่นตะจิตร์ และอคลย์ มีนาภา (2565)
		เพชรบุรี	เสถียรพงษ์ ขาวหิต และเกษม จันทร์แก้ว (2559)
		ระยอง ชลบุรี	Yoosukh & Matsukuma (2001)
		ตราด	รัตนา มั่นประสิทธิ์ และคณะ (2552)
		ประจวบคีรีขันธ์	ทรงชัยและคณะ (2530) อ้างอิงโดยกรมประมง(2547)
ชลบุรี สมุทรสงคราม ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง สตูล	Supmee <i>et al.</i> (2020)		
5	<i>M. petechialis</i>	ประเทศไทย	Wells <i>et al.</i> (2021)
6	<i>M. planisulcata</i>	สงขลา ภูเก็ต	Yoosukh and Matsukuma (2001)
	<i>M. ovum</i>	สมุทรสงคราม	Yoosukh and Matsukuma (2001)
	เป็น synonym		
	<i>M. casta</i>		

เมื่อ 20 ปีก่อนประเทศไทย มีการศึกษาอนุกรมวิธานของหอยตลับ *Meretrix* spp. อธิบายถึงชนิดพันธุ์หอยตลับออกเป็น 4 ชนิดพันธุ์ที่เก็บรวบรวมได้ คือ *M. meretrix*, *M. casta*, *M. planisalcata* และ *M. ovum* (Yoosukh and Matsukuma, 2001) และในปัจจุบันยังคงใช้การจำจัดแนกตามวิธีการของ Yoosukh and Matsukuma (2001) จึงทำให้มีความคลุมเคลือหรือจำแนกชนิดผิดพลาดได้ เนื่องจากปัจจุบันสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอาจจะทำให้หอยตลับมีการปรับตัวตามสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก หรือรวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้ นอกจากนี้จากการรวบรวมผลงานวิจัยข้างต้น (ตารางที่ 2.3) พบหอยตลับทั้งหมดในประเทศไทยถึง 6 ชนิดพันธุ์ ซึ่งการศึกษาการแพร่กระจายและข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยายังไม่มีข้อมูลของหอยตลับ *Meretrix* ทุกชนิดพันธุ์ อีกทั้งข้อมูลหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยตลับในประเทศไทยนั้น มีเพียงสองชนิดพันธุ์ ได้แก่ *M. meretrix* และ *M. lyrata* (Supmee et al., 2020; Suppapan et al., 2021)

2.6 เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ในการศึกษาการจำแนกชนิดพันธุ์

การจำแนกชนิดพันธุ์โดยการใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์เป็นวิธีการที่ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์ต่างๆ ที่มีความแม่นยำสูง เทคนิคเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะภายนอกที่มีลักษณะคล้ายกัน แต่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งบางครั้งไม่สามารถจำแนกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกได้

2.6.1 ข้อมูลทางพันธุกรรม

ดีเอ็นเอ (deoxy ribonucleic acid หรือ DNA) เป็นข้อมูลที่กำหนดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตรวมถึงโครงสร้างของโปรตีน การทำงานของเซลล์ และลักษณะทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่น ข้อมูลทางพันธุกรรมถูกบันทึกในลำดับของนิวคลีโอไทด์ ที่ประกอบไปด้วย ส่วนประกอบสามส่วนหลัก ได้แก่ น้ำตาลเพนโทส (pentose Sugar) กลุ่มฟอสเฟต (phosphate Group) และเบสไนโตรเจน (nitrogenous Base) ซึ่งมี 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine, A), ไทมีน (thymine, T), ไซโตซีน (cytosine, C) และกัวนีน (guanine, G) ซึ่งการเรียงกันของเบสไนโตรเจนแต่ละชนิดทำให้สิ่งมีชีวิตต่างกัน และการเรียงกันของสายดีเอ็นเอนี้สามารถนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอคือรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้น และเป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

การสกัดดีเอ็นเอมีหลักการในการสกัด โดยเริ่มจากการทำลายเซลล์ให้แตกเพื่อให้ดีเอ็นเอออกจากเซลล์ (cell lysis) การทำให้เซลล์แตกนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่นการใช้สารเคมีที่สามารถทำลายผนังเซลล์ หรือ การบดตัวอย่าง จะทำให้ผนังเซลล์และเนื้อเยื่อของเซลล์ถูกทำลาย ให้ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ถูกปล่อยออกมาให้สารละลาย จากนั้นเป็นการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA purification) เป็นการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่เหลืออยู่จากการทำให้เซลล์แตก ขั้นตอนนี้สามารถทำได้

หลายวิธี เช่น การใช้สารละลาย สารเคมีอินทรีย์แยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือเช่นเดียวกันกับการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอที่พัฒนาด้วยบริษัทต่าง ๆ เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการสกัดดีเอ็นเอ ต่อไปจะเป็นขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) จะเป็นขั้นตอนสำคัญในการสกัดดีเอ็นเอ โดยจะใช้แอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล (ethanol) หรือไอโซโพรพานอล (isopropanol) เนื่องจากแอลกอฮอล์มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ เมื่อเติมแอลกอฮอล์ลงไปจึงทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน หรืออาจจะมีการเติมเกลือโซเดียมอะซิเตต ให้ดีเอ็นเอสามารถแยกออกจากสารละลาย และให้ดีเอ็นเอนจับตัวกันเองแล้วตกตะกอนเป็นสีขาวอยู่ก้นหลอด หลังจากนั้น ดีเอ็นเอที่ตกตะกอนจะถูกล้างด้วยเอทานอล 70% เพื่อให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการละลายดีเอ็นเอ (DNA rehydration) โดยดีเอ็นเอที่ตกตะกอนจะถูกละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่น TE buffer หรือน้ำปราศจากนิวคลีเอส เป็นต้น การละลายดีเอ็นเอจะช่วยให้ได้สารพันธุกรรมที่พร้อมสำหรับการใช้ในขั้นตอนถัดไป เช่น การทำ PCR หรือการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ในสัตว์ทะเล และในการสกัดดีเอ็นเอในหอยสองฝา มักใช้วิธีการสกัดด้วย phenol/chloroform

2.6.2 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยต้องมีการอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ไพรเมอร์ นิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) และดีเอ็นเอต้นแบบในสภาวะที่เหมาะสม เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส คือ เอนไซม์ที่สำคัญในการจำลองดีเอ็นเอ โดยมีหน้าที่ในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ กระบวนการทำงานของเอนไซม์นี้จะเกิดขึ้นในระหว่างการแบ่งเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์สามารถคัดลอกสารพันธุกรรมไปยังเซลล์ลูก โดยเอนไซม์จะเพิ่มนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกับเบสในสายดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ส่วนไพรเมอร์ คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่มีควายาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 20 – 30 เบส โดยไพรเมอร์จะมีปลายคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณ ดังนั้นการทำ PCR ต้องรู้ถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ อาจารู้ทั้งหมดหรือเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อนำไปออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จะใช้ในปฏิกิริยา และนิวคลีโอไทด์ คือ หน่วยย่อยของคลีอิกที่ประกอบด้วย น้ำตาล ฟอสเฟต และเบสไนโตรเจน (A, T, C, G) ซึ่งจะมาเชื่อมต่อกันในรูปแบบสายเพื่อสร้างสายดีเอ็นเอ

การทำ PCR อาศัยความร้อนในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์และสารประกอบต่างๆ มีลำดับขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (ประมาณ 94-98°C) ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยวสองสาย โดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสของดีเอ็นเอ

2. Annealing เป็นขั้นตอนการจับคู่ไพรมเมอร์ โดยหลังจากที่ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จะเป็นการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (ประมาณ 50-65°C) เพื่อให้ไพรมเมอร์ ที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกันกับส่วนที่ต้องการขยายในดีเอ็นเอ ทำการจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายเดี่ยวที่เหมาะสมให้สามารถจับคู่กันได้ ไพรมเมอร์จะทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

3. Extension ขั้นตอนนี้จะเป็นการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส มักจะให้ Taq polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง โดยเอนไซม์นี้จะใช้ dNTPs ซึ่งประกอบด้วย Adenine (dATP), Thymine (dTTP), Cytosine (dCTP), และ Guanine (dGTP) ในการเพิ่มนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ลงในสายดีเอ็นเอใหม่ที่กำลังขยาย โดยจะเริ่มจากไพรมเมอร์และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเป็นแม่แบบในการขยายสายดีเอ็นเอใหม่

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอน จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในทุกรอบ หรือ 2^n เมื่อปฏิกิริยาเกิด n รอบ และสามารถใช้งานกับเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติในแต่ละขั้นตอนทำซ้ำได้ ถึง 30 - 40 รอบ ก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลาย ๆ เท่า ในเวลาประมาณ 2 - 4 ชั่วโมง (สุรินทร์ปิยโชคณากุล, 2552)

2.6.3 เทคนิค DNA sequencing และการทำ DNA barcoding

DNA barcoding เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในสายดีเอ็นเอ เพื่อระบุตำแหน่งและลำดับของเบส ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมในการจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค่อนข้างคงที่หรือไม่เปลี่ยนแปลงมากในสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ของบางยีน เช่น ยีน COI มาทำหน้าที่เป็น บาร์โค้ด ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ และสามารถนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่เพื่อระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ไม่รู้จักได้ (Herbert *et al.*, 2003) โดยหลักการทำ DNA barcoding ทำโดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการศึกษา ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวม ทำ PCR เพื่อขยายส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการทำการระบุชนิดพันธุ์ จากนั้นทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR และนำลำดับที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดพันธุ์ที่ตรงกับตัวอย่าง ซึ่งวิธีการนี้นิยมใช้ในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีแม่นยำและเชื่อถือได้ นอกจากนี้จะมีประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ โดยจะช่วยในการบันทึกและจัดการความหลากหลายของสายพันธุ์ ซึ่งมีประโยชน์โดยเฉพาะสำหรับสายพันธุ์ที่ยังไม่รู้จักหรือมีลักษณะคล้ายคลึงกัน และใช้ในการตรวจสอบและติดตามสายพันธุ์ที่ใกล้สูญพันธุ์ รวมถึงการตรวจจับสายพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกราน นอกจากนี้ในด้านนิติวิทยาศาสตร์ ใช้ในการระบุตัวตนของตัวอย่างชีวภาพในกระบวนการสอบสวนคดี และการวินิจฉัยทางการแพทย์ รวมถึงในทางด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพ (Frezal and Leblois, 2008)

การทำ DNA sequencing นั้นมีเทคนิคหลายประเภทที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ ยกตัวอย่างเช่น Sanger sequencing และ Next-Generation sequencing (NGS) โดย

Sanger Sequencing จะใช้หลักการ chain termination ซึ่งทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหยุดลง โดยการใช้ dideoxynucleotides (ddNTPs) ที่ขาดกลุ่ม -OH ที่ตำแหน่ง 3' ของน้ำตาล (deoxyribose) ซึ่งจำเป็นสำหรับการเชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์ตัวถัดไปในกระบวนการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอ เริ่มต้นจากการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์ที่ต้องการศึกษา แล้วทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาโดยใช้ PCR เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอในการถอดรหัส โดยจะมีสารที่ใช้ในการถอดรหัสประกอบไปด้วย dNTPs (ATP, TTP, CTP, GTP) เป็นสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายใหม่ และ ddNTPs (dideoxynucleotide triphosphates) เป็นสารที่ใช้ในการหยุดการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอ (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอ ไพโรเมอริใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเป็นดีเอ็นเอที่ต้องการถอดรหัส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ในเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายใหม่จากไพโรเมอริ โดยใช้ dNTPs เพื่อเพิ่มนิวคลีโอไทด์ต่อไปตามลำดับที่ต้องการ เมื่อกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดำเนินไป ddNTPs จะถูกเพิ่มเข้าไปในส่วนผสมในปริมาณน้อยมาก ซึ่งเมื่อ ddNTP ถูกเพิ่มเข้ามาในสายดีเอ็นเอที่อยู่ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะหยุดลงทันทีที่ ddNTP เข้าไปจับ เรียกว่า Chain Termination การหยุดกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกิดขึ้นเพราะ ddNTP ขาดกลุ่ม -OH ที่ตำแหน่ง 3' ของน้ำตาล ซึ่งเป็นกลุ่มที่จำเป็นสำหรับการเชื่อมนิวคลีโอไทด์ตัวถัดไป ddNTPs ทั้ง 4 ชนิด จะหยุดการขยายที่ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งจะทำให้เกิดลำดับของสายดีเอ็นเอที่ยาวต่างกัน ขึ้นอยู่กับว่า ddNTP ตัวใดถูกใช้ในแต่ละขั้นตอน ตรวจสอบสายดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มขึ้นมาโดยใช้ capillary electrophoresis เพื่ออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่หยุดการเพิ่ม โดยผลลัพธ์ที่ได้จะอยู่ในรูปแบบของโครมาโตแกรม (chromatogram) เป็นการแสดงภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ การแสดงผลจะประกอบไปด้วยชุดของ พิค (peaks) ที่แต่ละพิกจะแสดงถึงนิวคลีโอไทด์ (A T C และ G) ในดีเอ็นเอ (Sanger *et al.*, 1997) และหลักการของ Next-Generation sequencing (NGS) เป็นเทคโนโลยีที่ช่วยให้การถอดรหัสดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ในหลาย ๆ สายพร้อมกัน โดยไม่ต้องทำการขยายสายดีเอ็นเอทีละตัวอย่างเหมือนใน Sanger sequencing โดยพื้นฐานแล้ว NGS มีการทำงานโดยการสร้าง short DNA fragments (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดสั้น) และถอดรหัสลำดับของดีเอ็นเอในลำดับที่ไม่ซ้ำกันในระหว่างกระบวนการ ซึ่งขั้นตอนการทำ NGS ขั้นตอนแรกคือการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ จากเซลล์สิ่งมีชีวิตที่เราต้องการศึกษา หลังจากนั้นดีเอ็นเอจะถูกย่อยเป็น fragments ขนาดเล็ก (typically 100-800 bp) โดยใช้ enzymes หรือ mechanical shearing ต้องมีการเชื่อมกับ adapters เพื่อให้สามารถจับคู่และวางตัวอย่างในกระบวนการ NGS ได้ จำเป็นต้องเพิ่ม adapters (ลำดับสั้นๆ ที่รู้จัก) ที่ปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอ fragment ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adapters จะถูกวางลงใน flow cell ซึ่งเป็นแผ่นกระจกพิเศษที่มีที่จับตัว (capture oligos) ซึ่งช่วยยึดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จับกับ flow cell จะถูกขยายจำนวนในกระบวนการ cluster generation โดยใช้เทคนิค bridge amplification ในกระบวนการนี้

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะสร้าง clusters ที่มีจำนวนมากๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนของสัญญาณที่ได้จากการอ่าน หลังจากขั้นตอนการขยาย DNA แล้ว จะเริ่มกระบวนการอ่านลำดับดีเอ็นเอ หลังจากข้อมูลการถอดรหัสถูกเก็บรวบรวมแล้วจะถูกแปลงเป็น sequence reads ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อได้ เช่น Alignment คือขั้นตอนที่ใช้ในการจับคู่ข้อมูลกับ reference genome หรือฐานข้อมูลที่มีลำดับดีเอ็นเอที่รู้จัก (Mardis, 2008) ดังนั้นในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Sanger sequencing เหมาะสำหรับการถอดรหัสดีเอ็นเอขนาดเล็กหรือการตรวจสอบเฉพาะจุดที่ต้องการความแม่นยำสูง และ NGS เหมาะสำหรับการถอดรหัสข้อมูลพันธุกรรมขนาดใหญ่ เช่น จีโนมทั้งชุด หรือการวิเคราะห์พันธุกรรมในเชิงลึก โดยสามารถถอดรหัสได้เร็วและมีข้อมูลจำนวนมากกว่า ดังนั้นการทำ DNA Sequencing ควรเลือกให้เหมาะสมกับงานที่เราต้องการศึกษา

2.6.4 เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

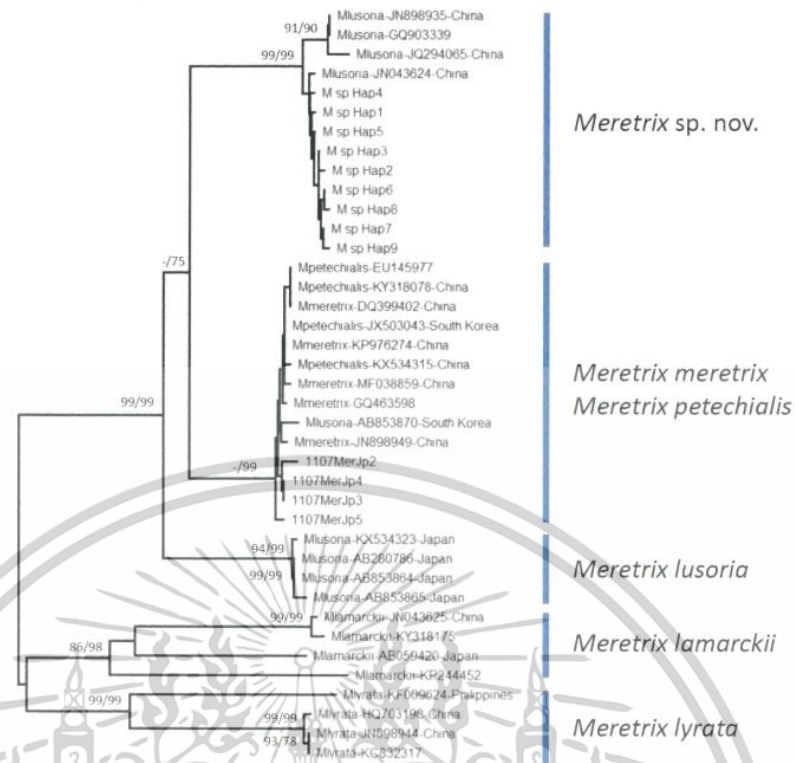
เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการแยก DNA, RNA หรือโปรตีนออกตามขนาด โดยอาศัยสนามไฟฟ้าที่ทำให้โมเลกุลที่มีประจุเคลื่อนที่ผ่านเจลที่มีรูพรุน โดยข้างหนึ่งของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสจะมีประจุบวกและอีกข้างหนึ่งจะมีประจุลบ และ DNA หรือ RNA ที่มีประจุลบก็จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส หลักการทำงานของเทคนิคนี้คือ การเคลื่อนที่ของโมเลกุล เมื่อมีการใช้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่มีประจุลบจะถูกดึงไปยังขั้วบวก โดย โมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการแยกตามขนาด นอกจากนี้การเลือกใช้เจล มักใช้เจลอะกาโรสเป็นวัสดุหลักในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยความเข้มข้นของเจลจะส่งผลต่อขนาดของรู ในการอ่านผลจากการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะต้องมีการย้อมสีเจลด้วยสีเรืองแสง เพื่อให้สามารถเห็นแถบ DNA ที่แยกออกมาเมื่ออยู่ภายใต้แสงยูวี (UV transilluminator) เช่น สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) แต่เนื่องจากสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ปัจจุบันเลยมีสีย้อมที่ปลอดภัยและไม่ก่อมะเร็งที่สามารถใช้แทนสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เช่น SYBR Green เป็นสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ และสามารถดูแถบ DNA ที่เกิดขึ้นบนเจลภายใต้แสงยูวีได้เช่นกัน (สุกัญญา สุนทร, 2549)

2.6.5 การจำแนกชนิดพันธุ์หอยตลับด้วยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์

การใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ โดยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกหอยเป็นเทคนิคที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน โดยทั่วไปการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตสามารถทำได้โดยใช้ลักษณะจากภายนอก (morphology) แต่การจำแนกชนิดพันธุ์จากลักษณะภายนอกยังมีข้อจำกัดอยู่ ได้แก่ ผลของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างภายนอกไปตามสิ่งแวดล้อม (phenotypic plasticity) และความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variabilities) ของลักษณะที่ใช้ในการจำแนก อาจนำไปสู่การจำแนกชนิดพันธุ์ที่ผิดพลาดได้ ซึ่งการจัดจำแนกจากลักษณะภายนอกนั้นจะต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและต้องมีการเปรียบเทียบ ในปัจจุบันมีการนำความรู้ด้านอนุชีววิทยามาใช้ร่วมในการจัดจำแนกชนิด โดย ลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตมีลักษณะเฉพาะของแต่ละชนิดพันธุ์ ดังนั้นจึงใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้เป็นเครื่องมือที่ช่วยในการระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต และเป็นสิ่งจำเป็นที่นักอนุกรมวิธานสามารถนำไปใช้เพื่อสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้อง ปัจจุบันมีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถช่วยระบุตัวอย่างชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชนิด ทำให้พบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กที่มีความซับซ้อนที่ยากต่อการระบุชนิดพันธุ์โดยลักษณะสัณฐานวิทยา เพื่อลดความผิดพลาดในการระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งสามารถใช้ประยุกต์ในงานต่าง ๆ ได้เช่น ด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การจัดการทรัพยากร เป็นต้น (Herbert *et al.*, 2003) ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบระหว่างชนิดพันธุ์ ในปัจจุบันมีหลากหลาย เช่น 12S ribosomal RNA (12S rRNA), 18S ribosomal RNA (18S rRNA) Cytochrome b (*Cytb*), และ *COI* เป็นต้น

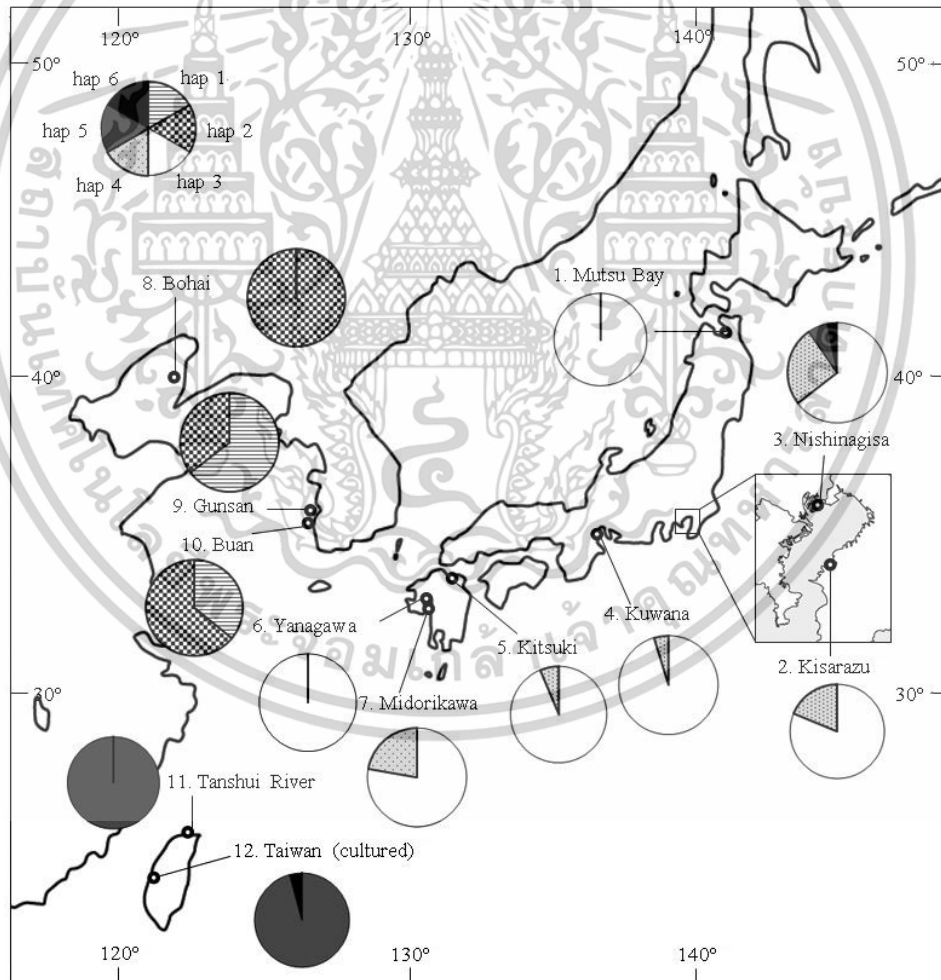
Hsiao *et al.* (2019) ศึกษาการจำแนกหอยตลับโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล จากตัวอย่างหอยตลับบริเวณปากแม่น้ำต้นสุ่ยที่ประเทศไต้หวัน เนื่องจากหอยตลับเป็นหอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีการเพาะเลี้ยงหอยตลับมาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน ซึ่งการระบุชนิดพันธุ์ของหอยตลับ โดยใช้เพียงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกนั้นเป็นไปได้ยาก โดย Hsiao *et al.* (2019) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *COI* พบว่าหอยตลับทั้งหมดที่เก็บรวบรวมได้บริเวณปากแม่น้ำต้นสุ่ย ที่มีลักษณะภายนอกคลุมเคลือกับหอยตลับชนิดพันธุ์อื่น (cryptic new species) เมื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic) ของหอยตัวอย่างเทียบกับข้อมูลตัวอย่างใน GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *M. meretrix* และ *M. pectecchalis* (รูปที่ 2.19) อีกทั้งหอยตลับ *Meretrix* sp. nov. ที่พบบริเวณบริเวณปากแม่น้ำต้นสุ่ยนั้นพบได้เฉพาะในประเทศไต้หวัน และทางตอนใต้ของประเทศจีนเท่านั้น



รูปที่ 2.19 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของหอยตลับ *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวันกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Meretrix* sp. ชนิดพันธุ์อื่น ๆ กับฐานข้อมูลใน NCBI ที่มา: Hsiao et al. (2019)

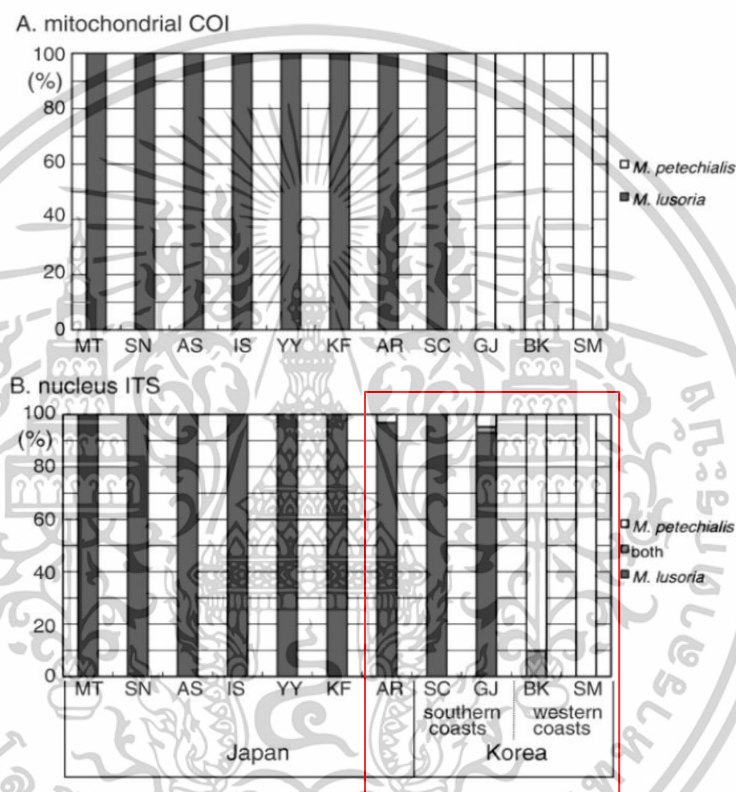
จากการศึกษาหอยตลับที่เป็นชนิดพันธุ์รุกรานชนิดพันธุ์ใหม่จากไต้หวันที่มีการนำเข้ามายังประเทศญี่ปุ่น เก็บตัวอย่างจากญี่ปุ่น จีน และไต้หวัน ทั้งหมดรวมพื้นที่ศึกษาทั้งหมด 12 สถานี โดยรวบรวมหอยตลับ *Meretrix* spp. สามชนิด คือ *M. lusoria*, *M. petechialis* และ *Meretrix* sp. มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR – RFLP และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งยีน COI ร่วมกับการตรวจสอบยีน *HincII* และ *AseI* เพิ่มเติมในการจัดจำแนกหอยตลับทั้ง 3 ชนิด พบว่า *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวัน มีสารพันธุกรรมแตกต่างจาก *M. lusoria* และ *M. petechialis* มีรูปแบบแอสพโพไลไทป์ทั้งหมด 6 แอสพโพไลไทป์ (รูปที่ 2.20) จากพื้นที่การศึกษาทั้ง 12 สถานี ไม่พบแอสพโพไลไทป์ร่วมกันในแต่ชนิด ยกเว้นตัวอย่างหอยตลับทางตอนเหนือของชายฝั่งของอ่าวโตเกียวที่มีแอสพโพไลไทป์ที่คล้ายกับ *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวัน นั้นเป็นเพราะว่าในปีค.ศ. 1920 มีการนำเข้า *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวัน เข้ามาในประเทศญี่ปุ่นตรงบริเวณนี้ เนื่องจาก *M. lusoria* ที่เป็นหอยตลับท้องถิ่นในประเทศญี่ปุ่นลดลง จากการถมทะเลครั้งใหญ่ รวมถึงปัญหามลพิษ แต่ความต้องการบริโภคหอยตลับในญี่ปุ่นเป็นที่นิยมมาก ๆ ในช่วงนั้น จึงมีการนำลูกพันธุ์ของ *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวันเข้ามาเพาะเลี้ยง จึงเป็นไปได้ว่าอาจจะมีการจัดการโรงเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม จึงทำให้มี *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวันถูกปล่อยหรือหลุดลงไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ที่เป็นแหล่งที่อยู่ของ

M. lurosia จึงทำให้มีการผสมพันธุ์กันระหว่างสองชนิดพันธุ์ เนื่องจากฤดูวางไข่ของทั้งสองมีความซ้อนทับกัน โดย *M. lurosia* จะมีฤดูวางไข่ในเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายน และ *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวันจะมีฤดูวางไข่ในเดือนเมษายนถึงเดือนพฤศจิกายน จึงเป็นไปได้ที่จะเกิดการผสมพันธุ์ระหว่างกัน นอกจากนี้ตัวอย่างหอยตลับตรงบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวโตเกียว ที่มีแฮพโลไทป์ 2 แฮพโลไทป์ที่เหมือนกับบริเวณอื่นในประเทศญี่ปุ่น ที่จำแนกชนิดพันธุ์เป็น *M. lurosia* แต่บริเวณนี้ได้มีทำการปล่อยลูกพันธุ์หอยตลับที่มาจากเพาะเลี้ยงในประเทศไต้หวัน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 แต่ไม่พบลักษณะแฮพโลไทป์ที่เหมือนกันกับ *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวัน ทั้งนี้จึงอาจเป็นไปได้ว่าจำนวนตัวอย่างหอยตลับจากบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวโตเกียว ที่นำมาวิเคราะห์ข้อมูลพันธุกรรมในครั้งนี้น้อยเกินไปที่จะตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรมกับ *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวัน ดังนั้นจึงควรที่จะเพิ่มจำนวนของตัวอย่างให้มากกว่าสถานีอื่น ๆ เพื่อดูว่าการมีอยู่ของ *Meretrix* sp. จากประเทศไต้หวันในบริเวณดังกล่าว (Yamakawa and Imai, 2013)



รูปที่ 2.20 แฮพโลไทป์ของหอยตลับ *Meretrix* sp. ที่เก็บได้จากเกาหลี จีน และไต้หวัน
ที่มา: Yamakawa and Imai (2013)

นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่ง COI ที่เป็นดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียและตำแหน่ง Internally transcribed spacer - 1 (ITS-1) ที่เป็นดีเอ็นเอในนิวเคลียส พบว่าจากการวิเคราะห์โดยใช้ COI (รูปที่ 2.21) ตัวอย่างหอยตลับจากญี่ปุ่น และชายฝั่งทางตอนใต้ของเกาหลี (SC) มีการระบุชนิดพันธุ์ทางพันธุกรรมเป็น *M. lusoria* ในขณะที่บริเวณอื่นของเกาหลีนั้น ระบุชนิดพันธุ์ทางพันธุกรรมเป็น *M. petechialis* การระบุชนิดพันธุ์ใช้ COI มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางลักษณะสัณฐานวิทยา



รูปที่ 2.21 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของ *M. lusoria* และ *M. petechialis* (A) การวิเคราะห์โดยใช้ mitochondrial COI และ (B) วิเคราะห์ด้วยการใช้ nucleus ITS-1
 ที่มา: ดัดแปลงจาก Torii *et al.* (2010)

แต่เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ ITS-1 พบว่าบริเวณ Ariake (AR) ประเทศญี่ปุ่นนั้นมีบางตัวอย่างถูกระบุชนิดพันธุ์ทางพันธุกรรมเป็น *M. petechialis* (รูปที่ 2.21) เป็นไปได้ว่าตัวอย่างหอยตลับจาก AR บางตัวอย่างที่เป็น *M. petechialis* แต่ถูกจัดจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงยีน COI ว่าเป็น *M. lusoria* แต่เมื่อใช้ยีน ITS-1 พบว่าบางตัวอย่างนั้นสามารถระบุชนิดเป็น *M. petechialis* และบริเวณชายฝั่งทะเลชายฝั่งทางตอนใต้ของเกาหลี (SC, GJ) การวิเคราะห์โดยใช้ ITS-1 ระบุชนิดพันธุ์ทางพันธุกรรมเป็น *M. lusoria* และ *M. petechialis* และตัวอย่างหอยตลับ GJ

ถูกระบุชนิดพันธุ์ทางพันธุกรรมเป็นหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์เช่นเดียวกันกับตัวอย่างจากทะเลชายชายฝั่งตะวันตกเกาหลี (BK) นี้แสดงให้เห็นได้ว่าอาจเกิดการผสมพันธุ์กันระหว่างหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์ แต่มีการสันนิษฐานว่า *M. lusoria* และ *M. petechialis* เป็นหอยท้องถิ่นบริเวณ GJ เนื่องจากมีรายงานการนำ *M. petechialis* ที่เป็นสัตว์น้ำท้องถิ่นในประเทศจีน และเกาหลี เข้ามายังประเทศญี่ปุ่น จึงคาดว่าอาจเป็นไปได้ที่จะมีการผสมพันธุ์กันระหว่างสองชนิดพันธุ์ *M. lusoria* และ *M. petechialis*

2.4.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรหอยตลับ

ในประเทศไทยมีการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยตลับ *M. meretrix* (Supmee *et al.*, 2020) เนื่องจากเป็นหอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และมีแนวโน้มว่าหอยตลับมีแนวโน้มลดลง ซึ่งการข้อมูลทางพันธุศาสตร์ สามารถนำมาใช้วางแผนในการอนุรักษ์ทรัพยากรหอยตลับได้ในอนาคต โดยในการศึกษาได้เก็บรวบรวมหอยตลับชนิดพันธุ์ *M. meretrix* ทั้งหมด 135 ตัวอย่าง จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง 7 พื้นที่ โดยบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย เป็น 5 พื้นที่ ได้แก่ ชลบุรี (CB) สมุทรสงคราม (SM) เป็นบริเวณอ่าวไทยตอนบน ชุมพร (CP) นครศรีธรรมราช (NS) และสุราษฎร์ธานี (SR) ฝั่งทะเลอันดามัน แบ่งออกเป็น 2 พื้นที่คือ สตูล (ST) และตรัง (TG) ในการศึกษาจะตรวจสอบด้วยการใช้ความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีน *COI* ในแต่ละตัวอย่าง แล้วจัดกลุ่มมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมที่ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ ฝั่งทะเลอันดามัน และฝั่งอ่าวไทย บริเวณพื้นที่ทะเลชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ ($\pi = 0.00045$ ถึง 0.00075) นั้นเป็นเพราะว่าการทำประมงหอยตลับ บริเวณอ่าวไทยตอนบนที่ผ่านมานั้นมีการใช้เครื่องมือที่เป็นเครื่องจักรในการทำประมง และจับหอยที่ไม่คำนึงถึงขนาด เป็นผลทำให้ประชากรหอยตลับลดลงจากการใช้ประโยชน์จนมากเกินไปกำลังการผลิตในธรรมชาติ และการที่โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร *M. meretrix* ถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ ฝั่งทะเลอันดามัน และฝั่งทะเลอ่าวไทย นั้นอาจมาจากเหตุผล 2 ประการ คือประการแรกฝั่งอ่าวไทยนั้นตั้งอยู่ในมหาสมุทรแปซิฟิก และฝั่งอันดามันอยู่ในมหาสมุทรอินเดีย โดยถูกคั่นด้วยคาบสมุทรไทย-มาเลเซีย ดังนั้นการถูกขวางกั้นนี้เป็นอุปสรรคทางภูมิศาสตร์จึงไม่มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (gene flow) ประการที่สอง ตัวอ่อนระยะแรกเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ เป็นตัวอ่อนที่ล่องลอยไปตามกระแสน้ำ และเริ่มลงเกาะลงในพื้นที่ท้องน้ำ ในช่วง 12 วัน ระยะเวลาที่ค่อนข้างสั้นในระยะตัวอ่อนนั้น อาจลดการแพร่กระจายของ *M. meretrix* และอาจลด gene flow ระหว่างพื้นที่ได้ เช่นเดียวกับ Suppapan *et al.* (2021) ศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของหอยตลับ *M. lyrata* ในประเทศไทย โดยตรวจสอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ทั้งหมด 145 ตัวอย่าง จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง 6 พื้นที่ โดยบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ได้แก่ ชุมพร (CP) สุราษฎร์ธานี (SR) และนครศรีธรรมราช (NS) ฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่ พังงา (PN) สตูล (ST) ตรัง (TG) จากการศึกษาพบว่า *M. lyrata* มีความ

หลากหลายของประชากรของหอยตลับ *M. lyrata* ทั้งฝั่งอ่าวไทย และฝั่งอันดามัน พบว่าประชากรหอยตลับฝั่งอันดามันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าฝั่งอ่าวไทย (สำหรับฝั่งอันดามันค่า $h=0.263$, $\pi=0.00063$ ในขณะที่ฝั่งอ่าวไทยมีค่า $h=0.029$ และ $\pi=0.00007$) และตัวอย่างประชากรจากฝั่งอ่าวไทย ได้แก่ประชากรจากสุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำมาก ($h=0.000$ และ $\pi=0.00000$) เป็นเพราะว่าทั้งสองพื้นที่ที่มีการทำประมงที่มากเกินไป จึงทำให้ random genetic drift และสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหอยตลับ *M. lyrata* ถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือทางฝั่งอ่าวไทย และฝั่งอันดามัน เนื่องจากมีปัจจัยทางภูมิศาสตร์ของภาคใต้ที่มีคาบสมุทรไทย-มาเลเซียคั่นระหว่างทะเลอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ขัดขวางการถ่ายเทของพันธุกรรม

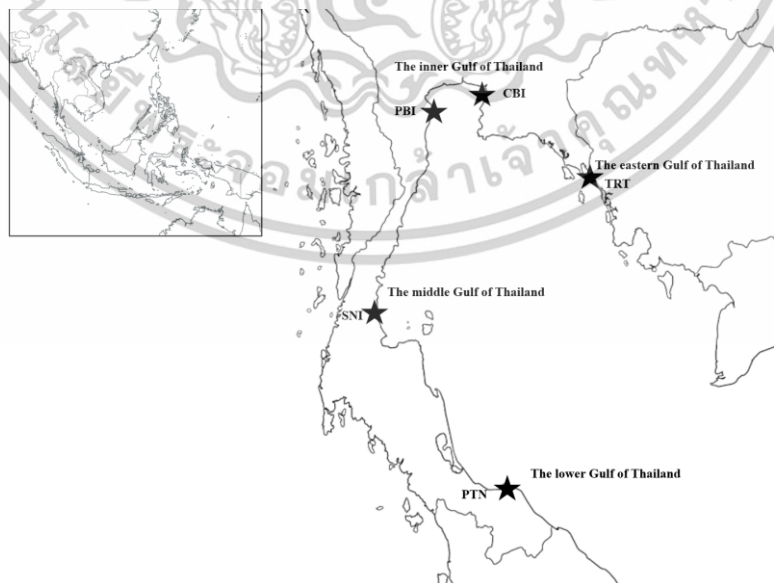


บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างและการแพร่กระจายของตลับ

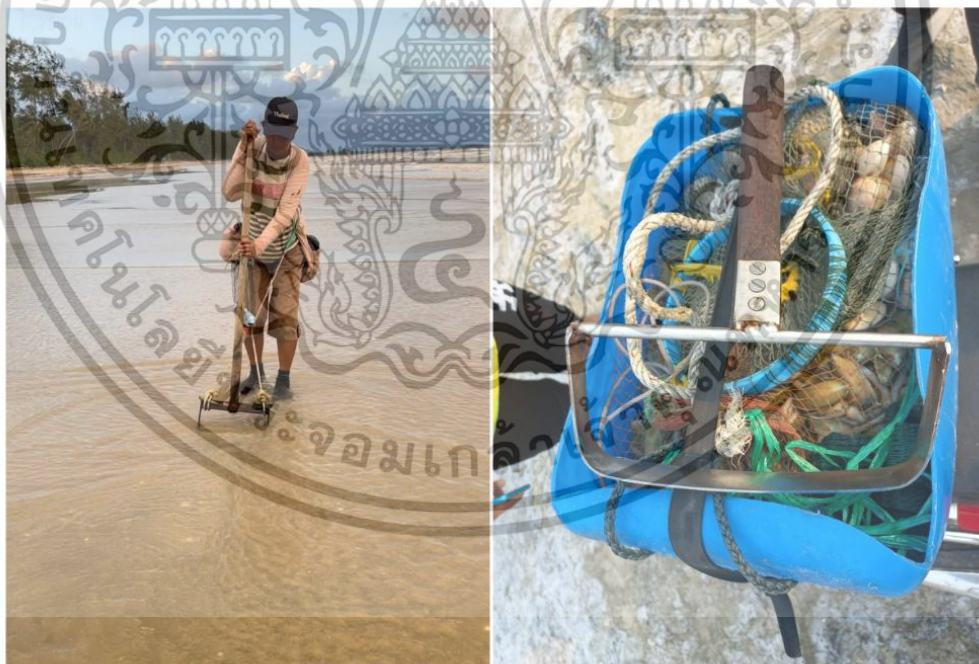
เก็บรวบรวมตัวอย่างหอยตลับบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย (รูปที่ 3.1) ตั้งแต่จังหวัดตราด (อ่าวไทยฝั่งตะวันออก) จังหวัดชลบุรี จังหวัดเพชรบุรี (อ่าวไทยตอนใน) จังหวัดสุราษฎร์ธานี (อ่าวไทยตอนกลาง) และจังหวัดปัตตานี (อ่าวไทยตอนล่าง) (ตารางที่ 3.1) เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนพฤษภาคม 2565 ถึงเดือน กรกฎาคม 2566 โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยตลับในพื้นที่ศึกษาช่วงน้ำทะเลลงต่ำสุด ใช้พลั่วขุดหาหอยความลึกประมาณ 5 – 10 เซนติเมตร การเก็บตัวอย่างในแต่ละจุดจะเว้นระยะห่างประมาณ 50 เมตร และมีการรวบรวมตัวอย่างจากชาวประมงพื้นบ้านที่มีการทำประมงหอยตลับบริเวณพื้นที่ศึกษา (รูปที่ 3.2) หลังจากนั้นนำตัวอย่างหอยตลับที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดมาจัดจำแนกชนิด ตาม Huber (2010) และ Yoosukh and Matsukuma (2001) แล้วคัดแยกหอยแต่ละชนิดพันธุ์ออกเป็นกลุ่มตามลักษณะสีและลวดลายของเปลือกหอยตลับภายนอก เพื่อนำมาวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งหมด และจากนั้นเลือกหอยตลับในแต่ละกลุ่ม มาอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง ในแต่ละชนิดพันธุ์ เก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยตลับบริเวณเท้า (foot) และกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) ด้วย 95% alcohol ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตรและเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม



รูปที่ 3.1 บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างหอยตลับ *Meretrix* spp. บริเวณอ่าวไทย

ตารางที่ 3.1 สถานีเก็บตัวอย่างหอยตลับที่ใช้ในการศึกษา บริเวณอ่าวไทย

อักษรย่อ	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด	วิธีการเก็บตัวอย่าง
TRT	ต.แหลมกลัด อ.เมือง จ.ตราด	12.152247014461716, 102.62496700948998	ประมงพื้นบ้าน
CBI	ต.แสนสุข อ.เมือง จ. ชลบุรี	13.274411302166982, 100.92082039685077	ประมงพื้นบ้าน
PBI	ต.แหลมผักเบี้ย อ. บ้านแหลม จ. เพชรบุรี	13.091522913183368, 100.06190871485632	ประมงพื้นบ้าน
SNI	ต.ท่าชนะ อ.ท่าชนะ จ. สุราษฎร์ธานี	9.620129310542286, 99.21149446531216	ประมงพื้นบ้าน และการ สุ่มเก็บตัวอย่าง
PTN	จังหวัดปัตตานี	6.512909415672954, 101.80546471074518	ตลาดสดเทศบาลเมือง นราธิวาส ประมงพื้นบ้าน

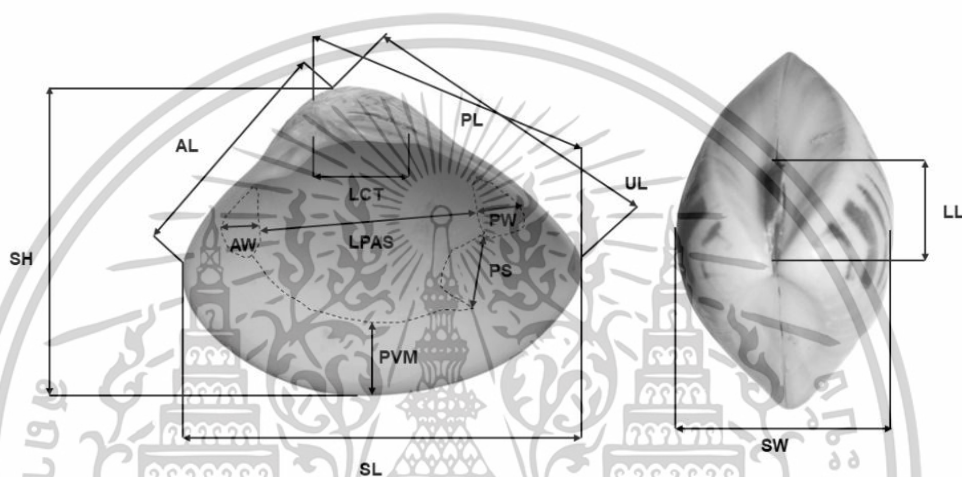


รูปที่ 3.2 อุปกรณ์การทำประมงหอยตลับของชาวประมงพื้นบ้าน (A) การทำประมงหอยตลับบริเวณ
สุราษฎร์ธานี (B) คราดหอยเครื่องมือประมงหอยตลับจังหวัดเพชรบุรี

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก

3.2.1 การศึกษาลักษณะภายนอก (external morphology)

นำหอยที่จัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยตลับแต่ละชนิดพันธุ์ จากการแบ่งกลุ่มของลักษณะของผิวเปลือก สีของเปลือก ลายแถบบนสีเปลือก ไปวัดขนาดความสูง ความยาว และความหนาของเปลือก (มิลลิเมตร) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ และทำการชั่งน้ำหนักรวมทั้งหมด ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง



รูปที่ 3.3 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดหอยตลับของเปลือกด้านขวา 13 ตำแหน่ง (SL=shell length; SH=shell height; SW=shell width; LL=ligament length; UL=umbo length; PL=posterior length; AL=anterior length; LCT=length of cardinal tooth; AW=anterior adductor scar width; PW=posterior adductor scar width; LPAS=length of posterior adductor scar to anterior adductor scar; PVM= pallial line scar to ventral margin; PS= pallial sinus length)

3.3.2 การวิเคราะห์ห้มอร์โฟเมตริก

3.3.2.1 การวัดลักษณะเชิงตัวเลข (Traditional Morphometrics)

นำตัวอย่างเปลือกหอยมาวัดลักษณะต่าง ๆ ของเปลือกภายใน และลักษณะของเปลือกส่วนอื่นๆตามวิธีของ Hamli *et al.* (2016) ได้แก่ วัดลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกภายในและภายนอก ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง (รูปที่ 3.3) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ แล้วนำข้อมูลที่วัดจากแต่ละตำแหน่งมาหารด้วยความยาวของเปลือก (SL) จากนั้นนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยระหว่างกลุ่มที่แบ่งตามสีและลวดลายข้างต้น จากการ

ตรวจสอบในเบื้องต้นพบว่าข้อมูลแต่ละกลุ่มมีการแจกแจงแบบปกติและมีความแปรปรวนเท่ากันจึงใช้ one way analysis of variance (ANOVA) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างในทุกกลุ่ม จากนั้นหาความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่แยกตามลักษณะสัญญาณวิทยาของเปลือกหอยโดยใช้ Tukey's test ด้วยโปรแกรม SPSS และจัดกลุ่มความคล้ายคลึงของลักษณะที่ใช้จำแนกและชนิดพันธุ์โดยใช้ Principal Component Analysis (PCA) เพื่อหาความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างระหว่างหอยตลับในแต่ละชนิดพันธุ์โดยใช้ โปรแกรม R

ตารางที่ 3.2 การอธิบายตำแหน่งในการวัดตำแหน่งลักษณะสัญญาณวิทยาของหอยตลับ

ชื่อตำแหน่งในการวัดภาษาไทย	ชื่อตำแหน่งในการวัดภาษาอังกฤษ	ตัวอักษรย่อ	อธิบายการวัด
ความยาวของเปลือก	shell length	SL	วัดจากจุดที่ยาวที่สุดในแนวหน้าถึงแนวหลัง ของเปลือก
ความสูงของเปลือก	shell height	SH	วัดจากจุดที่สูงที่สุดในแนวนจนถึงด้านล่างของเปลือก
ความหนาของเปลือก	shell width	SW	วัดจากขอบเปลือกด้านหนึ่งถึงอีกด้านหนึ่งในจุดที่หนาที่สุด
ความยาวของเอ็นบานพับ	ligament length	LL	วัดตามแนวเส้นตรงที่เชื่อมระหว่างจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของเอ็นบานพับ
ความยาวจากจุดยอดของเปลือกหอยถึงขอบของเปลือกหอย	umbo length	UL	วัดระยะจากจุดอัมโบซึ่งเป็นจุดที่ยื่นขึ้นมาบนเปลือกหอยไปยังขอบของเปลือกหอย
ความยาวด้านหลังของเปลือก	posterior length	PL	วัดความยาวในแนวตรงจากตำแหน่งบานพับไปถึงขอบเปลือกด้านหลัง
ความยาวด้านหน้าของเปลือก	anterior length	AL	วัดในแนวตรงจากจุดฐานบานพับด้านหน้าไปยังขอบเปลือกด้านหน้าของหอย
ความยาวของฟันกลาง	length of cardinal tooth	LCT	วัดจากจุดเริ่มต้นของฟันไปยังปลายสุดของฟันที่ยื่นออกมา
ความกว้างของรอยยัดกล้ามเนื้อยึดฝาด้านหน้า	anterior adductor scar width	AW	วัดจากจุดตรงกว้างที่สุดโดยเริ่มจากจุดภายในรอยยัดกล้ามเนื้อด้านหน้าไปยังขอบด้านหลังของรอยยัดกล้ามเนื้อยึดฝาด้านหน้าของเปลือก

ตารางที่ 3.2 การอธิบายตำแหน่งในการวัดตำแหน่งลักษณะสัญญาณวิทยาของหอยตลับ (ต่อ)

ชื่อตำแหน่งในการวัดภาษาไทย	ชื่อตำแหน่งในการวัดภาษาอังกฤษ	ตัวอักษรย่อ	อธิบายการวัด
ความกว้างของรอยยึดกล้ามเนื้อยึดฝาด้านหลัง	posterior adductor scar width	PW	วัดจากจุดตรงกว้างที่สุดโดยเริ่มจากจุดภายในรอยกล้ามเนื้อด้านหน้าไปยังขอบด้านหลังของรอยยึดกล้ามเนื้อยึดฝาด้านหลังของเปลือก
ความยาวระหว่างรอยยึดกล้ามเนื้อยึดฝาด้านหลังไปยังรอยยึดกล้ามเนื้อฝาด้านหน้า	length of posterior adductor scar to anterior adductor scar	LPAS	วัดจากรอยยึดกล้ามเนื้อยึดฝาด้านหลังไปยังรอยยึดกล้ามเนื้อฝาด้านหน้าในแนวเส้นตรง
ความยาวของระยะห่างจากเส้นพัลเลียมไปยังขอบด้านล่างของเปลือก	pallial line scar to ventral margin	PVM	วัดจากขอบตรงกลางด้านล่างของเปลือกที่เป็นส่วนที่กว้างที่สุดมายังเส้นพัลเลียม
ความยาวของรอยเว้าพัลเลียม	pallial sinus length	PS	วัดตรงจุดเส้นพัลเลียมแตกออกเป็นรอยเว้าพัลเลียมซึ่งอยู่ใกล้บริเวณรอยยึดกล้ามเนื้อยึดฝาด้านหลังไปถึงปลายลึกที่สุดของรอยเว้า

3.3.2.2 การวิเคราะห์เชิงรูปร่าง (geometric morphometrics)

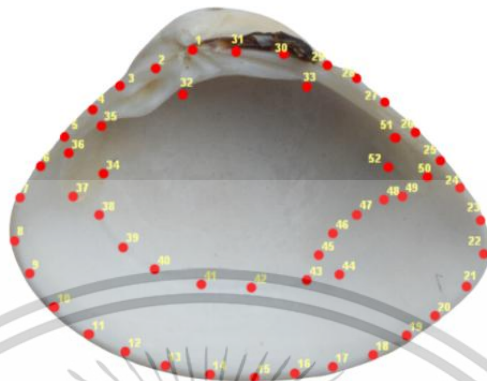
นำตัวอย่างเปลือกหอยตลับ *M. meretrix* 57 ตัว และ *M. astricta* 110 ตัว มาถ่ายภาพ และวัดลักษณะต่าง ๆ ของเปลือกภายในโดยการกำหนดตำแหน่ง (landmark) แทนการวัดระยะ แล้วนำไปศึกษาการจัดกลุ่มตามรูปร่าง (shape) ด้วย canonical variate analysis (CVA)

โดยนำตัวอย่างเปลือกหอย มาถ่ายรูปรูปเปลือกหอยด้านขวา โดยการสังเกตลักษณะของเปลือกหอยด้านขวาหรือด้านซ้ายนั้น เมื่อมองจากลักษณะภายนอกให้วางเอ็นบานพับหรือ อัมโบหันขึ้นไปด้านบน และขอบที่ปิดเปลือกหอยไว้ด้านล่าง และถ้ามองข้างล่าง แล้วจุดอัมโบหันออกไกลจากตัว (ด้านหน้า- ด้านหลัง) โดยที่ฝาด้านขวาจะอยู่ทางด้านขวาของเรา และฝาด้านซ้ายจะอยู่ทางด้านซ้ายของเรา จากนั้นใช้กล้องถ่ายรูปดิจิทัลรุ่น DSLR NIKON D5300 พร้อมขาตั้งกล้องเพื่อยึดติดกล้องไว้กับที่ ให้มีตำแหน่งและระยะห่างระหว่างภาพเท่ากัน หันเลนส์กล้องเข้าหาเปลือกหอย การ

ถ่ายภาพตัวอย่างต้องเห็นภายในเปลือกของตัวอย่างชัดเจน จึงใช้ดินน้ำมันรองใต้ฐานเพื่อยึดเปลือกหอย และกำหนดจุด landmark ที่สำคัญ 1 จุด สำหรับวางตัวอย่างหอยตลับทุกตัวอย่างให้ตรงกัน ทำให้ได้ตำแหน่ง landmark ที่แม่นยำและเสมอ ทุกภาพจะต้องมีไม้บรรทัดวางให้เห็นในภาพ เพื่อใช้วัด Centroid size ที่เป็นสิ่งสำคัญในการวิเคราะห์ข้อมูล เมื่อถ่ายรูปหอยตลับทั้งหมดแล้ว จะเก็บตัวอย่างรูปถ่ายไว้ในโฟลเดอร์เดียวกัน โดยไฟล์ภาพเปลือกหอยตลับแต่ละตัวอย่างที่บันทึกไว้จะเป็นสกุล .JPEG หลังจากนั้นนำไฟล์รูปไปแปลงเป็น .TPS โดยการสร้างไฟล์ข้อมูลในโปรแกรม tpsUtil เพื่อที่จะได้สะดวกในการเก็บข้อมูลของภาพทุกภาพที่มี โดยการเปิด tpsUtil เลือก Build file from images สำหรับ Input ให้เลือก folder ที่เก็บภาพไว้ output จากนั้นเข้าโปรแกรม tpsDig2 แล้วเปิดไฟล์ .TPS ที่เตรียมไว้เพื่อจะทำการลง landmark โดยก่อนที่จะลง landmark ควร set scale ก่อนเพื่อป้องกันการลืมนลง การ set scale ต้องทำการ set scale สำหรับทุกรูปของตัวอย่าง เพื่อว่าระยะแต่ละตัวอย่างจะแตกต่างกันเล็กน้อย จากนั้นทำการ landmark จุด โดยตำแหน่งที่ลงจุดนั้นทั้งหมด 52 จุด (รูปที่ 3.4) โดยลงจุดเริ่มต้นจากบริเวณอัมโบมาลัยรอบขอบเปลือกขวาจนรอบเปลือกนอกจากบริเวณรอบของเปลือกแล้วยังวาง landmark ตรง cardinal tooth รวมถึง ตรง anterior adductor scar ลงมายังตาม เส้น pallial และ pallial sinus จนถึง posterior adductor scar เมื่อทำการวางจุด landmark ในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างเรียบร้อยทำการบันทึก และข้อมูลตัวอย่างที่ทำการ landmark ต้องเชื่อมกันกับ Excle file เช่นรูปตัวอย่างหอยตลับที่ทำการลง landmark ตัวที่ 1 กับรหัสตัวอย่างใน Excle file ที่บันทึกชนิด สถานที่เก็บตัวอย่าง ตัวที่ 1 ต้องตรงกันเพื่อการวิเคราะห์ในขั้นตอนการวิเคราะห์ต่อในโปรแกรม MorphoJ จะได้ตรงกัน และทำการบันทึกข้อมูลใน Excle file เป็นสกุล .CSV

เมื่อทำการ landmark ตัวอย่างครบทุกตัวอย่างแล้ว นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความผันแปรของรูปร่างภายนอกเปลือกและภายในเปลือกระหว่างชนิดด้วยโปรแกรม MorphoJ โดยโปรแกรม MorphoJ เป็นโปรแกรมที่นำข้อมูลที่เป็นที่สกุล .TPS มาใช้ และเป็นกรวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างของเปลือกหอยตลับ โดยทำการนำข้อมูลจากการทำ landmark เป็นสกุล .TPS เข้ามายังโปรแกรมเป็นข้อมูล new Data set และจากนั้นนำข้อมูลที่ Excel file ที่เป็น .CSV เข้ามาเนื่องจากในไฟล์ .TPS มีแค่ชื่อตัวอย่าง และใน Excel file จะมีรายละเอียดต่าง ๆ ของตัวอย่างไว้ด้วยทำให้เมื่อลงไฟล์ทั้งสองลงใน MorphoJ จะได้มีการอ่านไฟล์ทั้งสองคู่กัน หลังจากนั้นจะเป็นการ ทำการ alignment โดยใช้ Procrustes superimposition เพื่อปรับข้อมูลให้อยู่ในทิศทางเดียวกัน หลังจากนั้นจะทำการเชื่อมจุด landmark ในลักษณะโครงสร้างแบบกรอบ (wireframe) เป็นการกำหนดลำดับของการเชื่อมระหว่างจุด landmark เพื่อสร้างแผนภาพที่ช่วยในการแสดงผล หลังจากนั้นจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลรูปร่างที่ได้จากการวัดจุดสังเกต (landmarks) บนเปลือกหอยโดยวิเคราะห์ CVA

ซึ่ง CVA จะช่วยแปลงข้อมูลเหล่านี้ให้อยู่ในรูปของแกนใหม่ (canonical variates) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มหอยแต่ละชนิดพันธุ์ได้ หากลักษณะสัณฐานมีความแตกต่างกัน



รูปที่ 3.4 การวางตำแหน่ง (Landmark) 52 ตำแหน่งบนเปลือกหอยตลับด้านขวาในโปรแกรม tpsDig2

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อในส่วน mantle หรือ เนื้อเยื่อตรง adductor ที่เก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% ที่เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใช้เนื้อเยื่อ 10 มิลลิกรัมมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol – Chloroform โดยทำการตัดเนื้อเยื่อประมาณ 10 – 20 มิลลิกรัม ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ผสม SDS-Lysis buffer 200 ไมโครลิตร กับ proteinase K 0.5 ไมโครลิตรสำหรับ 1 ตัวอย่าง แล้วบ่มไว้ในเตาให้ความร้อนแบบหมุน 50 องศาเซลเซียส บ่มข้ามคืน แล้วตรวจสอบคุณภาพว่าเนื้อเยื่อถูกย่อยหมด กำจัดโปรตีนและเศษเซลล์ออกโดยการเติม phenol-chloroform 100 ไมโครลิตร แล้วผสมด้วยเครื่องเขย่าผสมสารให้เข้ากัน (vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 150 ไมโครลิตรที่เป็นส่วนใสลงในหลอดใหม่ เติม chloroform 100 ไมโครลิตร ผสมด้วยมือ ปั่นเหวี่ยงที่ 15000 รอบ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที ย้ายส่วนบน 110 ไมโครลิตรไปหลอดใหม่ เติม 4M NaCl 25 ไมโครลิตร และ 100% ethanol ผสมด้วยมือปั่น เหวี่ยงที่ 15000 รอบ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งทั้งหมดโดยใช้ปิเปต เติม 75% ethanol 200 ไมโครลิตร เหวี่ยงที่ 15000 รอบ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งทั้งหมดโดยใช้ปิเปตแล้วตากให้แห้ง 30 นาที เติมน้ำ Dnase free water 50 ไมโครลิตร การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยใช้ 1.5 % agarose Gel Electrophoresis ตรวจสอบแถบจีโนมิกดีเอ็นเอบนแผ่น agarose gel โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เก็บรักษาที่ตู้เย็น 4 องศา เพื่อใช้ทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

นอกจากนี้ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการสกัด ด้วย Phenol – Chloroform ได้ ก็ยังมีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Kit ด้วยชุด Qiagen® DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, California, USA) และปฏิบัติตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของชุด Kit

เมื่อได้ดีเอ็นเอต้นแบบและจะนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน *COI* ที่ mitochondria DNA ด้วยเทคนิค PCR เพื่อวิเคราะห์ชนิดพันธุ์ของหอยตลับในแต่ละรูปแบบ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *COI* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') และ HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994) ในปฏิกิริยา 20 μ L จะประกอบด้วย PCR buffer (10X) 2 μ L $MgCl_2$ (2.5mmol/L) 2 μ L dNTPs (2.5mmol/L) 2 μ L i-Taq™ DNA Polymerase (5U/ μ L) 0.2 μ L (Intron, Korea), ไพรเมอร์ forward และ reverse 10 pmol/ μ L 0.5 – 1 μ L (Macrogen, Korea) และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 1-2 μ L เพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง QIAmplicon™ 96 (Germany) ที่ควบคุมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ดังนี้ initial denaturation step (เริ่มต้นการแยกสายดีเอ็นเอ) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที denaturation step (การแยกสายดีเอ็นเอ) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที annealing step (ลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 วินาที extension step (เพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension step (อุณหภูมิสุดท้ายเพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอ หรือ PCR product ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ

ตัวอย่างหอยตลับที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จจะมีการปรับ condition โดยการทำ gradient temperature ในการทำ PCR โดยการตั้งค่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ถึง 50 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการจับคู่ไพรเมอร์ (annealing temperature) อีกทั้งยังมีการปรับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 1 – 5 μ L และปรับปริมาณไพรเมอร์โดยจะใช้ปริมาณ 0.5 – 1 μ L สำหรับตัวอย่างที่ยังทำ PCR ไม่สำเร็จ ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนบริเวณอื่นในตำแหน่ง mitochondria DNA คือ ยีน *Cytb* โดย ใช้คู่ไพรเมอร์ *Cytb-F* (5'- TCTCTATAAGCCATTCTACAAAAG-3') และ *Cytb-R* (5'- TTAATGAGTCAAGATGTAGT-3') นอกจากนี้ยังใช้ยีน 16S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ 16S_arL, 16S_brH 16S_ANNF, 16S_ANNR และยีน 18S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ที่ Myt18S F (5'- CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT -3') Myt18S R (5' - CACCTCTAACACCGTAATACGA -3') DtCed18S (5'- CACCTCTCSCGCCGCARTACGT -3') BIVALVE1F (5' -TCTAG AGCTAATACAT GC -3') และ BIVALVE 1R (5'- ATAGGKCAGACAYTTGAAAG -3') และถ้าหากยังทำ PCR ไม่สำเร็จได้ทำการปรับ condition PCR เช่นเดียวกับที่ทำในยีน *COI*

ตัวอย่าง PCR product ที่เพิ่มปริมาณสำเร็จแล้วได้ถูกส่งไปทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA purification) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่บริษัท Gibthai Co.,Ltd. (Thailand) เมื่อได้รับผลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทด์ ในโปรแกรม CodonCode Aligner (Richterich, 2004) และ MEGAX (Kumar et al., 2018) จากนั้นตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้การ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) ที่ใช้หาความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุชนิดพันธุ์ โดยจะแสดงผลให้เห็นถึง query coverage และ percent identity หากมีค่าที่สูงแสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมีความใกล้เคียงกับชนิดพันธุ์นั้นๆ ในฐานข้อมูลใน NCBI หลังจากนั้นหาจำนวนแฮพโลไทป์ของตัวอย่างหอยตลับที่รูปแบบในโปรแกรม DnaSP version 6 (Rozas et al., 2017) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทป์แต่ละแฮพโลไทป์ ไปบันทึกในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้ Bankit และคำนวณหา Nucleotide divergence ด้วยโปรแกรม MEGAX (Kumar et al., 2018) เพื่อตรวจสอบระยะทางพันธุกรรมระหว่างหอยตลับ *Meretrix* spp. แต่ละชนิดพันธุ์

วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยตลับ *Meretrix* spp. โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI โดยมีการรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Meretrix* spp. ทุกชนิดพันธุ์ในฐานข้อมูล NCBI และตัวอย่าง *Meretrix* แต่ละแฮพโลไทป์ในการศึกษานี้ รวมถึงเลือกหอยสองฝาชนิดพันธุ์อื่น คือ *Mercenaria mercenaria* ซึ่งเป็นหอยในครอบครัว Veneridae ซึ่งเป็นหอยในครอบครัวเดียวกับ *Meretrix* spp. มาเป็น outgroup แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มา alignment ตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโมเดล ClustalW ในโปรแกรม MEGA11 (Kumar et al., 2018) หลังจากนั้นนำลำดับที่ผ่านการ alignment แล้วมาประเมินโมเดลที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ โดยใช้ jModelTest (Posada, 2008) ตาม Akaike information Criterion corrected for small sample sizes (AICc) ซึ่งโมเดลที่คัดเลือกมาที่ดีที่สุด ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ ในการศึกษารั้งนี้คือ Tamara- Nei model + Gamma distribution parameter เมื่อได้โมเดลแล้วนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ ด้วยวิธี maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA11 (Kumar et al., 2018) ใช้ repeated test ทั้งหมด 1,000 bootstraps

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การแพร่กระจายของหอยตลับ *Meretrix spp.*

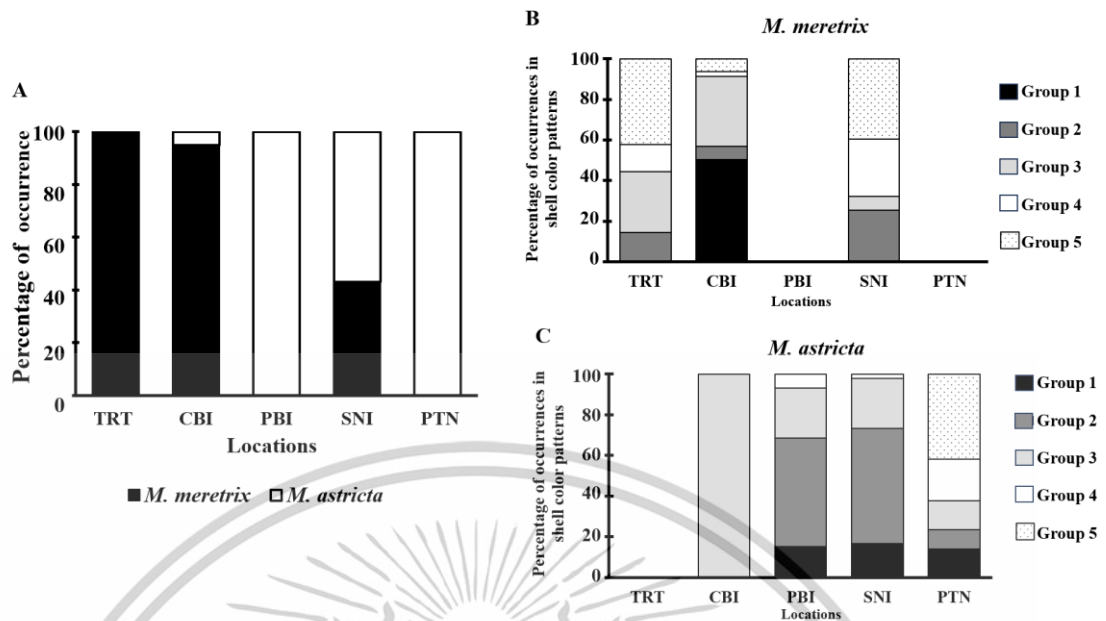
ตัวอย่างหอยตลับ *Meretrix spp.* บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย 5 จังหวัด ได้แก่ ตรัง ชลบุรี เพชรบุรี สุราษฎร์ธานี และปัตตานี จากการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บตัวอย่าง และจากชาวประมงพื้นบ้านในพื้นที่ มีจำนวนที่พบทั้งหมด 787 ตัวอย่าง มี ซึ่งจำนวนตัวอย่างที่พบในหอยตลับแสดงในตารางที่ 4.1 โดยตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานีนั้น มีการเก็บตัวอย่างได้มากที่สุด คิดเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากได้ตัวอย่างทั้งชาวประมงพื้นบ้านและการสุ่มเก็บตัวอย่าง ซึ่งจากตัวอย่างในจังหวัดปัตตานีได้ตัวอย่างหอยตลับที่น้อยที่สุดคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเก็บจากชาวประมงพื้นบ้านเพียงอย่างเดียว อีกทั้งจำนวนหอยในพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างมีปริมาณน้อย นอกจากลักษณะพื้นที่ชายหาดที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ อาจส่งผลให้จำนวนหอยตลับที่พบเจอนั้นแตกต่างกันได้แล้ว การเก็บตัวอย่างในครั้งนี้ยังใช้เครื่องมือประมงในการหาหอยตลับที่มีประสิทธิภาพต่างกันตามพื้นที่ทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาณหอยที่พบในแต่ละพื้นที่ให้เท่ากันได้ โดยจากการศึกษาของ Leitão *et al.* (2025) ทำการพัฒนาแบบจำลองและใช้ในการทำนายปริมาณสัตว์น้ำที่จับจากเครื่องมือประมงที่หลากหลายในการทำประมงชายฝั่งในโปรตุเกส โดยอ้างอิงจากข้อมูลการจับสัตว์น้ำที่ขึ้นฝั่ง ซึ่งรวมถึงชนิดของสัตว์น้ำ ท่าเรือ และช่วงเวลาของปี พบว่าเครื่องมือประมงที่ต่างกันมีผลอย่างมากต่อปริมาณสัตว์น้ำ รวมถึงหอยสองฝา โดยเฉพาะคราดลากหอย (bivalve dredge) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ทำนายได้แม่นยำที่สุดในโมเดล และมีความเฉพาะเจาะจงสูงในการจับหอย มีอัตราการทำนายที่ถูกต้องเกือบ 100% ซึ่งปริมาณการจับได้ต่างจากการใช้เครื่องมือประมงและการจับหอยสองฝาแบบดั้งเดิม เช่น การเก็บด้วยมือ (handpicking) การขุด (digging) และการใช้จวนจับหอย (clam net) หรือการใช้เครื่องมือพื้นบ้าน เช่น มิต สิว ตะกร้าหวาย ไม้ไผ่ หน้ากากดำน้ำ และเรือไม้ขนาดเล็ก (dinge) พบว่าการเก็บด้วยมือและขุดเหมาะกับหอยที่อยู่ตื้นหรือฝังในโคลนตื้นๆ มีประสิทธิภาพดีในพื้นที่ที่หอยกระจุกตัวหนาแน่น การใช้จวนจับหอย สามารถจับหอยได้จำนวนมากในเวลาสั้น เหมาะกับพื้นที่น้ำตื้นและหอยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และสำหรับสำหรับหอยนางรมและหอยแมลงภู่ การใช้เครื่องมืออย่าง มิตหรือสิวในการแซ่หอยจากวัสดุเกาะยึด มีประสิทธิภาพขึ้นกับความชำนาญและสภาพพื้นที่ นี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงหรือเหมาะสมกับพื้นที่ จะช่วยให้จับหอยได้จำนวนมากและหลากหลายขนาด เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพต่ำหรือไม่เหมาะสมกับพื้นที่ จะจับหอยได้น้อยหรือจับได้เฉพาะบางขนาด และความแตกต่างของเครื่องมือและวิธีการในแต่ละพื้นที่ ส่งผลให้จำนวนหอยที่จับ

ได้แตกต่างกันอย่างชัดเจน (Lagade and Muley, 2018) ทั้งนี้ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น คุณภาพน้ำ ฤดูกาล และกิจกรรมมนุษย์ในพื้นที่ อาจมีผลกระทบต่อความหนาแน่นของประชากรหอยตลับได้เช่นกัน (Jayawickrema and Wijeyaratne, 2009; Morton *et al.*, 2021)

ตารางที่ 4.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างหอยตลับที่พบเจอบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด

พื้นที่เก็บตัวอย่าง (ตัวย่อ)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (ตัว)	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (%)
ตราด (TRT)	140	17
ชลบุรี (CBI)	146	19
เพชรบุรี (PBI)	159	20
สุราษฎร์ธานี (SNI)	249	32
ปัตตานี (PTN)	93	12
รวม	787	100

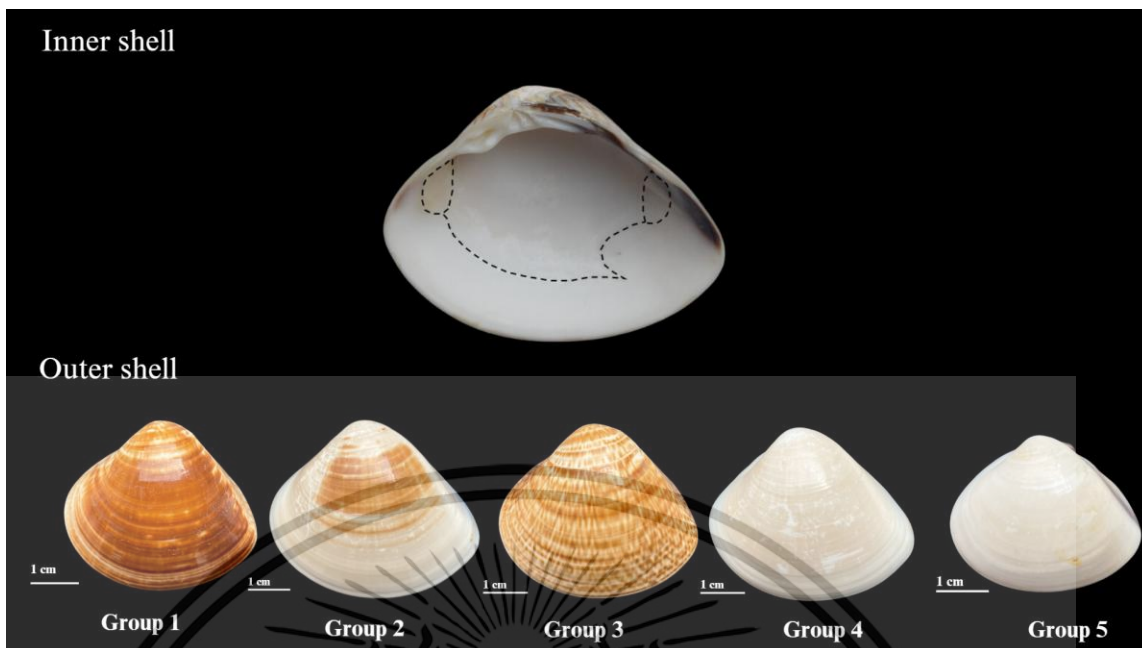
การจำแนกชนิดพันธุ์จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยดูจากลักษณะของเปลือกภายนอกตาม Yoosukh and Matsukuma (2001) พบว่ามีหอยตลับสองชนิดพันธุ์ ได้แก่ *Meretrix meretrix* และ *Meretrix astricta* (รูปที่ 4.1A) โดยพบว่าบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ได้แก่จังหวัดตราด พบเจอ *M. meretrix* เพียงชนิดเดียว คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ บริเวณอ่าวไทยตอนใน ได้แก่จังหวัดชลบุรี สามารถพบเจอได้ทั้งสองชนิด โดยพบเจอ *M. meretrix* เป็นส่วนใหญ่คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และ *M. astricta* จะพบเจอน้อยกว่าคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ในจังหวัดเพชรบุรีนั้น พบเจอแต่ *M. astricta* เพียงชนิดเดียว คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และจะเห็นได้ว่า *M. meretrix* ที่พบเจอบริเวณอ่าวไทยตอนใน เจอในจังหวัดชลบุรีแต่ไม่พบเจอในจังหวัดเพชรบุรี ในส่วนของอ่าวไทยตอนกลาง ได้แก่ สุราษฎร์ธานี สามารถเจอได้ทั้งสองชนิด โดย *M. meretrix* คิดเป็น 43 เปอร์เซ็นต์ และ *M. astricta* คิดเป็น 53 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง เจอ *M. astricta* เพียงชนิดเดียวคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.1 การแพร่กระจายของ *M. meretrix* และ *M. astricta* บริเวณอ่าวไทย (A) สัดส่วนหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์ที่พบเจอในบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด (B) สัดส่วน *M. meretrix* ที่พบเจอในบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด และ (C) สัดส่วน *M. astricta* ที่พบเจอในบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยตลับจากบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัดโดยใช้ลักษณะของเปลือกภายในและ ภายนอก รวมถึงขนาดความสูง ความยาว และความหนาของเปลือก รวมถึงสี และสวดลายของเปลือก พบว่า *M. meretrix* มีลักษณะของเปลือกภายในแสดงให้เห็นถึง anterior และ posterior adductor scar มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ และ posterior adductor scar จะมีขนาดที่ใหญ่กว่า anterior adductor scar เพียงเล็กน้อย pallial sinus ของหอยตลับชนิดพันธุ์นี้เป็นมีลักษณะที่โค้งเว้าลึกเข้าไปจนทำให้มีลักษณะที่คล้ายกับกับตะขอ (projecting horn) ส่วนลักษณะของเปลือกภายนอกนั้นพบว่ารูปแบบที่สีเปลือกมีความแตกต่างกันถึง 5 กลุ่ม (รูปที่ 4.2)

- 1) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มไปจนน้ำตาลสีเทาสดและมีสีขาวเพียงเล็กน้อยตรงเส้นการเติบโต
- 2) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีขาวมีสีน้ำตาลที่เป็นริ้วโค้งบนเปลือกขนาดใหญ่
- 3) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีขาวและมีลายเป็นซิกแซกสีน้ำตาล
- 4) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีขาว
- 5) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีขาวและมี escutcheon เป็นสีดำ



รูปที่ 4.2 ลักษณะของเปลือกภายในและรูปแบบของสีเปลือกภายนอก *M. meretrix*

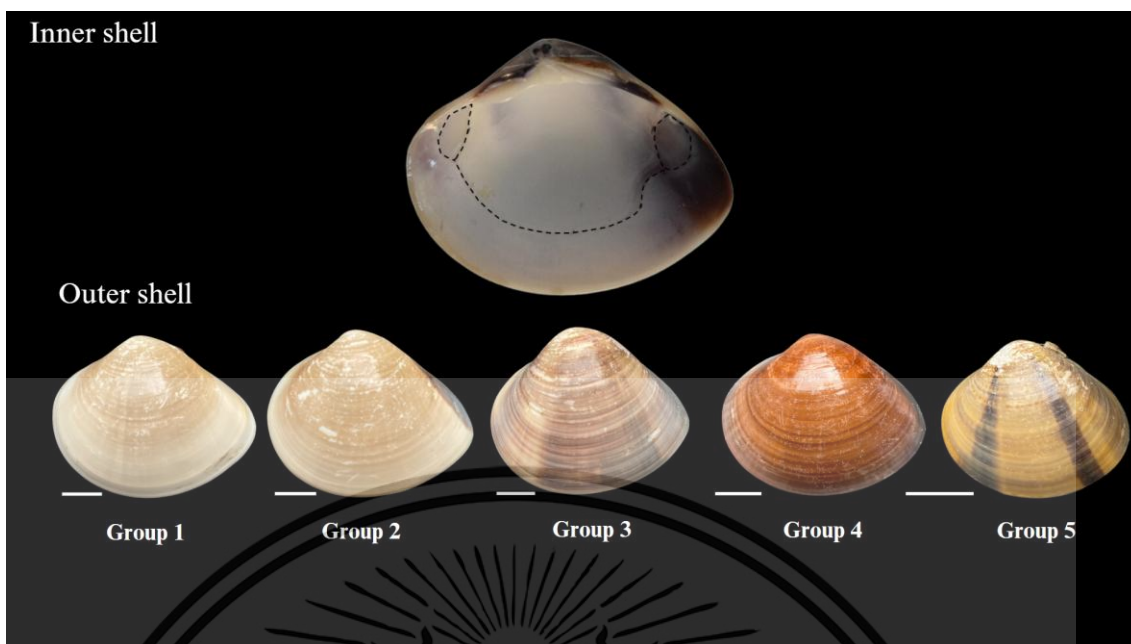
จากข้อมูลการแพร่กระจายของรูปแบบและสีเปลือกภายนอก พบว่าในเปลือกกลุ่มที่ 1 นั้น สามารถได้จังหวัดชลบุรีเท่านั้นคิดเป็น 48 เปอร์เซ็นต์ของหอยในจังหวัดชลบุรี (รูปที่ 4.1B) เปลือกหอยกลุ่มที่ 2 นั้น สามารถพบทุกจังหวัดที่มีการพบเจอ *M. meretrix* ได้แก่ ตราดพบเจอได้ 14 เปอร์เซ็นต์ ชลบุรีพบได้ 6 เปอร์เซ็นต์ และ จังหวัดสุราษฎร์ธานีพบได้ 11 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกหอยกลุ่มที่ 3 ในจังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นเปลือกที่พบเจอได้น้อยที่สุด คิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอีกสองจังหวัดที่พบเจอหอยกลุ่มนี้ คือจังหวัดชลบุรีเจอได้ 33 เปอร์เซ็นต์ และจังหวัดตราดพบเจอได้ 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปลือกหอยกลุ่มที่ 4 เจอได้ที่จังหวัดตราด เยอะสุดเมื่อเทียบกับจังหวัดอื่นคิดเป็น 14 เปอร์เซ็นต์ โดยจังหวัดสุราษฎร์ธานีเจอได้ 12 เปอร์เซ็นต์ และจังหวัดชลบุรีน้อยที่สุด คิดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกหอยกลุ่มที่ 5 จังหวัดที่พบเจอเปลือกหอยกลุ่มนี้มากที่สุด คือ จังหวัดตราด คิดเป็น 42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับจังหวัดสุราษฎร์ธานีที่พบเจอ คิดเป็น 17 เปอร์เซ็นต์ และชลบุรี คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ และจะเห็นได้ว่าไม่เจอเปลือกหอยกลุ่มที่ 5 ในจังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดปัตตานี

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของ *M. astricta* พบว่ามีลักษณะของเปลือกภายนอกมีลักษณะเงาเรียบไม่มีริ้วเช่นเดียวกับ *M. meretrix* แต่ส่วนหน้าของ *M. astricta* จะลักษณะที่แคบกว่า มี cardinal tooth 3 ซี่ที่มีการขยายออกอยู่ด้านบนของขอบเปลือก มีความยาวของ cardinal tooth มากกว่า ลักษณะภายในของเปลือก anterior adductor scar มีรูปทรงไข และ

posterior adductor scar รูปทรงคล้ายหยดน้ำ ซึ่ง posterior adductor scar มีขนาดกว้างกว่า anterior adductor scar เพียงเล็กน้อย pallial sinus มีลักษณะการโค้งงอที่ตื้น ไม่เป็นตะขอ (projecting horn) รูปที่ 4.3 และเมื่อเทียบความยาวของ pallial sinus ของ *M. astricta* จะสั้นกว่า *M. meretrix* และรูปแบบของเปลือกภายนอกจากการศึกษานี้สามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มคือ

- 1) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมเขี้ยว
- 2) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมเขี้ยว escutcheon เป็นสีดำ
- 3) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลออกสีคล้ำซีดำ
- 4) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลทึบไปถึงสีดำ
- 5) เปลือกที่มีลักษณะเป็นสีออกสีน้ำตาลเหลืองมีเส้นสีดำบนเปลือก

จากข้อมูลการแพร่กระจายของรูปแบบและสีเปลือกภายนอก พบว่าเปลือกหอยกลุ่มที่ 1 พบเจอได้มากที่สุดในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรีคิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์จากเปลือกหอยทั้งหมดที่พบ จังหวัดปัตตานีพบได้ 14 เปอร์เซ็นต์ และจังหวัดสุราษฎร์ธานีพบได้ 10 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกหอยกลุ่มที่ 2 จังหวัดเพชรบุรีพบเจอได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับจังหวัดอื่น คิดเป็น 53 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในจังหวัดสุราษฎร์ธานีพบได้ 33 เปอร์เซ็นต์ และจังหวัดปัตตานีพบได้ 10 เปอร์เซ็นต์ เปลือกหอยกลุ่มที่ 3 เป็นรูปแบบเดียวที่พบในจังหวัดชลบุรีจึงคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เปลือกหอยกลุ่มที่ 4 เจอในจังหวัดปัตตานี คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ จังหวัดเพชรบุรี 7 เปอร์เซ็นต์ และจังหวัดสุราษฎร์ธานี 1 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกหอยกลุ่มที่ 5 พบว่าสามารถเจอได้ที่จังหวัดปัตตานีเท่านั้น (รูปที่ 4.1C) ซึ่งรูปแบบของสีเปลือกภายนอกที่พบจากจังหวัดเพชรบุรีที่อยู่บริเวณอ่าวไทยตอนในมีรูปแบบของเปลือกที่คล้ายกันกับจังหวัดสุราษฎร์ธานีที่อยู่บริเวณอ่าวไทยตอนกลาง



รูปที่ 4.3 ลักษณะของเปลือกภายในและรูปแบบของสีเปลือกภายนอก *M. astricta*

จากการเก็บตัวอย่างหอยตลับทั้ง 5 จังหวัดบริเวณอ่าวไทย พบหอยตลับ 2 ชนิดพันธุ์ คือ *M. meretrix* และ *M. astricta* โดยแต่ละชนิดพันธุ์พบความแตกต่างของสีเปลือกและลวดลายจำนวน 5 แบบ จากรายงานเกี่ยวกับหอยตลับบริเวณอ่าวไทย โดยส่วนใหญ่มักพบเจอ *M. meretrix* (Huber, 2010; Yoosukh & Matsukuma, 2001; Supmee *et al.*, 2020; ขวัญภิรมย์ นกเทศ และคณะ, 2562; วิภูษิต มัณฑะจิตร และอศลย์ มีนาภา, 2565; เสถียรพงษ์ ขาวหิต และเกษม จันทรแก้ว, 2559; รัตนา มั่นประสิทธิ์และ คณะ, 2552) ในขณะที่ *M. casta* (Yoosukh and Matsukuma, 2001; ภมรพรรณ ฉัตรภูมิ และคณะ, 2564; เสถียรพงษ์ ขาวหิตและคณะ, 2558; มนตรี สุขมณฑา และคณะ, 2562; รัตนา มั่นประสิทธิ์ และคณะ, 2552), *M. lyrata* (Suppapan *et al.*, 2021), *M. planisulcata* (Yoosukh and Matsukuma, 2001) และ *M. astricta* (Huber, 2010) พบได้น้อยกว่า และจากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถพบเจอ *M. meretrix* ที่บริเวณอ่าวไทยตอนล่าง และไม่พบเจอ *M. astricta* บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก อีกทั้งไม่เจอ *M. casta* และ *M. planisulcata* ในบริเวณอ่าวไทย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแปรผันของสภาพแวดล้อมบริเวณชายฝั่งทะเล อาจส่งผลต่อการแพร่กระจายชนิดพันธุ์ของหอยตลับ ซึ่งการแพร่กระจายของหอยตลับในแต่ละพื้นที่อาจได้รับอิทธิพลจากชนิดของดินตะกอนในแหล่งที่อยู่อาศัย เช่น ทรายหรือโคลน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกแหล่งที่อยู่อาศัยของหอย รวมถึง ปัจจัยทางชีวภาพ เช่น ปฏิสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (Morton, 1983) นอกจากนี้ ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ความเค็มของน้ำ อุณหภูมิ และการเปลี่ยนแปลงของกระแสน้ำที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของประชากรหอยตลับ

(Gosling, 2003) เนื่องจาก *M. astricta* และ *M. meretrix* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน เพื่อทำให้เกิดความเข้าใจถึงการแพร่กระจายและพลวัตประชากรของ *M. astricta* และ *M. meretrix* ที่อยู่บริเวณอ่าวไทย จำเป็นต้องสังเกตลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยตลับ ซึ่งการทำความเข้าใจแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยตลับทั้งในอดีตและในปัจจุบัน เป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะทำหน้าที่การทำนายผลที่ตามมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในประชากรหอยและแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยตลับได้

จากการรายงานพบเจอหอยตลับในบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา (Huber, 2010; Sanpanich, 2011; Yoosukh and Matsukuma, 2001) แสดงให้เห็นถึงความแปรผันของประชากรหอยตลับ โดยเฉพาะในการศึกษาคั้งนี้ที่ไม่พบ *M. lyrata* แม้เคยมีการรายงานการพบเจอในบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสุราษฎร์ธานีเมื่อ 5 ปีก่อน (Suppapan *et al.*, 2021) ซึ่งเป็นพื้นที่เดียวกันกับการศึกษาในคั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมเฉพาะพื้นที่ในบริเวณอ่าวไทย อาจทำให้เกิดความหลากหลายของหอยตลับในพื้นที่ลดลงและในช่วงเวลาดังกล่าว การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมมีผลกระทบต่อสัตว์ที่มีการยึดเกาะเช่น หอยกาบและหอยชนิดอื่น ๆ ที่มีการเคลื่อนที่จำกัด โดย Herder *et al.* (2021) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในแต่ละปีในแถบอาร์กติกของแคนาดาในช่วง 50 ปีที่ผ่านมา ส่งผลให้หอยทะเลลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงในสภาพแวดล้อมทางกายภาพอื่น ๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้ส่งผลต่อความหลากหลายของหอยในพื้นที่ที่ทำการศึกษา รวมทั้งความหนาแน่นและความสมบูรณ์ของหอยลดลงไป (Rueda *et al.*, 2009) ซึ่งให้เห็นถึงการตรวจสอบชนิดพันธุ์ของสัตว์ทะเลอย่างละเอียดและทำอย่างต่อเนื่องสามารถให้ข้อมูลที่สำคัญเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางนิเวศวิทยา และส่งผลไปยังการจัดการอนุรักษ์ได้

หอยที่มีสีเปลือกแตกต่างกันอาจเกิดจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และการอยู่รอดโดยสีจะช่วยในเรื่องการพรางตัวและเลี่ยงการถูกล่าจากนักล่า (Williams, 2017) ซึ่งการวิวัฒนาการของสีเปลือกในหอยสองฝาขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อม และปัจจัยทางชีวภาพที่มีผลต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติ (natural selection) รวมถึงการตอบสนองต่อการล่าจากนักล่า สภาพแวดล้อมทางภูมิศาสตร์และสภาพแวดล้อมที่มีอยู่อย่างจำกัด อาจส่งผลให้เกิดวิวัฒนาการแบบเบนออก (Divergent evolution) เช่นที่พบเจอในหอยตลับในการศึกษาคั้งนี้ที่มีลักษณะสีที่แตกต่างกันในทั้ง 2 ชนิด และมีความหลากหลายภายในชนิดพันธุ์สูง การสะสมความแตกต่างระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตนี้ นำไปสู่การเกิดสปีชีส์ใหม่ ๆ และในทางกลับกัน หอยสองฝาบางชนิดมีวิวัฒนาการแบบเบนเข้า (Convergent Evolution) ที่เป็นหนึ่งในรูปแบบวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ไม่ได้มีบรรพบุรุษร่วมกัน แต่มีลักษณะทางวิวัฒนาการที่ได้ผลลัพธ์คล้ายกัน โดยปัจจัยหลักอาจมาจากสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยที่ทำให้ต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป จึงทำให้มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายกัน การศึกษา

ของ Asato *et al.* (2022) ที่ศึกษาวิวัฒนาการแบบเบนเข้า ของลวดลายของเปลือกในหอยสองฝา น้ำจืด จากยุคครีเตเชียส ฟอรัมซัน Kitadani ประเทศญี่ปุ่น พบว่า ลวดลายสีในหอยน้ำจืดที่สูญพันธุ์ไปแล้ว (fossil freshwater bivalves) และ หอยน้ำจืดที่มีอยู่ในปัจจุบัน มีลักษณะสีที่คล้ายคลึงกัน โดยที่ทั้ง Trigoniida และ Unionida มีการวิวัฒนาการลวดลายสีที่คล้ายคลึงกันในรูปแบบต่าง ๆ

4.2 ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของหอยตลับ *Meretrix* spp.

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยากายนอกของหอยตลับจากบริเวณอ่าวไทยทั้ง 5 จังหวัด โดยใช้ลักษณะของเปลือกภายนอก คือขนาดความสูง ความยาว และความหนาของเปลือก รวมถึงสี และลวดลายของเปลือก พบหอยตลับสองชนิดพันธุ์ ได้แก่ *M. meretrix* และ *M. astricta* โดย *M. meretrix* จะมีความยาวเปลือกเฉลี่ยอยู่ที่ 44.4 ± 0.05 มิลลิเมตร มีความกว้างของเปลือกอยู่ 25.3 ± 0.3 มิลลิเมตร และความหนาอยู่ระหว่าง 36.5 ± 0.4 มิลลิเมตร และจะเห็นว่า *M. astricta* ทั้ง 3 ลักษณะ มีขนาดที่เล็กกว่า โดยความยาวเปลือกเฉลี่ยอยู่ที่ 39.1 ± 0.07 มิลลิเมตร มีความกว้างของเปลือกอยู่ 21.7 ± 0.4 มิลลิเมตร และความหนาอยู่ระหว่าง 31.2 ± 0.6 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของเปลือกภายนอก ขนาดความสูง ความยาว และความหนาของเปลือก ตัวเลขในวงเล็บจำนวนตัวอย่าง

species		Shell Length (mm)	Shell width (mm)	Shell height (mm)
<i>M. meretrix</i>		44.4 ± 0.05	25.3 ± 0.3	36.5 ± 0.4
(385)	Min	31.0	16.0	26.0
	Max	61.0	43.0	45.0
<i>M. astricta</i>		39.1 ± 0.07	21.7 ± 0.4	31.2 ± 0.6
(402)	Min	25.0	14.0	20.0
	Max	62.0	33.0	49.0

จากการนำสัดส่วนของความยาวเปลือกต่อลักษณะสัณฐานอื่น ทั้ง 12 ลักษณะ (ตารางที่ 4.4) จากเปลือกภายในและภายนอกระหว่างหอยตลับทั้ง 2 ชนิดพันธุ์มาเปรียบเทียบทางสถิติ พบมีสัดส่วน 10 ใน 12 สัดส่วนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) หอยทั้ง 10 กลุ่ม (ตาราง ที่

4.3) โดยสัดส่วนที่ต่างกันของเปลือกภายนอก คือความหนาของเปลือกต่อความยาวเปลือก (SW/SL) ความสูงของเปลือกต่อความยาวเปลือก (SH/SL) ความยาวของอัมโบต่อความยาวเปลือก (UL/SL) ความยาวด้านหน้าของเปลือกต่อความยาวเปลือก (AL/SL) ความยาวด้านหลังของเปลือกต่อความยาวเปลือก (PL/SL) และสัดส่วนที่ต่างกันของเปลือกภายใน คือความยาวระหว่างรอยยัดกล้ามเนื้อยัดผาด้านหลังไปยังรอยยัดกล้ามเนื้อผาด้านหน้าต่อความยาวเปลือก (LPAS/SL) ความยาวของฟันต่อความยาวเปลือก (LCT/SL) ความยาวของระยะห่างจากเส้นพัลเลียลไปยังขอบด้านล่างของเปลือกต่อความยาวเปลือก (PVM/SL) ความยาวของ pallial sinus ต่อความเปลือก (PS/SL) และ ความกว้างของรอยยัดกล้ามเนื้อยัดผาด้านหน้าต่อความยาวเปลือก (AW/SL)

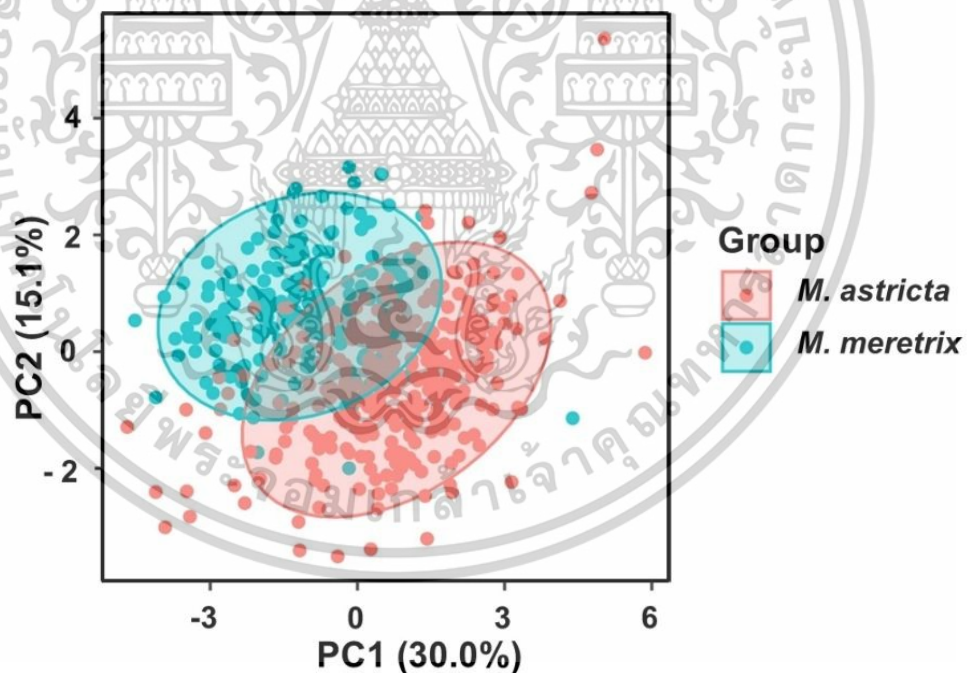
จากตารางที่ 4.3 เห็นได้ชัดเจนว่า มีสองสัดส่วนของลักษณะเปลือกภายในที่มีความยาวที่แตกต่างกัน ระหว่าง *M. astricta* และ *M. meretrix* คือ ความยาวของฟันกลางต่อความยาวเปลือก (LCT/SL) และความยาวของ pallial sinus ต่อความเปลือก (PS/SL)

ลักษณะที่จะใช้จัดจำแนกหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์ได้ง่ายที่สุดคือลักษณะของ pallial sinus scar (PS) โดยความยาวของ pallial sinus ต่อความเปลือก (PS/SL) ของ *M. meretrix* มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 0.17 ± 0.02 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า *M. astricta* ที่มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 0.13 ± 0.07 มิลลิเมตร โดยลักษณะของ pallial sinus scar ของ *M. astricta* ส่วนใหญ่จะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ *M. casta* (Yoosukh and Matsukuma, 2001) แต่ pallial line ของ *M. astricta* ส่วนที่โค้งด้านหน้า pallial sinus นั้นจะเรียบไม่มีลักษณะเป็นติ่งหรือเป็นมุมเหมือน *M. casta* ในส่วนของ pallial sinus ของ *M. meretrix* จะแสดงให้เห็นถึงลักษณะโค้งเว้าลึกเข้าไปจนทำให้มีลักษณะที่คล้ายกับตะขอ ดังนั้น pallial sinus จึงเป็นลักษณะที่สำคัญในการจำแนกหอยตลับในแต่ละชนิดพันธุ์ เนื่องลักษณะของ pallial sinus แต่ละชนิดพันธุ์จะไม่มี ความซ้อนทับกัน ซึ่ง *M. lyrata*, *M. meretrix* และ *M. lusoria* สามารถจัดจำแนกชนิดพันธุ์ได้จากลักษณะของ pallial sinus (Hamli et al., 2016) นอกจากนี้ความยาวของ pallial sinus ยังสามารถใช้ในการจัดจำแนกหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ เช่น *Ruditapes Chamelea Mercenaria* และ *Venerupis* (Moneva et al., 2014; Nerelovic et al., 2016; Rufino et al., 2006)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะต่าง ๆ ต่อความยาวเปลือก วิเคราะห์ one way ANOVA ด้วยวิธี Tukey's HSD ของรูปแบบของสีเปลือก

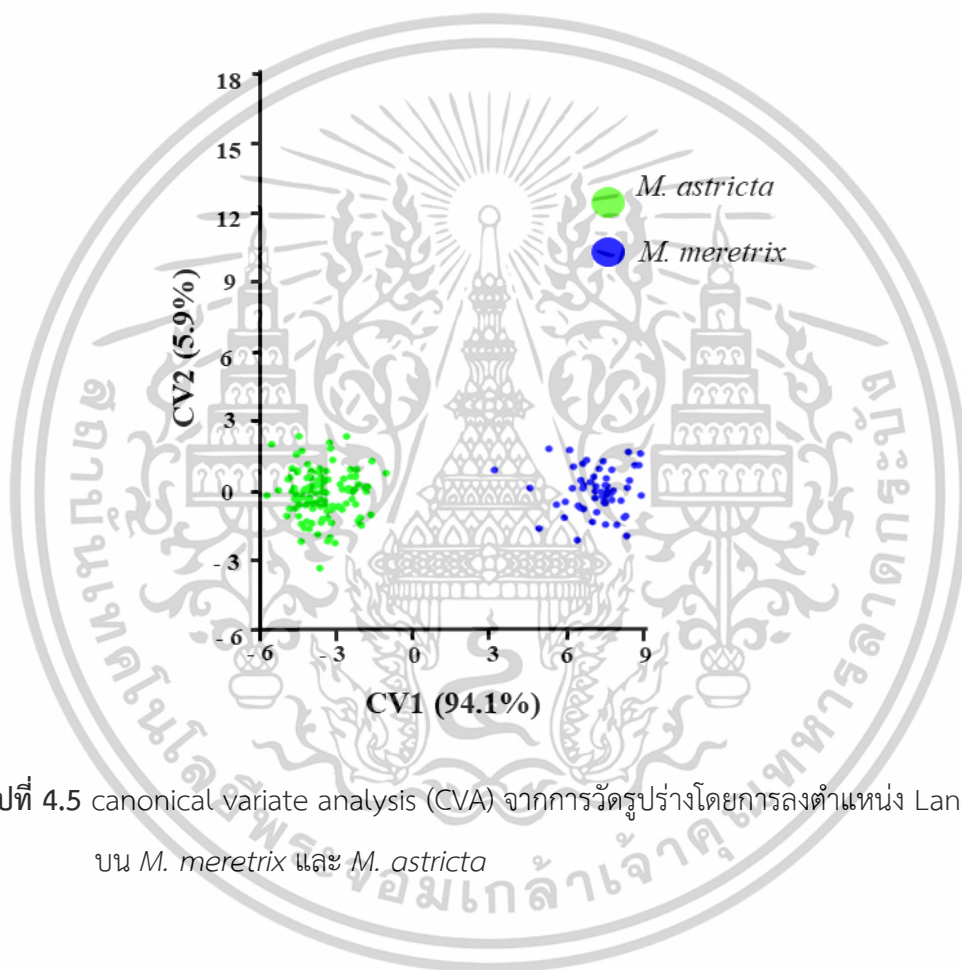
Species	Color pattern group	Outer shell						Inner shell					
		SW/SL	SH/SL	UL/SL	LL/SL	AL/SL	PL/SL	LPAS/SL	LCT/SL	PVM/SL	PS/SL	AW/SL	PW/SL
<i>Meretrix meretrix</i>	1	0.58±0.01 ^a	0.84±0.02 ^{ad}	0.70±0.02 ^{abc}	0.24±0.02 ^{ab}	0.66±0.02 ^{ac}	0.78±0.02 ^{ad}	0.52±0.02 ^{ad}	0.21±0.02 ^a	0.21±0.02 ^a	0.15±0.01 ^a	0.12±0.01 ^{ac}	0.15±0.01 ^a
	2	0.57±0.03 ^{ac}	0.82±0.02 ^{ac}	0.71±0.03 ^{ac}	0.25±0.02 ^a	0.64±0.03 ^a	0.79±0.03 ^{ad}	0.53±0.02 ^{abd}	0.24±0.02 ^a	0.19±0.02 ^{bd}	0.16±0.01 ^a	0.12±0.01 ^{ac}	0.16±0.02 ^a
	3	0.57±0.02 ^a	0.83±0.04 ^{ad}	0.70±0.03 ^a	0.24±0.02 ^{ab}	0.63±0.04 ^{cd}	0.80±0.03 ^a	0.53±0.02 ^{ad}	0.23±0.04 ^a	0.19±0.02 ^{bce}	0.17±0.02 ^a	0.12±0.01 ^a	0.16±0.02 ^a
	4	0.57±0.02 ^a	0.82±0.02 ^{ad}	0.71±0.03 ^{ac}	0.25±0.01 ^a	0.64±0.02 ^{ac}	0.80±0.03 ^a	0.54±0.02 ^{abcd}	0.24±0.01 ^a	0.20±0.01 ^{ac}	0.17±0.02 ^a	0.12±0.01 ^{cbe}	0.16±0.01 ^a
	5	0.57±0.04 ^a	0.82±0.03 ^a	0.71±0.03 ^{ac}	0.24±0.02 ^{ab}	0.63±0.04 ^{acd}	0.78±0.10 ^{de}	0.53±0.03 ^{ad}	0.24±0.02 ^a	0.19±0.01 ^{bd}	0.17±0.02 ^a	0.11±0.01 ^{cb}	0.15±0.01 ^a
Average±SD		0.57±0.03	0.82±0.03	0.71±0.03	0.24±0.02	0.63±0.03	0.79±0.06	0.53±0.02	0.24±0.02	0.19±0.02	0.17±0.02	0.11±0.01	0.16±0.01
<i>Meretrix acutricata</i>	1	0.56±0.03 ^{bc}	0.80±0.03 ^b	0.69±0.03 ^b	0.25±0.02 ^a	0.60±0.05 ^{bd}	0.75±0.03 ^c	0.54±0.02 ^{abc}	0.25±0.03 ^b	0.20±0.02 ^{ac}	0.13±0.02 ^b	0.11±0.01 ^b	0.16±0.04 ^a
	2	0.55±0.03 ^{bc}	0.80±0.03 ^b	0.68±0.03 ^b	0.24±0.02 ^{ab}	0.60±0.03 ^b	0.75±0.03 ^{bc}	0.54±0.02 ^{ab}	0.25±0.03 ^b	0.19±0.02 ^{bce}	0.14±0.12 ^b	0.11±0.01 ^{be}	0.15±0.02 ^a
	3	0.55±0.02 ^b	0.80±0.03 ^b	0.68±0.04 ^b	0.24±0.02 ^{bc}	0.60±0.08 ^b	0.75±0.03 ^{bc}	0.53±0.04 ^d	0.25±0.02 ^b	0.20±0.02 ^{ac}	0.12±0.02 ^b	0.11±0.01 ^b	0.16±0.04 ^a
	4	0.55±0.03 ^{bc}	0.80±0.03 ^{bc}	0.70±0.04 ^{ac}	0.25±0.02 ^{ac}	0.61±0.02 ^{bd}	0.76±0.03 ^{ce}	0.54±0.03 ^{bc}	0.25±0.02 ^b	0.20±0.02 ^{ae}	0.13±0.02 ^b	0.11±0.01 ^e	0.15±0.02 ^a
	5	0.57±0.02 ^{ac}	0.83±0.04 ^d	0.71±0.03 ^c	0.24±0.02 ^b	0.61±0.04 ^d	0.78±0.03 ^{de}	0.55±0.04 ^c	0.26±0.02 ^b	0.19±0.02 ^d	0.13±0.02 ^b	0.10±0.01 ^d	0.14±0.02 ^a
Average±SD		0.56±0.03	0.80±0.03	0.69±0.03	0.24±0.02	0.60±0.05	0.75±0.03	0.54±0.03	0.25±0.03	0.20±0.02	0.13±0.07	0.11±0.01	0.15±0.02
p-value		<0.001	<0.001	<0.001	0.054	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	0.689

และเมื่อนำสัดส่วนที่มีความแตกต่างกันทั้ง 10 ส่วนจากตารางที่ 4.3 ไปวิเคราะห์ PCA (Principal Component Analysis) ผลจากการศึกษาพบว่าลักษณะที่แตกต่างกันในทั้ง 2 ชนิดพันธุ์ ไม่ได้แยกกลุ่มออกจากกันชัดเจน ข้อมูล morphometric จากทั้ง 10 ลักษณะยังคงเกิดการซ้อนทับกันสูง โดยผลของ PC ที่คำนวณได้ 2 แกนรวมกันได้เพียง 45.1% โดย PC1 มีความแปรปรวนที่ 30.0 เปอร์เซ็นต์ และ PC2 แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนที่ 15.1 % (รูปที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าลักษณะที่พบมีความแตกต่างกันระหว่าง 2 ชนิดยังไม่สามารถใช้จำแนกชนิดพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งการใช้ PCA ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยสองฝา มักพบว่ามีการซ้อนทับของข้อมูลสูงเมื่อใช้เพียงลักษณะของเปลือกหอยในการศึกษา สอดคล้องกับการศึกษาของ Zieritz *et al.* (2010) ที่พบว่าหอยน้ำจืดในกลุ่ม *Unionoidea* มีลักษณะของเปลือกคล้ายคลึงกันมาก ส่งผลให้การจำแนกชนิดพันธุ์ด้วย PCA มีความซับซ้อน การศึกษาข้างี้ให้เห็นว่า ลักษณะสัณฐานของเปลือกหอยอาจมีความคล้ายคลึงกันระหว่างชนิดพันธุ์ ทำให้การจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะของเปลือกเพียงอย่างเดียวเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก



รูปที่ 4.4 Principal Component Analysis (PCA) ของ 10 ลักษณะ Morphometric ที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญระหว่าง *M. meretrix* และ *M. astricta*

ผลการศึกษาจาก PCA ที่ได้จากการวัดความยาวของลักษณะต่างๆ 10 ลักษณะ แตกต่างจากการศึกษา geometric morphometrics ที่ตรวจสอบรูปทรงของเปลือกภายในจากการทำ landmark ทั้งหมด 52 ตำแหน่งลักษณะ โดยผลของ CVA แสดงถึงความแตกต่างของรูปร่างเปลือกภายในระหว่างชนิดพันธุ์ได้ ซึ่งค่าของ CV1 มีความแปรปรวนเท่ากับ 94.1 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ CVA ที่ตรวจสอบลักษณะรูปทรงเปลือกภายในสามารถใช้ในการแยกลักษณะระหว่างหอยตลับทั้งสองชนิดได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.5)

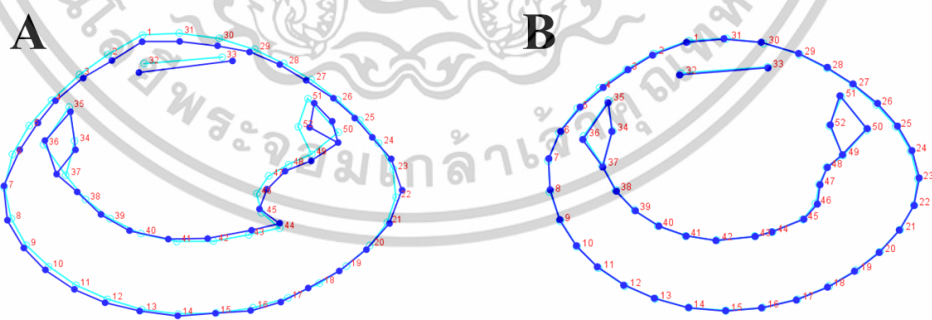


รูปที่ 4.5 canonical variate analysis (CVA) จากการวัดรูปร่างโดยการลงตำแหน่ง Landmark ลงบน *M. meretrix* และ *M. astricta*

นอกจากนี้การใช้ warped outline drawing แสดงให้เห็นว่าลักษณะของรูปทรง (Shape) ของ *M. astricta* และ *M. meretrix* โดยลักษณะของ pallial sinus ของ *M. meretrix* และ cardinal tooth ส่วนของ anterior-posterior ทำให้หอยตลับทั้ง 2 ชนิดพันธุ์มีความแตกต่างกันมาก (รูปที่ 4.6) การที่ pallial sinus ที่มีลักษณะโค้งเว้าลึก หรือโค้งเว้าตื้นนั้น เกิดจากมีความสัมพันธ์กันกับพฤติกรรมการเลือกแหล่งที่อยู่อาศัยและการปรับตัวให้เข้ากับทางสัณฐานวิทยาเพื่อให้เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อม โดยที่ *M. meretrix* มี pallial sinus ที่โค้งเว้าลึก ซึ่งรอย pallial sinus นี้เป็นร่องรอยของ siphons หอยชนิดนี้มักอาศัยในแหล่งที่ต้องขุดดินหรือทรายที่ลึกจึงต้องใช้ siphons ในการดูด

น้ำและหายใจจากผิวน้ำด้านบน การเว้าลึกของ pallial sinus จึงสะท้อนถึง siphons ที่ยาวและลึก ซึ่งช่วยให้หอยสามารถดำรงชีวิตในโพรงใต้ดินลึกได้ดี ในขณะที่ *M. astricta* ที่มี pallial sinus ที่เว้าตื้นกว่า อาจเป็นเพราะว่าแหล่งที่อยู่นั้นอยู่บริเวณที่ตื้นกว่า ทำให้ siphons ไม่จำเป็นต้องยาวมากเพื่อเข้าถึงน้ำด้านบน ซึ่งความแตกต่างกันของลักษณะ pallial sinus เป็นผลจากการวิวัฒนาการและการปรับตัวทางสัณฐานวิทยาของหอยตลับแต่ละชนิดให้เหมาะสมกับพฤติกรรมการขุดดินและลักษณะของแหล่งที่อยู่อาศัย โดยการอยู่ในโพรงลึกเป็นเวลานานของ *M. meretrix* ทำให้เกิดการพัฒนาของ pallial sinus ที่เว้าลึกชัดเจน เพื่อรองรับ siphons ที่ยาวและช่วยให้หอยสามารถดำรงชีวิตในระบบนิเวศ (Moneva et al., 2014)

อีกลักษณะที่ควรนำมาใช้จัดจำแนกหอยตลับทั้ง 2 ชนิดคือความยาวของ cardinal tooth (LCT) โดยพบว่าความยาว cardinal tooth ของ *M. astricta* จะยาวกว่า *M. meretrix* ซึ่ง cardinal tooth จะมีความแข็งแรงและใช้ในการยึดเกาะระหว่างเปลือกหอยทั้งสองฝา ซึ่งทำหน้าที่ที่สำคัญในการป้องกันตัวจากมวลน้ำหรือกระแสน้ำได้ในช่วงที่มีน้ำขึ้นน้ำลง (Moneva et al., 2014) ดังนั้น *M. meretrix* ที่มีความยาว cardinal tooth ที่สั้นกว่าอาจจะ เนื่องจากอยู่อาศัยในที่ลึกทำให้ได้รับผลกระทบจากแรงจากมวลน้ำหรือกระแสน้ำที่พัดผ่านผิวทรายน้อยกว่า *M. astricta* ที่อาจอยู่อาศัยในน้ำตื้น จึงมีความยาว cardinal tooth ยาวกว่า โดย cardinal tooth ที่ยาวขึ้นจะช่วยเพิ่มแรงต้านมวลน้ำหรือกระแสน้ำได้มากขึ้น ซึ่งเป็นการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่มีการเคลื่อนที่ของน้ำตลอดเวลาอย่างเช่นบริเวณชายหาด (Moneva et al., 2014)



รูปที่ 4.6 Warped outline drawings ของรูปทรง (A) *M. meretrix* และ (B) *M. astricta*. โดยเส้นในสีฟ้าแสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเส้นในสีน้ำเงินเข้มแสดงรูปร่างเฉลี่ย

จากการศึกษาของ Rufino *et al.* (2006) ที่ใช้วิธีการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาเชิงเรขาคณิต (Geometric Morphometrics) เพื่อจำแนกความแตกต่างของรูปร่างเปลือกหอยสองฝาในสกุล *Chamelea* โดยเฉพาะระหว่างชนิด *Chamelea gallina* และ *Chamelea striatula* พบว่าการใช้วิธีการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาเชิงเรขาคณิตสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Huang *et al.* (2024) ที่ศึกษาความแตกต่างของรูปร่างเปลือกหอยเซลล์ (*Argopecten irradians*) ที่มีสีเปลือกที่แตกต่างกัน คือ สีเปลือกแดง (Red Shell หรือ RS) และสีดำ (Black Shell หรือ BS) โดยใช้จุด Landmark หลายตำแหน่ง และวิเคราะห์ด้วย CVA พบว่ามีความแตกต่างของรูปร่างเปลือกอย่างมีนัยสำคัญระหว่างหอยที่มีสีเปลือกที่ต่างกันได้อย่างชัดเจน และการศึกษา Printrakoon *et al.* (2022) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกชนิดและการแพร่กระจายของหอยเสียบโดยใช้วิธี วิธี Geometric Morphometric (GM) และ การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ในประเทศไทย พบว่าการใช้ Geometric Morphometric สามารถช่วยจัดจำแนกหอยเสียบ *Donax* ในประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ในบางกรณีอาจต้องใช้ ข้อมูลพันธุกรรมร่วมด้วย เพื่อความแม่นยำในการจัดจำแนกชนิดยิ่งขึ้น ดังนั้นการใช้ลักษณะเปลือกภายนอกนั้นต้องมีการลักษณะการหลาย ๆ ลักษณะเข้ามาช่วยในการจำแนกชนิดพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก เช่น สีหรือรูปร่างของเปลือก ที่ยังไม่สามารถแยก ความแตกต่างกันได้อย่างชัดเจน

4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

จากตัวอย่างหอยตลับรวมทั้ง 2 ชนิดจำนวน 231 ตัวอย่างมีการสกัดดีเอ็นเอทั้งแบบ Phenol Chloroform และชุด kit แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR พบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ครั้งแรกคิดเป็น 2.2 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด และเมื่อเปลี่ยนบริเวณเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเท้าไปเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อยึดเปลือกก็ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เหลือมาปรับ condition ของ PCR ได้ตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จเพิ่มขึ้นอีก 11.3 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างที่เหลืออีก 86.5 เปอร์เซ็นต์ก็ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณให้สำเร็จได้ (ตารางที่ 4.4) โดยเปลือกแต่ละกลุ่มจากหอยทั้ง 2 ชนิดได้ตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จจำนวน 1-4 ตัวอย่าง

จากการศึกษารั้วนี้แสดงให้เห็นถึงความยากในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ อาจจะเป็นผลมาจากเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอที่เป็นปัจจัยสำคัญ และการสกัดดีเอ็นเอจากหอยสอง

ฝาคักได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Pereira *et al.*, 2011) นอกจากนี้การปนเปื้อนจากสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน และไขมันที่อยู่ในเนื้อเยื่อ ในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ ถ้าตกตะกอนไม่ดีก็จะส่งผลให้คุณภาพดีเอ็นเอลดลงได้ (Pereira *et al.*, 2011) เมื่อเปรียบเทียบเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากหอยสองฝา พบว่าการศึกษาส่วนใหญ่ใช้เนื้อเยื่อบริเวณเท้า (He *et al.*, 2011; Yamakawa and Imai, 2013; Yamakawa *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อยึดเปลือก (Idris *et al.*, 2022; Murari *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2011) และเหงือก (Gills) (Gros *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2021; Pathirana *et al.*, 2019) ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อแต่ละประเภทมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน โดยการใช้เนื้อเยื่อส่วนเท้ามาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอมีข้อดีคือเป็นเนื้อเยื่อบริเวณที่สะอาดและมีการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมต่ำ เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก ทำให้มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่ำ อย่างไรก็ตาม ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อนี้อาจต่ำกว่าส่วนอื่น ๆ เนื่องจากมีองค์ประกอบของโปรตีนน้อยกว่าที่อื่น ในส่วนของเหงือก แม้ว่าจะมีปริมาณเซลล์สูงและสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ในปริมาณมาก แต่เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะที่สัมผัสกับน้ำโดยตรง จึงมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์ การปนเปื้อนจากสิ่งเหล่านี้อาจทำให้กระบวนการสกัดดีเอ็นเอมีความยุ่งยากมากขึ้น แม้ว่าจะมีการสกัดได้ในปริมาณที่สูงกว่าก็ตาม และกล้ามเนื้อยึดเปลือก ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเฉพาะและมีองค์ประกอบของโปรตีนน้อยกว่าส่วนอื่น ๆ ส่งผลให้มีปริมาณดีเอ็นเอสูงและมีการปนเปื้อนต่ำ จึงเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์น้อย ซึ่งการเลือกใช้นเนื้อเยื่อบริเวณส่วนเท้าทำให้ดีเอ็นเอที่ต่ำ จนทำให้ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR อาจทำให้ไม่มีประสิทธิภาพหรือไม่สามารถเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงพอ (Pereira *et al.*, 2011; Popa *et al.*, 2007)

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการสกัดดีเอ็นเอการปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัด ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัด ดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)			ผล Sequencing				
							ปรับปริมาณ ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับ อุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ สำเร็จ	อ่านผล ไม่ได้	อ่านผลได้	
<i>M. meretrix</i>	1	CBI	CBI 5.1	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	6	4	1	-	1	1		<input checked="" type="checkbox"/>	
			CBI 5.2	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	6	3	1	-	0	0			
			CBI 5.3	1	Phenol Chloroform	6	4	2	-	-	0			
			CBI 5.4	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0			
			CBI 5.5	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0			
	2	TRT		TRT (form 5).1	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
				TRT (form 5).2	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
				TRT (form 5).3	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
				TRT (form 5).4	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
				TRT (form 5).5	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
		CBI		CBI (form 6) .1	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
				CBI (form 6) .2	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
				CBI (form 6) .3	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัดดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)				ผล Sequencing		
							ปรับปริมาณดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับอุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ	อ่านผลไม่ได้	อ่านผลได้
<i>M. meretrix</i>	2	SNI	m1.1	1	Phenol Chloroform	3	1	1	-	-	0		
			m1.2	1	Phenol Chloroform	3	1	1	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 2.1	1	Phenol Chloroform	1	-	-	1	1			<input checked="" type="checkbox"/>
			หาคสำเร็จ 2.2	1	Phenol Chloroform	1	-	-	1	1			<input checked="" type="checkbox"/>
			หาคสำเร็จ 2.3	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	1	1	<input checked="" type="checkbox"/>	
			หาคสำเร็จ 2.4	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	1	<input checked="" type="checkbox"/>	
			หาคสำเร็จ 2.5	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 2.6	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 2.7	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
	หาคสำเร็จ 2.8	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	1	1	1	-	0				
	หาคสำเร็จ 2.9	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	1	1	1	-	0				
	3	CBI	CBI 1.1	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		
			CBI 1.2	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		
			CBI 1.3	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			CBI 1.4	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
CBI 1.5			1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0			

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัดดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	ปรับปริมาณดีเอ็นเอ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)			ผล Sequencing		
								ปรับอุณหภูมิต่ำ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ	อ่านผลไม่ได้	อ่านผลได้
M. meretrix	3	TRT	TRT (form 1).1	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	1		☑
			TRT (form 1).2	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	1		☑
			TRT (form 1).3	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
		SNI	m 4.1 prelim	1	ชุด kit	1	-	-	-	-	1		☑
			m 4.2 prelim	1	ชุด kit	1	-	-	-	-	1		☑
		หัดสำเร็จ	3.1	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	1	☑	
			3.2	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	1	☑	
			3.3	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	1	☑	
	3.4		1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0			
	4	CBI	CBI 7.1	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
			CBI 7.2	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
		TRT	TRT (form 3).1	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			TRT (form 3).2	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
		SNI	หัดสำเร็จ 11.1	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	2	☑	☑
			หัดสำเร็จ 11.2	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	1		☑
			หัดสำเร็จ 11.3	1	Phenol Chloroform	4	2	1	1	-	1	☑	
			หัดสำเร็จ 11.4	1	Phenol Chloroform	4	2	1	1	-	2	☑	
หัดสำเร็จ 11.5			1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	2	☑		

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัด ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	ปรับปริมาณ ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)			ผล Sequencing		
								ปรับ อุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ สำเร็จ	อ่านผล ไม่ได้	อ่านผลได้
M. meretrix	5	CBI	CBI (form 4)	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
		TRT	TRT (form 2).1	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	1	<input checked="" type="checkbox"/>	
			TRT (form 2).2	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
			TRT (form 2).3	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-			
		SNI	SNI (form 10หาคสำเร็จ).1	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	1		<input checked="" type="checkbox"/>
			SNI (form 10หาคสำเร็จ).2	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	1		<input checked="" type="checkbox"/>
			SNI (form 10หาคสำเร็จ).3	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 10หาคสำเร็จ).4	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 10หาคสำเร็จ).5	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัดดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)				ผล Sequencing		
							ปรับปริมาณดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับอุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ	อ่านผลไม่ได้	อ่านผลได้
<i>M. astricta</i>	1	PBI	PBI 1.1	1	ชุด kit	1	-	-	-	-	0		
			PBI 1.2	1	ชุด kit	1	-	-	-	-	1		<input checked="" type="checkbox"/>
			PBI 1.3	1	ชุด kit	1	-	-	-	-	0		
	1	SNI	SNI (form 1 หาดสำเร็จ).1	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	2		<input checked="" type="checkbox"/>
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).2	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).3	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).4	2	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).5	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).6	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).7	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).8	1	ชุด kit	3	1	1	-	-	0		
			SNI (form 1 หาดสำเร็จ).9	1	ชุด kit	3	1	1	-	-	0		
	1	PTN	PTN (form3).1	1	Phenol Chloroform	2	1	-	-	-	0		
			PTN (form3).2	1	Phenol Chloroform	3	1	-	-	1	0		
			PTN (form3).3	1	Phenol Chloroform	2	1	-	-	-	0		

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัด ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)				ผล Sequencing		
							ปรับปริมาณ ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับ อุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ สำเร็จ	อ่านผล ไม่ได้	อ่านผลได้
<i>M. stricta</i>	2	PBI	PBI 4.1	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	0		
			PBI 4.2	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	0		
			PBI 4.3	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	0		
			PBI (form 5) .1_Ad01	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			PBI (form 5) .1_Ad02	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	1	<input checked="" type="checkbox"/>	
			PBI (form 5) .1_Ad03	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			PBI (form 5) .1_Mt01	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			PBI (form 5) .1_Mt02	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			PBI (form 5) .1_Mt03	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			SNI	SNI (form 12 หาดสำเร็จ).1	2	1. Phenol Chloroform	2	ชุด kit	4	1	1	1	0
	2. ชุด kit												
	1. Phenol Chloroform												
	2. ชุด kit												
	ชุด kit												
	SNI (form 12 หาดสำเร็จ).2	2	1. Phenol Chloroform	2	ชุด kit	3	-	1	1	-	0		
SNI (form 12 หาดสำเร็จ).3	2	1. Phenol Chloroform	2	ชุด kit	4	1	1	1	-	1	<input checked="" type="checkbox"/>		
SNI (form 12 หาดสำเร็จ).4	2	1. Phenol Chloroform	2	ชุด kit	3	2	-	-	-	0			
SNI (form 12 หาดสำเร็จ).5	2	1. Phenol Chloroform	2	ชุด kit	4	2	1	-	-	0			

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัดดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)			ผล Sequencing			
							ปรับปริมาณดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับอุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ	อ่านผลไม่ได้	อ่านผลได้
<i>M. astricta</i>	2	SNI	SNI (form 12 หาดสำเร็จ).6	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 12 หาดสำเร็จ).7	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 12 หาดสำเร็จ).8	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 12 หาดสำเร็จ).9	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
		PTN	PTN (form4).1	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PTN (form4).2	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
	PTN (form4).3		1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0			
	3	PBI	PBI 6.1	2	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI 6.2	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI 6.3	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
		PBI	PBI 7.1	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI 7.2	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI 7.3	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI 8.1	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI 8.2	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
PBI 8.3			1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0			

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัด ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)				ผล Sequencing		
							ปรับปริมาณ ดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับ อุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ สำเร็จ	อ่านผล ไม่ได้	อ่านผลได้
<i>M. astricta</i>	3	SNI	PBI (form 4) .1_Ad01	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
			PBI (form 4) .2_Ad02	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	1	<input checked="" type="checkbox"/>	
			PBI (form 4) .3_Ad03	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	1	<input checked="" type="checkbox"/>	
			PBI (form 4) .1_Mt01	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI (form 4) .2_Mt02	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0		
			PBI (form 4) .3_Mt03	1	Phenol Chloroform	4	1	2	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.1	1	Phenol Chloroform	4	1	1	1	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.2	1	Phenol Chloroform	4	1	1	1	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.3	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	3	2	1	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.4	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.5	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.6	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.8	1	ชุด kit	3	1	1	-	-	0		
			หาคสำเร็จ 4.9	1	ชุด kit	3	1	1	-	-	0		
			SNI (form 7) .1	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		
			SNI (form 7) .2	2	1. Phenol Chloroform 2. ชุด kit	4	2	1	-	-	0		

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัดดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)				ผล Sequencing		
							ปรับปริมาณดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับอุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ	อ่านผลไม่ได้	อ่านผลได้
<i>M. astricta</i>	3	PTN	SNI (form 7) .3	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
			SNI (form 7) .4	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
			SNI (form 7) .5	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
			PTN (form5).1	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
			PTN (form5).2	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
			PTN (form5).3	1	Phenol Chloroform	3	2	-	-	-	0		
	4	PBI	PBI 3.1	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	0		
			PBI 3.2	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	0		
			PBI 3.3	1	Phenol Chloroform	1	-	-	-	-	0		
		PBI (form 5).1	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	0			
		PBI (form 5).2	1	Phenol Chloroform	4	2	1	-	-	1		<input checked="" type="checkbox"/>	
		PBI (form 5).3	1	Phenol Chloroform	2	2	-	-	-	0			
		PBI (form 5).4	1	Phenol Chloroform	2	2	-	-	-	0			
		PBI (form 5).5	1	Phenol Chloroform	2	2	-	-	-	0			
		PBI (form 3) .1_Ad01	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	1		<input checked="" type="checkbox"/>	
		PBI (form 3) .2_Ad02	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	1		<input checked="" type="checkbox"/>	
		PBI (form 3) .3_Ad03	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0			

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการการสกัดดีเอ็นเอ การปรับ Condition ในการทำ PCR การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษา (ต่อ)

ชนิดพันธุ์	กลุ่มที่	สถานที่	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนการสกัดดีเอ็นเอ (ครั้ง)	วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)				ผล Sequencing		
							ปรับปริมาณดีเอ็นเอ (ครั้ง)	ปรับอุณหภูมิ	ทำ Gradient Temperature	ทำ Gradient ปริมาณดีเอ็นเอ	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำเร็จ	อ่านผลไม่ได้	อ่านผลได้
<i>M. astricta</i>	5	PTN	PTN (form2).10_Ad07	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			PTN (form2).11_Ad08	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	0		
			PTN (form2).12_Ad09	1	Phenol Chloroform	3	2	1	-	-	1	<input checked="" type="checkbox"/>	

เนื่องจากความยากในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงได้มีการทดลองหาวิธีการโดยการเลือกยีนที่ใช้ศึกษาหลายตัว เช่น ยีน *Cytb*, *16S rRNA* และ *18S rRNA* ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เช่นกัน (ตารางที่ 4.5) โดยจากการเลือกใช้นั้นทั้งหมด มีเพียงตัวอย่างเดียวที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จ ดังนั้นจึงไม่ได้มีการส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ตารางที่ 4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้ยีนตำแหน่งยีนในไมโทคอนเดรียในการศึกษา

ชื่อตัวอย่าง	ยีน	primer ที่ใช้	จำนวนที่ทำพีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)		เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ	หมายเหตุ	
				ปรับปริมาณดีเอ็นเอ	ทำ Gradient Temperature			
m4.1	16S	16S_arL, 16S_brH	3	2		0	เห็นแบน จางมาก	
		16S_ANNF, 16S_ANNR	1			0	เห็นแบน จางมาก	
	18S	Myt18S_F, DtCed18S	1			1		
		BIVALVE1F, BIVALVE1R	1			0	เห็นแบน จางมาก	
PTN (form1).1	16S	16S_arL, 16S_brH	3	2		0		
		16S_ANNF, 16S_ANNR	1			0		
	18S	Myt18S_F, Myt18S_R	3	1	1	0		
		Myt18S_F, DtCed18S	3	1	1	0		
	18S	BIVALVE1F, BIVALVE1R	3	1	1	0		
		16S	16S_ANNF, 16S_ANNR	1			0	
			18S	Myt18S_F, Myt18S_R	3	2	1	0
18S	Myt18S_F, DtCed18S	3		1	1	0		
	18S	BIVALVE1F, BIVALVE1R	3	1	1	0		
		PTN (form1).2	16S	16S_ANNF, 16S_ANNR	1			0
18S	Myt18S_F, Myt18S_R			3	2	1	0	
	18S		Myt18S_F, DtCed18S	3	1	1	0	
18S			BIVALVE1F, BIVALVE1R	3	1	1	0	
			PTN (form1).3	16S	16S_ANNF, 16S_ANNR	1		
18S	Myt18S_F, Myt18S_R	3			3	1	0	
	18S	Myt18S_F, DtCed18S		3	1	1	0	
18S		BIVALVE1F, BIVALVE1R		3	1	1	0	
		PTN (form2).1		16S	16S_arL, 16S_brH	3	2	

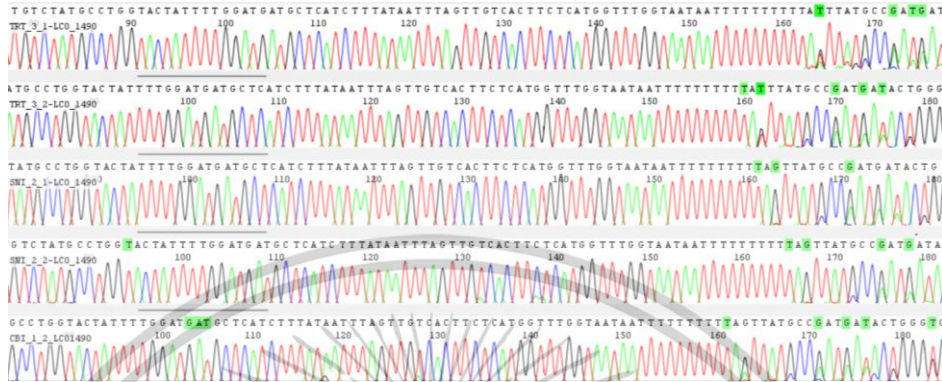
ตารางที่ 4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้ยีนตำแหน่งยีนในไมโทคอนเดรียในการศึกษา (ต่อ)

ชื่อตัวอย่าง	ยีน	primer ที่ใช้	จำนวนที่ทำ พีซีอาร์ (ครั้ง)	การปรับ Condition (ครั้ง)		เพิ่ม ปริมาณดี เอ็นเอ สำเร็จ	หมายเหตุ
				ปรับปริมาณ ดีเอ็นเอ	ทำ Gradient Temperature		
	18S	Myt18S_F, Myt18S_R	2		1	0	
		Myt18S_F, DtCed18S	3	1	1	0	
		BIVALVE1F, BIVALVE1R	3	1	1	0	
PTN (form2).2	18S	Myt18S_F, Myt18S_R	2		1	0	
PTN (form2).3	18S	Myt18S_F, Myt18S_R	2		1	0	
PTN (form3).1	16S	16S_arL, 16S_brH	1			0	
	18S	Myt18S_F, Myt18S_R	2		1	0	
PTN (form4).1	16S	16S_arL, 16S_brH	1			0	
PTN (form5).1	16S	16S_arL, 16S_brH	1			0	
PTN (form6).1	16S	16S_arL, 16S_brH	1			0	

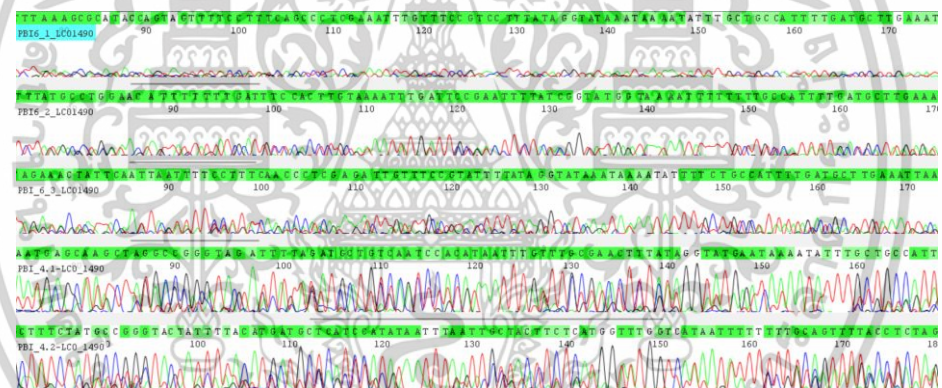
4.3.2 การศึกษาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

ตัวอย่างหอยตลับที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จทั้งหมด 42 ตัวอย่าง คิดเป็น 13.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 43 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 433–700 bp ซึ่งการแสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถอ่านผลได้ในรูปที่ 4.7 และสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อได้ แต่บางตัวอย่างไม่สามารถอ่านพีคได้ชัดเจน (57 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากได้ความสูงของพีคที่ต่ำและมีการซ้อนทับมากกว่า 1 พีคในตำแหน่งเดียวกัน (mixed or unclear sequencing peaks) (รูปที่ 4.8) ตัวอย่างลักษณะนี้จะไม่ถูกนำไปวิเคราะห์ต่อ การเกิดพีคที่ซ้อนกันในการทำ DNA Sequencing อาจเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR จึงทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับที่ตำแหน่งเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ หรือการซ้อนทับมากกว่า 1 พีคในตำแหน่งเดียวกัน อาจเป็นหลักฐานของผสมพันธุ์ข้ามชนิดพันธุ์ได้ เพราะหอยตลับมีการปฏิสนธิภายนอก อาจเกิดการปฏิสนธิของตัวอ่อนจากพ่อและแม่ต่างชนิดจึงทำให้รุ่นลูกมีพันธุกรรมที่หลากหลาย หรือมีลักษณะทางพันธุกรรมของทั้ง 2

ชนิดในหอยตัวเดียวกัน (Yamakawa and Imai, 2012; 2013) แต่ทั้งนี้การตรวจสอบการผสมพันธุ์ข้ามชนิดพันธุ์ในหอยตัวยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



รูปที่ 4.7 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถอ่านผลและนำมาใช้ได้



รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สามารถอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า *M. meretrix* บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ประกอบด้วยเบสไทมีน (T) จำนวน 43% เบสไซโตซีน (C) จำนวน 15.2% เบสอะดีนีน (A) จำนวน 18.8% และเบสกวานีน (G) จำนวน 23.0% (ตารางที่ 4.6) มี singleton variables sites และ parsimony informative site จำนวน 2 ตำแหน่ง สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. astricta* ที่เพิ่งบันทึกลงในฐานข้อมูล NCBI ประกอบด้วยเบสไทมีน (T) จำนวน 43.9% เบสไซโตซีน (C) จำนวน 14.7% เบสอะดีนีน (A) จำนวน 21.7% และเบสกวานีน (G) จำนวน 20.3% ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 10 ตำแหน่งทุกตำแหน่งเป็น singleton variable การมี singleton variable sites หมายถึงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสแค่ตัวอย่างเดียวจากหลายๆ ตัวอย่าง อาจพบการเปลี่ยนแปลงในแฮพโลไทป์

เดียว ซึ่งถือเป็น singleton variable sites ที่อาจให้ข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระดับที่ละเอียด แต่ไม่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดีเท่ากับ parsimony informative sites

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งความผันแปรของตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างหอยตลับ *M. meretrix* และ *M. astricta* ที่เก็บรวบรวมได้บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จำนวนแฮพลอไทป์เปรียบเทียบกันระหว่างแฮพลอไทป์ MA_H ตัวเลขบนลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงถึงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ (ขนาด 428 bp) จุดบ่งบอกถึงการเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ และตัวเลขที่ใสวงเล็บเป็นสัดส่วนของจำนวนของตัวอย่าง

<i>Meretrix meretrix</i>										
Haplotype	Nucleotide position									
	224	273	294							
MM_H1 (72)	A	A	C							
MM_H2 (8)	.	G	T							
MM_H3 (20)	G	.	.							
<i>Meretrix astricta</i>										
Haplotype	Nucleotide position									
	6	9	15	33	39	96	174	227	253	318
MA_H1 (20)	C	G	A	A	C	C	C	A	A	A
MA_H2 (40)	T	G	G	G
MA_H3 (20)	T	T	C	T	T	.	T	G	G	G
MA_H4 (20)	T	T	G	G	G

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหอยตลับทั้ง 2 ชนิดพันธุ์ พบว่าประชากรหอยตลับในบริเวณอ่าวไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยในชนิดพันธุ์ *M. meretrix* พบรูปแบบแฮพลอไทป์ 3 รูปแบบ ขณะที่ *M. astricta* พบรูปแบบแฮพลอไทป์ 4 รูปแบบ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างหอยตลับ *M. meretrix* และ *M. astricta* ที่เก็บรวบรวมได้บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จำนวนแฮพลอไทป์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับระหว่างแฮพลอไทป์

ตัวแทนรหัส ตัวอย่าง	การระบุชนิด	กลุ่ม	แฮพลอไทป์	ลำดับเบส
SNI 8.1	<i>M. astricta</i>	6	MA_H1	TCGTATGGAGTTGTCTATGCCTGGAACCTATTTAGATGATGCTCACTTG TATAATATGATTGTAACCTCTCACGGTTGGTAATAATTTTTTTTTTAG TAATACCCATAATGTTAGGCGGTTTTGGAAATGGTTAGTACCCCTAAT GTTGACGGCTCCTGACATAGCGTTCCACGAATAAATAATGAGTTTT TGGTTATTGGTTGTCTTTGTTTTGTTTTAGGTTCTTCTACACTGA GGCGGGAGTAGGGACAGGTTGAACCATATATCCTCCCTATCCAATAA AAATTACCATCTGGATTTCTATAAATTTTGGTTTTATCTTACATG TGGGTGGTATTTCTTCTATTGCGTCTGGAATTAATTTACAACCTCTGG TCTTTGTATGCGTCTGGAGTTATATCTTTACTT GGAGTTGTCTATGCCTGGAACCTATTTAGATGATGCTCACTTGTATAAT ATGATTGTAACCTCTCACGGTTGGTAATAATTTTTTTTTTAGTAATAC CCATAATGTTAGGCGGTTTTGGAAATGGTTAGTACCCCTAATGTTGAC GGCTCCTGACATAGCGTTCCACGAATAAATAATGAGTTTTTGGTTA TTGGTTGTCTTTGTTTTGTTTTAGGTTCTTCTATACTGAGGCGG GAGTAGGGACAGGTTGAACCATATATCCTCCCTATCCAATAGAAATTA CCATTCTGGATTTCTATAGATATTTGATTTATCTTTACATGTTGGGT GGTATTTCTTATTGCGTCTGGAATTAATTTACGACTTCTGGCTTT GTATGCGTCTGGAGTTATATCTTTACTTCACACA GAGACAGGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGAGCTAATACAGGCATAGC ACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACAAAATTTGTT GTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGACCAGAAGTC GTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCACATGTAAG ATAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATTTCTATTGGA TAAGGGAGGATATAGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCTCAGTATA GGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAACCAAAACT CATATTATTJATTCGTGGAAACGCTATGT CAGGAGCCGTCAACATTAAG GGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATAGGTATACTAAAA AAAAAATTATGACCAAAACCATGAGAAGTAACAATTAATTTATATAATG AGCATCATCTAAAATAGTACCCGGCATAGAAAGCTCTATACGAA ATTAAAATTTJCGATCAGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGACGCTAATACA GGCATAAGCACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACACA AATATTGTTGTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGAC CAGAAGTCGTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCCA CATGTAAGATAAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATT TCTATTGGATAAGGGAGGATATATGGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCC TCAGTATAGGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAAC CAAAAACCTATATTATTTATTCGTGGAAACGCTATATCAGGAGCCGTCA ACATTAAGGGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATGGGTAT TACTAAAAAATTTATTACCAACCCGTGAGAAGTTACAATCATATTA TACAAGTGAGCATCATCTAAAATAGTTCCAGGCATAGACAACCTCCATAC GAATAATAATTTCTAAAAGCCGTACCAACTAGACCAGC
PTN 12.6	<i>M. astricta</i>	9, 10	MA_H2	GGAGTTGTCTATGCCTGGAACCTATTTAGATGATGCTCACTTGTATAAT ATGATTGTAACCTCTCACGGTTGGTAATAATTTTTTTTTTAGTAATAC CCATAATGTTAGGCGGTTTTGGAAATGGTTAGTACCCCTAATGTTGAC GGCTCCTGACATAGCGTTCCACGAATAAATAATGAGTTTTTGGTTA TTGGTTGTCTTTGTTTTGTTTTAGGTTCTTCTATACTGAGGCGG GAGTAGGGACAGGTTGAACCATATATCCTCCCTATCCAATAGAAATTA CCATTCTGGATTTCTATAGATATTTGATTTATCTTTACATGTTGGGT GGTATTTCTTATTGCGTCTGGAATTAATTTACGACTTCTGGCTTT GTATGCGTCTGGAGTTATATCTTTACTTCACACA GAGACAGGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGAGCTAATACAGGCATAGC ACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACAAAATTTGTT GTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGACCAGAAGTC GTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCACATGTAAG ATAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATTTCTATTGGA TAAGGGAGGATATAGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCTCAGTATA GGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAACCAAAACT CATATTATTJATTCGTGGAAACGCTATGT CAGGAGCCGTCAACATTAAG GGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATAGGTATACTAAAA AAAAAATTATGACCAAAACCATGAGAAGTAACAATTAATTTATATAATG AGCATCATCTAAAATAGTACCCGGCATAGAAAGCTCTATACGAA ATTAAAATTTJCGATCAGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGACGCTAATACA GGCATAAGCACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACACA AATATTGTTGTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGAC CAGAAGTCGTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCCA CATGTAAGATAAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATT TCTATTGGATAAGGGAGGATATATGGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCC TCAGTATAGGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAAC CAAAAACCTATATTATTTATTCGTGGAAACGCTATATCAGGAGCCGTCA ACATTAAGGGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATGGGTAT TACTAAAAAATTTATTACCAACCCGTGAGAAGTTACAATCATATTA TACAAGTGAGCATCATCTAAAATAGTTCCAGGCATAGACAACCTCCATAC GAATAATAATTTCTAAAAGCCGTACCAACTAGACCAGC
PBI 5.1.3	<i>M. astricta</i>	8	MA_H3	GAGACAGGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGAGCTAATACAGGCATAGC ACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACAAAATTTGTT GTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGACCAGAAGTC GTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCACATGTAAG ATAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATTTCTATTGGA TAAGGGAGGATATAGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCTCAGTATA GGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAACCAAAACT CATATTATTJATTCGTGGAAACGCTATGT CAGGAGCCGTCAACATTAAG GGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATAGGTATACTAAAA AAAAAATTATGACCAAAACCATGAGAAGTAACAATTAATTTATATAATG AGCATCATCTAAAATAGTACCCGGCATAGAAAGCTCTATACGAA ATTAAAATTTJCGATCAGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGACGCTAATACA GGCATAAGCACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACACA AATATTGTTGTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGAC CAGAAGTCGTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCCA CATGTAAGATAAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATT TCTATTGGATAAGGGAGGATATATGGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCC TCAGTATAGGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAAC CAAAAACCTATATTATTTATTCGTGGAAACGCTATATCAGGAGCCGTCA ACATTAAGGGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATGGGTAT TACTAAAAAATTTATTACCAACCCGTGAGAAGTTACAATCATATTA TACAAGTGAGCATCATCTAAAATAGTTCCAGGCATAGACAACCTCCATAC GAATAATAATTTCTAAAAGCCGTACCAACTAGACCAGC
SNI 11.1	<i>M. astricta</i>	7	MA_H4	TCGTATGGAGTTGTCTATGCCTGGAACCTATTTAGATGATGCTCACTTG TATAATATGATTGTAACCTCTCACGGTTGGTAATAATTTTTTTTTTAG TAATACCCATAATGTTAGGCGGTTTTGGAAATGGTTAGTACCCCTAAT GTTGACGGCTCCTGACATAGCGTTCCACGAATAAATAATGAGTTTT TGGTTATTGGTTGTCTTTGTTTTGTTTTAGGTTCTTCTACACTGA GGCGGGAGTAGGGACAGGTTGAACCATATATCCTCCCTATCCAATAA AAATTACCATCTGGATTTCTATAAATTTTGGTTTTATCTTACATG TGGGTGGTATTTCTTCTATTGCGTCTGGAATTAATTTACAACCTCTGG TCTTTGTATGCGTCTGGAGTTATATCTTTACTT GGAGTTGTCTATGCCTGGAACCTATTTAGATGATGCTCACTTGTATAAT ATGATTGTAACCTCTCACGGTTGGTAATAATTTTTTTTTTAGTAATAC CCATAATGTTAGGCGGTTTTGGAAATGGTTAGTACCCCTAATGTTGAC GGCTCCTGACATAGCGTTCCACGAATAAATAATGAGTTTTTGGTTA TTGGTTGTCTTTGTTTTGTTTTAGGTTCTTCTATACTGAGGCGG GAGTAGGGACAGGTTGAACCATATATCCTCCCTATCCAATAGAAATTA CCATTCTGGATTTCTATAGATATTTGATTTATCTTTACATGTTGGGT GGTATTTCTTATTGCGTCTGGAATTAATTTACGACTTCTGGCTTT GTATGCGTCTGGAGTTATATCTTTACTTCACACA GAGACAGGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGAGCTAATACAGGCATAGC ACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACAAAATTTGTT GTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGACCAGAAGTC GTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCACATGTAAG ATAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATTTCTATTGGA TAAGGGAGGATATAGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCTCAGTATA GGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAACCAAAACT CATATTATTJATTCGTGGAAACGCTATGT CAGGAGCCGTCAACATTAAG GGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATAGGTATACTAAAA AAAAAATTATGACCAAAACCATGAGAAGTAACAATTAATTTATATAATG AGCATCATCTAAAATAGTACCCGGCATAGAAAGCTCTATACGAA ATTAAAATTTJCGATCAGTTAAAAGCATAGTTAAACCTGACGCTAATACA GGCATAAGCACAAACCAACAAAAACTAGTCACAGAAATACACCACACA AATATTGTTGTGCGAAGTAAAGATATACTCCAGGACGCATACAAAGAC CAGAAGTCGTAATAATTAATTCAGACGCAATAGAAGAAATACCCCA CATGTAAGATAAAATCAAATAATCTATAGAAATCCAGAATGGTAATT TCTATTGGATAAGGGAGGATATATGGTTCAACCTGTCCCTACTCCCGCC TCAGTATAGGAAGAACCTAAAAACAAAAACAAAGAACAAACCAATAAC CAAAAACCTATATTATTTATTCGTGGAAACGCTATATCAGGAGCCGTCA ACATTAAGGGTACTAACCAATTTCCAAAACCCCTAACATTATGGGTAT TACTAAAAAATTTATTACCAACCCGTGAGAAGTTACAATCATATTA TACAAGTGAGCATCATCTAAAATAGTTCCAGGCATAGACAACCTCCATAC GAATAATAATTTCTAAAAGCCGTACCAACTAGACCAGC

ตารางที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างหอยตลับ *M. meretrix* และ *M. astricta* ที่เก็บรวบรวมได้บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จำนวนแฮพลอไทป์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับระหว่างแฮพลอไทป์ (ต่อ)

ตัวแทนรหัส ตัวอย่าง	การระบุชนิด	กลุ่ม	แฮพลอไทป์	ลำดับเบส
SNI 10.1	<i>M. meretrix</i>	1, 2, 3, 4, 5	MM_H1	GGTACTATTTGGATGATGCTCATCTTTATAAATTTAGTTGTCACCTTC ATGGTTGGTAATAATTTTTTTTATAGTTATGCCGATGATACTGGGGG TTTTGGTAATGGTTGGTTCCCTTAATACTAACGGCTCCCGATAGCT TTCCCGGGTGAACAATAAAGTTTTGGTTATTAACAGGTTCTTGT TGCTTTGTTGGGGTCTCTTATGTAAGGCTGGGCTGGTACCGTT GAACTATTTATCCTCTTATCTAAAAGGAAGTATCATTCTGGGGTAC TGTTGATTATCTTATTTTATCTTTACATGTAGTGGTGCATCTCCATT ATATCGGGAATTAATTTTACTACTACAAGCTTTGCATGCGTCCGGGG TTATGCTTTGCTTCGGACTACTATGTTGTTGGTGTATGCTGTAAC TTTAGTTGTCACCTCTCATGGTTGGTAATAATTTTTTTTATAGTTATGC CGATGATACTGGGTGTTTGGTAATGGTTGGTCTTCTTAATACTAAC GGCTCCCGATAGCTTTTCCCGGGTGAACAATAAAGTTTTGGTTA TTAACAGGTTCTTGGTTGCTTTGTTGGGGTCTGCTTATGTAAGGCTG GTGCTGGTACCGGTTGAACATTTATCCTCTTATCTAAAAGGAAGTA TCATCTGGGGTACTGTTGATTATCTTATTTTATCTTGCATGTAGGT GGTGCATCTTCTATATCGGGAATTAATTTACTACTACAAGCTTT GCATGCGTCCGGGGTATGCTTTGCTTCGGACTACTATGTTGTTG GTGATTGCTGTAAGTATGTTCTTATGGTTGTCATGCTGTTTAA GCTGCTGGTTTAACTATGCTTTAACAGATCGAACTTAACTACTGCT TTTTGACCTGTTGGTTAG CGTATAGAATTTGCTATGCTGGTACTATTTGGATGATGCTCATCTTT ATAATTTAGTTGTCACCTCTCATGGTTGGTAATAATTTTTTTTATAGTT ATGCCGATGATACTGGGTGTTTGGTAATGGTTGGTCTTTAATAC TAACGGCTCCCGATAGCTTTCCCGGGTGAACAATAAAGTTTTG GTATTAACAGGTTCTTGGTTGCTTTGTTGGGGTCTGCTTATGTAAG GCTGGTGGTACCGGTTGAACATTTATCCTCTTATCTAAAAGGA AGTATCATTCTGGGGTACTGTTGATTATCTTATTTATCTTTACATGT AGGTGGTGCATCTTCCATTATATCGGGAATTAATTTACTACTACAAGT CTTGCATACGTCGGGGGTTATGCTTTGCTTCGGACTACTATGTTG TTTTGGTGTATGCTGTAAGTATGTTCTTATGGTTTGGCATGCTGT TTTAGCTGCTGGTTTAACTATGCTTTAACAGATCGAACTTAACTACT GCTTTTTTGGACCTGTTGGTTAGGTGATCCTCTTTATTTGTCATT T
SNI 9.1	<i>M. meretrix</i>	5	MM_H2	TTTTAGTTGTCACCTCTCATGGTTGGTAATAATTTTTTTTATAGTTATGC CGATGATACTGGGTGTTTGGTAATGGTTGGTCTTCTTAATACTAAC GGCTCCCGATAGCTTTTCCCGGGTGAACAATAAAGTTTTGGTTA TTAACAGGTTCTTGGTTGCTTTGTTGGGGTCTGCTTATGTAAGGCTG GTGCTGGTACCGGTTGAACATTTATCCTCTTATCTAAAAGGAAGTA TCATCTGGGGTACTGTTGATTATCTTATTTTATCTTGCATGTAGGT GGTGCATCTTCTATATCGGGAATTAATTTACTACTACAAGCTTT GCATGCGTCCGGGGTATGCTTTGCTTCGGACTACTATGTTGTTG GTGATTGCTGTAAGTATGTTCTTATGGTTGTCATGCTGTTTAA GCTGCTGGTTTAACTATGCTTTAACAGATCGAACTTAACTACTGCT TTTTGACCTGTTGGTTAG CGTATAGAATTTGCTATGCTGGTACTATTTGGATGATGCTCATCTTT ATAATTTAGTTGTCACCTCTCATGGTTGGTAATAATTTTTTTTATAGTT ATGCCGATGATACTGGGTGTTTGGTAATGGTTGGTCTTTAATAC TAACGGCTCCCGATAGCTTTCCCGGGTGAACAATAAAGTTTTG GTATTAACAGGTTCTTGGTTGCTTTGTTGGGGTCTGCTTATGTAAG GCTGGTGGTACCGGTTGAACATTTATCCTCTTATCTAAAAGGA AGTATCATTCTGGGGTACTGTTGATTATCTTATTTATCTTTACATGT AGGTGGTGCATCTTCCATTATATCGGGAATTAATTTACTACTACAAGT CTTGCATACGTCGGGGGTTATGCTTTGCTTCGGACTACTATGTTG TTTTGGTGTATGCTGTAAGTATGTTCTTATGGTTTGGCATGCTGT TTTAGCTGCTGGTTTAACTATGCTTTAACAGATCGAACTTAACTACT GCTTTTTTGGACCTGTTGGTTAGGTGATCCTCTTTATTTGTCATT T
TRT 9.1	<i>M. meretrix</i>	3, 5	MM_H3	CGTATAGAATTTGCTATGCTGGTACTATTTGGATGATGCTCATCTTT ATAATTTAGTTGTCACCTCTCATGGTTGGTAATAATTTTTTTTATAGTT ATGCCGATGATACTGGGTGTTTGGTAATGGTTGGTCTTTAATAC TAACGGCTCCCGATAGCTTTCCCGGGTGAACAATAAAGTTTTG GTATTAACAGGTTCTTGGTTGCTTTGTTGGGGTCTGCTTATGTAAG GCTGGTGGTACCGGTTGAACATTTATCCTCTTATCTAAAAGGA AGTATCATTCTGGGGTACTGTTGATTATCTTATTTATCTTTACATGT AGGTGGTGCATCTTCCATTATATCGGGAATTAATTTACTACTACAAGT CTTGCATACGTCGGGGGTTATGCTTTGCTTCGGACTACTATGTTG TTTTGGTGTATGCTGTAAGTATGTTCTTATGGTTTGGCATGCTGT TTTAGCTGCTGGTTTAACTATGCTTTAACAGATCGAACTTAACTACT GCTTTTTTGGACCTGTTGGTTAGGTGATCCTCTTTATTTGTCATT T

เมื่อพิจารณาแฮพลอไทป์ที่พบในเปลือกหอยแต่ละกลุ่มจากทั้งสองชนิดพันธุ์พบว่า *M. meretrix* มีรูปแบบแฮพลอไทป์ คือ MM_H1, MM_H2, และ MM_H3 โดย แฮพลอไทป์ MM_H1 คิดเป็น 72 เปอร์เซ็นต์ของหอยทั้งหมด ซึ่งสามารถพบได้ในหอยทั้ง 5 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะสีเปลือกและลวดลาย (ตารางที่ 4.8) แฮพลอไทป์ MM_H2 คิดเป็น 8 เปอร์เซ็นต์ พบในตัวอย่างหอยกลุ่มที่ 5 ที่มีลักษณะของสีเปลือกด้านนอกสีขาวมี escutcheon เป็นสีดำ ใน และ MM_H3 คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ พบในหอยที่มีลักษณะของสีเปลือกสีขาวและมีลายซิกแซกสีน้ำตาล (กลุ่มที่ 3) ในส่วนของ *M. astricta* มีรูปแบบแฮพลอไทป์ทั้งหมด 4 รูปแบบคือ MA_H1, MA_H2, MA_H3, และ MA_H4

แอฟลอไทป์ MA_H1 คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ พบได้ในตัวอย่างที่มีเปลือกสีเทาอมเขียว (กลุ่มที่ 1), แอฟลอไทป์ MA_H2 คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์พบในตัวอย่างหอยที่มีเปลือกสีน้ำตาลทึบไปถึงสีดำ (กลุ่มที่ 4) และเปลือกที่มีลักษณะเป็นสีออกสีน้ำตาลเหลืองมีเส้นสีดำบนเปลือก (กลุ่มที่ 5), แอฟลอไทป์ MA_H3 คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ พบในตัวอย่างหอยที่มีเปลือกสีน้ำตาลออกสีคล้ำซีดๆ (กลุ่มที่ 3), และใน MA_H4 คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ พบได้ในตัวอย่างหอยที่มีเปลือกสีเทาอมเขียว escutcheon เป็นสีดำ (กลุ่มที่ 2)

ตารางที่ 4.8 ความสอดคล้องระหว่างแอฟลอไทป์และรูปแบบของเปลือกภายนอกของหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์

ชนิด	แอฟลอไทป์	เปอร์เซ็นต์ที่พบแอฟลอไทป์	กลุ่มสีเปลือก
<i>M. astricta</i>	MA_H1	20	1
	MA_H2	40	4
			5
	MA_H3	20	3
	MA_H4	20	2
<i>M. meretrix</i>	MM_H1	72	1
			2
			3
			4
			5
	MM_H2	8	5
	MM_H3	20	3
		5	

4.3.3 ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในของหอยตลับ *M. meretrix* และ *M. astricta* พบว่า ภายในชนิดพันธุ์ *M. meretrix* มีรูปแบบแอฟลอไทป์ แสดงให้เห็นถึงระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดพันธุ์ 0.2 -0.7 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.002 – 0.007 ด้วยวิธี Tamura-Nei model และ *M. astricta* ที่มีรูปแบบแอฟลอไทป์ 4 แอฟลอไทป์ แสดงให้เห็นถึงระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดพันธุ์อยู่ที่ 0.2 -2.1 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.002-0.021 (ตารางที่ 4.9) ซึ่งระยะห่างทางพันธุกรรมที่พบครั้งนี้อยู่ในช่วงเดียวกับระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดพันธุ์ *Meretrix* คือ 0.002 – 0.007 (Hsiao et al.,

2019) แต่ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างหอยตลับ *M. meretrix* และ *M. astricta* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0269-0.292 ซึ่งสูงกว่าระยะห่างทางพันธุกรรมในสกุลเดียวกันที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ คือมีค่าอยู่ระหว่าง 0.004 – 0.169 (Hsiao *et al.*, 2019) ซึ่งการวัดระยะห่างทางพันธุกรรมเพื่อบ่งบอกถึงความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 4.9 เพอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (เหนือเส้นทแยงมุม) และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่คำนวณโดย Tamura-Nei model (ใต้เส้นทแยงมุม)

Sp. and Hap	MA_H1	MA_H2	MA_H3	MA_H4	MM_H1	MM_H2	MM_H3
MA_H1	-	0.9	2.1	1.2	22.9	22.9	23.1
MA_H2	0.009	-	1.2	0.2	22.2	22.2	22.4
MA_H3	0.021	0.012	-	1.4	21.7	21.7	22.0
MA_H4	0.012	0.002	0.014	-	22.0	22.0	22.0
MM_H1	0.287	0.275	0.269	0.272	-	0.5	0.2
MM_H2	0.288	0.276	0.270	0.273	0.005	-	0.7
MM_H3	0.292	0.28	0.273	0.276	0.002	0.007	-

และจากการศึกษาพบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดพันธุ์อยู่ในช่วงที่ต่ำกว่า 1 เพอร์เซ็นต์ บ่งชี้ว่า *M. meretrix* ในแต่ละแฮพโลไทป์อยู่ในชนิดเดียวกัน มีความหลากหลายต่ำ แสดงว่าประชากรยังคงเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน ไม่มีการแยกตัวหรือแตกแยกออกเป็นกลุ่มย่อยที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่นเดียวกันกับการศึกษาประชากร *M. meretrix* ในประเทศไทยพบความหลากหลายของแฮพโลไทป์สูง (20 แฮพโลไทป์) แต่ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ต่ำ ($\pi = 0.00161$) (Supmee *et al.*, 2020) แต่ในส่วนของชนิด *M. astricta* พบว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างแฮพโลไทป์ที่สูงกว่า *M. meretrix* ซึ่งบ่งบอกได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดสูงและอาจมีการแยกกลุ่มย่อยของประชากรภายในชนิดเดียวกัน การศึกษาด้วยเครื่องหมายอัลโลไซม์และไมโครแซทเทลไลท์ในกลุ่ม *Meretrix* พบว่าหอยบางชนิดมีโครงสร้างประชากรที่ซับซ้อน มีการแยกตัวออกเป็นกลุ่มย่อยทางพันธุกรรม และอาจมีการวิวัฒนาการที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ (Yamakawa *et al.*, 2008) และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในหอยตลับ *M. lamarckii* ที่พบที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดพันธุ์สูงกว่า *M. meretrix* โดยเฉพาะค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ที่สูงกว่า และพบการแบ่งกลุ่มย่อยทางพันธุกรรมในบางพื้นที่ในบริเวณชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของจีน พบว่ามีค่า

ความหลากหลายของแฮพลอไทป์ (haplotype diversity, $h = 0.784$) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ ($\pi = 0.00270$) สูงกว่า *M. meretrix* บางประชากร นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแยกกลุ่มย่อยทางพันธุกรรมระหว่างประชากรบางกลุ่ม นี้แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างประชากรที่ซับซ้อนกว่าและอาจมีการปรับตัวกับสภาพแวดล้อมเฉพาะถิ่น หรือมีการวิวัฒนาการที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ (Feng *et al.*, 2020)

4.3.4 การตรวจสอบชนิดพันธุ์ด้วยเทคนิคซีวโมเลกุล

จากการเปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ยีน *COI* ของดีเอ็นเอหอยตลับบริเวณอ่าวไทยใน 5 จังหวัดที่ได้กับฐานข้อมูล ด้วยวิธีการ BLAST (Basic Local Alignment system Tool) แสดงให้เห็นในตารางที่ 4.10 พบว่าตัวอย่างทั้งหมดของแฮพลอไทป์ *M. meretrix* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับหอยตลับชนิดเดียวกันในฐานข้อมูลคือ *M. meretrix* มากถึง 99.07 - 99.77 เปอร์เซ็นต์ และ *M. astricta* ที่มีตัวอย่างแฮพลอไทป์ทั้งหมด 4 แฮพลอไทป์ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับหอยตลับชนิด *M. lyrata* อยู่ที่ 78.12-79.06% และกับ *M. meretrix* อยู่ที่ 79.76-80.74%

ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันในหอยตลับชนิดพันธุ์ *Meretrix* spp. ในแต่ละของแฮพลอไทป์ *M. meretrix* จำนวน 3 แบบ และแฮพลอไทป์ *M. astricta* จำนวน 4 แบบ ที่วิเคราะห์โดยวิธีการ BLAST

Species	Sample	Query Length (bp)	Sequencing analysis		Sequencing identification	Accession number Reference
			Query cover (%)	Percent Identity (%)		
<i>M. meretrix</i>	MM_ H1	428	100	99.53	<i>Meretrix meretrix</i>	KX534255
	MM_ H2	428	100	99.07	<i>Meretrix meretrix</i>	KX534255
	MM_ H3	428	100	99.77	<i>Meretrix meretrix</i>	KX534255
<i>M. astricta</i>	MA_ H1	428	99	79.76	<i>Meretrix meretrix</i>	OK376221
			99	78.12	<i>Meretrix lyrata</i>	MN696995
	MA_ H2	428	99	80.47	<i>Meretrix meretrix</i>	OK376221
			99	78.82	<i>Meretrix lyrata</i>	MN696995
	MA_ H3	428	99	80.74	<i>Meretrix meretrix</i>	OK376221
			99	79.76	<i>Meretrix lyrata</i>	MN696995
	MA_ H4	428	99	80.71	<i>Meretrix meretrix</i>	OK376221
			99	79.06	<i>Meretrix lyrata</i>	MN696995

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. meretrix* และ *M. astricta* ในการศึกษารั้งนี้กับหอยตลับชนิดพันธุ์อื่นในสกุล *Meretrix* spp. ที่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (ตารางที่ 4.11) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. meretrix* ในการศึกษารั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทด์ของ *M. meretrix* มากที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยลำดับความคล้ายคลึงที่ต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์อาจเกิดจากการจัดจำแนกชนิดที่ผิดพลาดก่อนนำข้อมูลเข้าสู่ฐานข้อมูล NCBI (Chen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2007) เนื่องจากมีการรายงาน cryptic species ของหอยชนิดนี้ในหลายบริเวณทั่วโลก Hsiao *et al.* (2019) ทำให้การจัดจำแนกเพียงลักษณะภายนอกเป็นไปได้ยาก จึงมักต้องพิสูจน์การจัดจำแนกด้วยด้วย DNA ในทางตรงกันข้ามลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. astricta* มีความคล้ายคลึงกับหอยตลับชนิดพันธุ์อื่นในฐานข้อมูลต่ำอยู่ในช่วง 67 -76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.11) แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. astricta* ไม่สามารถจัดจำแนกเป็นชนิดหนึ่งชนิดใดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลได้เลย สอดคล้องกับที่ไม่เคยมีการบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. astricta* ในฐานข้อมูลมาก่อนจึงยืนยันได้ว่าหอย *M. astricta* สามารถพบเจอได้จริงในการศึกษารั้งนี้

ตารางที่ 4.11 Similarity Matrix ระหว่าง *M. meretrix* และ *M. astricta* ในการศึกษาครั้งนี้ กับ ลำดับ COI ของชนิดพันธุ์ *Meretrix* จำนวน 8 ลำดับที่เลือกจากฐานข้อมูล GenBank (NCBI) ซึ่งใช้สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

Species	<i>M. meretrix</i> (%)			<i>M. astricta</i> (%)				Accession number
	MM_H1	MM_H2	MM_H3	MA_H1	MA_H2	MA_H3	MA_H4	
<i>M. meretrix</i>	100 - 73	99 - 73	100 - 73	73 - 67	74 - 67	75 - 67	74 - 67	JX676166, MG698871, MF038873, KX534264, KP976276, KJ657769, JQ294057, JN898949, JN043623, JF809812, JF700174, HQ703163, HM627875, HM124578, FJ434678, EU118004, DQ399398
<i>M. petechialis</i>	79	80-79	79	74 - 71	74 - 72	74 - 73	74 - 72	JX503043, AY874530, MN308468, MN119630, KY318174, KX534315, JQ294063, HQ703187, AB853869, AB280785, HM627875
<i>M. lyrata</i>	84-81	85-81	85-82	74 - 73	75 - 74	76 - 75	76 - 74	KF009624, KX534251, KP976267, JN898944, JN043622, JN043622, HQ703198, HM124581, FJ434682, EU118002
<i>M. lusoria</i>	81 - 77	81 - 77	81 - 77	74 - 66	75 - 70	75 - 71	75 - 70	AY874532, AB853870, AB613022, AB280786, MF285227, KX534324, JQ294067, JN898936, JN043624, FJ434681, EU118003
<i>M. lamarckii</i>	83 - 79	83 - 78	83 - 79	72 - 71	74 - 72	74 - 73	74 - 73	AB059420, JN043625, HQ703191, HM124579, FJ434684, EU118001
<i>M. taiwanica</i>	79	79	80	70	71	72	71	MZ453093
<i>M. planisulcata</i>	83	83	83	71	72	72	72	KX534320
<i>M. casta</i>	82	83	83	74	75	76	75	KX608990

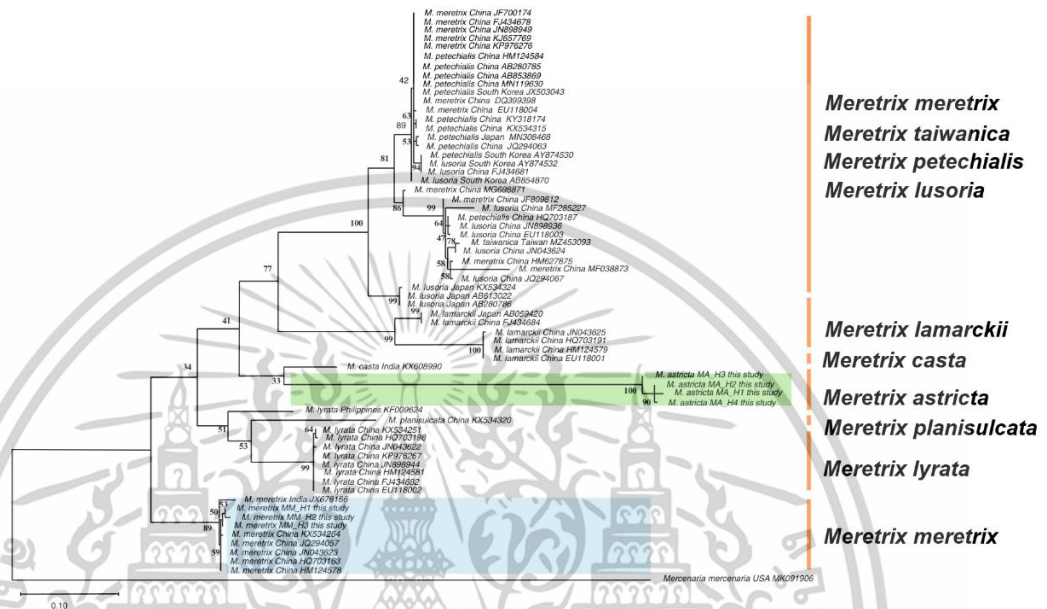
จากผลการศึกษาพบว่า *M. meretrix* และ *M. astricta* มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน การจำแนกชนิดพันธุ์หอยสองฝาด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลนั้น จะช่วยยืนยันการจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานภายนอกได้อย่างแม่นยำ โดยเฉพาะการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน COI เนื่องจากยีนนี้มีความแปรผันต่ำภายในชนิดพันธุ์เดียวกัน แต่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างชนิดพันธุ์ (Herbert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2008) โดยมีการใช้อย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์หอยตลับ (Hsiao *et al.* (2019); Yamakawa and Imai (2013); Torii *et al.* (2010) อีกทั้งยังใช้ในการจัดจำแนกหอยสองฝาใต้ทะเลลึก Vesicomidae โดยหอยครอบครัวนี้มี

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงและเปลี่ยนแปลงได้สูง ทำให้การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะภายนอกทำได้ยาก การใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถจำแนกชนิดหอย Vesicomylidae ที่มีปัญหาด้านอนุกรมวิธานจากลักษณะภายนอก (Liu and Zhang, 2018) หรือระบุชนิดของหอยแมลงภู่มะเดในวงศ์ Mytilidae ซึ่งมีความหลากหลายทางรูปร่างและสีสูง ทำให้การจำแนกชนิดด้วยลักษณะภายนอก ทำได้ยากและเกิดความผิดพลาดได้ง่าย โดยเฉพาะในกรณีของชนิดพันธุ์ต่างถิ่น (invasive species) และชนิดพันธุ์ซ่อนเร้น (cryptic species) ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก พบว่าการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล และลักษณะภายนอก จะช่วยให้การระบุชนิดของหอยแมลงภู่มะเดแม่นยำและเชื่อถือได้มากขึ้น (García-Souto *et al.*, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้

4.3.5 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยตลับ *Meretrix* spp.

จากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของหอยตลับ *Meretrix* spp. โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับข้อมูลในฐานข้อมูล สามารถแบ่งกลุ่มตามความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมได้ออกเป็น 7 Clades (รูปที่ 4.9) โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ แอพลอไทป์ *M. meretrix* จากการศึกษาี้ถูกจัดอยู่ใน Clade *M. meretrix* โดยพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. meretrix* ในประเทศจีนและประเทศอินเดีย ทั้งนี้ตัวอย่าง *M. meretrix* จากฐานข้อมูลยังถูกจัดไว้ใน clade เดียวกับ *M. taiwanica* *M. petechialis* และ *M. lusoria* ซึ่งมี bootstrap support 100% แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Meretrix* ใน Clade นี้มีจากประเทศจีน เกาหลีใต้ ญี่ปุ่น และไต้หวันซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของประชากรในภูมิภาคนี้ที่มีการวิวัฒนาการจากบรรพบุรุษร่วมกัน ทั้งนี้ Torii *et al.* (2010) ได้รายงานว่าการนำเข้าและเพาะเลี้ยงหอยตลับจากต่างถิ่นอาจส่งผลให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรหอยต่างถิ่นกับหอยตลับท้องถิ่น ซึ่งอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่อธิบายการกระจายตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. meretrix* ที่คล้ายคลึงกันในหลายประเทศ ซึ่งผลจากการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างหอยต่างถิ่นกับหอยตลับท้องถิ่น การผสมข้ามพันธุ์นี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเปลือกภายนอกจนทำให้การจัดจำแนกชนิดจากลักษณะภายนอกเกิดการสับสนได้ โดยการแยกชนิดด้วยลักษณะภายนอกของ *M. lusoria* และ *M. Petechialis* รวมถึง Taiwanese *Meretrix* ที่มีลักษณะเปลือกภายนอกที่คล้ายกันมากทั้งสี รูปร่าง ลวดลาย แต่สามารถแยกความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ และพบว่า Taiwanese *Meretrix* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจาก *M. lusoria* และ *M. petechialis* อย่างชัดเจน (Yamakawa and Imai, 2013) โดย *M. lamarckii* มีการแยกทางวิวัฒนาการกับทั้ง 4 ชนิดพันธุ์อย่างชัดเจน

ตัวอย่างของ *M. stricta* ทั้ง 4 แสพลอไทป์จากการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดเป็น sister group กับ *M. casta* บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันระหว่างทั้งสองชนิดพันธุ์นี้ เช่นเดียวกันกับ *M. planisulcata* ที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *M. lyrata*



รูปที่ 4.9 แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการถูกสร้างขึ้นโดยใช้วิธี Maximum Likelihood และแบบจำลอง Tamura-Nei สำหรับแอสพลอไทป์ *M. meretrix* จำนวน 3 แบบ และแอสพลอไทป์ *M. stricta* จำนวน 4 แบบ ร่วมกับลำดับของ *Meretrix* ssp. อื่น ๆ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหอยตลับ *M. meretrix* จากการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ *M. meretrix* จากฐานข้อมูลนั้นอยู่ใน Clade เดียวกัน (รูปที่ 4.9) ซึ่งสอดคล้องกันกับการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกชนิด และยังชี้ให้เห็นได้อีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. stricta* ทั้ง 4 แสพลอไทป์ แยก Clade ออกจากหอยตลับทุกชนิดที่เคยรายงานการแพร่กระจายในประเทศไทย และหอยตลับชนิดอื่นในฐานข้อมูล NCBI อย่างเห็นได้ชัดเจน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันว่า *M. stricta* ที่พบมีการจำแนกชนิดพันธุ์ได้ถูกต้อง

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยใช้รูปร่าง ขนาด สี ลวดลาย รวมถึงลักษณะของเปลือกภายนอกและภายใน ในการจัดจำแนกชนิดในหอยสองฝาถือได้ว่าเป็นสิ่งสำคัญ และยังคงเป็นที่ยอมรับในทางอนุกรมวิธาน แต่ในบางกรณีอาจมีข้อจำกัด การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมจะช่วยให้เพิ่มความแม่นยำ และช่วยลดข้อจำกัดของการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียวได้ โดยเฉพาะ

ในหอยสองฝาที่มีความหลากหลายหรือว่ามีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันระหว่างชนิดพันธุ์ มีการศึกษาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมในการจำแนกหอยตลับ *M. lusoria* และ *M. petechialis* สามารถแยกจำแนกหอยตลับทั้งสองชนิดได้ชัดเจนด้วยทั้งลักษณะเปลือกและข้อมูลพันธุกรรม โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีแพร่กระจายทับซ้อนกันระหว่างชนิดหรือมีการผสมข้ามพันธุ์ (Torii et al., 2010) นอกจากนี้ *M. taiwanica* เป็นหอยตลับชนิดใหม่แต่เคยถูกจำแนกชนิดผิดเป็น *M. lusoria* ก็สามารถยืนยันได้ด้วยแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการเช่นกันโดยพบว่า *M. taiwanica* เป็นชนิดพันธุ์ที่แยกจาก *M. lusoria* และ *M. petechialis* อย่างชัดเจน (Hsiao and Chuang, 2023)



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาความแปรผันทางลักษณะสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับ (*Meretrix* spp.) บริเวณอ่าวไทย พบว่าเจอหอยตลับ 2 ชนิดพันธุ์ คือ *M. meretrix* และ *M. astricta* และ *M. meretrix* พบได้มากในบริเวณอ่าวไทยตอนในและตอนกลาง แต่ไม่พบในบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง ในขณะที่ *M. astricta* พบมากในบริเวณอ่าวไทยตอนล่างและตอนกลาง แต่ไม่พบในอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ซึ่งความแตกต่างของหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์ในทางลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ามีความแตกต่างกันในขนาดและรูปร่างของเปลือกส่วนที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกหอยตลับทั้งสองชนิดพันธุ์ได้คือ ความยาวของ cardinal tooth และ ลักษณะของ pallial sinus โดย *M. meretrix* มี pallial sinus ที่มีลักษณะโค้งเว้าลึกและมีติ่งยื่นออกมา ขณะที่ *M. astricta* มี pallial sinus ตื้นกว่าและไม่มีติ่ง ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า *M. meretrix* รูปแบบแฮพโลไทป์ 3 รูปแบบ และ *M. astricta* มีรูปแบบแฮพโลไทป์ 4 รูปแบบ และการศึกษาพบว่า *M. astricta* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจาก *Meretrix* ชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูลอย่างชัดเจน และแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ *M. meretrix* รวมกลุ่มนิวคลีโอไทด์ *M. meretrix* ที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้าและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. astricta* แยก Clade ออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของหอยตลับชนิดอื่น การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและสภาพพื้นที่ทะเลที่เปลี่ยนไป มีผลต่อการกระจายตัวและความหลากหลายของหอยทั้งสองชนิดชี้ให้เห็นถึงความจำเป็นในการอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการจัดการพื้นที่ชายฝั่งทะเลและแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยตลับ เช่น การเฝ้าระวัง การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อประชากรหอยตลับ การควบคุมกิจกรรมการทำประมง และการกำหนดพื้นที่อนุรักษ์เพื่อฟื้นฟูประชากรหอยตลับบริเวณอ่าวไทย

2. ควรศึกษาความหลากหลายทางสัณฐานและพันธุกรรมเพิ่มเติมในบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับชายฝั่งทะเลอ่าวไทย และทำความเข้าใจการแพร่กระจายและความแปรผันทางสัณฐานและพันธุกรรมของหอยตลับในประเทศไทย

3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลกระทบของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม และมลพิษทางทะเล ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของหอยตลับ

4. ควรมีการส่งเสริมและพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยตลับที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพื่อลดผลกระทบจากการทำประมงจากแหล่งธรรมชาติ และสามารถเพิ่มผลผลิตในการผลิตสัตว์น้ำในระดับประเทศ



บรรณานุกรม

- ขวัญภรณ์ นกเทศ, จรรย์วดี สุริยพันธ์ และสมถวิล จิตติควร. 2564. ความหลากหลายทางชีวภาพของ สัตว์หน้าดินบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 24(1): 107-123.
- ทรงชัย สหวัชรินทร์, คมนัน ศิลปาจารย์, สุทธิโณ ลิ้มสุรัตน์ และ สมพงษ์ กลางณรงค์. 2530. การ เพาะพันธุ์หอยตลับ. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 47/2530. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัด ประจวบคีรีขันธ์*. 9 น.
- ภมรพรรณ ฉัตรภูมิ, มนตรี สุมนธา, อำนาจ ศิริเพชร, วราลี ศรีสว่าง, วิภาวดี ขำเขียว และสุดาราสัมฤทธิ์. 2564. สภาวะทรัพยากรและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตลับ (*Meretrix casta* Gmelin, 1791) ในแหล่งทำการประมงจังหวัดสมุทรสงคราม. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2564 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สมุทรสงคราม กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง*
- มนตรี สุมนธา, ประพัทธ์ แก้วมณี, วิชชิตระ โชโคช และจรรยา ฤทธิสมาน. 2562. การประมงหอยตลับขาว (*Meretrix casta* (Gmelin, 1791)) ในเขตจังหวัดระนอง. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 21/2562 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลอันดามันตอนบน กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง*
- รัตนา มั่นประสิทธิ์, กมลรัตน์ พุทธิรักษา, บุญฤทธิ์ เจริญสมบัติ, และอุดม เครือเนียม. 2552. ปัจจัย การอยู่อาศัยของหอยตลับ (*Meretrix spp.*) บริเวณชายฝั่งตำบลแหลมกลัด จังหวัดราด. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2552. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงอ่าวไทยฝั่งตะวันออก (ระยอง) สถาบันวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีประมงทะเล, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงทะเล กรมประมง*.
- สาวิกา กัลปพฤกษ์ และสิทธิ กุหลาบทอง. 2556. ความหลากหลายชนิดพันธุ์ของหอยที่พบในพื้นที่ แม่น้ำเพชรบุรีตอนล่าง. *วารสาร Veridian E-Journal*. 6(2): 976-983.
- เสถียรพงษ์ ขาวหิต และเกษม จันทร์แก้ว. 2559. ลักษณะนิเวศวิทยาสิ่งแวดล้อมเฉพาะของหอยตลับ (*Meretrix casta*, Chemnitz, 1782) บริเวณหาดเลน แหลมผักเบี้ย: โครงการ ศึกษาวิจัยและ พัฒนาสิ่งแวดล้อมแหลมผักเบี้ยอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเพชรบุรี. *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้*. 43(4): 620-631.
- เสถียรพงษ์ ขาวหิต, เกษม จันทร์แก้ว, วศิน อิงคพัฒนากุล, อรณรงค์ ผิวนิล และอนุภรณ์ บุตรสันต์. 2558. พลวัตประชากรหอย (*Meretrix casta*, Chemnitz, 1782) บริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเล แหลมผักเบี้ย โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมแหลมผักเบี้ยอันเนื่องมาจาก พระราชดำริ จังหวัดเพชรบุรี. *วารสารหน่วยวิจัย มข*. 43(4): 620-631.

- สุกัญญา สุนทร. 2549. **อิเล็กทรอนิกส์ครั้งที่ 1**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์.
- Ambarwati, R., Purnomo, T., Fitrihidajati, H., Rachmadiarti, F., Rahayu, D. A., & Faizah, U. 2021. Morphological Variations of *Meretrix* sp. from Bancaran, Madura, Indonesia. In **International Joint Conference on Science and Engineering 2021 (IJCSE 2021)**, Atlantis Press.
- Bivalves parts*. (n.d.). Kentucky Geological Survey, University of Kentucky. [Online]. Available: www.uky.edu/KGS/fossils/fossil-pelecypoda-Bivalves-parts.php
- Chen, A., Li, Z., & Feng, G. 2009. Phylogenetic relationships of the Genus *Meretrix* (Molluca: Veneridae) based on mitochondrial *COI* Gene Sequences. **Zoological research**. 30(3): 233-239.
- Chen, J., Li, Q., Kong, L., & Zheng, X. 2011. Molecular phylogeny of venus clams (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) with emphasis on the systematic position of taxa along the coast of mainland China. **Zoologica Scripta**. 40(3): 260-271.
- Feng, J., Wen, X., Guo, Y., Ye, Y., Li, J., & Guo, B. 2020. Genetic Diversity and Population Structure of Five *Meretrix lamarckii* Populations Along the Southeast China Sea. **Pakistan Journal of Zoology**. 52(4): 1415.
- Frezal, L., & Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**. 8(5): 727-736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.003>.
- García-Souto, D., Sumner-Hempel, A., Ferverza, S., Pérez-GarcíaC., Torreiro, A., R., G.-R., Eirín-López, J. M., Morán, P., & Pasantes, J. J. 2017. Detection of invasive and cryptic species in marine mussels (Bivalvia, Mytilidae): A chromosomal perspective. **Journal for Nature Conservation**. 39(58 - 67).
- Gosling, E. (2003) **Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture** [Fishing News Books]. Blackwell Publishing Ltd,.
- Gros, O., Darrasse, A., Durand, P., Frenkiel, L., & Moueza, M. 1996. Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 62(7): 2324-2330.

- Hamli, H., Idris, M. H., Abu Hena, M. K., & Rajae, A. H. 2019. Fisheries Assessment, Gametogenesis and Culture Practice of Local Bivalve: A Review. **Tropical Agricultural Science**. 42(1): 103-124.
- Hamli, H., Idris, M. H., Hena, M. K., Rajae, A. H., & Arshad, A. 2016. Inner shell as variation key of local hard clam *Meretrix* spp. **Journal of Environmental Biology**. 4: 641-646.
- Hamli, H., Idris, M. H., Rajae, A. H., & Kamal, A. H. M. 2015. Reproductive cycle of hard clam, *Meretrix lyrata* Sowerby, 1851 (Bivalvia: Veneridae) from Sarawak, Malaysia. **Tropical life sciences research**. 26(2): 59.
- Hashiguchi, M., Yamaguchi, J., & Henmi, Y. 2014. Distribution and movement between habitats with growth of the hard clam *Meretrix lusoria* in the Shirakawa–Midorikawa estuary of the Ariake Sea **Fisheries science**. 80: 687-693.
- He, C. B., Wang, J., Gao, X. G., Song, W. T., Li, H. J., Li, Y. F., Liu, W. D., & H., S. 2011. The complete mitochondrial genome of the hard clam *Meretrix meretrix*. **Molecular Biology Reports**. 38(5): 3401-3409.
- Herbert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society Biodiversitas**, London.
- Herder, E. C., Aitken, A., & Edinger, E. 2021. Temporal change in molluscan assemblages (bivalves and gastropods) of Frobisher Bay, Nunavut, Canada, over fifty years. **Arctic Science**. 8: 200-227. [https://doi.org/https://doi.org/10.1139/as-2020-0037](https://doi.org/10.1139/as-2020-0037).
- Hossain, M. Y., Uddin, M., Rahman, M. A., Haque, M. K., Kormoker, T., Samad, M. A., Tanjin, S., Rahman, M. A., Parvin, M. F., Sarmin, M. S., & Mawa, Z. 2023. Species identification, reproductive biology, and nutritional value of marine shellfish (*Meretrix lyrata*) in the Bay of Bengal. **Marine Environmental Research**. 192: 106222.
- Hsiao, S.-T., Chuang, S.-C., Chang, J.-W., Chin, C.-P., Wu, Y.-H., Su, B.-K., Yeh, H.-M., Henmi, Y., & Chen, J.-R. 2019. Preliminary studies on the habitat conditions of the Asian hard clam *Meretrix* sp. nov. (Bivalvia; Veneridae) in Tamsui river estuary, Taiwan. **proceedings of the 2019 CWMD Conference**, Japan.
- Hsiao, S. T., & Chuang, S. C. 2023. *Meretrix taiwanica* (Bivalvia: Veneridae), a previously misidentified new species in Taiwan. **Molluscan Research**. 43(1): 12-21.

- Huang, J.-F., Chou, J.-T., Lee, J.-M., & Cheng, Y.-H. 2016. Effects of Culture Area, Stocking Density, and Shrimp and Fish Polyculture on the Cost Efficiency of Hard Clam, *Meretrix meretrix*, Culture: A Case Study of Hard Clam Farms in Yunlin, Taiwan. **Journal of the World Aquaculture Society**. 47(4): 481-495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jwas.12289>.
- Huang, X., Hao, Z., Mao, J., Wang, L., Wang, X., & Tian, Y. 2024. Morphometric Analysis of Two Shell Color Strains of the Bay Scallop *Argopecten irradians*. **Fishes**. 9(7): 267.
- Huber, M. (2010) **Compendium of Bivalves: A Full Color Guide To 3300 of the World's Marine Bivalves; a Status on Bivalvia After 250 Years of Research** (Vol. 1). ConchBooks.
- Idris, M. H., Kamal, A. M., Hamli, H., Rajae, A. H., & Asif, A.-A. 2022. The molecular approach reveals the relationship among venus clams (*Meretrix* spp.) community in Malasia. **Biotropia**. 29(3): 213-224.
- Jayawickrema, E. M., & Wijeyaratne, M. J. S. 2009. Distribution and population dynamics of the edible bivalve species *Meretrix casta* (Chemnitz) in the Dutch canal of Sri Lanka. **Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences**. 14: 29-44.
- Kim, D. H., & Yoon, J. M. 2014. Genetic Distances of Three White Clam (*Meretrix lusoria*) Populations Investigated by PCR Analysis. **Development & Reproduction**. 18(2): 89-98. <https://doi.org/10.12717/DR.2014.18.2.089>.
- Kim, J. J., Kim, S. C., & Hong, H. C. 2005. Phylogeny of Veneroidea (Bivalvia: Heteroconchia) on the basis of partial mitochondrial COI sequences. NCBI (Direct Submission).
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**. 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lagade, V. M., & Muley, D. V. 2018. Traditional fishing methods and gears utilized in edible bivalve fishery at Bhatye estuary, Ratnagiri, (M.S.). **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**. 47(8): 1672-1678.
- Lin, Y.-T., Chang, F.-C., Chung, M.-T., Li, Z.-K., Chan, C.-C., Huang, Y.-S., Huang, K.-F., & Han, Y.-S. 2022. Evaluation of the Potential of the Hard Clam (*Meretrix meretrix*) Shell Which Can Be Used as the Bioindicator for Heavy Metal Accumulation. **Fishes**. 7(5): 290. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fishes7050290>.

- Liu, B., Dong, B., Tang, B., Zhang, T., & Xiang, J. 2006. Effect of stocking density on growth, settlement and survival of clam larvae, *Meretrix meretrix*. **Aquaculture**. 258(4): 334-249.
- Liu, J., & Zhang, H. 2018. DNA barcoding for species identification in deep-sea clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomysidae). **Mitochondrial DNA Part A**. 29(1): 1–11.
- Liu, P., Zhang, T., Lv, J., Ma, C., Yang, Z., Huang, X., Zhang, L., Bao, Z., & Wang, S. 2021. An efficient integrated approach for nonlethal DNA sampling and genome-wide genotyping in bivalve molluscs. **Aquaculture**. 536: 736489.
- Liu, Q., Wang, F., Meng, F., Jiang, L., Li, G., & Zhou, R. 2018. Assessment of metal contamination in estuarine surface sediments from Dongying City, China: Use of a modified ecological risk index. **Marine Pollution Bulletin**. 126: 293-303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.017>.
- Mardis, E. R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. 9: 387-402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>.
- Meng, F., Wang, F., Cheng, F., Du, X., Fu, W., Wang, Q., Yi, X., Li, Y., & Zhou, Y. 2013. The assessment of environmental pollution along the coast of Beibu Gulf, northern South China Sea: An integrated biomarker approach in the clam *Meretrix meretrix*. **Marine environmental research**. 85: 64-75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.01.003>.
- MolluscaBase. (2022). *MolluscaBase. Meretrix Lamarck, 1799* <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=204011>
- Moneva, C. S. O., Baquiano, P. M. L., Blasco, J. O., Borlaza, K. M. E., Burias, D. M. E., Flores, K. A., Fuentes, G. R. E., Pancho, A. G. E., & Sanchez, R. R. G. 2014. Comparative morphological descriptions of interior shell patterns of the venerid bivalves: *Meretrix lyrata*, *Mercenaria mercenaria* and *Venerupis philippinarum* using landmark-based geometric morphometric analysis. **AAFL Bioflux**. 7.
- Morton, B. 1983. The functional morphology of bivalve mollusc. **Proceedings of the Malacological Society of London**, London.
- Morton, B., Leung, S. E., & Leung, K. F. 2021. The biology and functional morphology of *Meretrix cf. meretrix* (Bivalvia: veneridea: Meretricinae) at Tong Fuk Min, Shui Hau, Lantau Island, Hong Kong. **Regional Studies in Marine Science**. 45.

- Murari, P. J. F., Souza, F. P. D., Oliveira, M. V. D., Oliveira, S. N. D., Povh, J. A., & Lopera-Barrero, N. M. 2018. A comparative study of four DNA extraction protocols from adductor muscle in golden mussel (*Limnoperna fortunei*) **Boletim do Instituto de Pesca**.
- Nerelovic, V., Korlevic, M., & Mravinac, B. 2016. Morphological and molecular differences between the invasive bivalve *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) and the native species *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) from the northeastern adriatic sea. **Journal of Shellfish Research**. 35(1): 1-9. <https://doi.org/10.2983/035.035.0100>.
- Oleynik, E. V., & Moshchenko, A. V. 2004. Biodiversity and abundance changes of bivalve Mollusks in 2001 compared to the end of 1980s in Peter the Great Bay, Sea of Japan. **Proceedings of the Workshop Climate Variability and Human Activities in Relation to Northeast Asian Land-Ocean Interactions and Their Implications for Coastal Zone Management**, Nanjing, China, December 4-8, 2004.
- Pan, B., Wu, Q., Yuan, Y., & Pan, H. 2007. Molecular Phylogeny of Veneridae (Mollusca Bivalvia) Based on the Sequence of Mitochondria. NCBI (Direct Submission).
- Pathirana, E., McPherson, A., Whittington, R., & Hick, P. 2019. The role of tissue type, sampling and nucleic acid purification methodology on the inferred composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) microbiome. **Journal of applied microbiology**. 127(2).
- Pereira, J. C., Chaves, R., Bastos, E., Leitão, A., & Guedes-Pinto, H. 2011. An Efficient Method for Genomic DNA Extraction from Different Molluscs Species. **International Journal of Molecular Sciences**. 12(11): 8086-8095.
- Popa, O. P., Murariu, D. U. M. I. T. R. U., & Popa, L. O. 2007. Comparison of four DNA extraction methods from invasive freshwater bivalve species (Mollusca: Bivalvia) in Romanian fauna. **Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle Grigore Antipa**. 6(527-536).
- Poutiers, J. M. (1998) **Bivalves (Acephala, Lamellibrachia, Polcypoda) in The living marineresources of the Westem Central Pacific** FAO.
- Printrakoon, C., Unajak, S., & Signorelli, J. H. 2022. Identification and Distribution of Wedge Clams (Donacidae: Bivalvia) in Thailand by Geometric Morphometric and Molecular Analysis. **Zoological Studies**. 61: 1-23.

- Rohlf, J. F. 1999. Shape Statistics: Procrustes Superimpositions and Tangent Spaces. **Journal of Classification**. 16: 197-223.
- Rueda, J. L., Marina, P., Urra, J., & Salas, C. 2009. Changes in the composition and structure of a molluscan assemblage due to eelgrass loss in southern Spain (Alboran Sea). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. 89(7): 1113-1130.
- Rufino, M. M., Gaspar, M. B., Pereira, A. M., & Vasconcelos, P. 2006. Use of shape to distinguish *Chamelea gallina* and *Chamelea striatula* (Bivalvia: Veneridae): linear and geometric morphometric methods. **Journal of Mophology** 267(12): 1433-1440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmor.10489>.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States of America.
- Sanpanich, K. 2011. Marine bivalves occurring on the east coast of the Gulf of Thailand. **ScienceAsia**. 37: 195-204. (<https://doi.org/DOI:10.2306/scienceasia1513-1874.2011.37.195>).
- Seed, R. 1969. The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. **Oecologia**. 3: 277-316
- Supmee, V., Sangthong, P., Songrak, A., & Suppapan, J. 2020. Population genetic structure of Asiatic Hard Clam (*Meretrix meretrix*) in Thailand based on Cytochrome Oxidase subunit I gene sequence. **Biodiversitas**. 21: 2702-2709.
- Suppapan, J., Sangthong, P., Songrak, A., & Supmee, V. 2021. Population genetic structure of hard clam (*Meretrix lyrata*) along the Southern coast of Thailand. **Biodiversitas**. 22: 2489-2496.
- Tan, K. S., Ong, F. S., Delta, J. D., & Julian, R. 2017. Distribution and Fishing Pressure of Hard Clam, *Meretrix Meretrix* in Marudu Bay, Sabah **International Journal of Oceans and Oceanography**. 11: 265-276.
- Thiet, C. C., & Kumar, M. S. (2008). *Clam (Meretrix lyrata) Hatchery Manual*.
- Torii, H., Sato, S. I., Hamaguchi, M., Henmi, Y., & Yamashita, H. 2010. The comparison of shell morphology and genetic relationship between *Meretrix lusoria* and *M. petechialis* in Japan and Korea. **Plankton Benthos Res**. 5: 231-241.

- Wan, R., Meng, F., Fu, W., Wang, Q., & Su, E. 2015. Biochemical responses in the gills of *Meretrix meretrix* after exposure to treated municipal effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 111: 78-85.
- Ward, R. D., Holmes, B. H., White, W. T., & Last, P. R. 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. **Marine and Freshwater Research**. 59(1): 57-71.
- Wells, F. E., Sanpanich, K., Tan, S. K., & Duangdee, T. (2021) **The Marine and Estuarine Molluscs of Thailand**.
- Yamakawa, A. Y., & Imai, H. 2012. Hybridization between *Meretrix lusoria* and the alien congeneric species *M. petechialis* in Japan as demonstrated using DNA markers. **Aquatic Invasions**. 7(3): 327-336
- Yamakawa, A. Y., & Imai, H. 2013. PCR-RFLP typing reveals a new invasion of Taiwanese *Meretrix* (Bivalvia: Veneridae) to Japan. **Aquatic Invasions** 8(4): 407-415.
- Yamakawa, A. Y., Yamaguchi, M., & Imai, H. 2008. Genetic Relationships among Species of *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) in the Western Pacific Ocean. **Pacific Science**. 62(3): 385-394.
- Yoosukh, W., & Matsukuma, A. 2001. Taxonomic study on *Meretrix* (Mollusca: Bivalvia) from Thailand. **Phuket Marine Biological Center Special Publication**. 25(2): 415-460.
- Zieritz, A., Hoffman, J. I., Amos, W., & Aldridge, D. C. 2010. Phenotypic plasticity and genetic isolation-by-distance in the freshwater mussel *Unio pictorum* Mollusca: Unionoidea). **Evolutionary Ecology**. 24: 923-938.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ- นามสกุล	นางสาวณัฐธิดา ศรีนุ่น
วัน เดือน ปีเกิด	10 กันยายน พ.ศ. 2540
ที่อยู่ปัจจุบัน	191 ม.4 ต.ทะเลน้อย อ.ควนขนุน จ.พัทลุง 93150
ประวัติการศึกษา	(2562) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2556) มัธยมศึกษาตอนปลาย (โรงเรียนควนขนุน)

