



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของ
หอยหวาน (*Babylonia areolata*) ในทะเลไทย

โดย นายสานิต ปิยพัฒนานกร

พฤษภาคม 2550

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของ
หอยหวาน (*Babylonia areolata*) ในทะเลไทย

ผู้วิจัย

นายศานิต ปิยพัฒนากร

สังกัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงาน
กองทุนสนับสนุนงานวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อภาษาไทย

หอยหวานเป็นหอยทะเลสาบเดียวที่พบกระจายทั่วไปในอ่าวไทย การสำรวจครั้งนี้ได้พบความแตกต่างของลักษณะสปีชีส์ของหอยหวานจากตัวอย่างหอยหวานที่เก็บมาจาก 8 สถานี คือ ตราด ชลบุรี ระยอง เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ลักษณะคือ น้ำตาล ส้ม ขาว สนิม และ แขนงน้ำตาลเข้ม โดยหอยสีน้ำตาลจะพบในหอยหวานที่ได้จากทุกสถานี ตรงกันข้ามหอยสีแขนงน้ำตาลเข้มจะพบเฉพาะหอยที่ได้จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เท่านั้น อีกสามสีที่เหลือจะพบกระจายอยู่ในบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันตกจากจังหวัดนครศรีธรรมราชถึงปัตตานี แต่เฉพาะสีสนิมที่มีการพบจากตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดตรังด้วย ความหลากหลายทางพันธุกรรม และ โครงสร้างพันธุกรรมของหอยทะเลชนิดนี้ได้ถูกทำการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ISSR จากการสำรวจ ISSR primer 49 ตัว มีเพียง 4 ตัวที่ให้ผลที่เชื่อถือได้ และมี polymorphisms คือ UBC 814 UBC841 UBC845 และ T8707 หลังจากที่ได้ทำการสำรวจความแปรปรวนทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยหวานจำนวน 203 ตัวอย่าง ที่ได้จาก 7 สถานี คือ ตราด ชลบุรี ระยอง เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช และสงขลา พบว่า มีแถบ DNA ที่สามารถเก็บข้อมูลได้ทั้งหมด 27 แถบ โดย 24 แถบจากทั้งหมดให้ polymorphisms ซึ่งคิดเป็น 88.89% ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างหอยหวานทั้งหมดมีค่าค่อนข้างสูง (PPB: 88.89%, H: 0.2329, I: 0.3563) ประชากรที่มีความหลากหลายสูงสุดและต่ำสุดคือ ประชากรจากจังหวัดตราด (PPB: 74.07%, H: 0.2380, I: 0.3572) และจังหวัดนครศรีธรรมราช (%PB = 40.74, H = 0.1163, I = 0.1800) ตามลำดับ ความห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรแต่ละคู่มีค่าตั้งแต่ 0.0145 ถึง 0.1276 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวานแสดงการแบ่งกลุ่มของประชากรทั้งหมดออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจนคือ อ่าวไทยตอนบน(ตราด ชลบุรี ระยอง เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์) และอ่าวไทยตอนล่าง(นครศรีธรรมราช และสงขลา) การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมของประชากรหอยหวานด้วยวิธี AMOVA ซึ่งแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละประชากร (F_{st} : 0.2602, $p < 0.001$) ระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ (F_{ct} : 0.1505, $p < 0.001$) และระหว่างพื้นที่ทั้งหมด (F_{ct} : 0.1291, $p < 0.049$) มีความสัมพันธ์ระหว่าง ความห่างทางพันธุกรรม (genetic distances) กับ ระยะความห่างทางภูมิศาสตร์ (geographical distances) ของแต่ละประชากรเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Mantel's test ($r = 0.6289$, $p = 0.008$) การพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งหมด อาจเป็นผลมาจากในแต่ละประชากรที่ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สูงซึ่งน่าจะเกิดมาจากการอพยพเข้ามาเป็นสมาชิกใหม่ของตัวอ่อนสามารถได้มาจากหลายแหล่ง หรืออาจจะมีสาเหตุมาจากการคัดเลือกทางธรรมชาติที่มีความจำเพาะต่อประชากรแต่ละประชากร ข้อมูลโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์อย่างมากในการอนุรักษ์ประชากรหอยหวานในพื้นที่ดังกล่าว

คำสำคัญ หอยหวาน พันธุกรรม ความหลากหลาย ประชากร

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Babylonia areolata is a common marine gastropod found widely distributed in the Gulf of Thailand. In this investigation, the variations in shell color patterns were found among the samples collected from eight sampling sites (Trat, Chanthaburi, Rayong, Phetchaburi, Prachuapkhirikhan, Nakorn Si Thammarat, Songkhla, and Pattani). There were five different color patterns described as brown, orange, white, rust, and dark-brown stripe. The brown samples were obtained from all sites. In contrast, the dark-brown stripe samples were found only in the samples from Prachuapkhirikhan. The other three color patterns commonly distributed on the West coast of the Gulf (from Nakorn Si Thammarat to Pattani), but samples having rust color also occur in one site from the East coast (Trad). The genetic diversity and population genetic structure of this marine species were investigated using ISSR markers. Forty nine ISSR primers were screened and four reliable and polymorphic primers (UBC 814, UBC841, UBC845, and T8707) were obtained and used. After, the investigation on genetic variation of two hundred and three spotted babylon samples from seven sites (Trat, Chanthaburi, Rayong, Phetchaburi, Prachuapkhirikhan, Nakorn Si Thammarat, and Songkhla), twenty-seven DNA bands can be scored, of which twenty-four were polymorphic (88.89%). High genetic diversity, at species level, was found (PPB: 88.89%, H: 0.2329, I: 0.3563). The highest and lowest genetic diversity within population were detected in Trat (PPB: 74.07%, H: 0.2380, I: 0.3572) and Nakorn Si Thammarat (%PB = 40.74, H = 0.1163, I = 0.1800) respectively. Pairwise genetic distances among populations ranged from 0.0145 to 0.1276. UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distances divided the populations of *B. areolata* into two groups, the upper area (Trat, Chanthaburi, Rayong, Phetchaburi, and Prachuapkhirikhan) and the southern area of the Gulf (Nakorn Si Thammarat and Songkhla). The hierarchical analysis of molecular variance tested by AMOVA showed significant genetic differentiation among the populations (F_{st} : 0.2602, $P < 0.0001$), among populations within group (F_{sc} : 0.1505, $P < 0.0001$) and among regions (F_{ct} : 0.1291, $P < 0.049$). Mantel's test showed high correlation between genetic distances and geographical distances ($r = 0.6289$, $p = 0.008$). High genetic differentiation among the populations can be effected by high genetic variation within populations, caused by various sources of larval supply or specific-local selection. The genetic structure between the populations in the upper and the South area of the Gulf of Thailand, found in this study, is useful information for the conservation of this marine gastropod species.

Keyword: *Babylonia areolata*, genetics, diversity, population

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างของหอยหวานในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน แต่จากการเก็บตัวอย่างและสอบถามข้อมูลจากชาวประมงและผู้เชี่ยวชาญพบว่าหอยหวานในบริเวณทะเลอันดามันมีในปริมาณที่น้อยมาก งานวิจัยครั้งนี้จำเป็นต้องคัดตัวอย่างประชากรหอยหวานบริเวณฝั่งอันดามันออกจากการศึกษาวิเคราะห์ตัวอย่างหอยหวานถูกเก็บจาก 8 สถานีดังนี้คือ ตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี และพบว่าหอยหวานมีลักษณะของสีเปลือกต่างกัน เท่าที่สำรวจในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถจำแนกออกเป็น 5 ลักษณะคือ สีน้ำตาล สีส้ม สีขาว สีน้ำตาลแถบเข้ม และสีสนิม โดยบริเวณอ่าวไทยตอนบนจะพบหอยสีน้ำตาลมากที่สุดโดยจะพบหอยสีสนิมปนอยู่ด้วยในตัวอย่างที่ได้จากตราดเท่านั้นซึ่งมีจำนวนไม่มาก ส่วนบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง จะพบหอยที่มีหลากหลายสีมากขึ้น โดยจะพบทั้ง 5 สี แต่หอยสีน้ำตาลแถบเข้มจะพบในตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เท่านั้น ด้วยเหตุที่ยังไม่มีการศึกษายืนยันว่าหอยที่มีสีเปลือกต่างกันนี้เป็นหอยชนิดเดียวกันหรือไม่ จึงทำให้การศึกษาค้นคว้าจำเป็นต้องเลือกศึกษาเฉพาะหอยสีน้ำตาลเท่านั้นเนื่องจากเป็นหอยที่มีการกระจายพันธุ์ทั่วทั้งอ่าวไทย และเป็นหอยที่ตลาดต้องการมากที่สุด

ในส่วนของการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม ISSR สำหรับหอยหวาน ได้มีการทดสอบ ISSR primers จำนวน 49 primers ปรากฏว่ามี ISSR primers จำนวน 4 primers คือ UBC 814 UBC 841 UBC 845 และ T8707 ที่ให้ผล ISSR profiles ที่ชัดเจน มี polymorphism และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ ISSR profiles เมื่อมีการทำปฏิกิริยา PCR ซ้ำ จากการสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยหวานทั้งหมด 203 ตัวอย่าง จาก 7 ประชากร ด้วยวิธี ISSR primer 4 ตัวพบว่า มีแถบ DNA ทั้งหมด 27 แถบ โดยขนาดของแถบ DNA อยู่ระหว่าง 270 ถึง 1100 คู่เบส และมี 24 แถบจากทั้งหมด หรือคิดเป็น 88.89% ที่ให้ polymorphism ความหลากหลายทางพันธุกรรม (gene diversity) มีค่าเท่ากับ 0.2318 ± 0.1959 และ Shannon's information index มีค่าเท่ากับ 0.3554 ± 0.2645 หากพิจารณาในระดับประชากรพบว่าเปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ที่ให้ polymorphism จะอยู่ในช่วง 40.74% ถึง 74.07% ความหลากหลายทางพันธุกรรม gene diversity (H) อยู่ในช่วง 0.1163 ± 0.1732 ถึง 0.2385 ± 0.2124 และ Shannon's information index (I) อยู่ในช่วง 0.1800 ± 0.2544 ถึง 0.3572 ± 0.2821 โดยประชากรหอยหวานที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ ประชากรจากจังหวัดตราด (%PB = 74.07, H = 0.2380 ± 0.2029 , I = 0.3572 ± 0.2821) ส่วนประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุดคือ ประชากรจากจังหวัดนครศรีธรรมราช (%PB = 40.74, H = 0.1163 ± 0.1732 , I = 0.1800 ± 0.2544) ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวาน พบว่า ค่า coefficient of genetic differentiation (Gst) มีค่าเท่ากับ 0.1810 แสดงให้เห็นว่า ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ระหว่างประชากรหอยหวานที่ทำการสำรวจในการศึกษาค้นคว้านี้มีอยู่ประมาณ 18 % ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จาก AMOVA ที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ระหว่างประชากรหอยหวานทั้งหมด และจากสัดส่วนของความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมด ประมาณ 20% เป็นสัดส่วนของ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ระหว่างประชากรหอยหวานทั้ง 7 ประชากร (among populations) ความห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0145 ถึง 0.1276 โดย ความห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากจันทบุรีกับสงขลา มีค่าความห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ 0.1276 ส่วนระหว่างประชากรจากระยองกับเพชรบุรี มีค่าน้อยที่สุดคือ 0.0145 (ดูตารางที่ 8) เมื่อนำค่าดังกล่าวมาสร้าง dendrogram เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของประชากรหอยหวานพบว่า ประชากรของหอยหวานในบริเวณอ่าวไทยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มชัดเจน โดยกลุ่มแรกคือประชากรตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ไปจนถึง จังหวัดตราด อีกกลุ่มคือประชากรหอยหวานจากจังหวัดนครศรีธรรมราช และ สงขลา แต่ภายในกลุ่มประชากรแรกโครงสร้างพันธุกรรมระหว่างประชากรฝั่งตะวันออก (ตราด จันทบุรี และ ระยอง) กับ ฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย (เพชรบุรี และ ประจวบคีรีขันธ์) ยังไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามประชากรจากจังหวัดตราดแยกออกจากประชากรอื่นภายในกลุ่มอย่าง

ชัดเจน ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลของ AMOVA เมื่อแบ่งประชากรหอยหวานทั้งหมดออกเป็น 2 พื้นที่คือ อ่าวไทยตอนบน (ตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์) และอ่าวไทยตอนล่าง (นครศรีธรรมราช และสงขลา) ซึ่งแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละประชากร ($p < 0.001$) ระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ ($p < 0.001$) และระหว่างพื้นที่ทั้งหมด ($p < 0.049$) ข้อมูลข้างต้นถือว่ามีประโยชน์ต่อการวางแผนการจัดการทรัพยากรหอยหวานในอ่าวไทย โดยเฉพาะการปล่อยพันธุ์หอยหวานกลับคืนสู่แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ แต่หากจะทำการอนุรักษ์หอยหวานอย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรหอยหวานเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมรูปแบบอื่น เพื่อยืนยันผลดังกล่าว และชีววิทยาที่สำคัญบางประการเช่น การสืบพันธุ์วางไข่ เป็นต้น

1 บทนำ

หอยหวาน (*Babylonia areolata*) เรียกอีกชื่อว่า หอยตุ๊กแก หรือ หอยเทพรส จัดเป็นหอยทะเลฝาเดียวที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ชนิดหนึ่งของประเทศไทย (Panichasuk, 1996) ลักษณะภายนอกที่สังเกตได้ง่ายคือ เปลือกค่อนข้างหนา มีลักษณะเป็นรูปทรงไข่ ผิวเรียบพื้นสีขาว มีแฉกปร่าร่างคล้ายสีเหลี่ยมสีน้ำตาลดำเรียงเป็นแถวสามแถวบนวงลำตัว บริเวณส่วนปลายสุดแหลม บริเวณส่วนหัวขาดเป็นเกลียวจะมีร่องตื้นๆปรากฏอยู่ ซึ่งบริเวณร่องนี้สามารถใช้จำแนกหอยหวานออกจากหอยหมาก (*B. spirata*) โดยหอยหมากจะมีร่องที่ลึกกว่า โดยทั่วไปหอยหวานอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งที่มีพื้นทะเลเป็นทรายหรือทรายปนโคลนที่ระดับความลึก 10-20 เมตร สำหรับในประเทศไทยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามแนวชายฝั่งของอ่าวไทย ตั้งแต่จังหวัดจันทบุรี รัชของ เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ไปถึงปัตตานี และนราธิวาส และทะเลอันดามัน ในบริเวณจังหวัดระนอง และสตูล (นิลนาถ ชัยชนาวิสุทธิ และ ศิริยา กฤษณะพันธุ์, 2545) ในปัจจุบันปริมาณหอยชนิดนี้ได้ลดลงอย่างมาก เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับหอยหวานในประเทศไทยที่ผ่านมามุ่งเน้นไปทางด้านการเพาะเลี้ยงเป็นหลัก (Chaitanawisuti and Kritsanapuntu, 1997a, b, 1999, 2000; Chaitanawisuti *et al.*, 2001a,b, 2002) โดยการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงได้อาศัยข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาและนิเวศวิทยาที่ได้มีการศึกษาไว้ในหอยหมาก (*B. spirata*) เป็นส่วนใหญ่ เช่น ความรู้ทางชีววิทยาทั่วไป (Thirumavalavan, 1987) พฤติกรรมการสืบพันธุ์ (Kannapiran, 1994) การทนต่อความเค็ม (Patterson *et al.*, 1994) และการเลือกอาหาร (Patterson *et al.*, 1995) เป็นต้น ปัจจุบันการพัฒนากการเพาะเลี้ยงหอยหวานมีความก้าวหน้าไปมาก แต่การทำการประมงหอยหวานก็ยังคงมีการดำเนินการอยู่เนื่องด้วยปริมาณหอยหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค และพ่อแม่พันธุ์ส่วนใหญ่ยังเป็นหอยที่จับมาจากธรรมชาติ ดังนั้นการอนุรักษ์ประชากรของหอยหวานในธรรมชาติก็ยิ่งถือว่ามีความสำคัญอย่างมากต่อการรักษาสมดุลของระบบนิเวศที่หอยหวานอาศัยอยู่และการทำการประมงหอยหวานที่ยั่งยืน ในด้านการอนุรักษ์นั้นข้อมูลด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหอยชนิดนี้เป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะข้อมูลในเรื่องพลวัตประชากรและโครงสร้างประชากร ซึ่งสามารถนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการสำรวจได้ เนื่องจากการทำการสำรวจและติดตามภาคสนามของการศึกษาประเภทนี้กระทำได้ค่อนข้างลำบาก โดยเฉพาะในสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งส่วนใหญ่มีตัวอ่อนที่เป็นแพลงก์ตอนและระบบนิเวศวิทยาทางทะเลยังถือว่าเป็นระบบเปิดอีกด้วย

เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากรของสิ่งมีชีวิตมีอยู่หลากหลายวิธีแต่สามารถแบ่งออกได้ สองประเภทใหญ่ๆคือ เทคนิคที่ใช้ DNA hybridisation เป็นเทคนิคพื้นฐาน เช่น multi-locus minisatellites (Jeffreys *et al.*, 1985, Bruford *et al.*, 1998) อีกเทคนิคหนึ่งใช้ PCR เป็นเทคนิคพื้นฐาน เช่น Microsatellites (Amour *et al.*, 1994, David and Menotti-Raymond, 1998), RAPDs (Williams *et al.*, 1990, Hadrys *et al.*, 1992) และ ISSR (Zietckiewicz *et al.*, 1994) เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิคที่มี PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานมีความนิยมในการใช้สูงกว่าเนื่องจากข้อได้เปรียบหลายอย่างเช่น ต้องการปริมาณ DNA template ที่น้อย ขั้นตอนในการทำงานไม่ซับซ้อน ประหยัดเวลาในการทำงาน เทคนิค Inter-simple sequence repeat (ISSR) เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อน ให้ระดับของ polymorphism ค่อนข้างสูง ไม่ต้องอาศัยข้อมูลลำดับรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา และไม่ไวต่อปัจจัยที่เปลี่ยนแปลงในการทำปฏิกิริยา PCR เหมือน RAPD เนื่องจากการมี primer ที่ยาวกว่าซึ่งส่งผลให้สามารถใช้อุณหภูมิ annealing ที่สูงกว่าได้ หลักการของเทคนิค ISSR ก็เหมือนการทำปฏิกิริยา PCR ทั่วไปเพียงแต่มีข้อแตกต่างคือการใช้ primer ที่มี microsatellite sequence อยู่โดยที่ปลายด้าน 3' ของ primer จะมีการเติม 1 ถึง 3 นิวคลีโอไทด์เข้าไป ตัวอย่างเช่น (AG)_nGC, (AT)_nG หรือ (GT)_nACG เป็นต้น ดังนั้นปัจจัยสำคัญของเทคนิค ISSR คือ การหา ISSR primers

ทำให้ผลดี ซึ่ง primer ที่จะนำมาทดสอบสามารถนำมาจาก primer ที่มีรายงานการใช้มาก่อน โดยเฉพาะการใช้กับกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา(ในด้านวิวัฒนาการ) หรือออกแบบ primer ขึ้นมาเองก็ได้

ได้มีการใช้เทคนิคด้านอนุชีววิทยาศึกษานิเวศวิทยาและโครงสร้างประชากรของหอยหลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Littorina striata* (De Wolf *et al.*, 1998), *Congeria kuscieri* (Stepien *et al.*, 2001), *Chorus giganteus* (Gajardo *et al.*, 2002), *Arctica islandica* (Holmes *et al.*, 2003), *Littorina saxatilis* (Johannesson *et al.*, 2004) และ *Abra tenuis* (Holmes *et al.*, 2004) สำหรับในทะเลไทยได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือ (*Haliotis asinina*) และได้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อหอยเป่าฮือ 3 ชนิดคือ *Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* และ *Haliotis varia* (Klinbunga *et al.*, 2003a) หอยนางรมเป็นหอยอีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาทั้งในด้าน การจำแนกชนิดโดยวิธี PCR-RFLP และ RAPD (Klinbunga *et al.*, 2000, Klinbunga *et al.*, 2003b) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (Klinbunga *et al.*, 2001a) นอกจากนี้ยังมีการใช้ Allozyme ในการจำแนกชนิดของหอยนางรมสกุล *Saccostrea* อีกด้วย (Day *et al.*, 2000) สำหรับหอยสกุล *Babylonia* มีการใช้เทคนิค allozyme ร่วมกับลักษณะของส่วนต่างๆของร่างกายในการจำแนกชนิดระหว่าง *Babylonia formosae formosae* กับ *B. formosae habei* (Liu and Chiu, 1998) และจากการค้นหาข้อมูลทางพันธุกรรมของหอยสกุลนี้ในฐานข้อมูลของ Genbank มีเพียงลำดับเบสของยีน cytochrome oxidase subunit I ใน mtDNA ของ *B. japonicus* เท่านั้น ยังไม่พบการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากรของหอยหวาน (*B. areolata*) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทะเลไทย

การศึกษครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรม และ โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของ หอยหวานในทะเลไทย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการวางแผนการอนุรักษ์ และเครื่องหมายพันธุกรรมที่ พัฒนาขึ้นมาจากการทำวิจัยครั้งนี้จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการจัดการเกี่ยวกับพ่อแม่พันธุ์หอยหวานในฟาร์มได้ในอนาคต

2 วิธีดำเนินการ

2.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างหอยหวานในการศึกษครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 3 พื้นที่คือ อ่าวไทยตอนบน (จังหวัดตราด ถึง จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์) อ่าวไทยตอนล่าง (จังหวัดสุราษฎร์ธานี ถึง จังหวัดนราธิวาส) และ ฟังทะเลอันดามัน โดยจะเก็บ 3-5 แห่ง ประชากรต่อพื้นที่ดังกล่าว (รูปที่ 1) กล้ามเนื้อเท้าของหอยจะถูกตัดเพียงเล็กน้อย แล้วเก็บรักษาไว้ใน 95% เอทานอล ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสโดยเร็วที่สุดเพื่อรอการนำไปใช้ในงานด้านอนุชีววิทยาต่อไป

2.2 การสกัดสารพันธุกรรม

นำเนื้อเยื่อเท้าของหอยที่ถูกเก็บรักษาไว้ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ออกมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณเท่าหัวไม้ จิตไฟแล้วใส่ไว้ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ หลังจากนั้นเติม TEN (0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 0.05M EDTA, 0.2M NaCl) บัฟเฟอร์ ที่มี 1% (w/v) SDS ผสมอยู่ จำนวน 230 μ l และ เติม Proteinase K (10 mg/ml) จำนวน 20 μ l ลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเติม 250 μ l 2 % CTAB buffer [2% (w/v) of CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) 0.1 M Tris (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA, 0.002% (v/v) β -mercaptoethanol] ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มต่อที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจาก

นั้น เติม 6M NaCl 200 μ l ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง ที่ระดับความเร็ว 14000 rpm นาน 10 นาที จะเห็นว่ามีการเหวี่ยงสีขาว



รูปที่ 1 แผนที่แสดงสถานที่ที่คาดว่าจะมีการเก็บตัวอย่าง (1= จันทบุรี 2=ระยอง 3=ชลบุรี 4=สมุทรสงคราม 5=เพชรบุรี 6=ประจวบคีรีขันธ์ 7=สุราษฎร์ธานี 8=นครศรีธรรมราช 9=สงขลา 10=สตูล 11=กระบี่ 12=ระนอง)

อยู่ด้านบนของสารละลาย ให้ดูดสารละลายใสด้านล่างแล้วนำไปใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ หลังจากนั้นเติมนั่น Phenol:Chloroform (1:1) ปริมาณ 700 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง ที่ระดับความเร็ว 14000 rpm นาน 10 นาที สารละลายในหลอดจะแบ่งออกเป็น 2 ชั้น ดูดสารชั้นบนและนำไปใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ เติมนั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (ethanol) และผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ไว้ที่ -20°C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนสารพันธุกรรม หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง ที่ระดับความเร็ว 14000 rpm นาน 20 นาที เทสารละลายออก แล้วเติมนั่น 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (ethanol) ปริมาณ 700 μ l เพื่อล้างตะกอนของสารพันธุกรรม นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง ที่ระดับความเร็ว 14000 rpm นาน 10 นาที เทสารละลายออก แล้วเติมนั่น 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (ethanol) ปริมาณ 500 μ l นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง ที่ระดับความเร็ว 14000 rpm นาน 10 นาที เทสารละลายออก เพื่อล้างตะกอนเป็นครั้งที่ 2 ตากตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมนั่น 20 μ l TE บัฟเฟอร์ เพื่อละลายสารพันธุกรรม

สารพันธุกรรมในรูปสารละลายที่ได้ถูกนำมาตรวจวัดคุณภาพและปริมาณด้วยวิธี gel electrophoresis โดยผสมสารพันธุกรรม 1 μ l กับน้ำ 7 μ l และ loading buffer (orange G ใน 40เปอร์เซ็นต์ glycerol) แล้วโหลดลงใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel พร้อมกับ λ DNA ที่ทราบความเข้มข้น เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการประเมินความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 60 โวลต์

2.3 ISSR-PCR

ISSR primers ถูกนำมาทดสอบกับตัวอย่างหอยหวาน โดยใช้ PCR condition ที่เหมือนกันดังนี้คือ ใน ปฏิกริยา PCR ที่มีปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 1x PCR buffer (Fermentas) 2.0 mM MgCl_2 0.25mM DNTP's 25 pmol Primer 1 unit *Taq* polymerase (Fermentas) และ 10-20 ng DNA template PCR cycle ประกอบด้วย 95°C 5 นาที ตามด้วย 45 รอบของ 95°C 45

วินาที 45°C 45 วินาที และ 72 °C 2 นาที จบด้วย 72 °C 10 นาที หลังจากการทดสอบ ISSR primers แล้ว เฉพาะ primers ที่ให้ ISSR profiles ที่คาดว่าจะสามารถนำมาใช้ในการศึกษารังนี้ได้ จะถูกนำมาปรับ PCR condition เพื่อให้ได้ ISSR profiles ที่ชัดเจนขึ้น โดยจะปรับในส่วนของ annealing temperature และ ความเข้มข้นของ MgCl₂ เท่านั้น พารามิเตอร์ตัวอื่นจะไม่ปรับ เนื่องจากมีผลค่อนข้างน้อยต่อปฏิกิริยา PCR

ผลผลิตของ ISSR PCR ที่ได้ตรวจเช็คด้วยวิธี gel electrophoresis โดยผลผลิตทั้ง 25µl จะถูกผสมกับ 5µl loading buffer (Orange G ใน 40 เปอร์เซ็นต์ Glycerol) แล้วโหลดลงใน 2.0 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel และมี 100bp DNA ladder (Hyper Ladder II, BIONLINE) เป็น DNA มาตรฐานในการบอกขนาดของผลผลิต PCR โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลถูกเก็บรวบรวมในรูปแบบของการมีและไม่มีแถบของ ISSR profiles ที่ได้รับจากตัวอย่างทั้งหมด ในแต่ละ primer โดยตัวเลข 1 แทนการมีแถบ และ 0 แทนการไม่มีแถบ โดย gene diversity (Nei, 1987) Shannon's information index (Lewinton, 1972) pairwise genetic distances (Nei, 1972) และ coefficient of genetic differentiation ระหว่างประชากรทั้งหมด (Gst) (Nei, 1973) สามารถประเมินได้โดยคอมพิวเตอร์โปรแกรม POPGENE (Yeh et al., 1997) ข้อมูล Pairwise genetic distances จะถูกนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวาน (dendrogram) โดยใช้ Phylip (Felsenstein, 1989) และ โปรแกรม Treeview (Page, 1996) ถูกนำมาใช้ในการแปลง Tree file เป็น dendrogram การสำรวจความสัมพันธ์ของ genetic distances กับ geographical distances สามารถทำได้ด้วยวิธี Mantel's test (permutation 10000 ครั้ง) โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม Arlequin version 3.01 (Excoffier et al., 2005) สำหรับข้อมูล geographical distances ได้จากการวัดระยะทางที่ใกล้ที่สุดระหว่างประชากรโดยใช้ โปรแกรม Google Earth

ลำดับชั้นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากร (Hierarchical relationship) จะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of molecular variance (AMOVA) โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม Arlequin version 3.01 โดยจะวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรทั้งหมด (among population) และแบ่งประชากรออกเป็น 2 กลุ่มคือ (ตราด จันทบุรี และ ระยอง) และอ่าวไทยตอนบน (ตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์) และอ่าวไทยตอนล่าง (นครศรีธรรมราช และสงขลา) โดยทดสอบแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละประชากร (within populations) ระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ (among population within regions) และระหว่างพื้นที่ทั้งหมด (among regions) ซึ่งการทดสอบนัยสำคัญสำหรับการวิเคราะห์ประเภทนี้สามารถทำได้โดยวิธี permutation ซึ่งทำให้ไม่จำเป็นต้องมีการสมมุติว่าข้อมูลมีการกระจายแบบ normal distribution เพราะการกระจายของข้อมูลจะได้จากการ permutation ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ permute 10000 ครั้ง

3 ผลการทดลอง

3.1 การเก็บและรวบรวมตัวอย่าง

ตามที่ได้มีการวางแผนการเก็บตัวอย่างทั้งในบริเวณอ่าวไทยและทะเลอันดามันนั้น ปรากฏว่าในฝั่งอันดามันไม่พบการกระจายตัวของหอยหวาน (*B. areolata*) (ถ้ามีก็จะมีในปริมาณที่น้อยมาก) จึงทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างจากฝั่งอันดามันได้และมีความจำเป็นต้องตัดสถานีเก็บตัวอย่าง สตูล กระบี่ และระนองออกไป ส่วนใหญ่หอยสกุล *Babylonia* ที่พบเป็นจำนวนมากในบริเวณดังกล่าวคือ หอยหมาก (*B. spirata*) สำหรับการเก็บตัวอย่างฝั่งอ่าวไทย สถานีเก็บตัวอย่างอาจจะไม่ตรง

กับแผนที่วางไว้แต่ก็จะครอบคลุมพื้นที่ทั้งอำเภอตามที่ได้วางแผนไว้โดยจำนวนตัวอย่างหอยหวานที่เก็บจะอยู่ระหว่าง 40-50 ตัว ยกเว้นตัวอย่างจากปัตตานีซึ่งรวบรวมมาได้เพียง 18 ตัวอย่าง (ดูตารางที่ 1) ประกอบ

จากตัวอย่างหอยที่รวบรวมได้พบว่าหอยหวานมีลักษณะของสีเปลือกต่างกัน โดยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้จำแนกออกเป็น 5 ลักษณะคือ สีน้ำตาล สีส้ม สีขาว สีน้ำตาลแถบเข้ม และสีสนิม (ดู รูปที่2) โดยบริเวณอำเภอไทยตอนบนพบหอยสีน้ำตาลมากที่สุดและพบหอยสีสนิมปนอยู่ด้วยในตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดตราดเท่านั้นซึ่งมีจำนวนไม่มาก ส่วนบริเวณอำเภอไทยตอนล่าง จะพบหอยที่มีหลากหลายสีมากขึ้นโดยจะพบทั้ง 5 สี แต่หอยสีน้ำตาลแถบเข้มพบมากในตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ดู ตารางที่ 2 และ รูปที่ 2 และ 3 ประกอบ)

ตารางที่ 1 สถานีเก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละสถานี (*สถานีที่อยู่ฝั่งอันดามัน)

ลำดับที่	สถานที่เก็บตัวอย่างตามแผนเดิม	สถานที่เก็บตัวอย่างจริง	พิกัด	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ (ตัว)
1	-	หาดเล็ก, คลองใหญ่, ตราด	11° 46' 38.79" N 102° 52' 38.05" E	40
2	จันทบุรี	ท่าแฉลบ, หาดเจ้าหลาว, จันทบุรี	12° 34' 19.72" N 101° 53' 38.48" E	50
3	ระยอง	บ้านเพ, ตะพง, ระยอง	12° 36' 47.65" N 101° 25' 23.87" E	50
4	ชลบุรี	-		-
5	สมุทรปราการ หรือสมุทรสงคราม	-		-
6	เพชรบุรี	ชะอำ, หาดเจ้าสำราญ, เพชรบุรี	12° 48' 48.78" N 99° 59' 44.70" E	40
7	ประจวบคีรีขันธ์	บางสะพาน, ประจวบคีรีขันธ์	11° 11' 54.91" N 99° 31' 31.65" E	45
8	สุราษฎร์ธานี	-		-
9	นครศรีธรรมราช	ลิซล, นครศรีธรรมราช	8° 58' 58.51" N 99° 54' 54.29" E	65
10	สงขลา	จะนะ สมิหราและนาทับ, สงขลา	6° 58' 27.67" N 100° 46' 42.91" E	65
11	สตูล*	-		-
12	กระบี่*	-		-
13	ระนอง*	-		-
14	-	หาดตะโกละโป,ปัตตานี	6° 53' 56.27" N 101° 22' 26.15" E	18

ตารางที่ 2 จำนวนของหอยหวาน โดยแยกออกเป็นแต่ละกลุ่มของสีเปลือก

สถานี	สีน้ำตาล	สีส้ม	สีขาว	สีสนิม	สีน้ำตาล แถบเข้ม	รวม
ตราด	32	-	-	8	-	40
จันทบุรี	50	-	-	-	-	50
ระยอง	50	-	-	-	-	50
เพชรบุรี	40	-	-	-	-	40
ประจวบคีรีขันธ์	35	-	-	-	10	45
นครศรีธรรมราช	38	8	19	-	-	65
สงขลา	30	18	7	10	-	65
ปัตตานี	9	5	3	1	-	18



ก



ข



ค

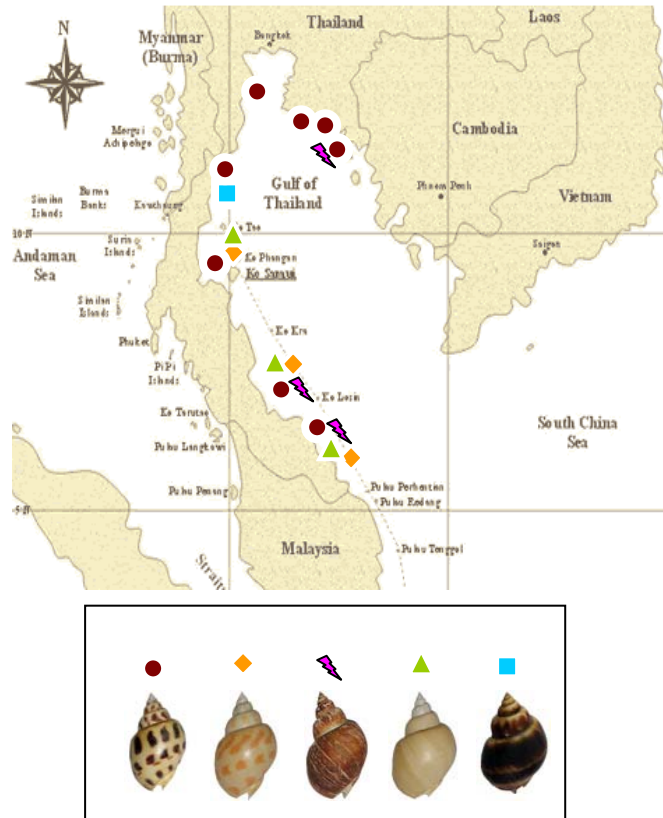


ง



จ

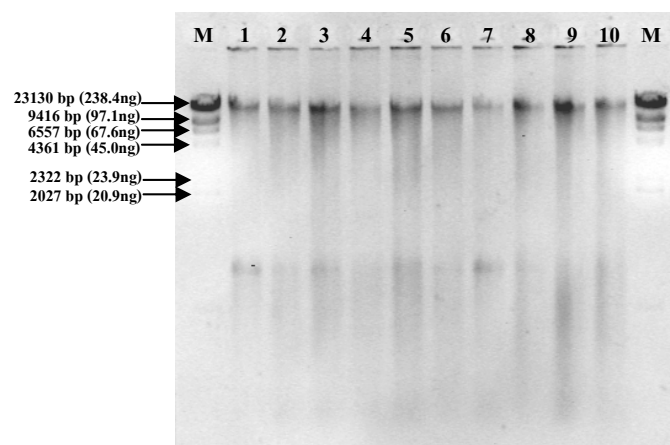
รูปที่ 2 แสดงลักษณะสีเปลือกของหอยหวาน (ก. สีน้ำตาล ข. สีส้ม ค.สีสนิม ง.สีขาว และ จ.สีน้ำตาลแถบเข้ม)



รูปที่ 3 แสดงการกระจายพันธุ์ของหอยหวานสีต่างๆในอ่าวไทย

3.2 การสกัดสารพันธุกรรม

การสกัดสารพันธุกรรมจากกล้ามเนื้อเท้าของหอยหวานที่เก็บไว้ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol สามารถทำได้โดยวิธี CTAB extraction สารพันธุกรรมที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ และคุณภาพดี (ไม่แตกหัก) โดยปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จะอยู่ที่ประมาณ 50-100 ng/μl (ดูรูปที่ 4)



รูปที่ 4 สารพันธุกรรม (DNA) ที่สกัดได้ (M = λ Hind III DNA marker 1-9 = สารพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง)

3.3 ISSR-PCR

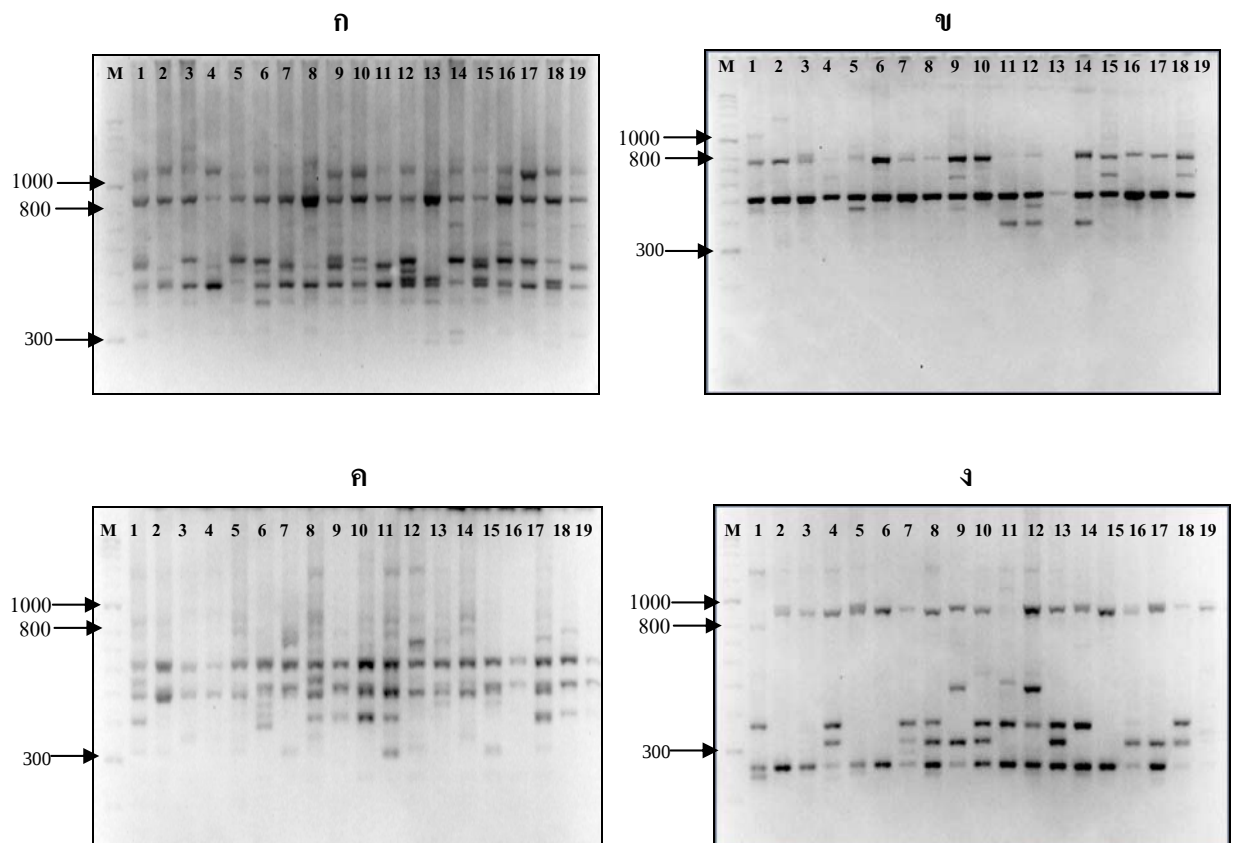
จากการทดสอบ ISSR primers จำนวน 49 primers (ตารางที่3) กับตัวอย่างหอยหวาน 5 ตัวอย่าง พบว่ามี ISSR primers ที่น่าจะนำมาใช้ในการศึกษาได้ 8 primers ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 (ตัวอักษรเอียง) หลังจากที่น่าสนใจ ISSR primers ทั้ง 8 มาปรับ PCR condition เหลือเพียง 4 primers ที่ให้ ISSR profiles ที่ชัดเจน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ ISSR profiles เมื่อมีการทำปฏิกิริยา PCR ซ้ำกับตัวอย่างเดิม (ดูรูปที่ 5) โดยพารามิเตอร์ของปฏิกิริยา PCR สำหรับแต่ละ Primer ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ISSR primers ที่ใช้ทดสอบ

ลำดับ	ชื่อ	ลำดับเบส (5'-3')	ลำดับ	ชื่อ	ลำดับเบส (5'-3')
1	UBC809	(AG)8G	26	T8711	(CA)7YG
2	UBC811	(GA)8C	27	T8712	(GA)8AT
3	UBC827	(AC)8G	28	T8713	(CT)8G
4	SAS1	(GIG)4C	29	T8714	(GT)6RG(CT)8T
5	<i>SAS3</i>	<i>(GAG)4C</i>	30	T8715	(GA)6C
6	<i>UBC814</i>	<i>(CT)8TG</i>	31	T8716	(CA)6C
7	844A	(CT)8AC	32	T8717	(CA)6T
8	844B	(CT)8GC	33	T8718	(GA)6T
9	17898A	(CA)6AC	34	UBC-813	(CT)8T
10	17898B	(CA)6GT	35	UBC-814	(CT)8A
11	17899A	(CA)6AG	36	UBC-824	(CT)8G
12	<i>HB12</i>	<i>(AC)3GC</i>	37	<i>UBC-845</i>	<i>(CT)8RG</i>
13	<i>HB13</i>	<i>(GAG)3GC</i>	38	<i>UBC-840</i>	<i>(GA)8YT</i>
14	HB14	(CTC)3GC	39	UBC-848	(CA)8RG
15	HB15	(GIG)3GC	40	TL01	(CAG)5
16	T8701	(CT)8RA	41	TL02	(CAA)5
17	T8702	(AG)7YC	42	TL03	(GACA)4
18	T8703	(GT)6YR	43	TL04	(GATA)4
19	T8704	(GT)6AY	44	UBC812	(GA)8A
20	T8705	CAA(AG)5	45	UBC826	(AC)8C
21	T8706	GGGC(GA)8	46	<i>UBC841</i>	<i>(GA)8YC</i>
22	<i>T8707</i>	<i>(GAG)4RC</i>	47	UBC857	(AC)8YC
23	T8708	(GA)7RG	48	UBC818	(CA)8G
24	T8709	(GT)7YG	49	UBC868	(GAA)6
25	T8710	(CA)7YC			

ตารางที่ 4 ISSR primers ที่ให้ ISSR profiles ที่ดี Annealing temperature ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม สำหรับแต่ละ Primer จำนวนแถบ DNA จำนวน polymorphic bands (PB) และขนาดของผลผลิต PCR

Primers	ลำดับเบส (5'-3')	Annealing temperature (°C)	ความเข้มข้น $MgCl_2$ (mM)	จำนวน แถบ DNA ทั้งหมด	จำนวน PB	ขนาดของ ผลผลิต PCR (bp)
UBC814	(CT)8TG	52	2.0	6	5	440-1100
UBC841	(GA)8YC	58	2.0	6	6	570-1000
UBC845	(CT)8RG	54	2.0	8	8	270-900
T8707	(GAG)4RC	51	2.0	7	5	390-630



รูปที่ 5 ISSR profiles ของไพรเมอร์ (primer) 814 (ก) 841 (ข) T8707 (ค) และ 845 (ง) (M= 100bp ladder DNA marker (hyperladder) 1-19 = ISSR profiles ของตัวอย่างหอยหวานแต่ละตัวอย่าง)

3.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยหวานทั้งหมด 203 ตัวอย่าง จาก 7 ประชากร ด้วยวิธี ISSR พบว่า มีแถบ DNA ทั้งหมด 27 แถบ เกิดจาก ISSR primer 4 ตัว โดยขนาดของแถบ DNA อยู่ระหว่าง 270 ถึง 1100 คู่เบส และมี 24 แถบจากทั้งหมด หรือคิดเป็น 88.89% ที่ให้ polymorphism ความหลากหลายทางพันธุกรรม (gene diversity) มีค่าเท่ากับ 0.2318 ± 0.1959 และ Shannon's information index มีค่าเท่ากับ 0.3554 ± 0.2645 (ดูตารางที่ 5)

หากพิจารณาในระดับประชากรพบว่าเปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ที่ให้ polymorphism จะอยู่ในช่วง 40.74% ถึง 74.07% ความหลากหลายทางพันธุกรรม gene diversity (H) อยู่ในช่วง 0.1163 ± 0.1732 ถึง 0.2385 ± 0.2124 และ Shannon's information index (I) อยู่ในช่วง 0.1800 ± 0.2544 ถึง 0.3572 ± 0.2821 โดยประชากรหอยหวานที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ ประชากรจากจังหวัดตราด (%PB = 74.07, H = 0.2380 ± 0.2029 , I = 0.3572 ± 0.2821) ส่วนประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุดคือ ประชากรจากจังหวัดนครศรีธรรมราช (%PB = 40.74, H = 0.1163 ± 0.1732 , I = 0.1800 ± 0.2544) (ดูตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยหวาน *B. areolata* (PB: polymorphic bands, H: gene diversity (Nei, 1987, I: Shannon information index (Lewinton, 1972))

ประชากร	จำนวน ตัวอย่าง (ตัว)	จำนวน PB	เปอร์เซ็นต์ PB (%)	H	I
ตราด	29	20	74.07	0.2380 ± 0.2029	0.3572 ± 0.2821
จันทบุรี	26	17	62.96	0.2064 ± 0.2101	0.3080 ± 0.2950
ระยอง	33	16	59.26	0.1708 ± 0.1934	0.2621 ± 0.2752
เพชรบุรี	34	18	66.67	0.2142 ± 0.1999	0.3244 ± 0.2802
ประจวบคีรีขันธ์	31	19	70.37	0.2385 ± 0.2124	0.3526 ± 0.2969
นครศรีธรรมราช	22	11	40.74	0.1163 ± 0.1732	0.1800 ± 0.2544
สงขลา	28	13	48.15	0.1361 ± 0.1866	0.2088 ± 0.2685
รวม	203	24	88.89	0.2318 ± 0.1959	0.3554 ± 0.2645

3.5 โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร

จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวาน พบว่า ค่า coefficient of genetic differentiation (G_{ST}) มีค่าเท่ากับ 0.1810 แสดงให้เห็นว่า ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ระหว่างประชากรหอยหวานที่ทำการสำรวจในการศึกษานี้มีอยู่ประมาณ 18 % ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จาก AMOVA ที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ระหว่างประชากรหอยหวานทั้งหมด และจากสัดส่วนของความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมด ประมาณ 20% เป็นสัดส่วนของ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ระหว่างประชากรหอยหวานทั้ง 7 ประชากร (among populations) (ดูตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) ของหอยหวาน *B. areolata* ในระดับระหว่างประชากรทั้งหมด

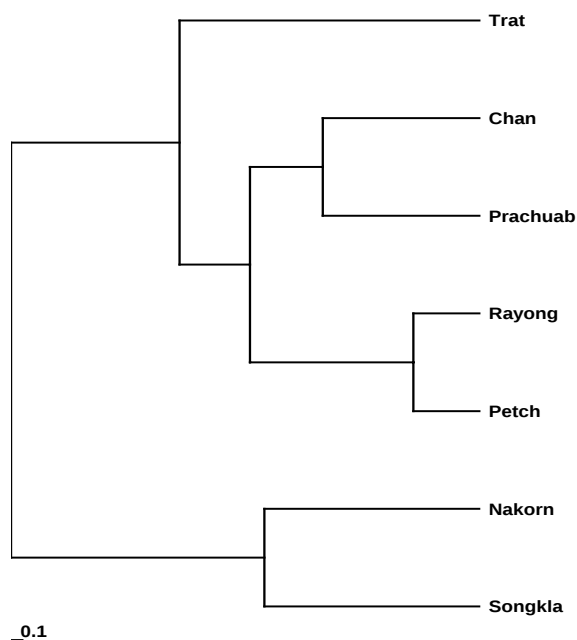
Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P-value
Among populations	6	136.270	0.69102 Va	20.19	< 0.001
Within populations	196	535.296	2.73110 Vb	79.81	
Total	202	671.567	3.42212		

ความห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0145 ถึง 0.1276 โดย ความห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากจันทบุรีกับสงขลา มีค่าความห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ 0.1276 ส่วนระหว่างประชากรจากระยองกับเพชรบุรี มีค่าน้อยที่สุดคือ 0.0145 (ดูตารางที่ 8) เมื่อนำค่าดังกล่าวมาสร้าง dendrogram เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของประชากรหอยหวานพบว่า ประชากรของหอยหวานในบริเวณอ่าวไทยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มชัดเจน โดยกลุ่มแรกคือประชากรตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ไปจนถึง จังหวัดตราด อีกกลุ่มคือประชากรหอยหวานจากจังหวัดนครศรีธรรมราช และ สงขลา แต่ภายในกลุ่มประชากรแรกโครงสร้างพันธุกรรมระหว่างประชากรฝั่งตะวันออก (ตราด จันทบุรี และ ระยอง) กับ ฝั่งตะวันตกของอ่าวไทย (เพชรบุรี และ ประจวบคีรีขันธ์) ยังไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามประชากรจากจังหวัดตราดแยกออกจากประชากรอื่นภายในกลุ่มอย่างชัดเจน (ดูรูปที่ 6) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จาก AMOVA เมื่อประชากรถูกแบ่งออกเป็น 2 พื้นที่ คือ อ่าวไทยตอนบน (ตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์) และอ่าวไทยตอนล่าง (นครศรีธรรมราช และสงขลา) ซึ่งแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละประชากร ($p < 0.001$) ระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ ($p < 0.001$) และระหว่างพื้นที่ทั้งหมด ($p < 0.049$) (ดูตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) ของหอยหวาน *B. areolata* ในระดับระหว่างตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละประชากร ระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ และระหว่างพื้นที่ทั้งหมด

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P-value
Among regions	1	51.584	0.4766Va	12.91	< 0.049
Among populations					
within regions	5	84.687	0.4839 Vb	13.11	< 0.001
Within population	196	535.296	2.7311 Vc	73.98	< 0.001
Total	202	671.567	3.6916		

ผลของ Mantel's test แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง genetic distance กับ geographical distance (ดูตารางที่ 8) อย่างมีนัยสำคัญ ($r = 0.6289$, $p = 0.008$) ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างประชากรของหอยหวานที่แสดงไว้ในแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ดูรูปที่ 6)



รูปที่ 6 UPGMA dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวาน (Trat = ตราด, Chan = จันทบุรี, Prachuab = ประจวบคีรีขันธ์, Rayong = ระยอง, Petch = เพชรบุรี, Nakorn = นครศรีธรรมราช และ Songkla = สงขลา)

ตารางที่ 8 Genetic distances และ Geographical distances ($\times 10^2$ km) ระหว่างประชากรของหอยหวาน

ประชากร	ตราด	จันทบุรี	ระยอง	เพชรบุรี	ประจวบฯ	นครศรีฯ	สงขลา
ตราด	****	1.1155	1.8414	3.3438	3.7134	4.4715	5.7768
จันทบุรี	0.0431	****	0.4964	2.0858	2.9820	4.5370	6.2382
ระยอง	0.0615	0.0457	****	1.5665	2.5787	4.3366	6.2760
เพชรบุรี	0.0578	0.0588	0.0145	****	1.8568	4.2323	6.5077
ประจวบฯ	0.0558	0.0310	0.0289	0.0360	****	2.4737	4.8655
นครศรีฯ	0.1138	0.0992	0.0451	0.0343	0.0647	****	2.4145
สงขลา	0.1210	0.1276	0.0667	0.0593	0.0813	0.0385	****

Geographical distances (above diagonal) and genetic distances (below diagonal).

4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ความแตกต่างของสีเปลือก

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างหอยหวานที่เก็บได้ มีความแตกต่างในเรื่องของสีเปลือก ซึ่งสามารถจำแนกได้ 5 ลักษณะคือ สีน้ำตาล สีส้ม สีขาว สีน้ำตาลแถบเข้ม และสีสนิม โดยบริเวณอ่าวไทยตอนบนจะพบหอยสีน้ำตาลมากที่สุดโดยจะพบหอยสีสนิมปนอยู่ด้วยในตัวอย่างที่ได้จากตราดเท่านั้น และหอยสีน้ำตาลแถบเข้มจะพบในตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ที่เดียวเท่านั้น ส่วนบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง จะพบหอยที่มีหลากหลายสีมากขึ้น ความแตกต่างของสีเปลือกอาจเกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม หรือพันธุกรรมก็ได้ อย่างเช่นใน *Littorina saxatilis* ความแตกต่างของสีเปลือกขึ้นอยู่กับที่อยู่อาศัยว่ามีผู้ล่าอย่าง *Carcinus maenas* อยู่หรือไม่ (Ekendahl, 1998) และ การเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลันของความเค็ม และ อุณหภูมิ (Sokolova and Berger, 2000) ส่วนใน desert landsnail, *Trochoidea simmulata* มีรายงานว่าความแตกต่างของสีเปลือกมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของความสามารถในการเข้าไปใช้ CaCO_3 ของหอยแต่ละตัว และปริมาณของ CaCO_3 ที่มีอยู่ในดินบริเวณที่อยู่อาศัย (Ward and Slotow, 1997) แต่ในหอยแครง *Mytilus edulis* มีรายงานว่าความแตกต่างของเปลือกสีน้ำตาลกับสีน้ำตาลเงินเป็นผลมาจากพันธุกรรม (Newkirk, 1980) และ มีรายงานว่าพันธุกรรมควบคุมเกี่ยวกับสีของเปลือกและขอบของMantle ในหอยนางรม *Crassostrea gigas* (Brake et al., 2004) นอกจากนี้ Qin et al. (2007) ได้พบเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับสีเปลือกของหอยเชลล์ *Argopecten irradians irradians* โดยการใช้เทคนิค Amplified fragment length Polymorphism (AFLP) จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่าความแตกต่างของสีเปลือกในหอยชนิดเดียวกันเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้ และสาเหตุอาจจะเกิดได้จากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมหรือพันธุกรรม หรือทั้งสองอย่าง จากข้อมูลที่มีในการศึกษานี้สามารถบอกได้เพียงการกระจายพันธุ์ของหอยหวานแต่ละสีและแหล่งที่พบ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าความแตกต่างของสีเปลือกหอยหวานมีสาเหตุมาจากอิทธิพลของอะไร ซึ่งเป็นเรื่องที่ต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

4.2 ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยมีค่าค่อนข้างสูง (gene diversity = 0.2318) ซึ่งสอดคล้องความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในหอยเป้าฮือด้วยวิธี PCR RFLP analysis ของยีน 16s rRNA และ 18s rRNA (ค่าเฉลี่ย nucleotide diversity = 0.3716 และค่าเฉลี่ย haplotype diversity = 0.6762) (Kinbunga et al., 2003a) และ กุ้งกุลาดำซึ่งศึกษาด้วยวิธี (ค่าเฉลี่ย nucleotide diversity = 3.328 และค่าเฉลี่ย haplotype diversity = 0.855) (Kinbunga et al., 2001b) แต่ต่างจาก หอยเชลล์ซึ่งศึกษาด้วยวิธี sequencing analysis ของยีน 16s rRNA (mean nucleotide diversity = 0.0006 และ mean haplotype diversity = 0.0237) (Mahidol et al., 2007) ที่มีรายงานว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับหอยทั้ง 3 ชนิดที่กล่าวไว้ข้างต้น และเมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวานทั้งหมดจะเห็นว่า ประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยตอนบน (ตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรี และ ประจวบคีรีขันธ์) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า ประชากรบริเวณอ่าวไทยตอนล่างมาก (นครศรีธรรมราช และสงขลา) ทั้งๆที่ประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยตอนล่างมีความหลากหลายของสีเปลือกมากกว่าประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยตอนบนซึ่งหอยหวานส่วนใหญ่มีสีเปลือกสีน้ำตาล การที่ประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำอาจเป็นผลมาจากการที่เฉพาะหอยสีน้ำตาลถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์เนื่องจากความไม่แน่ใจในเรื่องของสายพันธุ์หรือชนิดของหอยที่มีสีเปลือกต่างไปจากสีน้ำตาล หรือเป็นผลจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติ

สำหรับการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรหอยหวานในอ่าวไทย ได้มีการแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 พื้นที่คือ อ่าวไทยตอนบน (ตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์) และ อ่าวไทยฝั่งตะวันตกตอนล่าง (นครศรีธรรมราช

และสงขลา) พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละประชากร ($p < 0.001$) ระหว่างประชากรในแต่ละพื้นที่ ($p < 0.001$) และระหว่างพื้นที่ทั้งหมด ($p < 0.049$) สาเหตุของผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะหอยหวานในประชากรทั้งหมดมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) สูง (ประมาณ 79%) เพราะว่าสมาชิกใหม่ที่มาทดแทนประชากรเดิมสามารถได้จากประชากรในบริเวณนั้นและจากบริเวณอื่น เนื่องมาจากระบบนิเวศวิทยาทางทะเลเปิดได้ว่าเป็นระบบเปิด และตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิตทางทะเลส่วนใหญ่เป็นแพลงก์ตอนรวมทั้งหอยหวานด้วย ผลดังกล่าวข้างต้นสนับสนุนผลที่ได้จากการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวานในอ่าวไทย ซึ่งพบว่าสามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มชัดเจน กลุ่มแรกคือ ประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยตอนบน (ตราด จันทบุรี ระยอง เพชรบุรี และ ประจวบคีรีขันธ์) และกลุ่มที่สองคือ ประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง (นครศรีธรรมราช และสงขลา) ซึ่งผลการศึกษาค้นนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของกุ้งทะเลในทะเลไทย (*Penaeus merguensis*) โดยพบโครงสร้างประชากรระหว่างประชากรจากอ่าวไทยตอนบน (ตราด) และตอนล่าง (สุราษฎร์ธานี และสงขลา) (Wanna et al., 2004) แต่หากพิจารณาประชากรหอยหวานในกลุ่มแรก (อ่าวไทยตอนบน) พบว่ายังไม่มีโครงสร้างประชากรที่ชัดเจน ซึ่งผลดังกล่าวก็พบในการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของหอยเป้าฮือ (*Haliotis asinina*) ที่ไม่พบโครงสร้างประชากรที่ชัดเจนจากประชากรจากบริเวณอ่าวไทยตอนบนเช่นกัน (Kinbunga et al., 2003a; Tang et al., 2004) นอกจากนี้ในการศึกษาความหลากหลายของ Mitochondrial DNA ของหอยเชลล์ (*Amusium pleuronectes*) ก็ไม่พบโครงสร้างพันธุกรรมระหว่างประชากรจากจังหวัดนราธิวาสกับประชากรจากตราด จันทบุรี ระยอง และ เพชรบุรี (Mahidol et al., 2007)

หากพิจารณาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเล ซึ่งส่วนใหญ่จะมีตัวอ่อนที่ดำรงชีวิตบางช่วงเป็นแพลงก์ตอนจะเห็นได้ว่า ความสามารถในการแพร่กระจายของตัวอ่อน (Scheltema, 1971; Gooch, 1975; Crisp, 1978) น่าจะปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเรื่องดังกล่าว หากใช้ระยะเวลาที่ตัวอ่อนดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนมาเป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถในการแพร่กระจายของตัวอ่อนมีรายงานว่า ตัวอ่อนของเพริซทะเล (*Elminius modestus*) มีระยะที่เป็นแพลงก์ตอนอยู่ 10-15 วันก่อนที่จะลงเกาะ ความสามารถในการแพร่กระจายของตัวอ่อนมีค่าประมาณ 20-30 กิโลเมตรต่อปี (Crisp, 1958) ดังนั้นตัวอ่อนของหอยหวานซึ่งมีระยะที่ดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนอยู่ประมาณ 14-16 วัน (นิลนิจ ชัยธนวิสุทธิ และ ศิริยา กฤษณะพันธุ์ 2545) ดังนั้นความสามารถในการแพร่กระจายของตัวอ่อนของหอยหวานก็น่าจะประมาณ 30-40 กิโลเมตรต่อปี จากข้อมูลดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ที่ตัวอ่อนของหอยหวานน่าจะสามารถที่จะแพร่กระจายไปทั่วในบริเวณอ่าวไทย และความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวานทั้งหมดก็น่าจะไม่มี หรือถ้าจะมีก็จะต้องมีค่าน้อยมาก ดังนั้นความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นระหว่างประชากรหอยหวานบริเวณอ่าวไทยตอนบนกับตอนล่างน่าจะเป็นผลมาจากปัจจัยอื่นเช่น พฤติกรรมของตัวอ่อน (Bousfield, 1955; Burton and Feldman, 1982) การคัดเลือกในช่วงที่ดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนและช่วงลงเกาะ (Karl and Avise, 1992; Holm and Bourget, 1994) และโดยเฉพาะการไหลเวียนของกระแสน้ำ (Benzie and Stoddart, 1992; Bertness and Gaines, 1992; Wanna et al., 2004) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ทำหน้าที่เหมือนสิ่งกีดขวางไม่ให้ตัวอ่อนของหอยหวานของทั้งสองพื้นที่เคลื่อนที่หากันเนื่องจากช่วงฤดูผสมกระแสน้ำจะแบ่งส่วนของอ่าวไทยตอนบนกับตอนล่าง (Wanna et al., 2004; ปราโมช สุจิ. คุยเป็นการส่วนตัว) อย่างไรก็ตามฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยหวานก็มีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาละเอียดเพื่อสำรวจว่าช่วงเวลาที่มีการสืบพันธุ์ข้างในมากที่สุดตรงกับกระแสน้ำของอ่าวไทยตอนบนกับตอนล่างโดยกระแสน้ำในช่วงฤดูผสมหรือไม่ หากตรงกันก็เป็นไปได้ว่ากระแสน้ำน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีส่วนทำหน้าที่เหมือนสิ่งกีดขวางการเคลื่อนที่ย้ายถิ่นของตัวอ่อนระหว่างสองพื้นที่ นอกจากนี้ Wanna และคณะ (2004) ได้แสดงความเห็นว่าช่วงฤดูฝนที่แตกต่างกันระหว่างพื้นที่อ่าวไทยตอนบน (สิงหาคม – ตุลาคม) และตอนล่าง (ธันวาคม - กุมภาพันธ์) มีผลต่ออุณหภูมิของผิวน้ำ

ซึ่งอาจส่งผลให้ช่วงเวลาในการสืบพันธุ์ว่างไ้ของพื้นที่ทั้งสองแตกต่างกัน ทำให้การไหลแลกเปลี่ยนยีนระหว่างพื้นที่อ่าวไทยตอนบน และล่างเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยาก

4.3 การจัดการทรัพยากรหอยหวาน

การสำรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมหอยหวานในระดับพื้นที่พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในพันธุศาสตร์เชิงของการอนุรักษ์กรณีที่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา กลุ่มประชากรดังกล่าวก็สามารถที่จะทำการจัดการเหมือนกับว่าเป็นประชากรเดียว แต่การที่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมอาจจะเกิดได้จากสาเหตุหลายประการเช่น การมีการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรที่เพียงพอ (Gene flow) มีระดับการคัดเลือกที่เท่ากันเมื่ออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีสิ่งแวดล้อมคล้ายๆกัน ประชากรนั้นๆอาจแยกออกจากกันในระยะเวลาที่ไม่นาน หรือการที่เครื่องหมายพันธุกรรมไม่มีประสิทธิภาพเพียงในการค้นหาความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Carvalho and Hauser, 1995) เป็นต้น ดังนั้นการจะอธิบายหรือสรุปเรื่องดังกล่าวจึงต้องมีความรอบครอบ และจะต้องใช้ข้อมูลในหลายๆด้าน แต่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญของประชากรหอยหวานทั้ง 7 ประชากร อาจเป็นไปได้ที่แต่ละประชากรอาจรับสมาชิกใหม่จากประชากรอื่นทั้งใกล้เคียงและไกลออกไปในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน หรือมีผลของการคัดเลือกโดยธรรมชาติไม่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าหากจะทำการอนุรักษ์ประชากรหอยหวานมีความจำเป็นที่จะต้องทำเป็นแหล่งๆไป ส่วนในกรณีที่ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรหอยหวานแสดงให้เห็นชัดเจนว่า ประชากรบริเวณอ่าวไทยตอนบนตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ถึงตราด และ อ่าวไทยตอนล่างตั้งแต่จังหวัดนครศรีธรรมราชลงไปถึงสงขลา แยกออกจากกันอย่างชัดเจน หากใช้ข้อมูลดังกล่าวการอนุรักษ์ประชากรหอยหวานก็จะต้องแบ่งออกเป็น 2 พื้นที่ โดยเฉพาะการปล่อยพันธุ์หอยหวานกลับคืนสู่แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามหากจะทำการอนุรักษ์หอยหวานอย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องมีการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรหอยหวานเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมรูปแบบอื่น เพื่อยืนยันผลดังกล่าว และชีววิทยาที่สำคัญบางประการเช่น ฤดูกาลสืบพันธุ์ว่างไ้ เป็นต้น

5 ข้อเสนอแนะ

การค้นพบความหลากหลายของสปีชีส์หอยหวานที่พบในการศึกษานี้ถือได้ว่าเป็นปรากฏการณ์ที่น่าสนใจและทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อความชัดเจนในเรื่องของสายพันธุ์ของหอยที่มีลักษณะของสปีชีส์ที่ต่างกัน เนื่องจากการส่งออกหอยหวาน และตลาดภายในประเทศมีความต้องการหอยสีน้ำตาลมากที่สุด ควรมีการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรหอยหวานเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมรูปแบบอื่นเช่น mitochondrial DNA หรือ microsatellites เป็นต้น เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการศึกษานี้ เพื่อช่วยทำให้ได้ภาพของโครงสร้างพันธุกรรมประชากรหอยหวานในอ่าวไทย และน่าจะทำการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับฤดูกาลสืบพันธุ์ว่างไ้ของหอยหวานในประชากรธรรมชาติ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นข้อมูลที่สำคัญที่ช่วยทำให้การวางแผนจัดการทรัพยากรหอยหวานมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

Piyapattanakorn S. and Chaitanawisuti N. (-----) Population Genetic Structure of Spotted-Babylon (*Babylonia areolata*) in the Gulf of Thailand revealed by ISSR marker. (in preparation)

เอกสารอ้างอิงภาษาไทย

นิลนิจ ชัยชนาวินสุทธิ์ และ ศิริญา กฤษณะพันธุ์ (2545) คู่มือการเพาะเลี้ยงหอยหวาน : หลักการ และแนวปฏิบัติ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, 114 หน้า.

เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษ

Amour J.A.L., Neumann R., Gobert S., and Jeffrey A (1994) Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3: 599-605.

Benzie J.A. and Stoddart J.A. (1992) Genetic structure of crown-of-horns starfish (*Acanthaster planci*) in Australia. *Marine Biology* 112: 631-639.

Bertness, M.D. and Gaines S.D. (1992) Larval dispersal and local adaptation in acorn barnacles. *Evolution* 47(1): 316-320

Bousfield E.L. (1955) Ecological control of the occurrence of barnacles on the Atlantic coast of Canada. *Bulletin of Natural Museum of Canada* 132: 112-153

Brake J., Evans F., and Langdon C. (2004) Evidence for genetic control of pigmentation of shell and mantle edge in selected families of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 229: 89-98.

Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J.F.Y., and Burke T. (1998) Multi-locus and single-locus DNA fingerprinting, pp. 287-336. In : *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach (second edition)*, Hoelzel A.R. (ed.). Oxford University Press.

Burton R.S. and Feldman M.W. (1982) Population genetics of coastal and estuaries invertebrates: does larval behaviour influence population structure? , pp 537-551. In *Estuarine comparison*, Kenedy, V.S. (ed.). Academic Press, New York.

Carvalho G.R. and Hauser L. (1995) Molecular genetics and the stock concept in fishers, pp. 55-72. In : *Molecular genetics in fisheries* , Carvalho G.R. and Pitcher T.J. (ed.). Chapman & Hall.

Chaitanawisuti N. and Kritsanapuntu A. (1997a) Laboratory spawning and juvenile rearing of the marine gastropod: spotted babylon, *Babylonia areolata* link 1807 (Neogastropoda. Buccinidae) in Thailand. *J. Shellfish Res.* 16: 31-37.

Chaitanawisuti N. and Kritsanapuntu A. (1997b) Effects of stocking density and substrate presence on growth and survival of juveniles spotted babylon *Babylonia areolata* Link 1807 (Neogastropoda. Buccinidae) in Thailand. *J. Shellfish Res.* 16: 429-433.

Chaitanawisuti N. and Kritsanapuntu A. (1999) Effect of different feeding regimes on growth, survival and feed conversion of hatchery-reared juveniles of the gastropod mollusc spotted babylon *Babylonia areolata* Link 1807 in flow-through culture systems. *Aquaculture research* 30: 589-593.

Chaitanawisuti N. and Kritsanapuntu A. (2000) Growth and production of hatchery-reared juvenile spotted babylon *Babylonia areolata* Link 1807 cultured to marketable size in intensive flow-through and semi-closed recirculating water systems. *Aquaculture research* 31: 415-419.

Chaitanawisuti N., Kritsanapuntu A., and Natsukari Y. (2002) Economic analysis of a pilot commercial production for spotted babylon *Babylonia areolata* Link 1807, of marketable size using a flow-through culture system in Thailand. *Aquaculture research* 33: 1265-1272.

Chaitanawisuti N., Kritsanapuntu A., Kathinmai S., and Natsukari Y. (2001a) Growth trails for polyculture of hatchery-reared juvenile spotted babylon (*Babylonia areolata*) and sea bass (*Lates calcarifer*) in a flow-through seawater system. *Aquaculture research* 32: 247-250.

Chaitanawisuti N., Kritsanapuntu A., Natsukari Y., and Kathinmai S. (2001b) Effect of feeding rates on growth, survival and feed utilization of hatchery-reared juvenile spotted babylon (*Babylonia areolata*) in a flow-through seawater system. *Aquaculture research* 32: 689-692.

Crisp D.J. (1978) Genetic consequence of different reproductive strategies in marine invertebrates, pp. 257-273. In: *Marine organisms: genetic, ecology, and evolution*. Battaglia B. and Beardmore J.A. (eds.). Plenum Press, New York.

David V.A., and Menotti-Raymond M. (1998) Automated DNA detection with fluorescence-based technologies, pp. 337-370. In: *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach (second edition)*, Hoelzel A.R. (ed.). Oxford University Press.

Day A.J., Hawkins A.J.S., and Visootiviset P. (2000) The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster *Saccostrea* in Thailand. *Aquaculture* 187(1-2): 51-72.

De Wolf H., Backeljau T., and Verhagen R. (1998) Spatio-temporal genetic structure and gene flow between two distinct shell morphs of the planktonic developing periwinkle *Littorina striata* (Mollusca: Prosobranchia). *Marine Ecological Progress Series* 163: 155-163.

Ekendahl A. (1998) Colour polymorphic prey (*Littorina saxatilis* Olivi) and predatory effects of a crab population (*Carcinus maenas* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 47: 239-246.

Excoffier L., Laval G., and Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

Felsenstein, J. (1989) PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.

Gajardo G., Cancino J.M., and Navarro J.M. (2002) Genetic variation and population structure in the marine snail *Chorus giganteus* (Gastropod:Muricidae) an overexploited endemic resource from Chile. *Fisheries Research* 55(1-3): 329-333.

Gooch J.L. (1975) Mechanisms of evolution and population genetics, pp. 349-409. In *Marine ecology*. Kinne O. (ed.). Vol 11, part1. Wiley, London.

Hadrys H., Balick M., and Schierwater B. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.

Holmes S.P., Dekker R., and Williams I.D. (2004) Population dynamics and genetic differentiation in the bivalve mollusc *Abra tenuis*: aplanic dispersal. *Marine Ecological Progress Series* 268: 131-140.

Holmes S.P., Witbaard R., and van der Meer J. (2003) Phenotypic and genotypic population differentiation in the bivalve mollusc *Arctica islandica*: results from RAPD analysis. *Marine Ecological Progress Series* 254: 163-176.

Jeffrey A.J., Wilson V., and Thein S.L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314(7): 67-73.

Johannesson K., Lundberg J., Andre C., and Nilsson P.G. (2004) Island isolation and habitat heterogeneity correlate with DNA Variation in a marine snail (*Littorina saxatilis*). *Biological Journal of The Linnean Society* 82(3): 377-384.

Kannapiran E. (1994) *Breeding biology of Babylonia spirata (Linnaeus) (Mollusca: Neogastropoda: Buccinidae)*. Master's Thesis, Annamalia University, Parangipettai, India

Kinbunga S., Siludjai D., Wudthijinda W., Tassanakajon A., Jarayabhand P., and Menasveta P. (2001b) Genetic heterogeneity of the Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Marine Biotechnology* 3: 428-438.

- Klinbunga S., Ampayup P., Tassanakajon A., Jarayabhand P., and Yoosukh W. (2000) Development of species-specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 2(5): 476-484.
- Klinbunga S., Ampayup P., Tassanakajon A., Jarayabhand P., and Yoosukh W. (2001a) Genetic diversity and molecular markers of cupped oysters (genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Marine Biotechnology* 3(2): 133-144.
- Klinbunga S., Khamnamtong N., Tassanakajon A., Puanglarp N., Jarayabhand P., and Yoosukh W. (2003b) Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 5(1): 27-36.
- Klinbunga S., Pripue P., Khamnamtong N., Puanglarp N., Tassanakajon A., Jarayabhand P., Hirono I., Aoki T., and Menasveta P. (2003a) Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 5(5): 505-517.
- Lewinton R.C. (1972) The apportionment of human diversity, *Evolutionary Biology* 6: 381–398.
- Liu, L.L. and Chiu Y.W. (1998) Allozyme and morphological evidence supporting the separation of *Babylonia formosae formosae* and *B. formosae habei* at specific level (Prosobranchia: Buccinidae). *Journal of Shellfish Research*. 17: 971-977.
- Mahidol C., Na-Nakorn U., Sukmanomon S., Taniguchi N., and Nguyen T.T.T. (2007) Mitochondrial DNA diversity of Asian Moon Scallop, *Amusium pleuronectes* (Pectinidae), in Thailand. *Marine Biotechnology* 9, 352-359.
- Nei M. (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 70: pp. 3321–3323.
- Nei M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, USA.
- Newkirk G.F. (1980) Genetic of shell color in *Mytilus edulis* L. and the association of growth rate with shell color. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 47: 89-94.

- Page, R. D. M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Panichasuk P. (1996) *Areolata babylon*, *Babylonia areolata* link 1807. *Thai Fishery Gazette* 49: 107-117.
- Patterson J.K., Raghunathan C., and Ayyakkannu K. (1995) Food preference, consumption and feeding behaviour of the scavenging gastropod *Babylonia spirata* (Neogastropoda. Buccinidae). *Indian Journal of Marine Science* 24: 104-106.
- Patterson J.K., Shanmugaraj T., and Ayyakkannu K. (1994) Salinity tolerance of *Babylonia spirata* (Neogastropoda. Buccinidae). *Phuket Marine Biological Center Special Publication* 13: 95-97.
- Qin Y., Liu X., Zhang H., Zhang G., and Guo X. (2007) Identification and mapping of amplified fragment length polymorphism markers linked to shell color in Bay Scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Marine Biotechnology* 9, 66-73.
- Scheltema R.S. (1971) Larval dispersal as a mean of genetic exchange between geographically separated population of shallow-water benthic marine gastropods. *Biological Bulletin* 140: 284-322.
- Sokolova I.M. and Berger V.Ja. (2000) Physiological variation related to shell colour polymorphism in White Sea *Littorina saxatilis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 47: 1-23.
- Stepien C.A., Morton B., Dabrowska K.A., Guarnera R.A., Radja T., and Radja B. (2001) Genetic diversity and evolutionary relationships of the troglodytic 'living fossil' *Congeria kuscieri* (Bivalvia: Dreissenidae). *Molecular Ecology* 10(8): 1873-1879.
- Tang S., Tassanakajon A., Klinbunga S., Jarayabhand P., and Menasveta P. (2004) Population structure of tropical Abalone (*Haliotis asinina*) in coastal waters of Thailand determined using microsatellite markers. *Marine Biotechnology* 6, 604-611.
- Thirumavalavan R. (1987) *Study on Babylonia spirata (L.) Mollusca (Gastropoda: Buccinidae) from Proto Novo waters*. M-Phil. Thesis, Annamalia University, Parangipettai, India
- Wanna W., Rolland J.-L., Bonhomme F., and Phongdara A. (2004) Population genetic structure of *Penaeus merguensis* in Thailand based on nuclear DNA variation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311: 68-78.

Ward D. and Slotow R. (1997) Paedomorphosis and shell-colour polymorphism of a desert landsnail. *Journal of Arid Environments* 36: 677-685.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.

Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T., Ye Z.H., and Mao J.X. (1997) POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Zietekiewicz E., Rafalsky A., and Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by inter-simple sequence repeat (ISSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.