บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

1. การจัดคาริโอไทป์

จากการศึกษาคาริโอไทป์ของหอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae โดยวิธี Air-dry และย้อมด้วยสีจิมซ่า (Giemsa) เป็นวิธีการที่เหมาะสม ซึ่งเป็นวิธีเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาหอยสองฝาส่วนใหญ่ (Ieyama *et al.*, 1994; Nakamura, 1985 และ Ojima, 1984) และในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าหอยกาบน้ำจืดทั้ง 4 สปีชีส์ 5 สปีชีส์ย่อย อันได้แก่ *Pilsbryoconcha exilis exilis, Pseudodon vondembuschianus ellipticus, Ps.vondembuschianus chaperi, Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi, H.*(*Limnoscapha*) *myersiana, Chamberlainia hainesiana, Uniandra contradens rustica, U. contradens tumidula* และ *Physunio superbus* พบว่า มีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซม 2n = 38 ทั้งหมด แต่มีความแตกต่างกันที่รูปแบบคาริโอไทป์ ซึ่งตรงกันกับรายงานการรวบรวมการศึกษาคาริโอไทป์ของหอยอันดับ Unionoida 22 สปีชีส์ ซึ่งพบว่ามีจำนวนดิพลอยด์ 2n = 38 เท่ากันทุกสปีชีส์ (Nakamura, 1985 และ Vitturi, 1982)

2. การเปรียบเทียบโครโมโซมหอยกาบน้ำจืด

2.1 การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ระหว่างวงศ์ย่อย

ในการศึกษาโครโมโซมของหอยกาบน้ำจืด 3 วงศ์ย่อย ได้แก่ วงศ์ย่อย Pseudodontinae วงศ์ย่อย Hyriopsinae และวงศ์ย่อย Rectidentinae จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดโครโมโซม พบว่า

วงศ์ย่อย Pseudodontinae อันได้แก่ *Pilsbryoconcha exilis exilis, Pseudodon vondembuschianus ellipticus,* และ *Ps. vondembuschianus chaperi* ทั้งสองสปีชีส์ส่วนใหญ่มีโครโมโซมชนิด submetacentric โดยมี คาริโอไทป์เป็น 3m 15sm 1st, 5m 14sm และ 3m 14sm

1st 1t ตามลำดับ [metacentric (m), submetacentric (sm) , subtelocentric (st), telocentric (t)] โดยเมื่อเปรียบเทียบ *Pi. exilis exilis* กับหอยซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุลเดียวกันคือ สกุล *Anodonta* ใน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Anodonta antina, A. gradis* และ *Anodontoides ferssacianus* พบว่า จำนวนดิพลอยด์ 2n = 38 เช่นเดียวกัน แต่ต่างกันที่ชนิดโครโมโซมและรูปแบบของคาริโอไทป์ โดยมีรายงานคาริโอไทป์ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *A. antina* มีคาริโอไทป์เป็น 10m 3m/sm 6sm (Jenkinson, 1976 และ Van, 1969) และเมื่อเปรียบเทียบ *Ps. vondembuschianus ellipticus* และ *Ps. vondembuschianus chaperi* กับหอยซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุลเดียวกันคือสกุล *Pseudodon* ได้แก่ *Pseudodon obovalis omiensis* พบว่ามีจำนวนดิพลอยด์ 2n = 38 เช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกันที่ชนิดโครโมโซมและรูปแบบคาริโอไทป์ โดยมีรายงานคาริโอไทป์เป็น 9m 10sm (Nadamitsu and Kanai, 1978) จากการเปรียบเทียบ พบว่า หอยแต่ละสปีชีส์ในวงศ์ย่อย Pseudodontinae มีความแตกต่างกันที่ชนิดโครโมโซมและรูปแบบคาริโอไทป์ นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าการศึกษาที่ผ่านมาไม่มีรายงานชนิดโครโมโซมเป็น subtelocentric และ telocentric ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้ พบว่า *Pi. exilis exilis* มีโครโมโซมชนิด subtelocentric และ *Ps. vondembuschianus chaperi* มีโครโมโซมชนิด subtelocentric และชนิด telocentric

วงศ์ย่อย Hyriopsinae ได้แก่ *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi, H. (Limnoscapha) myersiana* และ *Chamberlainia hainesiana* ซึ่งทั้งสามสปีชีส์ส่วนใหญ่มีโครโมโซมเป็นชนิด submetacentric และ metacentric โดยมีคาริโอไทป์เป็น 3m 14sm 1st 1t, 5m 14sm และ 5m 14sm ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับหอยซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุลเดียวกันคือสกุล *Unio* 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Unio elongatulus* และ *U. pictorum* พบว่ามีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซม 2n = 38 เช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกันที่ชนิดโครโมโซมและรูปแบบคาริโอไทป์ โดยมีรายงานคาริโอไทป์ 1 สปีชีส์ คือ *U. pictorum* มีคาริโอไทป์เป็น 8m 1m/sm 10sm (Vitturi, 1982 และ Van, 1969) จากการเปรียบเทียบพบว่าหอยแต่ละสปีชีส์ในวงศ์ย่อย Hyriopsinae มีความแตกต่างกันที่ชนิดโครโมโซมและรูปแบบคาริโอไทป์ นอกจากนี้ยังพบว่าจากการศึกษาที่ผ่านมาไม่มีรายงานชนิดโครโมโซมเป็น subtelocentric และ telocentric ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้ พบว่า *H. (Limnoscapha) desowitzi* มีโครโมโซมชนิด subtelocentric และ telocentric

วงศ์ย่อย Rectidentinae ได้แก่ *Uniandra contradens rustica, U. contradens tumidula* และ *Physunio superbus* ส่วนใหญ่มีโครโมโซมเป็นชนิด submetacentric และทั้ง 3 สปีชีส์มีโครโมโซมชนิด subtelocentric และ telocentric เช่นเดียวกัน โดยมีคาริโอไทป์เป็น 3m 13sm 2st 1t, 5m 10sm 3st 1t และ 7m 10sm 1st และ 1t ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหอยซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุลเดียวกันคือสกุล *Unio* พบว่าได้ผลเช่นเดียวกับในวงศ์ย่อย Hyriopsinae คือ มีจำนวน

ดิพลอยด์เท่ากันและมีความแตกต่างกันที่รูปแบบคาริโอไทป์ โดยการศึกษาในครั้งนี้พบว่า หอยกาบน้ำจืดในวงศ์ย่อยนี้ ทุกสปีชีส์มีโครโมโซมทั้ง 4 ชนิด คือ metacentric, submetacentric, subtelocentric และ telocentric ในขณะที่การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไม่มีการรายงานโครโมโซมแบบ subtelocentric และ telocentric

2.2 การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ระหว่างสปีชีส์ในวงศ์ย่อยเดียวกัน

วงศ์ย่อย Pseudodontinae

จากการศึกษาหอยกาบน้ำจืด ในสกุลย่อย Pseudodontinae 3 สปีชีส์ย่อย ซึ่งได้แก่ *Pilsryoconcha exilis exilis, Pseudodon vondembuschianus ellipticus* และ *Ps. vondembuschianus chaperi* พบว่ามีรูปแบบคาริโอไทป์ใกล้เคียงกัน โดยมีจุดแตกต่างที่เห็นได้ชัดเจน คือ *Pi. exilis exilis* มีโครโมโซมชนิด subtelocentric 1 คู่ แต่ *Ps. vondembuschianus chaperi* มีโครโมโซมชนิด subtelocentric 1 คู่ และมีชนิด telocentric 1 คู่ ในขณะที่ไม่พบโครโมโซมชนิดนี้ในสปีชีส์ *Ps. vondembuschianus ellipticus* นอกจากนี้ยังพบว่าโครโมโซมคู่แรกของ *Pi. exilis exilis* เป็นชนิด submetacentric ในขณะที่ *Ps. vondembuschianus ellipticus* เป็นชนิด metacentric และ *Ps. vondembuschianus chaperi* เป็น submetacentric จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยในวงศ์ย่อยนี้พบว่า มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยมีขนาดและรูปร่างของเปลือกแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยพบ *Pi. exilis exilis* และ *Ps. vondembuschianus ellipticus* จากทั้งสองลุ่มน้ำ แต่พบสปีชีส์ *Ps. vondembuschianus chaperi* เฉพาะลุ่มน้ำยมบริเวณแก่งเสือเต้น จ. แพร่ เท่านั้น

วงศ์ย่อย Hyriopsinae

การศึกษาโครโมโซมในระดับวงศ์ย่อย Hyriopsinae 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi, H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* และ *Chamberlainia hainesiana* พบว่า *C. hainesiana* มีรูปแบบของคาริโอไทป์ที่ใกล้เคียงกับ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* กล่าวคือทั้ง 2 สปีชีส์มีโครโมโซมเป็น 2 ชนิดคือ metacentric และ submetacentric จำนวน 5 และ 14 คู่ เช่นเดียวกันโดยมีความแตกต่างอยู่ที่โครโมโซมคู่แรกของ *C. hainesiana* เป็น submetacentric ในขณะที่ของ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* เป็นชนิด metacentric ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีความแตกต่างกันโดย *C. hainesiana* จะมีขนาดใหญ่กว่าและมีรูปทรงของเปลือกมนกว้างกว่า *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* ส่วน *H. (Limnoscapha) desowitzi* นั้น พบว่า

คาริโอไทป์มีความแตกต่างจาก *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* และ *C. hainesiana* อย่างชัดเจน กล่าวคือ *H.* (*Limnoscapha*) *desowitzi* มีโครโมโซมชนิด subtelocentric และ telocentric ชนิดละ 1 คู่ ในขณะที่ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* และ *C. haianesiana* ไม่มีโครโมโซมทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ลักษณะรูปทรงทั่วไป มีความหนาของเปลือกแตกต่างไปจากสองสปีชีส์ข้างต้น นอกจากนี้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง พบสปีชีส์ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* และ *C. hainesiana* ทั้งในลุ่มน้ำยมและน่าน ส่วน *H.* (*Limnoscapha*) *desowitzi* พบเฉพาะในลุ่มน้ำยมที่ ต. วังอิทก อ. บางระกำ จ. พิษณุโลก และมีรายงานว่า สปีชีส์นี้พบเฉพาะในประเทศไทยและมีการแพร่กระจายเฉพาะพื้นที่ (Brandt, 1974)

วงศ์ย่อย Rectidentinae

การศึกษาโครโมโซมในระดับวงศ์ย่อย Rectidentinae 1 สปีชีส์ 2 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Uniandra contradens rustica, U. contradens tumidula* และ *Physunio superbus* พบว่ามีโครโมโซมทั้ง 4 ชนิดคือ metacentric, submetacentric, subtelocentric และ telocentric โดยมีความแตกต่างของคาริโอไทป์เล็กน้อย ความแตกต่างที่เห็นได้ชัดคือ *U. contradens rustica* และ *U. contradens tumidula* มีโครโมโซมคู่ท้ายสุดเป็นชนิด subtelocentric แต่ใน *Ph. superbus* เป็นชนิด metacentric ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า *Ph. superbus* มีขนาดและ รูปทรงที่แตกต่างจากอีก 2 สปีชีส์อย่างชัดเจน โดยมีขนาดใหญ่และพองหนามาก

2.3 การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ระหว่างสกุลย่อย

การศึกษาคาริโอไทป์ของหอยกาบน้ำจืดในสกุลย่อย Hyriopsinae 2 สปีชีส์ *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi* และ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* พบว่า *H.* (*Limnoscapha*) *desowitzi* มีโครโมโซมชนิด subtelocentric 1 คู่ และ telocentric 1 คู่ ในขณะที่ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* ไม่พบว่ามีโครโมโซม 2 ชนิดนี้ คงมีแต่ชนิด metacentric และชนิด submetacentric เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าโครโมโซมคู่แรกของสปีชีส์ *H.* (*Limnoscapha*) *desowitzi* เป็นชนิด submetacentric ในขณะที่สปีชีส์ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* เป็นชนิด metacentric ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีความแตกต่างกัน กล่าวคือ *H.* (*Limnoscapha*) *myersiana* มีขนาดใหญ่กว่า และมีรูปร่างแตกต่างกับ *H.* (*Limnoscapha*) *desowitzi*

2.4 การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ระหว่างสปีชีส์

Pilsbryoconcha exilis exilis ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 3 คู่ submetacentric 15 คู่ และ subtelocentric 1 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ทั้งหมด

Pseudodon vondembuschianus ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Ps. vondembuschianus ellipticus* ซึ่งมีโครโมโซมชนิด metacentric 5 คู่ และ submetacentric 14 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 17 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 2 คู่ และในส่วนของสปีชีส์ย่อย *Ps. vondembuschianus chaperi* ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric จำนวน 3 คู่ submetacentric 14 คู่ subtelocentric 1 คู่ และ telocentric 1 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ทั้งหมด

Hyriopsis (*Limnoscapha*) *desowitzi* ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 3 คู่ submetacentric 14 คู่ subtelocentric 1 คู่ และ telocentric 1 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ทั้งหมด

H. (*Limnoscapha*) *myersiana* ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 5 คู่ และ submetacentric 14 คู่ โดยแบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 18 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 1 คู่

Chamberlainia hainesiana ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด metacentric 5 คู่ และ submetacentric 14 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ทั้งหมด

Uniandra contradens ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *U. contradens rustica* ซึ่งมีโครโมโซม metacentric 3 คู่ submetacentric 13 คู่ subtelocentric 2 คู่ และชนิด telocentric 1 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 8 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 11 คู่ และในส่วนของ *U. contradens tumidula* มีโครโมโซม metacentric 5 คู่ submetacentric 10 คู่ subtelocentric 3 คู่ และ telocentric 1 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 12 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 7 คู่

Physunio superbus ประกอบด้วยโครโมโซม metacentric 7 คู่ submetacentric 10 คู่ subtelocentric 1 คู่ และ telocentric 1 คู่ โดยเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 16 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 3 คู่

2.5 การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ในระหว่างสปีชีส์ย่อย

การศึกษาโครโมโซมในระดับสปีชีส์ย่อย 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Pseudodon vondembuschianus ellipticus* และ *Ps. vondembuschianus chaperi* พบว่ามีคาริโอไทป์แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดย *Ps. vondembuschianus chaperi* มีชนิดโครโมโซมทุกแบบทั้ง 4 ชนิด แต่ *Ps. vondembuschianus ellipticus* มีโครโมโซมชนิด submetacentric และ metacentric เท่านั้น ซึ่งจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา พบว่าทั้ง 2 สปีชีส์ย่อย มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ ขนาดของ *Ps. vondembuschianus ellipticus* จะใหญ่กว่าขนาดของ *Ps. vondembuschianus chaperi* และยังมีรูปทรงต่างกัน โดยใน *Ps. vondembuschianus chaperi* เปลือกเป็นทรงกลมเกือบป้อม ส่วนใน *Ps. vondembuschianus chaperi* เปลือกเป็นทรงไข่ ขนาดเล็ก ด้วยลักษณะคาริโอไทป์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังกล่าว ทำให้สามารถกล่าวได้ว่า หอยกาบน้ำจืด 2 สปีชีส์ย่อยนี้อาจจัดจำแนกออกเป็น 2 สปีชีส์ ได้

การศึกษาโครโมโซมในระดับสปีชีส์ย่อย 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Uniandra contradens rustica* และ *U. contradens tumidula* พบว่าทั้งสองสปีชีส์ย่อย มีคาริโอไทป์ที่แตกต่างกัน โดยที่โครโมโซมคู่แรกของ *U. contradens rustica* เป็นชนิด submetacentric ในขณะที่ของ *U. contradens tumidula* เป็นชนิด metacentric นอกจากนี้ยังพบว่า *U. contradens rustica* มีชนิดโครโมโซม subtelocentric 2 คู่ ในขณะที่ *U. contradens tumidula* มีโครโมโซมชนิดนี้ 3 คู่ เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีขนาดและรูปร่างคล้ายกัน แต่ที่บริเวณผิวเปลือกด้านนอกของ *U. contradens tumidula* จะเรียบมัน ส่วนผิวเปลือกด้านนอกของ *U. contradens rustica* จะขรุขระ ด้วยคาริโอไทป์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังกล่าว ทำให้สามารถกล่าวได้ว่า หอยกาบน้ำจืด 2 สปีชีส์ย่อยนี้ อาจจัดจำแนกเป็น 2 สปีชีส์ ได้เช่นกัน

3. <u>คาริโอไทป์ของหอยกาบน้ำจืดและผลที่เกี่ยวข้องจากการศึกษา</u>

จากการเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของหอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae กับวงศ์ Unionidae พบว่า หอยในวงศ์ Unionidae เท่าที่มีรายงานคาริโอไทป์นั้น มีโครโมโซม 2 ชนิด คือ metacentric และ submetacentric (Nakamura, 1985) ส่วนหอยในวงศ์ Amblemidae ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า หอยหลายสปีชีส์ มีโครโมโซมทั้ง 4 ชนิด คือ metacentric, submetacentric, subtelocentric และ telocentric จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า หอยในวงศ์ Amblemidae สปีชีส์ที่ประกอบด้วยโครโมโซม 2

ชนิด คือ metacentric และ submetacentric อันได้แก่ *Pseudodon vondembuschianus ellipticus, Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* และ *Chamberlainia hainesiana* อาจจัดไว้ในวงศ์ Unionidae ตามเดิม และหอยในวงศ์ Amblemidae สปีชีส์ที่ประกอบด้วยโครโมโซมทั้ง 4 ชนิด คือ metacentric, submetacentric, subtelocentric และ telocentric อันได้แก่ *Pilsbryoconcha exilis exilis, Ps. vondembuschianus chaperi, H. (Limnoscapha) desowitzi, Uniandra contradens rustica, U. contradens tumidula* และ *Physunio superbus* จัดอยู่ในวงศ์ Amblemidae ตามรายงานของ Brandt (1974) ทั้งนี้คงต้องพิจารณาร่วมกับข้อมูลทางด้านอื่นที่มีอยู่ประกอบกัน

ถ้าพิจารณาถึงวิวัฒนาการของโครโมโซม ซึ่งใช้หลักการเดียวกันกับวิวัฒนาการของโครโมโซมปลา (Ahmed, 1976 และ Vitturi *et al.*, 1982) โดยอาศัยหลักการที่ว่า หอยที่มีวิวัฒนาการต่ำจะมีโครโมโซมชนิด telocentric มากกว่าหอยที่มีวิวัฒนาการสูง ดังนั้นหอยในวงศ์ย่อย Rectidentinae น่าจะมีวิวัฒนาการต่ำกว่าวงศ์ Pseudodontinae และ Hyriopsinae แต่ทั้งนี้การศึกษาด้านวิวัฒนาการของหอยนั้น ควรจะต้องศึกษาในกลุ่มหอยที่มีจำนวนสปีชีส์หลากหลายกว่านี้ เพื่อการเปรียบเทียบที่ชัดเจนและศึกษาด้วยเทคนิควิธีการที่เหมาะสม สำหรับข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประกอบกับข้อมูลด้านอื่นเพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของหอยต่อไป

ในส่วนของการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดนั้น จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้พบแหล่งที่มีหอยซึ่งสามารถนำมาเพาะเลี้ยงมุกน้ำจืดได้เพิ่มขึ้น อันจะเป็นแหล่งที่สามารถเก็บหอยจากธรรมชาติไปใช้ในการพัฒนาเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดได้เพิ่มขึ้น

4. <u>การเก็บตัวอย่าง</u>

บริเวณที่กำหนดเพื่อเก็บตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดคือ บริเวณลุ่มแม่น้ำยม และลุ่มแม่น้ำน่าน เนื่องจากเหตุผลสำคัญ 2 ประการ คือ ประการที่หนึ่ง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า บริเวณนี้มีความหลากหลายของสปีชีส์หอยกาบน้ำจืดมากกว่าบริเวณอื่น (Brandt, 1974) และจากการสำรวจพบว่ามีหอยกาบน้ำจืดซึ่งสามารถนำมาเพาะเลี้ยงมุกน้ำจืดได้อาศัยอยู่หลายสปีชีส์ ประการที่สอง บริเวณลุ่มน้ำยมและลุ่มน้ำน่าน มีลำน้ำสาขาหลายสาย เป็นผลให้มีบริเวณติดต่อกับลุ่มน้ำหลายลุ่มน้ำ อันได้แก่ ลุ่มน้ำปิง ลุ่มน้ำวัง ลุ่มน้ำโขง และลุ่มน้ำป่าสัก อันน่าจะเป็นเหตุผลสนับสนุนให้มีสปีชีส์ของหอยกาบน้ำจืดที่หลากหลายด้วย ดังนั้นจึงเลือกบริเวณลุ่มน้ำทั้งสองเป็นแหล่งเก็บตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดในการศึกษาครั้งนี้

การเก็บตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดในช่วงของการศึกษา ประสบปัญหาเป็นอย่างมาก เนื่องจากในช่วงปลายปี พ.ศ. 2537 จนถึงปลายปี 2539 ซึ่งเป็นช่วงระยะที่กำหนดไว้เพื่อเก็บตัวอย่างนั้น เป็นช่วงที่เกิดอุทกภัยครั้งใหญ่ของประเทศไทย แม้ว่าในบางช่วงปริมาณน้ำฝนจะน้อยลงบ้าง แต่ปริมาณน้ำในเขื่อนยังคงสูงมาก และมีการระบายออกตลอดเวลา อันเป็นผลทำให้น้ำในลุ่มน้ำยมและน่านยังคงอยู่ในระดับสูง ดังนั้นการเก็บตัวอย่างในบางช่วงต้องไปเก็บบริเวณต้นน้ำและลำน้ำสาขาซึ่งมีความลึกไม่มากนัก โดยที่ตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดที่ได้จากลุ่มน้ำยมจะมีปริมาณมากกว่าจากลุ่มน้ำน่าน เนื่องจากในลุ่มน้ำน่านมีน้ำมากเกือบตลอดปี ซึ่งเป็นผลมาจากการระบายน้ำเพื่อรักษาระดับในเขื่อนสิริกิติ์ อย่างไรก็ตาม จำนวนสปีชีส์ของหอยกาบน้ำจืดที่สำรวจพบในลุ่มน้ำยมและน่านในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าใกล้เคียงกับในรายงานการจำแนกหอยกาบน้ำจืดในประเทศไทยของ Brandt (1974)

เนื่องจากพื้นที่ที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างนั้น มีระยะทางไกลจากห้องปฏิบัติการมาก ทำให้หอยกาบน้ำจืดบางสปีชีส์ที่มีขนาดเล็กซึ่งต้องการออกซิเจนสูง ไม่สามารถทนต่อการเคลื่อนย้ายได้ ทำให้มีสภาพอ่อนแอหรือตายก่อนที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ ส่งผลต่อการตรวจพบเซลล์ในระยะเมตาเฟสจำนวนน้อยลงไปด้วย หรืออาจไม่พบเลย ดังนั้นกรณีที่ถึงช่วงเวลาของการแบ่งตัวระยะเมตาเฟสในบางสปีชีส์อาจเริ่มทำการแช่สารละลายโคลชิซินในระหว่างการเดินทาง และกลับมาทำการเตรียมโครโมโซมในขั้นตอนอื่นต่อไป

หอยกาบน้ำจืดที่นำมาศึกษานั้น ยังไม่สามารถนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอันเนื่องมาจากลักษณะความเป็นอยู่และวิธีการกินอาหารที่มีความแตกต่างและเป็นลักษณะเฉพาะตัวมาก ดังนั้นจึงทำได้เพียงนำหอยมาพักไว้ มีผลให้หอยอ่อนแอและมีอัตราการแบ่งตัวลดน้อยลงเรื่อยๆ ด้วยเหตุนี้จะต้องทำการเตรียมโครโมโซมให้เร็วที่สุด เพื่อความสมบูรณ์ของโครโมโซม

5. <u>การเตรียมโครโมโซม</u>

เซลล์ที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ เซลล์จากเนื้อเยื่อเหงือกหอย (Nakamura, 1985; Rasotto *et al.*, 1981) เนื่องจากเซลล์ที่ได้จะมีขนาดใหญ่ และสามารถพบเซลล์เมตาเฟสจำนวนมาก (Nadamitsu and Kanai, 1978; Ojima, 1984) นอกจากนั้นได้ทดลองนำเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (egg) มาศึกษาด้วยวิธีการเดียวกันนี้ ปรากฏว่า สำหรับเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้นั้น โครโมโซมที่ได้มีขนาดเล็ก และหดสั้นมาก (Nadamitsu and Kanai, 1975) ส่วนเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้ผลดีใกล้เคียงกับการใช้เนื้อเยื่อเหงือก (Vitturi *et al.*, 1983) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่เลือก

เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เนื่องจากโอกาสที่จะเก็บตัวอย่างให้ได้หอยซึ่งอยู่ในระยะมีเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียที่กำลังเจริญนั้นเป็นไปได้น้อย นอกจากนั้นระยะนี้จะอยู่ในช่วงฤดูหนาวซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่ระดับน้ำในแม่น้ำขึ้นสูงมาก ประกอบกับเนื้อเชื่อชนิดนี้เมื่อนำมาเก็บเกี่ยวเซลล์ จะมีโอกาสเกิด polyploid ได้ง่าย (Vitturi *et al.*, 1983)

การเตรียมโครโมโซมในระยะเมตาเฟสนั้น พบว่า ในหอยแต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างกันไม่มากนัก และความแตกต่างของเวลาที่เกิดระยะเมตาเฟสจะขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของหอยและสภาพที่หอยอาศัยอยู่ ในการใช้สารละลายโคลชิซิน ได้ทดลองใช้วิธีฉีดโคลชิซินเข้าตัวหอยและวิธีแช่หอยทั้งตัวในสารละลายโคลชิซิน (Ieyama, 1994) พบว่า วิธีฉีดได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร และหอยบางสปีชีส์จะตายก่อนครบเวลา ส่วนวิธีแช่หอยทั้งตัวจะได้ผลดีมากกว่า ระยะเวลาในการแช่หอยที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 5-8 ชั่วโมง โดยขึ้นอยู่กับขนาดของหอยที่นำมาศึกษา ซึ่งหอยที่มีขนาดเล็กกว่าจะใช้เวลาน้อยกว่าหอยขนาดใหญ่ นอกจากนี้ลักษณะของเปลือกหอยและการปิดเปิดฝา มีผลต่อเวลาที่ใช้แช่สารละลายโคลชิซินด้วย ในด้านความเข้มข้นของโคลชิซินนั้น พบว่า สารละลายโคลชิซิน 0.05% สามารถหยุดการแบ่งเซลล์ให้อยู่ในระยะเมตาเฟสได้ดี

การทำให้เซลล์บวมโดยสารละลายไฮโปโทนิค (hypotonic) พบว่า การใช้ 0.69 M KCl จะทำให้เซลล์บวมพอเหมาะแก่การทำให้เซลล์แตกและโครโมโซมกระจาย โดยใช้เวลาแช่สารละลายไฮโปโทนิคนาน 45 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า ในหอยบางสปีชีส์ ได้แก่ *C. hainesiana* และ *H. (Limnoscapha) myersiana* ต้องเพิ่มเวลาในการแช่ไฮโปโทนิค หรือลดค่าความเข้มข้นของสารละลายไฮโปโทนิคลง เนื่องจากเซลล์เหงือกของหอยสองสปีชีส์นี้มีเยื่อหุ้มเซลล์หนา ตลอดจนมีเมือกที่ขับออกมามาก เมื่อใช้ค่าและช่วงเวลาที่แช่ไฮโปโทนิคเช่นเดียวกับสปีชีส์อื่นๆ จะไม่สามารถเตรียมโครโมโซมได้

ในด้านจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการนับจำนวนโครโมโซมนั้น เนื่องจากหอยที่ศึกษาแต่ละสปีชีส์มีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซม 2n = 38 เท่ากันทุกสปีชีส์ จึงได้กำหนดจำนวนเซลล์ที่ใช้นับโครโมโซมในแต่ละสปีชีส์เป็น 100 เซลล์ เพื่อให้เกิดความถูกต้องมากที่สุด ส่วนในการจัดเรียงคาริโอไทป์นั้น เนื่องจากค่าความยาวแขนที่นำมาใช้ประกอบการวิเคราะห์และจัดเรียงคาริโอไทป์มาจาก 10 เซลล์ ซึ่งมีความแตกต่างกันเล็กน้อย ดังนั้นจึงใช้ค่าความยาวแขนเฉลี่ยของโครโมโซมและค่า Centromeric index เฉลี่ย และค่า Relative length จาก 10 เซลล์ ของแต่ละสปีชีส์ มาใช้ในการจัดเรียงคาริโอไทป์และสร้างอิดิโอแกรม