บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

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

การศึกษาครั้งนี้เป็นสิ่งที่ต้องใช้ความพยายามเป็นอย่างมาก เริ่มจากในการเก็บตัวอย่างหอยทากบกในป่าซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถเก็บตัวอย่างได้เฉพาะในฤดูฝนและในเวลากลางคืนจะเก็บได้ดีที่สุด การเตรียมโครโมโซมในหอยทากบกหลายสปีชีส์ต้องมีการปรับเปลี่ยนระยะเวลาในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้ได้เมตาเฟสโครโมโซมที่สวยงาม การศึกษาครั้งนี้มีหอยทากบางสปีชีส์ที่พยายามเตรียมโครโมโซมแต่ก็ได้ผลที่ไม่สมบูรณ์ การอภิปรายผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้

โดยสภาพธรรมชาติแล้วพบว่าหอยทากบกจะออกหากินในเวลากลางคืน และส่วนใหญ่จะเก็บได้ในฤดูฝน ซึ่งจะต้องใช้ระยะเวลาหลายเดือนเพื่อให้ได้ตัวอย่างหอยทากบกที่มากพอสำหรับการทำวิจัย

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

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

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

แต่ในสารละลายที่ใช้ยับยั้งการแบ่งเซลล์และชนิดของสารละลายที่ใช้ยับยั้งการแบ่งเซลล์ไม่เหมือนกัน

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

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

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

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย