รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย

2. **โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix*

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Biology, geographical distribution and genetic diversity of aquatic pest snail *Radix*

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง :

อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน :

ดาราพร รินทะรักษ์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ปราสาททอง พรหมเกิด สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ไตรเดช ข่ายทอง สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ** :

ดำเนินการศึกษาชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ได้ตัวอย่างหอย *Radix* ทั้งหมด 80 ตัวอย่างจาก 8 จังหวัด (ตาก ยโสธร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ นครราชสีมา สุพรรณบุรี นครปฐม และกาญจนบุรี) พบว่า 71 ตัวอย่างคือ *R. rubiginosa* และอีก 9 ตัวอย่างคือ *R. swinhoei* ผลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสอดคล้องกับการระบุชนิดหอย *Radix* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี NJ ML และ BI อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชนิดนี้เพื่อให้เข้าใจถึงพฤติกรรมเชิงนิเวศวิทยาซึ่งมีความจำเป็นต่อการวางแผนจัดการและการกำจัด

Biology, geographical distribution and genetic diversity of aquatic pest snail *Radix* were elucidated from October 2016 to September 2017. Totally 8 0 specimens of *Radix* were collected from 8 provinces (Tak, Yasothon, Ubon Ratchathani, Sisaket, Nakhon Ratchasima, Suphanburi, Nakhon Pathom, and Kanchanaburi). 71 samples were morphologically identified as *Radix rubiginosa* while 9 samples were *R. swinhoei*. Molecular investigation using *cox*I also confirmed the morphological identification of *Radix* samples. There are two major clades of *Radix* found with more than 50% bootstrapping support (NJ and ML) and more than 0.5 of posterior probability value (BI). Further population genetic research for *Radix* is needed to get ecological insights which is crucial for management and control for this species.

6. คำนำ :

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เป็นแหล่งที่อยู่ของพันธุ์พืชน้ำหลายชนิดที่มีความสวยงาม สามารถนำมาใช้ประดับตกแต่งตู้ปลา และจัดสวน พรรณไม้น้ำเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ต่างประเทศต้องการและให้ราคาสูง ไม้น้ำประดับสร้างรายได้ให้กับประเทศนับร้อยล้านบาทและมีแนวโน้มที่จะเติบโตต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญของการผลิตไม้น้ำและการส่งออกคือปัญหาการเข้าทำลายจากหอยน้ำศัตรูพืชซึ่งสร้างความเสียหายแก่พรรณไม้น้ำ นอกจากนี้ตัวและไข่หอยยังติดไปกับต้นไม้ ทำให้เสียเวลาในการล้างทำความสะอาดก่อนนำส่งออก ถ้าหากมีการพบเห็นตัวและไข่หอยติดไปกับพรรณไม้น้ำส่งออกจะถูกเผาทำลาย ทำให้ภาพพจน์การส่งออกไม้น้ำของประเทศไทยเสื่อมเสียอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตรกำลังทำการวิจัยหอยศัตรูพรรณไม้น้ำ พบว่าหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* (วงศ์ Lymnaeidae) เป็นหนึ่งในชนิดที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถทำความเสียหายแก่พรรณไม้น้ำประดับเป็นอย่างมาก มักพบหอยสกุลนี้ติดไปกับไม้น้ำ และเข้าทำลายโดยการกัดกินใบจนเสียหาย เช่น บัว เป็นต้น และมีถิ่นอาศัยอยู่ในประเทศไทย มักพบตามแหล่งน้ำจืด เช่น หนอง คลอง บึง แม่น้ำ เป็นต้น อีกทั้งมีรายงานว่าเป็นศัตรูเข้าทำลายข้าวในประเทศอินเดีย

หอยสกุล *Radix* จัดอยู่ในวงศ์ Lymnaeidae เป็นหอยน้ำจืดไม่มีฝาปิด สามารถพบได้ทั่วโลก (Hunova *et al*., 2012; Correa *et al*., 2010) ในประเทศไทยพบรายงาน 3 ชนิด ได้แก่ *Radix rubiginosa*, *R. swinhoei* และ *R. luteola* ทุกชนิดสามารถเป็นตัวกลางของพยาธิที่ก่อให้เกิดโรคในคน ดังเช่น *R. swinhoei* เป็นตัวกลางของพยาธิใบไม้ในตับ ทั้ง *I. exustus* และ *Radix* รวมเรียกว่าหอยคัน เนื่องมาจากหอยเหล่านี้เป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิใบไม้ในเลือดของสัตว์ ซึ่งตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิเหล่านี้สามารถชอนไชผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกาย แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ทำให้มีผิวหนังอักเสบและมีอาการคัน (วิวิชชุตา, 2549) มีรายงานว่า *R. swinhoei* เข้ากัดกินและ

ก่อให้เกิดความเสียหายแก่บัวหลวง (Tian, 2008) ทางกรมวิชาการเกษตรกำลังดำเนินการศึกษาหอยศัตรูพรรณไม้น้ำและพบว่าหอยสกุล *Radix* นี้เป็นหอยศัตรูพรรณไม้น้ำประดับ (อภินันท์และคณะ, 2557)

มีรายงานการศึกษาการกินพืชน้ำในหอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* โดยศึกษากับพืชน้ำ 21 ชนิดพบว่าอัตราการกินมีค่าตั้งแต่ 1.1 ถึง 22% ของน้ำหนักตัวและมีความแตกต่างกันในพืชน้ำแต่ละชนิด หอยจะชอบกินพืชที่มีไนโตรเจนสูง และหลีกเลี่ยงพืชที่มี ส่วนประกอบแห้ง (dry matter content) สูง และพืชบางชนิดที่มีสารเคมีที่หอยไม่ชอบเช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหอยชนิดอื่น เช่น *P. insularum* และ *Lymnaea stagnalis* (Wong *et al*., 2010; Elger and Barrat-Segretain, 2002)

มีการศึกษาการกินพืชน้ำในหอย *Radix swinhoei* พบว่า หอยชนิดนี้สามารถกินพรรณไม้น้ำสกุล *Myriophyllum Monochoria Eichhornia Brasenia Cabomba Alternanthera Hydrilla Elodea Ottelia Vallisneria Hydrocharis Potamogeton Egeria Monochoria Utricularia* และสามารถกิน *Pomatogeton malaianus* ได้มากที่สุด (Li *et al*., 2009; Xiong *et al*., 2008)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของหอยน้ำสกุล *Radix* ดังนี้ Gaten (1986) รายงานว่า *Radix peregra* มีอัตราการเจริญของความยาวเปลือกอยู่ระหว่าง 2.41 ถึง 2.86 มิลลิเมตร ต่อระยะเวลา 4 สัปดาห์ วางไข่ตั้งแต่ 11 ถึง 99 ฟองต่อกลุ่ม สืบพันธุ์เพียง 1 รอบต่อปี ต่อมา Bryne et al. (1989) ได้รายงานว่า *R. peregra* มีช่วงชีวิตตั้งแต่ 140 ถึง 728 วัน วางไข่ในช่วงฤดูไม้ใบไม้ผลิและต้นฤดูร้อน หลังจากฟักออกมาจากไข่มีความยาวเปลือก 0.9 ถึง 1.1 มิลลิเมตร ในประเทศไทย กัญญา (2520) ศึกษาชีววิทยาบางประการของ *Radix rubiginosa* พบว่าหอยชนิดนี้กินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ ไดอะตอม พืชดังเช่น สาหร่ายพุงชะโด ผักตบชวา บัวประดับ ผักบุ้ง จอก แหน เป็นต้น มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนไข่เฉลี่ย 11 ถึง 28 ฟอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของศัตรูพืชทำให้เข้าใจชีววิทยา นิเวศวิทยา และกระบวนการวิวัฒนาการ (evolution) ในการระบาดบุกรุก (invasion) ของศัตรูพืช การแพร่กระจาย (dispersal) การเปลี่ยนแปลงประชากร (demography) และการปรับตัว (adaptation) ของศัตรูพืชให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการจัดการศัตรูพืช (applied pest management) ข้อมูลเชิงพันธุกรรมสามารถใช้เพื่อการระบุชนิดศัตรูพืช (identification of pest species) ใช้ประเมินประสิทธิผล (efficacy) ของการจัดการศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมาย (target invasive pest) ดังเช่นการเกิดปรากฏการณ์คอขวด (bottleneck effect) หลังจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำให้สัดส่วนของศัตรูพืชที่ต้านทานมีมากขึ้น เป็นต้น ใช้ในการอธิบายเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นกับประชากรศัตรูพืช (pest demographic history) และคาดคะเนเส้นทางการบุกรุก (reconstruction of pest invasion route) (Kirk *et al*., 2013)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและอณูชีววิทยาของหอยน้ำจืดดังนี้ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อระบุชนิดของหอยในวงศ์ Lymnaeidae ในประเทศไทย (Kaset et al., 2010) หอยในวงศ์ Lymnaeidae จากหลายทวีป (Correa *et al*., 2010) และในประเทศเวียดนาม (Dung *et al*., 2013) หอยในวงศ์ Bithyniidae (Kulsantiwong *et al*., 2013) มีการใช้เทคนิค real-time PCR ในการแยกชนิดหอยในวงศ์ Lymnaeidae ในประเทศอาร์เจนตินา (Duffy *et al*., 2009) นอกจากนี้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำ *Physella acuta* เพื่อตอบคำถามว่ามีพาหะใดบ้างที่นำพาหอยชนิดนี้ไปแพร่กระจายไปยังสถานที่อื่น (Van Leeuwen et al., 2013) จากการศึกษาหอย *Radix balthica* พบว่าหลายปัจจัยเช่นการเกิด local drift และภูมิอากาศมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม (Pfenninger *et al*., 2011) ต่อมา Haun *et al*. (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *R. bathica* และพบว่าการเข้าไปตั้งถิ่นฐาน (colonization) และความแปรปรวนของประชากรย่อย (metapopulation dynamics) มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม

นอกจากหอย *Radix* จัดเป็นศัตรูพรรณไม้น้ำที่สำคัญแล้ว มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับหอยสกุลนี้ในแง่ของความสำคัญด้านการแพทย์ เนื่องจากหอยชนิดนี้เป็นพาหะของพยาธิหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลพื้นฐานในด้านของชีววิทยาดังเช่น อนุกรมวิธาน วงจรชีวิต การสืบพันธุ์ แหล่งที่อยู่อาศัย และอาหาร เป็นต้น การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้ข้อมูลทางด้าน ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยจะทำให้เข้าใจถึงธรรมชาติและพฤติกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิงวิชาการ เพื่อการป้องกันกำจัดและมีความจำเป็นต่อการวางแผนเพื่อการจัดการหอยน้ำศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ (pest management) ต่อไปได้

7. วิธีดำเนินการ :

- - อุปกรณ์
- กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ กระดาษอเนกประสงค์
- เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
- อาหารปลาชนิดเม็ด
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
- สาหร่าย และไม้น้ำ
- ผักสด
- เครื่อง UV transilluminator
- เครื่อง autoclave
- เครื่อง PCR
- เครื่องอบความร้อน

- วิธีการ

1) เก็บตัวอย่าง เลี้ยงหอยและศึกษาการแพร่กระจาย

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* จากแปลงปลูกและแหล่งน้ำธรรมชาติ บันทึกลักษณะของระบบนิเวศที่เป็นที่อยู่อาศัยของหอย พืชอาหาร วัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ บันทึกข้อมูลการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ โดยการจดบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์ อำเภอ จังหวัด สถานที่ สิ่งแวดล้อมและลักษณะถิ่นที่อยู่ของหอย ทำการบันทึกข้อมูลด้วยโปรแกรม Google Earth

2) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและน้ำหนัก

นำหอยที่เก็บตัวอย่างมาได้มาวัดความสูงของเปลือก (จาก apex จนถึงด้านล่างสุดของ aperture) ความยาวของเปลือก ความกว้างของรูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะของเปลือก ชั่งน้ำหนักหอย นำมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาว ความสูงของเปลือกและน้ำหนัก ด้วยวิธี correlation analysis

3) ศึกษาวงจรชีวิต

3.1 นำหอยที่ได้จากในข้อ 13.1 นำหอยมาเลี้ยงเพื่อศึกษาวงจรชีวิตในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ที่ภายในบรรจุน้ำประมาณ 3 ลิตร พร้อมสาหร่ายหางกระรอก นำไปเลี้ยงในบริเวณที่มีแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้อาหารปลาชนิดเม็ดและผักกาดหอมทุก 3 วัน และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและให้แคลเซียมผงทุก 7 วัน วัดความสูงความยาวของเปลือก น้ำหนัก วัดค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ

3.2 เมื่อหอยเกิดการผสมพันธุ์และวางไข่ บันทึกจำนวนไข่ต่อกลุ่ม ให้นำไข่มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกบรรจุน้ำและสาหร่ายหางกระรอกกล่องใหม่ เมื่อลูกหอยรุ่นที่ 1 ฟักออกมาจากไข่แล้ว นับจำนวน ชั่งน้ำหนักและวัดขนาดลูกหอยที่เกิดขึ้นใหม่ทุกสัปดาห์

3.3 เลี้ยงลูกหอยรุ่นที่ 1 จนกระทั่งเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยและสามารถผสมพันธุ์ได้ ให้ดำเนินการตามข้อที่ 13.3.1 และ 13.3.2 จนกระทั่งเกิดลูกหอยรุ่นที่ 2

4) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเนื้อเยื่อของหอยมาสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% และนำไปใส่ในกล่องที่บรรจุทีบีอีบัฟเฟอร์ ผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมในอัตราส่วน 1:5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปิดให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การเพิ่มปริมาณยีน coxI ด้วยพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีน coxI ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ของ Folmer et al. (1994) แต่ละไพร์เมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ LCO1490 (5’-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3’) และ HCO2198 (5’-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3’)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วยสารเคมีต่อไปนี้

10x buffer	5	µl
10 mM dNTP mix	1	µl
10 µM LCO1490 primer	1.5	µl
10 µM HCO2198 primer	1.5	µl
2 U/µl Taq polymerase	0.5	µl
template DNA (ดีเอ็นเอของหอย)	1	µl
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	39.5	µl

นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดพีซีอาร์และผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermocycler ภายใต้อุณหภูมิดังนี้

- ช่วงเริ่มต้น

95°C เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ

- ช่วงเพิ่มปริมาณ

a) 95°C เป็นเวลา 1 นาที

b) 50°C เป็นเวลา 1 นาที

c) 72°C เป็นเวลา 1 นาที

ทำซ้ำเรียงตามลำดับจาก a) ถึง c) 35 รอบ

- ช่วงสุดท้าย

72°C เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ

หลังจากนั้นนำสารผสมดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบว่ามีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการเกิดขึ้นหรือไม่ โดยเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.8% และนำไปใส่ในกล่องที่บรรจุทีบีอีบัฟเฟอร์ ผสมสารผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมในอัตราส่วน 1:5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปิดให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ ถ้ามีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการขนาดประมาณ 600 คู่เบสเกิดขึ้นให้นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสรอการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่มีให้บริการโดยบริษัทเอกชนที่รับจ้างอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และสร้างสร้างแผนภูมิต้นไม้ต่อไป

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิต้นไม้

นำไฟล์ที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer มาวิเคราะห์และตัดบริเวณสัญญาณรบกวนออก เพื่อให้ได้ไฟล์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน coxI ทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT version 7 (Katoh and

Standley, 2013) หลังจากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ 3 วิธี ดังนี้

4.4.1 วิธี neighbor-joining

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.1 (Tamura et al., 2011) โดยใช้โมเดล Kimura-2 parameter และทดสอบความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธีบูทสแทร็ป 1,000 ซ้ำ

4.4.2 วิธี maximum likelihood

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทดสอบหาโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม jModeltest version 2 (Darriba et al., 2012) และนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ตามโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม PhyML version 3 (Guindon et al., 2010) และทดสอบความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธีบูทสแทร็ป 1,000 ซ้ำ

4.4.3 วิธี Bayesian inference

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ตามโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยตั้งค่า MCMC chain เท่ากับ 10,000,000 รอบ และตัด burn-in ออก 25% ก่อนสร้างแผนภูมิ

นำแผนภูมิที่ได้จากทั้ง 3 วิธีมารวมให้เป็นแผนภูมิเดียว เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Lymnaea* sp. เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม

- การบันทึกข้อมูล

ความสูงของเปลือก (จาก apex จนถึงด้านล่างสุดของ aperture) ความยาวของเปลือก ความกว้างของรูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะของเปลือก น้ำหนักหอย ลักษณะของระบบนิเวศที่เป็นที่อยู่อาศัยของหอย พืชอาหาร วัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ บันทึกข้อมูลการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ โดยการจดบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์ อำเภอ จังหวัด สถานที่ สิ่งแวดล้อมและลักษณะถิ่นที่อยู่ของหอย

- เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 โดยเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Radix* ตามธรรมชาติและแปลงปลูกทั่วประเทศไทย นำมาศึกษาชีววิทยา สกัดดีเอ็นเอและทำพีซีอาร์ ณ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ได้ตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืช *Radix* ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จากจังหวัดจังหวัดนครราชสีมาได้ 9 ตัวอย่าง จังหวัดตาก 10 ตัวอย่าง จังหวัดอุบลราชธานี 10 ตัวอย่าง จังหวัดกาญจนบุรี 25 ตัวอย่าง จังหวัดยโสธร 5 ตัวอย่าง จังหวัดสุพรรณบุรี 1 ตัวอย่าง จังหวัดศรีสะเกษ 10 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 10 ตัวอย่าง พบว่าหอยที่เก็บได้จากจังหวัดกาญจนบุรีและนครปฐมเป็นหอยชนิด *Radix*

rubiginosa และ *R. swinhoei* จังหวัดอื่น ๆ เป็นหอยชนิด *R. rubiginosa* (รูปที่ 1) พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ (71 จาก 80 ตัวอย่าง คิดเป็น 88.8%) เป็นหอยชนิด *R. rubiginosa* มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้น (9 จาก 80 ตัวอย่าง คิดเป็น 11.2%) เป็นหอยชนิด *R. swinhoei* หอยชนิด *R. rubiginosa* พบในทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษา ขณะที่ *R. swinhoei* พบเพียง 2 จังหวัดจาก 8 จังหวัดที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 1)

จากการศึกษาลักษณะกลุ่มไข่ของ *R. rubiginosa* พบว่า กลุ่มไข่ของ *Radix* มีเมือกหุ้มกลุ่มไข่ ไข่มีจำนวนตั้งแต่ 10-40 ฟองต่อกลุ่ม ไข่จะฟักเป็นตัวภายใน 3-6 วัน จากนั้น หอยจะเจริญเติบโตจนสามารถวางไข่ได้ใช้เวลาประมาณ 25-45 วัน เมื่อโตเต็มที่จะมีความยาวเปลือกประมาณ 9 ถึง 35 มิลลิเมตร และมีความกว้างเปลือกประมาณ 6 ถึง 8 มิลลิเมตร

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหอย 20 ตัวอย่าง และตอนนี้กำลังดำเนินการหาสภาวะที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *cox*I พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการทำพีซีอาร์คือการใช้วงรอบพีซีอาร์ตามอุณหภูมิและช่วงเวลาต่อไปนี้

1) 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2) 40 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3) 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที

ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (รูปที่ 2) แต่ยังมี non-specific product เกิดขึ้นที่ขนาดประมาณ 500 คู่เบสในบางตัวอย่าง จึงต้องมีการปรับสภาวะพีซีอาร์ดังกล่าว ในขั้นตอนที่ 2 (annealing) เพิ่มขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แถบดังกล่าวจึงหายไป

จากการสกัดดีเอ็นเอและทำพีซีอาร์ของยีน *cox*I จากตัวอย่างหอยจำนวน 30 ตัวอย่าง ได้แก่ กาญจนบุรี 6 ตัวอย่าง นครปฐม 6 ตัวอย่าง นครราชสีมา 5 ตัวอย่าง ตาก 5 ตัวอย่าง อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง และศรีสะเกษ 5 ตัวอย่าง พบว่าโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคือ HKY+G+I จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงให้เห็นว่าพบ *Radix* 2 ชนิด ได้แก่ *Radix rubiginosa* (กลุ่ม A) และ *Radix swinhoei* (กลุ่ม B) ซึ่งลักษณะโครงสร้างของแผนภูมิจากการสร้างแผนภูมิด้วยวิธีการ neighbor joining, maximum likelihood และ Bayesian inference พบว่ามีความสอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (รูปที่ 3)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Radix* ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จาก 8 จังหวัด พบว่าเป็น *Radix rubiginosa* 71 ตัวอย่าง และ *Radix swinhoei* 9 ตัวอย่าง การจำแนกทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับการใช้ยีน *cox*I ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการทั้งสามวิธี ทั้งนี้ ควร

ทำการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์ประชากร เพื่อที่จะเข้าใจถึงนิเวศวิทยาเชิงโมเลกุล พฤติกรรม และการแพร่กระจายได้ดียิ่งขึ้น อันจะนำไปสู่การวางแผนการจัดการหอยน้ำศัตรูพืชต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

พัฒนาต่อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกไม้น้ำ หน่วยงานของรัฐผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย นักวิชาการ และผู้สนใจ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

ขอขอบคุณ นายวีระวุฒิ พรมสุวรรณ ผู้ช่วยวิจัย และเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานสัตววิทยา การเกษตร และเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานไส้เดือนฝอยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง :

กัญญา อังศุพานิช. 2520. ชีววิทยาบางประการของหอย *Lymnaea* (*Radix*) *auricularia rubiginosa* Michelin (1831). วิทยานิพนธ์ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทัศนีย์ มุงเมือง, นิดารัตน์ ไพรคณะฮก, วีรชัย วิโรจน์แสงอรุณ และนพพร ศราธพันธุ์. 2543. หอยลิมเนีย รูบิจิโนซาและหอยอินโดพลานอร์บิส เอกซัสตัสที่ติดพยาธิใบไม้ของโคตามธรรมชาติในหนองน้ำที่อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38: สาขาสัตวแพทยศาสตร์, กรุงเทพ. หน้า 370-378.

ยุพา วรยศ. 2534. พันธุ์ไม้น้ำ Aquatic Plants BO351 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 500 หน้า

วนาพร วงษ์นิคง, ศรุต สุทธิอารมณ์, ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา, วิภาดา ปลอดครบุรี, บุษบง มนัสมั่นคง, พวงผกา อ่างมณี. 2553. การศึกษาชนิดและทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพรรณไม้น้ำ. รายงานวิจัยประจำปี. กลุ่มบริหารศัตรูพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1569-1580.

วิวิชชุตา เดชรักษา. 2549. การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยน้ำจืดวงศ์ Thiaridae ในภาคเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุกัญญา พริกจำรูญ. 2548. คู่มือการเพาะเลี้ยงและส่งออกพรรณไม้น้ำปลาสวยงาม. สำนักพิมพ์นีออนบุ๊คมีเดีย. 130 หน้า

อรุณี รอดลอย, สุจินต์ หนูขวัญ และยุพเยาว์ สายจันทร์. 2555. การศึกษาชนิดและการกระจายพันธุ์ของพรรณไม้น้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย. กลุ่มงานวิจัยพรรณไม้น้ำ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 316 หน้า.

อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข, ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์, ดาราพร รินทะรักษ์ และปราสาททอง พรหมเกิด ความหลากชนิดและการป้องกันก้าจัดหอยศัตรูพรรณไม้น้ำประดับ รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 2682-2693.

Byrne, R. A., Reynolds, J. D., and McMahon, R. F. 1989. Shell Growth, Reproduction and Life Cycles of *Lymnaea peregra* and *L. palustris* (Pulmonata: Basommatophora) in Oligotrophic Turloughs (Temporary Lakes) in Ireland. Journal of Zoology, London 217: 321-339.

Elger, A. and Barrat-Segretain, M. H. 2002. Use of the Pond Snail *Lymnaea stagnalis* (L.) in Laboratory Experiments for Evaluating Macrophyte Palatability. Archiv Fur Hydrobiologie 153(4): 669-683.

Bandelt, H-J., Forster, P., and Rohl, A. 1999. Median-joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16:37-48.

Brandt, R. A. M. 1974. The non-marine aquatic mollusca of Thailand. Archiv fuer Molluskenkunde 105: 1 – 423.

Correa, A. C., Escobar, J. S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J-P., and Hurtrez-Boussès, S. 2010. Bridging Gaps in the Molecular Phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), Vectors of Fascioliasis. BMC Evolutionary Biology 10: 381.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772.

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. and Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular biology and evolution 29(8): 1969-1973.

Duffy, T., Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Issia, L., Schijman, A. G., and Wisnivesky-Colli, C. 2009. Real-time PCR Strategy for Rapid Discrimination among Main Lymnaeid Species from Argentina. Acta Tropica 109: 1–4.

Dung, B. T., Doanh, P. N., The, D. T., Loan, H. T., Losson, B., and Caron, Y. 2013. Morphological and Molecular Characterization of Lymnaeid Snails and

Their Potential Role in Transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. Korean Journal of Parasitology 51(6): 657-662.

Excoffier, L., and Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10: 564-567.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3, 294-297.

Gaten, E. 1986. Life Cycle of *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata) in the Leicester Canal, U.K., with an Estimate of Annual Production. Hydrobiologia 135: 45-54.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, 59(3): 307-321.

Haun, T., Salinger, M., Pachzelt, A., and Pfenninger, M. 2012. On the Processes Shaping Small-Scale Population Structure in *Radix balthica* (Linnaeus, 1758). Malacologia 55(2): 219-233.

Hunova, K., Kasny, M., Hampl, V., Leontovyc., R., Kubena, A., Mikes, L. and Horak, P. 2012. *Radix* spp.: Identification of Trematode Intermediate Hosts in the Czech Republic. Acta Parasitologica 57(3): 273-284.

Kaset, C., Eursitthichai, V., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V., and Grams, R. 2010. Rapid Identification of Lymnaeid Snails and Their Infection with *Fasciola gigantica* in Thailand. Experimental Parasitology 126: 482–488.

Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Molecular biology and evolution 30(4): 772-780.

Kirk, H., Dorn, S., and Mazzi, D. 2013. Molecular Genetics and Genomics Generate New Insights into Invertebrate Pest Invasions. Evolutionary Applications 6: 842–856.

Kulsantiwong, J., Prasopdee, S., Ruangsittichai, J., Ruangjirachuporn, W., Boonmars, T., Viyanant, V., Pierossi, P., Hebert, P. D. N., Tesana, S. 2013. DNA Barcode Identification of Freshwater Snails in the Family Bithyniidae from Thailand. PLOS ONE 8(11): e79144.

Li, K-Y., Liu, Z-W., Hu, Y-H., and Yang, H-W. 2009. Snail Herbivory on Submerged Macrophytes and Nutrient Release: Implications for Macrophyte Management. Ecological Engineering 35: 1664–1667.

Librado, P., and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. Bioinformatics 25**:** 1451-1452.

Pfenninger, M., Salinger, M., Haun T., and Feldmeyer, B. 2011. Factors and Processes Shaping the Population Structure and Distribution of Genetic Variation Across the Species Range of the Freshwater Snail *Radix balthica* (Pulmonata, Basommatophora). BMC Evolutionary Biology 11: 135.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19(12): 1572-1574.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.

Stevens, M. M. 2002. Planorbidae and Lymnaeidae as Pests of Rice, with Particular Reference to *Isidorella newcombi* (Adams & Angus). In Molluscs as Crop Pests, Baker, G. M. ed. CABI Publishing. UK.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution 28: 2731-2739.

Tian, D. 2008. Container Production and Post-harvest Handling of Lotus (*Nelumbo*) and Micropropagation of Herbaceous Peony (*Paeonia*). Doctoral dissertation. Auburn University.

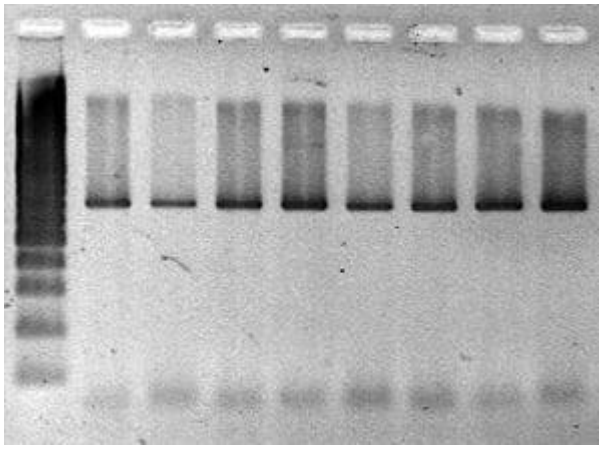
Van Leeuwen, C. H. A., Huig, N., Van Der Velde, G., Van Alen, T. A., Wagemaker, C. A. M., Sherman, C. D. H., Laassen, M. K., And Figuerola, J. 2013. How did This Snail Get Here? Several Dispersal Vectors Inferred for an Aquatic Invasive Species. Freshwater Biology 58: 88–99.

Wong, P. K., Liang, Y., Liu, N. Y., and Qiu, J. W. 2010. Palatability of Macrophytes to the Invasive Freshwater Snail *Pomacea canaliculata*: Differential Effects of Multiple Plant Traits. Freshwater Biology 55(10): 2023-2031.

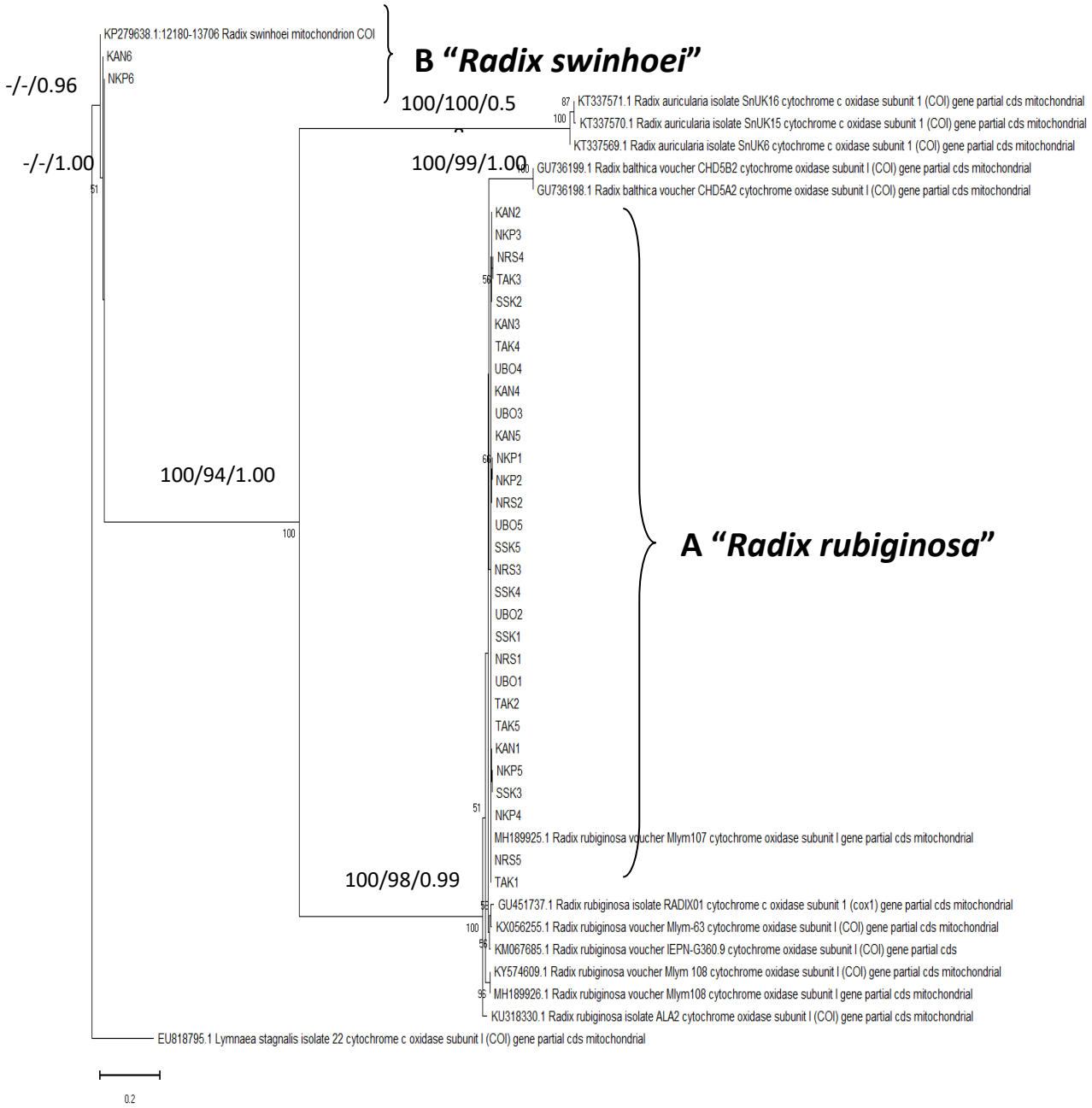
Xiong, W., Yu, D., Wang, Q., Liu, C., and Wang, L. 2008. A Snail Prefers Native over Exotic Freshwater Plants: Implications for The Enemy Release Hypotheses. Freshwater Biology 53: 2256–2263.

13. ภาคผนวก :

รูปที่ 1 หอยศัตรูพืช *Radix rubiginosa*



รูปที่ 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ยีน COI จากตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* จำนวน 8 ตัวอย่าง (จากซ้ายไปขวา) ตัวอย่าง KAN1-KAN5 และ NKP1-NKP3



รูปที่ 3 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ยีน COI ตัวอักษรย่อแทนชื่อตัวอย่างจากแต่ละจังหวัดดังนี้ KAN = กาญจนบุรี, NKP = นครปฐม, TAK = ตาก, NRS = นครราชสีมา, UBO= อุบลราชธานี และ SSK = ศรีสะเกษ ตัวเลขเอียงตัวแรกแทนค่า bootstrap ประจำกิ่ง ด้วยวิธี neighbor joining จำนวน 1,000 รอบ ตัวเลขเอียงตัวกลางแสดงค่า bootstrap ประจำกิ่ง ด้วยวิธี maximum likelihood จำนวน 1,000 รอบ และตัวเลขเอียงท้ายสุดแสดงค่า posterior probablility ประจำกิ่ง ด้วยวิธี bayesian inference

จังหวัด	*Radix*	
	R. rubiginosa	*R. swinhoei*
ภาคเหนือ		
ตาก	10	
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ		
ยโสธร	5	
อุบลราชธานี	10	
ศรีสะเกษ	10	
นครราชสีมา	9	
ภาคกลาง		
สุพรรณบุรี	1	
นครปฐม	6	4
ภาคตะวันตก		
กาญจนบุรี	20	5

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนหอยน้ำจืดศัตรูพืชสกุล *Radix* ที่สำรวจพบในแหล่งน้ำจืดในจังหวัดต่าง ๆ