



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายและเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยทากบกวงศ์
Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

โดย ดร. บังอร กองอ้อม และคณะ

ธันวาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายชนิดและเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยทากบกวงศ์
Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

คณะผู้วิจัย

ดร.บังอร กองอึ้ง

ศ.ดร.สมศักดิ์ ปัญญา

สังกัด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ของ สำนักงานคณะกรรมการการศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญญา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย (mentor) ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี Professor Fred Naggs, Department of Zoology, The Natural History Museum ประเทศอังกฤษ ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน และช่วยเหลือในการอ่านต้นฉบับบทความทางวิชาการ Siddal, S. Watson (AMNH, New York); J. Abblet and H. Taylor (NHM, London) และ T. Backeljau (RBINS, Brussel) ที่ช่วยเหลือในการดูตัวอย่างต้นแบบ (Type specimens) ดร. จิรศักดิ์ สุจริต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือด้านอนุกรมวิธาน Dr. Jolyond Dodgson ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ช่วยเหลือในการตรวจแก้ภาษาอังกฤษ ผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิตภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างหอยทากบก ขอขอบคุณคณาจารย์ บุคลากร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บ้งอร กองอิม

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5080405 MRG5080405

ชื่อโครงการ : ความหลากหลายชนิดและเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย : ดร.บังอร กองอิม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email : b.kongim@msu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550 ถึง 1 กรกฎาคม 2552)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดของหอยในวงศ์ Cyclophoridae ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์โครโมโซมโดยการศึกษาคาร์ิโอไทป์ สืบสาวและเก็บตัวอย่างตามภูเขาศรีสุทโธปถิ์และพื้นที่ป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ระหว่างเดือนมิถุนายน 2550 ถึงเดือนมิถุนายน 2551 รวมจำนวนทั้งสิ้น 50 แหล่ง จัดจำแนกชนิดหอยทากบกโดยลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก กายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ แรดูลาหรือแผงฟัน และโครโมโซม ผลการศึกษาพบหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ทั้งสิ้น 5 สกุล 9 สปีชีส์ 1 ซับสปีชีส์ ได้แก่ *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *Cyclophorus fulguratus* ssp., *C. courbeti*, *C. orthostylus*, *Cyclotus* sp1, *Cyclotus* sp2, *Micraulax* sp., *Platyrhaphe* sp., *Rhiostoma housei* และ *Rhiostoma* sp. และการพบ *Platyrhaphe* sp. ถือเป็นรายงานการค้นพบหอยสกุลนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และจัดเป็นหอยทากบกสปีชีส์ใหม่

ลักษณะแรดูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ที่ศึกษาเป็นแบบ Taenioglaossa เขียนสูตรแรดูลาได้เป็น 1M+2L+1C+2L+1M รอยหยักหรือคัสบนฟันในหอยแต่ละสกุลมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งจำนวนและรูปร่าง ลักษณะกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจนในหอยแต่ละสกุล โดยเฉพาะลักษณะรูปร่างของ bursa copulatrix, albumin gland, prostate gland, seminal receptacle และ seminal vesicle

ผลการศึกษาคาร์ิโอไทป์ พบว่าทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ $n = 14$, $2n = 28$ แต่มีค่าจำนวนแขนโครโมโซม (FN) ของคาร์ิโอไทป์แตกต่างกัน โดยหอยทากบกสกุล *Cyclophorus* มีจำนวนโครโมโซมชนิดที่มีแขนสองข้างมากกว่าหอยสกุลอื่นๆ และคาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกสกุล *Cyclotus* ทั้งสองชนิดพบโครโมโซม acentric chromosome นอกจากนี้ยังได้รายงานระบบโครโมโซมเพศของหอยสกุล *Cyclotus*, *Micraulax*, *Platyrhaphe* และ *Rhiostoma* เป็นครั้งแรก โดยหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae มีระบบโครโมโซมเป็นแบบ ZW/ZZ

คำสำคัญ: หอยทากบก, อนุกรมวิธาน, Cyclophoridae, คาร์ิโอไทป์, ระบบโครโมโซม zz/zw

Abstract

Project Code : MRG5080405

Project Title : Species diversity and Cytogenetics of land operculate snails family
Cyclophoridae in northeastern Thailand

Investigator : Dr.Bangon Kongim Mahasarakham University
Prof.Dr.Somsak Panha Chulalongkorn University

E-mail Address: b.kongim@msu.ac.th

Project Period: 2 years (July 2, 2007 – July 1, 2009)

The objectives of this study are to species diversity and cytogenetics of land operculate snails family Cyclophoridae. The taxonomy and systematics of cyclophorids were examined based on field surveys conducted throughout northeastern Thailand. Total collections were made from 50 mountain sites between June 2007 and June 2008. Eventually 5 genera of 9 species and a subspecies were identified as follows *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *Cyclophorus fulguratus* ssp., *C. courbeti*, *C. orthostylus*, *Cyclotus* sp1, *Cyclotus* sp2, *Micraulax* sp., *Platyrhaphe* sp., *Rhiostoma housei* and *Rhiostoma* sp. This is the first report of a newly genus and new species of *Platyrhaphe* sp.

They have the very constant radula formula of 1M+2L+1C+2L+1M that call Taenioglaossa type. The characteristics of cusp are very significant for species identification. Moreover, the anatomy of reproductive system such as bursa copulatrix, albumin gland, prostate gland, seminal receptacle and seminal vesicle can be used for identification.

The karyotype showed that all perform the same haploid and diploid chromosome numbers of $n = 14$, $2n = 28$. However, the fundamental chromosome number (FN) and karyotype formulae contain unique representatives of total summed combination of chromosome types. Among genera *Cyclophorus* exhibit symmetric karyotypes containing the highest bi-arm number which differs from others. Moreover, karyotypes of both *Cyclotus* species showed acentric chromosome. A ZZ-ZW sex determination system is prominent in this family.

Key words: Land snails, Taxonomy, Cyclophoridae, karyotype, zz/zw sex determination

Executive summary

หอยทากบก วงศ์ Cyclophoridae จัดอยู่ในอันดับ Mesogastropoda ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในเศษซากใบไม้บนพื้นดินในป่าตามแนวเทือกเขาหรือภูเขา สมาชิกส่วนใหญ่อยู่ในสกุลหอยหอม หอยเกล็ด หรือหอยภูเขา *Cyclophorus* ซึ่งเป็นหอยทากบกที่มีการนำมาปรุงอาหารโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนิยมรับประทานมาก อีกทั้งมีขายในตลาดท้องถิ่นถือเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีรายงานการรับประทานหอยหอมทั้งชาวไทยและประเทศเพื่อนบ้านเนื่องจากมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวเมื่อนำมาประกอบอาหาร และมีเนื้อขาวสะอาดน่ารับประทาน หลายคนกล่าวว่าหอยหอมเป็นหอยอีกกลุ่มหนึ่งที่มีรสชาติดีที่สุดเช่นเดียวกับเอสคาโกของฝรั่งเศส หอยทากบกกลุ่ม cyclophorids หลายสกุลมีข้อจำกัดของถิ่นอาศัย และออกไข่ในแต่ละครั้งจำนวนน้อยทำให้ประชากรลดจำนวนอย่างรวดเร็วและอยู่ในภาวะวิกฤตใกล้สูญพันธุ์ จึงจำเป็นต้องดำเนินการสำรวจและศึกษาอย่างเร่งด่วนเพื่อประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์ต่อไป นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยน้อยมาก และมีเอกสารที่พิมพ์มานานแล้วจำนวนหนึ่ง อีกทั้งข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายชนิดและเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในประเทศไทยยังมีน้อย การศึกษาอนุกรมวิธานที่ผ่านมาใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก และหลายสปีชีส์ยังคงเป็นปัญหาทางอนุกรมวิธาน จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าสัณฐานวิทยาของเปลือกเพียงอย่างเดียวไม่สามารถนำมาจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดของหอยในวงศ์ Cyclophoridae ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์โครโมโซมโดยการศึกษาคาร์ิโอไทป์ สำรวจและเก็บตัวอย่างตามภูเขาและพื้นที่ป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ระหว่างเดือนมิถุนายน 2550 ถึงเดือนมิถุนายน 2551 รวมจำนวนทั้งสิ้น 50 แหล่ง จำแนกชนิดหอยทากบกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการใช้เทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ ได้แก่ สัณฐานวิทยาของเปลือก กายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ แรดูลา หรือแผงฟัน และโครโมโซม ผลการศึกษาพบหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ทั้งหมด 5 สกุล 9 สปีชีส์ 1 ซับสปีชีส์ ได้แก่ *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *Cyclophorus fulguratus* ssp., *C. courbeti*, *C. orthostylus*, *Cyclotus* sp1, *Cyclotus* sp2, *Micraulax* sp., *Platyrhaphe* sp., *Rhiostoma housei* และ *Rhiostoma* sp. และการพบ *Platyrhaphe* sp. ถือเป็นรายงานการค้นพบหอยสกุลนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และจัดเป็นหอยทากบกสปีชีส์ใหม่

โดยหอยสกุลที่พบกระจายเฉพาะในเขตภูเขาหินปูน ได้แก่ *Micraulax*, *Platyrhaphe*, *Rhiostoma* และสกุลที่มีการกระจายทั้งในภูเขาหินปูนและภูเขาหินทราย ได้แก่ *Cyclophorus* และ *Cyclotus*

ลักษณะแรดูลา หรือแผงฟันของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ทุกสกุลมีแรดูลาเป็นแบบ Taenioglossa แต่มีจำนวนและลักษณะของฟันและรอยหยักหรือคัสแตกต่างกันอย่างชัดเจนในระดับสกุล สามารถเขียนสูตรแรดูลาได้เป็น $1M+2L+1C+2L+1M$ โดยฟันของหอยทากบกสกุล

Cyclotus จะมีความแหลมคมกว่าหอยสกุลอื่นทั้งสี่สกุลที่ศึกษา ลักษณะกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันในหอยแต่ละสกุล โดยเฉพาะลักษณะรูปร่างของ prostate gland และ seminal vesicle ของเพศผู้ และลักษณะ albumin gland, seminal receptacle และ bursa copulatrix ของเพศเมียมีลักษณะรูปร่างแตกต่างกันอย่างชัดเจน

ผลการศึกษาคาริโอไทป์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $n = 14$, $2n = 28$ และมีค่าจำนวนแขนโครโมโซม (FN) แตกต่างกัน โดยหอยทากบกสกุล *Cyclophorus* มีค่า FN เท่ากับ 56 แตกต่างจากหอยทั้งสี่สกุล โดยหอยทากบกสกุล *Cyclotus* มีค่า FN = 52, 50 ส่วนหอยสกุล *Micraulax*, *Platyrhaphe* และ *Rhiostoma* มีค่า FN = 50 หอยแต่ละชนิดมีรูปแบบคาริโอไทป์แตกต่างกัน โดย *Cyclophorus fulguratus* ssp. มีจำนวนโครโมโซมชนิดเมตาเซนทริกมากกว่าหอยชนิดอื่นๆ และมีสูตรคาริโอไทป์เป็น $13m+1sm$ ส่วน *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *C. orthostylus* และ *C. courbeti* มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $12m+2sm$, $10m+4sm$ และ $9m+5sm$ ตามลำดับ คาริโอไทป์ของหอยทากบกสกุล *Cyclotus* ทั้งสองชนิดพบโครโมโซม acentric chromosome โดย *Cyclotus* sp1. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $7m+4sm+2t+1a$ และ *Cyclotus* sp 2 มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $9m+3sm+1t+1a$ หอยทากบก *Micraulax* sp. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $6m+5sm+3t$ และ *Platyrhaphe* sp. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $7m+4sm+3t$ ส่วน *Rhiostoma housei* และ *Rhiostoma* sp. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $9m+2sm+3t$ และ $9m+2sm+2t+1a$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังรายงานระบบโครโมโซมเพศของหอยสกุล *Cyclotus*, *Micraulax*, *Platyrhaphe* และ *Rhiostoma* เป็นครั้งแรก และมีระบบโครโมโซมเป็นแบบ ZW/ZZ โดย ZZ พบในหอยเพศผู้ ส่วน ZW พบในเพศเมีย โดยโครโมโซมทั้งสองชนิดมีรูปร่างโครโมโซมเป็นเมตาเซนทริก แต่โครโมโซม Z จะมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม W

โดยสรุปข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้นอกจากทำให้งานอนุกรมวิธานสมบูรณ์แล้ว ยังสามารถนำข้อมูลจากการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยด้านอื่น เช่น การเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นอาหารและการค้า การวิเคราะห์ทางชีวภูมิศาสตร์ (biogeography) และวิวัฒนาการ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และจัดการพันธุกรรมของหอยหมอสกุลนี้ต่อไปในอนาคต

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ

บทคัดย่อภาษาไทย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Executive summary

สารบัญ

(ก)

สารบัญตาราง

(ข)

สารบัญภาพ

(ค)

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

1

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

2

บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

1. สรรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae

4

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิด

6

3. ศึกษาคาริโอไทป์ (Karyotype)

8

บทที่ 3 ผลการวิจัย

1. สรรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae

10

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิด

14

3. ศึกษาคาริโอไทป์ (Karyotype)

18

บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

13

เอกสารอ้างอิง

27

Output จากโครงการวิจัย

31

ภาคผนวก

33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 การวิเคราะห์รูปร่างลักษณะโครโมโซมของหอย โดยใช้ค่า centromeric index (CI)	9
ตารางที่ 3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ตามแนวเทือกเขาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	12
ตารางที่ 3.2 ชื่อวิทยาศาสตร์ สถานที่เก็บตัวอย่าง จำนวนโครโมโซม ($2n$), จำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์คาริโอไทป์ (N), จำนวนแขนโครโมโซม (FN) และคาริโอไทป์	19
ตารางที่ 5.1 สรุปลักษณะแระดูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae จำนวน 5 สกุล ได้แก่ <i>Cyclophorus</i> , <i>Cyclotus</i> , <i>Micraulax</i> , <i>Platyrhaphe</i> และ <i>Rhiostoma</i>	23
ตารางที่ 5.2 สรุปจำนวนโครโมโซม ($2n$) และ ค่า Fundamental number (FN) ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae	26

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 สถานที่เก็บตัวอย่างหอยทากบก ได้แก่ ภูเขาหินปูน ภูเขาหินทราย และพื้นที่ป่า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	5
ภาพที่ 2.2 สถานที่เก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในพื้นที่ 13 จังหวัด จำนวน 50 แหล่ง	6
ภาพที่ 2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก (A-C) แสดงการวัดขนาดของ เปลือก (D) แสดงการนับจำนวนวงเปลือก	7
ภาพที่ 3.1 เปลือกหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ ประเทศไทย	11
ภาพที่ 3.2 ลักษณะกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ของหอยทากบกสกุล <i>Cyclophorus</i> <i>orthostylus</i>	14
ภาพที่ 3.3 ลักษณะแรดูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae (A) <i>Cyclophorus</i> <i>fulguratus fulguratus</i> , (B) <i>Cyclophorus fulguratus</i> ssp.1, (C) <i>C. courbeti</i> , (D) <i>C. orthostylus</i> , (E) <i>Cyclotus</i> sp1 และ (F) <i>Cyclotus</i> sp2	16
ภาพที่ 3.4 ลักษณะแรดูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae (A) <i>Micraulax</i> sp., (B) <i>Platyrhaphe</i> sp., (C) <i>Rhiostoma housei</i> และ (D) <i>Rhiostoma</i> sp.	17
ภาพที่ 3.5 Mitotic metaphase chromosome ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae	20
ภาพที่ 3.6 คาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae	21

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

หอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae หรือเรียกว่าหอยกลุ่ม ไชโคลฟอริด (cyclophorids) จัดอยู่ในอันดับ Mesogastropoda ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ใต้เศษซากใบไม้บนพื้นดินในป่าตามแนวเทือกเขา สมาชิกส่วนใหญ่อยู่ในสกุลหอยภูเขา ในท้องถิ่นเรียกหอยเกล็ด หรือหอยหอม *Cyclophorus* เป็นหอยสกุลที่ชาวบ้านโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนิยมรับประทานและถือเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีรายงานการรับประทานหอยหอมทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เนื่องจากมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวเมื่อนำมาประกอบอาหาร และมีเนื้อขาวสะอาดน่ารับประทาน หลายคนกล่าวว่าหอยหอมเป็นหอยอีกกลุ่มหนึ่งที่มีรสชาติดีที่สุดในเดิยวกับเอสคาโกของฝรั่งเศส

หอยทากบกวงศ์ใหญ่ (Superfamily) Cyclophoroidea เป็นหอยทากบกที่มีฝาปิดเปลือกและเพศแยก ทั่วโลกมีจำนวนมากกว่า 600 สปีชีส์ พบการแพร่กระจายทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น บนทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย แอฟริกา และอเมริกา (Kobelt, 1902; Morrison, 1955; Alcalde and Jacobson, 1959; Thompson, 1969; Burch, 1976) สำหรับหอยทากบกกลุ่มโบราณวงศ์ Cyclophoridae รายงานโดย Tielecke (1940) มีการกระจายในหมู่เกาะอินเดีย ศรีลังกา ตลอดแนวเทือกเขาหิมาลัยไปทางทิศตะวันออกจนถึงหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หมู่เกาะต่างๆ ของอินโดนีเซีย ทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย และหมู่เกาะญี่ปุ่น ทั่วโลกหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ประกอบด้วยสมาชิกประมาณ 40 สกุล (genus) ในประเทศไทยพบอย่างน้อย 7 สกุล เช่น *Cyclophorus*, *Cyclotus*, *Leptopoma*, *Pterocyclus* และ *Rhiostoma* เป็นต้น (Abbott 1989) สมาชิกส่วนใหญ่อยู่ในสกุลหอยภูเขา บางแห่งเรียกหอยเกล็ด หรือหอยหอม *Cyclophorus* Montfort, 1810 สำหรับหอยหอมมีสมาชิกกว่า 100 สปีชีส์ มีการแพร่กระจายในเอเชียใต้ไปจนถึงฝั่งตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก และพบหลักฐานฟอสซิลในแถบยุโรปมีอายุราว ยุคมีโซโซอิก (Reeve, 1861; Nevill, 1881; Möllendorff, 1894; Blandford, 1903; Gude, 1921; Benthem Jutting, 1948, 1949; Zilch, 1956; Habe, 1964; Solem, 1966; Minato and Habe, 1982; Barker, 2001) ปัจจุบันถือว่าข้อมูลทางอนุกรมวิธานของหอยกลุ่ม cyclophorids มีการปรับปรุงน้อยมาก มีผลงานวิจัยที่พิมพ์ขึ้นมานานแล้วจำนวนหนึ่งแต่ข้อมูลยังสับสน

ส่วนการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ ในหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae มีน้อยมาก มีรายงานการศึกษาครั้งแรกโดย Kasinathan and Natarajan (1975) ได้รายงานจำนวนเมตาเฟสโครโมโซมของ *Cyclophorus jerdoni*, *Pterocyclus bilabiatius*, *Theobaldius ravidus*, *Theobaldius shiplayi*

และ *Micraulax scabra* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 28$ ต่อมาในปี ค.ศ. 1997 Choundhury และ Pandit ศึกษาการโอโตไป์ของ *Cyclophorus polynema* ($2n = 28$) และล่าสุด Komgim และคณะ (2006) ศึกษาและรายงานการศึกษาการโอโตไป์ของทากบกสกุล *Cyclophorus* จำนวน 10 สปีชีส์ พบว่าทุกสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันแต่มีรูปแบบการโอโตไป์และโครงสร้างของโครโมโซมแตกต่างกันในหอยแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังค้นพบระบบโครโมโซมเพศ (sex chromosome system) ในหอยวงศ์ Cyclophoridae เป็นครั้งแรก โดยมีระบบโครโมโซมเพศเป็นแบบ ZW/ZZ (ZW ในเพศเมีย และ ZZ ในเพศผู้)

หอยทากบกกลุ่ม cyclophorids หลายสกุลมีข้อจำกัดของถิ่นอาศัย และถูกรบกวนจากการทำลายป่าเพื่อการเกษตร อุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้ประชากรลดจำนวนอย่างรวดเร็วและอยู่ในภาวะวิกฤตใกล้สูญพันธุ์ จึงจำเป็นต้องดำเนินการสำรวจและศึกษาอย่างเร่งด่วนเพื่อประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์ต่อไป นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยน้อยมาก และมีเอกสารที่พิมพ์มานานแล้วจำนวนหนึ่ง อีกทั้งข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายชนิดและเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในประเทศไทยยังมีน้อย การศึกษาอนุกรมวิธานที่ผ่านมาใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสัณฐานวิทยาของเปลือกเพียงอย่างเดียวไม่สามารถนำมาจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน

การศึกษาดังนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดของหอยทากบกในวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ ระบบสืบพันธุ์ แร่ธาตุ และโครงสร้างของโครโมโซม ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาสร้างกุญแจรูปวิธาน ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ นอกจากทำให้งานอนุกรมวิธานสมบูรณ์แล้ว ยังสามารถนำข้อมูลจากการศึกษาไปประยุกต์ในการศึกษาวิจัยด้านอื่น เช่น การเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นอาหารและการค้า การวิเคราะห์ทางชีวภูมิศาสตร์ (biogeography) และวิวัฒนาการ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และจัดการพันธุกรรมของหอยวงศ์นี้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดและการกระจายทางภูมิศาสตร์ของหอยวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) ของหอยวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ การจัดคาริโอไทป์ (karyotype) เพื่อศึกษาจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซม (chromosome number and chromosome structure) และการศึกษาหาแบบแผนการกำหนดโครโมโซมเพศ (sex chromosome system)

3. เผยแพร่ผลงานวิจัยที่ได้เพื่อให้เป็นที่อ้างอิงในเชิงวิชาการทั้งในและต่างประเทศ
4. เป็นข้อมูลในการวิจัยต่อเนื่องเกี่ยวกับชีววิทยาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae เพื่อการใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงหรือการอนุรักษ์ต่อไป

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

1. สํารวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยวงศ์ Cyclophoridae จากพื้นที่ป่าครอบคลุมเทือกเขาและป่าธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ตารางที่ 2.1, ภาพที่ 2.1-2.2) เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2550 ถึง มิถุนายน พ.ศ. 2551 โดยออกสำรวจเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 12 เดือน โดยเก็บตัวอย่างเปลือกและตัวเป็น แล้วนำตัวอย่างกลับมาที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จากนั้นแยกและเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษา โดยคัดเลือกหอยที่แข็งแรงแล้วเก็บในกล่องเลี้ยงที่มีอากาศถ่ายเทสะดวกก่อนนำไปเตรียมโครโมโซมต่อไป ตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษาได้เก็บไว้เป็นตัวอย่างอ้างอิง (Voucher specimens) และตัวอย่างต้นแบบ (Holotype) ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การจัดจำแนกชนิดได้จัดจำแนกชนิดตามกระบวนการทางอนุกรมวิธาน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก แรดูลา ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ และเทียบตัวอย่างเปลือกกับตัวอย่างต้นแบบในพิพิธภัณฑ์ทั้งในระดับชาติและนานาชาติ นอกจากนี้อาจใช้การจำแนกโดยใช้เซลล์พันธุศาสตร์ในหอยทากบกบางชนิดที่มีความคล้ายคลึงของลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการวิเคราะห์การโอไทป์

ในการศึกษาได้แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

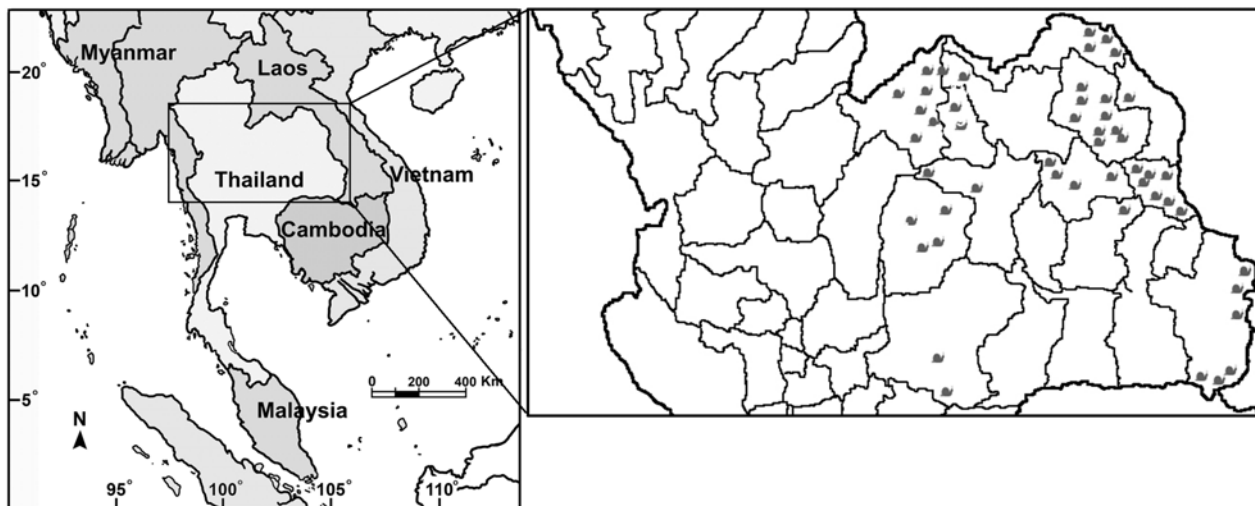
1. เปลือก ตัวอย่างเปลือกจะล้างให้สะอาด ทำบัญชีรายชื่อ บันทึกข้อมูลที่สำคัญ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา วัดขนาดความกว้าง ความยาวของเปลือก (ภาพที่ 2.3) และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของฝาปิดเปลือก

2. ตัวเป็น ใช้ศึกษาลักษณะทั่วไปโดยเฉพาะสี ใช้เตรียมแรดูลา กายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ และเตรียมโครโมโซม

โดยเฉพาะการเตรียมโครโมโซมต้องใช้ตัวอย่างที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น และจะได้ผลดีมากหากเตรียมโครโมโซมจากตัวอย่างหอยที่เพิ่งเก็บมา จึงควรรีบเตรียมโครโมโซมเมื่อได้ตัวอย่างมา



ภาพที่ 2.1 สถานที่เก็บตัวอย่างหอยทากบก ได้แก่ ภูเขาหินปูน ภูเขาหินทราย และพื้นที่ป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

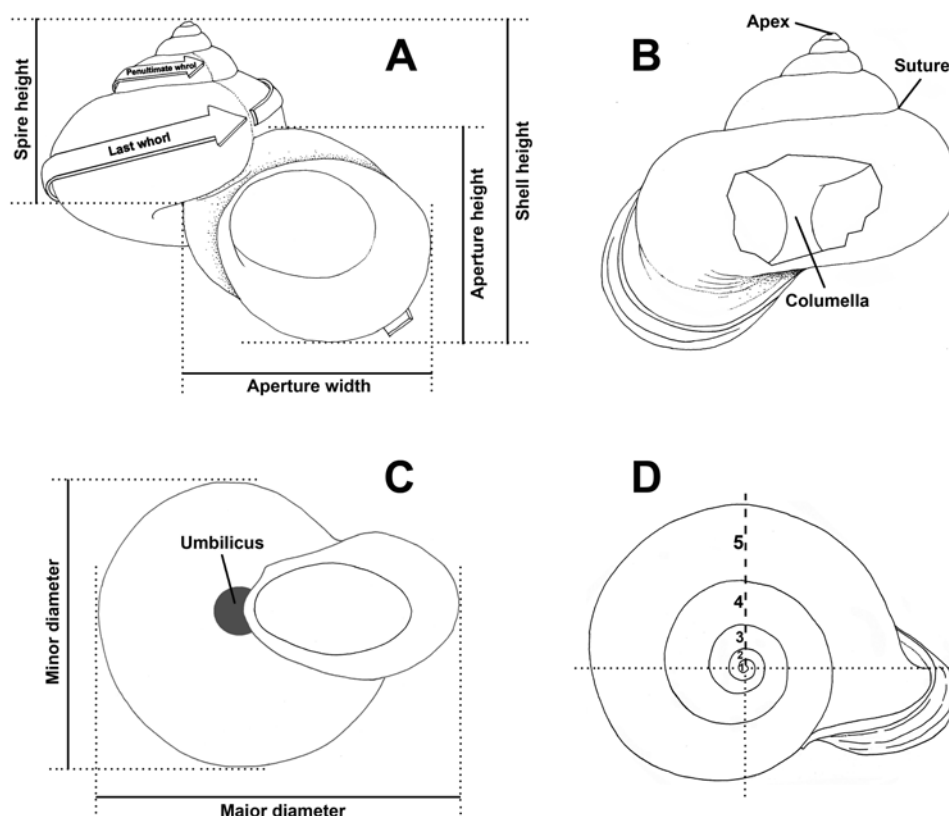


ภาพที่ 2.2 สถานที่เก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในพื้นที่ 13 จังหวัด จำนวน 50 แหล่ง (ตารางที่ 3.1) ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดเลย จังหวัดสกลนคร จังหวัดหนองคาย จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดอุดรธานี และจังหวัดอุบลราชธานี

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิด

ศึกษาลักษณะเปลือกเพื่อใช้ในการจำแนกระดับชนิดหรือตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์

(Identification) โดยศึกษารูปร่าง ขนาด สี และลวดลายบนเปลือก โดยเฉพาะรูปร่างและสีของปาก เปลือกเป็นลักษณะสำคัญในการระบุชนิด ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เตอริโอ ศึกษาลักษณะแรดูลา (radula) หรือแผงฟันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และทำการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ ตามเอกสารดังนี้ Möllendorff, 1894; Blandford, 1902; Kobelt, 1902; Tomlin, 1931; Salisbury, 1949; Solem, 1966 and Ruhoff, 1980 รวมถึงศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างที่เก็บมากับตัวอย่างต้นแบบในพิพิธภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ BMNH, The Natural History Museum, London; CUMZ, Chulalongkorn University, Museum of Zoology, Bangkok, Thailand; MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris; RBINS, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium; SMF, Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt, a.m.; UMZC, University Museum of Zoology Cambridge, Cambridge; ZMA, Zoologische Museum of Amsterdam, Amsterdam; ZMB, Zoologisches Museum of Berlin, Berlin; ZMMSU, Zoological Museum of Mahasarakham University, Thailand



ภาพที่ 2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก (A-C) แสดงการวัดขนาดของเปลือก (D) แสดงการนับจำนวนวงเปลือกของหอยหอม *Cyclophorus fulguratus fulguratus*

การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ โดยนำตัวอย่างหอยที่เก็บมาแยกตัวออกจากเปลือก จากนั้นผ่าและตรววจดูระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียอย่างละเอียด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยเลาะเนื้อเยื่อที่ไม่เกี่ยวข้องออกและดึงเอาเฉพาะอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ออกมา บันทึกภาพ และวาดภาพลายเส้น ศึกษาลักษณะรูปร่างของโครงสร้างต่างๆ โดยเพศผู้จะศึกษาลักษณะรูปร่างของ ของ genital opening, prostate gland, seminal vesicle และ vas deferens ส่วนเพศเมียพิจารณาจากลักษณะรูปร่างของ albumin gland, bursa copulatrix, genital opening, prostate gland, oviduct และ seminal receptacle

ส่วนการศึกษาลักษณะแรดูลา โดยนำตัวอย่างหอยที่ตายแล้วมาตัดเอาส่วนที่คล้ายกระพุ้งแก้มที่เรียกว่า บัคคัลแมส (buccal mass) และใช้เทคนิคการย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้สารละลาย 10 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) จากนั้นล้างแรดูลาด้วยน้ำสะอาดอย่างน้อยสองครั้ง แล้วนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก และเก็บใน 70% แอลกอฮอล์ ก่อนนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หรือ SEM (Scanning Electron Microscope) เพื่อศึกษาโครงสร้างของแรดูลาและเขียนสูตรแรดูลา

3. ศึกษาการโอไทป์ (Karyotype)

3.1 การเตรียมโครโมโซม การศึกษาโครโมโซมของหอยทากบกนี้ใช้เนื้อเยื่อของเซลล์สืบพันธุ์ (gonad tissues) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Patterson และ Burch (1978) และ Park (1994) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การเตรียมและฉีดสาร (Pretreatment) โดยฉีดสารโคชิซิน (colchicine) เข็มข้น 0.01% ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างหอยในกล่องเลี้ยงเช่นเดิมเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ก่อนนำเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์มาเตรียมโครโมโซม เพื่อยับยั้งการทำงานของเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ทำให้เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวหยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส
2. การทำให้เซลล์บวม (Hypotonic treatment) โดยตัดเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ให้เป็นชิ้นเล็กๆ และแช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข็มข้น 0.07 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 45 นาที
3. การคงสภาพ (Fixation) นำเซลล์ตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้หลอดดูดสารละลายและเศษเซลล์ (supernatant) ออกให้หมด แล้วเติมสารละลาย Carnoy Fixative solution ซึ่งเตรียมใหม่ทุกครั้งลงไป ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง
4. การหยดตัวอย่างเซลล์บนสไลด์ (Air dried slide) นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หยดลงบนสไลด์สะอาดและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
5. การย้อมสี (Staining) ย้อมตัวอย่างบนสไลด์ด้วยสีจีเมซา (Giemsa) เข็มข้น 4% เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
6. นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนและบันทึกภาพโครโมโซมเพื่อนำไปจัดการโอไทป์

3.2 การศึกษาการโอไทป์ นำภาพโครโมโซมมาจัดการโอไทป์ ตามหลักการของ Levan และคณะ (1964) โดยเลือกภาพที่โครโมโซมระยะเมตาเฟสที่กระจายดีมาชนิดละอย่างน้อย 25 เซลล์ มาวัดความยาวแขนข้างสั้น (Ls) และความยาวแขนข้างยาว (LI) จากนั้นคำนวณค่าความยาวโครโมโซมแต่ละแท่ง ($LT = Ls + LI$) ค่า relative length ($RL = LT_n / \sum LT$) และค่า centromeric index ($CI = LI/LT$) เพื่อระบุรูปร่างของโครโมโซม (chromosome shape) ตามค่าดังตารางที่ 2.1 จากนั้นทำ ideogram โดยการสร้างกราฟ ให้ค่า centromeric index อยู่ที่แกน abscissa และ relative length อยู่ที่ ordinate เพื่อตรวจสอบการจัดคู่ของโครโมโซมที่ถูกต้อง จากนั้นนำโครโมโซมแต่ละแท่งมาเรียงคู่ โดยเรียงจากโครโมโซมคู่ที่มีความยาวมากที่สุด ไปหาโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุด

ตามลำดับ และให้ตำแหน่งเซนโทรเมอร์อยู่ในแนวเส้นตรงเดียวกัน ซึ่งโครโมโซมที่เป็นคู่กันจะเป็นโครโมโซมชนิดเดียวกัน มี chromosome marker เหมือนกัน และขนาดใกล้เคียงกันที่สุด

ตารางที่ 2.2 การวิเคราะห์รูปร่างลักษณะโครโมโซมของหอย โดยใช้ค่า centromeric index (CI)

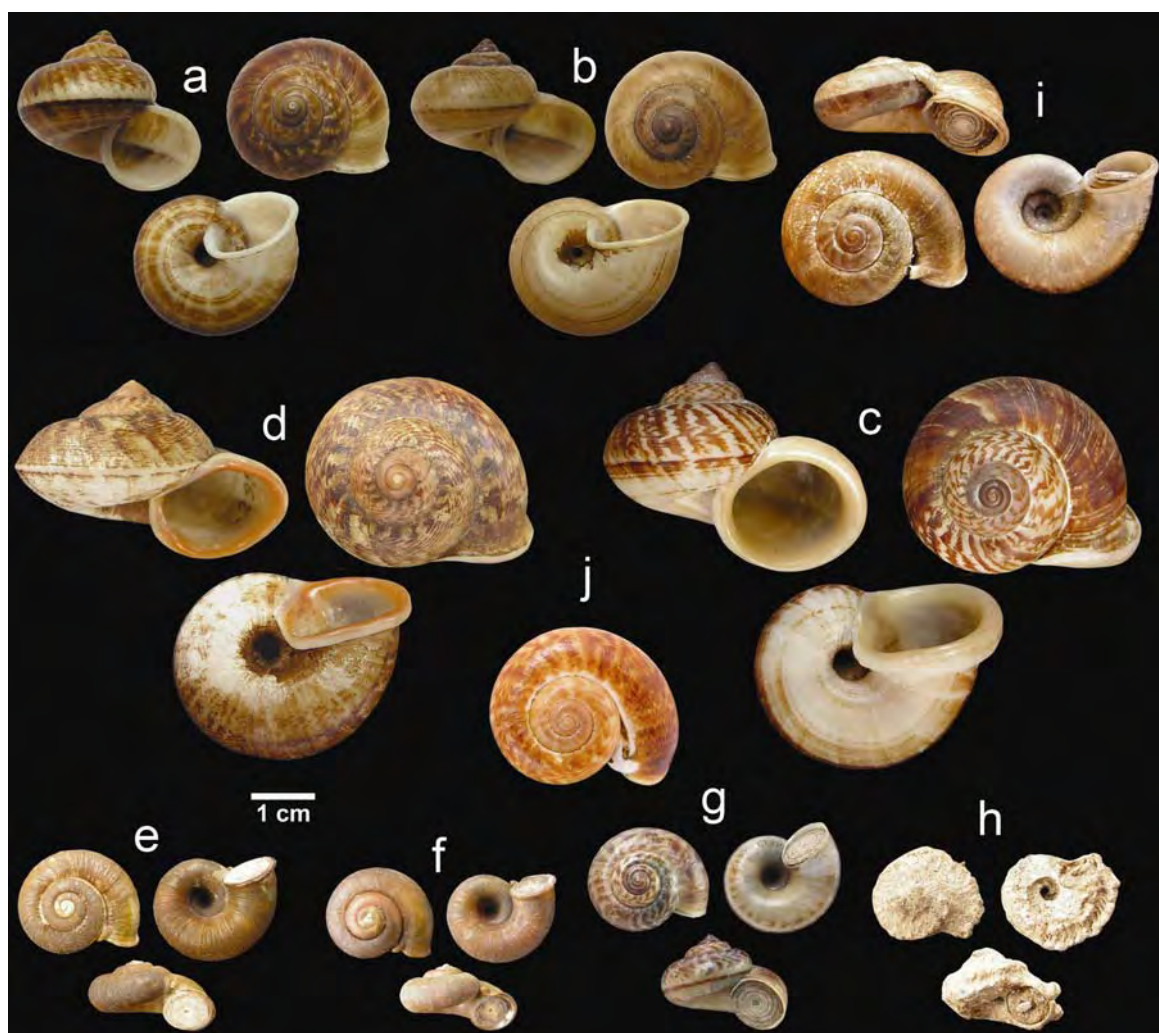
ชนิดโครโมโซม (chromosome shape)	ค่า centromeric index
Metacentric (M)	0.500-0.599
Submetacentric (SM)	0.600-0.699
Subtelocentric (ST)	0.700-0.899
Telocentric (T)	0.900-1.000

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ตามแนวเทือกเขา (ภาพที่ 3.1) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 13 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดเลย จังหวัดสกลนคร จังหวัดหนองคาย จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดอุดรธานี และจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 50 แหล่ง (ตารางที่ 3.1, ภาพที่ 2.2) โดยเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2550 ถึง มิถุนายน พ.ศ. 2551 รวมเวลาออกสำรวจเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 12 เดือน พบตัวอย่างเปลือกและตัวอย่างที่ยังมีชีวิตอยู่ และได้จัดจำแนกชนิดตามกระบวนการทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก แร่ดูลา ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ และเทียบตัวอย่างเปลือกกับตัวอย่างต้นแบบในพิพิธภัณฑ์ทั้งในระดับชาติและนานาชาติ พบหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae จำนวนทั้งหมด 5 สกุล 9 สปีชีส์ 1 ซับสปีชีส์ ได้แก่ *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *Cyclophorus fulguratus* ssp.1, *C. courbeti*, *C. orthostylus*, *Cyclotus* sp1, *Cyclotus* sp2, *Micraulax* sp., *Platyrhapha* sp., *Rhiostoma housei*, *Rhiostoma* sp., (ภาพที่ 3.1) และพบว่าถิ่นอาศัยที่เป็นภูเขาหินปูน จะมีความหลากหลายชนิดของหอยทากบกมากกว่าถิ่นอาศัยที่เป็นภูเขาหินทราย โดยหอยสกุลที่พบกระจายเฉพาะในเขตภูเขาหินปูน ได้แก่ *Micraulax*, *Platyrhapha*, *Rhiostoma* และชนิดที่มีการกระจายทั้งในภูเขาหินปูนและภูเขาหินทราย ได้แก่ *Cyclophorus* และ *Cyclotus*



ภาพที่ 3.1 เปลือกหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ (a) *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, (b) *Cyclophorus fulguratus* ssp.1, (c) *Cyclophorus courbeti*, (d) *C. orthostylus*, (e) *Cyclotus* sp1, (f) *Cyclotus* sp2, (g) *Micraulax* sp., (h) *Platyrrhaphe* sp., (i) *Rhiostoma housei* และ (j) *Rhiostoma* sp.

ตารางที่ 3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ตามแนวเทือกเขา (ภาพที่ 2.2) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 13 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดเลย จังหวัดสกลนคร จังหวัดหนองคาย จังหวัดหนองบัวลำพู จังหวัดอุดรธานี และจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 50 แหล่ง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	หอยที่พบ (สกุล)				
	<i>Cyclophorus</i>	<i>Cyclotus</i>	<i>Micraulax</i>	<i>Platyrhaphe</i>	<i>Rhiostoma</i>
1. ภูพระ จ. กาฬสินธุ์	/	/	-	-	-
2. ภูโน จ. กาฬสินธุ์	/	/	-	-	-
3. ภูคุ้มข้าว จ. กาฬสินธุ์	/	/	-	-	-
4. เขาวง จ. กาฬสินธุ์	/	/	-	-	-
5. ภูผาม่าน จ. ขอนแก่น	/	/	/	-	/
6. ภูเวียง จ. ขอนแก่น	/	/	/	/	/
7. ภูเขี้ยว อ. หนองบัวแดง จ. ชัยภูมิ	/	/	/	/	/
8. ภูเขี้ยว อ. เกษตรสมบูรณ์ จ. ชัยภูมิ	/	/	/	/	/
9. น้ำตกตาดโตน จ. ชัยภูมิ	/	/	/	-	-
10. ภูแล่นคา จ. ชัยภูมิ	/	/	/	-	-
11. ค่ายเสาวลักษณ์ จ. นครราชสีมา	/	/	/	-	/
12. เขาใหญ่ จ. นครราชสีมา	/	/	/	-	/
13. ป่าโคกนาหว้า จ. นครพนม	/	/	-	-	-
14. วนอุทยานดงบังอี จ. มุกดาหาร	/	/	-	-	-
15. ภูสระดอกบัว จ. มุกดาหาร	/	/	-	-	-
16. ภูหมู จ. มุกดาหาร	/	/	-	-	-
17. ต.ช.ด.ที่ 3 จ. มุกดาหาร	/	/	-	-	-
18. ห้วยมะเบ็น จ. มุกดาหาร	/	/	-	-	-
19. ภูน้อย จ. มุกดาหาร	/	/	-	-	-
20. ภูผาขาม จ. มุกดาหาร	/	/	-	-	-
21. ผาน้ำทิพย์ จ. ร้อยเอ็ด	/	/	-	-	-
22. วัดถ้ำผาสิ้ง จ. เลย	/	/	/	-	/
23. วัดถ้ำผาบึง จ. เลย	/	/	/	-	/

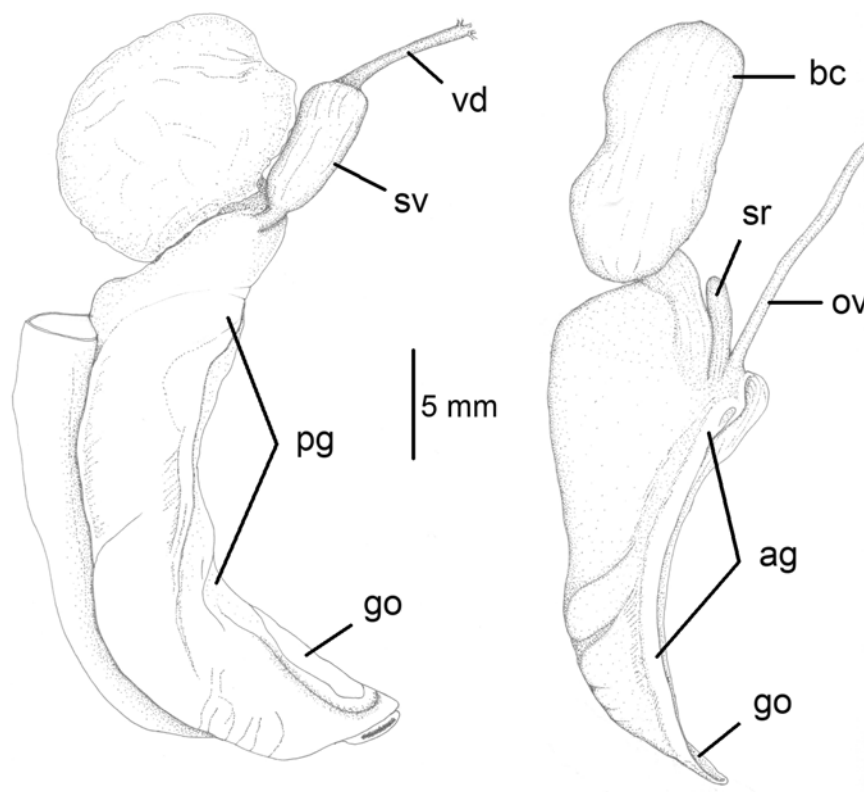
ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	หอยที่พบ (สกุล)				
	<i>Cyclophorus</i>	<i>Cyclotus</i>	<i>Micraulax</i>	<i>Platyrhaphe</i>	<i>Rhiostoma</i>
24. วัดถ้ำผาปู่ จ. เลย	/	/	/	-	/
25. ภูหลวง จ. เลย	/	/	/	-	/
26. ภูผาล้อม จ. เลย	/	/	/	-	/
27. ภูผาสายยอด จ. เลย	/	/	/	-	/
28. ถ้ำผาดำ จ. เลย	/	/	/	-	/
29. ภูอ่างศอ จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
30. ภูนางหงส์ จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
31. นิคมน้ำอุ่น จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
32. บ้านโคกสามัคคี จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
33. ภูผาเหล็ก จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
34. บ้านกกปลาขิว จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
35. บ้านสร้างค้อ จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
36. ห้วยกระเเมอ จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
37. เขื่อนน้ำพุง จ. สกลนคร	/	/	-	-	-
38. ภูลังกา จ. หนองคาย	/	/	-	-	-
39. ภูวัว จ. หนองคาย	/	/	-	-	-
40. ภูทอก จ. หนองคาย	/	/	-	-	-
41. ภูสิงห์ จ. หนองคาย	/	/	-	-	-
42. ถ้ำสุวรรณคูหา จ. หนองบัวลำพู	/	/	/	-	/
43. เขาวังผา จ. หนองบัวลำพู	/	/	/	-	/
44. ภูพระบาทบัวบก จ. อุตรธานี	/	/	-	-	-
45. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่ายอดโดม จ. อุบลราชธานี	/	/	-	-	-
46. ภูจองนายอย จ. อุบลราชธานี	/	/	-	-	-
47. แก่งลำดวน จ. อุบลราชธานี	/	/	-	-	-
48. วัดถ้ำน้ำทิพย์ จ. อุบลราชธานี	/	/	-	-	-
49. น้ำตกสร้อยสวรรค์ จ. อุบลราชธานี	/	/	-	-	-
50. ผาแต้ม จ. อุบลราชธานี	/	/	-	-	-

หมายเหตุ: / คือ พบตัวอย่างหอย, - คือ ไม่พบตัวอย่างหอย

3.2 ลักษณะกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์

การศึกษาลักษณะระบบสืบพันธุ์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae พบว่าแต่ละสกุลจะมีลักษณะแตกต่างกัน โดยเฉพาะลักษณะรูปร่างของ prostate gland และ seminal receptacle ของเพศผู้จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ส่วนเพศเมียจะมีลักษณะรูปร่างของ albumin gland, seminal receptacle และ bursa copulatrix แตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 3.2)

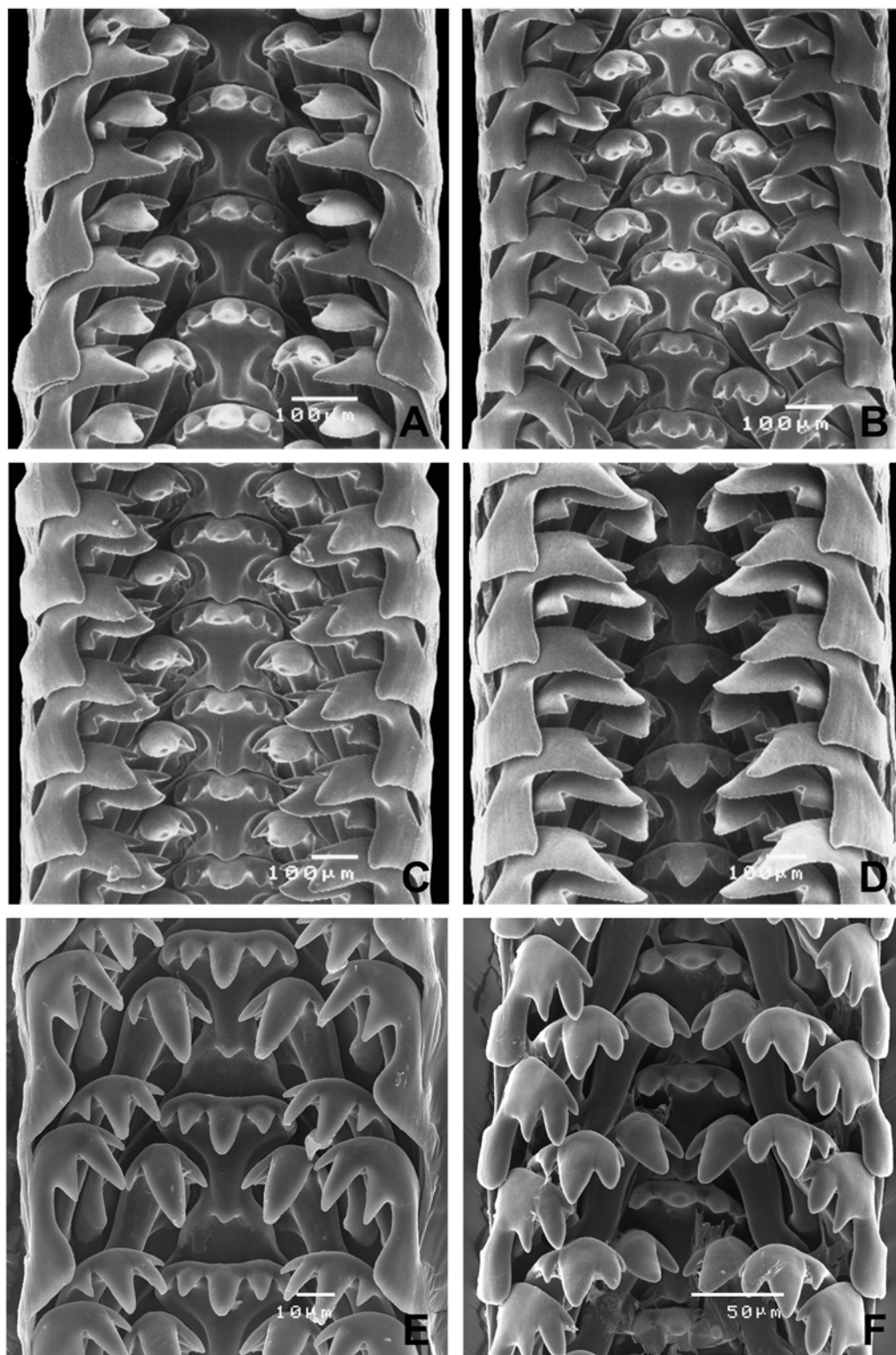


ภาพที่ 3.2 ลักษณะกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ของหอยทากบกสกุล *Cyclophorus orthostylus* ในเพศผู้ (ภาพซ้าย) และเพศเมีย (ภาพขวา) (ag = albumin gland; bc = bursa copulatrix; go = genital opening; ov = oviduct; pg = prostate gland; sr = seminal receptacle; sv = seminal vesicle; vd = vas deferens)

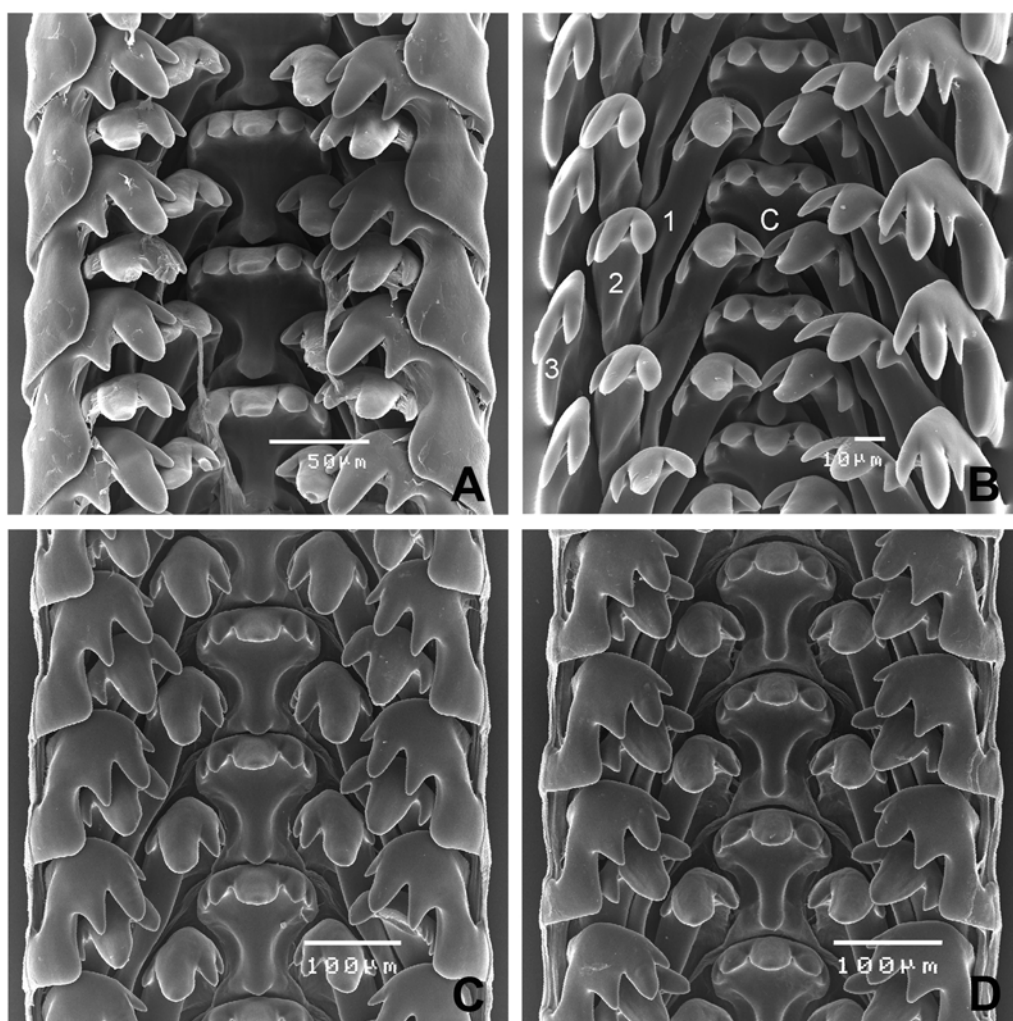
3.3 ลักษณะเรณูลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การศึกษาลักษณะเรณูลา (radula) หรือแผงฟัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM) จากการศึกษาโครงสร้างเรณูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae พบว่า ทุกสกุลมีเรณูลาเป็นแบบ taenioglaossa แต่โครงสร้างของฟันแต่ละซี่จะมีลักษณะแตกต่างกัน รวมถึงมีจำนวนรอยหยัก หรือ คัส (cusp) มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในระดับสกุล และพบความแตกต่างในบางสปีชีส์ โดยเรณูลาแบบ taenioglaossa นั้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นยาวประกอบด้วยฟันจัดเรียงตัวหลายแถวตามยาว และแต่ละแถวตามขวางประกอบด้วยฟันเรียงเป็นแถว จำนวน 7 ซี่ ได้แก่ ฟันกลาง (central teeth หรือ C) จำนวนหนึ่งซี่ ฟันข้าง (lateral teeth หรือ L₁, L₂) จำนวนข้างละ 2 ซี่ และฟันขอบ (marginal teeth หรือ M) จำนวนข้างละ 1 ซี่ สามารถเขียนสูตรเรณูลาได้เป็น 1+2+1+2+1 หรือ 1M+2L+1C+2L+1M โดยลักษณะรูปร่างของเรณูลามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในระดับสกุล จากรูปร่างของฟันแต่ละซี่และจากจำนวนรอยหยัก หรือ คัส (cusp) ที่ปรากฏบนฟันแต่ละซี่ ดังภาพที่ 3.3-3.4

ลักษณะเรณูลาของหอยหอยสกุล *Cyclophorus* ฟันกลางมีจำนวน 5 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสอื่นเล็กน้อย ฟันข้างมีจำนวน 3 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสรอบนอกทั้งสอง ฟันขอบมีจำนวน 2 คัส คัสที่อยู่ด้านนอกมีขนาดใหญ่กว่าคัสที่อยู่ด้านใน ลักษณะเรณูลาของหอยสกุล *Cyclotus* ฟันมีคัสที่แหลมคมกว่าหอยสกุลอื่นที่ทั้งสี่สกุลที่ทำการศึกษ โดยฟันกลางมีจำนวน 5 คัส เห็นได้ชัดเจน ฟันข้างมีจำนวน 4 คัส คัสกลางสองคัสมีขนาดใหญ่กว่าคัสรอบนอก ฟันขอบมีจำนวน 3 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสรอบนอกทั้งสอง (ภาพที่ 3.3) ลักษณะเรณูลาของหอยสกุล *Micraulax* ฟันกลางมีจำนวน 5 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสอื่นเล็กน้อย ฟันข้างมีจำนวน 4 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสรอบนอกทั้งสอง ฟันขอบมีจำนวน 3 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสที่อยู่รอบนอกทั้งสอง ลักษณะเรณูลาของหอยสกุล *Platyrhaphe* ฟันกลางมีจำนวน 5 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสอื่นเล็กน้อย ฟันข้างและฟันขอบมีจำนวน 3 คัส โดยคัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสรอบนอกทั้งสอง ลักษณะเรณูลาของหอยสกุล *Rhiostoma* ฟันกลางมีจำนวน 5 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสอื่นเล็กน้อย ฟันข้างมีจำนวน 4 คัส คัสกลางมีขนาดใหญ่กว่าคัสรอบนอกทั้งสอง ฟันขอบมีจำนวน 3 คัส โดยสองคัสด้านนอกมีขนาดใหญ่กว่าคัสที่อยู่ด้านใน (ภาพที่ 3.4)



ภาพที่ 3.3 ลักษณะเรณูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae (A) *Cyclophorus fulguratus*, (B) *Cyclophorus fulguratus* ssp.1, (C) *Cyclophorus courbeti*, (D) *C. orthostylus*, (E) *Cyclotus* sp1 และ (F) *Cyclotus* sp2. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ประกอบด้วยฟันเรียงตามขวางจำนวน 7 ซี่ เขียนสูตรเรณูลาได้เป็น 1+2+1+2+1 หรือ 1M+2L+1C+2L+1M (เมื่อ C คือ central teeth, L คือ lateral teeth และ M คือ marginal teeth)



ภาพที่ 3.4 ลักษณะแตรดูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae (A) *Micraulax* sp., (B) *Platyrrhapha* sp., (C) *Rhlostoma housei* และ (D) *Rhlostoma* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ประกอบด้วยฟันเรียงตามขวางจำนวน 7 ซี่ เขียนสูตรแตรดูลาได้เป็น $1+2+1+2+1$ หรือ $1M+2L+1C+2L+1M$ (เมื่อ C คือ central teeth, L คือ lateral teeth และ M คือ marginal teeth)

3.4 การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

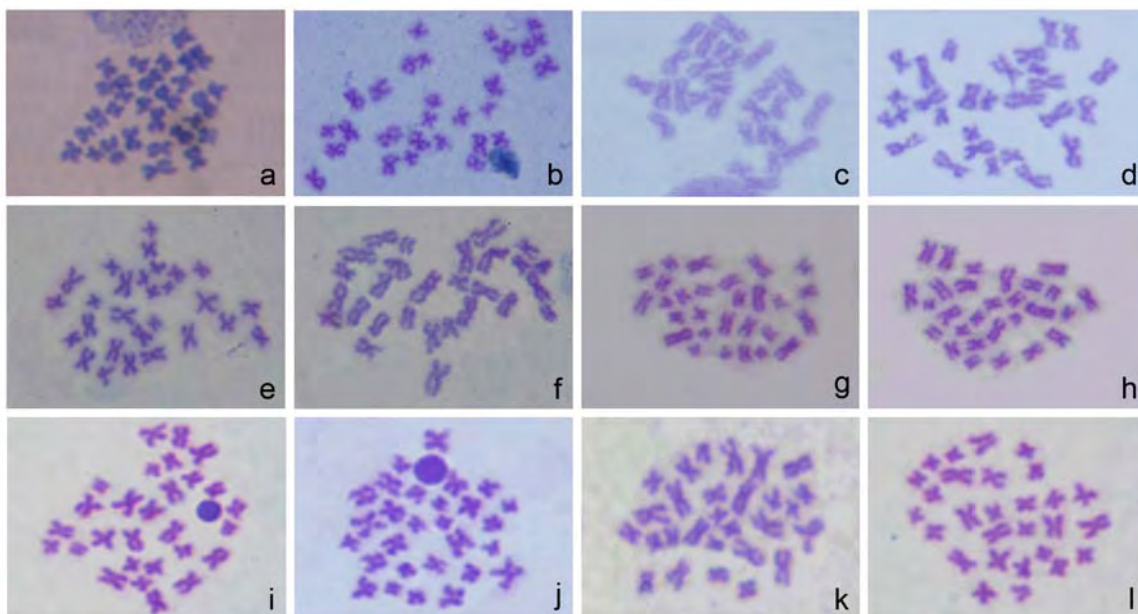
ผลการศึกษาคาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $n = 14$, $2n = 28$ (ดังภาพที่ 3.5) และมีค่าจำนวนแขนโครโมโซม (FN) แตกต่างกัน โดยหอยทากบกสกุล *Cyclophorus* มีค่า FN เท่ากับ 56 แตกต่างจากหอยทากสกุล *Cyclotus* โดยหอยทากบกสกุล *Cyclotus* มีค่า FN = 52, 50 ส่วนหอยสกุล *Micraulax*, *Platyrhapha* และ *Rhiostoma* มีค่า FN = 50 และเมื่อพิจารณารูปแบบคาร์ิโอไทป์พบว่าหอยแต่ละชนิดมีรูปแบบคาร์ิโอไทป์แตกต่างกัน กล่าวคือคาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกแต่ละชนิดมีจำนวนชนิดโครโมโซมแตกต่างกัน และเห็นได้ชัดเจนเมื่อพิจารณาจากการมีสูตรคาร์ิโอไทป์ที่แตกต่างกัน โดย *Cyclophorus fulguratus* ssp. มีจำนวนโครโมโซมชนิดเมตาเซนทริกมากกว่าหอยชนิดอื่นๆ และมีสูตรคาร์ิโอไทป์เป็น $13m+1sm$ ส่วน *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *C. orthostylus* และ *C. courbeti* มีสูตรคาร์ิโอไทป์เป็น $12m+2sm$, $10m+4sm$ และ $9m+5sm$ ตามลำดับ คาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกสกุล *Cyclotus* ทั้งสองชนิดพบโครโมโซมที่ไม่ปรากฏเซนโทรเมียร์ หรือที่เรียกว่า acentric chromosome โดย *Cyclotus* sp1. มีสูตรคาร์ิโอไทป์เป็น $7m+4sm+2t+1a$ และ *Cyclotus* sp 2 มีสูตรคาร์ิโอไทป์เป็น $9m+3sm+1t+1a$ หอยทากบก *Micraulax* sp. มีสูตรคาร์ิโอไทป์เป็น $6m+5sm+3t$ และ *Platyrhapha* sp. มีสูตรคาร์ิโอไทป์เป็น $7m+4sm+3t$ ส่วน *Rhiostoma housei* และ *Rhiostoma* sp. มีสูตรคาร์ิโอไทป์เป็น $9m+2sm+3t$ และ $9m+2sm+2t+1a$ ตามลำดับ (ดังภาพที่ 3.6; ตารางที่ 3.2)

นอกจากนี้ยังพบระบบโครโมโซมเพศของหอยสกุล *Cyclotus*, *Micraulax*, *Platyrhapha* และ *Rhiostoma* เป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นสมาชิกของหอยทากบกวงศ์วงศ์ Cyclophoridae และมีระบบโครโมโซมเพศ (sex chromosome system) เป็นแบบ ZW/ZZ โดย ZZ พบในหอยเพศผู้ ส่วน ZW พบในเพศเมีย โดยโครโมโซมทั้งสองชนิดมีรูปร่างโครโมโซมเป็นเมตาเซนทริก แต่โครโมโซม Z จะมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม W (ดังภาพที่ 3.6)

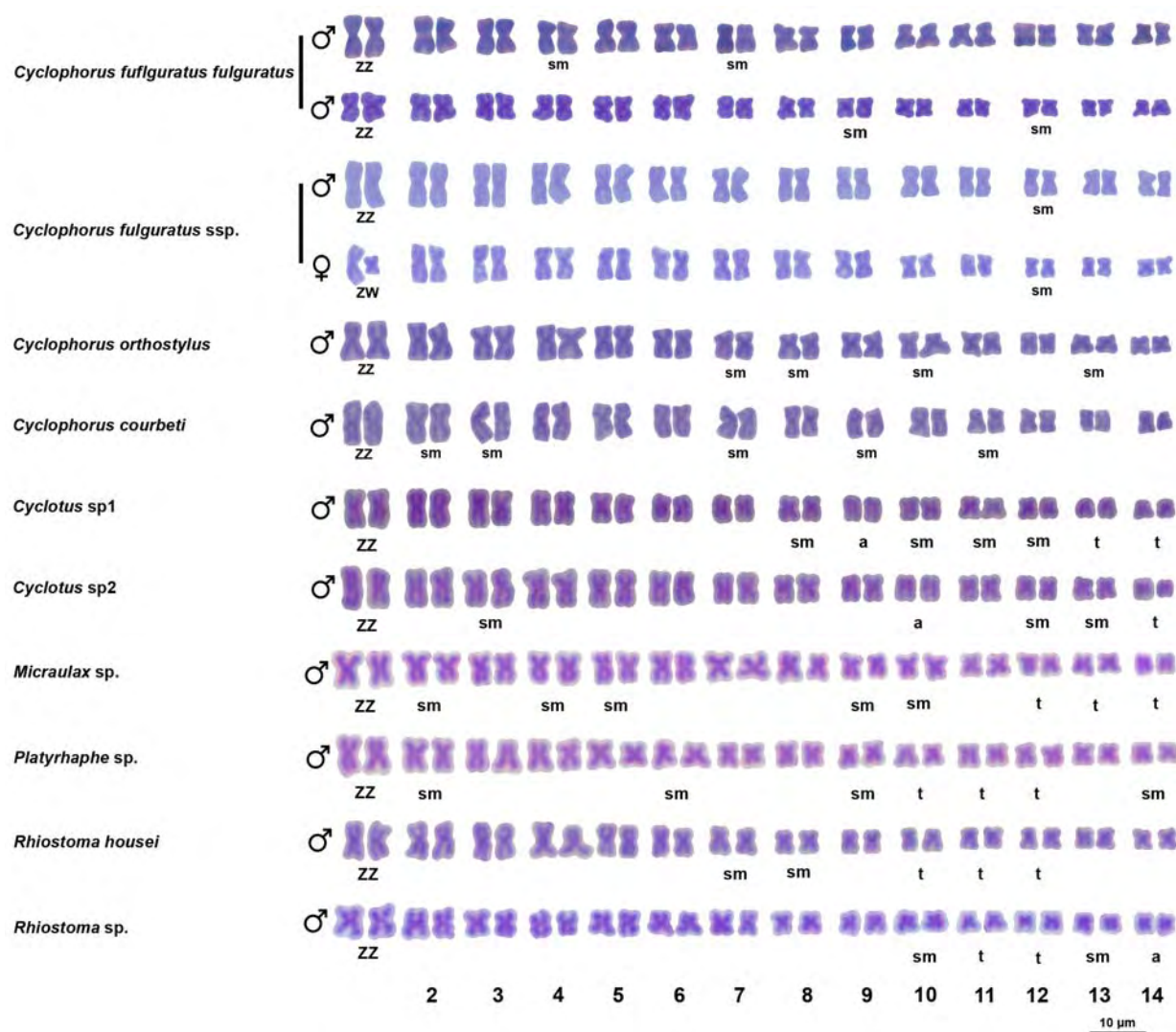
ตารางที่ 3.2 ชื่อวิทยาศาสตร์ สถานที่เก็บตัวอย่าง จำนวนโครโมโซม ($2n$), จำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์คาริโอไทป์ (N), จำนวนแขนโครโมโซม (FN) และคาริโอไทป์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Scientific name	Localities	Sex	N	($2n$, FN)	Karyotype
<i>Cyclophorus fulguratus</i>	Nakhon Ratchasima, Thailand	Male,	10	28, 56	12m+2sm
		Female	9		
<i>C. fulguratus</i> ssp.	Sakhon Nakorn, Thailand	Male,	10	28, 56	13m+1sm
		Female	10		
<i>C. orthostylus</i>	Sakhon Nakorn, Thailand	Male,	9	28, 56	10m+4sm
		Female	7		
<i>C. courbeti</i>	Chaiyaphum, Thailand	Male,	9	28, 56	9m+5sm
		Female	9		
<i>Cyclotus</i> sp1	Mukdaharn, Thailand	Male	8	28, 50	7m+4sm+2t+1a
<i>Cyclotus</i> sp2	Loei, Thailand	Male	10	28, 52	9m+3sm+1t+1a
<i>Micraulax</i> sp.	Chaiyaphum, Thailand	Male,	10	28, 50	6m+5sm+ 3t
<i>Platyrhaphe</i> sp.	Chaiyaphum, Thailand	Male,	10	28, 50	7m+4sm+3t
<i>Rhiostoma housei</i>	Loei, Thailand	Male,	10	28, 50	9m+2sm+3t
		Female	6		
<i>Rhiostoma</i> sp.	Nongbua Lamphu, Thailand	Male	10	28, 50	9m+2sm+2t+1a
		Female	8		

หมายเหตุ: m คือ metacentric; sm คือ submetacentric; st คือ subtelocentric; t คือ telocentric chromosome และ a คือ acentric chromosome.



ภาพที่ 3.5 Mitotic metaphase chromosome ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทุกสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ $2n = 28$
 (a-b) *Cyclophorus fulguratus fulguratus*; (c-d) *Cyclophorus fulguratus* ssp.1; (e) *Cyclophorus courbeti*; (f) *Cyclophorus orthostylus*; (g) *Cyclotus* sp1; (h) *Cyclotus* sp2; (i) *Micraulax* sp.; (j) *Platyrhaphe* sp; (k) *Rhiostoma housei* และ (l) *Rhiostoma* sp.



ภาพที่ 3.6 คาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย *Cyclophorus fulguratus fulguratus*; *Cyclophorus fulguratus* ssp.1; *Cyclophorus courbeti*; *Cyclophorus orthostylus*; *Cyclotus* sp1; *Cyclotus* sp2; *Micraulax* sp.; *Platyrhapha* sp; *Rhiostoma housei* และ *Rhiostoma* sp. แสดงโครโมโซม 4 ชนิด ได้แก่ metacentric (ไม่ได้ระบุในภาพ), submetacentric (sm), subtelocentric (st), telocentric (t) และ acentric chromosome (a) โดยมีระบบโครโมโซมเพศเป็น ZZ-ZW (ZZ พบในหอยเพศผู้ ส่วน ZW พบในหอยเพศเมีย)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การสำรวจหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ตามแนวเทือกเขาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 13 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดเลย จังหวัดสกลนคร จังหวัดหนองคาย จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดอุดรธานี และจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 50 แหล่ง รวมเวลาออกสำรวจเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 12 เดือน พบตัวอย่างเปลือกและตัวอย่างที่ยังมีชีวิตอยู่ และจัดจำแนกชนิดตามกระบวนการทางอนุกรมวิธาน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก แรดูลา ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ และเทียบตัวอย่างเปลือกกับตัวอย่างต้นแบบในพิพิธภัณฑ์ทั้งในระดับชาติและนานาชาติ พบหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae จำนวนทั้งหมด 5 สกุล 9 สปีชีส์ 1 ซับสปีชีส์ ได้แก่ *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *Cyclophorus fulguratus* ssp.1, *C. courbeti*, *C. orthostylus*, *Cyclotus* sp1, *Cyclotus* sp2, *Micraulax* sp., *Platyrhapha* sp., *Rhiostoma housei*, *Rhiostoma* sp., โดยพบว่าถิ่นอาศัยที่เป็นภูเขาหินปูน จะมีความหลากหลายชนิดของหอยทากบกมากกว่าถิ่นอาศัยที่เป็นภูเขาหินทราย โดยหอยสกุลที่พบกระจายเฉพาะในเขตภูเขาหินปูน ได้แก่ *Micraulax*, *Platyrhapha*, *Rhiostoma* และสกุลที่มีการกระจายทั้งในภูเขาหินปูนและภูเขาหินทราย ได้แก่ *Cyclophorus* และ *Cyclotus* ทั้งนี้มีสาเหตุเนื่องมาจากภูเขาหินปูนมีสารประกอบหินปูน หรือ แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักในการสร้างเปลือก ทำให้ถิ่นอาศัยที่เป็นภูเขาหินปูนมีความหลากหลายชนิดของหอยทากบกมากกว่าถิ่นอาศัยที่เป็นภูเขาหินทราย

ลักษณะระบบสืบพันธุ์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae แต่ละสกุลจะมีลักษณะแตกต่างกัน โดยเฉพาะลักษณะรูปร่างของ prostate gland และ seminal vesicle ของเพศผู้จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ส่วนเพศเมียจะมีลักษณะรูปร่างของ albumin gland, seminal receptacle และ bursa copulatrix แตกต่างกันอย่างชัดเจน

ลักษณะแรดูลา (radula) หรือแผงฟัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM) สามารถศึกษาโครงสร้างแรดูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae และทุกสกุลมีแรดูลาเป็นแบบ taenioglaossa แต่โครงสร้างของฟันแต่ละซี่จะมีลักษณะแตกต่างกัน รวมถึงมีจำนวนรอยหยัก หรือคัส (cusp) แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในระดับสกุล และพบความแตกต่างในบางสปีชีส์ โดยแรดูลาแบบ taenioglaossa นั้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นยาวประกอบด้วยฟันจัดเรียงตัวหลายแถวตามยาว และแต่ละแถวตามขวางประกอบด้วยฟันเรียงเป็นแถว จำนวน 7 ซี่ ได้แก่ ฟันกลาง (central teeth หรือ C) จำนวนหนึ่งซี่ ฟันข้าง

(lateral teeth หรือ L_1 , L_2) จำนวนข้างละ 2 ซี่ และฟันขอบ (marginal teeth หรือ M) จำนวนข้างละ 1 ซี่ สามารถเขียนสูตรแรดูลาได้เป็น $1+2+1+2+1$ โดยลักษณะรูปร่างของแรดูลามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในระดับสกุล จากรูปร่างของฟันแต่ละซี่และจากจำนวนรอยหยัก หรือ คัส (cusp) ที่ปรากฏฟันแต่ละซี่ โดยทั่วไปลักษณะของฟันจะสัมพันธ์กับอาหารที่หอยกินเข้าไป โดยฟันของหอยทากบกสกุล *Cyclotus* จะมีความแหลมคมกว่าหอยสกุลอื่นทั้งสี่สกุลเนื่องจาก *Cyclotus* จะใช้ฟันขูดกินสาหร่าย ไลเคนส์ และเศษซากบนก้อนหิน ส่วนหอยสกุลอื่นทั้งสี่สกุลที่ศึกษาได้แก่ *Cyclophorus*, *Micraulax*, *Platyrhaphe* และ *Rhiostoma* จะกินเศษซากใบไม้ตามพื้นดินฟันจึงมีรอยหยักหรือคัสที่แหลมคมน้อยกว่า *Cyclotus* รายละเอียดสรุปดังตาราง 5.1

ตารางที่ 5.1 สรุปลักษณะแรดูลาของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae จำนวน 5 สกุล ได้แก่ *Cyclophorus*, *Cyclotus*, *Micraulax*, *Platyrhaphe* และ *Rhiostoma* แสดงจำนวนรอยหยักหรือคัสบนฟันแต่ละซี่

หอยทากบก (สกุล)	จำนวนคัสบนฟันแต่ละซี่			
	ฟันกลาง	ฟันข้าง	ฟันขอบ	ลักษณะพิเศษ
<i>Cyclophorus</i>	5	3	2	
<i>Cyclotus</i>	5	4	3	มีคัสที่แหลมคม
<i>Micraulax</i>	5	4	3	
<i>Platyrhaphe</i>	5	3	3	
<i>Rhiostoma</i>	5	4	3	สองคัสด้านนอกของฟันขอบมีขนาดใหญ่กว่าคัสที่อยู่ด้านใน

คาริโอไทป์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $n = 14$, $2n = 28$ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมในหอยวงศ์ Cyclophoridae จำนวน 16 สปีชีส์ (Kasinathan and Natarajan (1975); Choundhury and Pandit (1997); Kongim, 2006) ดังตารางสรุป 5.2 และมีค่าจำนวนแขนโครโมโซม (FN) แตกต่างกัน โดยหอยทากบกสกุล *Cyclophorus* มีค่า FN เท่ากับ 56 และไม่พบโครโมโซมชนิดทีโลเซนทริกในเซลล์ จัดเป็น symmetric karyotype แตกต่างจากหอยทั้งสี่สกุล แสดงถึงการมีลักษณะอนุรักษ์ (conservative characters) (White, 1978; Clark and Wall, 1996) โดยหอยทากบกสกุล *Cyclotus* มีค่า FN = 52, 50 ส่วนหอยสกุล *Micraulax*, *Platyrhaphe* และ *Rhiostoma* มีค่า FN = 50 และเมื่อพิจารณาารูปแบบคาริโอไทป์พบว่าหอยแต่ละชนิดมีรูปแบบคาริโอไทป์แตกต่างกัน กล่าวคือคาริโอไทป์ของหอยทากบกแต่ละชนิดมีจำนวนชนิดโครโมโซมแตกต่างกัน และเห็นได้ชัดเจนเมื่อพิจารณาจากการมีสูตรคาริโอไทป์ที่แตกต่างกัน โดย *Cyclophorus fulguratus* ssp. มีจำนวนโครโมโซมชนิดเมตาเซนทริกมากกว่าหอยชนิดอื่นๆ และมีสูตรคาริโอไทป์เป็น $13m+1sm$ ส่วน *Cyclophorus fulguratus fulguratus*, *C. orthostylus* และ *C. courbeti* มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $12m+2sm$, $10m+4sm$ และ $9m+5sm$ ตามลำดับ คาริโอไทป์ของหอยทากบกสกุล *Cyclotus* ทั้งสองชนิดพบโครโมโซมที่ไม่ปรากฏเซนโทรเมียร์ หรือที่เรียกว่า acentric chromosome โดย *Cyclotus* sp1. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $7m+4sm+2t+1a$ และ *Cyclotus* sp 2 มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $9m+3sm+1t+1a$ หอยทากบก *Micraulax* sp. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $6m+5sm+3t$ และ *Platyrhaphe* sp. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $7m+4sm+3t$ ส่วน *Rhiostoma housei* และ *Rhiostoma* sp. มีสูตรคาริโอไทป์เป็น $9m+2sm+3t$ และ $9m+2sm+2t+1a$ ตามลำดับ

สัตว์กลุ่มหอยมีรูปแบบแตกต่างกันเพิ่มมากขึ้นอันเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ในหอยทากบกแท้ (pulmonates) มีจำนวนโครโมโซมที่หลากหลายแม้สมาชิกในวงศ์เดียวกัน ส่วนในหอยทากบกที่มีฝาปิดเปลือก (operculated land snail) จะมีลักษณะที่อนุรักษ์มาก กล่าวคือสมาชิกของหอยทากบกมีฝาปิดเปลือกในวงศ์เดียวกันมีจำนวนคู่ของโครโมโซมเท่ากันในทุกสปีชีส์ สอดคล้องกับการที่หอยทากบกมีฝาปิดเปลือกมีลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์คล้ายกันภายในสกุลเดียวกัน จึงไม่นิยมนำลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์มาเป็นลักษณะในการจัดจำแนกชนิด เช่น หอยทากจิ๋วสกุล *Diplommatina* spp. มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ $n = 13$ และประกอบด้วยโครโมโซมที่มีทั้งแขนสั้นและแขนยาวชนิด metacentric และ submetacentric เท่านั้น (Burch, 1967; Ogaito and Ieyama, 1997; Ieyama and Ogaito, 1998, 2000) เช่นเดียวกับหอยหุซังสกุล *Pollicaria* ทั้งหมดหกสปีชีส์และมีกระจายในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีจำนวนโครโมโซม $n = 13$ (Kongim et al., 2010) หอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae จำนวนอย่างน้อย 4 สกุล ได้แก่ *Cyclophorus*, *Pterocyclus*, *Theobaldius* และ *Micraulax* ล้วนมีจำนวนโครโมโซม $n = 14$ ส่วนหอยทากบกแท้ซึ่งไม่มีฝาปิดเปลือกมีจำนวนโครโมโซมจำนวนมาก และมีรายงานพบ asymmetric karyotype สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ระบบสืบพันธุ์มีความ

แตกต่างในระดับสปีชีส์จึงเป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งที่น่ามาใช้ในการจัดจำแนกชนิดในหอยทากบกแท้ ส่วนหอยทากบกมีฝาปิดเปลือกที่อาศัยอยู่ในน้ำพบมีรายงานการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมทั้งจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซม โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบแอนยูพลอยดีพบรายงานมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจากถิ่นอาศัยที่อยู่บนบกมีแรงผลักดันให้เกิดวิวัฒนาการไม่ว่าจะเป็นพยาธิ สารเคมี หรือแบคทีเรียในน้ำจะมีมากกว่าบนบก เช่น การพบยูพลอยดีในหอยขมสกุล *Viviparus* หรือพบโพลีพลอยดี (polyploidy) ในหอยน้ำจืด *Pisidium casertanum* นับจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นได้มากถึง 180 แท่ง (Baršienė *et al.*, 1998-1999; Baršienė *et al.*, 2000)

การศึกษาในครั้งนี้ได้รายงานระบบโครโมโซมเพศของหอยสกุล *Cyclotus*, *Micraulax*, *Platyrhaphe* และ *Rhiostoma* เป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นสมาชิกของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae และมีระบบโครโมโซมเพศ (sex chromosome system) เป็นแบบ ZW/ZZ โดย ZZ พบในหอยเพศผู้ ส่วน ZW พบในเพศเมีย โดยโครโมโซมทั้งสองชนิดมีรูปร่างโครโมโซมเป็นเมตาเซนทริก แต่โครโมโซม Z จะมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม W

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ และพัฒนาองค์ความรู้เดิม ส่วนข้อมูลการสำรวจเพิ่มเติมจะได้รายงานให้ทราบในโอกาสต่อไป การศึกษาในครั้งนี้นอกจากได้ข้อมูลทางอนุกรมวิธาน ทราบชนิด ลักษณะโดยทั่วไป ลักษณะแรดูลาหรือแผงฟัน และโครงสร้างของโครโมโซมแล้ว ยังได้ข้อมูลทางชีววิทยา ที่สำคัญหลายประการ เช่น ความหลากหลายและการกระจาย ข้อมูลทางนิเวศวิทยา สภาพถิ่นอาศัย ซึ่งพบว่าหอยกลุ่มนี้มีการกระจายอยู่ในเขตที่เป็นภูเขาหินปูน (limestone area) เป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่บนพื้นดิน โดยกินเศษซากใบไม้เป็นอาหารในฤดูที่มีอากาศแห้งแล้งจะมีการจำศีล (hibernate) เพื่อรักษาความชุ่มชื้นเป็นต้น

ตารางที่ 5.2 สรุปจำนวนโครโมโซม ($2n$) และ ค่า Fundamental number (FN) ของหอยทากบก วงศ์ Cyclophoridae

Species	Origin	$2n$	FN	References
<i>Cyclophorus jerdoni</i> (Benson, 1851)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Cyclophorus polynema</i> (Pfeiffer, 1854)	India	28	-	Choundhury and Pandit (1997)
<i>Pterocyclus bilabiatus</i> (Sowerby, 1853)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Theobaldius ravidus</i> (Benson, 1851)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Theobaldius shiplayi</i> (Pfeiffer, 1856)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Micraulax scabra</i> Theobald, 1876	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Cyclophorus aurantiacus</i> (Schumacher, 1817)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus cantori</i> (Benson, 1851)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus diplochilus</i> Möllendorff, 1894	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus fulguratus</i> (Pfeiffer, 1852)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus malayanus</i> (Benson, 1852)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus saturnus</i> Pfeiffer, 1862	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus speciosus</i> (Philippi, 1847)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus subfloridus</i> Ancey, 1888	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Pterocyclus perrieri</i> Morlet, 1889	Thailand	28	56	Personal data
<i>Pterocyclus</i> sp1	Malaysia	28	56	Personal data
<i>Pterocyclus</i> sp2	Malaysia	28	56	Personal data
<i>Rhiostoma asiphon</i> Moellendorft, 1894	Thailand	28	48	Personal data
<i>Rhiostoma chupingense</i> Tomlin, 1938	Thailand	28	56	Personal data
<i>Rhiostoma hainesi</i> (Pfeiffer, 1861)	Thailand	28	56	Personal data
<i>Rhiostoma jalorensis</i> Sykes, 1903	Thailand	28	56	Personal data
<i>Rhiostoma samuiense</i> Tomlin, 1931	Thailand	28	48	Personal data
<i>Rhiostoma housei</i> (Haines, 1854)	Thailand	28	56	Present study
<i>Cyclophorus courbeti</i> Ancey, 1888	Thailand	28	56	Present study
<i>Cyclophorus fulguratus fulguratus</i>	Thailand	28	56	Present study
<i>Cyclophorus fulguratus</i> ssp.	Thailand	28	56	Present study
<i>Cyclophorus orthostylus</i>	Thailand	28	56	Present study
<i>Cyclophorus courbeti</i>	Thailand	28	56	Present study
<i>Cyclotus</i> sp1	Thailand	28	50	Present study
<i>Cyclotus</i> sp2	Thailand	28	50	Present study
<i>Micraulax</i> sp.	Thailand	28	46	Present study
<i>Platyrhaphe</i> sp.	Thailand	28	46	Present study
<i>Rhiostoma housei</i>	Thailand	28	56	Present study
<i>Rhiostoma</i> sp.	Thailand	28	50	Present study

เอกสารอ้างอิง

- Abbott, R.T. 1989. **Compendium of Landshells**. Madison Publishing Associates. Inc., New York, 36-56.
- Alcalde, A. and Jacobson, M.K. 1959. New operculate snail: Jamaica. **Nautilus** 72: 111-115.
- Barker, G.M. 2001. **The biology of terrestrial Molluscs**. CABI Publishing, CAB International, New York, 86-89.
- Baršienė, J. and Ribi, G. 1998-1999. Karyological studies of *Viviparus ater* (Gastropoda: Prosobranchia) from different populations in Switzerland. **Malacological Review** 31-32: 93-100.
- Baršienė, J., Ribi, G. and Barsyte, D. 2000. Comparative karyological analysis of five species of *Viviparus* (Gastropoda: Prosobranchia). **Journal of Molluscan Studies** 66: 259-271.
- Benson, W.H. 1865. Characters of seventeen new of the Cyclostomacea from the British Provinces of Burmah, collected by W. Theobald, jun., Esq. **Ann. Mag. Nat. Hist. (ser. 2)** 17: 225-233.
- Bentham Jutting, W.S.S. 1948. Systematic studies on the non marine mollusca of the Indo-Australian Archipelago. **Treubia** 19: 539-604.
- Bentham Jutting, W.S.S. 1949. On a collection of non marine Mollusca from Malaya in the Raffles museum, Singapore, with an appendix on cave shells. **Bulletin of the Raffles Museum** 19: 50-77.
- Blandford, W.T. 1903. Notes on Mr. W.M. Daly's collections of land and fresh water Mollusca of Siam. **Proceedings of the Malacological Society of London** 5: 247-284.
- Burch, J.B. 1967. Cytological relationship of Pacific gastropods. **Venus** 25: 118-135.
- Burch, J.B. 1976. Outline of classification of Australian terrestrial mollusks. **Journal of the Malacological Society of Australia** 3: 127-156.
- Choundhury, R.C. and Pandit, R.K. 1997. Chromosome of prosobranch gastropods from Viviparidae, Pilidae and Cyclophoridae (Order Mesogastropoda). **Caryologia** 50: 303-315.
- Clark, M.S. and Wall, W.J. 1996. **Chromosome: The complex code**. Alden Press, Oxford.

- Dillon, R.T. 1991. Karyotypic evolution in pleurocerid snails. II. Pleurocera, *Goniobasis* and *Juga*. **Malacologia** 33: 339-344.
- Gould, A.A. 1856. Descriptions of shells. **Proc. Boston. Soc. nat. Hist.** 6: 11-16.
- Gude, G.K. 1921. **Mollusca: -III (Land Operculates)**. In: The Fauna of British India including Ceylon and Burma. (A. K. Shipley and Marshall, eds), 45-90, Taylor and Francis, London.
- Habe, T. 1964. Operculate land molluses from Southeast Asia. **Fauna and Flora Research Society Kyoto** 4: 111-127.
- Ieyama, H. and Tada, A. 1991. Chromosomal studies and the quantitative evaluation of nuclear images stained with Feulgen dye of the Diplommatinidae. **Venus** 50: 68-78.
- Ieyama, H., Henmi, S. and Tada, A. 1993. Chromosomal studies and quantitative evaluation of cellular DNA in several species of the Diplommatinidae (Mollusca: Gastropoda). **Memoirs of the Faculty of Education, Ehime University, Natural Science** 13: 33-39.
- Ieyama, H. and Ogaito, H. 1998. Chromosomes and nuclear DNA contents of two species in the Diplommatinidae. **Venus** 57: 133-136.
- Ieyama, H. and Ogaito, H. 2000. Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in the Diplommatinidae. **Venus** 59: 217-224.
- Kasinathan, R. 1975. Some studies of five species of cyclophorid snails from peninsular India. **Proceedings of the Malacological Society of London** 4: 379-394.
- Kasinathan, R. and Natarajan, R. 1975. Chromosome numbers of five species of Cyclophoridae (Prosobranchia: Mesogastropoda) from South India. **Malacological Review** 8: 109-110.
- King, M. 1993. **Species evolution: the role of chromosome change**. Cambridge University Press.
- Kobelt, W. 1902. **Cyclophoridae**. Das Tierreich, Cyclophoridae. Pp. i-xxxix, 1-663. Friedländer and Son, Berlin.
- Kongim, B., Panha, S. and Naggs, F. 2006. Karyotype of land operculate snails of the genus *Cyclophorus* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in Thailand. **Invertebrate Reproduction and Development** 49 : 1-8.

- Kongim, B., Sutcharit, C., Tongkerd, P., Tan, S.H.A., Quynh, N.X., Naggs, F. and Panha, S. 2010. Karyotype variation in the genus *Pollicaria* (Caenogastropoda: Pupinidae). **Zoological Studies** 49: 125-131.
- Levan, A., Frega, K. and Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position chromosomes. **Heredity** 52: 201-205.
- Minato, H. and Habe, T. 1982. Land shell fauna of Ujigunto, Kusakakigunto I. **Venus** 41: 124-140.
- Möllendorf, O.F. 1894. On a collection of land shell from the Samui Islands, Gulf of Siam. **Proceedings of the Zoological Society of London** 62: 146-156.
- Morrison, J.P.E. 1955. American cyclophorid land snails. **Journal of the Washington Academy of Science** 45: 149-162.
- Nevill, G. 1881. New or little-known Mollusca of the Indo-Malayan Fauna. **Journal of the Asiatic Society of Bengal** 50: 125-167.
- Ogaito, H. and Ieyama, H. 1997. *Diplommatina (Sinica) hidaensis* n. sp. (Diplommatinidae) from mountains districts of Gifu and Nagano Prefectures, Central Japan. **Venus** 56: 197-203.
- Park, G.M. 1994. Cytotaxonomic studies of freshwater gastropods in Korea. **Malacological Review** 27: 23-41.
- Patterson, C.M. and Burch, J.B. 1978. **Chromosomes of pulmonate mollusks**. In: Pulmonates: Systematics and Ecology. (V. Fretter and J. Peake, eds), 171-217, Academic Press, New York.
- Reeve, L.A. 1861. **Monograph of the genus Cyclophorus**. Conchologia Iconica, Lodon .
- Ruhoff, F.A. **Index of the species of mollusca introduced from 1850 to 1870**. Smithsonian Contribution to Zoology No. 294, 1980.
- Salisbury, A.E. A new species of *Rhiostoma*. **Proceeding of Malacological Society of London** 28 (1949) 41-42.
- Solem, A. 1966. Some non marine mollusks from Thailand. **Spolia Zoologia Musei Hauniensis** 24: 10.
- Swanson, C.P., Merz, T. and Young, W.J. 1967. **Cytogenetics**. Prentice Hall, New Jersey.
- Thiriot-quiévreux, C. and Seapy, R. 1997. Chromosome studies of three families of pelagic heteropod molluscs (Atlantidae, Carinariidae and Pterotracheidae) from Hawaiian waters. **Canadian Journal of Zoology** 75: 237-244.
- Thompson, F.G. 1969. Some Mexican and Central American land snails of the family Cyclophoridae. **Zoologica** 54: 35-77.

- Tielecke, H. 1940. Anatomie, Phylogenie und Tiergeographie der Cyclophoriden. **Archiv für Naturgeschichte** 9: 317-371.
- Tomlin, J.R. 1931. Two new species of *Rhiostoma*. **Proceeding of Malacological Society of London** 19 : 227-228.
- Wade, C.M., Mordan, P.B. and Clarke, B. 2001. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). **Proceedings of the Royal Society of London** 268: 413-422.
- White, M.D.J. 1978. Chain processes in chromosomal speciation. **Systematic Zoology** 27: 17-26.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง ความหลากหลายชนิดและเซลล์พันธุศาสตร์ของหอยทากบกวงศ์ Cyclophoridae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

1. **Kongim, B.,** Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2010. Karyotypes of Land Operculate Snails Genus *Pterocyclus* and *Rhiostoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) from Thailand and Malaysia. (Submitted)
2. **Kongim, B.,** Sutcharit, C. and Panha, S. 2010. A newly record genus and a new species of the terrestrial snail genus *Platyrhaphe* from Thailand (Prosobranchia: Cyclophoridae) additional Karyotype investigation. (Submitted)
3. **Kongim, B.,** Sutcharit, C. and Panha, S. 2010. Cytogenetics and Sex chromosome determination of operculate land snails family Cyclophoridae from Thailand. (Preparing)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการดำเนินงานในโครงการนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิชาการ ได้แก่ การพัฒนาการเรียนการสอน โดยนำองค์ความรู้จากการวิจัยไปใช้ในการเรียนการสอนวิชาพันธุศาสตร์ของเซลล์ และสัตววิทยา นอกจากนี้ยังสามารถสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ซึ่งเป็นนิสิตระดับปริญญาตรี สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จำนวน 7 คน ซึ่งทำโครงการงานปัญหาพิเศษทางชีววิทยา เรื่องความหลากหลายชนิดและคาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

ผลการวิจัยจากโครงการได้นำในที่ประชุมวิชาการ 4 เรื่อง ได้แก่

1. **Kongim, Bangon,** Tongkerd, Piyoros; Sutcharit, Chirasak; Yasin Zulficar; Tan Aileen; Panha, Somsak. 2007. Karyotypes of Land Operculate Snails Genus *Pterocyclus* and *Rhiostoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) from Thailand and Malaysia. In abstract, **World Congress of Malacology**, Antwerp, Belgium, 15-20 July 2007.

2. **Kongim, B.**, Naggs, F. and Panha, S. 2008. Land Snail family Cyclophoridae from Northeastern Thailand, Diversity and Chromosomal investigation. In: Abstracts, Molluscan Forum 2008. **The Malacological Society of London, Natural History Museum**, London, United Kingdom.
3. **Kongim, B.** and Panha, S. 2008. Cytogenetics of land snail family Cyclophoridae in northeastern Thailand. In: Abstract, **The Congress of The Thailand Research Fun and Commission on Higher Education**, Phetchaburi Thailand 16-18 October 2008.
4. **Kongim, B.** and Panha, S. 2009. Species diversity and cytogenetics of land snail family Cyclophoridae in northeastern Thailand. In: Abstract, **The Congress of The Thailand Research Fun and Commission on Higher Education**, Phetchaburi Thailand 15-17 October 2009.
5. **Bangon Kongim**, Chirasak Sutcharit, Piyoros Tongkerd and Somsak Panha. Taxonomic Investigation of the genus *Platyrhaphe* from Thailand (Prosobranchia: Cyclophoridae). In: Abstracts, **17th International Congress of Unitas Malacologica (World Congress of Malacology, WCM)**, Phuket, Thailand from 18-24th July 2010.

บทความวิชาการที่เผยแพร่

1. บังอร กองอิม. 2008. หอยหอม...หอยแห่งภูเขา. BRT Magazine December 2008.
2. บังอร กองอิม. 2009. หอยทากบก: สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีบทบาทต่อวิถีชีวิตของมนุษย์. วารสารก้าวหน้า โลภวิทยาาสตร์ปีที่ 8 ฉบับที่ 2 (2009).
3. บังอร กองอิม และ สมศักดิ์ ปัญญา. คาริโอไทป์กับการศึกษาวิวัฒนาการของชีวิต กรณีศึกษาใน หอยทากบก. (อยู่ในระหว่างกระบวนการตีพิมพ์)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ต้นฉบับเพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ (Manuscript)

Manuscripts สำหรับตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

1. **Kongim, B.**, Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2010. Karyotypes of Land Operculate Snails Genus *Pterocyclus* and *Rhiostoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) from Thailand and Malaysia. (Submitted)

2. **Kongim, B.**, Sutcharit, C. and Panha, S. 2010. A newly record genus and a new species of the terrestrial snail genus *Platyrhaphe* from Thailand (Prosobranchia: Cyclophoridae) additional Karyotype investigation. (Submitted)

Karyotypes of Land Operculate Snails Genus *Pterocyclos* and *Rhiostoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) from Thailand and nearby areas

**Kongim Bangon¹, Tongkerd Piyoros², Sutcharit Chirasak²
and Panha Somsak²**

¹Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand, Email: kongimb@yahoo.com,

²Animal Systematics Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Bangkok 10330, Thailand, Email: Piyoros_Tongkerd@yahoo.com, Jirasak4@yahoo.com, somsak.Pan@chula.ac.th

The snorkel snails of the two related genera *Pterocyclos* and *Rhiostoma* from Thailand and Malaysia were karyotyped. The two genera showed distinct intergeneric similarities in both haploid and diploid chromosome number ($n = 14$, $2n = 28$) but the ranges of fundamental chromosome number (FN) exhibit variation of 48, 52 and 56. Karyotypes of the two *Pterocyclos* species from south Thailand and Malaysia show $8m + 4sm + 2t$ in *Pterocyclos* sp. and $7m + 5sm + 2t$ in *Pterocyclos blandi*. The six species of *Rhiostoma* examined herein show the karyotype variations and chromosome morphology differentiation. The karyotype varies from $7m + 4sm + 3t$ in eastern Thailand *R. hainesi*; $6m + 5sm + 3t$ in *R. chupingense* and $2m + 9sm + 3t$ in *R. jalorensis* from south Thailand. The two island species exhibit $3m + 8sm + 1t + 2a$ in *R. asiphon* from Angtong Archipelago and $5m + 5sm + 2t + 2a$ in *R. samuiense* from Samui Island. Karyotypes among populations of *R. housei* showed variation between the central ($9m + 2sm + 3t$) and southern populations ($9m + 2sm + 2t + 1a$) of Thailand. This is the first report on chromosome study of the peculiar land operculate snails of the Thai-Malay Peninsula. The systematic studies of the genus *Pterocyclus* and *Rhiostoma* are now being critically investigated.

Key words: land operculate snail, *Pterocyclos*, *Rhiostoma*, karyotype, Thailand

INTRODUCTION

The Cyclophoridae are confined to peninsular India and Sri Lanka, the east Himalayan region through Southeast Asia and the Indonesian archipelago to Northeastern Australia and north into much of Japan (Tielecke, 1940). The two genera of snorgel snails, *Pterocyclos* and *Rhiostoma* are endemic operculate snails in the limestone areas of Asian region. They belong to the subfamily Pterocyclinae, contains twenty species which distributed in Myanmar, Vietnam, Laos, Cambodia, Malaysia and Thailand (Möllendorff, 1894; Blandford, 1902;

Tomlin, 1931; Salisbury, 1949; Solem, 1966 and Ruhoff, 1980). They have unique shell shape, some part of last whorl disconnected with penultimate whorl, or having a tubular process on the last whorl near the aperture of their shells look like snorkel. Because of their attractive characters to shell traders, large numbers of snails have been continuously hunted from natural habitats, so that their status seems to be endangered, which will certainly effect the limestone food web.

The main problems regarding classification of the genus *Pterocyclos* and *Rhiostoma* are shell morphological variation such as colour pattern, last whorl characteristics and even shell shapes within and between populations, and the anatomical studies especially of the reproductive organs have not been yet reported. With high species diversity and wide-ranging distribution, and with limited materials in the museums as well as there is no record at all to address the mentioned problem. The peculiar shell characters and problem on classification both *Pterocyclos* and *Rhiostoma* becoming attractive materials for systematic and biogeographical studies. There is enormous potential for genome sequencing-based studies on terrestrial snails, but to date these have been conducted almost exclusively on Stylommatophoran pulmonates (Wade *et al.*, 2001) and involve relatively expensive consumables. In contrast, karyotyping is a low cost methodology that provides useful tools for alpha taxonomy. It can be used in evolutionary interpretations, and is ultimately complementary to sequencing. Although *Rhiostoma* is a diverse genus and clearly presents an interesting focal group for diversification studies, the karyotype has not been reported before.

In the present paper, we report cytogenetic data of Thai and Malaysia species of *Pterocyclos* and *Rhiostoma*, which brings the total examined to 24 cyclophorids (Table 1), and for the first time allow some discussion of systematic implications.

MATERIALS AND METHODS

Localities, shell characteristics of each species and karyotype information are given in Fig. 1, 2 and Table 2 respectively. Species identification were made using the following literatures; Reeve, (1861), Möllendorff (1894), Blandford, (1902); Tomlin, (1931); Salisbury (1949); Solem (1966) and Ruhoff (1980), and compared with type specimens at the Senckenberg Museum, Frankfurt (SMF) and the Natural History Museum, London (NHM).

Chromosome preparations were made from gonad tissue by an air-drying method modified from Patterson and Burch (1978) and Park (1994). Gonads were directly injected with 0.1 ml of 0.1% colchicine (Sigma D-89552), were

dissected after 4-5 hours and cut into small pieces in 0.07% hypotonic KCl solution. Separated cells were collected after centrifugation at 1,000 rpm for 10 minutes and fixed in fresh Carnoy's fixative (3 parts of absolute ethanol and 1 part glacial acetic acid). The supernatant was replaced with fresh fixative for each of the two centrifugations. Cell suspensions were dropped onto clean glass slides pre-heated to 60°C. Slides were then air-dried and stained in 4% Giemsa solution for 15 minutes. Photomicrographs of ten well-spread metaphase cells were measured for relative length and centromeric index. Mitotic karyotypes were arranged and numbered for chromosome pairs in order to decrease mean relative length. Nomenclature of morphological chromosome types follows that of Levan et al. (1964).

RESULTS OF KARYOTYPE ANALYSIS

The operculate land snails of the two related genera *Pterocyclos* and *Rhiostoma* collected from Thailand and Malaysia were karyotyped. These genera showed distinct intergeneric similarities in both haploid and diploid chromosome number ($n = 14$, $2n = 28$) but the ranges of fundamental chromosome number (FN) exhibit variations of 48, 52 and 56. The metacentric, submetacentric, telocentric and acrocentric chromosomes were identified. Karyotypes of two *Pterocyclos* species from south Thailand and Malaysia show $8m + 4sm + 2t$ in *Pterocyclus* sp. from south Thailand and $7m + 5sm + 2t$ in *Pterocyclus blandi* from Malaysia. The latter species shows chromosome marker of short arm of pair number sixth exhibits wider angle arrangement, and number 7 shows secondary constriction. The six species of *Rhiostoma* examined herein show karyotype variations with chromosome morphology differentiation. The karyotype varied from $7m + 4sm + 3t$ in *R. hainesi* from eastern Thailand. Two species from the south i.e. *R. chupingense* exhibits $6m + 5sm + 3t$ and chromosome no. 4 show telomere end circled on long arm, and $2m + 9sm + 3t$ in *R. jalorensis*. The two island species *R. asiphon* from Angtong Island have $3m + 8sm + 1t + 2a$ and $5m + 5sm + 2t + 2a$ in *R. samuiense* from Samui Island. Karyotypes among populations of *R. housei* show variations between the central ($9m + 2sm + 3t$) and southern regions ($9m + 2sm + 2t + 1a$) of Thailand (Fig. 3, 4 and Table 2).

DISCUSSION

The chromosome number among the Pterocyclinae is highly conservative. Several characteristics are common to all analysed species so far, including the invariable diploid number (28) which most similar in chromosome number to the Cyclophorinae of the common genus *Cyclophorus* (Kongim et al., 2006, Lee et al. 2008), the presence of a size continuum and the karyotype pattern (the present study).

This conservation of haploid number is distinctly different from the subclass Streptoneura (Caenogastropoda), for which haploid chromosome numbers have been reported from 7 to 60 (Burch, 1967). And the Streptoneura exhibits its own chromosome number in each taxon. This is quite seldom varies to not more than ± 2 bivalents (Burch, 1967). An investigation of ten tiny cyclophoroideans belonging to the genus *Diplommatina* also showed a similar conservative chromosome number ($2n = 26$) and karyotype characters (metacentric and submetacentric) (Ieyama and Tada, 1991; Ieyama, Henmi and Tada, 1993; Ogaito and Ieyama, 1997; Ieyama and Ogaito, 1998, 2000).

The variation of chromosome number may represent a primary species-isolating mechanism as discussed by King (1993). As currently recognized that *R. housei* ranges from northern Thailand (type locality) to southern Thailand and is notable for exhibiting significant variation in shell morphology (Haines, 1854). Our data suggested that eight *Rhiostoma* species and some subspecies occurring in Thailand. Further chromosomal surveys, combined with comparative analyses and geographic variation of morphological characters including DNA sequence analysis of the *R. housei* species complex, are challenged to prove the species limitation. Karyotypes of the two endemic species, *R. chupingense* and *R. housei* are different in arm length ratios. Moreover, *Pterocyclus blandi*, *R. chupingense*, *R. housei*, *R. jalorensis* exhibits unique character on the chromosome especially the first six pairs chromosome. These characters are highly variable between a wide range of organisms (Swanson *et al.*, 1967), are associated with a high level of conservation between species and therefore associated with species status (Clark and Wall, 1996; Rickart *et al.*, 1999).

The karyotype is generally a species-specific character useful in species discrimination (King, 1993; Clark and Wall, 1996). Karyological data has been used for species-level classification in several molluscan groups such as *Goniobasis* (Dillon, 1991); *Bellamya* (Zhou *et al.*, 1988); *Atlanta* (Thiriot-Quèvèux and Seapy, 1997) and *Viviparus*. Baršienė *et al.* (2000) used karyotyping to improve on existing schemes of classification and to explain the evolutionary role of chromosomes. Cytogenetic studies are particularly valuable for clarifying phylogenetic relationships and investigating mechanisms of chromosomal evolution in closely related species.

Chromosome variations in both number and karyotype pattern have been implied as a primary isolating mechanism for speciation. Karyotype differentiation appears to result most readily from population fragmentation via founder events. The interpretation of chromosome numbers as an indicator of

evolutionary relationship must be viewed with caution. According to some authors (e.g. Patterson and Burch, 1978), molluscan chromosome numbers have a tendency to increase, but for others (e.g. Butor and Kiauta, 1969; Ahmed, 1976) not appeared in literatures, chromosomal evolution indicate by the lower numbers tendency. From the present review, chromosome numbers increase from the traditional Archaeogastropoda to the Neogastropoda, whereas a tendency to decrease is noticeable in the Opisthobranchia from the Cephalaspidea to the Nudibranchia. In the previous reviews of the molluscan chromosomes (Patterson, 1969; Patterson and Burch, 1978; Nakamura, 1985, 1986), a general constancy with regard to chromosome numbers within a taxonomic group was noted.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Ronald Janssen (Forchungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt) for kindly permitting SP and CS to study type specimens. Thanks also to Ms. Pongpun Prasankok for her kind assistance with fieldwork. We would also like to convey our gratitude Fred Naggs (The Natural History Museum, London) for his critical comment on the manuscript. This project was funded by The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education (grant No. MRG 5080405), the Mahasarakham University (grant year 2007), Additional funding was provided by TRF/BIOTEC.

REFERENCES

- ALCALDE, A. and JACOBSON, M.K., New operculate snail: Jamaica. *Nautilus*, 72 (1959) 111-115.
- BARŠIENĖ, J., RIBI, G. and BARSYTE, D., Comparative karyological analysis of five species of *Viviparus* (Gastropoda: Prosobranchia). *Journal of Molluscan Studies*, 66 (2000) 259-271.
- BLANDFORD, W.T., On *Rhiostoma daily*, n. sp., and *Sesara megalodon*, n. sp., obtained of the late Mr. W. M. Daily in Siam. *Proceeding of the Malacological Society of London*, 5 (1902) 34-35.
- BURCH, J.B., Cytological relationship of Pacific gastropods. *Venus*, 25 (1967) 118-135.
- CLARK, M.S. and WALL, W.J., *Chromosome: The complex code*. Alden Press, Oxford, 1999.
- DILLON, R.T., Karyotypic evolution in pleurocerid snails. II. Pleurocera, *Goniobasis* and *Juga*. *Malacologia*, 33 (1991) 339-344.
- DIUPOTEX-CHONG, M.L., CAZZANIGA, N., HERNÁNDEZ-SANTOYO, A., BETANCOURT-RULE, J.M. Karyotype description of *Pomacea patula catemacensis* (Caenogastropoda, Ampullariidae), with an assessment of the taxonomic status of *Pomacea patula*. *Biocell*, 28 (2004) 279-285.
- ESPINOSA, F. I., DOMINGUEZ, J.C., GARCIA-GOMEZ. Chromosome and cytological analysis of the endangered limpet *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 (Gastropoda: Patellidae): taxonomical and monitoring implications. *J. Conch.* 39 (2007) 347-356.

- HABE, T., Operculate land molluses from Southeast Asia. Fauna and Flora Research Society Kyoto, 4 (1964) 111-127.
- IEYAMA, H. and OGAITO, H., Chromosomes and nuclear DNA contents of two species in the Diplommatinidae. *Venus*, 57 (1998) 133-136.
- IEYAMA, H. and OGAITO, H., Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in the Diplommatinidae. *Venus*, 59 (2000) 217-224.
- IEYAMA, H. and TADA, A., Chromosomal studies and the quantitative evaluation of nuclear images stained with Feulgen dye of the Dipplommatinidae. *Venus*, 50 (1991) 68-78.
- KING, M., Species evolution: the role of chromosome change. Cambridge Univ. Press, 1993.
- KOBELT, W., Cyclophoridae. Das Tierreich, Cyclophoridae. Pp. i-xxxix, 1-663. Friedländer and Son, Berlin, 1902.
- KONGIM, B., PANHA, S. and NAGGS, F. Karyotype of land operculate snails of the genus *Cyclophorus* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in Thailand. *Invertebrate Reproduction and Development*, 49 (2006) 1-8.
- LEE, Y.C., LUE, K.Y., WU, W.L. A molecular phylogenetic investigation of *Cyathopoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in East Asia. *Zoological studies*, 47 (2008) 591-604.
- LEVAN, A., FREGA, K. and SANDBERG, A.A., Nomenclature for centromeric position chromosomes. *Heredity*, 52 (1964) 201-205.
- MÖLLENDORFF, O.F. VON. On a collection of the land-shell from the Samui Islands, gulf of Siam. *Proceeding of the Zoological Society of London*, (1894) 146-156.
- MORRISON, J.P.E., American cyclophorid land snails. *Journal of the Washington Academy of Science*, 45 (1955) 149-162.
- OGAITO, H. and IEYAMA, H., *Diplommatina (Sinica) hidaensis* n. sp. (Diplommatinidae) from mountains districts of Gifu and Nagano Prefectures, Central Japan. *Venus*, 56 (1997) 197-203.
- PARK, G.M. Cytotaxonomic studies of freshwater gastropods in Korea. *Malac. Rev.* 27 (1994). 23-41.
- PATTERSON, C.M. and BURCH, J.B. Chromosomes of pulmonate mollusks. In V Fretter, J Peake, eds. *Pulmonates: systematics and ecology*. New York: Academic Press, pp. (1978) 171-217.
- REEVE, L.A., Monograph of the genus *Cyclophorus*. *Conchologia Iconica*, London, 1861.
- RICKART, E.A., MERCIER, J.A. and HEANNEY, L.R., Cytogeography of Philippine bats (Mammalia: Chiroptera). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 112 (1999) 453-459.
- RUHOFF, F.A. Index of the species of mollusca introduced from 1850 to 1870. *Smithsonian Contribution to Zoology* No. 294, 1980.
- SALISBURY, A.E. A new species of *Rhiostoma*. *Proceeding of Malacological Society of London*, 28 (1949) 41-42.
- SOLEM, C., Some non marine mollusks from Thailand. *Spolia Zoologia Musei Hauniensis*, 24 (1966) 9-13.
- SWANSON, C.P., MERZ, T. and YOUNG, W.J., *Cytogenetics*. Prentice Hall, New Jersey, 1967.
- THIRIOT-QUIÉVREUX, C. and SEAPY, R., Chromosome studies of three families of pelagic heteropod molluscs (Atlantidae, Carinariidae and Pterotracheidae) from Hawaiian waters. *Canadian Journal of Zoology*, 75 (1997) 237-244.
- THOMPSON, F.G., Some Mexican and Central American land snails of the family Cyclophoridae. *Zoologica*, 54 (1969) 35-77.
- TIELECKE, H., Anatomie, Phylogenie und Tiergeographie der Cyclophoriden. *Archiv für Naturgeschichte*, 9 (1940) 317-371.

- TOMLIN, J.R. LEB. Two new species of *Rhiostoma*. Proceeding of Malacological Society of London, 19 (1931) 227-228.
- WADE, C.M. MORDAN, P.B. and CLARKE, B., A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). Proceedings of the Royal Society of London B 268 (2001) 413-422.
- ZHOU, D., ZHOU, M. and WU, Z., The karyotype of five species of freshwater snails of the family Viviparidae. Acta Zoologica Sinica, 34 (1988) 364-370.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. A map of Thailand showing the collecting localities of *Pterocyclus* and *Rhiostoma* in this study. 1 = Tham Sumano, Patthalung; 2 = Gua Cenderawasih, Peris, Malaysia; 3 = Kedah Cement Langawi, Malaysia; 4 = Koh Wua Talub, Mu Koh Angtong N.P., Suratthani; 5 = Koh Samsao, Suratthani; 6 = Khao Poo Khao Ya N.P., Phatthalung; 7 = Khao Panomwang, Suratthani; 8 = Khao Chang, Donsak, Suratthani; 9 = Wat Khao Thammarong, Prachuap Khirikhan; 10 = Khao Wangtong, Khanom, Nakhon Srithammarat; 11 = Sugai Jenis Peris, Malaysia; 12 = Khao Chakan, Sra Kaeo; 13 = Namtok Plio N.P., Chanthaburi; 14 = Muaglek, Saraburi; 15 = Khao Lukchang, Pakchong, Nakhon Ratchasima; 16 = Wat Theppithakpunnaram, Kang Koi, Saraburi; 17 = Tham Dao, Saraburi; 18 = Khao Lommuak, Muang, Prachuap Khirikhan; 19 = Wat Tham Suwannakuha, Muang, Pang-nga; 20 = Wat Tham Sua, Muang, Krabi; 21 = Namtok Taotong, Pang-nga; 22 = Tham Nampud, Pang-nga; 23 = Namtok Namuang, Koh Samui, Suratthani; 24 = Namtok Hinlad, Koh Samui, Suratthani; 25 = Koh Tan, Suratthani

Fig. 2. Shell characteristics of, **A**, *Pterocyclus* sp1.; **B**, *Pterocyclus* sp2.; **C**, *Rhiostoma asiphon*; **D**, *R. chupingense*; **E**, *R. hainesi*; **F**, *R. housei* (from localities 14 to 17); **G**, *R. housei* (form locality 18); **H**, *R. jalorensis* and **I**, *R. samuiense*.

Fig. 3. Mitotic chromosomes of, **A**, *Pterocyclus* sp1.; **B**, *Pterocyclus* sp2.; **C**, *Rhiostoma asiphon*; **D**, *R. chupingense*; **E**, *R. hainesi*; **F**, *R. housei* (from localities 14 to 17); **G**, *R. housei* (form locality 18); **H**, *R. jalorensis* and **I**, *R. samuiense*.

Fig. 4. Karyotype of **A**, *Pterocyclus* sp1.; **B**, *Pterocyclus* sp2.; **C**, *Rhiostoma asiphon*; **D**, *R. chupingense*; **E**, *R. hainesi*; **F**, *R. housei* (from localities 14 to 17); **G**, *R. housei* (form locality 18); **H**, *R. jalorensis* and **I**, *R. samuiense* as indicated in Fig. 3, showing metacentric (not labelled), submetacentric (sm), telocentric (t) and acrocentric (a).

Table 1. The diploid (2n) and fundamental number (FN) of the previous recorded cyclophorid species.

Species	Origin	2n	FN	References
<i>Cyclophorus jerdoni</i> (Benson, 1851)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Cyclophorus polynema</i> (Pfeiffer, 1854)	India	28	-	Choundhury and Pandit (1997)
<i>Pterocyclus bilabiatus</i> (Sowerby, 1853)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Theobaldius ravidus</i> (Benson, 1851)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Theobaldius shiplayi</i> (Pfeiffer, 1856)	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Micraulax scabra</i> Theobald, 1876	India	28	-	Kasinathan and Natarajan (1975)
<i>Cyclophorus aurantiacus</i> (Schumacher, 1817)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus cantori</i> (Benson, 1851)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus courbeti</i> Ancey, 1888	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus diplochilus</i> Möllendorff, 1894	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus fulguratus</i> (Pfeiffer, 1852)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus malayanus</i> (Benson, 1852)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus saturnus</i> Pfeiffer, 1862	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus speciosus</i> (Philippi, 1847)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus subfloridus</i> Ancey, 1888	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Cyclophorus volvulus</i> (Müller, 1774)	Thailand	28	56	Kongim et al. (2006)
<i>Pterocyclus</i> sp1	Thailand Malaysia	28	56	Present study
<i>Pterocyclus</i> sp2	Malaysia	28	56	Present study
<i>Rhiostoma asiphon</i> Moellendorft, 1894	Thailand	28	48	Present study
<i>Rhiostoma chupingense</i> Tomlin, 1938	Thailand	28	56	Present study
<i>Rhiostoma hainesi</i> (Pfeiffer, 1861)	Thailand	28	56	Present study
<i>Rhiostoma housei</i> (Haines, 1854)	Thailand	28	56	Present study
<i>Rhiostoma jalorensis</i> Sykes, 1903	Thailand	28	56	Present study
<i>Rhiostoma samuiense</i> Tomlin, 1931	Thailand	28	48	Present study

Table 2. The diploid number (2n), fundamental number (FN) and Karyotype pattern of the *Pterocyclus* and *Rhiostoma* species in the present study.

Scientific name	Locality	(2n, FN)	Karyotype
<i>Pterocyclus</i> sp1.	2. Tham Sumano, Patthalung	28, 56	8m+4sm+2t
<i>Pterocyclus</i> sp1.	3. Gua Cenderawasih, Peris, Malaysia	28, 56	8m+4sm+2t
<i>Pterocyclus</i> sp2.	4. Kedah Cement Langawi, Malaysia	28, 56	7m+5sm+2t
<i>Rhiostoma asiphon</i>	5. Koh Wua Talub, Mu Koh Angtong N.P., Suratthani	28, 48	3m+8sm+1t+2a
<i>R. asiphon</i>	6. Koh Samsao, Suratthani	28, 48	3m+8sm+1t+2a
<i>R. chupingense</i>	7. Khao Pu Khao Ya N.P., Phatthalung	28, 56	6m+5sm+3t
<i>R. chupingense</i>	8. Khao Panomwang, Suratthani	28, 56	6m+5sm+3t
<i>R. chupingense</i>	9. Khoa Chang, Donsak, Suratthani	28, 56	6m+5sm+3t
<i>R. chupingense</i>	10. Wat Khao Thammarong, Prajurbkerekkan	28, 56	6m+5sm+3t
<i>R. chupingense</i>	11. Khao Wangtong, Khanom, Nakhon Srithammarat	28, 56	6m+5sm+3t
<i>R. chupingense</i>	12. Sugai Jenis Peris, Malaysia	28, 56	6m+5sm+3t
<i>R. hainesi</i>	13. Khao Chakan, Sra Kaeo	28, 56	7m+4sm+3t
<i>R. hainesi</i>	14. Namtok Plio N.P., Chanthaburi	28, 56	7m+4sm+3t
<i>R. housei</i>	15. Muaglek, Saraburi	28, 56	9m+2sm+3t
<i>R. housei</i>	16. Khao Lukchang, Pakchong, Nakhon Ratchsrima	28, 56	9m+2sm+3t
<i>R. housei</i>	17. Wat Theppithakpunnaram, Kang Koi, Saraburi	28, 56	9m+2sm+3t
<i>R. housei</i>	18. Tham Dao, Saraburi	28, 56	9m+2sm+3t
<i>R. housei</i>	19. Khao Lommuak, Muang, Prachuap Khirikhan	28, 52	9m+2sm+2t+1a
<i>R. jalorensis</i>	20. Wat Tham Suwannakuha, Muang, Pang-nga	28, 56	2m+9sm+3t
<i>R. jalorensis</i>	21. Wat Tham Sua, Muang, Krabi	28, 56	2m+9sm+3t
<i>R. jalorensis</i>	22. Namtok Taotong, Pang-nga	28, 56	2m+9sm+3t
<i>R. jalorensis</i>	23. Tham Nampud, Pang-nga	28, 56	2m+9sm+3t
<i>R. samuiense</i>	24. Namtok Namuang, Koh Samui, Suratthani	28, 48	5m+5sm+2t+2a
<i>R. samuiense</i>	25. Namtok Hinlad, Koh Samui, Suratthani	28, 48	5m+5sm+2t+2a
<i>R. samuiense</i>	26. Koh Tan, Suratthani	28, 48	5m+5sm+2t+2a

Abbreviation: m, metacentric; sm, submetacentric; t, telocentric; a, acrocentric chromosome.

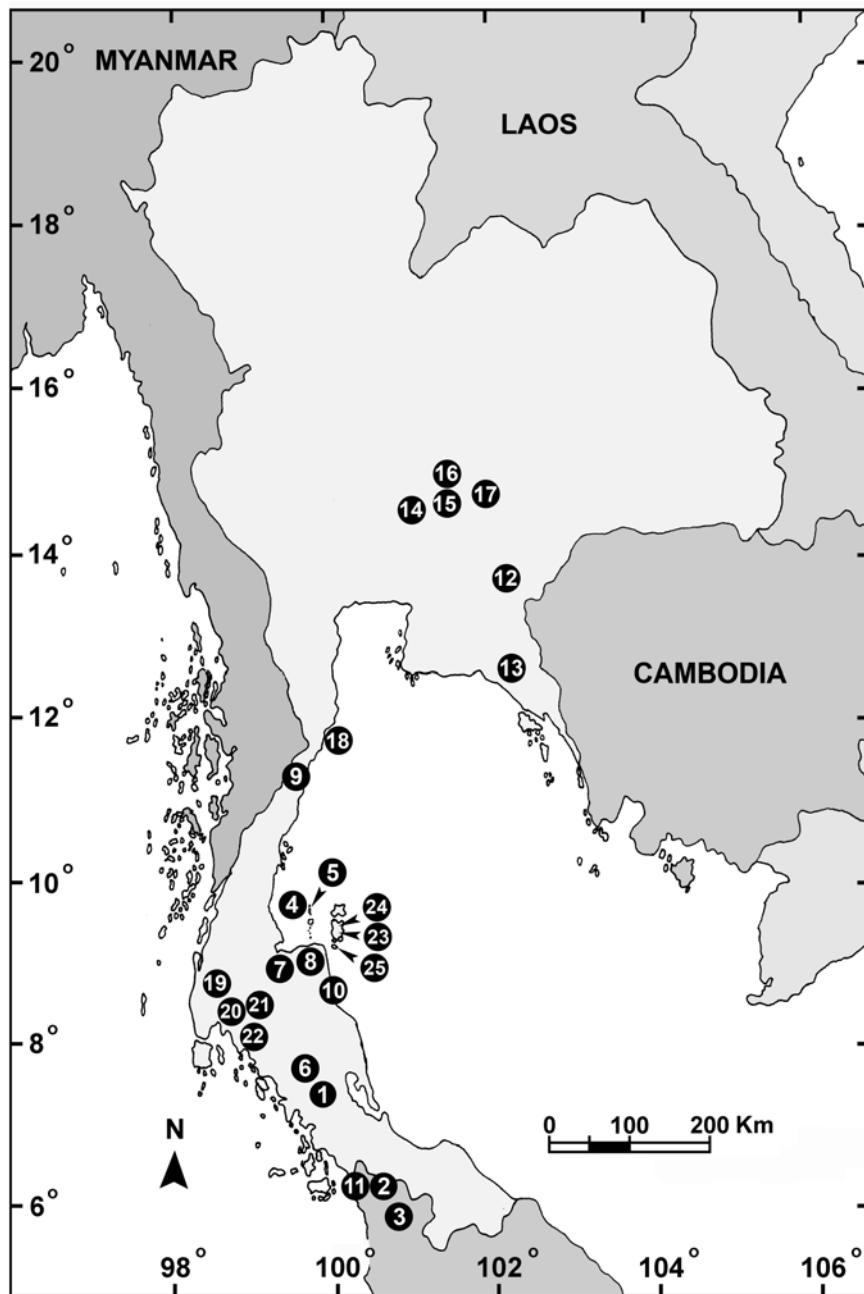


Fig. 1.

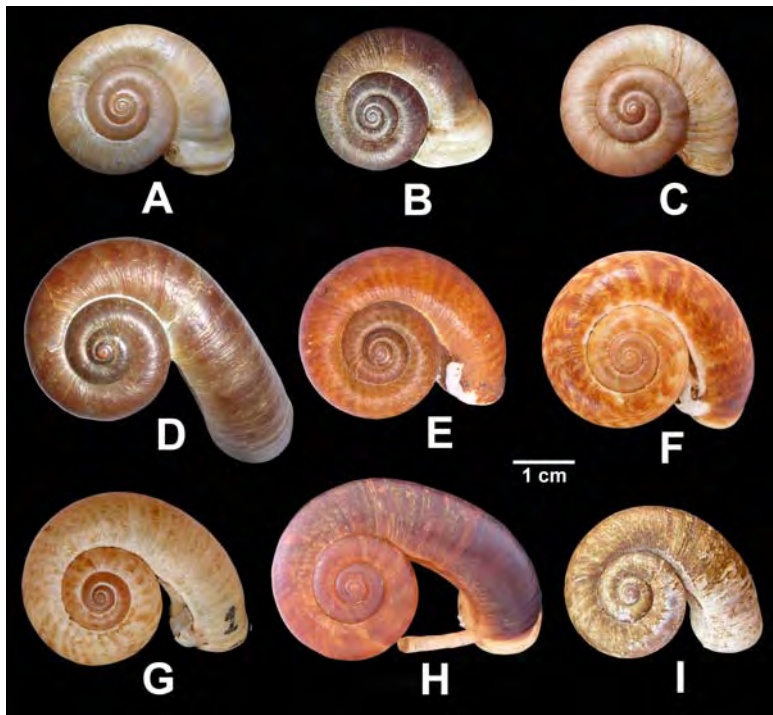


Fig. 2.

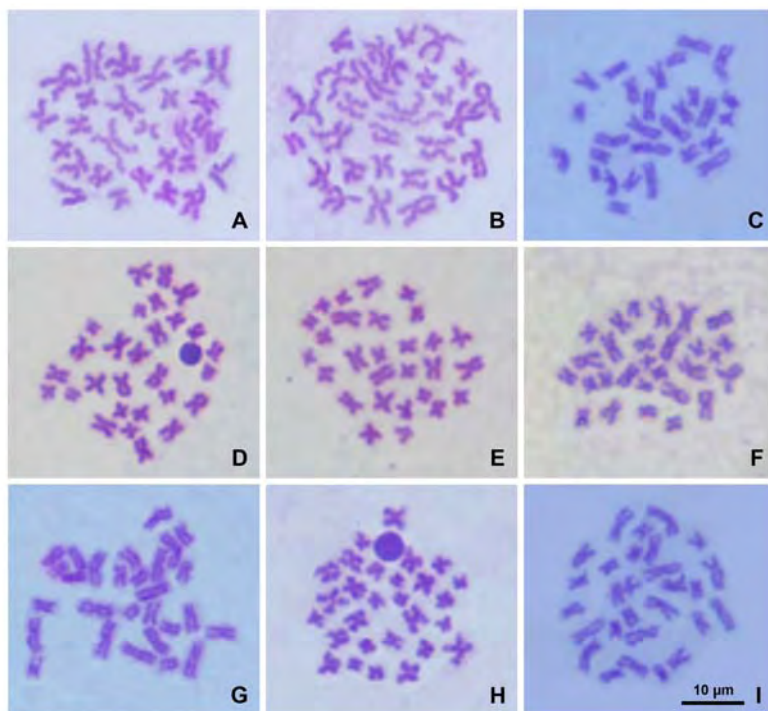


Fig. 3.

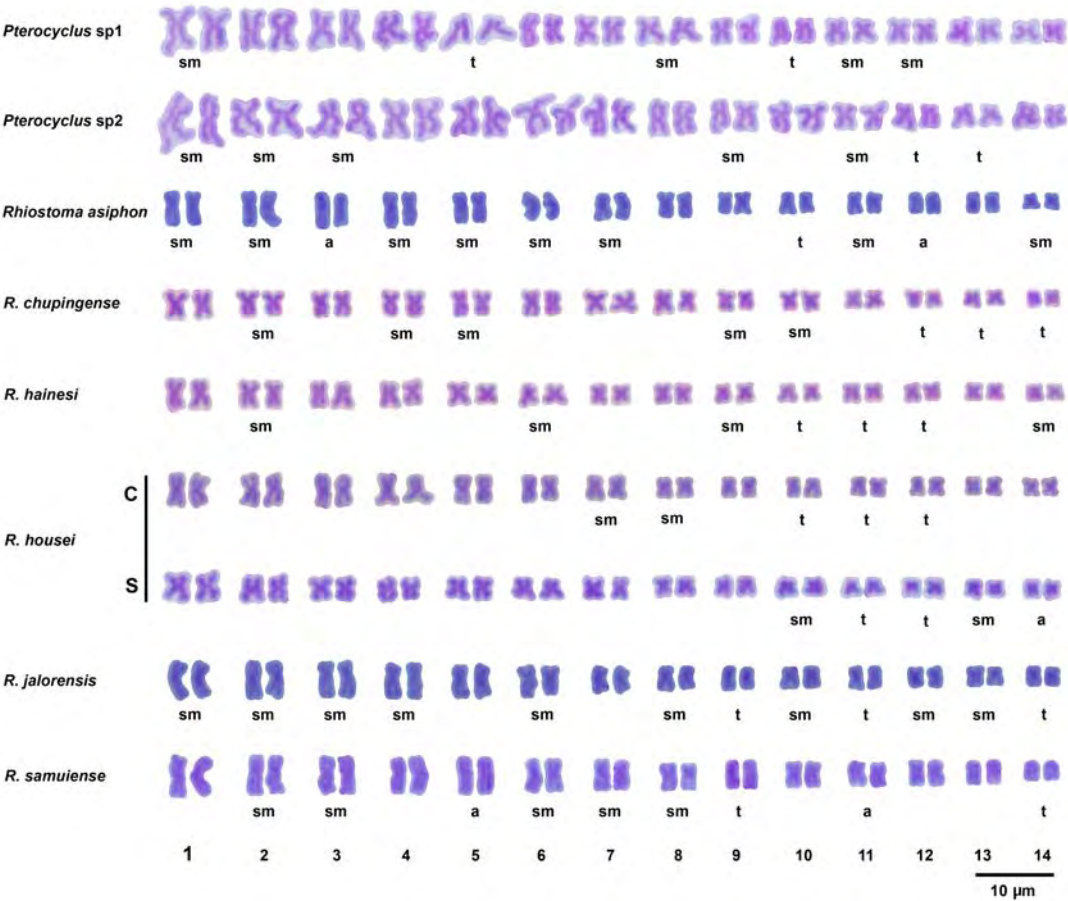


Fig. 4.

A newly record genus and a new species of the terrestrial snail genus *Platyrhaphe* from Thailand (Prosobranchia: Cyclophoridae).

Bangon Kongim¹, and Somsak Panha²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai, Maha Sarakham, 44150, Thailand. Email: b.kongim@msu.ac.th

² Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand. Email: somsakp@sc.chula.ac.th,
jirasak4@yahoo.com

Abstract

The cyclophorid snail genus *Platyrhaphe* Möllendorff, 1890 is mainly distributed in Southeast Asia. In Thailand, this genus has only been recorded a few times in the southern peninsular of Thailand. However, recent land snail diversity investigations, in the Korat Plateau, Northeastern Thailand, have recorded this snail for the first time, and it is clearly different from the other co-families such as *Cyclotus* and *Pterocyclus*. The classical techniques, which are still suitable when employed critically, such as shell and radula morphology, as well as genital characteristics, were used in the identification. The specimens were also compared to *P. lowi* Morgan, 1887 and *P. leucaeme* Möllendorff, 1901, and distinct differences in morphology were found. In addition, a karyotype study of *Platyrhaphe* sp., from northeastern Thailand, identified haploid and diploid chromosome numbers of $n = 14$, $2n = 28$, $FN = 56$. The karyotypic formulae contained unique representatives at $7m + 5sm + 2st$. The ZZ-ZW sex determination system is reported in this superfamily including *Cyclophorus*, *Rhiostoma* and *Pollicaria*.

Key words: Taxonomy, Cyclophoridae, *Platyrhaphe*, Karyotype, Thailand

Introduction

Within the Cyclophoridae, *Platyrhaphe* Moellendorff, 1890 is one of a small and a poorly known operculate land snail, which live in ground dwelling moist litters along out crop mountain. The geographic ranges of *Platyrhaphe* species are quite narrow. They

previously recorded along the closed lime stone mountain of Southeast Asia. So far, the land snail *Platyrhaphe* are confined to India, south China, Vietnam, much in Philippines, Malaysia, Borneo and Japan (Moellendorff, 1890; Kobelt, 1902; Sykes, 1902; Bavay & Dautzenberg, 1903; Martens 1903; Laid law, 1928; Otuka, 1941; Zilch, 1956) did not record this species from Thailand.

One of these is the Cyclophoridae which about 300 species currently arranged into 34 genera, and consists of 4 subfamilies. The Cyclophorinae, Spirotomatinae, Alycaeinae, and Pterocyclinae in a Linnean system are considered to be equal entities, problems associated with ranks and synonymies arise. *Platyrhaphe lowi* was initially placed in the genus *Aulopoma* (Morgan, 1885), then placed in the genus *Cyclotus* by Moellendorff in 1886 and Moellendorff (1809) placed *lowi* in the genus *Platyrhaphe*. Similar to *fodiens* Heude (1882) recognized this species as belonging to the genus *Cyclotus*, while Yen (1939) placed it in the genus *Platyrhaphe*. By the traditional classification is based on shell morphology very well especially the remark that the live shell of *Platyrhaphe* is covered with a layer of mud. Moreover, Phylogenetic relationships based on mitochondrial (mt) DNA sequences suggested that *Cyclophorus*, *Cyclotus*, *Leptopoma* and *Platyrhaphe* are monophyletic (Yen et al., 2008).

The most generally accepted system of classification today *Platyrhaphe* into Pterocyclinae (Vaught 1989, Millard 1996). Although some investigators treat *Platyrhaphe* as Cyclotinae. Kobelt (1902) listed Cyclotinae of two genera of *Platyrhaphe*, Moellendorff with 32 species name and *Cyclotus*, Sowerby with 100 species name.

Materials and Methods

The population was first found in July 2008 in Phukeyaw, Chaiyaphum Province (northeastern Thailand), in an isolated forest at an elevation of 300-1,300 m, 9.7°16'E 39.6°101°N.

Field observations investigating the life history were made over 1 yr, and records were taken monthly. The specimens were taken to the laboratory for rearing. The life was transferred to the laboratory to observe pupation. The specimens were preserved in 70% ethyl alcohol, and the adults were removed from their shell. To prepare drawings of the adult reproductive systems of both male and female, the radula were separated and boiled in a 10% KOH solution, cleared in distilled water, and then studied by using Scanning Electron Microscope. Terminology of the reproductive system follows Chaboo (2007). Descriptions of adult

follows Świętojańska et al. (2006). The holotype and paratypes are deposited at the Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University. Species identifications were made on the basis of published work (Gould 1856, Benson 1856 1859, Haines 1858, Pfeiffer 1862, Crosse 1885, Fischer 1885, Morgan 1885, Mabille 1887, Kobelt 1902, Gude 1921, Habe 1964, Solem 1966, Pain 1974), and by comparison with type material at the Natural History Museum, London (NHM), Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (NMHN) and Senckenberg Museum, Frankfurt (SMF).

Result

SYSTEMATICS

Family Cyclophoridae

Subfamily Pterocyclinae

Platyrhappe Moellendorff, 1890

Platyrhappe phukaewensis sp. nov.

Material: Holotype: Thailand, Chaiphaphum, Phukaew Mountain. 5 July 2008

Paratype (25 specimens):

Type material.— Holotype: ZMMSU 1577 (Fig. 1; height 34.5 mm, width 18.4 mm, 6½ whorls) from the type locality, paratypes ZMMSU 1548 (Fig. 3K; 9 shells), 1561 (82 shells), 1562 (85 shells); CUMZ; BMNH xxxx (5 shells); MNHN xxxx (5 shells).

Type locality.— The lime stone outcrop at Phukiew National Park, Nongbuadang District, Chaiphaphum Province, Thailand (17° 14' 1.3'' N 101° 44' 3.5'' E).

Etymology.— The specific name “*phukaewensis*” derived from the type locality meaning “Phukiew mountain”. It refers to the type locality of this species that found in the first with unique pattern of mud layer on shell.

Shell.— Shell small, globose shape; shell colour dark brown to blackish. Shell surface mostly tiny transverse rib, rarely rough on upper half of last whorl. Whorl 4-5; suture moderately

impressed; apex obtuse; spire short. Last whorl large about two-third of its length and flattened in front. Shell surface rough with malleations on upper half of last whorl. Aperture rounded, posterior angle canal small; peristome continuous, thicken, white, margin duplicated with some prominent growth ridges, slightly reflexed. Lip weakly thickened; umbilicus narrow. Umbilicus narrowly and deeply perforated. Operculum concentric thick calcareous, multi-spiral plate, plate 5 evenly increasing whorls, exterior little convex. Mostly, shell cover with soil, expand like wing along whorl,

Dimensions (n=15): height 33 - 41 mm, 35 mm on average, width of body whorl 18-23 mm, 20 mm on average.

Radula (n=1; figs 4, 5). — The taenioglossate radula long like ribbon, the radula has numerous rows with seven teeth per transverse row (Kobelt, 1902; Kasinathan, 1975) that is a central (middle or rhachis) tooth, flanked on both sides by one lateral tooth and two marginal teeth with radula formula of (2+1+1+1+2). The central tooth consist of five cusps, the central cusp is bigger than the four lateral cusps. The lateral tooth has three cusps and longest stalk which tend to the central tooth. The inner marginal tooth (no.2 in fig.2) exhibits the three cusps which the central cusp is bigger than the two lateral cusps.

Habitat and biological notes.— *Platyrhaphé phukeawensis* sp. nov. were found on litter and low rock locate the slope of hill or mountain. In generally, the adult usually inactive and rested on the underside of the leave litter, but in the rainy season we can see them moving slowly on the upper side of the leaves litter or low rock. However, we might not immediately recognize these small snails and colour identical to dead leaves, shell look like a small dry mud or a spot on leaves disease. So we have to sit down and look for carefully. which are almost always covered by a ...

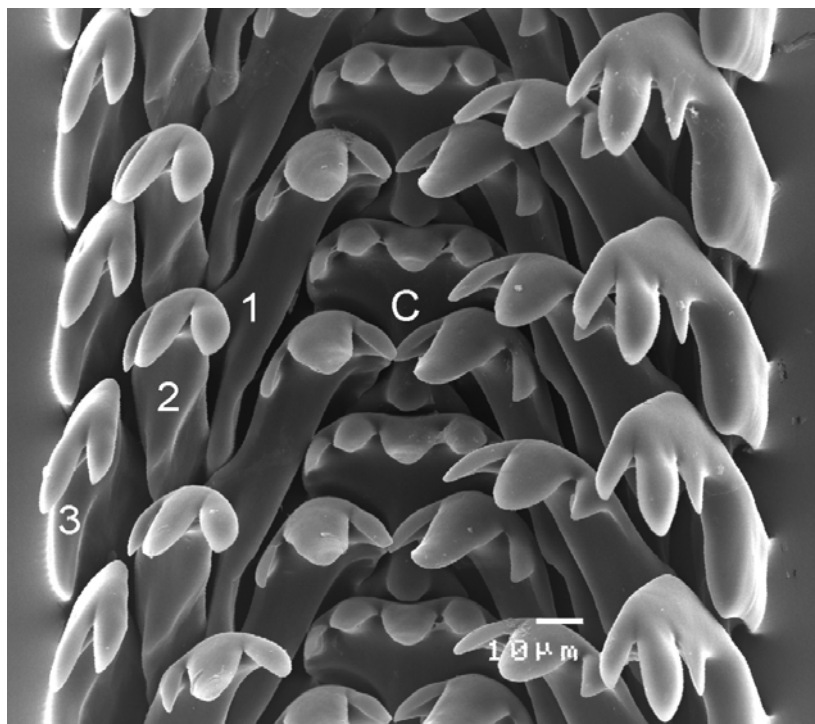
Remarks: This *Platyrhaphé phukeawensis* species differs from larger species from North Vietnam in having brown shell colour while *P. lowi* has green brown. Additional, mud shell exhibit distinct two keel. and. The similar of both species is their shell sculpture smooth and they have whitish aperture. But they have unique character in each. *P. grávida* distinct smaller than *P. rochebruni* and the latter species has reddish brown in shell colour. Head with black spot, orange tentacle.

Remark.— This new species *Platyrhaphe phukeawensis* can be distinguished from *P. lowi* from Gunung Genting, Ipoh, Malaysia in having brown shell colour while *P. lowi* has green brown. Additional, mud shell exhibit distinct two keel.

Diagnosis. — Shell small, dark brown, dextral, globose. Shell surface mostly tiny transverse rib, rarely rough on upper half of last whorl. Whorls 4-5, last whorl rapidly expanding about two thirds of the total length shell, flattened in front. Suture is weakly impressed. Aperture rounded, rarely with angular corner on the upper side, peristome continuous, thickened, white, margin duplicated, internal callus, with some prominent growth ridges, slightly reflexed. Umbilicus narrowly and deeply perforated. Mostly, shell cover with soil, expand like wing along whorl.



(fig. 1) *Platyrhaphe phukeawensis* sp. nov.



(fig. 2) Radula of *Platyrrhapha phukeawensis* sp. nov.

Acknowledgements

We are indebted to Ronald Janssen (Forchungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt) for kindly permitting SP and CS to study type specimens. Thanks also to Ms. Pongpun Prasankok for her kind assistance with fieldwork. We would also like to convey our gratitude Fred Naggs (The Natural History Museum, London) for his critical comment on the manuscript. This project was funded by The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education (grant No. MRG 5080405), the Mahasarakham University (grant year 2010), Additional funding was provided by TRF/BIOTEC.

References

- Benson, W.H. 1865. Characters of seventeen new of the Cyclostomacea from the British Provinces of Burmah, collected by W. Theobald, jun., Esq. **Ann. Mag. Nat. Hist. (ser. 2)** 17: 225-233.
- Gould, A.A. 1856. Descriptions of shells. **Proc. Boston. Soc. nat. Hist.** 6: 11-16.
- Gude, G.K. 1921. **Mollusca: -III (Land Operculates)**. In: The Fauna of British India including Ceylon and Burma. (A. K. Shipley and Marshall, eds), 45-90, Taylor and Francis, London.
- KOBELT, W. 1902. **Cyclophoridae**. Das Tierreich, Cyclophoridae. Pp. i-xxxix, 1-663. Friedländer and Son, Berlin.
- 1856, Haines 1858, Pfeiffer 1862, Crosse 1885, Fischer 1885, Morgan 1885, Mabille 1887, Kobelt 1902, Gude 1921, Habe 1964, Solem 1966, Pain 1974),
- Laidlaw, F.F. 1928. A list of the land and fresh water Mollusca of the Malay Peninsula with note. Malayan Branch Royal Asiatic Society (6): 31.
- Laidlaw, F.F. 1928. A list of the land and fresh water Mollusca of the Malay Peninsula with notes. Malayan Branch Royal Asiatic Society (6): 25-37.
- Lee, Y.C., Lue, K.Y., Wu, W.L. 2008. A molecular phylogenetic investigation of *Cyathopoma* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in East Asia. Zoological studies 47: 519-604.
- Moellendorff 1890. Ber. Senckenb. naturf. Ges., 1889-90, 267. volum 3 page 800.
- Solem, A. 1966. Some non marine mollusks from Thailand. **Spolia Zoologia Musei Hauniensis** 24: 10.
- Sykes. 1902. On a collection of land and fresh water shells from Kelantan, Malay Peninsula. Journal of Malacology 9: 23 pl. 3 fogs. 3, 4.

**A new genus of Trematode (Platyhelminthes: Digenea) from land
snail in limestone mountain**

Opisthorchis pollicarii n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) from operculate
land snail *Pollicaria mouhoti* (Prosobranchia: Pupinidae)

Bangon Kongim

*Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University,
Kantharawichai, Maha Sarakham 44150, Thailand e-mail:
b.kongim@msu.ac.th*

Abstract

The adult digenean, *Opisthorchis pollicarii* n. sp. found in the cavity between the heart, kidney and digestive gland of the land operculate snail *Pollicaria mouhoti*, is reported for the first time from adult pupinids snails captured in June-July 2008, in North and Northeast Thailand. The differentiation between the adult worm of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. and that of the closely related species, *Opisthorchis viverrini* and *Opisthorchis felineus*, is mainly based on the body shape, the shape and position of the testes and sucker, and the arrangement of the vitellaria. Morphology and ultrastructure are comparatively reviewed. Biological aspects of the land snails are also included. The host range of *Opisthorchis* is now known to include the operculate land snail family Pupinidae.

KEY WORDS. – Taxonomy, New species, Digenea, *Opisthorchis* n. sp., SEM, Land snail.

Introduction

The Digeneans or flukes are a large and successful group of parasites. There are about 6,000 species known to science. They all have complicated life cycles involving at least one intermediate host, which is normally an aquatic snail as well as the primary host which is normally a vertebrate. Digeneans as adults are flat worm shaped animals, they have two suckers. The first is the oral sucker, around the mouth; this has two functions, a) to hold the animal to its host and b) to assist in feeding. The second sucker is found a little way further down the animal's body and it has only a single function, that of attachment. Only about 12 of the 6,000 known species are infectious to mankind, but some of these species cause important diseases which infect 200 million infected worldwide. The most famous digeneans is *Opisthorchis viverrini*, a liver fluke belonging to the food-borne trematodes, is the causative agent of opisthorchiasis. At present, an estimated 67.3 million people are at risk and 9 million are infected with the highest prevalence found in Cambodia, Lao People's Democratic Republic, Thailand, and Vietnam. The most serious complication of opisthorchiasis is cholangiocarcinoma, the bile duct cancer (Haswell-Elkins and Levri 2003; Sripa 2003; Keiser and Utzinger 2007). The liver flukes of the genus *Opisthorchis* are classified into family Opisthorchiidae. The three species that are most commonly found in humans are members of the family Opisthorchiidae including *Clonorchis sinensis* (syn. *Opisthorchis sinensis*), *O. viverrini* and *O. felinus*. Six rarely reported species of this family are *O. guayaquilensis*, *O. noverca*, *Metorchis albidus*, *M. conjunctus*, *Pseudamphistomum aethiopicum* and *P. truncatum* (Kaewkes, 2003). Due to the high prevalence of *O. viverrini* infection and its related serious illness, cholangiocarcinoma, particularly in Thailand (Vatanasapt *et al.*, 1990; IARC, 1994), this revision will emphasize on *O. pollicarii* n. sp. and related information about *O. viverrini*, *C. sinensis* and *O. felinus* will also be included. This paper describes a new species of *Opisthorchis pollicarii* n. sp., from the operculate land snail *Pollicaria mouhoti* Pfeiffer, 1862 endemic species in Thailand. This is the first record of an adult liver fluke infection in land snails.

The aim of the present paper was to describe the morphological and biological characteristics of the *Opisthorchis pollicarii* n. sp. and to compare them with those of other species of *Opisthorchis*.

Materials and Methods

Opisthorchis pollicarii n. sp. adults were obtained from naturally infected operculate land snail from 12 localities covering 4 provinces in North and Northeast Thailand (Fig. 1). Adult operculate land snails (*Pollicaria mouhoti* Pfeiffer, 1862) were collected during the rainy season in June-July, 2009 by the random examination of 20 snails from each locality. The snails were killed by freezing before their shell were cracked so that these could be examine. The visceral mass of digestive system, reproductive system, muscular, heart, kidney was examined and photographed under a stereo light microscope using DIC optics on an Olympus AX 70 microscope. The permanent whole mount of the digeneans were prepared by washing extensively with 0.9% NaCl, fixed in Schaudinn's fixative, and stained with Acetic carmine. They were dehydrated in a series of ethyl alcohol series, cleared in xylene, and mounted in Canada balsam. Drawings were made under light microscope with the aid of a camera lucida and details were added freehand. Others were processed and observed with a scanning electron microscope (SEM). The identification used the key of Anderson (2000), Byksovskaya-Pavloskaya (1964), Fernando & Fertado (1963), Pearse (1933), Schell (1970) and Yamaguti (1933, 1958, 1959).

Type-specimens were deposited in the department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Thailand.

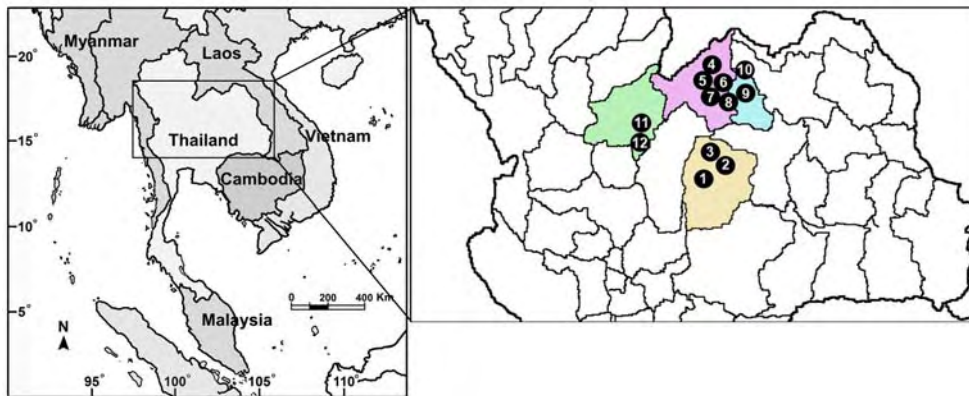


Figure 1. Map of Thailand showing the collection localities of *Pollicaria mouhoti* in this study. (1) Phu Kiew, Nongbuadang, Chiayaphum; (2) Tam Wuadang, Pakdeechumpol, Chiayaphum; (3) Phu Phachit, Chiayaphum; (4) Phu Phalom, Loei; (5) Tam Phasing, Loei; (6) Phu Noi, Loei; (7) Tam Pha Bing, Loei; (8) Phu Phasamyod, Loei; (9) Khao Wangpha, Nongbualamphu; (10) Tam Suwannakuha, Nongbualamphu; (11) Wat Pamamuang, Nernmaprang, Phitsanulok; and (12) Tam Wangdang, Nernmaprang, Phitsanulok.

Results

Prevalence and density of adult

The snails were collected from 12 localities in 4 provinces and 10%-20% of the snails studied were infected with the adults of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. In total, 138 adults flukes were recovered, an average of 10 per land snail. The adults were found in the cavity between the heart-kidney-digestive glands.

Morphology and biology

Taxonomy: These are described below as a new species of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. is described below.

Type-host: Operculate land snail, *Pollicaria mouhoti* (Pfeiffer, 1862)

Location: The cavity between heart-kidney-digestive glands

Locality: Phu Kaew, Chiayaphum, North Thailand

Adult (Figs. 2-8):

The adult worms of *O. pollicarii* n. sp. are monoecious, dorso-ventrally flattened, lancet-shaped, thin and transparent. Size of the worm is slightly smaller than *O. viverrini* from human. The average size of fresh worms is $3.2 (3.0-3.5) \times 1.2 (1.0-1.5)$ mm with a transparent body. The oral sucker is subterminal, while the ventral sucker is anterior at approximately two-fifth of the body length. Two testes are deeply lobed, diagonal, situated near the posterior extremity. The long-slightly coiled seminal vesicle terminates in the ejaculatory duct, which opens through the genital pore immediately in front of the ventral sucker. Cirrus sac and cirrus are absent. The multilobated ovary is in front of the anterior testis and nearby the seminal receptacle and Laurer's canal. The vitellaria consist of numerous follicles disposed as several columnous groups in the lateral fields between the ventral sucker and testes. Excretory bladder is long, sac-like tubed, S-shaped and runs between the two testes (figs. 2-3)

Based on the morphology, adult worms of *O. pollicarii* n. sp., *O. viverrini* and *O. felinus* differ mainly in shape and position of the testes, the arrangement of vitelline glands, and the size, shape and position of the sucker (Figs. 2-3). *O. pollicarii* n. sp. can be distinguished from *O. viverrini* and *O. felinus* by the presence

of small globules testes and the long cluster distributed vitelline glands. Moreover, the oral sucker is distinctly larger and oval shaped in subterminal position, the ventral sucker is obviously larger and nearly positioned in the central body. *O. pollicarii* n. sp. is similar to *O. viverrini* in having no transversely compressed pattern vitelline glands but it differs from *O. felineus* in the presence of no transversely compressed patterns of vitelline follicles (Sadun, 1955; Beaver *et al.*, 1984).

Scanning Electron microscopy revealed that the oral and ventral suckers are clearly seen. The oral sucker is larger and oval shaped in subterminal position, ventral sucker obviously larger and nearly positioned is the central body. Genital pore exits at 4/5 body length. Excretory pore deposits on the end of body (figs. 4, 8, 9). The tegument of body appears small spine and papilla. Papilla are more numerous on the dorsal than on the ventral surface (fig. 5). The surface of the oral sucker and ventral sucker consist of a group of papillae on the outer lip. The tegument of the inner lip appears distinct with two types of spine, type I is larger and the few on number than type II which is small and more numerous (figs. 6-7). The tegument of the body display a spine similar to *O. viverrini* (Scholz *et al.*, 1992; Apinhasmit *et al.*, 1993).

Type deposition: Holotype: Mahasarakham University, Faculty of Science, Department of Biology, Zoological Museum of Mahasarakham University, Thailand —ZMMSU 12345

Remarks: *Opisthorchis pollicarii* n. sp. is smaller than *O. viverrini* and *O. felineus*. The adult of this digenean found in the cavity between heart, kidney and digestive gland of the land operculate snail *Pollicaria mouhoti*, it is reported for the first time from adult pupinids snails.

Biological aspects of snail host

The operculate land snails *P. mouhoti* are naturally infected with *Opisthorchis pollicarii* n. sp. They are distributed in the North and Northeast Thailand. The land dwelling snail genus *Pollicaria* Gould, 1856 is endemic to threatened limestone outcrops of Southeast Asia (Kobelt 1902, Gude 1921, Solem 1966, Pain 1974, Abbott 1989), where species occur in highly localized populations. The snails of this genus are often called elephant pupinids or elephant snails because of their gigantic size relative to other members of the family Pupinidae. The form and color of the shell are

highly distinctive; the shell is large and inflated, it has an expanded aperture in the adult (Kongim *et al*, 2009; 2010).

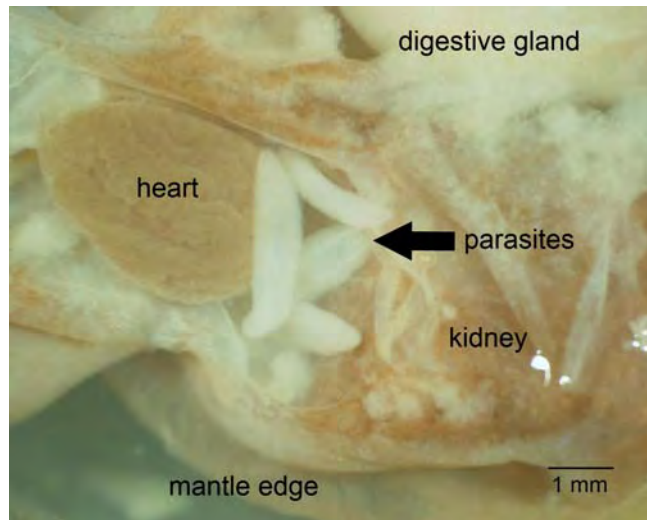


Figure 2. The adults of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. found in the cavity between the heart- kidney-digestive gland.



Figure 3. The fresh adults of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. transparency body. the oral sucker shows oval shape, the ventral sucker shows cup shape, 2 small globular testis.

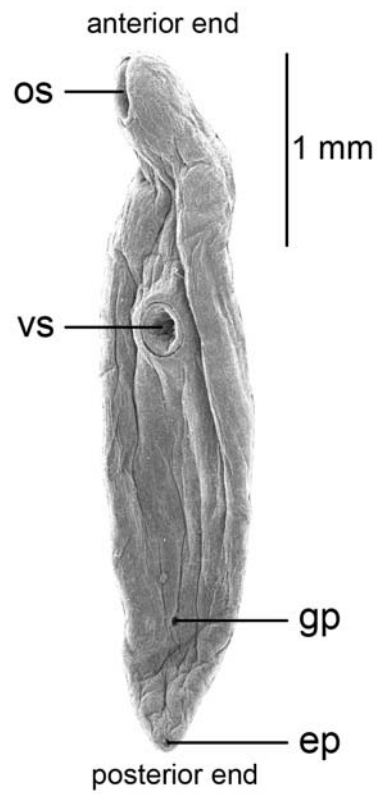


Figure 4. SEM observations of the adults of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. os = oral sucker; vs = ventral sucker; gp = genital pore; ep = excretory pore

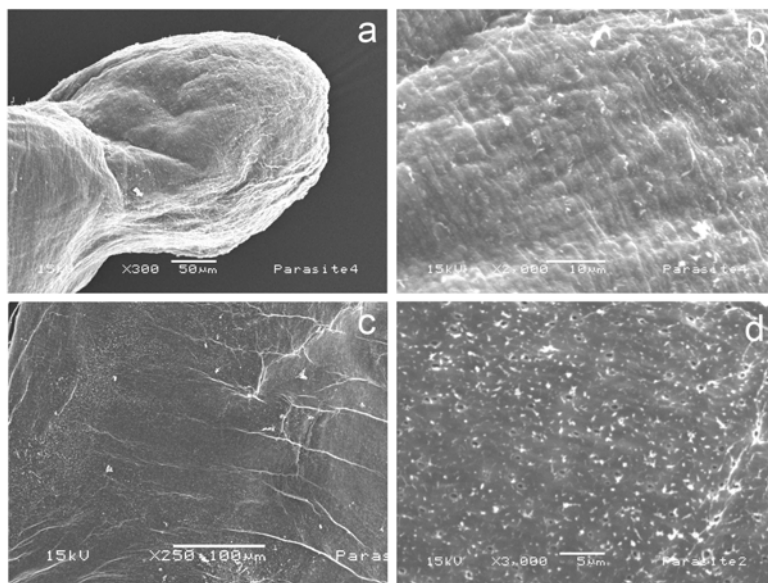


Figure 5. SEM observations of the dorsal surface of head part display spine (a, b); body part with spine (c, d).

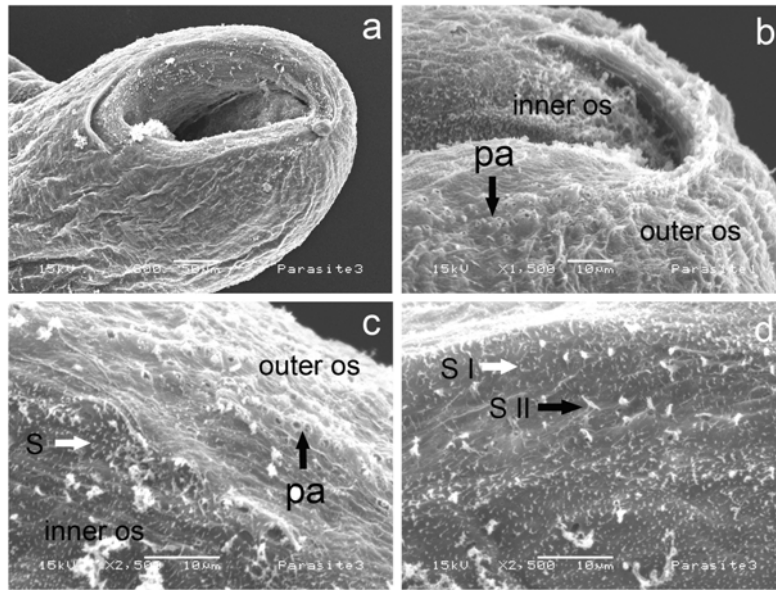


Figure 6. SEM observations of the oral sucker surface of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. Numerous papilla on outer surface of oral sucker (outer os) and spines on the inner surface (inner os) consist of 2 types; type I small, more numerous and type II large and few. pa = papilla; s = spine; S I = spine type I; S II = spine type II.

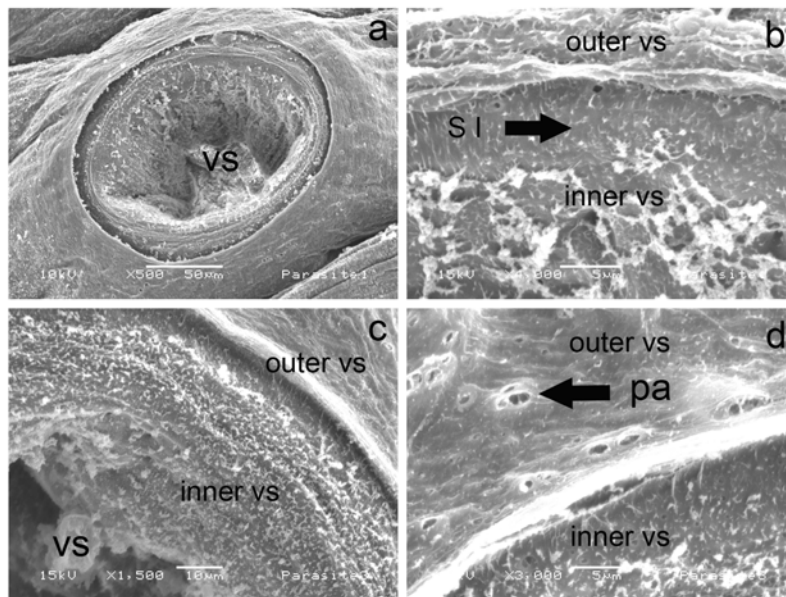


Figure 7. SEM observations of the ventral sucker surface of *Opisthorchis pollicarii* n. sp. Numerous papilla on outer surface of ventral sucker (outer vs) and the spines on the inner surface (inner vs) consist of 2 types; type I small, more numerous and type II large and few. pa = papilla; s = spine; S I = spine type I; S II = spine type II.

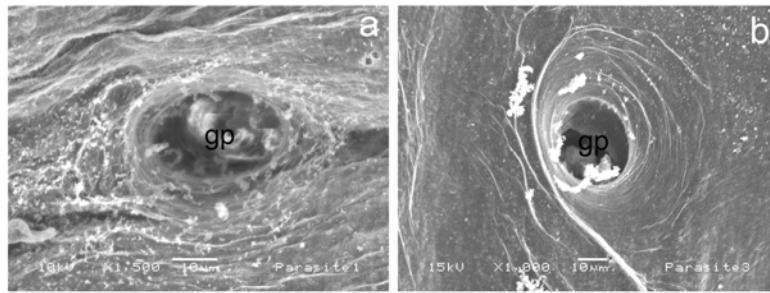


Figure 8. SEM observations of the genital pore (gp) of *Opisthorchis pollicarii* n. sp.

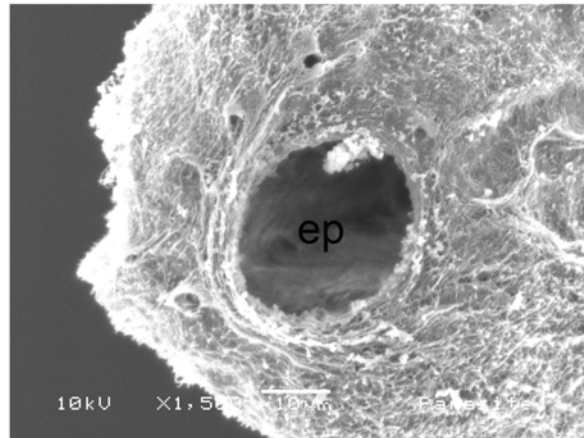


Figure 9. SEM observations of the excretory pore (ep) of *Opisthorchis pollicarii* n. sp.

Acknowledgements

We are indebted to Ronald Janssen (Forchungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt) for kindly permitting SP and CS to study type specimens. Thanks also to Ms. Pongpun Prasankok for her kind assistance with fieldwork. We would also like to convey our gratitude Fred Naggs (The Natural History Museum, London) for his critical comment on the manuscript. This project was funded by the Mahasarakham University (grant year 2008), the Thailand Research Fund and Commission on Higher Education (grant No. MRG 5080405).

References

- Abbott, R.T. 1989. Compendium of land shells. Melbourne, FL: American malacologists.
- Anderson, R.C. 2000. Nematode parasite of vertebrates: Their development and transmission 2nd ed. CABI Publishing, New York. USA. pp. 650.
- Apinhasmit, W., Sobhon, P., Saitongdee, P. and Upatham, E.S. 1993. *Opisthorchis viverrini*: changes of the tegumental surface in newly excysted juvenile, first-week and adult flukes. Int. J. Parasitol. 23: 829–839.
- Apinhasmit, W., Sobhon, P., Saitongdee, P., Menayotin, S. and Upatham, E.S. 1994. *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure of the tegument of the first-week juveniles and adult flukes. Int. J. Parasitol. 24: 613–621.
- Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp, E.W. 1984. Clinical Parasitology, Ninth ed. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 402–478.
- Byksovskaya-Pavloskaya, I. E. 1964. Key to parasite of freshwater fish of the U. S. S. R. Israel Program for Scientific Translation Ltd. Jerusalem, pp. 919.
- Fernando, C.H. and Fertado, J.I. 1963. A study of some helminth parasites freshwater fishes in Ceylon. Z. f. Parasitenkunde. 23: 141-163.
- Gude, G.K. 1921. Mollusca. -III (Land Operculates). In AE Shipley, AK Marshall, eds. The fauna of British India including Ceylon and Burma. London: Taylor and Francis, pp. 1-386.
- Haswell-Elkins, M. and Levri, E. 2003. Food-borne trematodes. In: Cook GC, Zumla AL (eds) Manson's tropical diseases, 21st edn. Saunders, London, pp. 1471–1486.
- Kaewkes, S. 2003. Taxonomy and biology of liver flukes. Acta Trop. 88: 177–186.
- Keiser, J. and Utzinger, J. 2007. Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. Trends Parasitol 23: 555–562.
- Kobelt, W. 1902. Cyclophoridae. Berlin: Das Tierreich, Friedländer and Son.
- Pain, T. 1974. The land operculate genus *Pollicaria* Gould (Gastropoda), a systematic revision. J. Conchol 28:173-178.
- Pearse, A.S. 1933. Parasites of Siamese fish and crustaceans. Journal Siam Society Natural History Supplement. 9(2): 179-188.

- Sadun, E.H. 1955. Studies on *Opisthorchis viverrini* in Thailand. Am. J. Hyg. 62: 81–115.
- Schell, C.H. 1970. How to know the trematode. W. M. C. Brown Company, Iowa. pp. 355.
- Scholz, T., Ditrich, O. and Giboda, M. 1992. Study on the surface morphology of the developmental stages of the liver fluke, *Opisthorchis viverrini* (Trematoda: Opisthorchiidae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 67: 82–90.
- Sripa, B. 2003. Pathobiology of opisthorchiasis: an update. Acta Trop 88: 209–220.
- Solem, A. 1966. Some non marine mollusks from Thailand. Spolia. Zool. Mus. Haun. 24: 9-13.
- Vatanasapt, V., Tangvoraphonkchai, V., Titapant, V., Pipitgool, V., Viriyapap, D. and Sriamporn, S. 1990. A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 21, 489–494.
- Yamaguti, S. 1933. Studies on the helminth fauna of Japan. Part. I. Trematodes of birds, reptiles and mammals. Japan Jour. Zoo. Trans. 5: 3-134.
- Yamaguti, S. 1958. Systema Helminthum. Vol. 1. The digenetic trematodes of vertebrates. New York, Interscience Press.
- Yamaguti, S. 1959. Systema Helminthum. Vol. 2. The cestoda of vertebrates. New York, Interscience Press.

ภาคผนวก ข

บทความวิจัยสำหรับเผยแพร่ (Manuscript)

การไต่พบกับการศึกษาวิวัฒนาการของชีวิต กรณีศึกษาในหอยทากบก

Karyotype studies on evolution of life: A case study in land snails

บังอร กองอิม¹ และ สมศักดิ์ ปัญญา²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต. ขามเรียง อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150 โทร 043-754245

E-mail: b.kongim@msu.ac.th

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 02-2185273 e-mail:

somsak.Pan@chula.ac.th

บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าชีวิตเมื่อแรกกำเนิดขึ้นบนโลกนั้นมีความไม่ซับซ้อน เกิดจากชิ้นส่วนของสารเคมีที่ต่อมาเรียกว่า “สารพันธุกรรม” จากชีวิตที่มีเซลล์เดี่ยวๆ และค่อยๆ พัฒนาซับซ้อนขึ้นจนมีหลายเซลล์ รูปร่างลักษณะแตกต่างกันออกไปตามกาลเวลาและสถานที่ (times and spaces) ที่เปลี่ยนไปเป็นพลวัต ปัจจุบันจึงมีสิ่งมีชีวิตรวม 5 อาณาจักรได้แก่โมเนรา โปรติสตา เห็ดรา พืช และสัตว์ โดยไม่รวมไวรัสซึ่งเป็นชีวิตที่มีโครงสร้างเหมือนตอนเมื่อชีวิตกำเนิดใหม่ๆ และเป็นสิ่งที่มิมีบทบาทต่อวิวัฒนาการ และการเปลี่ยนผ่านของสิ่งมีชีวิตบนโลกทุกยุคทุกสมัย

โครโมโซม (chromosome) เป็นโครงสร้างทางพันธุกรรม (heredity structure) ที่เป็นที่อยู่ของสารพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งบรรจุอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ยูคาริโอต โดยโครโมโซมทำหน้าที่เก็บรักษา (storage) ถ่ายทอด (transmission) และแสดงออก (expression) ของข้อมูลพันธุกรรม (genetic information) (วิสุทธิ ไบไม้, 2548; Clark and Wall, 1996; White, 1978) โดยโครโมโซมเป็นโครงสร้างที่เกิดจากดีเอ็นเอสายคู่ (polynucleotide) พันรอบโปรตีนฮิสโตน (histone) อย่างมีระเบียบแบบแผน โครโมโซมจึงเป็นโครงสร้างที่สำคัญที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีลักษณะต่างๆ ดังที่ปรากฏในปัจจุบัน โดยมีกลไกทางวิวัฒนาการผ่านกลไกการคัดเลือกทางธรรมชาติ (natural selection) เป็นเวลาอันยาวนาน อีกทั้งสิ่งมีชีวิตจะมีการปรับตัว (adaptation) เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมได้ โครโมโซมของยูคาริโอตอาจแตกต่างกันทั้ง ขนาด รูปร่าง ปริมาณดีเอ็นเอ โปรตีน และอาร์เอ็นเอ (RNA) ในเซลล์ปกติ จำนวนและรูปร่างของโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ จะคงที่เสมอและแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ดังนั้นจำนวนหรือโครงสร้างของโครโมโซมที่แตกต่างกัน นั้นหมายถึงปริมาณ และโครงสร้างของสารพันธุกรรมหรือยีน ได้แก่การจัดเรียงตัวของเบสบนสายดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกัน ย่อมมีผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันได้ในที่สุด และหากมีความแตกต่างมากจนสิ่งมีชีวิตไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ นั้นหมายถึงสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ในทางชีววิทยาได้เกิดขึ้นแล้ว การศึกษาการไต่พบ (karyotype) คือ การนำโครโมโซมระยะเมทาเฟสมาจัดเรียงเป็นคู่ตามลำดับจากคู่ใหญ่จนถึงคู่เล็ก จัดให้แขนข้างสั้น (short arm) ตั้งขึ้น และหากทราบระบบโครโมโซมเพศก็จะระบุลงในแผนภาพ เพื่อความสะดวกในการวิเคราะห์และการแสดงโครงสร้างของโครโมโซมในเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น

หอยทากบกเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอีกกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทต่อวิถีชีวิตของมนุษย์มาเป็นเวลานาน โดยมนุษย์นำเปลือกมาทำเครื่องประดับตกแต่ง บางชนิดเป็นศัตรูพืช เป็นพาหะตัวกลางของพยาธิ และบางชนิดมนุษย์นำมาประกอบอาหาร หอยทากบกมีความหลากหลายชนิดสูงตามแนวเทือกเขาหินปูน โดยมีบรรพบุรุษอาศัยอยู่ในน้ำ จากนั้นมีวิวัฒนาการขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกโดยมีลักษณะโครงสร้างของร่างกายที่เอื้อต่อการอาศัยอยู่บนบกได้ ทำให้สามารถดำรงเผ่าพันธุ์มาจนถึงปัจจุบันได้ เช่น การมีเปลือกที่แข็งแรงห่อหุ้มลำตัวที่อ่อนนุ่มเพื่อป้องกันอันตรายจากศัตรูและ

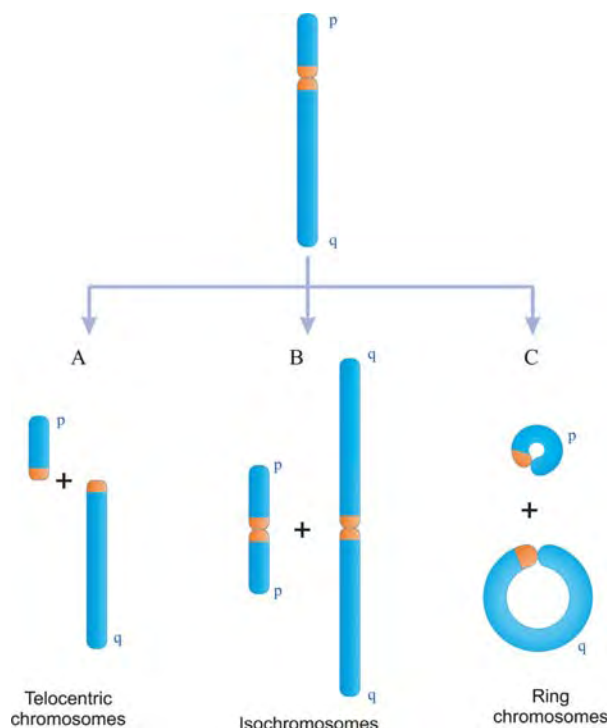
รักษาน้ำในร่างกาย การมีสองเพศในตัวเดียวกัน หรือที่เรียกว่าลักษณะกะเทย (hermaphrodite) ในหอยทากบกที่หายใจด้วยปอด (pulmonates) ไม่มีฝาปิดเปลือก บางที่เรียกกันว่าหอยทากบกแท้ (true terrestrial snails) แต่ยังคงมีการผสมพันธุ์แบบผสมข้ามเช่นเดียวกับไส้เดือนดิน (Panha and Burch, 2005) และมีการพัฒนาอวัยวะแลกเปลี่ยนก๊าซเป็นปอด (lung) แทนเหงือก (gill) (Sutcharit *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามยังมีหอยทากบกอีกกลุ่มหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตมีวิวัฒนาการ หอยทากบกกลุ่มที่วุ้นได้แก่หอยทากบกมีฝาปิดเปลือก (operculate land snails) แม้ว่าจะขึ้นมาอยู่บนบกได้อย่างสมบูรณ์แล้วก็ตาม แต่ยังคงลักษณะเหมือนบรรพบุรุษที่อาศัยอยู่ในน้ำ ทำให้เห็นร่องรอยของการเชื่อมโยงได้แก่การที่ยังคงอาศัยอยู่บนบกที่มีความชื้นมากๆ การมีฝาปิดเปลือก และมีอวัยวะแลกเปลี่ยนก๊าซแสดงถึงการเปลี่ยนผ่าน (transition) คือมีลักษณะของเหงือกหลงเหลืออยู่และบางส่วนที่กำลังเปลี่ยนเป็นปอด และลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งคือการมีเพศแยกเช่นเดียวกับหอยน้ำจืด เช่นหอยขม หอยโข่ง ลักษณะดังกล่าวทำให้พบหอยทากบกในถิ่นที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย และลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายดังกล่าวมาจากการกำหนดทางพันธุกรรม ร่วมกับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม หากพูดถึงโครโมโซมและคาริโอไทป์แล้ว หอยทากบกกลุ่มที่มีฝาปิดเปลือกมีลักษณะที่อนุรักษ์มาก กล่าวคือมีจำนวนคู่ของโครโมโซมเท่ากันในทุกสปีชีส์ทั้งวงศ์ ส่วนหอยทากบกแท้นั้นโครโมโซม และคาริโอไทป์มีความหลากหลายมาก ดังจะได้กล่าวต่อไป

สาเหตุของความหลากหลายของคาริโอไทป์

ความหลากหลายของคาริโอไทป์ที่ปรากฏมีสาเหตุเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซม ดังรายละเอียด

1. การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างไปจากจำนวนโครโมโซมชุดปกติอาจเปลี่ยนแปลงได้เองโดยธรรมชาติหรือถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยรังสี สารเคมี ไวรัส แบคทีเรีย เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบ่งเป็นสองชนิด ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงโครโมโซมทั้งชุดเรียกว่ายูพลอยดี (euploidy) และการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมบางแท่งเรียกว่าแอนยูพลอยดี (aneuploidy) รวมถึงการมีโครโมโซมชนิดพิเศษ เช่น บีโครโมโซม (B chromosome)

2. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมมีหลายรูปแบบ ได้แก่ การขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม (Deletion or Deficiency) การมีชิ้นหรือส่วนของโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา (Duplication) การเปลี่ยนลำดับทิศทางโครโมโซม (Inversion) การย้ายลำดับที่ของชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (Translocation) รวมถึงการแตกหักของโครโมโซม (chromosome break) หรือการมีคาริโอไทป์ที่ประกอบด้วยโครโมโซมที่มีแขนข้างเดียว เรียก asymmetric karyotype ได้แก่ การเกิดโครโมโซมอะโครเซนทริก (acrocentric) ทีโลเซนทริก (telocentric) หรือโครโมโซมขนาดเล็ก (microchromosome) เกิดจากการแตกหักของโครโมโซม เช่น การแตกหักของโครโมโซมบริเวณเซนโทรเมียร์ (centromeric fission) (ภาพที่ 1) และส่งผลให้คาริโอไทป์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น (วิสุทธิ ไบไม้, 2548; White, 1978; Clark and Wall, 1996) โดยส่วนใหญ่สิ่งมีชีวิตชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก (metacentric) มากถือว่ามีลำดับวิวัฒนาการต่ำกว่าชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกน้อย และสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนโครโมโซมมากมักมีวิวัฒนาการสูงกว่าชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมน้อย (Diupotex-Chong *et al.*, 2004; Kolnicki, 2000; Perry *et al.*, 2004; Schubert, 2007)



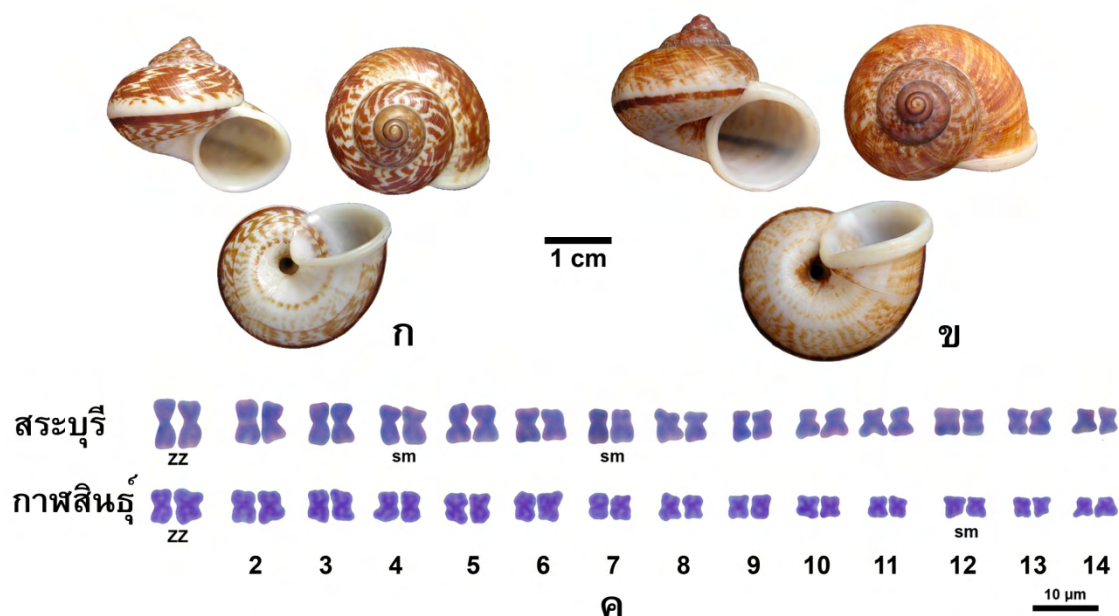
ภาพที่ 1 การแตกหักของโครโมโซมบริเวณเซนโทรเมียร์ (centromeric fission) ทำให้เกิดโครโมโซมที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิมแบ่งได้เป็นสามชนิด ได้แก่ ทีโลเซนทริก (telocentric chromosomes) ไอโซโครโมโซม (isochromosomes) และโครโมโซมรูปวงแหวน (ring chromosomes) (Perry *et al.*, 2004)

การศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ในหอยทากบก

การศึกษากลไกทางวิวัฒนาการในสัตว์กลุ่มหอยสามารถทำได้และเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง เนื่องจากหอยมีโครงสร้างแข็งที่ถูกเก็บรักษาไว้ตั้งแต่กำเนิดเมื่อหลายร้อยล้านปี และยังคงลักษณะเหล่านั้นไว้ดังปรากฏให้เห็นในปัจจุบัน การติดตามกลไกทางวิวัฒนาการสามารถพิจารณาได้จากหลักฐานหลายประการรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของคาริโอไทป์ โดยที่บรรพบุรุษเริ่มแรกโครโมโซมอาจมีเพียงรูปแบบเดียวหรือแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เมื่อวิวัฒนาการมาจนปัจจุบันพบว่า สัตว์กลุ่มหอยมีรูปแบบแตกต่างกันเพิ่มมากขึ้นอันเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ในหอยทากบกแทมีจำนวนโครโมโซมที่หลากหลายแม้สมาชิกในวงศ์เดียวกัน ส่วนในหอยทากบกที่มีฝาปิดเปลือกจะมีลักษณะที่อนุรักษ์มาก กล่าวคือสมาชิกของหอยทากบกมีฝาปิดเปลือกในวงศ์เดียวกันมีจำนวนคู่ของโครโมโซมเท่ากันในทุกสปีชีส์ สอดคล้องกับการที่หอยทากบกมีฝาปิดเปลือกมีลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์คล้ายกันภายในสกุลเดียวกัน จึงไม่นิยมนำลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์มาเป็นลักษณะในการจัดจำแนกชนิด เช่น หอยทากจิ๋วสกุล *Diplommatina* spp. มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ $n = 13$ และประกอบด้วยโครโมโซมที่มีทั้งแขนสั้นและแขนยาวชนิด metacentric และ submetacentric เท่านั้น (Burch, 1967; Ogaito and Ieyama, 1997; Ieyama and Ogaito, 1998, 2000) เช่นเดียวกับหอยหุ้ขังสกุล *Pollicaria* ทั้งหมดหกสปีชีส์และมีการขยายในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีจำนวนโครโมโซม $n = 13$ (Kongim *et al.*, 2009, 2010) หอยทากวงศ์ Cyclophoridae จำนวนอย่างน้อย 4 สกุล ได้แก่ *Cyclophorus*, *Pterocyclus*, *Theobaldius* และ *Micraulax* ล้วนมีจำนวนโครโมโซม $n = 14$ ส่วนหอยทากบกแทซึ่งไม่มีฝาปิดเปลือกมีจำนวนโครโมโซมจำนวนมาก และมีรายงานพบ asymmetric karyotype สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของระบบสืบพันธุ์ที่มีความแตกต่างในระดับสปีชีส์จึงเป็น

ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งที่น่ามาใช้ในการจัดจำแนกชนิดในหอยทากบกแท้ ส่วนหอยทากบกมีฝาปิดเปลือกที่อาศัยอยู่ในน้ำพบมีรายงานการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมทั้งจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซม โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบแอนยูพลอยดีพบรายงานมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจากถิ่นอาศัยที่อยู่บนบกมีแรงผลักดันให้เกิดวิวัฒนาการไม่ว่าจะเป็นพยาธิ สารเคมี หรือแบคทีเรียในน้ำจะมีมากกว่าบนบก เช่น การพบยูพลอยดีในหอยขมสกุล *Viviparus* หรือพบโพลีพลอยดี (polyploidy) ในหอยน้ำจืด *Pisidium casertanum* นับจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นได้มากถึง 180 แท่ง (Baršienė et al., 1996; Baršienė et al., 2000)

การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของหอยทากบกของไทย Kongim และคณะ (2006) ได้ศึกษาคาร์ิโอไทป์ของหอยหอมในสกุล *Cyclophorus* Montfort, 1810 ในวงศ์หอยมีฝาปิดเปลือก Cyclophoridae จำนวน 8 ชนิด โดยคาร์ิโอไทป์ของหอยหอมประกอบด้วยโครโมโซมที่มีรูปร่างแตกต่างกัน ได้แก่โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก (m) และซับเมทาเซนทริก (sm) จำนวนแตกต่างกันในหอยแต่ละสปีชีส์ และมีเพียงสองสปีชีส์ที่มีจำนวนโครโมโซมเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริกเท่ากัน ได้แก่ หอยหอมปากเปลือกส้ม *Cyclophorus aurantiacus* ที่พบทางภาคตะวันตกของประเทศไทย เช่น จังหวัดกาญจนบุรี และหอยหอมปากเปลือกขาว *C. malayanus* ที่พบทางภาคใต้ของประเทศไทย ทั้งสองชนิดคาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก จำนวน 7 คู่ และซับเมทาเซนทริก จำนวน 7 คู่ เท่ากัน แต่เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโครโมโซมพบว่าหอยหอมปากเปลือกส้ม *C. aurantiacus* โครโมโซมแสดงลักษณะแซทเทลไลท์ (satellites) บนโครโมโซมคู่ที่ 8 และมีรอยคอดที่สอง หรือที่เรียก “secondary constriction” บนโครโมโซมคู่ที่ 9 แตกต่างจากหอยหอมปากเปลือกขาว *C. malayanus* ซึ่งไม่ปรากฏลักษณะดังกล่าว ยิ่งไปกว่านั้นคาร์ิโอไทป์ยังสามารถใช้ประกอบการวิเคราะห์สปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) ของหอยหอมชนิด *C. fulguratus* ซึ่งมีขนาดและรูปร่างเปลือกคล้ายกัน อีกทั้งลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของระบบสืบพันธุ์ และลักษณะแฟงฟันที่คล้ายกันมาก ไม่สามารถนำมาใช้ระบุสปีชีส์ได้ การวิเคราะห์คาร์ิโอไทป์ทำให้พบรูปแบบคาร์ิโอไทป์ที่แตกต่างกันโดย *C. fulguratus* จากภาคกลางของประเทศไทยพบคาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซม 12m และ 2sm ส่วนหอยหอมจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือคาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซม 13m และ 1sm (ดังภาพที่ 2) และจากการศึกษาของ Prasankok และคณะ (2008) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์อัลโลไซม์ พบความแตกต่างของอัลลีลระหว่างประชากรของหอยหอม *C. fulguratus* ได้อย่างชัดเจน ผลการศึกษาดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้หลายแนวทาง ประเด็นพื้นฐานที่สุดคือการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้เปลือกและสัณฐานวิทยาอื่นๆ มีความผิดพลาด หากเป็นเช่นนั้นจริงจะต้องมีการตรวจสอบว่าหอยที่ใดมีความเหมือนกับตัวอย่างต้นแบบ (type specimens) และตัวที่แตกต่างจะกลายเป็นชนิดที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน หรือเรียกว่าชนิดใหม่ (new species) ที่ต้องถูกบันทึกและตั้งชื่อ เนื่องจากการจำแนกในอดีตของหอยหอมเน้นใช้ลักษณะของเปลือกเป็นหลัก ดังนั้นผลการวิเคราะห์โครโมโซม และอัลโลไซม์ที่กล่าวถึงจะทำให้สามารถจัดการกับตัวอย่างต้นแบบ และการจัดจำแนกใหม่ (classification rearrangement) ให้ถูกต้อง เป็นไปตามธรรมชาติที่เชื่อถือได้ต่อไป



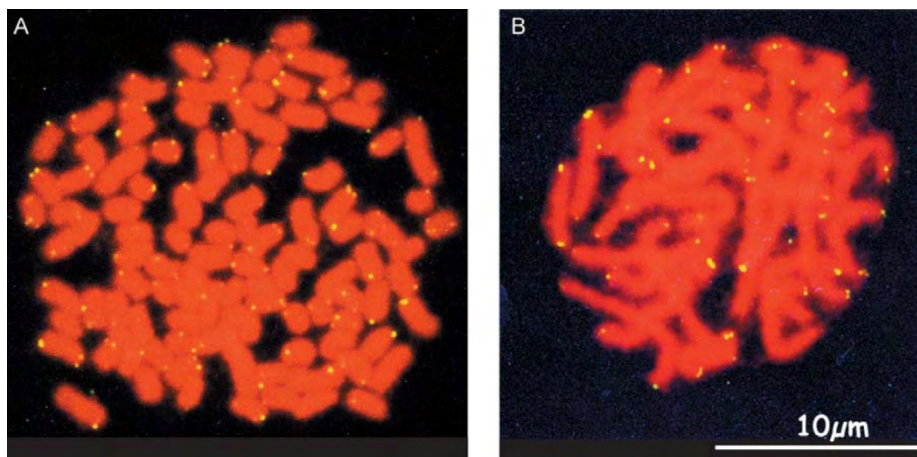
ภาพที่ 2 เปลือกและคาริโอไทป์ของหอยหอม *Cyclophorus fulguratus* จาก (ก) ภาคกลาง และ (ข) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (sm คือ โครโมโซมชนิด ซับเมทาเซนทริก และที่ไม่ระบุ คือ โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก จะเห็นว่าเมื่อกลับมาดูเปลือกอีกครั้งจะเห็นความแตกต่าง แม้จะมีลักษณะที่อนุรักษณ์ค่อนข้างมากก็ตาม (Kongim *et al.*, 2006)

การศึกษารายละเอียดของโครโมโซมให้ชัดเจนยิ่งขึ้นสามารถใช้เทคนิคการย้อมแถบสีบนโครโมโซม (Chromosome banding) เช่น G-band, C-band, R-band, Q-band (H-band), NOR band, T-band และ Feulgen band ในหอยทากบกมีรายงานการย้อมแถบสีโครโมโซมน้อยมากทั้งนี้เนื่องมาจากโครโมโซมของหอยทากบกมีขนาดเล็กมากยากต่อการวิเคราะห์แถบสีบนโครโมโซม พบมีรายงานการย้อม C-band และ NORs band ในหอยทากบกแท้ใน *Lehmannia melitensis* และ *Helicella virgigata* โดยการย้อม C-band เป็นการย้อมแถบโครโมโซมบริเวณที่มี Constitutive heterochromatin ซึ่งเป็นส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำๆ กัน และส่วนใหญ่พบที่ตำแหน่งเซนโทรเมียร์และทีโลเมียร์บนโครโมโซม ส่วน NORs band หรือ silver (NOR) staining เป็นการย้อมบริเวณที่มี nucleolar organizer จะเกิดแถบสีเนื่องจากเป็นบริเวณที่มี ribosomal gene (rDNA) มักพบบริเวณใกล้ satellite บนโครโมโซม (Ieyama and Tada, 1991; Vitturi & Sparacio, 1993)

ปัจจุบันเทคนิคทางพันธุศาสตร์ของเซลล์พัฒนาขึ้นมากมีการศึกษาดำเนินงานจำเพาะบนโครโมโซม ด้วยวิธี *in situ* hybridization เช่น เทคนิค FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) หรือ GISH (Genomic *in situ* hybridization) และ chromosome painting โดยใช้หลักการติดฉลากดีเอ็นเอที่ต้องการหาตำแหน่ง หรือ ดีเอ็นเอบนโครโมโซมในจีโนมที่ต้องการหา เรียกว่า ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ด้วยสารเรืองแสงซึ่งสามารถติดฉลากดีเอ็นเอติดตามโดยใช้สีย้อมที่แตกต่างกันได้ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้วเข้าไปจับกับโครโมโซมเป้าหมาย (hybridization) และนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่เชื่อมต่อกับระบบคอมพิวเตอร์ สามารถตรวจหาสัญญาณเรืองแสงบนโครโมโซมได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค chromosome microdissection ในการตัดโครโมโซมบางส่วนที่ต้องการ และนำชิ้นส่วนนี้ไปทำดีเอ็นเอติดตามที่ทราบตำแหน่งอย่างแม่นยำ สำหรับสัตว์กลุ่มหอยมีการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์โดยใช้เทคนิค FISH ในหอยเป่าหรือหอยร่อยรู ที่ถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญได้แก่ หอยเป่าฮือสีน้ำเงิน *Haliotis fulgens* และหอยเป่าฮือสีเหลือง *H. corrugata* โดยการย้อม DAPI staining และ

fluorescence *in situ* hybridization โดยใช้ 18S-5.8S-28S rDNA, telomeric (TTAGGG)_n and (GATA)_n เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่า หอยเป่าอื้อทั้งสองชนิด มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ $2n = 36$ แต่มีสูตรคาริโอไทป์ต่างกัน โดยหอยเป่าอื้อสีน้ำเงินมีสูตรคาริโอไทป์เป็น $8M + 8SM + 2ST$ ขณะที่หอยเป่าอื้อสีเหลืองมีสูตรคาริโอไทป์เป็น $10M + 7SM + 1ST$ นอกจากนี้ยังพบ 18S-5.8S-28S rDNA บนปลายแขนโครโมโซมชนิดซับริโทเซนทริก จำนวน 2 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 4 กับ 11 และ 2 กับ 4 และพบ microsatellites (TTAGGG)_n ปรากฏที่ปลายแขนโครโมโซมทุกแท่งในหอยทั้งสองสปีชีส์ ส่วน (GATA)_n พบในบางโครโมโซม และจากการประเมินทำให้ทราบจีโนมของหอยเป่าอื้ออันเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ต่อไปในอนาคต (Gallardo-Escárate, 2005)

ในหอยทากบกเริ่มมีรายงานการศึกษาดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ (Repetitive DNA) โดยใช้เทคนิค FISH ในหอยทากไร่เปลือก *Milax nigricans* โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามจำนวนสองชนิด ได้แก่ 18S-28S rDNA และ (TTACGGG)_n พบตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์โปรตีนเป็นจุดเล็กๆ บนโครโมโซม 1 คู่ ส่วนผลจากการย้อม silver staining เพื่อตรวจสอบหา NORs ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าสามารถแสดงตำแหน่ง NORs บนโครโมโซมระยะ Metaphase-I ซึ่งมีรูปร่างเป็นไบวาเลนซ์ ขณะที่ไม่พบตำแหน่ง NORs บนโครโมโซมระยะ Metaphase (Vitturi *et al.*, 2004) และการศึกษาพันธุศาสตร์ของเซลล์ในหอยทากบก *Cantareus aspersus* และ *C. mazzullii* (Gastropoda: Pulmonata) เคยถูกจัดให้อยู่คนละสกุล คือ *Helix aspersa* และ *Cantareus mazzullii* และต่อมา Giusti และคณะได้จัดให้หอยทั้งสองชนิดอยู่ในสกุลเดียวกันเป็น *Cantareus* จากการย้อมโครโมโซมด้วยสีจิมซา พบว่าหอยทั้งสองชนิดมีสูตรคาริโอไทป์เหมือนกัน ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก, ซับริโทเซนทริก และซับริโทเซนทริก ส่วนผลการย้อม CMA₃ และ DAPI ไม่สามารถระบุตำแหน่งของลำดับกรดนิวคลีอิกจำเพาะบนโครโมโซมได้ ขณะที่ผลการย้อมแถบสีโครโมโซมด้วย silver stain และ FISH พบ NORs จำนวน 10 ตำแหน่งบนโครโมโซม และผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามสามชนิด ได้แก่ 18S rDNA, (GATA)_n และ (TTAGGG)_n พบตำแหน่งที่มีดีเอ็นเอติดตาม 18S rDNA กระจายทั่วไป และตำแหน่งที่มี (GATA)_n พบเป็นเพียงจุดเล็กๆ กระจายทั่วไปบนโครโมโซม ส่วน (TTAGGG)_n ที่ตำแหน่งทีโลเมียร์บริเวณปลายแขนของโครโมโซมทุกแท่งในหอยทากบกทั้งสองชนิด ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอมีค่าปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content; C value) แตกต่างกัน (3.58 pg และ 3.08 pg ตามลำดับ) นอกจากนี้ในจีโนมของหอยทั้งสองชนิดมีลำดับเบสค่อนข้างแตกต่างกัน และค่าความแตกต่างของ GS และร้อยละ AT ระหว่างหอยทั้งสองชนิดมีแนวโน้มสูงขึ้นเช่นเดียวกับค่าร้อยละ GC (Vitturi *et al.*, 2005) ปัจจุบันมีการบูรณาการความรู้ศาสตร์ต่างๆ เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ทางชีววิทยาซึ่งท้ายที่สุดจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์แก่นมนุษย์ต่อไปได้



ภาพที่ 3 โครโมโซมระยะเมตาเฟสของหอยทากบก *Cantareus aspersus* (A) และ *C. mazzullii* (B) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม (TTAGGG)_n และแสดงตำแหน่งที่มีดีเอ็นเอจำเพาะคือจุดสีเหลืองเล็กเรียงแถบบนตำแหน่งที่โลเมียร์บริเวณปลายแขนของโครโมโซมทุกแท่ง (Vitturi *et al.*, 2005)

สรุป

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไฟลัมมอลลัสกา เป็นสัตว์ที่มีจำนวนสมาชิกการรองจากแมลง มีถิ่นอาศัยที่หลากหลาย ทั้งในน้ำจืด ทะเล และบนบก หลายชนิดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ การศึกษาโครโมโซมของมอลลัสกามีมานานส่วนใหญ่เป็นเพียงรายงานจำนวนโครโมโซม เนื่องจากมีข้อจำกัดคือโครโมโซมมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับโครโมโซมของแมลง ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาโครงสร้างโครโมโซมของมอลลัสกาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยศึกษาร่วมกับข้อมูลด้านอื่น เช่น สัณฐานวิทยา นิเวศวิทยา และอื่นๆ เพื่อให้สามารถติดตามกลไกทางวิวัฒนาการได้ เช่น เมื่อพิจารณาจากยีนศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ของหอยทากบกมีฝาปิดเปลือกในสกุลเดียวกันจะมีรูปแบบของระบบสืบพันธุ์คล้ายกัน สอดคล้องกับการมีลักษณะอนุรักษณ์กล่าวคือมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันในทุกสปีชีส์ทั้งวงศ์ อีกทั้งยังไม่พบความผันแปรของจำนวนชุดโครโมโซม เช่น triploid, tetraploid และ polyploid ในขณะที่ปรากฏการณ์การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมมักพบในหอยทากบกที่หายากด้วยปอดและไม่มีฝาปิดเปลือก และพบมากในหอยที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น หอยฝาเดียว *Gyraulus huronensis*, *Melanoides tuberculata* และ *Ancylus fluviatilis* เช่นเดียวกับในหอยสองฝา เช่น *Monodonta vermicularis* ทั้งนี้หลักมาจากการมีหนอนพยาธิและผู้ล่าเป็นตัวกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม

เทคนิคการศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตเป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ไม่สิ้นเปลืองเมื่อเทียบกับการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์วิธีอื่นๆ อีกทั้งสามารถให้ข้อมูลสนับสนุนการติดตามกระบวนการวิวัฒนาการว่าความหลากหลายของสารพันธุกรรม (genetics diversity) ของสิ่งมีชีวิตได้เกิดขึ้นแล้วหรือยัง ซึ่งไม่สามารถบอกได้จากลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิต หอยเป็นสัตว์ที่มีความผันแปรของลักษณะเปลือก กล่าวคือหอยที่อาศัยอยู่ในที่เดียวกันมักมีลวดลายของเปลือกที่หลากหลาย แต่เมื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมพบว่ายังเป็นสปีชีส์เดียวกัน ดังนั้นเป็นการยากที่จะระบุสถานะของหอยทั้งที่อยู่ในประชากรเดียวกัน และระหว่างประชากรจากลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะภายนอกของเปลือกที่แตกต่างกัน ลักษณะของชุดฟันหอยหรือแรดูลา (radula) และลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ และไม่สามารถบอกได้ว่าลักษณะภายนอกดังกล่าวต้องแตกต่างกันมากแค่ไหนถึงจะพบ

ความแตกต่างของสารพันธุกรรม ซึ่งจากการศึกษาการโอโทปีในหอยหลายกลุ่มสามารถระบุจีส์โซนเร้น และ ข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาความหลายของโปรตีนด้วยเทคนิคการวิเคราะห์อัลโลไซม์

การศึกษาโครโมโซมและการโอโทปีของสิ่งมีชีวิต นอกจากจะได้ข้อมูลจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิต เพิ่มขึ้นแล้วยังทำให้งานทางพันธุศาสตร์ของเซลล์พัฒนาขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานอนุกรมวิธาน และอธิบายความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตร่วมกับหลักฐานอื่นๆ ได้ ที่สำคัญการโอโทปีสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบหรือสนับสนุนยืนยันการจัดจำแนกชนิดให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น กล่าวคือการศึกษาโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตนอกจากเป็นความรู้พื้นฐานทางวิชาการแล้วยังมีการนำความรู้เกี่ยวกับโครโมโซมไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การปรับปรุงพันธุ์โดยชักนำให้หอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม เช่น หอยเป๋าฮื้อ (*abalone*) *Haliotis discus hannai* โดยชักนำให้เกิด tetraploid (4n) เพื่อให้หอยมีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิต (Zhang *et al.*, 2000) การติดตามผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซมร่วมกับการศึกษาทางเซลล์วิทยา (Cytology) ซึ่งปัจจุบันองค์กรต่างๆ ทั่วโลกต่างตระหนักและให้ความสำคัญในการป้องกันและรักษาสีงแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการดำรงชีพร่วมกันของสิ่งมีชีวิตรวมถึงมนุษย์อย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

- วิสุทธิ ไบไม้. 2538. พันธุศาสตร์ ฉบับปรับปรุงใหม่ 3. ซีเอ็นซีพพลายพริ้นตัง, กรุงเทพฯ
- Baršienė, J., Tapia, G. and Barsyte, D. 1996. Chromosomes of mollusks inhabiting some mountain springs of eastern Spain. **Journal of Molluscan Studies** 62: 539-543.
- Baršienė J, G Ribi, D Barsyte. 2000. Comparative karyological analysis of five species of *Viviparus* (Gastropoda: Prosobranchia). **Journal of Molluscan Studies** 62: 259-271.
- Burch, J.B. 1967. Cytological relationship of Pacific gastropods. **Venus** 25: 118-135.
- Clark, M.S. and Wall, W.J. 1996. **Chromosome: The complex code**. Alden Press, Oxford.
- Diupotex-Chong, M.L., Cazzaniga, N., Hernández-Santoyo, A. and Betancourt-Rule, J.M. 2004. Karyotype description of *Pomacea patula catemacensis* (Caenogastropoda, Ampullariidae), with an assessment of the taxonomic status of *Pomacea patula*. **Biocell** 28: 279-285.
- Gallardo-escárate, C., Álvarez-Borrego, J., Río-Portilla, M., Brand-Skopnik, E., Cross, I., Merlo, A., and Rebordinos, L. 2005. Karyotype analysis and chromosomal localization by fish of ribosomal DNA, telomeric (TTAGGG)_n and (GATA)_n repeats in *Haliotis fulgens* and *H. corrugata* (Archeogastropoda: Haliotidae). **Journal of Shellfish Research** 24(4):1153-1159.
- Ieyama, H. and Tada, A. 1991. Chromosomal studies and the quantitative evaluation of nuclear images stained with Feulgen dye of the Diplommatinidae. **Venus** 50: 68-78.
- Ieyama, H. and Ogaito, H. 1998. Chromosomes and nuclear DNA contents of two species in the Diplommatinidae. **Venus** 57: 133-136.
- Ieyama, H. and Ogaito, H. 2000. Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in the Diplommatinidae. **Venus** 59: 217-224.
- Kolnicki, R.L. 2000. Kinetochore reproduction in animal evolution: cell biological explanation of karyotypic fission

- theory. **Proceeding of the Academy of Natural Science of USA** 97: 9493–9497.
- Kongim, B., Panha, S. and Naggs, F. 2006. Karyotype of land operculate snails of the genus *Cyclophorus* (Prosobranchia: Cyclophoridae) in Thailand. **Invertebrate Reproduction and Development** 49: 1-8.
- Kongim, B., Sutcharit, C., Tongkerd, P., Tan, S.H.A., Quynh, N.X., Naggs, F. and Panha, S. 2010. Karyotype variation in the genus *Pollicaria* (Caenogastropoda: Pupinidae). **Zoological Studies** 49: 125-131.
- Ogaito, H. and Ieyama, H. 1997. *Diplommatina (Sinica) hidaensis* n. sp. (Diplommatinidae) from mountains districts of Gifu and Nagano Prefectures, Central Japan. **Venus** 56: 197–203.
- Panha, S. and Burch, J.B. 2005. An introduction to the microsnails of Thailand. **Malacological Review** 37/38: 1-155.
- Perry, J, Slater, H.R. and Andy Choo, K.H. 2004. Centric fission: simple and complex mechanisms. **Chromosome Research** 12: 627–640.
- Prasankok, P., Sutcharit, C., Tongkerd, P. and Panha, S. 2008. Biochemical assessment of the taxonomic diversity of the operculate land snail, *Cyclophorus fulguratus* (Gastropoda: Cyclophoridae), from Thailand. **Biochemical Systematics and Ecology** 36: 900-906.
- Schubert, I. 2007. Chromosome evolution. **Current Opinion in Plant Biology** 10: 109-115.
- Solem, A. 1966. Some non marine mollusks from Thailand. **Spolia Zoologia Musei Hauniensis** 24: 9-13.
- Sutcharit, C., Asami, T. and Panha, S. 2006. Evolution of whole-body enantiomorphy in the tree snail genus *Amphidromus*. **European Society for Evaluation Biology** 20: 661-672.
- Thiriout-Quévieux, C. 2003. Advance chromosome studies of gastropod mollusks. **Journal of Molluscan Studies** 69: 187-201.
- Vitturi, R. and Sparacio, I. 1993. Spermatocyte chromosome analysis of the slug *Lehmannia melitensis* (Lessona and Pollonera, 1891) (Mollusca, Pulmonata) using conventional, NOR- and C-banding techniques. **Caryologia** 46: 189-199.
- Vitturi, R., Sineo, L., Volpe, N., Lannino, A. and Colomba, M. 2004. Repetitive DNAs in the slug *Milax nigricans*: association of ribosomal (18S-28S and 5S rDNA) and (TTAGGG)_n telomeric sequences) in the slug *M. nigricans* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata). **Micron** 35: 255-260.
- Vitturi, R., Libertini, A., Sineo, L., Sparacio, I., Lannino, A., Gregorini, A. and Colomba, M. 2005. Cytogenetics of the land snails *Cantareus asperses* and *C. mazzullii* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata). **Micron** 36: 351-357.
- White, M.D.J. 1978. Chain processes in chromosomal speciation. **Systematic Zoology** 27: 17-26.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Zhao, S. and Guo, X. 2000. Tetraploid induction in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino with 6-DMAP and CB. **Journal of Shellfish Research** 19: 540-541.