



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : โครโมโซมแถบสีซีและแถบสีจีของหอยวงศ์หอยนกขมิ้น
ของประเทศไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ และ
อินโดนีเซีย

โดย : รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญา

ธันวาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : โครโมโซมแถบสีซีและแถบสีจีของหอยวงศ์หอยนกกม้น
ของประเทศไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ และ
อินโดนีเซีย

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา

สังกัด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA/01/2540
 ชื่อโครงการ : โครโมโซมแถบสีซีและแถบสีจีของหอยวงศ์หอยนกขม้นของประเทศ
 ไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ และอินโดนีเซีย
 ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญา
 E-mail Address : somsakp@sc.chula.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

การศึกษาค้างนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะจัดจำแนกหอยนกขม้นสกุล *Amphidromus* ซึ่งเป็นกลุ่มจำเพาะ และใกล้สูญพันธุ์ของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยใช้ฐานานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ แรดูลา การวิเคราะห์โครโมโซม และการวิเคราะห์การกระจายทางภูมิศาสตร์จากจำนวน 64 สปีชีส์ที่เก็บตัวอย่างได้จากประเทศไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ และอินโดนีเซีย พบจำนวนสปีชีส์ของหอยนกขม้นในประเทศไทยถึงหนึ่งในสาม ตัวอย่างที่มีชีวิตที่ได้ 17 สปีชีส์ ถูกนำมาศึกษา ค่าแฮพลอยด์นั้นเกือบทุกสปีชีส์มีค่า 28 ถึง 29 ใกล้เคียงกับผลงานของนักวิจัยอื่นที่ศึกษาในหอยวงศ์เดียวกัน แต่พบ *Amphidromus semitesellatus* และ *A. xiengensis* ที่มีค่าผันแปรระหว่าง 24 ถึง 28 และ 26 ถึง 29 โดยลำดับ การไอโทปีและ C-banding จะเห็นความแตกต่างชัดเจนในสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่ ที่มักพบ median chromosome มากกว่า terminal chromosome ในขณะที่สปีชีส์บนเกาะจะพบ terminal chromosome เพิ่มมากขึ้น จนสามารถมองเห็น centric fission ได้ ตัวอย่างที่พบชัดเจน เช่น *A. atricallosus* group บนแผ่นดินใหญ่ และบนเกาะในทะเลอันดามัน และ *A. inversus* ทางตะวันออกเฉียงของไทยกับของสิงคโปร์ เมื่อวิเคราะห์การกระจายทางภูมิศาสตร์สามารถแบ่งกลุ่มการกระจายของหอยนกขม้นได้ 3 กลุ่ม โดยใช้ Huxley 's modifications of Wallace 's Line เป็นเส้นแบ่ง

คำหลัก : หอยนกขม้น, โครโมโซม, ประเทศไทย, *Amphidromus*

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA/01/2540
 ชื่อโครงการ : โครโมโซมแถบสีซีและแถบสีจีของหอยวงค์หอยนภมลินของประเทศ
 ไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ และอินโดนีเซีย
 ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา
 E-mail Address : somsakp@sc.chula.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะจัดจำแนกหอยนภมลินสกุล *Amphidromus* ซึ่งเป็นกลุ่มจำเพาะ และใกล้สูญพันธุ์ของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยใช้ฐานวิธานของอวัยวะสืบพันธุ์ แรดูลา การวิเคราะห์โครโมโซม และการวิเคราะห์การกระจายทางภูมิศาสตร์จากจำนวน 64 สปีชีส์ที่เก็บตัวอย่างได้จากประเทศไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ และอินโดนีเซีย พบจำนวนสปีชีส์ของหอยนภมลินในประเทศไทยถึงหนึ่งในสาม ตัวอย่างที่มีชีวิตที่ได้ 17 สปีชีส์ ถูกนำมาศึกษา ค่าแฮพลอยด์นั้นเกือบทุกสปีชีส์มีค่า 28 ถึง 29 ใกล้เคียงกับผลงานของนักวิจัยอื่นที่ศึกษาในหอยวงค์เดียวกัน แต่พบ *Amphidromus semitesellatus* และ *A. xiengensis* ที่มีค่าผันแปรระหว่าง 24 ถึง 28 และ 26 ถึง 29 โดยลำดับ การไอโซไทป์และ C-banding จะเห็นความแตกต่างชัดเจนในสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่ ที่มักพบ median chromosome มากกว่า terminal chromosome ในขณะที่สปีชีส์บนเกาะจะพบ terminal chromosome เพิ่มมากขึ้น จนสามารถมองเห็น centric fission ได้ ตัวอย่างที่พบชัดเจน เช่น *A. atricallosus* group บนแผ่นดินใหญ่ และบนเกาะในทะเลอันดามัน และ *A. inversus* ทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทยกับของสิงคโปร์ เมื่อวิเคราะห์การกระจายทางภูมิศาสตร์สามารถแบ่งกลุ่มการกระจายของหอยนภมลินได้ 3 กลุ่ม โดยใช้ Huxley 's modifications of Wallace 's Line เป็นเส้นแบ่ง

คำหลัก : หอยนภมลิน, โครโมโซม, ประเทศไทย, *Amphidromus*

Abstract

Project Code: RSA 01 – 2540

Project Title: C-BANDING AND G-BANDING CHROMOSOMES OF
CAMAENID SNAILS OF THAILAND, LAOS, VIETNAM,
MALAYSIA, SINGAPORE AND INDONESIA

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Somsak Panha

E-mail Address: somsakp@sc.chula.ac.th

Project Period: 3 years

The purpose of the present study is to classify the endemic and endangered Southeast Asian tree snail genus *Amphidromus* by using the morphology of reproductive organs and the radula, chromosome analysis and biogeographic analysis. Sixty-four species were collected from Thailand, Laos, Vietnam, Malaysia, Singapore and Indonesia, and about one-third are found living in Thailand. The 17 living species were used in this study. Haploid chromosome numbers of almost all species are 28 to 29 close to those reported by other papers for related groups. However, *Amphidromus semitessellatus* and *A. xiengensis* have various values, ranging from 24 to 28 and 26 to 29, respectively. Karyotypes and C-banding analysis showed distinct evidence of mainland species that possess mostly median chromosomes and few terminal chromosomes, while island species have increased terminal chromosomes, so that centric fission was observed. The *Amphidromus atricallosus* group, from mainland and an island in the Andaman Sea and *A. inversus* from eastern Thailand and Singapore are good examples. From biogeographic analysis using Huxley's modifications of Wallace's Line as a barrier, three groups of amphidromid snails are identified.

Keywords: Camaenid Tree Snails, Camaenidae Amphidromus, Thailand

บทนำ

หอยนกกม้นจัดเป็นหอยทากสวยงามในสกุล *Amphidromus* เป็นทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพจำเพาะของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (endemic genus) เป็นกลุ่มหอยต้นไม้ (tree snails) ที่กล่าวกันว่าสวยที่สุดในโลกในขณะนี้ เนื่องจากถิ่นอาศัยเกือบตลอดวงจรชีวิตจะดำรงอยู่บนต้นไม้ขนาดใหญ่ ๆ หลายประเภท จึงจัดหอยนกกม้นเป็นตัวบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของป่าเขตร้อนอีกประเภทหนึ่ง หอยสกุลนี้มีบทบาทในห่วงโซ่อาหารของป่าเขตร้อนโดยการเป็นอาหารให้กับนกนานาชนิด และสัตว์เลื้อยคลานด้วยน้ำนมหลายวงศ์ การทำลายป่าไม้และการนำหอยไปจำหน่ายโดยผู้ค้าเปลือกหอยทั่วโลก ทำให้หอยหลายสปีชีส์สูญพันธุ์ เช่น สปีชีส์ของฟิลิปปินส์ ปัจจุบันพบมีการจำหน่ายเปลือกหอยนกกม้นไปทั่วโลกนั้นเกือบทั้งหมดเป็นของฟิลิปปินส์ ยิ่งไปกว่านั้น มีการเปิดจำหน่ายเปลือกหอยสวยงามไปทั่วโลกทาง internet มีหลายแหล่งที่เสนอขายเปลือกหอยนกกม้น (<http://www.geocities.com/~sangiouli/exchange.html>, October, 2000) เหล่านี้ล้วนทำให้หอยหลาย สปีชีส์ตกอยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) และภาวะถูกคุกคาม (threatened species)

จากรายงานของ Fulton (1896) , Pilsbry (1900), Laidlaw and Solem (1961), Solem (1965, 1966, 1983), Dharma (1993) และ Panha (1997) พบว่า หอยนกกม้นสกุล *Amphidromus* มีอยู่ในภูมิภาคเอเชีย 84 สปีชีส์ มีการแพร่กระจายอยู่ในป่าเขตร้อนของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่พม่า ไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย และตามเกาะทางตอนใต้ของอินโดนีเซียไปจนถึงตอนเหนือของออสเตรเลียแถบเมืองดาร์วิน (Solem, 1959 และสมศักดิ์ ปัญหา 2543) (ภาพที่ 1)

การจัดจำแนกหอยนกกม้นตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมักใช้ลักษณะของเปลือก ไม่ว่าจะเป็นรูปร่างและสีสรร เป็นลักษณะที่ใช้จำแนก นอกจากนั้นยังมีการใช้ลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์และโครโมโซมมาช่วยจัดจำแนกให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น (Bishop, 1977; Minato, 1979; Panha, et al., 1999)

Bishop (1977) อนุมานว่า หอยวงศ์หอยนกกม้นมีกำเนิดมาจากบริเวณทางใต้ของแผ่นดินใหญ่จีน จากหลักฐานของฟอสซิลทำให้พบว่าในราวยุคอีโอซีน (Eocene) ประมาณ 30 กว่าล้านปีมาแล้ว และมีการเปลี่ยนแปลงมาเป็นระยะเวลาจนถึงยุคน้ำแข็งละลายล่าสุดเมื่อราว ๆ 1 ล้านปีที่ผ่านมานี้ ทำให้เกิดเกาะแก่งต่าง ๆ มากมายเกิดการตัดขาดของประชากรและพันธุกรรมของหอย ต่อมาจึงได้พบร่องรอยต่าง ๆ ของหอยหลายสปีชีส์ที่ยังคงความคล้ายคลึง (similarity) ไว้อย่างชัดเจน เช่น *Amphidromus inversus* ปัจจุบันมีการแพร่กระจายตั้งแต่



ภาพที่ 1 แสดงแผนที่การแพร่กระจายของหอยนักษัตรสกุล *Amphidromus* ของ Alan Solem (1961) (เส้นทึบ) และจากการศึกษาครั้งนี้ (เส้นประ)

เวียดนาม กัมพูชา ตะวันออก และภาคใต้ของไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ และซาราวักมาเลเซีย ดูจากลักษณะของเปลือกแล้วมีความใกล้เคียงกันมาก

ลักษณะของเปลือกโดยเฉพาะสีสรร การเวียนซ้ายขวา (chirality) มีความผันแปร (variation) มากในหอยนกขมมัน ดังนั้นหลายครั้งจึงพบข้อผิดพลาดขึ้น การศึกษาวิจัยที่จะใช้ลักษณะอื่น ๆ มาประกอบ เช่น กายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซม จะทำให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมาเพื่อประกอบการอนุรักษ์หอยนกขมมันได้อย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุด ต่อทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของหอยนกขมมันด้วยวิธีการทางโครโมโซมและวิธีการอื่น ๆ เพื่อหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหอย เกิดประโยชน์ต่อการจัดทำ Reference Collection ของหอยนกขมมันของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Burch (1969) ได้รวบรวมข้อมูลทางโครโมโซมของหอยทากบกหลายวงศ์ รวมทั้งวงศ์หอยนกขมมัน 9 สกุล จากตัวอย่างของหมู่เกาะแปซิฟิกตอนใต้ ปาปัวนิวกินี ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น พบค่า haploid number อยู่ในช่วง 27-29

Laws (1973) ได้ศึกษาโครโมโซมของหอยวงศ์หอยนกขมมันของออสเตรเลีย 14 สกุล 25 สปีชีส์ พบว่าค่า haploid number ของทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 29

Scott (1996) ได้ใช้ข้อมูลที่มีผู้ศึกษาในแง่มุมต่าง ๆ เกี่ยวกับหอยนกขมมันมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สรุปว่าหอยนกขมมันแถบอเมริกามีความสัมพันธ์กับวงศ์ Helicidae , Helminthoglytidae ในทวีปอเมริกา และบางส่วนของวงศ์ Bradybaenidae ในออสเตรเลีย

Panha et al. (1999) ได้รายงานโครโมโซมของหอยนกขมมันสกุล *Amphidromus* เป็นครั้งแรก โดยใช้หอยสปีชีส์ *Amphidromus (Amphidromus) atricallosus* (Gould, 1843) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีการแพร่กระจายกว้างขวาง และมีลักษณะเปลือกที่ผันแปรมากได้พบค่า haploid number ที่ 28

การจัดทำโครงการนี้จนถึงการศึกษาในระดับการย้อมแถบสีบนแท่งโครโมโซม แล้วนำมาเทียบกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของเปลือกและกายวิภาคศาสตร์ของอวัยวะสืบพันธุ์ จะทำให้งานจัดจำแนกในระดับสปีชีส์มีความสมบูรณ์ที่สุด

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง
2. การเตรียมและวิเคราะห์โครโมโซม
3. การศึกษากายวิภาคอวัยวะสืบพันธุ์และแรดูลา
4. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 2)

เก็บตัวอย่างหอยนภม้นจากหลายบริเวณของอุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าของประเทศไทย ได้แก่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ (เชียงใหม่) สถานศึกษาธรรมชาติถ้ำลอด (แม่ฮ่องสอน) อุทยานแห่งชาติเขาลง (สุโขทัย) อุทยานแห่งชาติคลองลาน (กำแพงเพชร) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว (ชัยภูมิ) อุทยานแห่งชาติผาแต้ม (อุบลราชธานี) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (อุทัยธานี) อุทยานแห่งชาติพุเตย (สุพรรณบุรี) อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน (เพชรบุรี) สถานศึกษาธรรมชาติเขาเขียว หมู่เกาะสมสาร เกาะไผ่ เกาะรี (ชลบุรี) อุทยานแห่งชาติพลี (จันทบุรี) เกาะกูด (ตราด) เกาะสมุย หมู่เกาะอ่างทอง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองแสง (สุราษฎร์ธานี) เกาะกระ (นครศรีธรรมราช) เกาะตาชัย เกาะสิมิลัน (พังงา)

บริเวณแนวเขาหินปูนเขตวังเวียง ท่าแขก หลักซาว (Lak Sao) ประเทศลาว

บริเวณสถานอนุรักษ์ธรรมชาติคุกเฟื่อง ลางเซิน ประเทศเวียดนาม

บริเวณสถานอนุรักษ์ธรรมชาติคิเรียง เทมปูลุงในอลด์สตาร์ เปรัก ซาราวัก และซาบাহ ประเทศมาเลเซีย

บริเวณภูเกตุ ดีมา และสวนพฤกษศาสตร์ ประเทศสิงคโปร์

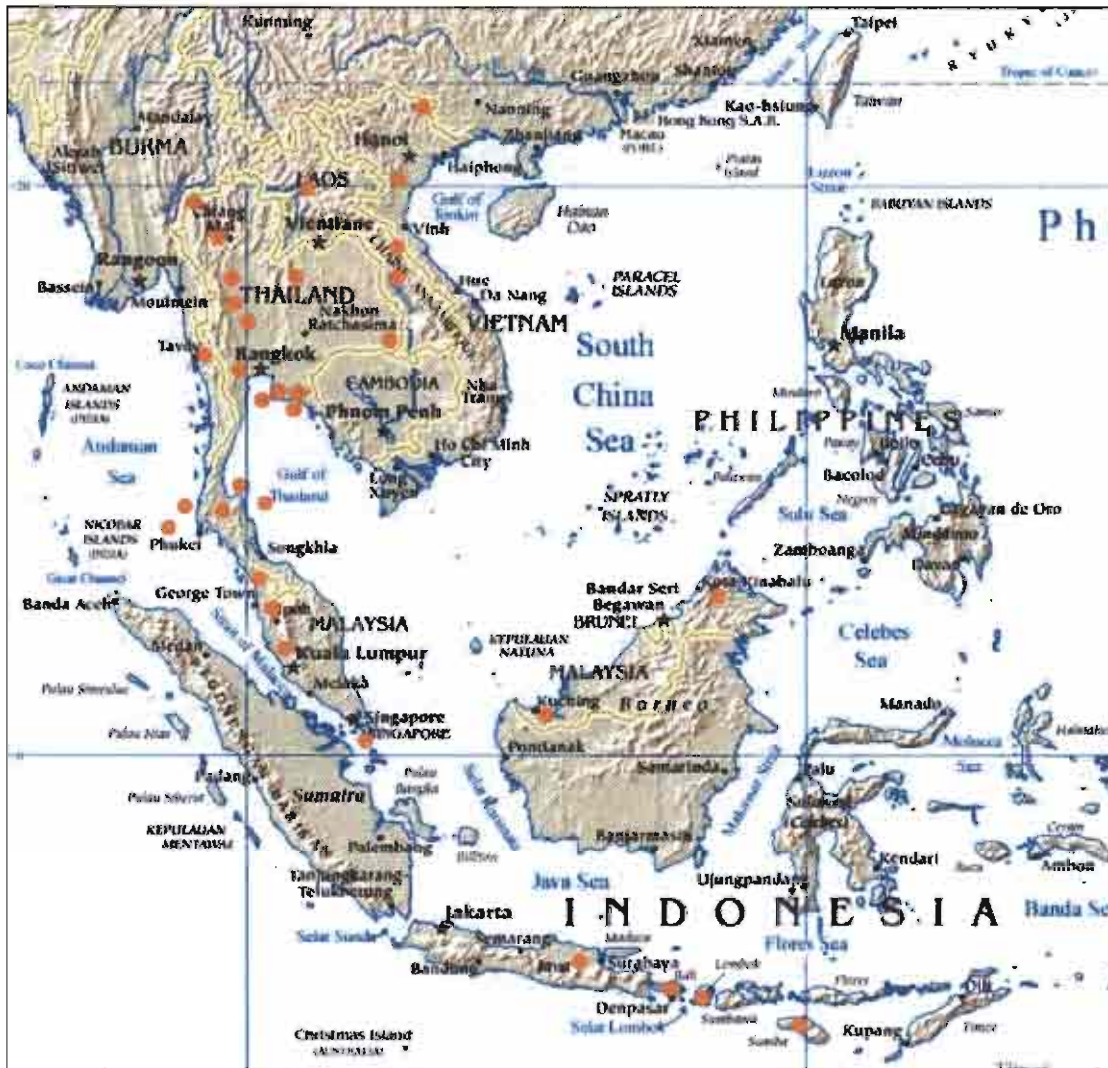
บริเวณชืออาวี บาหลี และลอมบก ชุมบา ประเทศอินโดนีเซีย

บางส่วนของทวาย ประเทศพม่า

2. การเตรียมและวิเคราะห์โครโมโซม

จัดเตรียมโครโมโซมด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 จี๊ด 0.01% colchicine เข้าในตัวอย่างก่อนเตรียมโครโมโซมประมาณ 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างหอยนกขมิ้น (จุดสีแดง) ของผู้วิจัย และบางส่วนของอินโดนีเซีย จาก Dr. Mike Severns



ภาพที่ 3 รูปแบบของเปลือกที่หลากหลายใน *Amphidromus atricallosus* group (*atricallosus* type: A จากทวาย พม่า, B จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองแสง ; *leucoxanthus* type: C จากอุทยานแห่งชาติ น้ำตกพลิ้ว D,E จากอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ; *classarius* type: F จากเกาะตาชัยทะเลอันดามัน ; *A. siminis* : G จากซาบารห์, H จากซาราวัก มาเลเซีย)

2.2 กระเทาะเปลือกหอย และนำสวณ gonad มาบีบให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ผ่านตะแกรงผ้าไนลอนที่ซึ่งปิดปากหลอด microcentrifuge tube ที่มีสารละลาย 0.06 MKCl บรรจุอยู่ แช่เซลล์ในสารละลายเป็นเวลา 30 นาที

2.3 นำหลอดในข้อ 2.2 ไปปั่นใน centrifuge ที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสออก (supernatant) ประมาณครึ่งหลอด

2.4 เติมน Carnoy's Fixative ลงไปผสมให้เข้ากับตะกอน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

2.5 ทำซ้ำข้อ 4 จนได้ตะกอนใส

2.6 เมื่อได้ตะกอนใส ดูดส่วนน้ำใสทิ้งจนเกือบหมด แล้วเติมน Carnoy's Fixative ลงไปประมาณครึ่งหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์

2.7 นำสไลด์ไปย้อมด้วยสี Geimsa เป็นเวลา 15-20 นาที

2.8 นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจหาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วถ่ายภาพเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

2.9 จัดการโอไทป์ โดยทำการวัดความยาวของแขนข้างสั้น (Ls) และความยาวของแขนข้างยาว (Li) โดยวัดจากตำแหน่งของ Centromere ไปยังปลายของโครโมโซมทั้งสองด้าน ทำการคำนวณค่า Centromeric Index (C.I.) = (Ls/Lt) โดยที่ Lt คือค่า total length เรียงลำดับตามความยาวและการแบ่งชนิดของโครโมโซม โดยช่วงของ C.I. อยู่ในช่วง 46-49 เป็นชนิด metacentric, 26-45 เป็นชนิด submetacentric, 15-25 เป็นชนิด subtelocentri คำน้อยกว่า 15 เป็น telocentric

2.10 นำแผ่นสไลด์ของข้อ 2.6 จำนวนหนึ่งไปทำการย้อม Band ด้วยวิธี C-Banding และ/หรือ G-Banding ตามวิธีการของ Hussain et al., 1978; Karasawa and Tanaka, 1980; Summer, 1982; De Sarker and Datta, 1987; Summer 1994 และ Natayaganova, 1997 โดยมีวิธีการโดยสรุปดังต่อไปนี้

นำสไลด์จุ่มลงใน $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ประมาณ 1-2 นาที ที่อุณหภูมิ 60°C ใน incubator จากนั้นหยด 0.2 N HCl และน้ำ ผ่านสไลด์ แล้วแช่ใน 2XSSC แล้วนำเข้า incubator ที่ 60°C 1 ชั่วโมง (กรณีของ G-banding ใช้อุณหภูมิ 40°C) จากนั้นผ่านวิธีการที่ได้รับความนิยมคือ Traditional trypsin method (Seabright, 1971) โดยนำสไลด์จุ่ม 0.25 สารละลาย trypsin ประมาณ 5 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง (ช่วง $28-31^\circ\text{C}$ สำหรับการศึกษาค้างนี้) หยดสารละลาย 2XSSC แล้วย้อมด้วยสี 5% Giemsa เป็นเวลา 5-20 นาที

3. การศึกษากายวิภาคอวัยวะสืบพันธุ์และแรดูลา

หอยที่ถูกเก็บไว้ใน 70% เอธิลแอลกอฮอล์ นำมาทำการผ่าตัด แยกส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ มาเพื่อศึกษาส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์ วาดภาพเปรียบเทียบหลาย ๆ สปีชีส์

นำแรดูลา (radula) มาเตรียมให้สะอาด แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) นำภาพถ่ายมาศึกษาเปรียบเทียบในแต่ละสปีชีส์

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

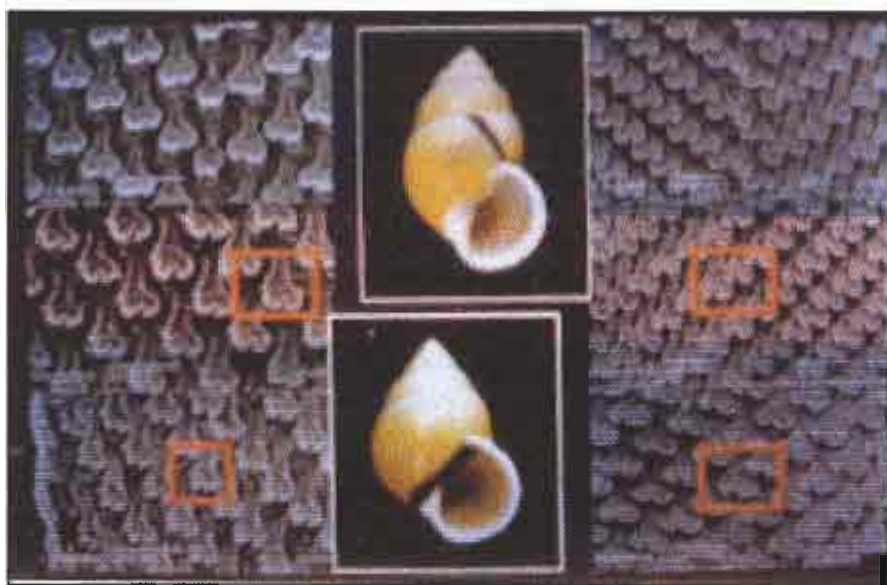
นำข้อมูลโครโมโซม กายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ และแรดูลา มาเปรียบเทียบในหอยแต่ละสปีชีส์ แต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างแล้วทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) และทางชีวภูมิศาสตร์ (biogeography)

ผลการศึกษา

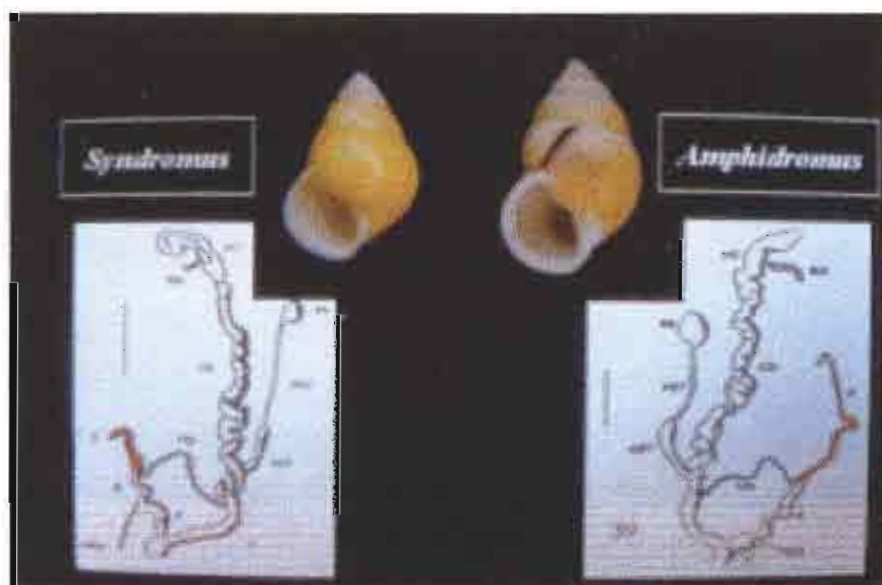
จากการเก็บตัวอย่างได้พบเปลือกหอยนภขมมันและตัวอย่างที่มีชีวิตบางสปีชีส์ เมื่อตรวจสอบที่ The Field Museum, Chicago สามารถจำแนกหอยได้ถึง 64 สปีชีส์ เนื่องจากหอยนภขมมันสกุล *Amphidromus* อาศัยอยู่บนต้นไม้เกือบตลอดวงชีวิต และมักจะออกหากินเวลากลางคืนเฉพาะช่วงฤดูฝนเท่านั้น การเก็บตัวอย่างจึงต้องเก็บในตอนกลางคืน และส่วนใหญ่จะได้จากประเทศไทย บางส่วนของลาว สิงคโปร์ ชาราวัก และบาห์ลี ตัวอย่างที่มีชีวิตที่สามารถเก็บมาศึกษาวิจัยได้มีอยู่ 17 สปีชีส์ ได้แก่ *Amphidromus sinensis*, *A. glaucolarynx*, *A. schomburgki*, *A. atricallosus*, *A. areolatus*, *A. inversus*, *A. semitessellatus*, *A. xiengensis*, *A. laosianus*, *A. flavus*, *A. perversus*, *A. siminis*, *A. tanyai*, *A. principalis*, *A. classarius*, *A. sp.1*, *A. sp.2* ในจำนวนนี้เป็นสปีชีส์ที่พบในประเทศไทยถึง 14 สปีชีส์ อาจกล่าวได้ว่าขณะนี้ชุมชนหอยนภขมมันที่ยังมีชีวิตอยู่ในประเทศไทยมากที่สุด

ข้อมูลทั่วไป

จากตัวอย่างมีชีวิตและเปลือกที่ได้ทั้งจากประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน ได้พบลักษณะพื้นฐานคือ สัตว์ฐานวิทยาของเปลือกและกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ มีการกระจายที่มีรากฐานเดียวกันของสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่กับสปีชีส์ที่อยู่บนเกาะ ทั้งเกาะขนาดเล็กและใหญ่ในบริเวณประเทศต่าง ๆ หอยนภขมมันเหลือง *Amphidromus atricallosus* (Gould, 1843) เป็นตัวอย่างที่เห็นชัดเจน ตัวอย่างที่เก็บได้เริ่มต้นในแผนที่จากทะเลวาย ประเทศพม่า แล้วเริ่มมีการค้นพบที่อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน เพชรบุรี มาพบความหลากหลายอีกครั้งที่อุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิว จันทบุรี จากเพชรบุรีลงไปมาเป็นกลุ่มที่มีลักษณะของเปลือกแบบได้ ที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองแสง สุราษฎร์ธานี และเขาช่อง ตราง และกลายเป็น type "*perakensis*" ที่มาเลเซียและสิงคโปร์ ในขณะที่เกาะในทะเลอันดามัน เช่น เกาะตาชัยกลับพบ type "*classarius*" ซึ่งเป็น type ที่ผันแปรจากแผ่นดินใหญ่ออย่างชัดเจน (ภาพที่ 3) กายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ และแรดูลาเป็นลักษณะที่ช่วยยืนยันได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 4) เมื่อนำข้อมูลโครโมโซมจะพบเห็นความคล้ายคลึงกันมาก ยกเว้นเกาะในทะเลอันดามัน เช่น เกาะตาชัยกลับพบ type "*classarius*" ซึ่งเป็น type ที่ผันแปรจากแผ่นดินใหญ่ออย่างชัดเจน กายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ และแรดูลาเป็นลักษณะที่ช่วยยืนยันได้เป็นอย่างดี เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจำนวนโครโมโซมจะพบเห็นความคล้ายคลึงกันมาก ยกเว้น *A. semitessellatus*



ก.



ข.

ภาพที่ 4 ก. ลักษณะที่ต่างกันของแรคูไลใน *Amphidromus atricallosus*

ข. ลักษณะ กายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของ สกุลย่อย *Amphidromus* และ *Syndromus*

สัณฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์และแรดูลา

สัณฐานวิทยาของหอยนกกชนิดนี้ได้ศึกษามีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก ลักษณะของ flagellum, epiphallus และ receptaculum seminis ลักษณะ flagellum เป็นลักษณะที่กำหนดลักษณะสัณฐานของ spermatophore โดยทั่วไปแล้วลักษณะสัณฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์จากการศึกษาในหอย 7 สปีชีส์คือ *A. areolatus*, *A. glaucolarynx*, *A. semitessellatus*, *A. principalis*, *A. xiengensis*, *A. atricallosus*, *A. classarius* และ *A. inversus* พบว่า flagellum ของ *A. atricallosus* และ *A. classarius* มีขนาดและสัณฐานใกล้เคียงกันมาก ปกติทั้ง 2 สปีชีส์นั้นถูกจำแนกไว้ในกลุ่ม "atricallosus" ต่อมาเมื่อมีการพบตัวอย่างจากเกาะตาชัยในทะเลอันดามัน ลักษณะของ receptaculum seminis เป็นลักษณะที่แตกต่าง เมื่อเทียบกับลักษณะของแรดูลา พบว่าฟันขอบ (marginal teeth) มีลักษณะ 2 ซี่ฟันเล็กด้านใน และ 3 ซี่ฟันเล็กด้านนอก

การวิเคราะห์โครโมโซม (ภาคผนวก 1)

ค่าแฮพลอยด์อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันมาก ที่ 28-29 มีเพียง *A. semitessellatus* ที่พบค่าอยู่ 2 ช่วงคือ 24-27 และ 28-29 (ภาพที่ 5) เมื่อนำมาจัดคาริโอไทป์จะได้รูปแบบที่แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างชัดเจน C-banding สามารถบอกความแตกต่างของกลุ่มสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันได้ เช่น *A. atricallosus*, *A. classarius*, *A. siminis*

คาริโอไทป์ของหอยแต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่กับบนเกาะ C-banding ของหอยนกกชนิดนี้มีแนวทางเดียวกัน ชัดเจน และมองเห็นการเกิด centric fission ค่อนข้างชัดเจน เช่น ใน *A. atricallosus* บนแผ่นดินใหญ่กับบนเกาะในทะเลอันดามันและชาววกของประเทศมาเลเซีย *A. inversus* และกลุ่มสปีชีส์ *A. xiengensis* และข้อมูลทาง C-banding ยังช่วยยืนยันให้ *A. principalis* จากเกาะกระ และ *A. classarius* จากเกาะตาชัย และ *Amphidromus* sp. จากอุทยานแห่งชาติผาแต้ม เป็นสปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานที่ใดมาก่อน

การศึกษานี้ได้ใช้เนื้อเยื่อ ovotestis เตรียมเมตาเฟสโครโมโซมเช่นเดียวกับที่มีการศึกษากันมาโดยตลอด แต่โครโมโซมที่ได้นั้นนำมาจัดคาริโอไทป์ยากมาก จึงพยายามใช้เนื้อเยื่อของ pedal gland ซึ่งเป็นต่อมขนาดใหญ่ สร้างเมือกมาที่เท้าของหอยช่วยให้เกิดการหล่อลื่นเวลาเคลื่อนที่ และเป็นเซลล์ร่างกาย (somatic cells) ซึ่งสามารถเตรียมเมตาเฟสโครโมโซมได้ดีกว่าเนื้อเยื่อ ovotestis และสามารถนำมาศึกษา C-banding ได้ค่อนข้างชัดเจนอีกด้วย

คาริโอไทป์ของหอย 7 สปีชีส์ที่เกิดจากการเตรียมโครโมโซมโดยเนื้อเยื่อของ pedal gland และให้ colchicine ด้วยวิธีการ feed เหมือนป้อนอาหาร ให้รายละเอียดของเมตาเฟสโครโมโซมที่ชัดเจนมากขึ้น

	24	25	26	27	28	29	30	Reference
<i>A. areolatus</i>								present
<i>A. atricallosus</i>								Panha et al., 1999 & present
<i>A. classarius</i>								present
<i>A. flavus</i>								present
<i>A. glaucolarynx</i>								present
<i>A. inversus</i>								present
<i>A. laosianus</i>								present
<i>A. perversus</i>								Laws, 1973
<i>A. principalis</i>								present
<i>A. schomburgki</i>								present
<i>A. semitessellatus</i>								present
<i>A. sinensis</i>								Burch, 1969
<i>A. siminis</i>								present
<i>A. tanyai</i>								present
<i>A. xiengensis</i>								present
<i>A. sp. 1</i>								present
<i>A. sp. 2</i>								present

ภาพที่ 5 Haploid Chromosome Numbers of 17 species of Amphidromus

ใน *Amphidromus atricallosus* พบค่าแฮพพลอยด์ที่ 26 เป็นส่วนใหญ่ บางตัวอย่างพบที่ 27 (Panha et al., 1999) ในขณะที่ *A. classarius* ซึ่งจัดเป็นกลุ่ม "atricallosus" ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก พบค่าแฮพพลอยด์ที่ 29 จากการสังเกตจากแท่งโครโมโซมพบว่า โครโมโซมคู่ที่ 3, 4 ของ *A. atricallosus* มีแนวโน้มที่จะเกิด centric fission ทำให้เกิดพันคู่อื่น ๆ ของ *A. classarius* ที่ค่อนข้างชัดเจน อย่างไรก็ตาม เมื่อดูลักษณะคาริโอไทป์จะเห็นว่า *A. atricallosus* มีลักษณะแท่งโครโมโซมเป็นแบบ median ทั้งหมดเมื่อดูที่ตำแหน่งของ centromere ในขณะที่ของ *A. classarius* เป็นแบบ median 20 คู่ เป็นแบบ terminal ถึง 9 คู่ ในเบื้องต้นค่อนข้างเห็นได้ชัดสำหรับสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่กับสปีชีส์บนเกาะ (เกาะตาชัยในทะเลอันดามัน ห่างจากฝั่งประมาณ 40 กิโลเมตร) สำหรับ *A. classarius* ค่อนข้างแยกตัวเองออกจากกลุ่มชัดเจน มีแนวโน้มว่ามีการเกิด speciation (สมศักดิ์ และคณะ, 2543) ซึ่งถือว่าเป็นสมมติฐานที่กำลังจะได้ทำการพิสูจน์ต่อไป นอกจากลักษณะของโครโมโซมดังกล่าว ลักษณะของเปลือก แรดูลา หรือสัณฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ก็มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน (Panha et al., 2000)

Amphidromus inversus นั้นเห็นการเปลี่ยนแปลงชัดเจนระหว่างสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่ (หมู่เกาะแสมสาร ชลบุรี เกาะสมุย สุราษฎร์ธานี) กับสปีชีส์จากสิงคโปร์ ค่าแฮพพลอยด์ที่ 29 เท่ากันแต่ของสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่ประกอบด้วย median chromosome ถึง 25 คู่ ในขณะที่สปีชีส์จากสิงคโปร์มีเพียง 17 คู่ เมื่อทำ C-banding พบว่า คู่ที่ 1 และ 2 ของจาก 2 บริเวณมีความเหมือนกัน

Amphidromus xiengensis เป็นสปีชีส์ที่มีขนาดเล็ก มีการกระจายที่กว้างขวางมาก ตั้งแต่ภาคเหนือลงมาถึงภาคตะวันออกของไทย ค่าแฮพพลอยด์ที่มีช่วงยาวตั้งแต่ 26-29 นั้น มีความใกล้เคียงกับลักษณะของ *A. atricallosus* แต่เมื่อดูจากลักษณะของแท่งโครโมโซมที่ได้ในส่วนมากใน *A. xiengensis* ทางตอนเหนือมีลักษณะเป็น median chromosome เกือบทั้งหมด กลุ่มทางภาคตะวันออกมีลักษณะของ terminal chromosome เพิ่มขึ้น ค่าแฮพพลอยด์ก็ต่างกันชัดเจนระหว่างสปีชีส์จากทางเหนือ (เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว เชียงใหม่) มีค่า 26 ขณะที่สปีชีส์จากภาคตะวันออก (เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤๅไน ป่ารอยต่อ 5 จังหวัด) มีค่า 29 *A. xiengensis* จากสองบริเวณควรแยกออกเป็นต่างสปีชีส์กัน แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานอื่นมีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก

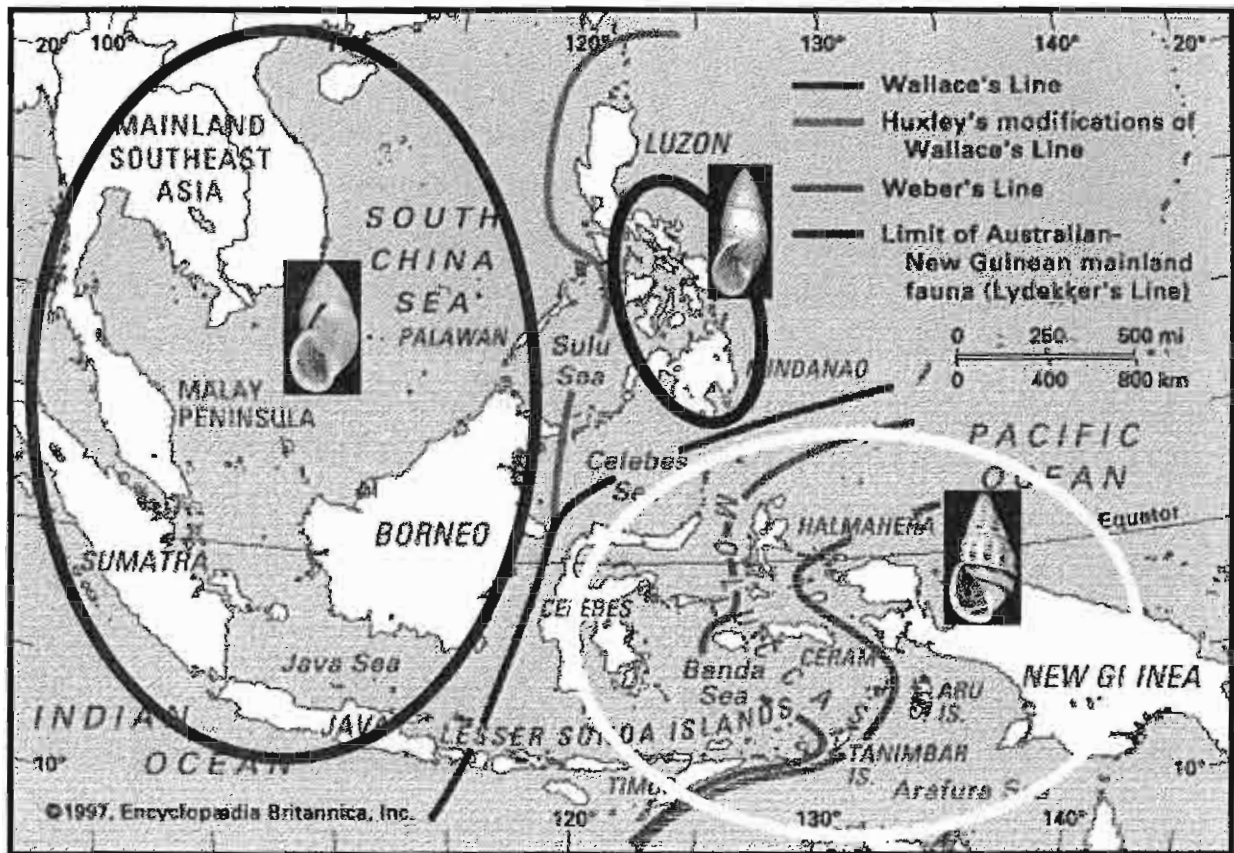
Amphidromus principalis เป็นสปีชีส์ที่พบที่เกาะกระกลางอ่าวไทยและพบซากที่หมู่เกาะอ่างทองอ่าวไทยเช่นกัน สปีชีส์นี้ถือเป็นการค้นพบใหม่เนื่องจากยังไม่มีรายงานที่ใดมาก่อน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก อวัยวะสืบพันธุ์และแรดูลา มีลักษณะจำเพาะ (Panha et al., 2001) เมื่อศึกษาลักษณะทางโครโมโซมพบค่าแฮพพลอยด์ที่ 29 เช่นเดียวกับสปีชีส์อื่น ๆ ในวงศ์นี้โดยทั่วไป แต่เมื่อดูคาริโอไทป์จะพบลักษณะของ terminal chromosome (15) มากกว่า

median chromosome (14) เป็นสปีชีส์แรก *A. principalis* จึงเป็นสปีชีส์ที่มองเห็นค่อนข้างชัดเจนในเชิงของ isolation และ centric fission ในเชิงของการวิเคราะห์โครโมโซม

Amphidromus sp. หอยทากเขี้ยวที่พบอยู่ในบริเวณเล็ก ๆ ในเขตติดต่อระหว่างประเทศไทยและลาว (บริเวณอุทยานแห่งชาติผาแต้ม จังหวัดอุบลราชธานี) เปลือกมีลักษณะจำเพาะ และค่าแฮพลอยด์อยู่ที่ 29 มีจำนวน terminal chromosome ถึง 11 นับว่ามีมากกว่าอีกหลายสปีชีส์ และ median chromosome ถึง 18

การกระจายทางภูมิศาสตร์

Pilsbry (1900), Laidlaw and Solem (1961) รวบรวมข้อมูลของหอยทากเขี้ยวใน *Amphidromus* spp. ที่มีรายงานมาแล้ว พบว่ามีมากกว่า 80 สปีชีส์ มีการกระจายในเขตเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บนแผ่นดินใหญ่ หมู่เกาะของอินโดนีเซีย บอร์เนียว ไปจนถึงทางตอนเหนือของเมืองดาร์วิน ประเทศออสเตรเลีย และผลงานวิจัยล่าสุดของ Goldberg and Severns (2000) การศึกษาครั้งนี้สามารถวิเคราะห์และประมวลผลได้ว่า ถ้าใช้ Huxley 's modifications of Wallace 's Line จะพบว่า *Amphidromus* (*Amphidromus*) มีการกระจายเด่นชัดบนแผ่นดินใหญ่แถบพม่า ไทย อินโดจีน ลงมาถึงมาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา และชวา และบอร์เนียว อยู่อีกด้านหนึ่งของ Huxley 's Line ในขณะที่ *Amphidromus* (*Syndromus*) กลุ่มสปีชีส์ที่มีขนาดเล็ก พบกระจายปะปนบนแผ่นดินใหญ่กับ *A. (Amphidromus)* แต่จะเป็นกลุ่มเด่น (dominant taxa) บนหมู่เกาะต่าง ๆ โดยเฉพาะเกาะขนาดกลางและเล็ก และอยู่ไปทางด้านขวาของ Huxley 's Line จากเกาะ Sulawesi (Celebes) และ Lombok ของอินโดนีเซีย (ภาพที่ 6) มีการพบหอยชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นตามหมู่เกาะต่าง ๆ โดยเฉพาะหมู่เกาะขนาดกลางและเล็ก (Dharma, 1993 : Goldberg and Severns, 2000 : Panha et al., 2001) เกาะที่มีขนาดใหญ่เช่น บอร์เนียว สุมาตรา นั้นพบลักษณะของความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาที่เห็นได้ด้วยตา เช่น สีของเปลือก น้อยกว่าที่พบบนเกาะขนาดกลางเช่น Lombok, Timor, Sumba เกาะขนาดเล็กมาก ๆ เช่นเกาะกระ เกาะแสมสารในอ่าวไทย เกาะตาชัยในทะเลอันดามันเป็นเช่นเดียวกับเกาะขนาดใหญ่ในเรื่องของความหลากหลายของลักษณะ แต่เกาะขนาดใหญ่มักจะมี ความหลากหลายของสปีชีส์สูงกว่า เกาะขนาดเล็ก ๆ หลายเกาะที่มีมนุษย์เข้ามามีกิจกรรมบนเกาะบ้างที่ไม่ใช่การตัดไม้ทำลายป่า จะพบค่า abundance มากกว่าบนเกาะขนาดใหญ่ ประชากรในเกาะนั้น ๆ อาจถูกตัดขาดจากประชากรอื่น ๆ ทำให้ไม่มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมกับประชากรอื่น ๆ ซึ่งอาจพบได้ทั้งความหลากหลายที่สูงขึ้นเนื่องจากสามารถใช้ถิ่นที่อยู่อาศัยหลายรูปแบบมากขึ้น และมีปริมาณแหล่งที่อยู่อาศัยเพิ่มขึ้น (Woodruff and Solem, 1990 ; Johan-Nesson and Tatarenkov, 1997) หรือประชากรดังกล่าวอาจประสบ



ภาพที่ 6 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของหอยนภมันสามกลุ่ม กับ Huxley's Line (วงสีชมพู, *Amphidromus* (*Amphidromus*); วงสีขาว, *Amphidromus* (*Syndromus*); วงสีดำ, กลุ่มสปีชีส์จำเพาะของฟิลิปปินส์)

กับภาวะเสื่อมโทรมของความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากประชากรตั้งต้นมีขนาดเล็ก มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำและการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (O' Brien et al., 1985 ; Satoshi, 1999) เหล่านี้ล้วนเป็นคำถามที่กำลังทำการศึกษาต่อเนื่องอยู่ในขณะนี้ เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มสปีชีส์ต่าง ๆ กับสภาพภูมิศาสตร์ที่มีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่อดีตโดยการวิเคราะห์ที่ลึกถึงระดับ DNA (สมศักดิ์ ปัญหาและคณะ , 2543) โดยเฉพาะกลุ่มหอยนกขมิ้นนั้นจัดเป็นประเภท arboreal อาศัยอยู่บนต้นไม้เกือบตลอดชีวิต การเปลี่ยนแปลงสภาพป่าเพียงเล็กน้อยอาจมีผลต่อประชากรของหอยเหล่านี้ได้ ผลการวิจัยต่อไปสามารถนำมาเปรียบเทียบกับบางผลงานที่มีผู้ศึกษาในหอยที่ค่อนข้าง common และอดทนต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี เช่น *Mandarina* (Satoshi, 1999)

วิจารณ์ผลและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาพบว่าหอยนกขมิ้นสกุล *Amphidromus* นับว่าเป็นทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพอีกประเภทหนึ่งที่กำลังตกอยู่ในภาวะคุกคามเป็นอย่างมาก Abbott (1989) รายงานว่า *Amphidromus glaucolarynx* สูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยแล้ว สาเหตุจากการทำลายป่าไม้ และพบว่าหลายสปีชีส์ในฟิลิปปินส์และอินโดนีเซียสูญพันธุ์จากการทำลายป่า และการล่าหอยเพื่อนำเปลือกที่สวยงามไปจำหน่าย การกระจายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทำให้หอยนกขมิ้นเป็นทรัพยากรของภูมิภาคนี้แต่เพียงแห่งเดียวและในบรรดาสปีชีส์ที่รายงานมาทั้งหมดในอดีตและการรวบรวมข้อมูลที่ผ่านมา (Panha, 1996) เมื่อรวมกับการศึกษาครั้งนี้พบว่าประเทศไทยมีหอยนกขมิ้นอยู่ถึงหนึ่งในสี่ของจำนวนทั้งหมด

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกนั้นมีความหลากหลายมากในสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่และพบมากบนเกาะขนาดกลาง (Goldberg and Severns, 2000) นอกจากนี้ยังพบความหลากหลายของลักษณะต่าง ๆ และความหลากหลายของสปีชีส์น้อยมากบนเกาะขนาดเล็ก หลายสปีชีส์แสดงให้เห็นร่องรอยการเปลี่ยนแปลงภายในกลุ่มสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่ แล้วพบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงชัดเจนบนเกาะหลังจากมีการตัดขาดจากกันของแผ่นดิน (Bishop, 1977) *Amphidromus atricallosus* group เป็นตัวอย่างที่เห็นชัดเจน พบการกระจายบนแผ่นดินใหญ่ ตั้งแต่ทวาย พม่า ตะวันตก ตะวันออกของไทย ลาว และทางใต้ของไทยจนถึงสิงคโปร์ มีการกระจายเป็น type “*atricallosus*” จากทวาย แล้วมาพบอีกที่สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช type “*leucoxanthus*” พบที่ตะวันออกของไทย เขมร type “*perakensis*” พบที่

นครศรีธรรมราช ลงไปจนถึงมาเลเซีย สิงคโปร์ ในขณะที่ *A. siminis* ที่ผันแปรบนเกาะบอร์เนียว (ซาราวัก) ก็เป็นรูปแบบหนึ่งที่เชื่อว่าผันแปรไปจาก “*atricallosus*” group บนแผ่นดินใหญ่ (Panha et al., 2000b) การวิเคราะห์โครโมโซม พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ type ต่าง ๆ เช่นเดียวกับที่กล่าวมาในลักษณะสัณฐานวิทยา เช่นพบลักษณะการโอโทไปที่แตกต่างกัน พบลักษณะ median chromosome ของสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่มากกว่า terminal chromosome และสังเกตเห็น centric fission บนเกาะขนาดเล็กเช่นเกาะตาชัยในหอยสปีชีส์ *A. classarius* ลักษณะโครโมโซมของ *A. siminis* บนเกาะบอร์เนียว (ซาราวัก) มีความแตกต่างจาก *A. atricallosus* ในลักษณะของจำนวนและแท่งโครโมโซมโดยทั่วไปอย่างชัดเจน การวิเคราะห์ด้วย C-banding

Amphidromus inversus เป็นอีกสปีชีส์หนึ่งที่พบการกระจายกว้างขวาง ตั้งแต่บนแผ่นดินใหญ่ ในเวียดนาม ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ที่เกาะชวาและบอร์เนียว ลักษณะของเปลือกพบว่าสปีชีส์บนเกาะบอร์เนียวมีความผันแปรจากสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่อย่างชัดเจน การโอโทไปของสปีชีส์ที่หมู่เกาะแสมสาร ชลบุรี มีค่า median chromosome ที่ 25 และ terminal chromosome ที่ 4 ในขณะที่สปีชีส์ที่ได้จากสิงคโปร์ มีค่า median chromosome ที่ 17 และ terminal chromosome ที่ 12 ค่าแฮพลอยด์ของทั้งสองมีค่าเท่ากันที่ 29 เกาะแสมสารนั้นอยู่ห่างจากแผ่นดินเพียง 2 กิโลเมตร ในทาง biogeography แล้วถือว่าเป็นแผ่นดินใหญ่ เมื่อเทียบกับสปีชีส์ที่สิงคโปร์นั้น จะเห็นว่าแยกจากกันมาก ลักษณะการโอโทไปที่ต่างกันเป็นหลักฐานยืนยันว่า อาจเกิด centric fission ของสปีชีส์ในสิงคโปร์หลังจากแยกตัวจากสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่ทางเหนือมาเป็นเวลานาน ระยะเวลาที่ผ่านมา นาน ๆ อาจทำให้เกิด speciation ได้ในกรณีนี้ การพิสูจน์ในระดับ DNA อาจให้คำตอบที่ชัดเจนกว่านี้ได้

Amphidromus xiengensis เป็นสปีชีส์ขนาดเล็กที่จัดไว้ใน subgenus “*Syndromus*” พบการกระจายกว้างเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้จากเชียงใหม่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขางูใน ลักษณะของเปลือกเหมือนกันทุกประการ เช่นเดียวกับสัณฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ ข้อมูลทางโครโมโซมก็เป็นเช่นเดียวกับ *A. inversus* คือตัวอย่างทางเหนือมีค่า median chromosome มากกว่า terminal chromosome (22, 4) ตัวอย่างทางภาคตะวันออกมีค่า terminal chromosome เพิ่มขึ้น (19, 10) ค่าแฮพลอยด์ต่างกันอย่างชัดเจน ที่ 26 และ 29 หอยทั้งสองบริเวณน่าจะมีการวิเคราะห์ทางอนุกรมวิธานที่ผิดพลาด หอยสองบริเวณควรจะเป็นสปีชีส์ที่แยกออกจากกัน

Amphidromus -principalis จากเกาะกระกลางอ่าวไทยแสดงให้เห็นลักษณะของ isolation จากสปีชีส์อื่น ๆ ทั้งลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือก อวัยวะสืบพันธุ์ ลักษณะของโครโมโซมที่พบ median chromosome มีค่าน้อยกว่า terminal chromosome (14, 15)

isolation อาจทำให้เกิด centric fission ได้เช่นกัน แต่ยังคงค่าแฮพพลอยด์ที่ 29 ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของหอยวงศนี้

Amphidromus sp. สปีชีส์ใหม่ล่าสุดที่เพิ่งพบระหว่างประเทศไทยและลาวเมื่อเดือนตุลาคม 2543 ลักษณะเปลือก รูปแบบสีสรร ยังไม่มีรายงานที่ใดมาก่อน เป็นสปีชีส์ใหม่ที่ต้องนำเสนอต่อไป ค่าแฮพพลอยด์ที่ 29 นับว่ายังคงลักษณะของหอยนักษมีนไว้ ค่า median chromosome และ terminal chromosome ที่ 18 และ 11 ยังคงลักษณะของสปีชีส์บนแผ่นดินใหญ่ไว้เช่นกัน

จะเห็นว่าเมื่อเตรียมเมตาเฟสโครโมโซมจาก pedal gland ได้แล้วสามารถจำแนกหอยได้เกือบทุกสปีชีส์ที่สามารถเก็บตัวอย่างหอยเป็น ๆ มาได้ C-banding ก็เป็นตัวช่วยยืนยันความต่างกันของคาริโอไทป์ที่มีความพหุคล้ายกันมาก การศึกษาครั้งนี้หอยที่ใช้เตรียมโครโมโซมเกือบทั้งหมดเป็นสปีชีส์ที่พบในประเทศไทย เนื่องจากการเก็บตัวอย่างหอยนักษมีน *Amphidromus* จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างในเวลากลางคืนเนื่องจากหอยกลุ่มนี้ดำรงชีพแบบ nocturnal การเก็บตัวอย่างเป็นจากต่างประเทศจึงทำได้ยาก อย่างไรก็ตามข้อมูลของต่างประเทศไม่ว่าจะเป็นเปลือก หรือตัวอย่างตายแล้ว สามารถนำมาประมวลประกอบการหาการกระจายทางภูมิศาสตร์ และสามารถวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์และระหว่างสปีชีส์ในเบื้องต้นได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ทั้งหมดล้วนเป็นหลักฐานที่นำไปใช้ยืนยันการจัดจำแนกโดย Pilsbry (1900) และ Laidlaw and Solem (1961) ได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- สมศักดิ์ ปัญญา. 2543. หอยทากบก. บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายชีวภาพในประเทศไทย (Review of Biodiversity Research in Thailand). โครงการพัฒนางานความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย, หน้า 110-126.
- สมศักดิ์ ปัญญาสุกมล ศรีขวัญ จิรศักดิ์ สุจริต ปิโยรส ทองเกิด และ John B. Burch. 2543. การใช้หอยทากบกในการวิเคราะห์ชีวภูมิศาสตร์ของเกาะในประเทศไทย. บทความเสนอต่อที่ประชุมวิชาการสมาคมภูมิศาสตร์แห่งประเทศไทย ประจำปี 2543, หน้า (C-103) – (C-112).
- Abbott, R. T. 1989. Compendium of landshells. American malacologist, Inc. Melbourne, 240 pp.
- Bishop, M. 1977. Anatomical notes on some Javanese *Amphidromus* (Pulmonata: Camaenidae). Journal of Conchology, 29(4): 199-205.
- Burch, J. B. 1969. The chromosome number of *Bulinus sericinus* from Ethiopia. Malacological Review, 2: 113-114.
- De Sarker, D. and Datta, K. B. 1987. Giemsa C-banding pattern in some cultivars of *Trichosanthes dioica* Roxb. Cytologia, 52: 419-423.
- Dharma, B. 1993. Description of two new species of *Amphidromus* from Sumatra, Indonesia (Gastropoda): Pulmonata: (Camaenidae). Apex, 8(4): 139-143.
- Fulton, H. C. 1896. A list of the species of *Amphidromus* Albers, with critical notes and descriptions of some hitherto undescribed species and varieties. Annals and Magazine of Natural History, 6(17): 66-94.
- Goldberg, R. and Severns, M. 2000. Isolation and evolution of the *Amphidromus* in Nusa Tenggara. American Conchologist, 25(2) : 111-119.
- Hussain, L. A. and Elkington, T. T. 1978. Giemsa C-band Karyotypes of diploid and triploid *Allium caeruleum* and their genomic relationship. Cytologia, 43: 405-410.
- Johan-Nesson, K. and Tatarenkov, A. 1997. Allozyme variation in a snail (*Littorina saxatilis*) deconfounding the effect of microhabitat and gene flow. Evolution, 51 (2) : 402-409.

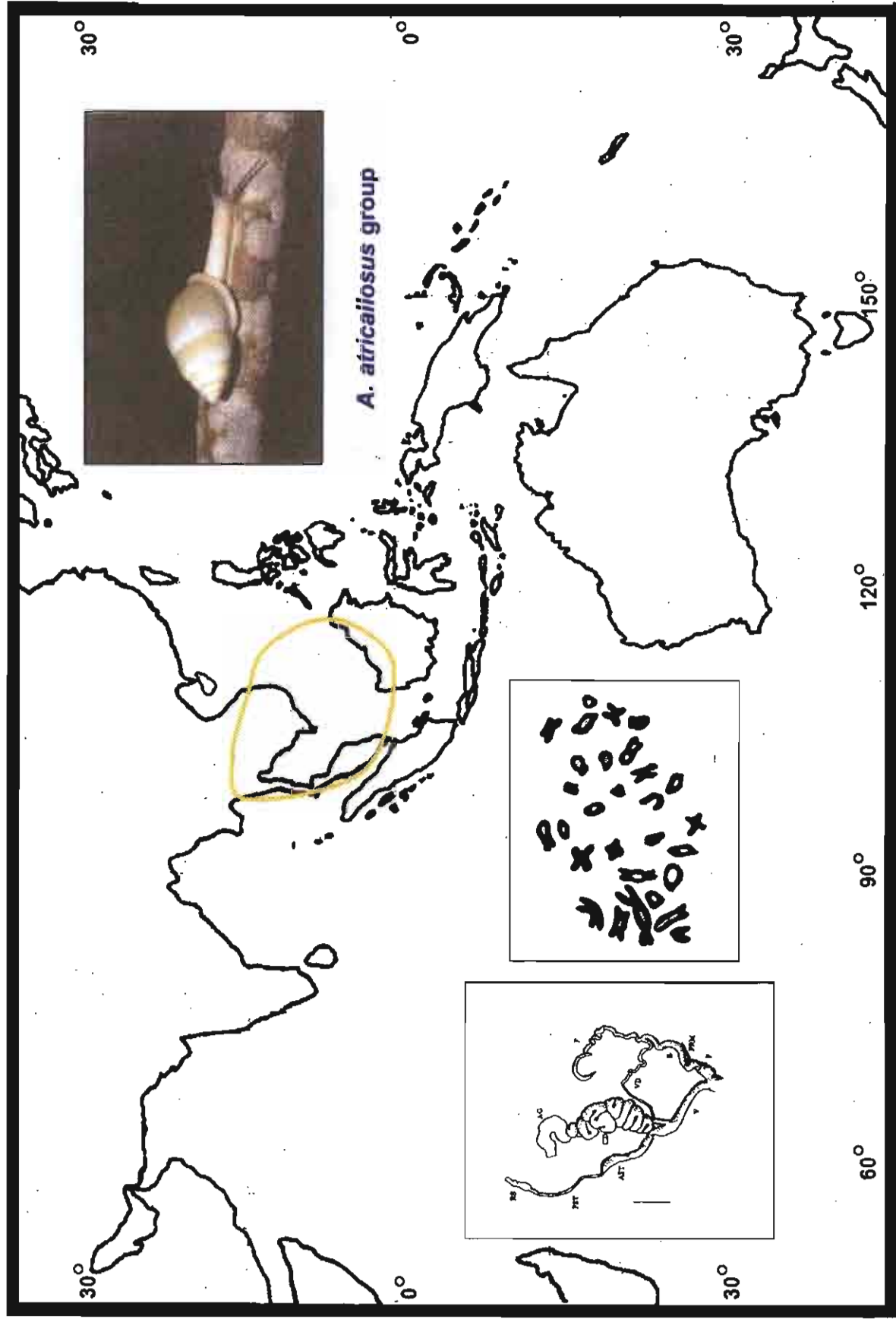
- Karasawa, K. and Tanaka, R. 1980. C-banding on centric fission in the chromosome of *Paphiopedilum*. *Cytologia*, 45: 97-102.
- Laidlaw, F.F. and Solem, A. 1961. The land snail genus *Amphidromus*, a Synoptic Catalogue, *Fieldiana : Zoology*, 41(4) : 505-677.
- Laws, H. M. 1973. The chromosomes of some Australian camaenid land snails. *Cytologia*, 38: 229-235.
- Minato, H. 1979. Notes on *Amphidromus* (Camaenidae) from Komoto Island, Indonesia. *Shells of Kyusho*, 13: 15-17 (in Japanese).
- Natayaganova, A., Scherbakov, D. and Graphodatsky, A. 1997. G- and C-banding of chromosomes in *Baicalasellus angarensis* (Crustacea: Isopoda). *Cytologia*, 62: 177-180.
- O' Brien, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltzer, D., Colly, L., Everman, J.F., Bush, M. and Wildt, D.E. 1985. Genetic basis for species vulnerability in the *Cheetah*. *Science*, 227 : 1428-1434.
- Panha, S. 1996. A checklist and classification of the land pulmonate snails in Thailand. *Walkerana*, 8(19) : 11-34.
- Panha, S., Meesukko, C., Dumrongrojwatana, P. Karnchanasaka, B., Thanamitramanee, P. and Burch, J. B. 2000. Karyotype of *Amphidromus atricallosus* (Gould, 1844) from Thailand. *Malacological Review*, 32(1/2): 147-152.
- Panha, S., Sutcharit, C., Maneewong, A., Tongkerd, P. and Burch, J.B. 2000. Morphogeography of an endemic Southeast Asian tree snail genus *Amphidromus*. Abstract on Sixth International Congress on Medical and Applied Malacology, September 4-8, 2000 at Havana Cuba, p. 44.
- Panha, S., Sutcharit, C., Maneewong, A. and Burch, J.B. 2001. Two new species of *Amphidromus* from Thailand with anatomical notes on several species (Pulmonata : Camaenidae). *The Nautilus*, (in press).
- Pilsbry, H. A. 1900. *Manual of Conchology*, 13(2): 1-253.
- Satoshi, C. 1999. Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the Oceanic Bonin Island : Evidence from mtDNA sequence. *Evolution*, 53(2) : 460-471.

- Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2: 971-972.
- Solem, A. 1959. Systematics and Zoogeography of the land and fresh-water Mollusca of the New Hebrides. *Fieldiana: Zoology*, 43: 359 pp.
- Solem, A. 1965. Land snails of the genus *Amphidromus* from Thailand. *Proceedings of the United State National Museum, Smithsonian Institution*, 17(3519): 615-627.
- Solem, A. 1966. Some non-marine mollusks from Thailand, with notes on classification of Helicarionidae. *Spolia Zoological Musei Hauniensis, Copenhagen*, 24: 1-110.
- Solem, A. 1983. First record of *Amphidromus* from Australia, with anatomical notes on several species (Mollusca: Pulmonata: Camaenidae). *Record of the Australian Museum*, 35: 153-166.
- Summer, A. T. 1982. The nature and mechanisms of Chromosome banding. *Cancer Genet. Cytogenet.* 6: 59-87.
- Summer, A. T. 1994. Chromosome banding and identification absorption staining. *Method in Molecular Biology*. 29: 59-81.
- Woodruff, D.S. and Solem, A. 1990. Allozyme variation in the camaenid land snail *Cristilabrum primum* : A prolegomenon for molecular phylogeny of an extraordinary radiation in an isolated habitat. *Veliger*, 33(2) : 129-139.

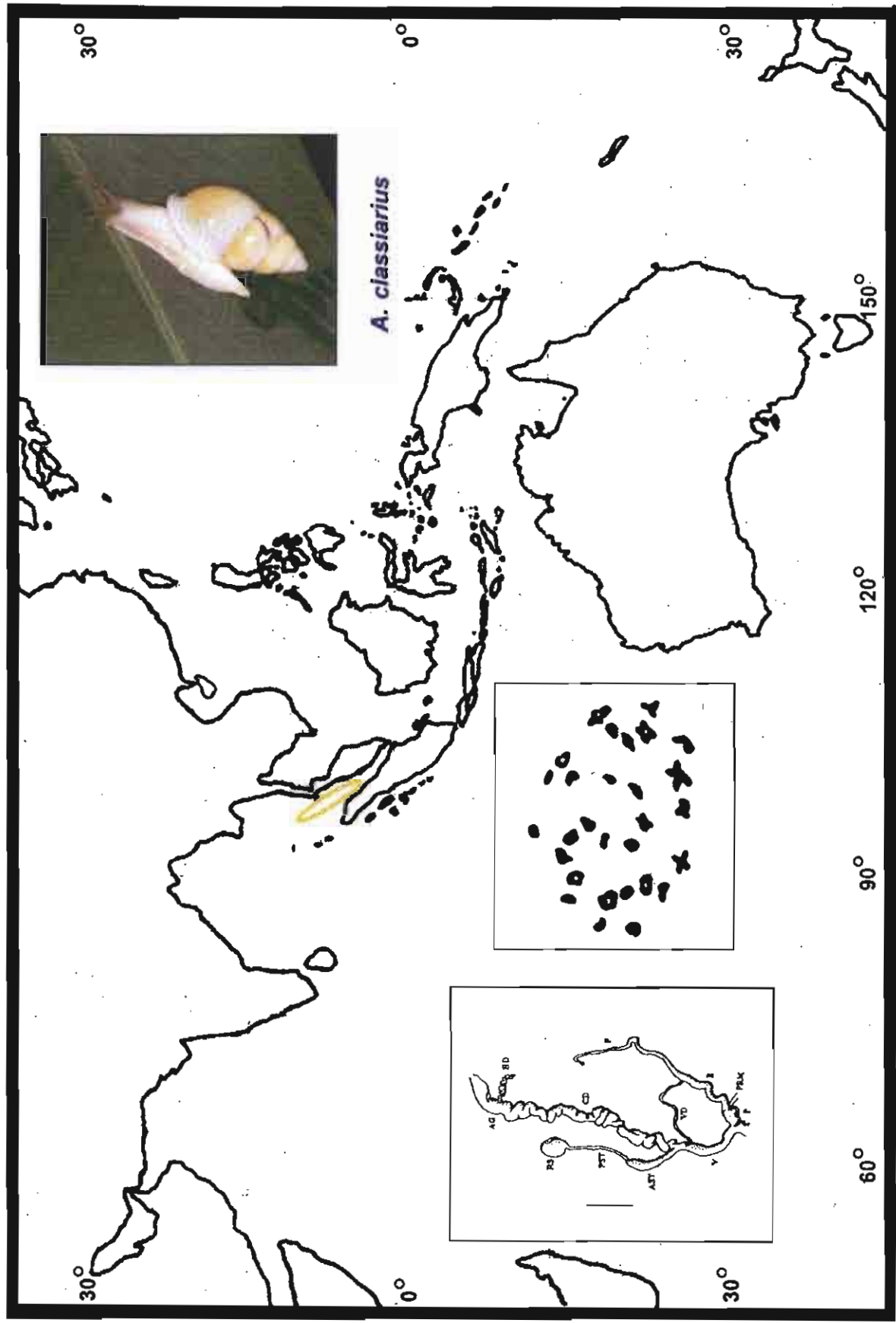
<http://www.geocities.com/~sangioul/exchange.html>, October, 2000

ภาคผนวก 1

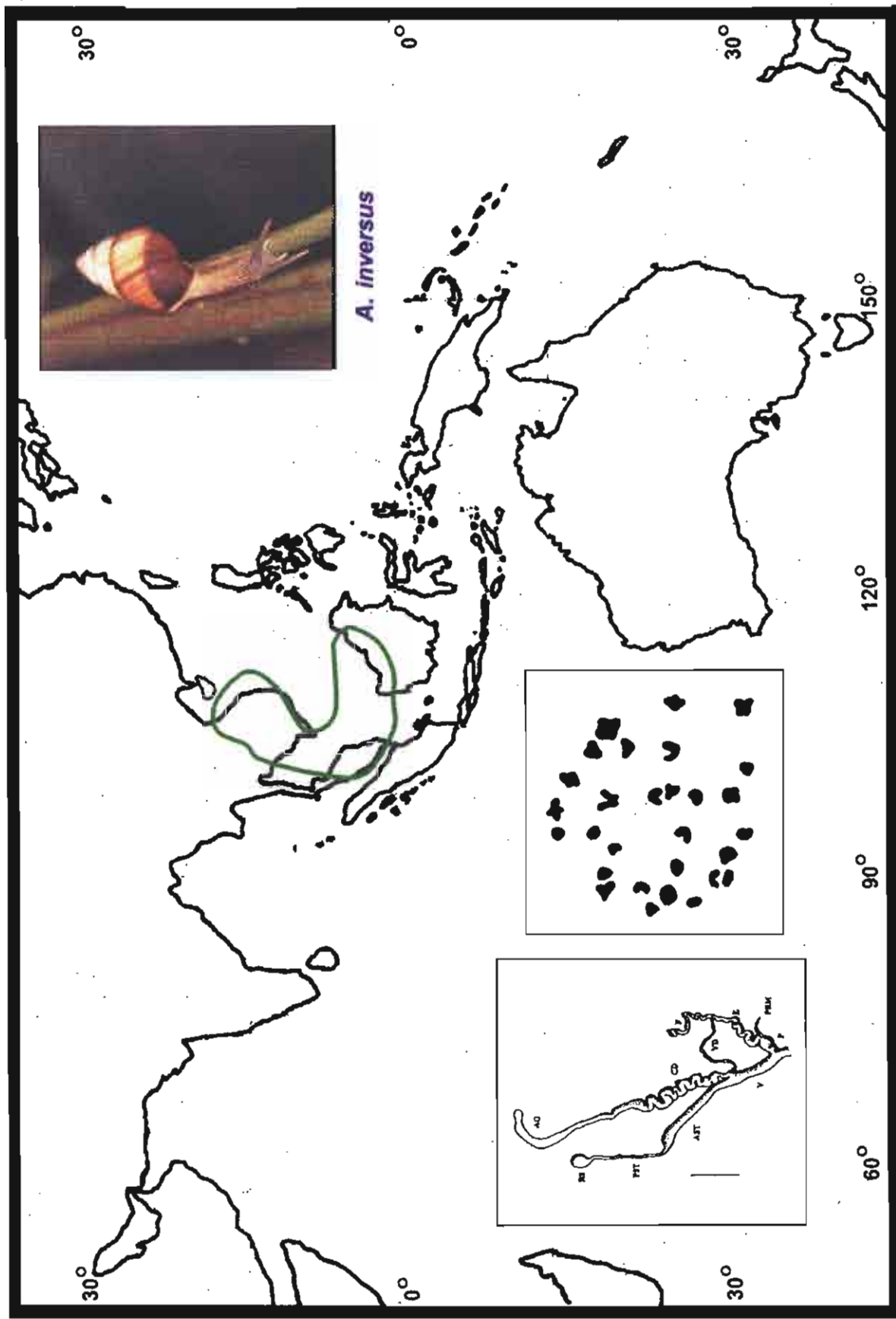
1. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอย ***A. atricallosus*** group
2. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. classiarlus***
3. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. inversus***
4. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. perversus***
5. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. schomburgki***
6. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. siminis***
7. การกระจายทางภูมิศาสตร์ของหอยชนิด ***A. tanyai***
8. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***Amphidromus* sp. 1**
9. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***Amphidromus* sp. 2**
10. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. areolatus***
11. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. flavus***
12. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. glaucolarynx***
13. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. principlalis***
14. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. semitessellatus***
15. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. sinensis***
16. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. xiengensis***
17. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด ***A. laoslanus***
18. แสดงการไอโทปี (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกขมชนิด ***Amphidromus atricallosus*** (A) และชนิด ***Amphidromus classiarlus*** (B)
19. แสดงการไอโทปี (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกขมชนิด ***Amphidromus inversus*** บนแผ่นดินใหญ่ (A) และสิงคโปร์ (B)
20. แสดงการไอโทปี (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกขมชนิด ***Amphidromus xiengensis*** เชียงใหม่ (A) และ ฉะเชิงเทรา (B)
21. แสดงการไอโทปี (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกขมชนิด ***Amphidromus principlalis*** เกาะกระนครศรีธรรมราช
22. แสดงการไอโทปี (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกขมชนิด ***Amphidromus* sp.** อุบลราชธานี



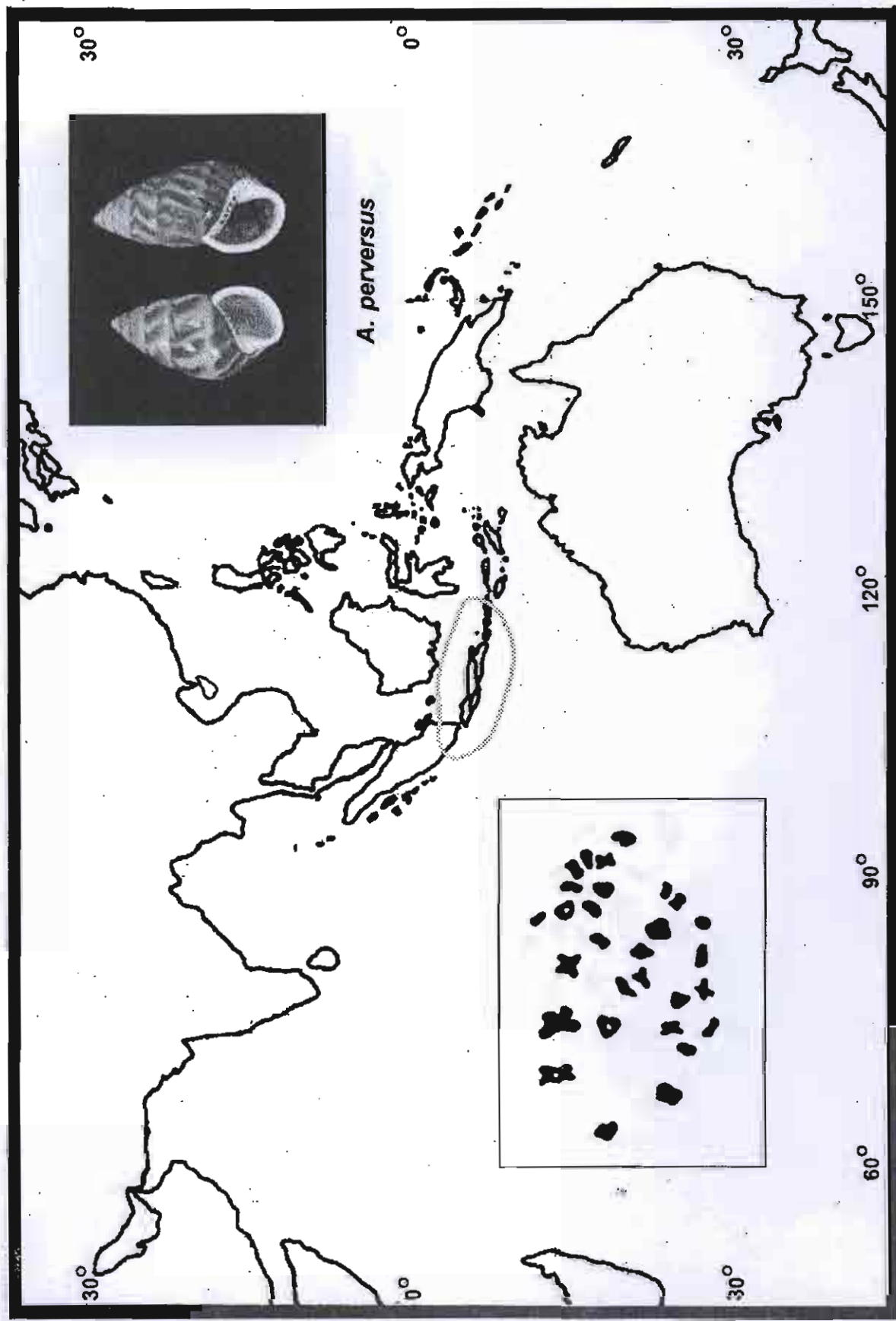
1. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สันฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. atricallus* group



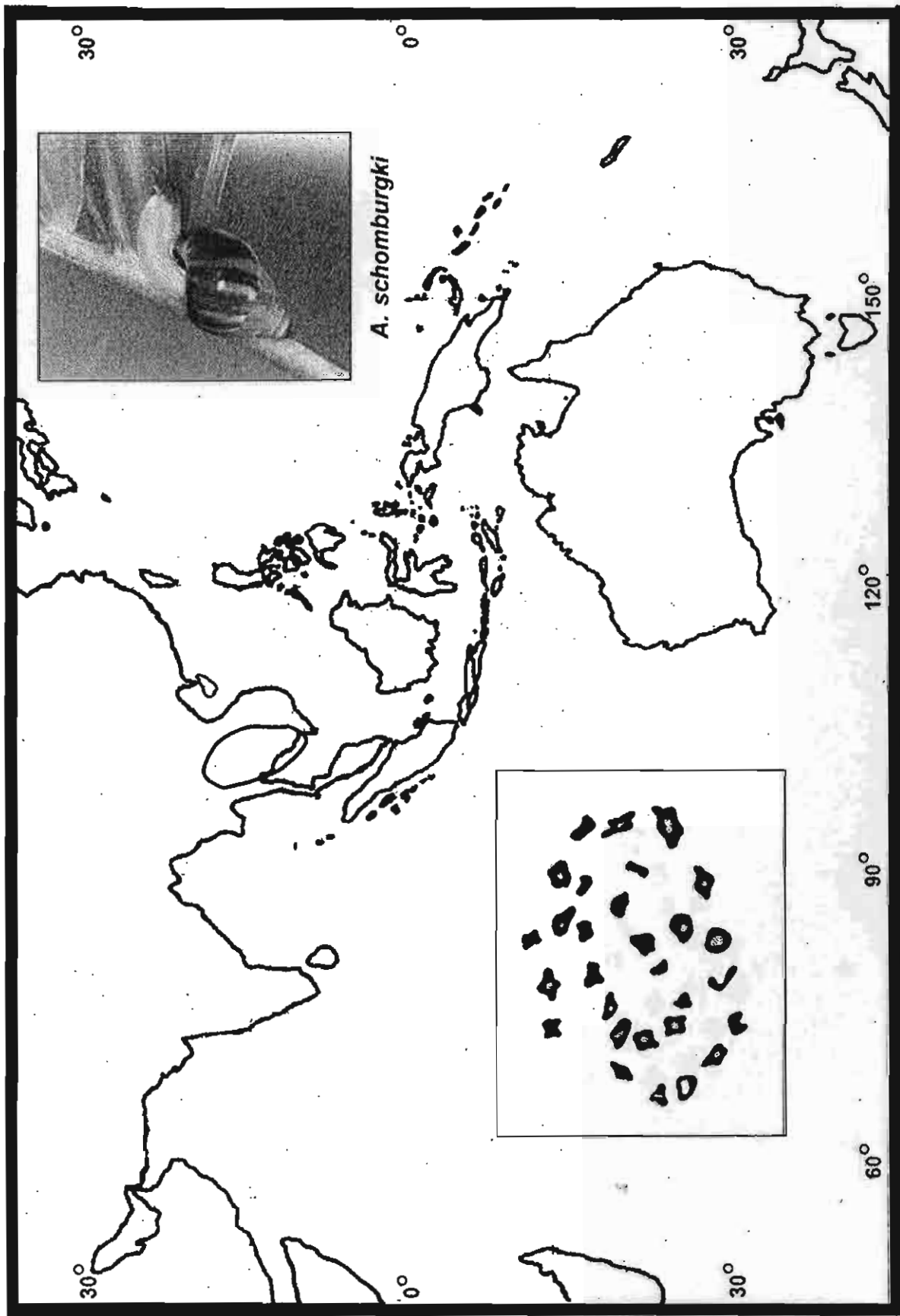
2. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สันฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. classarius*



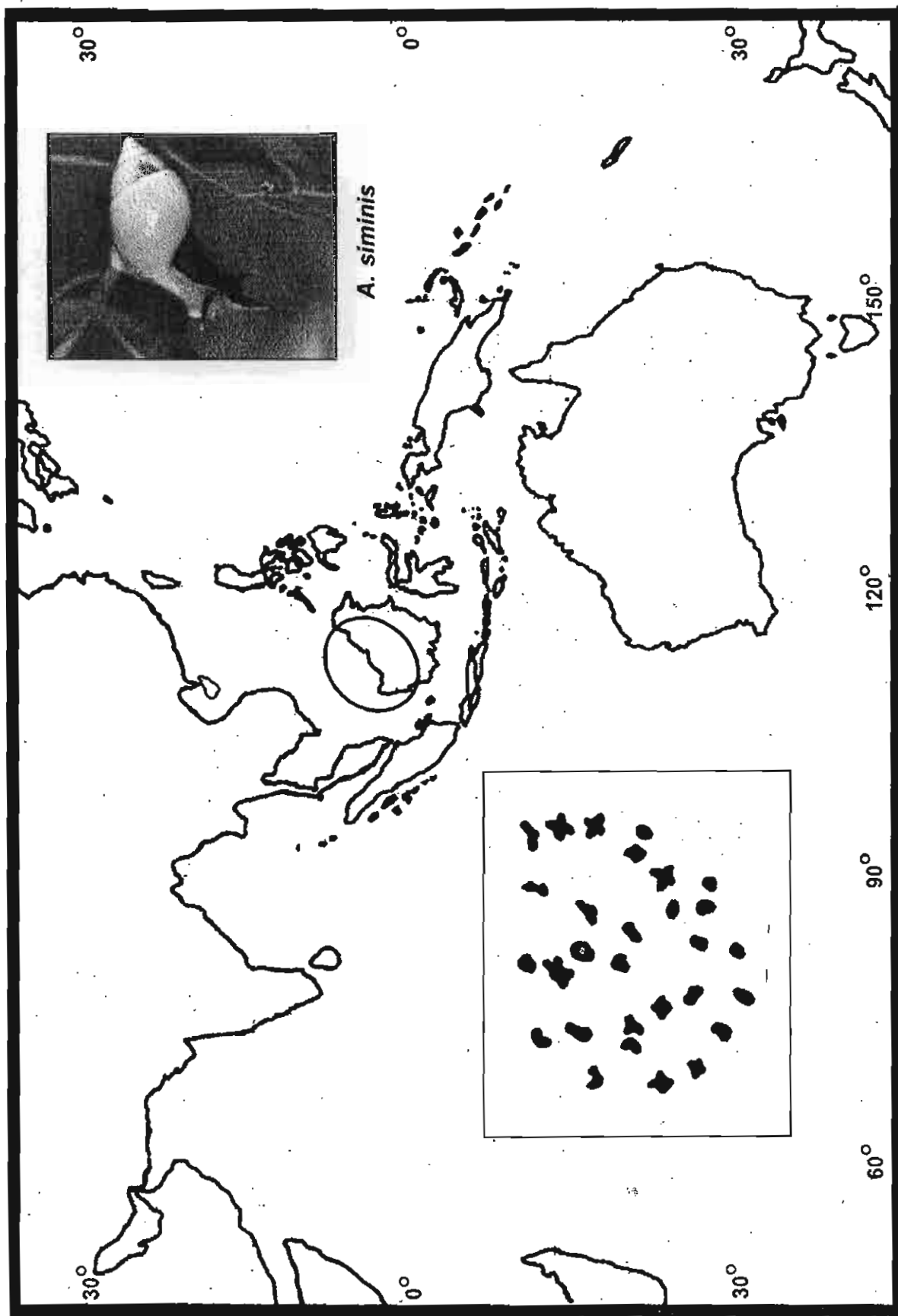
3. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. inversus*



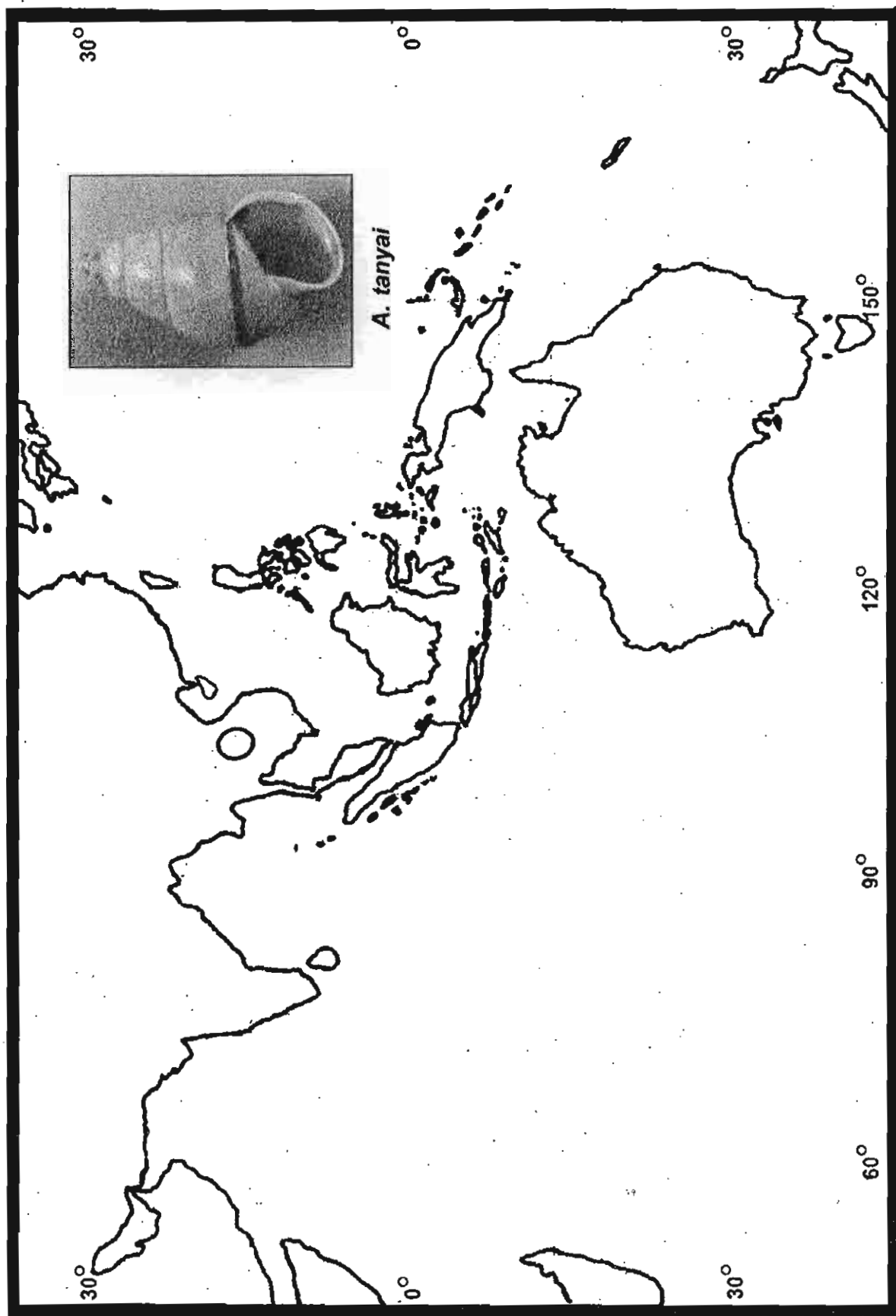
4. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. perversus*



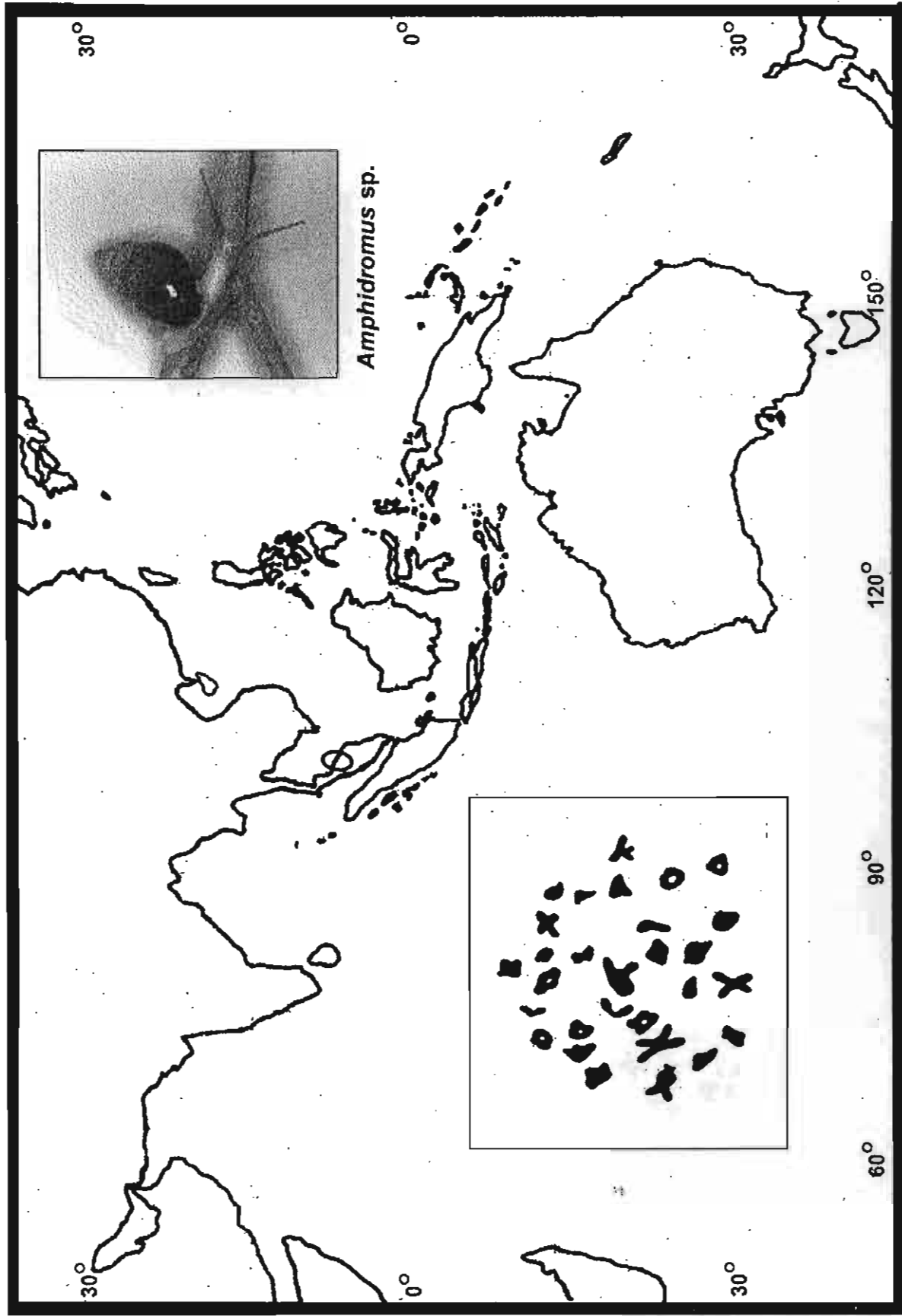
5. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. schomburgki*



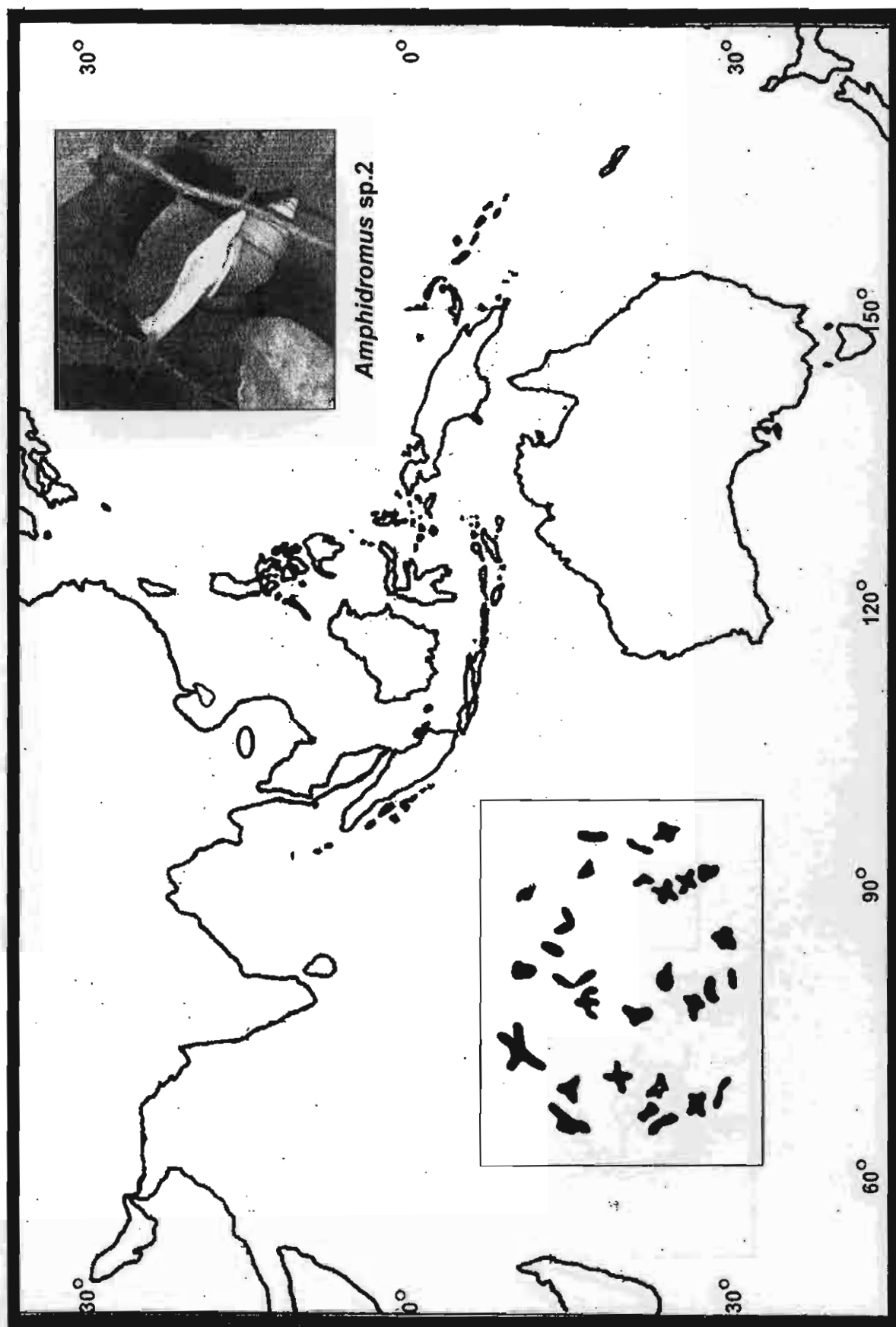
6. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของพอยชนิด *A. siminis*



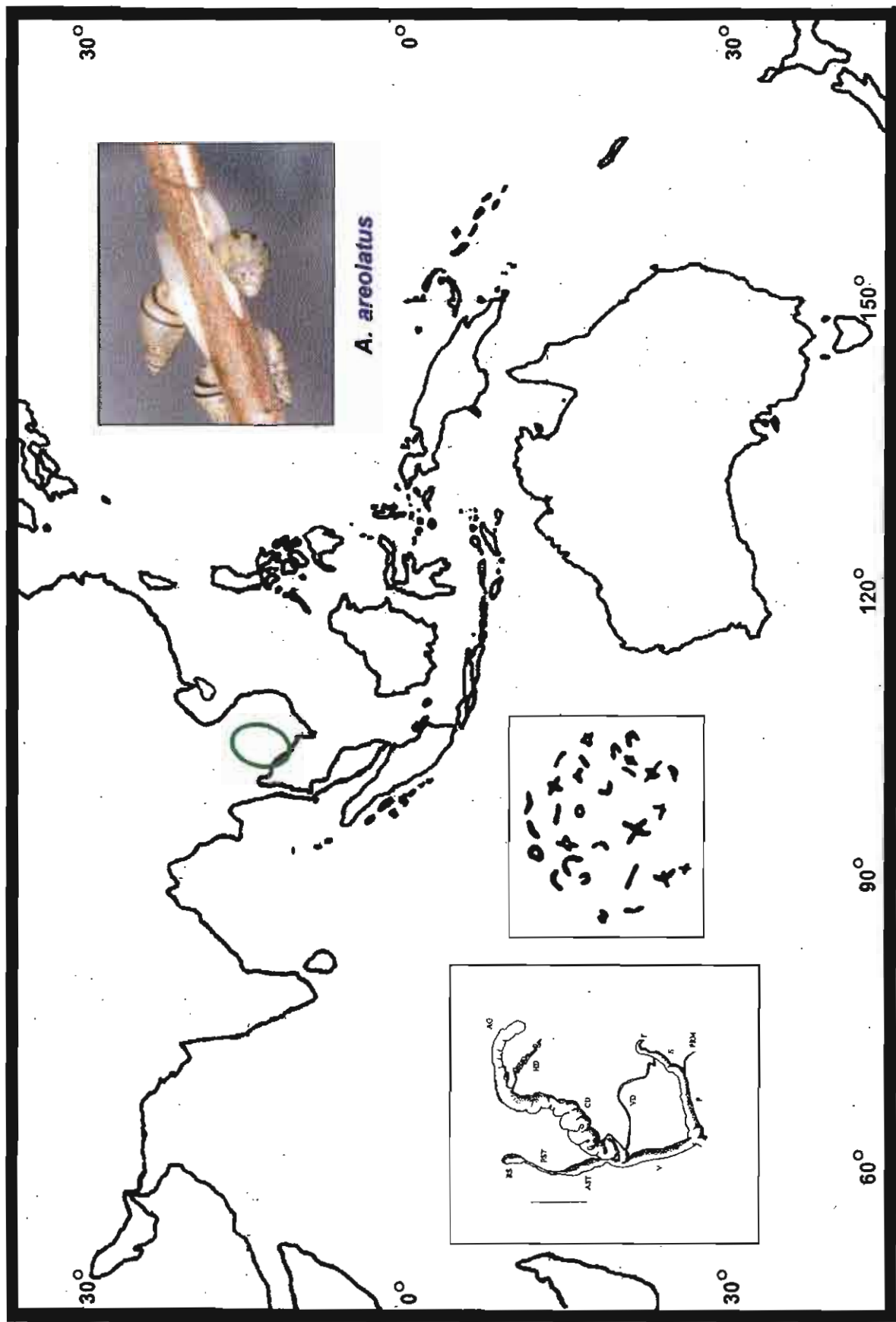
7. การกระจายทางภูมิศาสตร์ของหอยชนิด *A. tanyai*



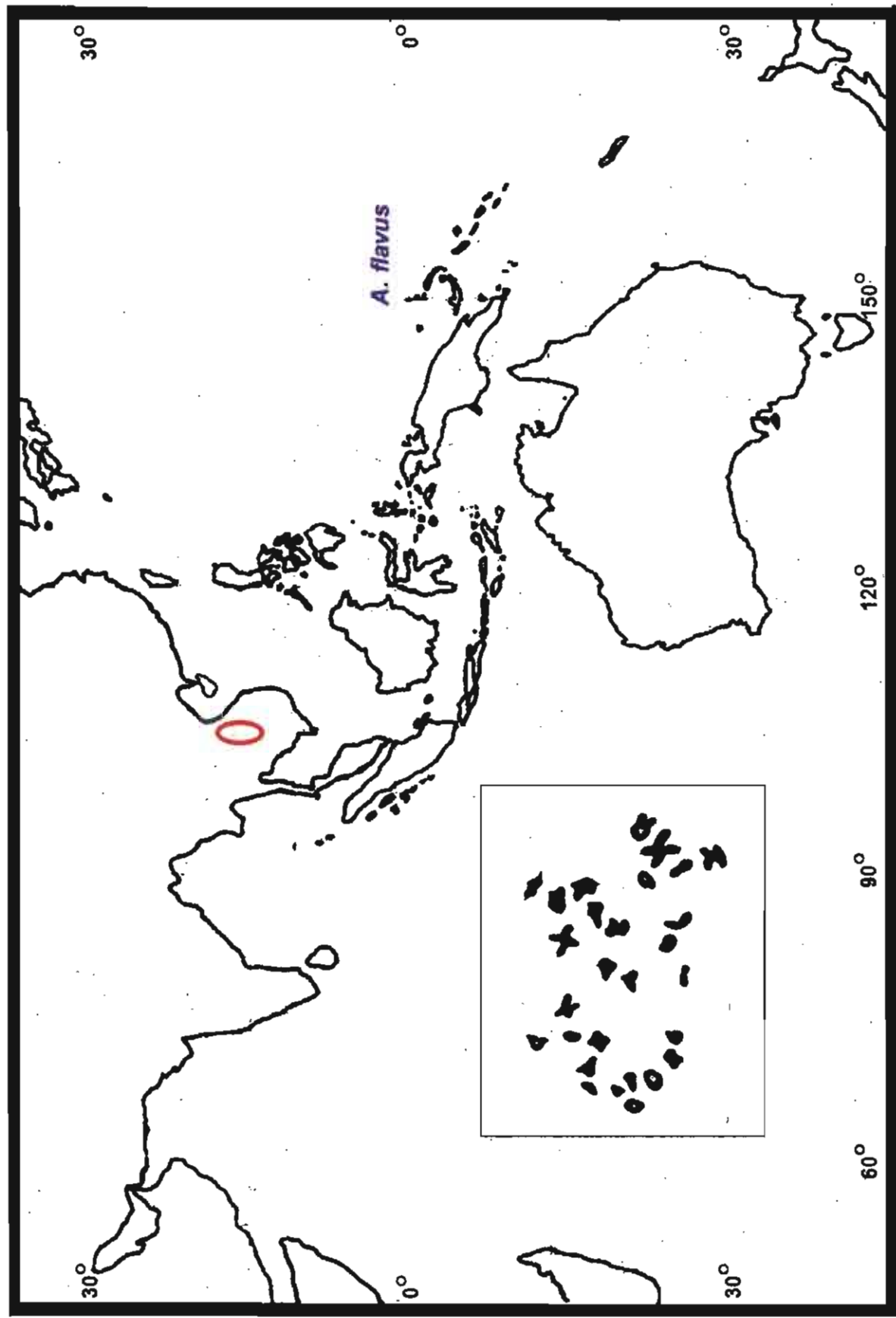
8. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และไครโมไซมของหอยชนิด *Amphidromus* sp.1



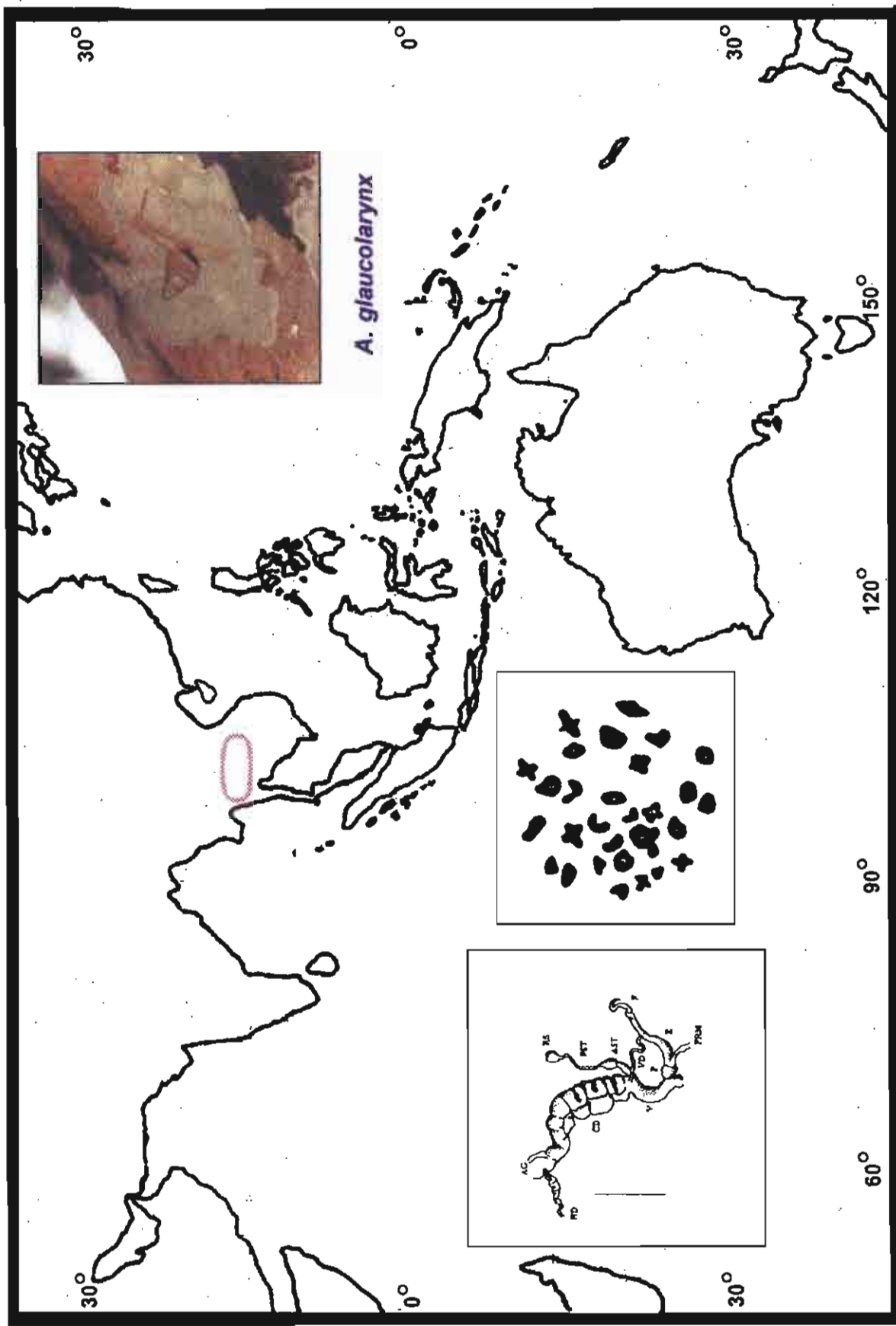
9. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด *Amphidromus* sp.2



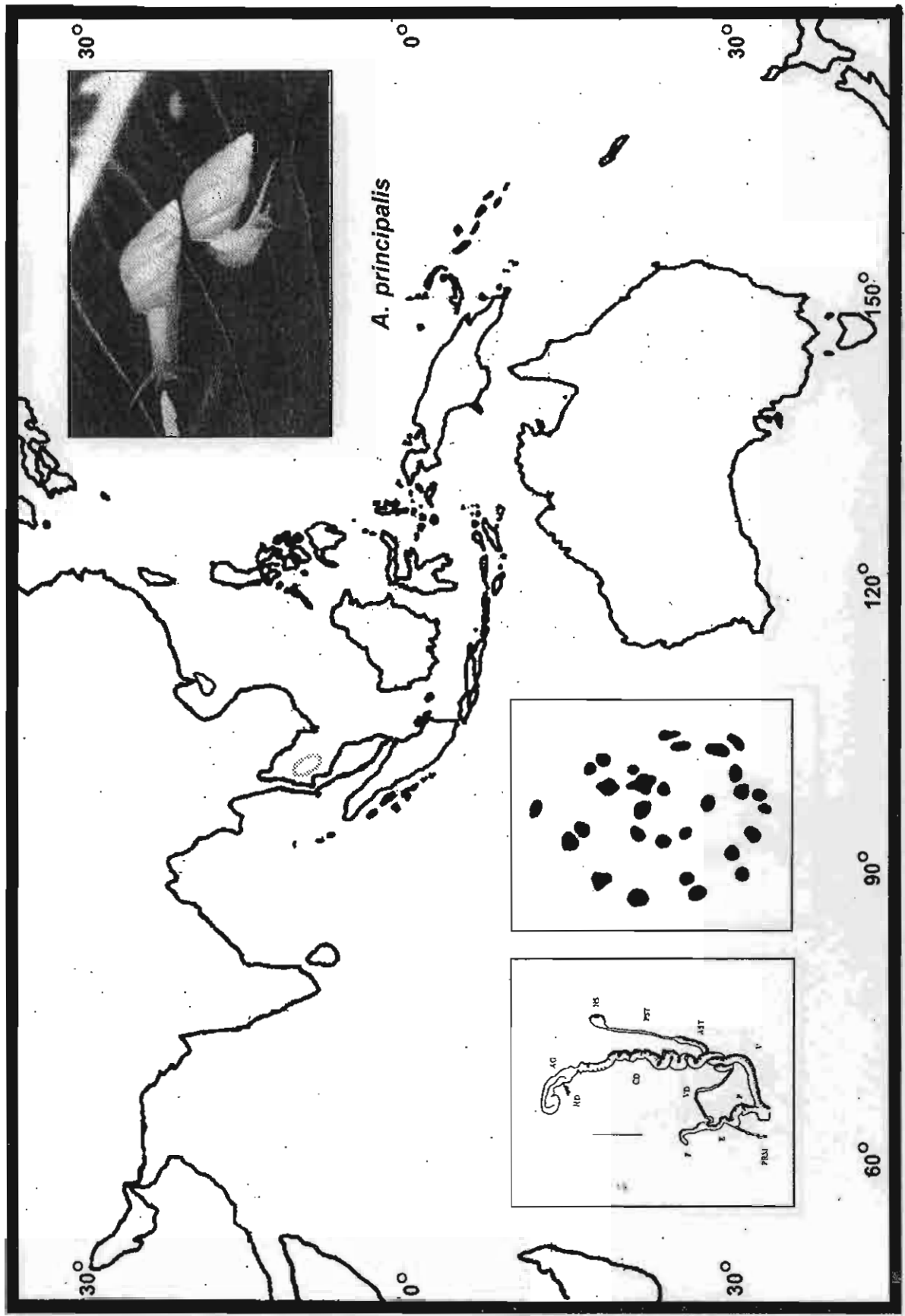
10. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สันฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. areolatus*



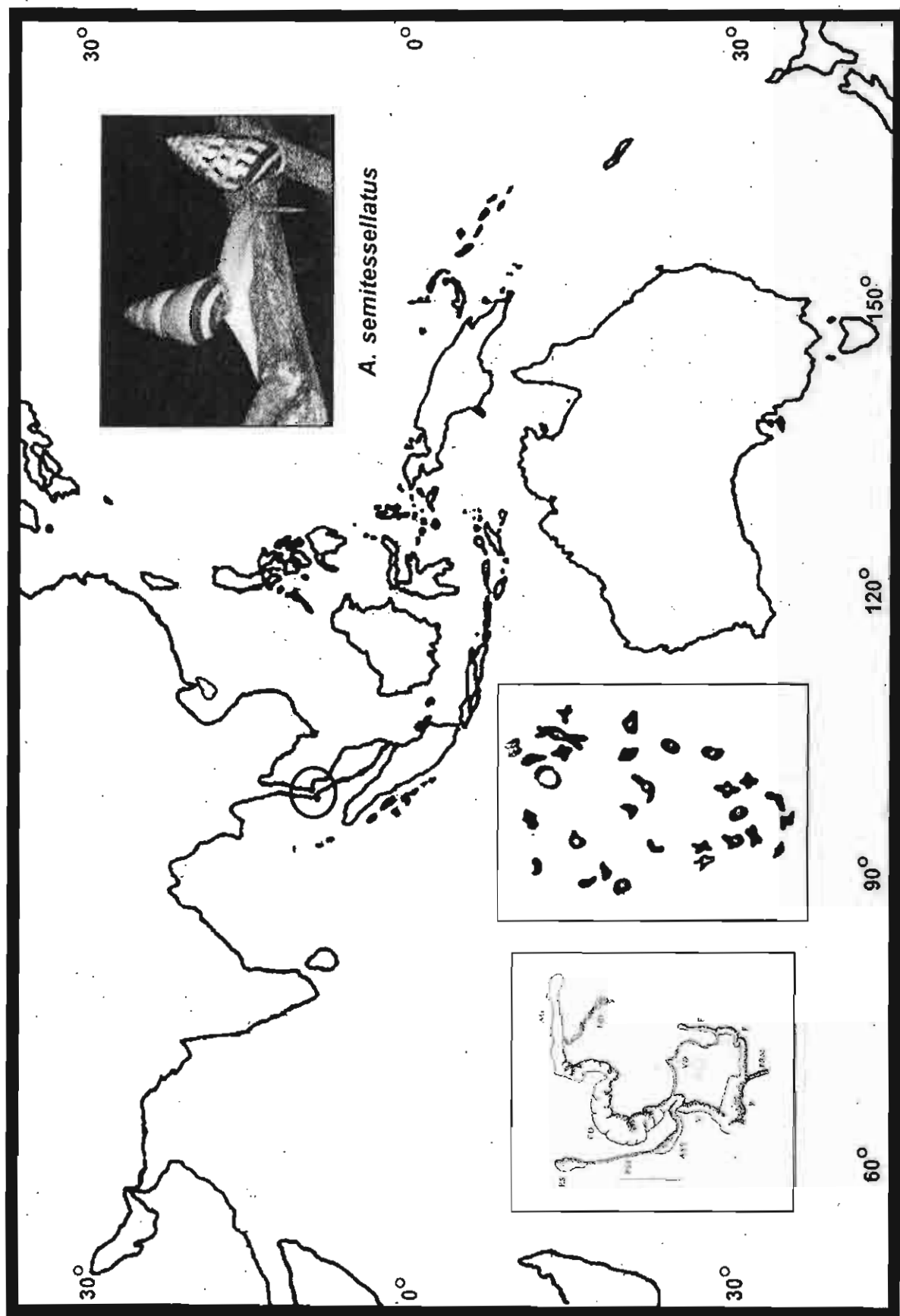
11. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. flavus*



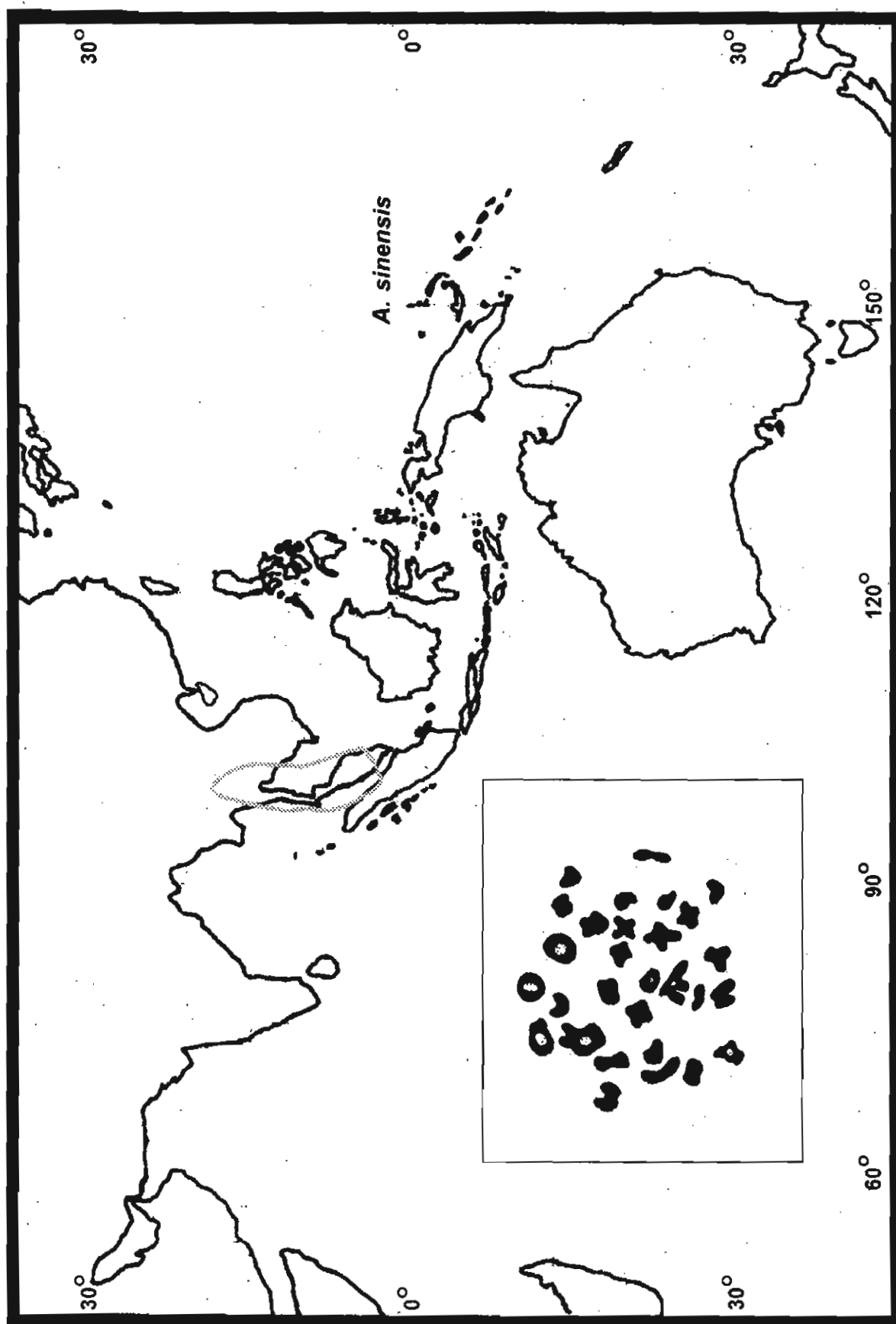
12. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. glaucolarynx*



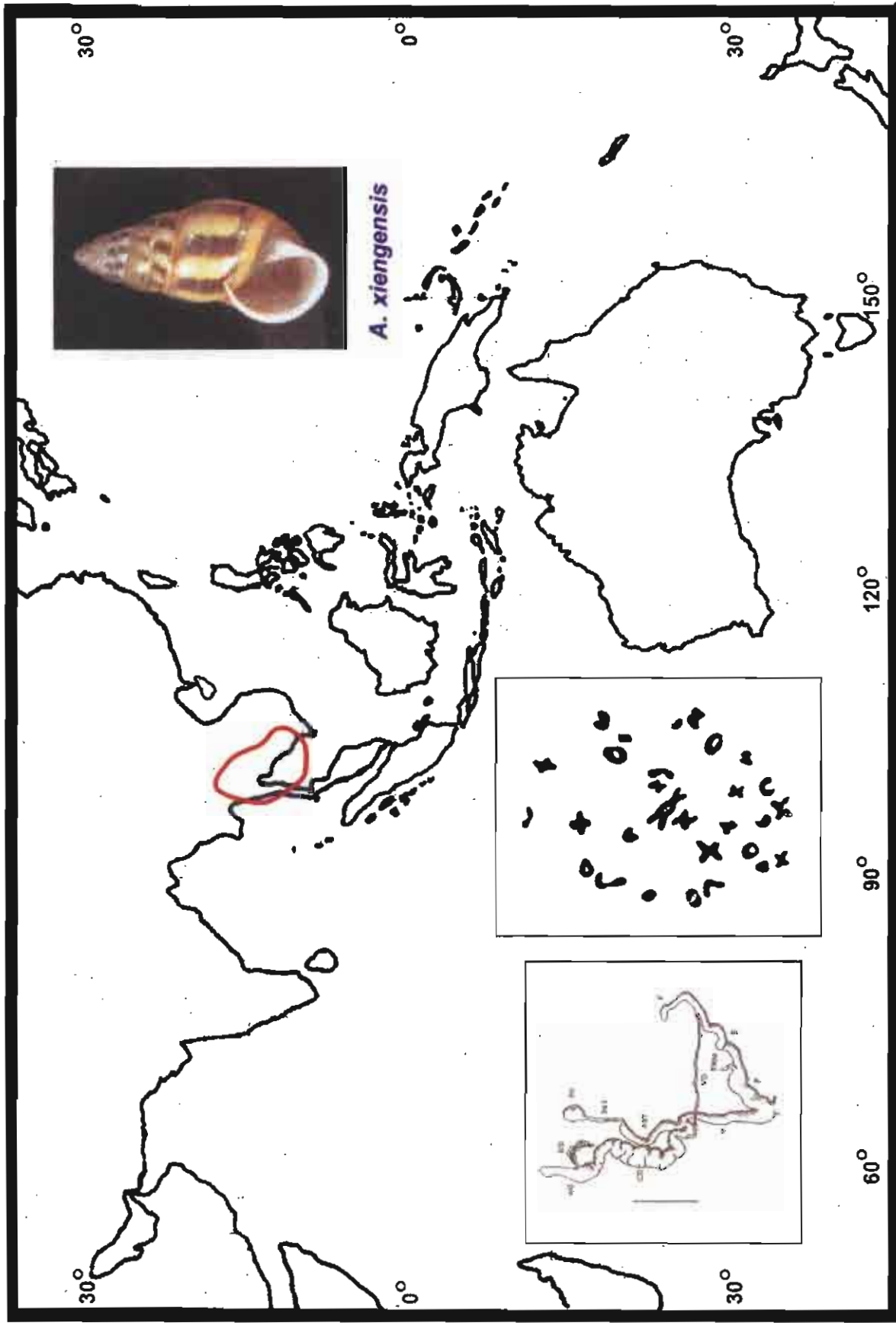
13. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สันฐานวิพาทของอวาระสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. principalis*



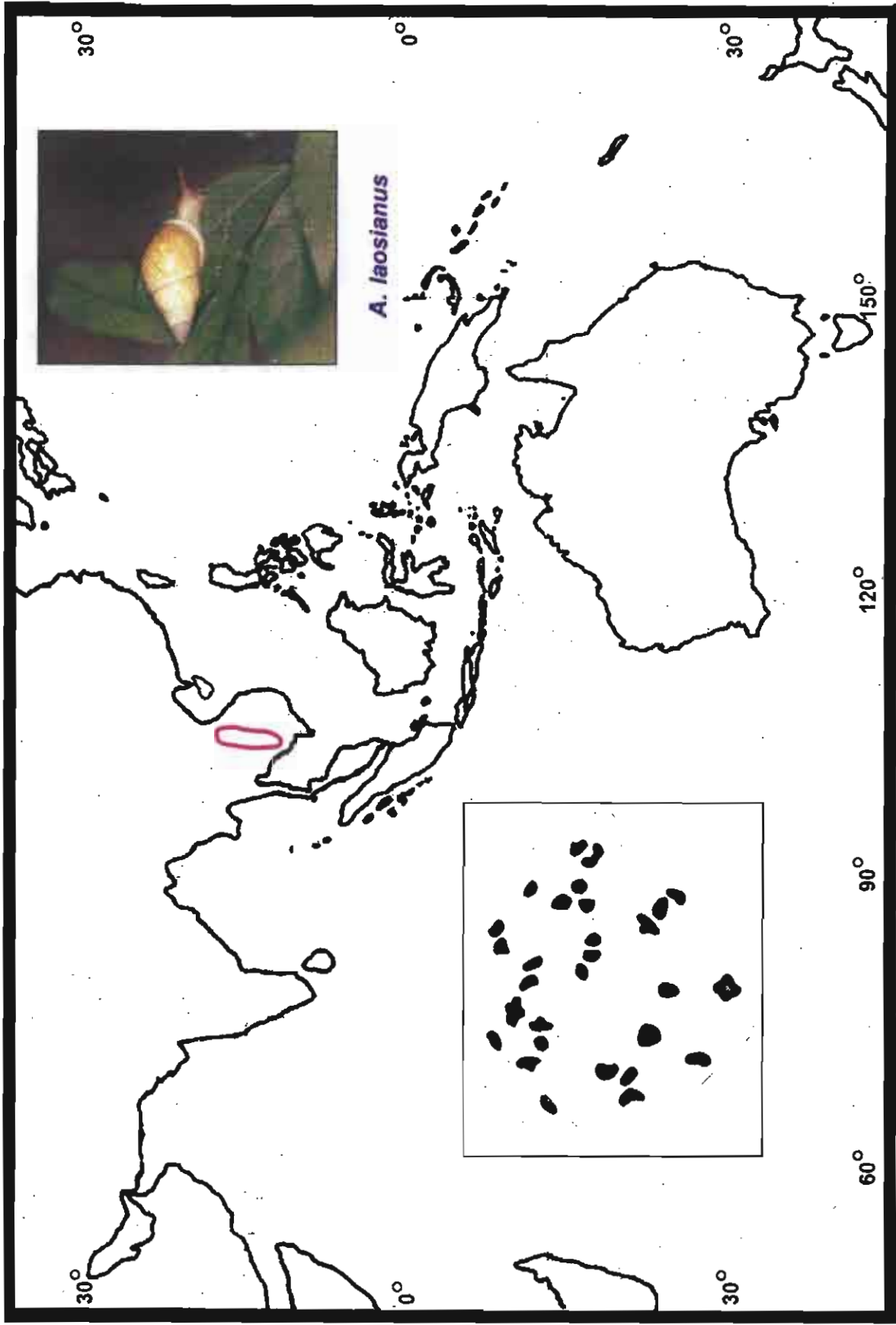
14. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตว์น้ำหายากของอ่าวมะลิพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. semitesellatus*



15. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. sinensis*

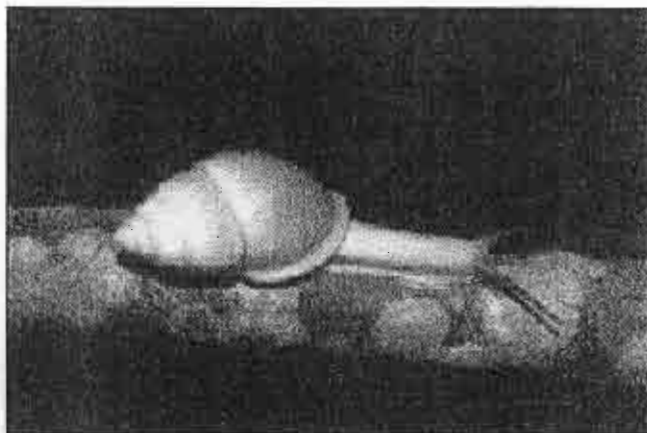


16. การกระจายทางภูมิศาสตร์ สัตฐานาวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. xiengensis*

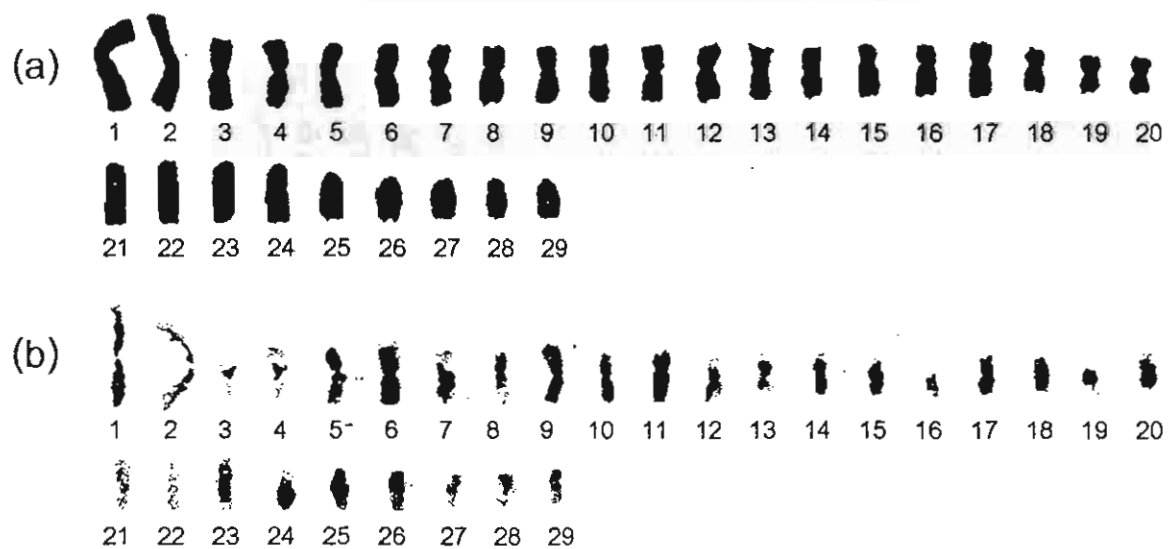


17. การกระจายทางภูมิศาสตร์ และโครโมโซมของหอยชนิด *A. laosianus*

A



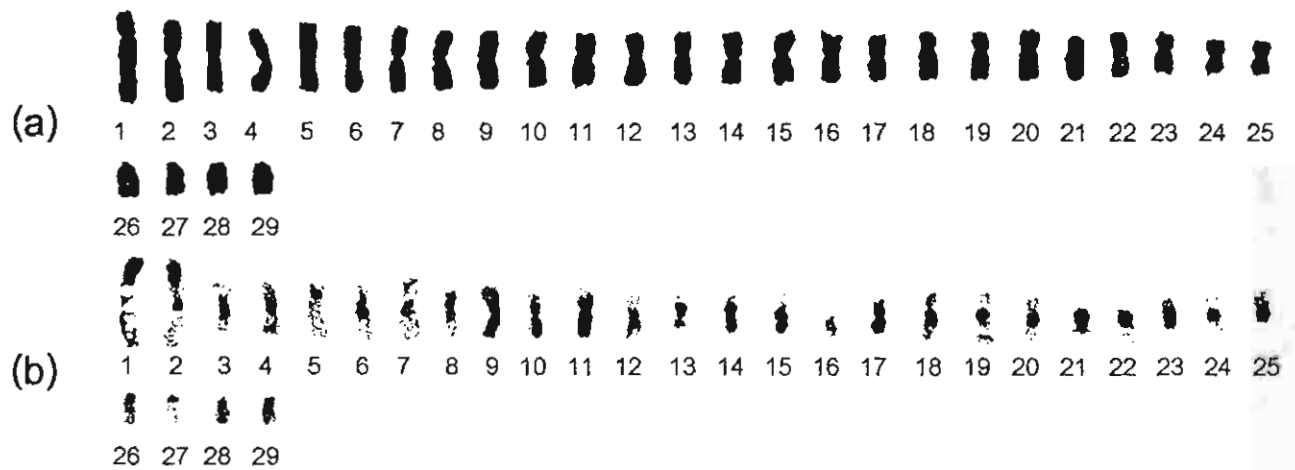
B



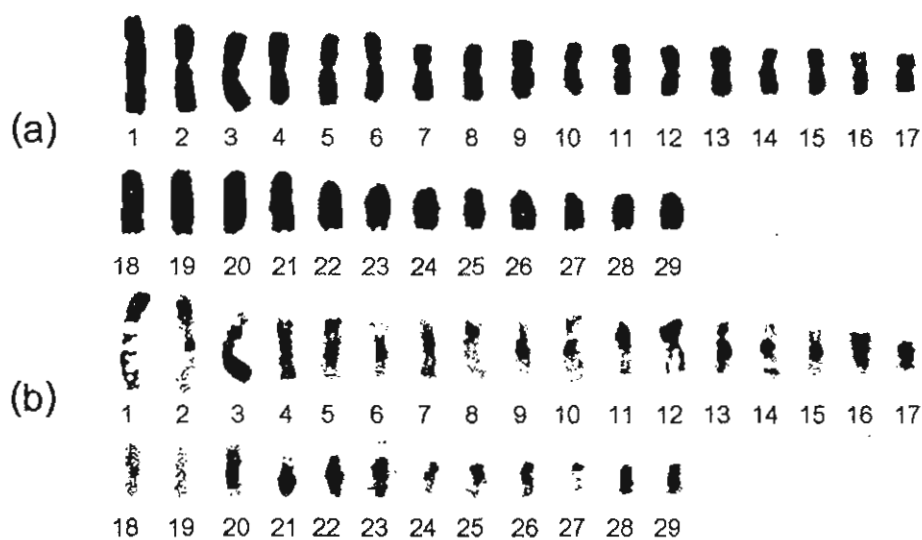
ภาพที่ 18 แสดงคาริโอไทป์ (a) และ C-banding (b) ของหอยนกขมิ้นชนิด *Amphidromus atricallosus* (A) และชนิด *Amphidromus classarius* (B)



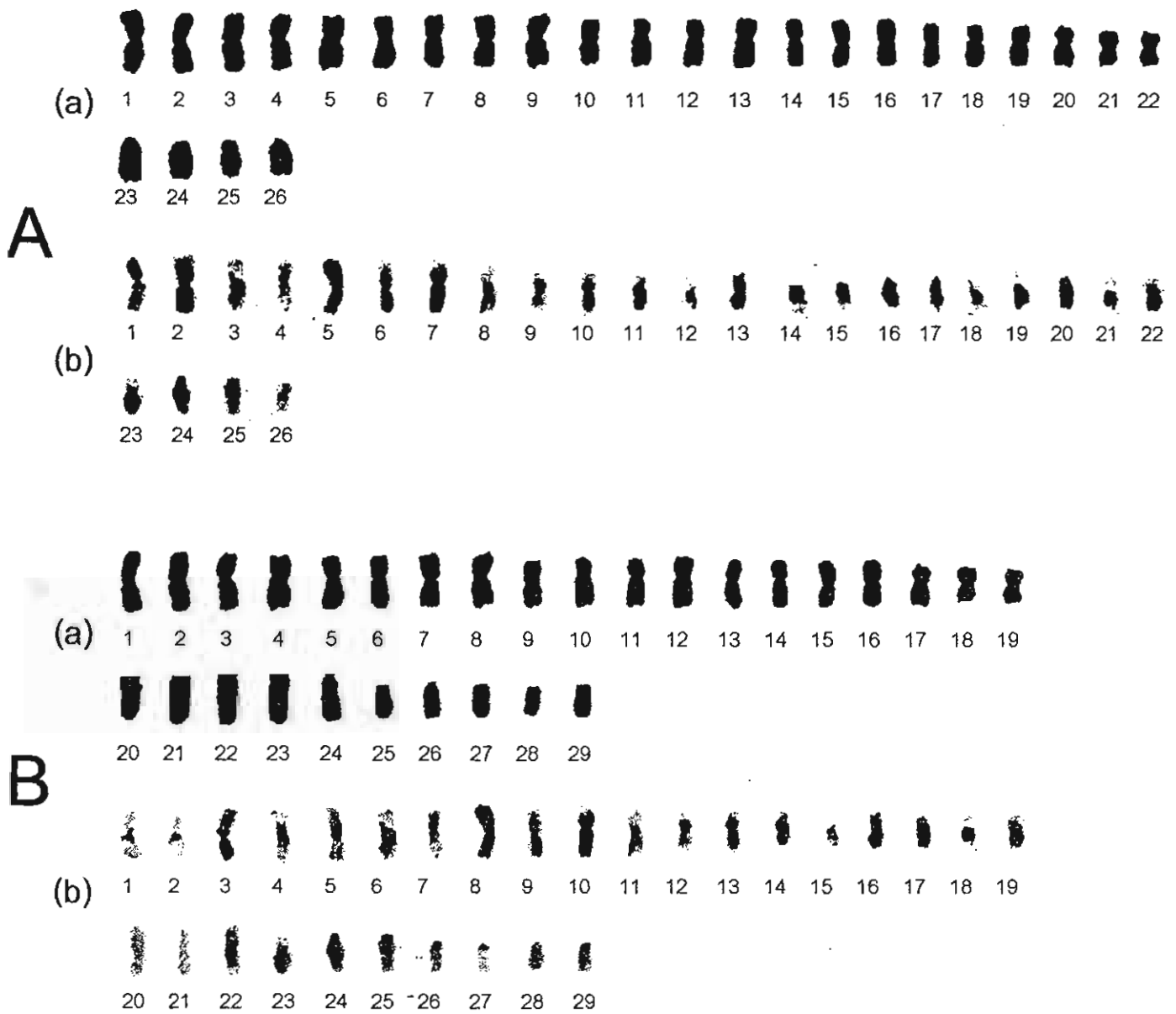
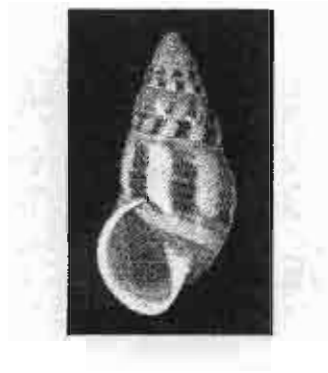
A



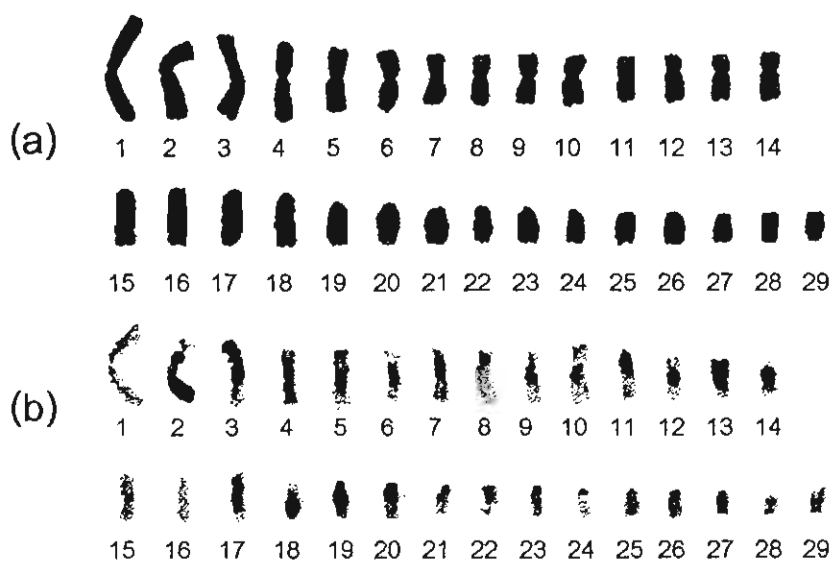
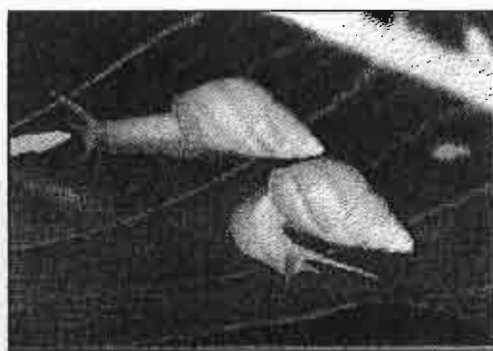
B



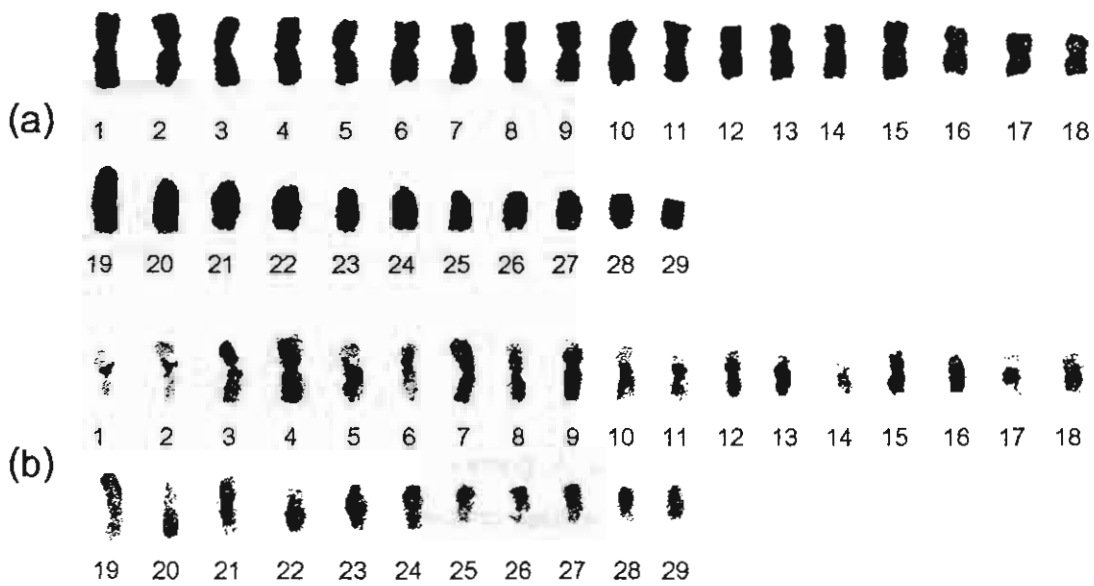
19. แสดงคาริโอไทป์ (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกขมมีหนวด *Amphidromus inversus* บนแผ่นดินใหญ่ (A) และสิงคโปร์ (B)



20. แสดงคาริโอไทป์ (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกบมีนชนิด *Amphidromus xiengensis* เชียงใหม่ (A) และ ฉะเชิงเทรา (B)



21. แสดงคาริโอไทป์ (a) และ C-banding (b) ของหอยนกขมิ้นชนิด *Amphidromus principalis*
เกาะกระ นครศรีธรรมราช



22. แสดงคาริโอไทป์ (a) และ C-banding (b) ของหอยนกกม้นชนิด *Amphidromus* sp. อุบลราชธานี

ภาคผนวก 2

ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติและผลงานตีพิมพ์ และต้นฉบับผลงานที่ได้ส่งไปตีพิมพ์ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติ

ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Panha, S. and Burch, J.B. Land snail faunas of Thailand and neighboring countries. Abstract on The Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology : In *Journal of Medical and Applied Malacology*, 2000, 10 : 244.

ผลงานตีพิมพ์และต้นฉบับ

1. Panha, S. and Ung, L.M. The survival of *Rhinocochlis nasuta* (Metcalf, 1851) in Sarawak. *Walkerana*, 1999 : 9(22) : 67-69. (จะส่ง reprint ตามมาภายหลัง)
2. Panha, S. Meesukko, C., Dumrongrojwatana, P., Karnchanasaka, B., Thanamitramanee, P. and Burch, J.B. Karyotype of *Amphidromus atricallosus* (Gould, 1844) from Thailand. *Malacological Review*, 2000, 32(1/2) : 147-152. (จะส่ง reprint ตามมาภายหลัง)
3. Panha, S. Sutcharit, C., Maneewong, A. and Burch, J.B. Two new species of *Amphidromus* from Thailand with anatomical notes on several species. *The Nautilus* 2001 (accepted for publication).

ISSN 1053-6388

Volume 10

2000

JOURNAL OF
MEDICAL AND APPLIED
MALACOLOGY



INTERNATIONAL SOCIETY FOR MEDICAL AND APPLIED MALACOLOGY

often resulted in a concomitant increase of species richness. The example of the Caribbean island of Martinique is particularly relevant of this situation. Fifteen freshwater species may be considered as native on this island, but during the last five decades, thirteen new taxa have been added to the local fauna. The introduced snails include four planorbids (*Biomphalaria straminea*, *Helisoma duryi*, *Amerianna carinata* and *Gyraulus* sp.), eight thiarids (five distinct morphs of *Melanoides tuberculata*, *Thiara granifera* and *Thiaridae* sp.) and one ampullarid (*Marisa cornuarietis*). The introduction of foreign species resulted mainly in an increase of the species richness. However, populations of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea*, the intermediate snail hosts of schistosomes on the island, were strongly reduced in numbers and density following the invasion of the whole hydrographic system of Martinique by thiarid snails.

¹Laboratoire de Biologie Marine et Malacologie, École Pratique des Hautes Études, Centre de Biologie et d'Écologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan, Perpignan France.

LAND SNAIL FAUNAS OF THAILAND AND NEIGHBORING COUNTRIES

Somsak Panha^{1,2} and John B. Burch^{1,2,3}

Nearly all species of non-marine mollusks either do or probably can serve as an intermediate host for some trematode or nematode parasites. Therefore a detailed knowledge of the snail fauna of any geographic region is important for parasitology. Despite a century of shell collecting, and of increased biodiversity awareness in recent years, the land snail faunas of Thailand and neighboring countries have never been comprehensively assessed. We surveyed and collected land snails from all habitat types in Thailand, and in some parts of Myanmar, Laos, Vietnam, Malaysia, Singapore and Indonesia. Of the more than two thousand species of mangrove and land snails in this area, the mangrove pulmonates are the least regionalized, some species being almost cosmopolitan in their distribution, e.g., *Ellobium aurismidae* (Linnaeus 1758), *E. aurisjudae* (Linnaeus 1758), *Cassidula aurisfelis* (Bruguière 1789) and *Melampus* (*Melampus*) *fasciatus* (Deshayes 1830). On the other hand, the land operculates and land pulmonates show very specific diversity and evolution in each country, particularly among the micro snails. The most diverse species areas are the Malay Peninsula and Borneo. Of the ca. 600 Thai land snail species already described and published, only about 5% are endemics. The rest are shared with the faunas of neighboring countries. Most of the beautiful tree snails are endangered, e.g., snails of the genera *Papuina* and *Amphidromus*. However, some snails that formerly were reported to be extinct, i.e., *Rhinocochlis nasuta* (Metcalf 1851) and *Amphidromus glaucolarynx* (Dohrn 1861), were found living.

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

²Museum of Zoology and ³Department of Biology, College of Literature, Science and the Arts, and School of Natural Resources and Environment, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, U.S.A.

Phylogeny

EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS OF THE FRESHWATER MUSSELS (BIVALVIA: UNIONOIDA) AS ASSESSED BY MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL COMPARISONS

Arthur E. Bogan¹, W.R. Hoeh² and W. Heard³

The lack of a robust phylogenetic hypothesis for the higher taxa within the Unionoida has impeded evaluations of character state evolution within the group. Relationships within the Unionoida were initially assessed using comparisons of cytochrome oxidase subunit (COL)

THE NAUTILUS

July 25, 2000

Dr. Somsak Panha
Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Bangkok, 10330 THAILAND

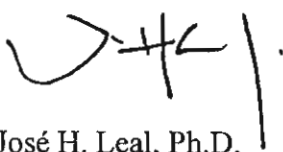
Re: Ms. No. 00-18 "Two new species of *Amphidromus* from Thailand with anatomical notes on several species (Pulmonata: Camaenidae)", by Somsak Panha, Chirasak Sutcharit, Anchira Maneewong, and John B. Burch

Dear Dr. Panha,

This will formally acknowledge receipt of your above referenced manuscript, which will be sent to reviewers for consideration for publication in *The Nautilus*.

In any further communications, please refer to the manuscript number above cited.
Thanks for considering *The Nautilus* for the publication of your work!

Sincerely,



José H. Leal, Ph.D.
Editor
jleal@gate.net

ta:JHL

Two new species of *Amphidromus* (Stymmatophora, Camaenidae) from Thailand,
with notes on shell morphology and anatomy of some other species of the genus

Somsak Panha^{1,2}, Chirasak Sutcharit¹, Anchira Maneewong¹, and John B. Burch^{2,3,4}

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

²Museum of Zoology, College of Literature, Science and the Arts, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, U.S.A.

³Department of Biology, College of Literature, Science and the Arts, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, U.S.A.

⁴School of Natural Resources, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, U.S.A.

ABSTRACT

Floristic and faunistic surveys in April 1999 and April 2000 of Thai islands were carried out under the sponsorship of the Plant Genetics Conservation Project of the Royal Initiative of Her Royal Highness, Princess Maha Chakri Sirindhorn. As part of that project, the land snails of Tachai Island in the Andaman Sea and Kra Island in the Gulf of Thailand were investigated. Two new species of the tree snail genus *Amphidromus* were discovered. Descriptions of the new species include characters of shell morphology, shell color pattern, radulae, and genital anatomy. *Amphidromus* (*Amphidromus*) *classarius* new species is characterized by ... *Amphidromus* (*Syndromus*) *principalis* new species is characterized by ... Anatomical notes on some other species of the genus are included.

INTRODUCTION

The Plant Genetics Conservation Project of the Royal Initiative of Her Royal Highness, Princess Maha Chakri Sirindhorn, has recently given tremendous support to Thai biodiversity research and conservation. Floristic and faunistic surveys are the main purpose of the first step of the project, with mainland species, and some particular island species, as the initial targets. A very important collaboration for the island surveys is with the Royal Thai Naval Authority, especially the Naval Special Warfare Group from the Naval Fleet Command. The Navy is providing ships and crew. Naval personnel have given especially useful support to our efforts. This project is sometimes referred to as the Princess Expedition, and is the first such project run by Thais.

The mollusk survey is the part of the project that emphasizes terrestrial snails. Among the land snail taxa, the arboreal genus *Amphidromus* Albers 1850 is an important group species, genetic and ecological conservation. Panha (1996) reported 18 species of *Amphidromus* for Thailand, including a recently described new species (Panha, 1997). The distribution of *Amphidromus* is Assam, Burma, Thailand, Indochina, the Malay Peninsula, Indonesia, various Pacific islands, and northern Australia (Richardson, 198_; Laidlaw and Solem, 1961; Solem, 1965, 1966, 1983; Dharma, 1993).

Fulton (1896) and Pilsbry (1900) are standard papers for *Amphidromus* identification, although the key characters used are limited to color forms and shell morphology. Useful anatomical papers are those of Bishop (1977), Minato (1979), and the excellent paper by Solem (1983) on *Amphidromus* from Australia.

MATERIALS AND METHODS

In April 1999 and April 2000, Tachai Island (Ko Tachai) in the Andaman Sea and Kra Island (Ko Kra) in the southern Gulf of Thailand (Fig. 1) were surveyed for land snails. Two new species of *Amphidromus* were collected, one species from each island. Shell morphology, color pattern, radula and genital anatomy traditionally have been significant characters for taxon identification and systematic placement, and these characteristics are described below for the two new species.

Shells descriptions and terminology follow standard practices for land snails. For study of anatomy, the animals were [?anesthetized, how?] ... and fixed in ... The animals were removed from their shells by ... For the study of the genitalia, dissections were made by carefully cutting through the head-foot body wall, cutting the atrium near the genital pore, removing the whole genitalia (except for the ovotestis), then separating out the female and male systems, and separating the organs [in a petri dish [bottom covered with paraffin?]]. The intact genitalia were then drawn with the aid of a [?camera lucida] (Figs. 33-40). The dissected soft parts are preserved in the malacological collections of Chulalongkorn University. Radulae were carefully dissected from the buccal mass, ... and photographed with a scanning electron microscope (SEM).

DESCRIPTIONS

Amphidromus (Syndromus) principalis, new species

Description of shell (holotype): Shell large for the subgenus (height 36.1 mm, width 19.2 mm), conical, sinistral, yellow, with some mixed greenish-yellow on the last whorl, translucent, polished, with 5.5 whorls. The apex is brown, obtuse, smooth and glossy. The aperture is ovate and white in color. The peristome is white, narrowly expanded, the umbilus closed. All sutures are shallow. The snail's

Body is cream to white, with pale brown on the head and tentacles. The genitalia are similar to those of *A. (S.) glaucolarynx* (Dohrn, 1861) and *A. (S.) areolatus* (Pfeiffer 1861), but the flagellum and seminal receptacle differ by ... (Figs. 33, 34, 35, 36, 37). The epiphallus is short and has a short spatulated flagellum. The seminal receptacle is roundly bulb-shaped and has a long duct. The radula differs from other species of the genus by ... The central tooth has a single cusp; the proximal lateral teeth are bicuspid and lack ectocones. The antero-marginal and marginal teeth are tricuspid. The cusps of the marginal teeth have two or three cusps (Figs. 8, 9, 10).

Type locality: Kra Island (Ko Kra), Gulf of Thailand, 8° 23' 55" N, 100° 44' 2" E, 120 meters elevation, in a dry evergreen forest near the central peak of the island.

Habitat and geographical distribution: This species was found on leaves and trunks

Two new species of Amphidromus from Thailand with anatomical notes
on several species (Pulmonata : Camaenidae)

Somsak Panha^{1,2}, Chirasak Sutcharit¹, Anchira Maneewong¹

¹
Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Bangkok 10330

Thailand

somsakp @ sc.chula.ac.th

John B. Burch^{2,3}

² Museum of Zoology, ³ College of Literature, Science and The Arts,

And ⁴ School of Natural Resources and Environment,

University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, U.S.A.

ABSTRACT

Floristic and faunistic surveys of islands were carried out under the Plant Genetics Conservation Project on the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn in April, 1999 and 2000. Malaco-fauna on Tachai Island in the Andaman Sea and Kra Island in the Gulf of Thailand were investigated. Two new species of the tree snail genus Amphidromus were discovered. Descriptions of the new species using the shell morphology, shell color pattern, radula and anatomy of genitalia with additional anatomical notes of some other species are presented.

INTRODUCTION

The Plant Genetics Conservation Project as the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn has recently given tremendous support to Thai biodiversity research and conservation. Both floristic and faunistic surveys are the main purpose of the first step of the project. Main land and some particular island species are the targets. A very important collaboration for the island surveys is with the Royal Thai Navy Authority, especially the Naval Special Warfare Group from Naval Fleet Command for providing ships, crew members and navy men, who gave very useful supports. Sometimes this project is referred to as the Princess Expedition, the first such project run by Thais. The mollusc survey is a part of the project which emphasizes on terrestrial snails. The tree snail genus Amphidromus Alber, 1850 is an important group for species, genetic and ecological conservation. Panha (1996) reported 18 Amphidromus species found in Thailand, including a recently described new species (Panha, 1997). The distribution of the genus is over Assam, Burma, Thailand, Indochina, the Malay Peninsula, Indonesia, Pacific Islands and Northern Australia (Richardson, 1988; Solem 1961; 1965; 1966; 1983; Dharma, 1993).

In April 1999 and April 2000, Tachai Island (Ko Tachai) in the Andaman Sea and Kra Island (Ko Kra) in the southern Gulf of Thailand (Fig. 1) were surveyed. Two new species of Amphidromus were collected, one species from each island. Shell morphology, color pattern, radula and anatomy of genitalia are significant characters for identification.

Fulton (1896) and Pilsbry (1900) are standard papers for Amphidromus identification; however, the key characters used are color forms and shell morphology. The anatomical papers are from Bishop (1977), Minato (1979) and the paper on Amphidromus from Australia, with anatomical notes on several species written by Solem in 1983 as excellent anatomical information.

DESCRIPTION

Family CAMAENIDAE Pilsbry, 1893

Genus Amphidromus Albers, 1850

Amphidromus (Syndromus) principalis new species

(Figures 2-3)

Description (Holotype) : Shell large sized for the subgenus (height 36.1 mm, width 19.2 mm), conical, sinistral, yellow, with some greenish yellow mixed on last whorl, translucent, polished with 5.5 whorls. The apex is brown, obtuse, smooth and glossy. The aperture is ovate, white color. The peristome is white, narrowly expanded, the umbilicus closed. All sutures are shallow. Whole body is cream to white with pale brown on head and both tentacles. Genitalia is almost similar to of A. (S.) glaucolarynx (Dohrn, 1861) and A. (S.) areolatus (Pfeiffer, 1861) but the flagellum and receptaculum seminis are different with specific characters of the new species (Fig. 33, 34, 35, 36, 37). Epiphallus is short with short spatulated flagellum. Receptaculum seminis is round bulb shaped with long posterior part of receptaculum seminis stalk. Radula is different from any other Amphidromus species. The central is monocuspid but early

lateral is bicuspid without ectocone. Latero-marginal and marginal teeth are tricuspid, giving two scrapes ectocone at marginal teeth (Fig. 8, 9, 10).

Type locality : Kra Island (Ko Kra), Gulf of Thailand at 120 metres elevation ($8^{\circ}23' 55''$ N $100^{\circ} 44' 2''$ E), dry-evergreen forest near the central peak of the island.

Habitat and geographical distribution : The new species found on tree leaves and trunks. The known localities of the new species are at the type locality, and some similar old shells were collected from Wua Ta Lab Island of Ang Thong Marine National Park at $9^{\circ} 38' 6''$ N $99^{\circ} 48' 16''$ E.

Variability : The shell height of the type material ranges from 24 to 36 mm, the shell width from 13 to 19 mm (Table 1).

Type material : The holotype (CUBMZ 6336) and fourteen specimen paratypes (CUBMZ 6337) are deposited in Chulalongkorn University Museum of Zoology. Twelve specimen paratypes (CUBMZ 6338) are kept at National Museum of Natural History (NMNH), Washington D.C.; The Field Museum of Natural History (FMNH), Chicago; University of Michigan Museum of Zoology (UMMZ), 4 specimens for each museum.

Etymology : The specific epithet “principalis” is from the Latin meaning “princess”, that is referred to Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn who chaired the Plant Genetics Conservation Project on the Royal Initiative. The project is now the great activity to support biodiversity in Thailand.

Discussion : Amphidromus (Syndromus) principalis new species is distinctly different from other Amphidromus (Syndromus) species in having whole yellow shell with all sinistral population. Anatomical data of genitalia is similar to that of A. (S.) glaucolarynx (Dohrn, 1861) and A. (S.) areolatus (Pfeiffer, 1861), but the flagellum and receptaculum seminis are distinctly different.

Amphidromus (Amphidromus) classarius new species

(Figure 20-21)

Description (Holotype) : Shell medium sized for the subgenus (height 37.9 mm, width 20.15 mm), conical, sinistral, greenish , translucent, polished with six whorls. The apex is almost white, little obtuse, smooth and glossy. The last whorl is convex and has a dark oblique band at 5 whorls. The aperture is ovate yellowish within, and pale brown at

columella, white at outer and inner lip. The peristome is white, narrowly expanded; the umbilicus closed. All sutures are shallow. Whorl sizes increased two times respectively from the first to last whorl. Whole body is cream with brown tentacles, foot sole has pale orange color while A. (A.) atricallosus has bright orange color. Genitalia is similar to of A. (A.) inversus but the flagellum is longer, but anterior part of receptaculum seminis stalk are quite shorter. The shape of receptaculum seminis is distinctly different from of A. (A.) atricallosus with round shape (Fig. 38, 39, 40). Central tooth of radula is monocuspid but lateral teeth are bicuspid. Latero-marginal and marginal teeth are tricuspid which is a bit larger than central and early lateral teeth, giving a small sharp ectocone (Fig. 24, 25, 26).

Type locality : Tachai Island (Ko Tachai), the Andaman Sea, near Pang Nga Province at 10 metres elevation (9° 4' 9" N 97° 49' 1" E), dipterocarp forest near sandy beach on the eastern side of the island.

Habitat and geographical distribution : The new species found on tree leaves and trunks. The only known locality of the new species is the type locality at Tachai Island.

Variability : The shell height of the type material ranges from 37.45 mm to 37.90 mm, the shell width from 20.15 mm to 21.1 mm (Table 2).

Type material : The holotype (CUBMZ 6339), four specimens and four shell paratypes (CUBMZ 6340) are deposited in Chulalongkorn University Museum of Zoology. Two shell paratypes (CUBMZ 6341) are kept at National Museum of Natural History (NMNH), Washington D.C. Two specimens paratypes (CUBMZ 6342) are deposited in Museum of Zoology, University of Michigan, Ann Arbor (UMMZ), and another three shell paratypes (CUBMZ 6343) are deposited in the Field Museum of Natural History (FMNH), Chicago, Illinois.

Etymology : The specific epithet “classiarius” is from the Latin meaning “of the Navy”, that is referred to the dedication of the Royal Thai Navy Authority which extended the responsibility to Thailand biodiversity particularly on the island project.

Discussion : Amphidromus (Amphidromus) classiarius new species is distinctly different from other Amphidromus (Amphidromus) species in having surrendered shell shape of the whole sinistral population. The shells of A. (A.) classiarius are most similar to the “perakensis”, a varied form of A. (A.) atricallosus (Gould, 1843) but differ in indistinct inflated last whorl, while A. (A.) atricallosus has great inflation. Anatomical study of genitalia of the new species is absolutely different from A. (A.) atricallosus particularly the large round shaped receptaculum seminis ,

while flagellum has long slender shape with blunt tip, but has sharp tip in A. (A.) atricallosus (Fig. 38, 39).

Remarks ; Radula structure of seven Amphidromus species showing in this paper (Fig. 8-19 and 24-32) are almost the same in some generic characteristic for example the spatulated central tooth with truncated tip but in A. (S.) principalis has round shape, marginal teeth are quite unique character which is different each other. The very strange shape from others is of A. (S.) glaucolarynx , with long spatulated central and early lateral teeth. The unique marginal teeth possess two scrapes endocone and three scrapes ectocone (Fig. 17, 18, 19).

Genitalia anatomy of eight Amphidromus species (Fig. 33-40) are almost the same structures. There are some unique characteristics which different each other for example in A. (S.) glaucolarynx has ample shape receptaculum seminis and short sharp tip flagellum, and the anterior part of receptaculum seminis stalk is quite inflated (Fig. 34). The flagellum of A. (S.) principalis is very short but the posterior part of receptaculum seminis stalk is very long. Receptaculum seminis of almost all species are round shape but in A. (A.) atricallosus long slender or finger-like shape (Fig. 38).

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Plant Genetics Conservation Project on the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, and the joint management of the Royal Thai Navy Authority, particularly the Naval Special Warfare Unit gave their kind assistance and made the island studies possible. Special thanks go to the following people who organized the field studies until all surveys were successful : Dr. Pisit Woraurai, Dr. Pornchai Chutamas, Dr. Pusatee Pariyanont, Captain Winai Klom-in, Commander, Naval Special Warfare Group and CDR. Apakorn Youkongkaew, Chief of Staff Naval Special Warfare Group.

Thanks are also due to Professor Hidetoshi Ota of Ryukyu University, Japan and Paul Greenhall of the National Museum of Natural History, Washington D.C., for supplying references on Amphidromus, and to Dr. Rudiger Bieler of the Field Museum of Natural History, Chicago and Dr. Ronald Janssen of Senckenberg Museum, Frankfurt for kindly permitting senior author to study some type specimens of Amphidromus. The financial support for studying type specimens and

taxonomic analysis in the museums was from the Thailand Research Fund (TRF 1/1997), Chulalongkorn University and the Hitachi Scholarship Foundation, Tokyo, Japan.

LITERATURE CITED

- Bishop, M. 1977. Anatomical notes on some Javanese Amphidromus (Pulmonata : Camaenidae). Journal of Conchology 29(4) : 199-205.
- Dharma, B. 1993. Description of two new species of Amphidromus from Sumatra, Indonesia (Gastropoda) : Pulmonata : (Camaenidae). Apex 8(4) : 139-143.
- Fulton, H.C. 1896. A list of the species of Amphidromus Albers, with critical notes and descriptions of some hitherto undescribed species and varieties. Annals and Magazine of Natural History (6) 17 : 66-94.
- Laidlaw, F.F. and A. Solem, 1961. The land snail genus Amphidromus, a synoptic catalogue. Fieldiana : Zoology 41(4) : 503-677.
- Minato, H. 1979. Notes on Amphidromus (Camaenidae) from Komodo Island, Indonesia. Shells of Kyushu 13 : 15-17 (in Japanese).

- Panha, S. 1996. A checklist and classification of land pulmonate snails of Thailand. *Walkerana* 8(19) : 31-40.
- Panha, S. 1997. A new species of Amphidromus from Thailand (Stylommatophora : Camaenidae). *Malacological Review* 29 : 131-132.
- Pilsbry, H. A. 1900. *Manual of Conchology* 13(2) : 1-253.
- Richardson, L. 1985. Camaenidae : Catalog of species. Tryonia, The Department of Malacology of the Academy of Sciences of Philadelphia 12(1,2) : 5-48.
- Solem, A. 1965. Land snails of the genus Amphidromus from Thailand. *Proceedings of the United State National Museum, Smithsonian Institution* 17(3519) : 615-627.
- Solem, A. 1966. Some non-marine mollusks from Thailand, with notes on Classification of Helicarionidae. *Spolia Zoological Musei Hauniensis, Copenhagen* 24 : 1-110.
- Solem, A. 1983. First record of Amphidromus from Australia, with anatomical notes on several species (Mollusca : Pulmonata : Camaenidae). *Records of the Australian Museum* 35 : 153-166.

LEGEND FOR FIGURES

Figure 1. Map of southern Thailand showing Tachai Island (Ko Tachai) and Kra Island (Ko Kra), type localities of two new Amphidromus species.

Figure 2-7. 2. Amphidromus (Syndromus) principalis new species (Bar = 1 cm) 3. Shell of A. (S.) principalis ; 4. A. (S.) glaucolarynx ; 5. A. (S.) xiengensis ; 6. A. (S.) semitessellatus ; 7. A. (S.) areolatus (Bar = 1 cm).

Figure 8-19. Radula teeth of some Thai Amphidromus (Syndromus).
8. A. (S.) principalis central and lateral teeth ; 9. Latero-marginal teeth 10. Marginal teeth ; 11. A. (S.) xiengensis central and lateral teeth ; 12. Latero-marginal teeth ; 13. Marginal teeth ; 14. A. (S.) semitessellatus central and lateral teeth ; 15. Latero-marginal teeth ; 16. Marginal teeth ; 17. A. (S.) glaucolarynx central and lateral teeth ; 18. Latero-marginal teeth ; 19. Marginal teeth.

Figure 20-23. 20. Amphidromus (Amphidromus) classarius new species (Bar=1cm). 21. Shell of A. (A.) classarius; 22. A. (A.) atricallosus ; 23. A. (A.) inversus (Bar = 1 cm).

Figure 24-32. Radula teeth of some Thai Amphidromus (Amphidromus). 24. A. (A.) classarius central and lateral teeth ; 25. Latero-marginal teeth ; 26. Marginal teeth ; 27. A. (A.) atricallosus central and lateral teeth ; 28. Latero-marginal teeth ; 29. Marginal teeth ; 30. A. (A.) inversus central and lateral teeth ; 31. Latero-marginal teeth ; 32. Marginal teeth.

Figure 33-40. Genitalia of six species of Thai Amphidromus. 33. A. (S.) areolatus ; 34. A. (S.) glaucolarynx ; 35. A. (S.) semitessellatus ; 36. A. (S.) principalis ; 37. A. (S.) xiengensis ; 38. A. (A.) atricallosus ; 39. A. (A.) classarius ; 40. A. (A.) inversus. (Abbreviation : AG, albumen gland ; AST, anterior part of receptaculum seminis stalk ; CD, common duct ; E, epiphallus ; F, flagellum ; P, penis ; PRM, penial retractor muscle ; PST, posterior part of receptaculum seminis stalk ; RS, receptaculum seminis ; S, spermatheca ; V, vagina ; VD, vas deferens) (Bar = 1 cm).

TABLE 1. Size variation in six species of Thai Amphidromus (Syndromus)

Species	No. of Specimens	Height (mm.)			Width (mm.)			Whorls Mean
		Mean	Range	S.D.	Mean	Range	S.D.	
<u>A. (S.) glaucolarynx</u>	28	23.2	22.2-24.6	1.08	11.6	11.2-12.2	1.14	5.5
<u>A. (S.) xiengensis</u>	10	27.7	26.0-33.6	1.30	12.4	11.0-13.2	1.18	6.0
<u>A. (S.) semitessellatus</u>	6	25.1	21.4-30.3	1.34	11.4	10.2-12.5	1.17	6.2
<u>A. (S.) areolatus</u>	9	28.3	26.3-28.2	1.06	11.4	11.2-11.5	1.11	6.5
<u>A. (S.) tanyai</u>	4	21.6	21.2-22.4	1.05	11.1	10.8-11.5	1.13	5.3
<u>A. (S.) principalis</u>	34	30.14	24.2-36.1	2.65	16.6	13.2-19.2	1.27	5.7

TABLE 2. Size variation in four species of Thai Amphidromus (Amphidromus)

Species	No. of Specimens	Height (mm.)			Width (mm.)			Whorls Mean
		Mean	Range	S.D.	Mean	Range	S.D.	
<u>A. (A.) atricallosus</u>	18	37.5	33.7-43.4	4.5	21.1	20.3-23.2	2.1	6.1
<u>A. (A.) inversus</u>	12	41.3	37.6-48.2	4.0	21.5	20.0-24.1	2.0	6.0
<u>A. (A.) schomburgki</u>	8	40.8	36.4-47.1	4.7	22.4	21.1-23.8	1.2	6.25
<u>A. (A.) classarius</u>	24	37.6	37.4-37.9	0.18	20.6	20.1-21.1	0.4	6.0